

Chemisch-biologischer Ansatz für die Protein-Semisyntthese und biologische Evaluierung des N-Ras Zyklus

Dissertation

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

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

Eingereicht von Dipl.-Chem. Marc Philippé Gerauer
aus Menden

Dekan:	Prof. Dr. N. Krause
1.Gutachter:	Prof. Dr. H. Waldmann
2.Gutachter:	Prof. Dr. H. Mootz

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Allgemeiner Teil	3
1.1. Die Ras-Protein Superfamilie	3
1.2. Ras als molekularer Schalter.....	5
1.3. Posttranslationale Lipidmodifikationen	9
1.4. Der Ras Zyklus.....	12
2. Chemische Peptid-und Proteinsynthese	14
2.1. Prinzip der Festphasensynthese.....	15
2.2. Synthese lipidierter Peptide.....	17
2.3. Kupplungsreagenzien.....	19
2.4. Semisynthese modifizierter Proteine.....	22
2.5. Die Expressed Protein Ligation	24
2.6. MIC-Ligation	26
2.7. Staudinger Ligation und enzymatische Ligation.....	27
3. Ziel der Arbeit	29
4. Spezieller Teil	34
4.1. Peptidsynthese für die Photocrosslink-Experimente	34
4.1.1. Photoaktivierbare Lipopeptide.....	35
4.1.2. Synthese der Benzophenon-markierten Farnesylanaloga	37
4.1.3. Synthese des photoaktivierbaren N-Ras C-terminus an der festen Phase	41
4.1.4. Biologische Untersuchungen der Benzophenon-markierten Peptide.....	43
4.2. Peptidsynthese für die kinetischen Untersuchungen im Ras Zyklus	50
4.2.1. Synthese der prelipidierten Bausteine.....	53
4.2.2. Synthese der Lipopeptide	56
4.3. Synthese des N-Ras C-terminus unter Verwendung von β-Aminosäuren	62
4.3.1. Synthese der prelipidierten Bausteine.....	63
4.3.2. Synthese des farnesylierten β -Peptids.....	64
4.3.3. Fragmentkupplung in Lösung.....	65
4.3.4. Aufreinigung des farnesylierten β -Peptids.....	66
4.3.5. Synthese des N-Ras C-terminus unter Verwendung von β -Aminosäuren und Lipidierung am Harz	67
4.3.6. Fragmentkupplung in Lösung.....	72
4.3.7. Synthese des palmitoylierten und farnesylierten β -Peptids	74

4.3.8.	Aufreinigung des β -Peptids	75
4.4.	Biochemische Experimente	76
4.4.1.	Mikroinjektion der gelabelten semisynthetischen Proteine	76
4.4.2.	Mikroinjektion des CysFar-Konstruktes (2)	76
4.4.3.	Mikroinjektion des PalFar-Konstruktes (3)	78
4.4.4.	Ergebnisse der Mikroinjektion der semisynthetischen Proteine	81
4.4.5.	Prozesse nach der Mikroinjektion.....	83
4.5.	Sulfonamid Linker	85
4.5.1.	Syntheschema für den Ellman-Linker	87
4.5.2.	Experimente zur Racemisierung.....	90
4.6.	ADIFAB-Assay	96
5.	Zusammenfassung und Ausblick	102
5.1.	Ras Zyklus.....	102
5.2.	Linker-Systeme	106
5.3.	Ellman-Linker	107
6.	Experimenteller Teil	109
6.1.	Allgemeines	109
7.	Versuche zu dem Kapitel 4	113
7.1.	Allgemeine Arbeitsweise	113
7.2.	Synthese am Hydrazid-Harz	115
7.3.	Synthese am Ellman-Linker.....	118
7.4.	Synthese am Tenta Gel R PHB Harz	120
7.5.	Synthese der Cysteinderivate	123
7.6.	Synthese der β -Cysteinderivate.....	134
7.7.	Synthese der Peptide für die Racemisierungsversuche	140
7.8.	Synthese der Lipopeptide.....	144
7.9.	ADIFAB-Assay.....	167
8.	Literatur- & Abkürzungsverzeichnis	169

Einleitung

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

Die Entwicklung der Naturwissenschaften ergründet sich in dem tiefen Verlangen der Menschen am Verständnis der Natur.

Bei der heutzutage immer wichtigeren Betrachtungsweise des Lebens auf molekularer Ebene ist die Notwendigkeit gegeben, verschiedene wissenschaftliche Disziplinen zu kombinieren, um die entscheidenden Einsichten zu erhalten.

Somit konnten mittlerweile durch immer verfeinerte Analysetechniken aus der Physik (vom Mikroskop bis zum konfokalen Lasermikroskop) Auflösungen erzielt werden, die unter der Abbeschen Beugungsgrenze (STED-Mikroskop) liegen.^[1]

Die rekombinante Gentechnik liefert die Hilfsmittel um maßgeschneiderte Proteine zu erzeugen, die den jeweilig zugrundeliegenden Fragestellungen gerecht werden. So ist im Jahr 2006 durch Kombination von STED-Mikroskopie und einem GFP-Protein (*green-flourescent-protein*), das mit einer ER-(Endoplasmatisches Retikulum) Sequenz fusioniert war, erstmalig eine 70nm laterale Auflösung in Zellen gelungen.^[2] Dies zeigt den enormen Wissenssprung der heute durch die Life-Science Wissenschaften möglich ist. Weitere Meilensteine waren die Knüpfung zweier Peptid- bzw. Proteinfragmente durch native chemische Ligation oder durch MIC-Ligation, die Zugang zu nicht natürlichen bzw. nicht vollständig prozessierten Proteinsequenzen erlaubte.^[3,67] Diese Sachverhalte ließen sich durch unzählige weitere Beispiele illustrieren.

So ist es selbstschlüssig, dass Disziplinen entstanden sind, die ihren Ursprung in den drei Schlüsselnaturwissenschaften Biologie, Chemie und Physik hatten und deren Zielsetzung es ist, die molekularen Grundlagen des Lebens zu lösen. Hier seien Disziplinen wie Chemische Biologie, Neurowissenschaften oder Biotechnologie genannt. Gerade weil dieser molekulare Zusammenhang immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist gerade der Chemiker prädestiniert die geeigneten Werkzeuge für diese Erkenntnisgewinn zu liefern.

Die synthetische Chemie steht mittlerweile auf dem Level, entsprechende Verbindungen darzustellen.

Somit benutzt die Chemische Biologie die von der synthetischen Chemie hergestellten Stoffe, um biologische Systeme zu studieren oder zu manipulieren. Hierbei werden durch Analyse biologischer Phänomene und ihrer strukturellen Grundlagen ungelöste Probleme erkannt und mithilfe kombinierter Techniken aus Chemie und der Biologie zu lösen versucht.

Dieser Ansatz ist sinnvoll, weil sich nach der Vollendung der Entschlüsselung des menschlichen Erbguts (Genom) immer deutlicher herausstellte, dass die Anzahl der Gene nicht zum Verständnis der Funktion führt. Ebenso gibt die Anzahl der Gene keine Information über die Komplexität des Lebens. So hat Reis etwa 40-60k Gene^[4], der Mensch hingegen nur 25k Gene^[5].

So scheint das Wechselspiel zwischen den Proteinen, deren Menge und weiterer Prozessierung einen wesentlichen Einfluss zu haben. Aufgrund dessen richtet sich das Augenmerk auf die Erforschung des Proteoms (Gesamtheit aller Proteine) und nicht nur auf das Erbgut. Wohingegen durch klassische biochemische Verfahren, wie der Mutagenese, nur neue Varianten des Proteins oder der interessierten Zelle erlangt werden, benutzt die Chemische Biologie ihre Werkzeuge um es an eine spezifische Fragestellung zu adressieren.

1. Allgemeiner Teil

1.1. Die Ras-Protein Superfamilie

Ras-Proteine stehen seit mehr als zwei Jahrzehnten im Fokus der Forschung. Mutationen in den drei Ras-Genen sind zu einem hohen Prozentsatz in vielen Krebsarten zu finden, wobei je nach Krebsart die Häufigkeit stark variiert, bei Brustkrebs sind 5% und bei Bauchspeicheldrüsenkrebs 90% mutiert.^[6,7] Deswegen ist Ras zu einem der wichtigsten Ziele für die Krebstherapie geworden.

Die Geschichte von Ras geht bereits über 40 Jahre zurück, als erkannt wurde, dass bestimmte Retroviren Sarkoma-Tumore in Ratten auslösen können. In den beiden Stämmen der Retroviren, dem Harvey- und dem Kirsten Stamm wurden die Gene für die entsprechenden Onkoproteine entdeckt, die von nun an H-Ras (Harvey) und K-Ras (Kirsten) genannt wurden. N-Ras (Neuroblastoma) wurde 1983 in humanen neuroblastomischen Zelllinien entdeckt.^[8] Diese Ras-Proteine gehören zu den sogenannten kleinen G-Proteinen. Die Klasse der G-Proteine (*guanine-nucleotide-binding proteins*) teilt sich auf in heterotrimere G-Proteine und monomere kleine G-Proteine.^[9] Von diesen kleinen G-Proteinen ist die Ras-Superfamilie die am meisten untersuchte. Sie ist wiederum in fünf Unterfamilien eingeteilt: die RAS, RHO, RAB, RAN und ARF Familie (Abbildung 1).

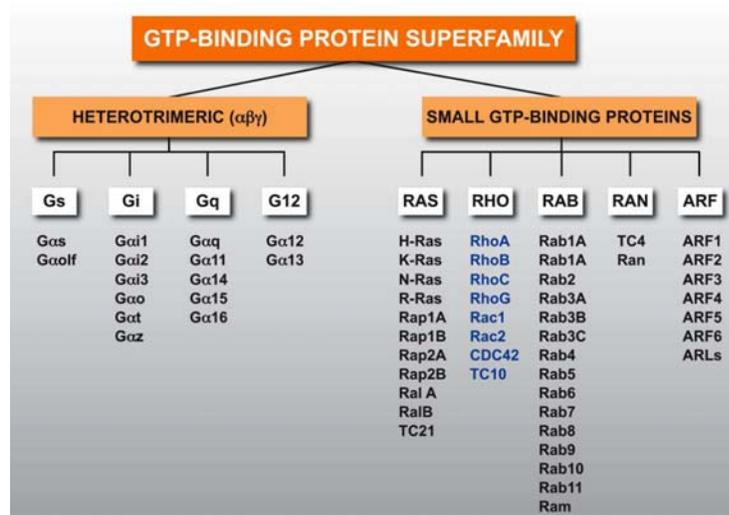


Abbildung 1: GTP-bindende Proteine

Sie fungieren allesamt als Regulatoren in wichtigen biologischen Funktionen, wie transmembraner Signaltransduktion (RAS), Cytoskelett Organisation (RHO), Genexpression (RAS, RHO), intrazellulärem Vesikel-Transport (RAB, ARF) und Mikrotubulus-Organisation (RAN).^[10]

Obwohl die Entstehung von Krebs immer noch nicht umfassend verstanden ist, erhofft man sich vom Verständnis der Signalwirkung von Ras und seinen Interaktionspartnern die Möglichkeit, gezielt in deregulierte, zelluläre Prozesse in Tumoren eingreifen zu können. Dabei gibt es eine Vielzahl von Interaktionen des Ras-Proteins mit anderen Proteinen, wie in Abbildung 2 dargestellt ist.^[11]

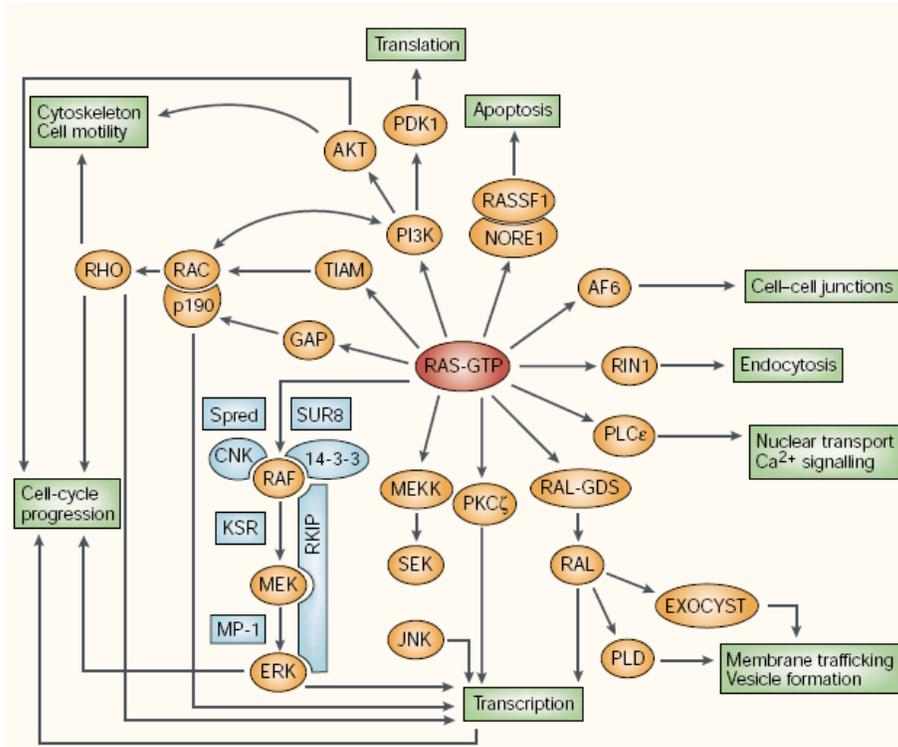


Abbildung 2: Übersicht über die verschiedenen Interaktionspartner von Ras (Malumbres, Barbacid, 2003)

1.2. Ras als molekularer Schalter

Ras ist ein Guaninnukleotid-bindendes Protein (GNBP) und kann als solches an GTP oder GDP binden und GTP zu GDP hydrolysieren. Diese Proteine werden deswegen auch als GTPasen bezeichnet. Zur Zeit werden mehr als 150 Proteine gezählt.^[12] Während die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) in der Zelle als Energielieferant für metabolische Prozesse verantwortlich ist oder für die Bewegung von Motorproteinen genutzt wird, ist die GTP-Hydrolyse hauptsächlich nur für die Regulation von GNBP zuständig.^[13] Die GNBDs werden entsprechend ihres Molgewichtes, Untereinheitstruktur und Sequenz-Homologie in fünf große Superfamilien eingeteilt: in die α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen, in die Ras Superfamilie, in die Translationsfaktoren für die Proteinbiosynthese (RF-3, EF-G, EF-Tu und IF-2), in SRP's (signal recognition particle) und seinen Rezeptor und in die großen GTP-bindenden Proteine.^[14]

Ein universelles Merkmal aller Proteine ist das Vorkommen zweier verschiedener Konformationszustände, einerseits dem aktiven GTP-gebundenen Zustand andererseits dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand.^[15] Deswegen werden die GNBP oftmals auch als molekulare Schalter beschrieben (Abbildung 3).

In ihrem aktiven Zustand interagieren sie mit sogenannten Effektorproteinen, welche dann ihrerseits das eintreffende Signal innerhalb der zellulären Signalkette weiterleiten.

Der Konformationswechsel bei den GNBP's wird hauptsächlich durch zwei konservierte Aminosäuren Sequenzen vermittelt, die mit dem γ -Phosphat des GTP interagieren.^[10] Sie werden als Switch I und Switch II Region bezeichnet. Da die intrinsische GTPase Aktivität der GNBP's sehr gering und die Nukleotid-Affinität sehr hoch ist, geschieht der Wechsel zwischen den Aktivitätszuständen nicht spontan, sondern wird über so genannte GEF Proteine (*guanine nucleotide exchange factor*) und GAP Proteine (*GTPase activating protein*) geregelt. GEFs sind für das „Anschalten“ und GAPs für das „Ausschalten“ zuständig. Ein Charakteristikum vieler GEF- und GAP-Proteine ist es, dass sie neben der Nukleotid-Austausch-Funktion eine modulare Multidomänen-Primärstruktur aufweisen.

Zu der Gruppe der GEF's zählt man z.B. SOS, RLF und RasGRF2, zu den GAP's gehören p120GAP, NF1.^[7,16] Viele dieser Domänen sind Lipid- oder Proteininteraktion-

Domänen. Es gibt aber auch Effektoren, die zwei verschiedene GEF oder GAP Domänen vereinen. Dies dient wahrscheinlich dem Zweck zwei Signalprozesse zu verbinden.^[7]

Der Austausch von GDP zu GTP verläuft über einen ternären GNBP·Nukleotid·GEF Komplex, der die Nukleotid-Affinität vom GNBP um eine Größenordnung herabsetzt. Es kommt zur Dissoziation von GDP und GNBP·GEF.^[17] Die Reaktionskaskade ist reversibel und somit könnte GDP wiederaufgenommen werden. Da aber die Konzentration von GTP im Cytosol der Zelle zehnmal höher ist, wird schließlich GTP gebunden. Die anschließende Inaktivierung erfolgt mit GAP, das die Hydrolyse von GTP zu GDP um den Faktor 10^5 beschleunigt.

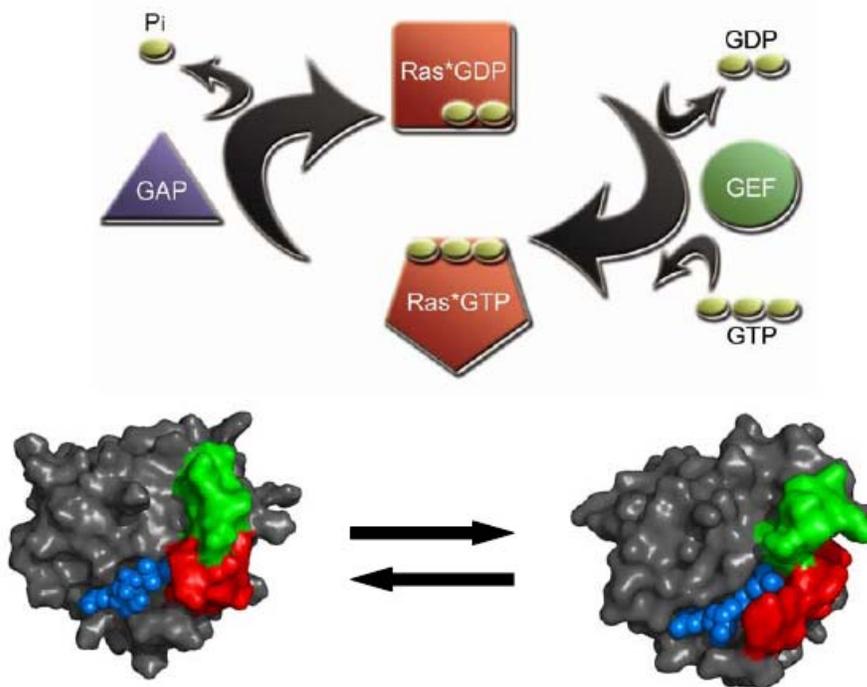


Abbildung 3: Oben: Der Ras Schaltvorgang zwischen GTP und GDP unter der Einwirkung von den Austauschfaktoren GAP und GEF. Unten: Links ist H-Ras in dem GDP-gebundenen Zustand. Rechts ist H-Ras in dem GTP-gebundenen Zustand. Nukleotid (blau), Switch I- und Switch II-Region (grün und rot)

Die GAP Reaktion ist von entscheidender Bedeutung, da in onkogenen Varianten von Ras die GTPase Reaktion blockiert ist.^[18] Aus diesem Grund ist Ras in der aktiven Form eingefroren und sendet permanent Signale aus, welche letztlich zur unkontrollierten Zellteilung beitragen. Ras ist in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert. Endpunkte

der Signalwege sind Transkriptionsfaktoren wie c-Myk, Elk-1, c-JUN oder c-Fos, die die Genexpression regulieren und somit den Zellzyklus steuern.^[19] Derzeit sind mehr als hundert Gene, deren Expression durch Ras-Proteine stimuliert oder auch inhibiert wird, bekannt.^[20,21]

Seit mehr als einem Jahrzehnt ist ein linearer Ras Signalweg von der Plasmamembran (PM), zu nuklearen Transkriptionsfaktoren bekannt.^[22] Dieser Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg wird initiiert durch das Andocken eines Wachstumsfaktors wie z.B. von EGF (epidermal growth factor) an den extrazellulären Teil einer Transmembran-Rezeptor-Kinase, wie z.B. EGFR. Der Rezeptor dimerisiert und es kommt zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinseitenketten. Diese Phosphotyrosine dienen als Andockstellen für bestimmte zelluläre Adapterproteine, die eine SH2-Domäne besitzen.^[23] Durch diese SH2-Domäne ist das spezifische Erkennen der Phosphotyrosine möglich. Im Falle von Ras bindet ein zweiteiliger Komplex, bestehend aus den Proteinen Grb2 (growth factor receptor bound 2) und dem RasGEF (*guanine nucleotide exchange factor*), SOS (*son of sevenless*) an die Andockstelle.^[24] Grb2 besteht aus einer SH2-Domäne, benötigt für die Bindung an Phosphotyrosin, und zweier SH3-Domänen, welche mit der prolinreichen Bindungsseite in der Nähe des SOS-C-terminus wechselwirken können.^[25] Da sich Ras, aufgrund seiner Lipidmodifikation ebenfalls an der Plasmamembran befindet, kommt es wegen der Anreicherung von SOS an der Plasmamembran dazu, dass im Folgenden Ras in den aktiven GTP-gebunden Zustand transferiert wird.

In diesem aktiven Zustand kann Ras das Effektorprotein Raf-Kinase (*rapid fibrosarcoma*) binden und aktivieren. Es kommt aufgrund zweier Domäne einerseits RBD (Ras binding domain) und CRD (cysteine rich domain) von Raf zur Wechselwirkung mit dem aktiven Ras.^[26] Anschließend kommt es zu einer Raf-vermittelten Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von MEK (MAPK/ERK kinase), einer Kinase, die wiederum die Ser/Thr-spezifische ERK-Kinase phosphoryliert.^[27] Diese kann nun, aufgrund der Phosphorylierung im Zytosol verschiedene Zielproteine phosphorylieren aber auch in den Nukleus eindringen, um Transkriptionsfaktoren wie Myc, Jun, Fos oder Elk-1 zu aktivieren.^[28] Die Transkriptionsfaktoren erlauben nun die Expression bestimmter Gene, die im Zellzyklus oder in der Zell-Differenzierung involviert sind.

Inzwischen wurde eine Vielzahl weiterer Effektorproteine von Ras identifiziert, die die Kommunikation mit weiteren Signalwegen ermöglichen.

So ist Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ein weiteres Effektorprotein, das von Ras-GTP an die Membran rekrutiert und dadurch aktiviert wird. Die Produkte der Enzymaktivität von Phosphatidylinositol-3-Kinase, nämlich PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat) und PtdIns3P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) dienen als Membranbindestellen für PH-(pleckstrin-homology) domänenhaltige Proteine.

Weitere, noch nicht tiefgehend charakterisierte Effektoren sind identifiziert worden, z.B. das Protein Nore1 (novel Ras effector), welches mit Apoptose in Verbindung gebracht wird.^[29,30,31] Rin1 (Ras interaction/interference) ein Effektor, der wahrscheinlich in die Regulation der Endocytose bei den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen eingreift. Ebenso die Phospholipase C ϵ -Isoform. Sie produziert die Second Messenger DAG (diacylglycerol) und IP3 (Inositol-1,4,5-triphosphate) und kann mittels ihrer Cdc25-Domäne als RasGEF fungieren und somit möglicherweise zur positiven-feedback Aktivierung von Ras beitragen.

Viele der Effektoren von Ras interagieren auch mit anderen Mitgliedern der Ras Superfamilie, ebenso können viele der oben genannten Signalwege auch von anderen Signalen als Ras-GTP ausgelöst werden. Genauso ist die zelluläre Antwort nicht nur das Ergebnis von einem einzelnen Signalweg. Ras ist eingebunden in ein Netzwerk von parallel arbeitenden oder auf Feedback basierenden Signalwegen. Somit wird es ein Ziel der Forschung sein, herauszufinden wie, trotz vielfältiger Einbindung von Ras in diese Netzwerke, letztlich eine hohe Spezifität in der zellulären Antwort gewährleistet ist.

Dabei stellt sich immer mehr heraus, dass es zum Verständnis der Feinregulation der Signalwirkung von Ras wichtig ist, nicht nur isoliert die Interaktion zwischen den einzelnen Bindungspartnern zu studieren, sondern auch die räumlich-zeitliche Aktivität von Ras zu berücksichtigen. Der Untersuchung der Dynamik der Ras Aktivität in der lebenden Zelle kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Von zentraler Bedeutung sind hierbei die posttranslationalen Modifikationen von Ras.

1.3. Posttranslationale Lipidmodifikationen

Unter posttranslationaler Modifikation versteht man die weitere Prozessierung eines Proteins nach der ribosomalen Proteinsynthese. Dies ist für die vollständige Funktion der vielen Proteine unabdingbar, da es erst dadurch zur Entfaltung der biologisch aktiven Form kommt. Beispiele für Modifikationen sind Glykosylierung, Lipidierung, Acetylierung, Methylierung, Hydroxylierung und Phosphorylierung.^[32]

Hier soll im weiteren Verlauf die Lipidierung als posttranslationale Modifizierung erläutert werden (Abbildung 4).

Signale aus der Umgebung aufzunehmen und in geeigneter Weise zu antworten, ist eine der wichtigsten Fähigkeiten von Zellen, um ihre Existenz zu behaupten. Dieser Prozess der Signalweiterleitung beinhaltet, dass ein Signal aus der extrazellulären Matrix durch das Zytoplasma in den Nukleus geleitet werden kann. Dies verlangt neben vielen anderen Proteinen auch solche, die mit einem hydrophoben Rest am Peptidrückrat modifiziert werden können.

Die Mehrheit aller Signaltransduktionsprozesse findet auf Membranoberflächen statt. Die Zweidimensionalität der Reaktionen hat zwei Vorteile. Zum einen kann die effektive Konzentration der Reaktionspartner enorm erhöht werden. Zum anderen kann die Zelle aus einem limitierten Pool an Genprodukten individuelle, lokale Signalplattformen zusammenstellen, entweder in Mikrodomänen derselben Membran wie z.B. den sogenannten Rafts der PM, oder aber auch auf verschiedenen membranumhüllten Organellen. Dies trägt zum einen zu einer erhöhten Diversifität in der Signaltransduktion bei, zum anderen kann aber auch die Spezifität der biologischen Antwort einer Signalkaskade feinreguliert werden.

Diese posttranslationale Modifizierung kann durch Acylierung von Fettsäuren, Alkylierung mit Prenylgruppen oder durch Knüpfung komplexer Lipidkomponenten, wie z.B. durch GPI (glycosylphosphatidylinositol), geschehen. Ein Beispiel für lipidmodifizierte, membranverankerte Proteine sind die Ras-GTPasen (Abbildung 5). Ras Proteine weisen ein sogenanntes CAAX-Motiv am C-terminus auf.^[33] Dabei steht das C für ein Cystein, A für eine aliphatische Aminosäuren und X für irgendeine Aminosäure , die sich am C-terminus befinden.

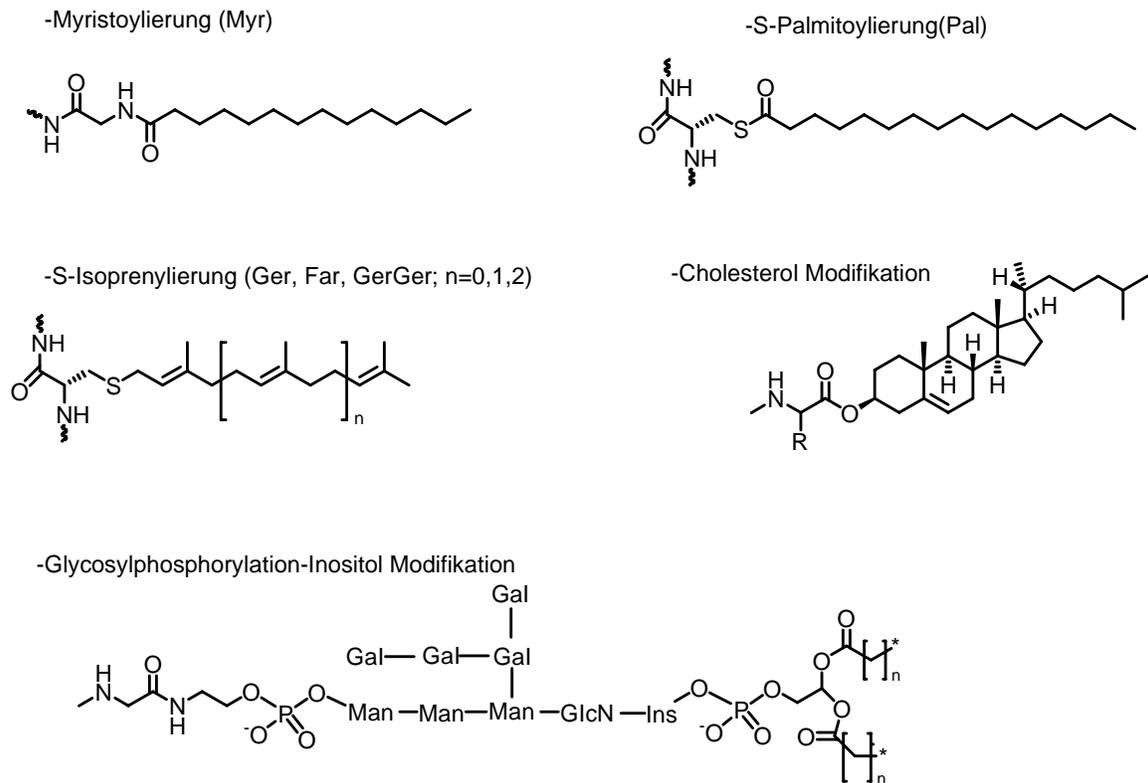


Abbildung 4 : Übersicht über die verschiedenen Lipidierungs-Motive bei membranbindenden Proteinen

Nach der Neusynthese des Proteins unterliegt dieses CAAX-Motiv posttranslationaler Modifikation. Die erste Modifikation ist eine enzymvermittelte kovalente Knüpfung eines Farnesyl- oder Geranylgeranylrestes, um eine hydrophobe Domäne für spätere Wechselwirkungen mit Membranen zu schaffen. Dabei wird die aktiv vorliegende Form, entweder Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat, enzymatisch an das freie Cystein der CAAX-Box angeknüpft. Die beteiligten Enzyme sind FTase (Farnesyltransferase) oder GGTase I (Geranylgeranyltransferase I).^[34] Ein Farnesylrest wird nur dann kovalent an das Cystein der CAAX-Box geknüpft, wenn die CAAX-Sequenz nicht mit Leucin endet, wohingegen Geranylgeranylrest nur bei Endung auf Leucin an das Cystein gebunden wird.^[6] Hierbei ist herauszustellen, dass nur H-Ras einfach farnesyliert wird. N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B können sowohl farnesyliert als auch geranylgeranyliert werden.

Nach erfolgreicher Prenylierung wird die Membranaffinität der Ras-Proteine an der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums durch weitere Prozessierungsschritte erhöht. Hier werden die letzten drei C-terminalen Aminosäuren durch die Endoprotease RCE1 (Ras converting enzym 1) abgespalten und die freie Carboxylgruppe durch das Enzym ICMT (isoprenylcysteine carboxymethyltransferase) in eine Methylestergruppe umgewandelt.^[31] Kras4B kann sich nun an der Plasmamembran aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen dortigen negativ geladenen Phospholipiden und eines polybasischen Bereichs am C-terminus anreichern. Diese Wechselwirkung mit der PM kann durch die Phosphorylierung eines C-terminalen Serin-Restes geschwächt werden, in dessen Folge sich K-Ras4B unspezifisch auf Endomembranen anreichern kann.^[35]

Die übrigen Ras Formen, N-Ras, K-Ras4A und H-Ras, werden am Golgi palmitoyliert, um anschließend über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran zu gelangen.^[36]

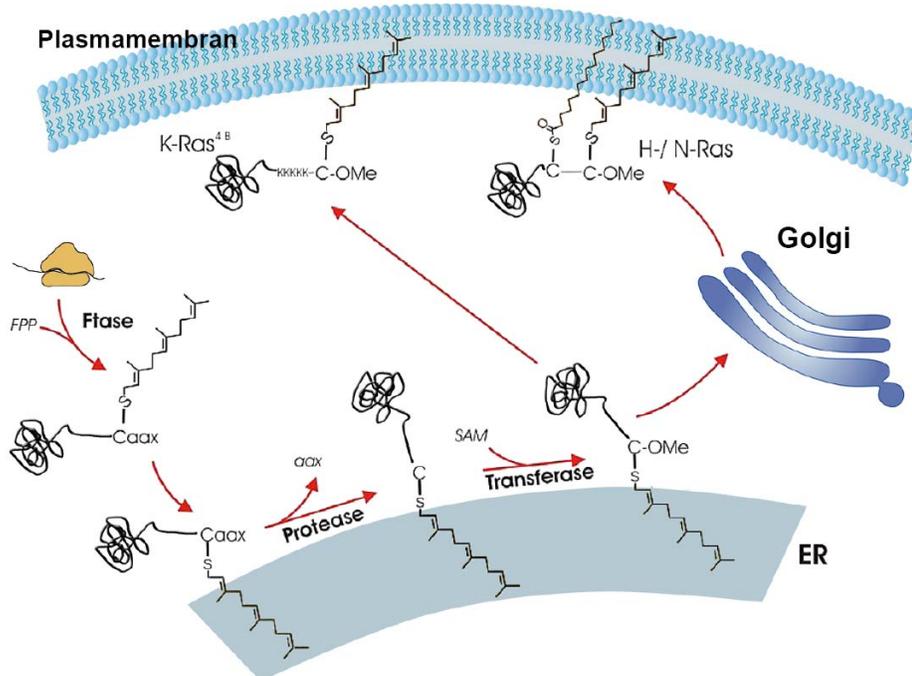


Abbildung 5: Prozessierung von N/H-Ras und K-Ras. Nach der ribosomalen Synthese erfolgt die Prenylierung, Abspaltung der CAAX-Box, Generierung des Methylesters und anschließender Palmitoylierung am Golgi (H/N-Ras). K-Ras wird nicht palmitoyliert.

1.4. Der Ras Zyklus

Die Zelldifferenzierung und die Zellteilung gehören zu den grundlegendsten Antworten auf extrazelluläre Reize. Obwohl beide durch die gleichen Regulatoren initiiert werden, kann die Endantwort in der Zelle nicht unterschiedlicher sein.^[37] Teilende Zellen werden in praktisch die gleiche Zelle geteilt, wohingegen bei der Differenzierung ein neuer Typus entsteht. Dieser enorme Unterschied wird darin begründet, dass die Zellantwort maßgeblich dadurch gesteuert wird, in welcher örtlichen Umgebung das für die Antwort spezifische Protein sich befindet. Durch diese präzise räumliche Verteilung von den verschiedenen Ras Isoformen ist es erst möglich, die Diversität und Spezifität der Ras vermittelnden Signaltransduktion zu kontrollieren.

Ursprünglich wurde angenommen, dass Ras ausschließlich an der Plasmamembran biologisch aktiv ist. Erst Chiu et al. zeigten, dass die Oberfläche des Golgi-Apparats als zusätzliche Signalplattform fungieren kann und das Ras möglicherweise eine von PM Ras unterschiedliche Signalwirkung haben kann.^[38,39]

Aufschluss über den Mechanismus der örtlich-zeitlichen Kontrolle der Ras Aktivität ergaben die Untersuchungen von Bastiaens et al.^[36] Dazu wurden fluoreszenz-gelabelte H- und N-Ras Konstrukte in Zellen exprimiert und deren zelluläre Lokalisation an der Plasmamembran und dem Golgi mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskopes beobachtet. Nach selektivem Photobleaching der Ras-Fluoreszenz am Golgi kehrte diese nach nur wenigen Minuten wieder zurück. Ebenso wurden Experimente mit photoaktivierbaren Ras-Konstrukten durchgeführt. Diese wurden selektiv an der Plasmamembran aktiviert und man konnte ebenfalls nach kurzer Zeit das Aufkommen von Fluoreszenz am Golgi beobachten. Diese und weitere Experimente ließen den Rückschluss auf einen Rücktransport von Ras von der PM zum Golgi zu (Abbildung 6). Diese Erkenntnis des Rücktransportes war neu, da bisher nur angenommen wurde, dass Ras nach der Biosynthese vom Golgi zur Plasmamembran gelangt, aber nie wieder zurück. Um zu prüfen, ob dieser Rücktransport durch einen Zyklus von Depalmitoylierung an der PM und Repalmitoylierung am Golgi zustande kommt, wurden semisynthetische Protein-Konstrukte verwendet. Diese beinhalteten ein C-terminal und Cy5-gelabeltes verkürztes Ras-Protein, das mit einem synthetischen Peptid durch MIC-

Ligation verbunden wurde. Dafür wurden zwei Konstrukte angefertigt, eines das dem natürlichen N-Ras entsprach, indem es eine Palmitoyl- und Farnesylgruppe (PalFar) enthielt.

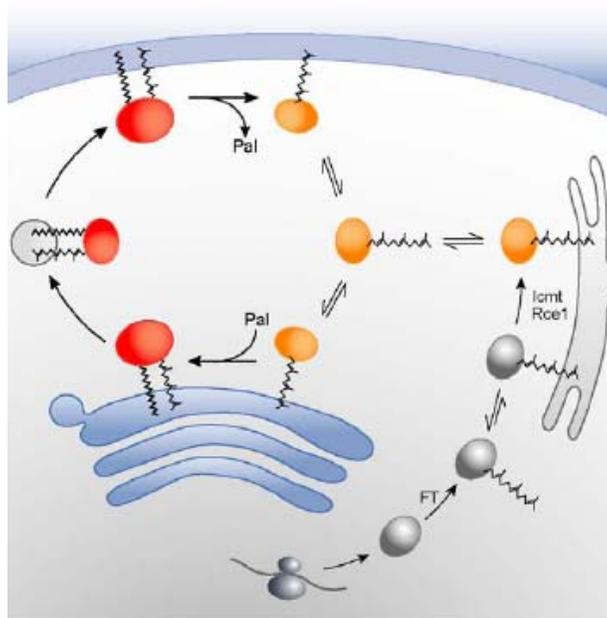


Abbildung 6. Ras-Zyklus: Das gelbe Konstrukt soll das einfach farnesylierte Ras repräsentieren. Das rote Konstrukt repräsentiert das palmitoylierte und farnesylierte Konstrukt.

Das andere enthielt eine Hexadecyl- und eine Farnesylgruppe (HDFar). Dabei war das Hexadecyl (HD) über einen Thioether mit dem Cystein verbunden, was es im Gegensatz zu der Thioestergruppe der Palmitinsäure inert gegenüber einer Abspaltung macht. Nachdem beide mikroinjiziert wurden, werden zwei deutliche Unterschiede klar. Das PalFar-Konstrukt lokalisierte wie das zelluläre N-Ras an der PM und am Golgi. Im Gegensatz dazu verteilte sich das HDFar-Konstrukt unspezifisch in der ganzen Zelle auf den verschiedenen Membrankompartimenten. Dies zog die Schlussfolgerung nach sich, dass ein kontinuierlicher Zyklus von De- und Repalmitoylierung für die korrekte zelluläre Lokalisation von Ras erforderlich ist. Nicht die biophysikalischen Eigenschaften der Lipid-Anker alleine genommen sorgen für die korrekte Zielsteuerung von Ras. Ohne die Dynamik der Lipidmodifikationen würde sich mehrfach lipid-modifiziertes Ras langfristig Entropie-gesteuert über alle Membranen verteilen.^[36] Das Modell sieht vor, dass vollständig lipid-modifiziertem Ras an der PM depalmitoyliert wird. Das lediglich

farnesylierte Protein verteilt sich nun durch abwechselnde zytosolische Diffusion und kurzzeitige unspezifische Membraninsertation rasch über alle Membranen. Repalmitoylierung erfolgt dann am Golgi, wodurch das Protein wieder stabil membranverankert wird und erneut in den anterograden sekretorischen Transportweg eingeschleust wird, um dann über Vesikel zurück an die PM zu gelangen.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieser Zyklus nicht nur für N- und H-Ras gilt. Der bloße Ras C-terminus an YFP fusioniert oder ein durch eine Punktmutation geranylgeranyliertes Ras Konstrukt sind diesem Zyklus ebenso unterworfen wie eine N-terminal myristoylierte und palmitoylierte Proteinsequenz in Fusion mit YFP. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass der De- und Repalmitoylierungszyklus ein universeller Mechanismus ist, der die zelluläre Lokalisation vieler, wenn nicht aller palmitoylierten, peripheren Membranproteine kontrolliert.^[40]

2. Chemische Peptid- und Proteinsynthese

Im Jahr 1963 fand sich in der Zeitschrift *Annual Reports on the Progress of Chemistry*^[41] im Bereich Peptidchemie eine Bemerkung auf die kürzlich vorher veröffentlichten Ergebnisse von Bruce Merrifield :

“A novel approach to peptide synthesis has been the use of a chloromethylated polystyrene polymer as an insoluble but porous solid phase on which the coupling reactions are carried out. Attachment to the polymer constitutes protection of the carboxyl group (as a modified benzyl ester), and the peptide is lengthened from its amino-end by successive carbodiimide couplings. The method has been applied to the synthesis of a tetrapeptide, but incomplete reactions lead to the accumulation of by products. Further development of this interesting method is awaited.”

Der letzte Satz ließ bereits darauf schließen, welche stürmische Entwicklung noch folgen würde. Heute gehören synthetische Peptide und Proteine zu den wichtigsten Werkzeugen in der chemisch-medizinischen Forschung. Die Peptidbindung spielt eine zentrale Rolle in der Biochemie. Sie ist einerseits gekennzeichnet durch Koplanarität der am Stickstoff gebundenen Gruppen, der Rotationsbarriere um die C-N Bindung, wie dieser verkürzten

Bindungslänge, als auch einer gewissen Stabilität gegenüber nukleophilen Angriff. All diese Eigenschaften beruhen auf der Delokalisation des freien Elektronenpaares am Stickstoff über das CNO- π -System. Dabei ist besonders herauszustellen, dass sich die Peptidbindung mit ihren Donor- und Akzeptoreigenschaften an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Dadurch kommt es zu der intrinsischen dreidimensionalen Struktur eines Proteins und somit erst zur Entfaltung seiner Wirkung. Der Beginn der Peptidchemie 1903 wird durch Verbindungen wie L-Glycinglycin von *Fischer* betrachtet^[42], die Cbz-Schutzgruppe wurde von *Zervas* und *Bergmann* 1932 eingeführt^[43]. Das erste Peptidhormon Oxytocin wurde 1953 von *du Vigneaud* synthetisiert.^[44,45] Schließlich folgte 1963 die Entdeckung der Festphasensynthese von Peptiden durch *Merrifield*, der anschließend im Jahre 1964 innerhalb von wenigen Tagen das Nonapeptid Bradykinin synthetisieren konnte.^[46,47] *Carpino* führte 1970 die Fmoc-Schutzgruppe^[48] ein, 1973 kam schließlich das Wang-Harz^[49] auf den Markt. Diese Entwicklung hält bis heute an und neben neuen Harzen und Schutzgruppen und funktionalisierten Peptiden ist ebenso die rasante Entwicklung neuer Kupplungsreagenzien zu nennen.

2.1. Prinzip der Festphasensynthese

Die Festphasensynthese insbesondere die Peptidfestphasensynthese beruht auf dem Prinzip eines polymeren reaktiven Trägers, der in einem Lösungsmittel gequollen und weiter mit einem Substrat funktionalisiert werden kann (Abbildung 7). Diese Funktionalisierung führt dazu, dass durch weitere repetitive Schritte andere Substrate an das zuerst immobilisierte angebracht werden können. Durch die Unlöslichkeit des Trägers können die Reagenzien im hohen Überschuss verwendet, da diese im folgenden Schritt abfiltriert werden können. Wurden ursprünglich die Substrate direkt an den chlormethylierten Polystyrol-Träger aufgebracht, sind heute Linker-Systeme üblich, bei denen zwischen dem Polystyrol-Harz und der funktionellen Gruppe ein Spacer eingebracht ist, der es aufgrund seiner chemischen Beschaffenheit erlaubt unter verschiedensten Bedingungen das Endprodukt abzuspalten.^[50]

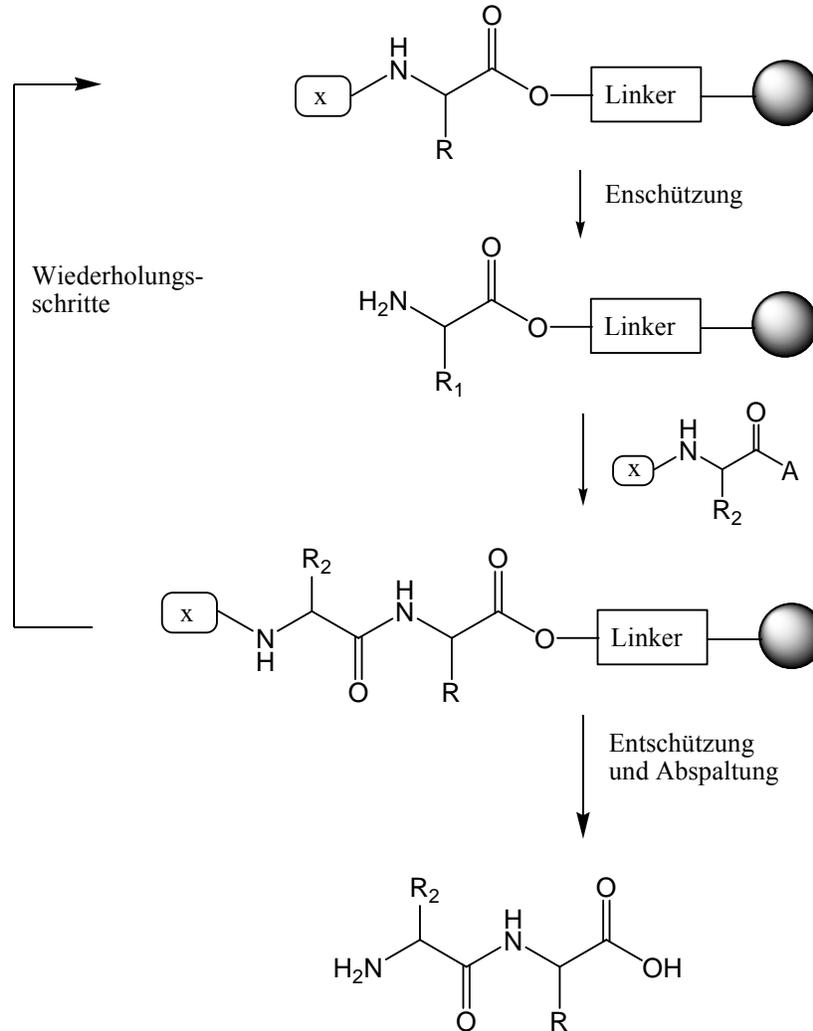


Abbildung 7: Prinzip der Festphasensynthese für Peptide

Ein Linker ist dadurch gekennzeichnet, dass er als bifunktionelle Schutzgruppe anzusehen ist. Eine funktionelle Gruppe ist mit dem zu synthetisierenden Molekül verbunden, wobei diese Bindung unter den Abspaltungsbedingungen einfach zu brechen sein sollte (z.B. Silylether, Ester). Der andere Teil ist mit der polymeren Matrix über eine stabile Bindung verbunden (z.B. Ether, Amid).

Einige dieser Linker basieren tatsächlich auf Schutzgruppen und eine grobe Einteilung kann deshalb auf ihre Spaltungsbedingungen bezogen werden: säurelabil, photolabil, oxidativ, und traceless (Abbildung 8).

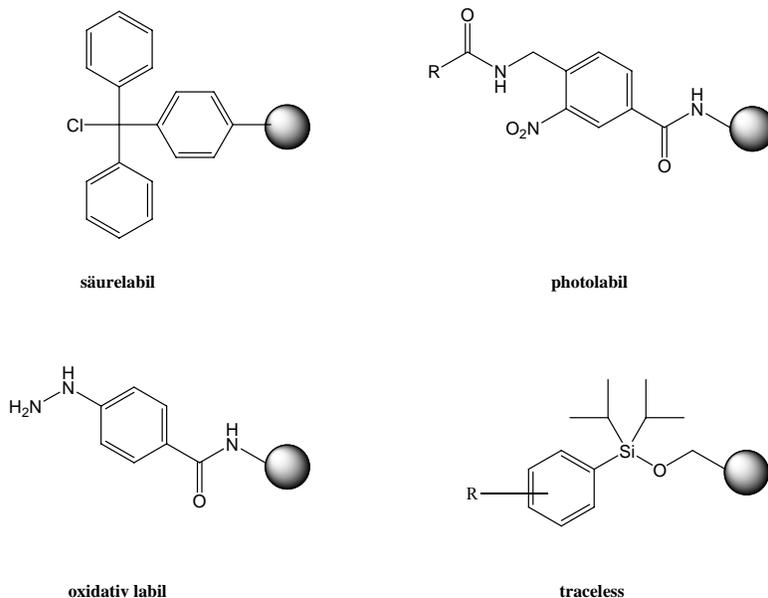


Abbildung 8: Verschiedene Linker-Systeme

Besonders in dieser Einteilung sind die so genannten Traceless- oder Safety-Catch Linker. Bei den Traceless kommt es, wie der Name schon sagt, zu Abspaltung keiner funktionellen Gruppe, stattdessen wird eine C-H- oder C-C-Bindung generiert. Bei den Safety-Catch Linkern findet der Abspaltungsprozess über zwei Stufen statt, i. Allg. findet zuerst eine Aktivierung statt, gefolgt von der Abspaltung mit einem spezifischen Reagenz.^[51] Um letztendlich ein Peptid an fester Phase aufzubauen, bedarf es sogenannter Kupplungsreagenzien, um die Reaktivität zu steigern.

2.2. Synthese lipidierter Peptide

Die Synthese lipidierter Peptide ist trotz der großen Fortschritte der letzten Jahre (über die Synthese in Lösung bishin zur Festphasensynthese) immer noch als sehr anspruchsvoll anzusehen.^[52,53] Peptidbindungen und Esterbindungen gelten immer noch als die am schwierigsten zu erzeugenden Bindungen (Zitat- A.Fürstner, Vorlesung). Die

2.3. Kupplungsreagenzien

Das Feld der Kupplungsreagenzien wird sehr gut in den Reviews von Han und Albericio wiedergegeben, weswegen hier nur eine kleine Übersicht über dieses Themengebiet gegeben wird.^[55,56]

Zur Bildung einer Amidbindung bedarf es einer gewisser Aktivierung, da Säure und Amin keine spontane Reaktion eingehen. Ein Problem bei dieser Aktivierung ist die Racemisierung. Diese kann einerseits durch die Enolform des Aktivesters geschehen, hauptsächlich wird die Racemisierung aber durch die intermediäre Bildung eines Oxazolins hervorgerufen (Abbildung 10). Aus diesem Grund werden Peptide von dem C- in Richtung des N-Terminus aufgebaut.

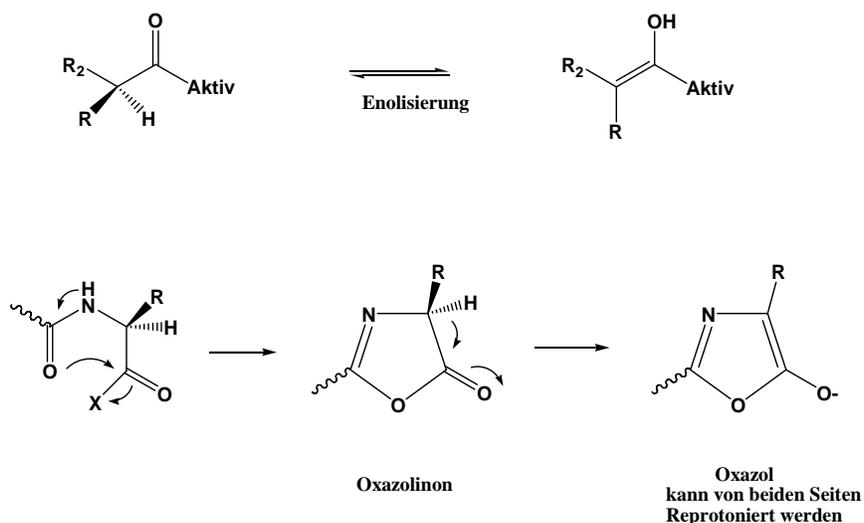


Abbildung 10: Racemisierungsprozess

Allerdings tritt die Racemisierung zurück, wenn N-terminal ein Urethan vorliegt, was dadurch erklärt werden könnte, dass der +M Effekt des O-Atoms beim Urethan zusätzliche Elektronendichte in die C=O Gruppe gibt und somit die Acidität des N-H erniedrigt. Des Weiteren ist ein entscheidender Faktor die Wahl des Kupplungsmittels. Insgesamt kann man die Kupplungsmittel in acht Gruppen aufteilen. Zusätzlich zu den Kupplungsreagenzien werden mittlerweile Beschleuniger eingesetzt, die auch gleichzeitig die Racemisierung unterdrücken (HOBt, HOAt). Es ist aber nicht möglich eine generelle Vorhersage zu treffen, für welche Reaktion ein bestimmtes Reagenz einzusetzen ist.

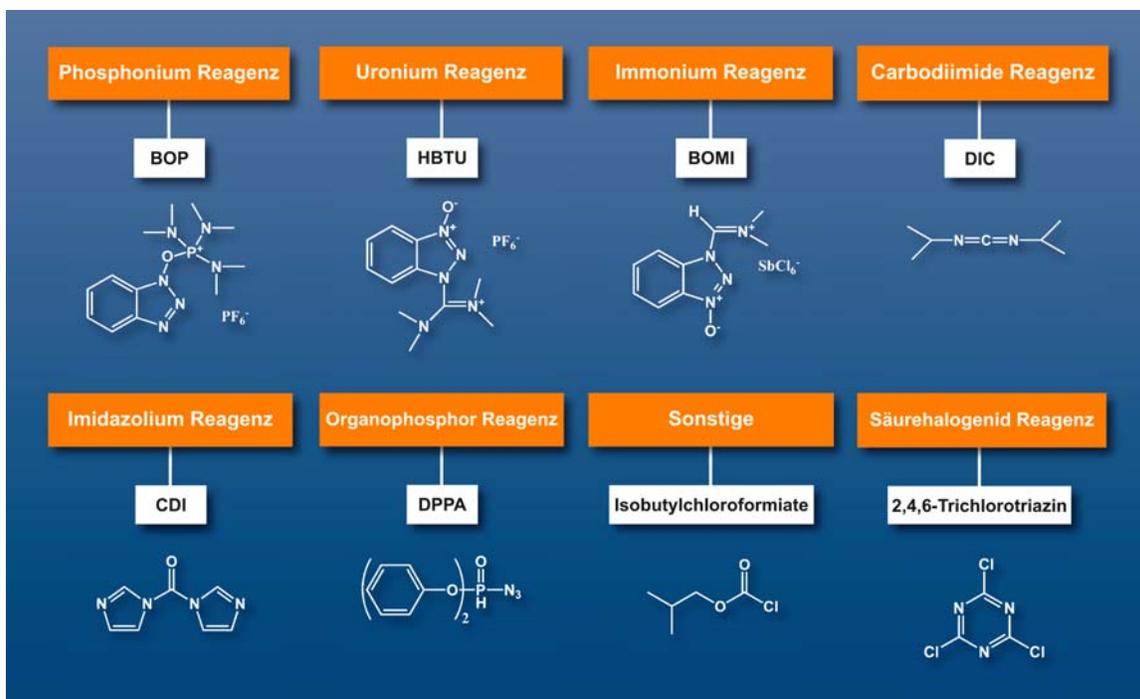


Abbildung 10: Übersicht Kupplungsreagenzien

Bei den Carbodiimide hat sich herausgestellt, dass die Oxazolone-Formierung begünstigt wird, wenn eine N-carboxyamid Schützung vorliegt, wohingegen eine Carbamat-Schützung eine geringere Tendenz zur Racemisierung aufweist.^[57] Hierbei hat sich CuCl_2 als hilfreiches Reagenz erwiesen, da es die Racemisierung des Oxazolone-Intermediates unterdrückt.^[58,59] Ebenfalls zeigen mechanistische Studien, dass zuerst ein Ionenpaar-Intermediat gebildet wird (Abbildung 11). Dies erklärt den experimentellen Befund, dass DCC mit Essigsäure 30-mal langsamer in der Gegenwart von Triethylamin reagiert.^[60]

Im Falle der Uronium Reagenzien (z.B. HBTU) hat sich herausgestellt, dass die Zugabe von 1 eq HOBt nicht nur die Reaktion beschleunigt, sondern auch die Racemisierung unterdrückt.^[61] Untersuchungen zeigten bei Verwendung von Fmoc-geschützten Aminosäuren, dass die Basenwahl erheblichen Einfluss auf den Grad der Racemisierung bei Fmoc-Serin oder Cysteinderivaten hat.^[62,63]

Selbst die Schutzgruppen scheinen Einfluss auf die Ausbeute zu haben. Nachdem Austausch der *t*-Butyl- gegen eine Trityl-Gruppe am Serin, ergab die Trityl-Variante eine Reinheit von 98 % gegenüber 68% bei der *t*-Bu-Schützung.^[64] Mittlerweile besteht die Möglichkeit chemoselektive Kupplungen mittels Phosphoniumreagenzien zu erzielen.

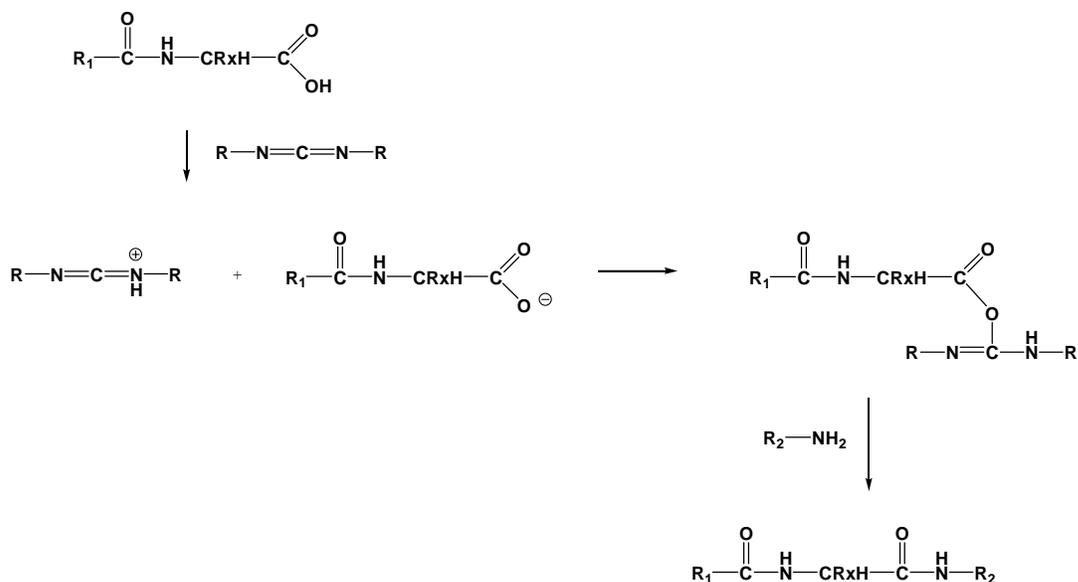


Abbildung 11: Aktivierung mit Carbodiimiden.

So kann durch diese bei einer Thio Säure entweder das Thioamid oder das Amid gebildet werden (Abbildung 12). So wurde bei Verwendung des Kupplungsreagenzes PyNOP das Thioamid gebildet, hingegen bei der Verwendung von PyBrop das Amid.^[65]

Das Kupplungsreagenz DEPBT (Abbildung 13) wurde für die Synthese von Peptiden eingesetzt, wobei teilweise auf Schutzgruppen verzichtet wurde.^[66] Diese Selektivität, sonst nur bei enzymatischen Reaktionen (z.B. Thermolysin) gefunden, zeigt, dass Kupplungsreagenzien selektiv reagieren können.

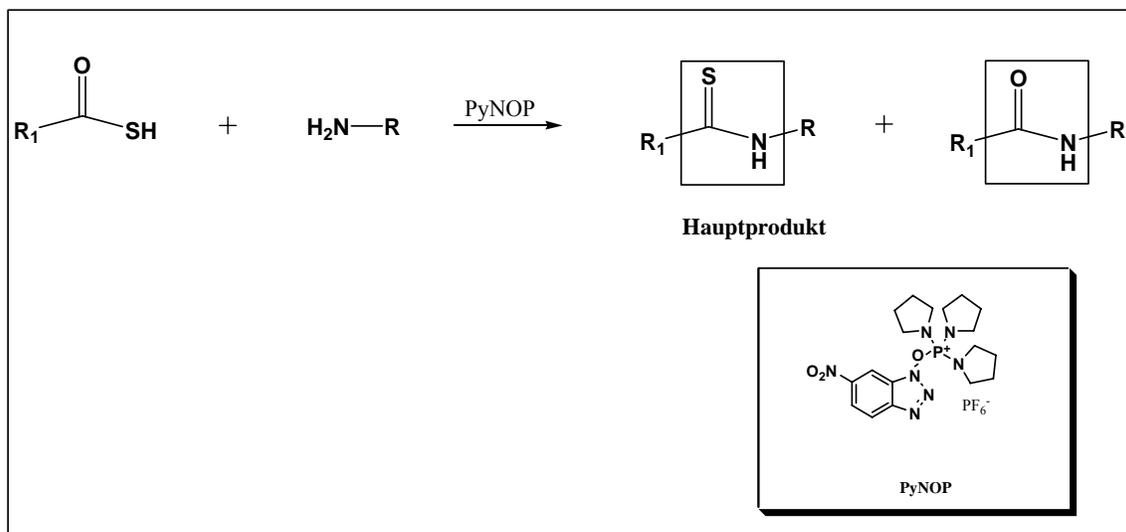


Abbildung 12: Chemoselektive Kupplung mittels PyNOP

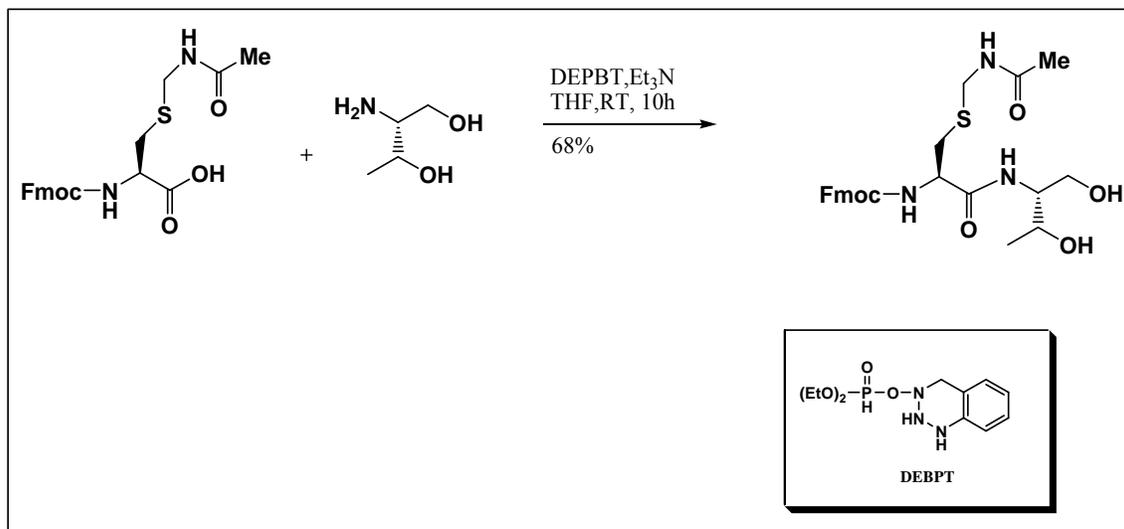


Abbildung 13: Selektive Kupplung ohne Schutzgruppen

2.4. Semisyntese modifizierter Proteine

Das genaue Verständnis der Funktionen von Proteinen, ebenso ihre örtliche und zeitliche Integrierung in das Netzwerk der Zelle, ist als die größte Herausforderung der postgenomischen Ära zu verstehen. Die Kontrolle über die molekulare Struktur und die Funktion, die von der Natur so einfach generiert wird, ist für den Chemiker und Biochemiker nur annähernd zu erreichen. Große Fortschritte wurden erst dadurch erzielt, dass Ligationmethoden (Abbildung 14) etabliert wurden, die dabei helfen verschiedene Peptid- oder Proteinkonstrukte zu verbinden. Erste Beispiele waren eine Oxim-Ligation^[67], Thioester-Bildung^[68], Pseudoproline-Ligation^[69] oder Thioether-Bildung^[70]. Ein Nachteil hierbei war neben der umständlichen Bildung der Endfunktionalitäten, dass nie eine native Peptidbindung bei der Ligation entstanden ist.

Der erste Ligation in dieser Richtung wurde von Kemp^[71] durchgeführt, indem er Tripeptide mittels „Prior Thiol Capture“ erzeugte (Abbildung 14a). Erste Kopplungen von Peptid- und Proteinfragmente wurden von Kent durchgeführt^[72], der sich einen S-N Acylshift zu Nutze gemacht hat, der erstmal von Wieland beschrieben wurde.^[73]

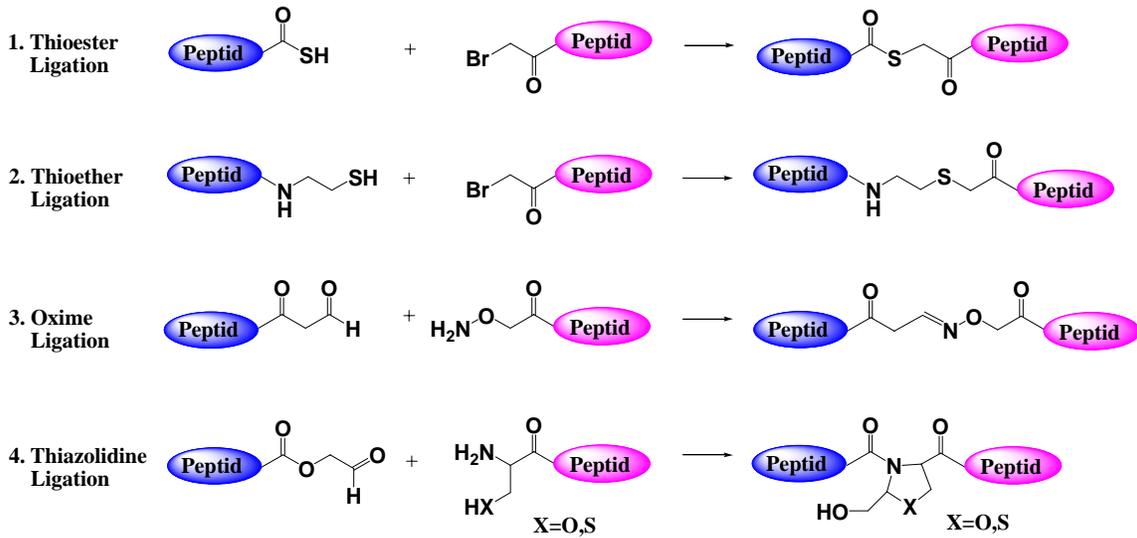


Abbildung 14: Übersicht der verschiedenen Ligationsverfahren

Diese sogenannte Native Chemical Ligation findet in zwei Schritten statt (Abbildung 15). Es kommt zwischen dem Cystein und dem Thioester zu einem Thiol-Thioesteraustausch, der die Segmente in eine Kopf zu Schwanz Anordnung bringt.

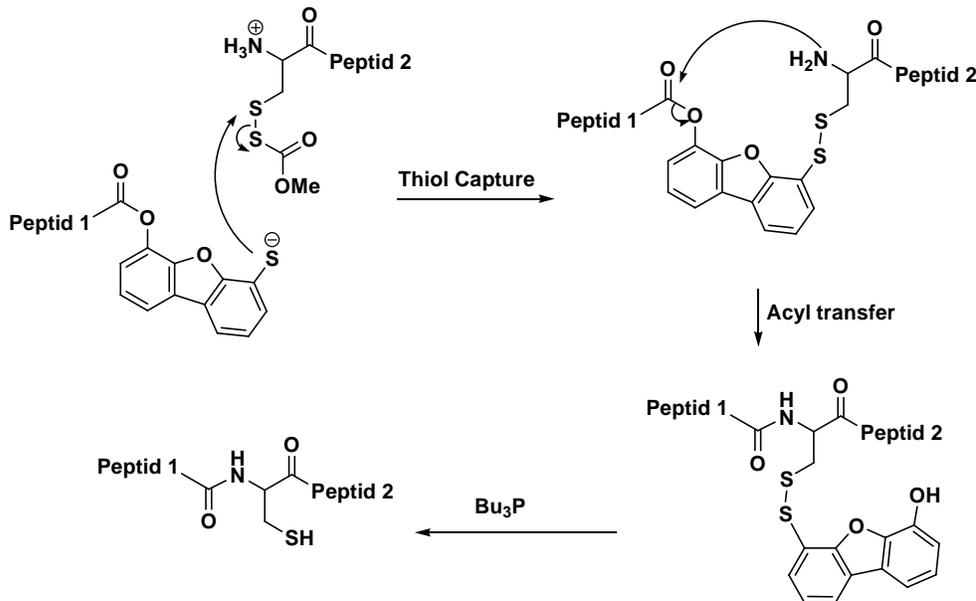


Abbildung 14a: Prior Thiol Capture

Dabei kommt es zu einem spontanen S-N Acylshift, der zu einer amidischen Bindung führt. Hunderte von Proteinen sind durch NCL dargestellt worden, von kleinen Polypeptiden bishin zu menschlichen Proteinen wie Ras und der Polymer-modifizierten Variante von Erythropoietin.^[74,75]

Eine weitere Alternative wurde von *Tam* entwickelt, der die C-terminale Thiocarbonsäure mit einem N-terminalen β -Bromalanin reagieren lässt (Abbildung 15).^[76]

Trotz dieser erfolgreichen Methode, besteht hier der Nachteil, dass ein N-terminales Cystein vorhanden sein muss. Weitere Ansätze lösen dies, indem sie entfernbare Thiolkomponenten an den N-terminalen Aminosäuren verwenden^[77], histidine-, homocysteine- und selenocysteine basierte Ligationen benutzen^[78,79,80] oder durch Eliminierung das Cystein zum Alanin umwandeln.^[81]

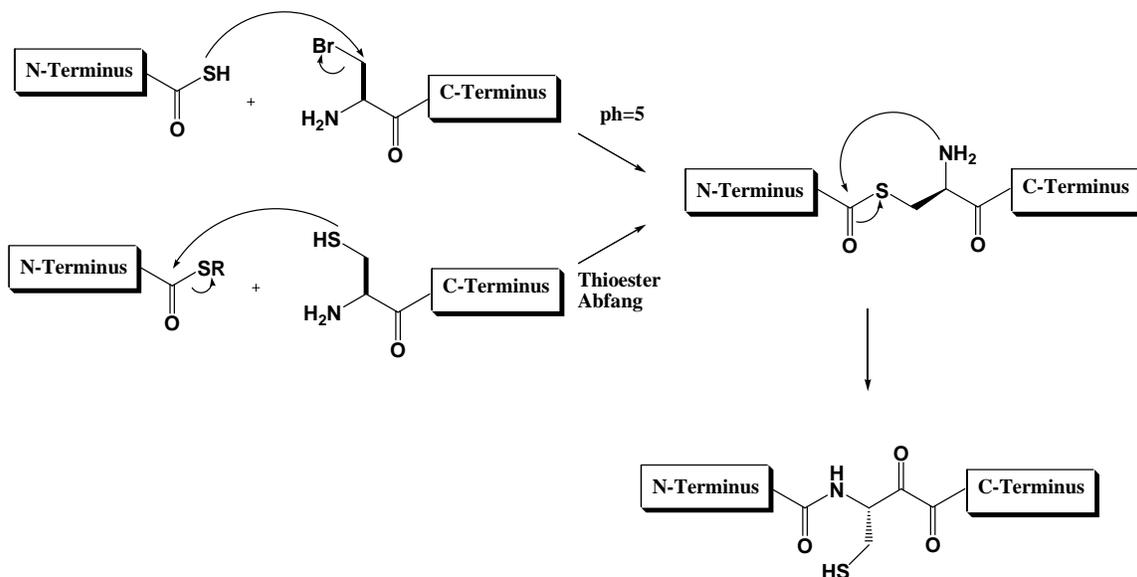


Abbildung 15: Native Chemical Ligation

2.5. Die Expressed Protein Ligation

Durch die Einbeziehung von rekombinanten DNA Techniken können die beiden reaktiven Gruppen in rekombinante Proteine eingebaut werden. Diese sogenannte Expressed Protein Ligation (EPL) wurde von Paulus et al.^[82] entwickelt und beruht auf der Fähigkeit bestimmter Proteindomänen (Inteinen) einen Protein-Spleiß Vorgang

ausführen zu können. Inteine sind autokatalytische Polypeptid-Sequenzen, die sich posttranslational aus einem Protein-Precursor ausschneiden, was anschließend zu einer Verknüpfung der beiden Exteine und somit zu einem neuen funktionellen Protein führt (Abbildung 16). Bis jetzt wurden mehr als 170 verschiedene Inteine katalogisiert.^[83]

Die meisten dieser Spleißvorgänge laufen über den *cis*-Zustand, d.h. ein komplettes Intein ist von Anfang an vorhanden. Im Gegensatz dazu ist es auch möglich *trans* zu spleißen. Ein komplettes Intein setzt sich aus zwei Split-Inteinstücken zusammen. Das wurde zum Beispiel benutzt, um Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen.^[84]

Das Spleißen verläuft über fünf Schritte (Abbildung 16):

(1.) Bildung des *trans*-Splicing Komplexes

(2.) *N,O*- bzw. *N,S*-Acyltransfer

Das Spleißen wird durch einen nukleophilen Angriff der Hydroxyl- bzw. der Thiolgruppe der *N*-terminalen Aminosäure des Inteins eingeleitet

(3.) Umesterung

Der Aktivester kann in folgenden von der Seitengruppe der *N*-terminalen Aminosäure des C-Exteins, eines konservierten Cysteins, Serins oder Threonins, angegriffen werden, wodurch ein N-Extein auf die Seitenkette des C-Exteins übertragen wird

(4.) Asparagin Zyklisierung

Die Amidbindung am C-Terminus des Inteins wird durch Zyklisierung seines C-terminalen Asparagins unter Freisetzung des Inteins gespalten

(5.) *O,N*- bzw. *S,N*-Acylshift

Das Ligationsprodukt, ein instabiler Ester, lagert sich irreversibel zum entsprechenden Amid um.

Für den Vorgang des Protein Spleißens ist neben der Intein-Domäne die erste benachbarte Aminosäure der N-Extein Sequenz notwendig. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bestimmte N-Extein Reste (Prolin, Valin und Isoleucin) den Spleißvorgang hemmen können^[85].

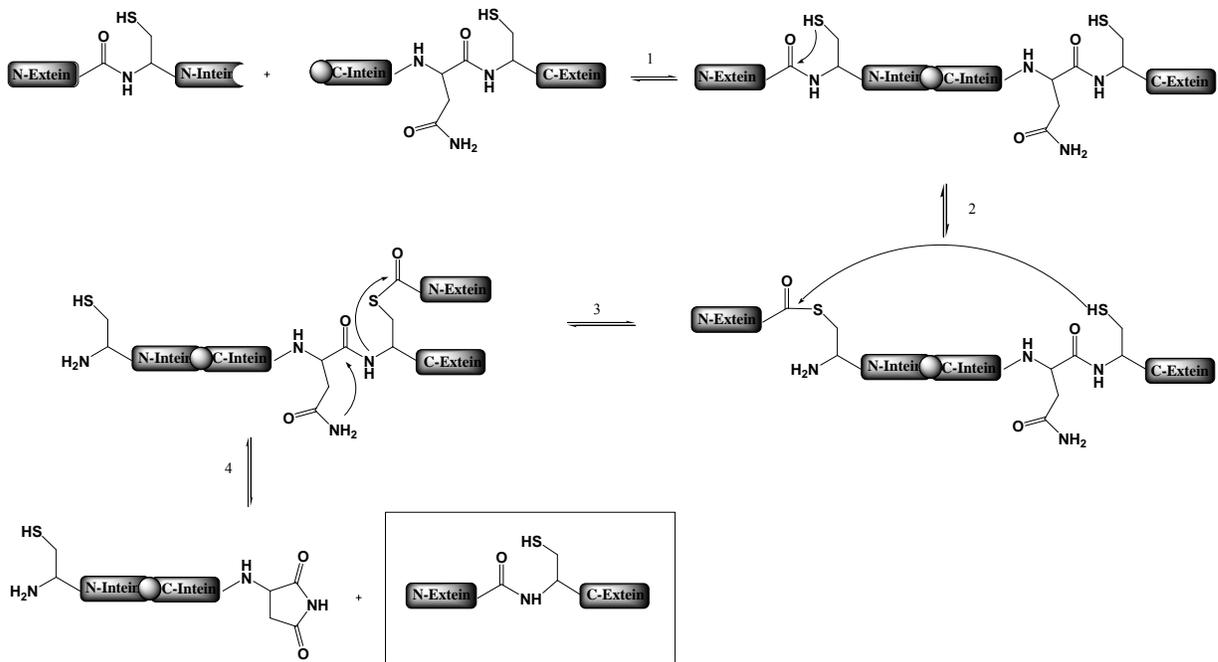


Abbildung 16: Mechanismus des Proteinspleißens: 1. Bildung des trans-Splicing Komplexes, 2. Acylshift, 3. Umesterung, 4. Asparaginzyklisierung

2.6. MIC-Ligation

Alle Ras-Isoformen werden am C-terminalen Cystein in der CAAX-Box durch eine cytosolische Farnesyltransferase prenyliert. Nach Abspaltung der letzten drei Aminosäuren wird das S-farnesylierte Cystein in einen Methylester umgewandelt. Bei den N- und H-Isoformen werden noch zusätzlich eine oder zwei weitere Cysteingruppen palmitoyliert. Da diese Modifikationen mit biologischen Verfahren nicht einfach durchzuführen sind, wurden Lipopeptide mit den benötigten funktionellen Gruppen synthetisiert und mit verkürzten Ras-Proteinen ligiert. Zu diesem Zweck wurde das Ras-Protein mit einem freien C-terminalen Cystein in Bakterien expremiert, um eine reaktive Gruppe für die MIC-Ligation bereitzustellen. In einer Michael-Addition kommt es hier aufgrund des flexiblen C-terminus zu einer schnellen selektiven Ligation. Weitere Cysteine in der Sequenz sind im Proteinkorpus vergraben und damit weniger zugänglich. Zur Aufreinigung des Lipopeptids macht man sich die zusätzliche Hydrophobie zu Nutze.

Durch Extraktion mit einer Triton X-114 gesättigten Lösung kann man durch Phasentrennung des Lösungsmittels das Peptid in die hydrophobe Phase schleppen.

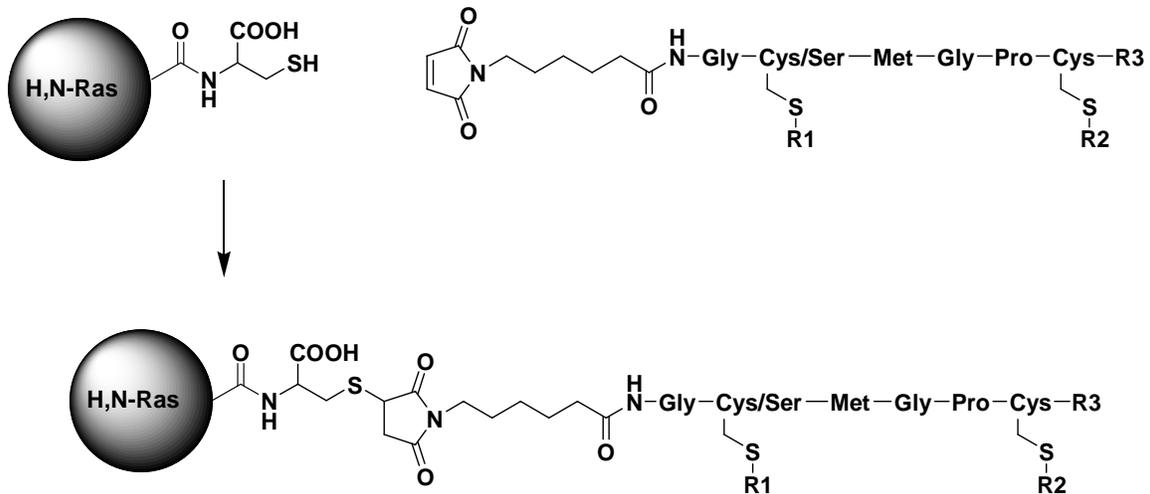


Abbildung 16: MIC-Ligation: Das verkürzte Ras-Protein kann mit dem C-terminalen Cystein kovalent an des Lipopetid binden

2.7. Staudinger Ligation und enzymatische Ligation

Bertozzi und Raines haben die Staudinger Ligation (Abbildung 18) neben der NCL eingeführt, die prinzipiell unabhängig von der Aminosäure an der Ligungsseite ist. Hierbei wird ein Azid mit einem Phosphan umgesetzt, wobei ein nukleophiles Aza-Ylid entsteht, dass im folgenden Schritt das Carbonylatom angreift. Hydrolyse führt anschließend zum Phosphoniumoxid und dem Amid. Diese Ligungsart wurde zusammen mit EPL eingesetzt, um semi-synthetische RNAase darzustellen^[86], ebenso wurden kurze Peptide in nicht-wässrigen Lösungen synthstisiert^[87].

Ebenfalls erwähnenswert sind die enzymkatalisierten Ligationen, in denen gentechnisch veränderte Proteasen eingesetzt werden. Wells führte die „Subtiligase“ ein, die als Acyltransferase agiert und verminderte proteolytische Eigenschaften besitzt^[88,89].

Ähnliche Ligationen wurde mithilfe der V8 Protease gemacht, hierbei wurde durch eine Kombination von EPL und Enzym-Ligation ein C-terminaler Aktivester gebildet und ein N-terminales Serin-haltiges synthetisches Peptid verknüpft^[90].

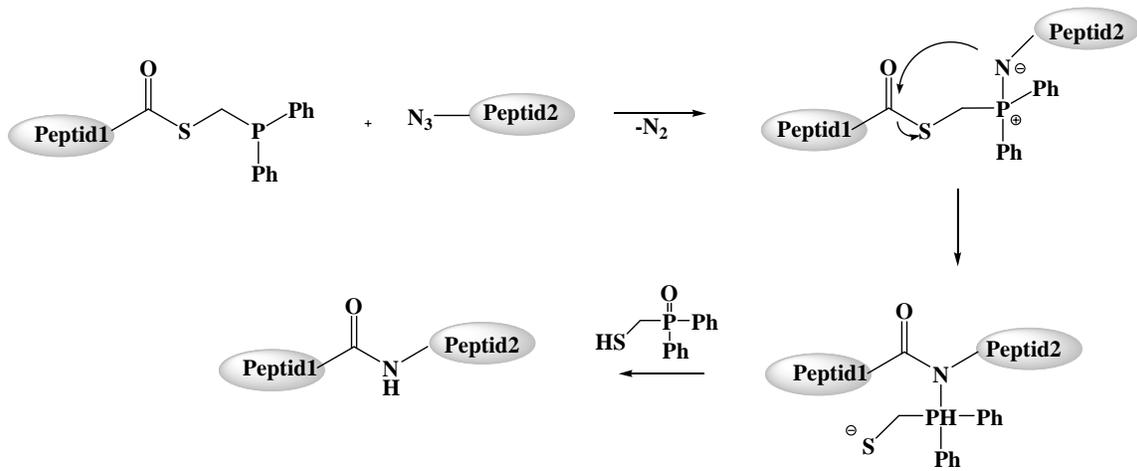


Abbildung 18: Mechanismus der Staudinger-Ligation

3. Ziel der Arbeit

Das Onkoprotein Ras ist eines der Hauptziele in der Krebsforschung und strukturell und biochemisch eines der am besten charakterisierten Proteine. Dennoch sind seine vielfältigen Funktionen im Kontext der lebenden Zelle immer noch nicht ausreichend verstanden. Jüngere Untersuchungen legen nahe, dass dem Verständnis der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Ras Aktivität in der Zelle eine besondere Bedeutung zukommt. Durch Kombination moderner Mikroskopie und Chemischer Biologie konnte Bastiaens 2005 zeigen, dass ein Zyklus von De- und Repalmitoylierung den kontinuierlichen Austausch von PM Ras und Golgi Ras steuert (Abbildung 19) und damit das Ras Aktivitätsprofil in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten kontrolliert.^[91] Das Modell sieht vor, dass sich aktives Ras im Verlauf des Palmitoylierungs-Zyklus vorübergehend in unterschiedlichen Signalumgebungen in der Zelle aufhalten kann mit unterschiedlichen Regulatoren und Effektoren. Dieser Mechanismus ermöglicht somit sowohl Diversität als Spezifität in der Signalweiterleitung.

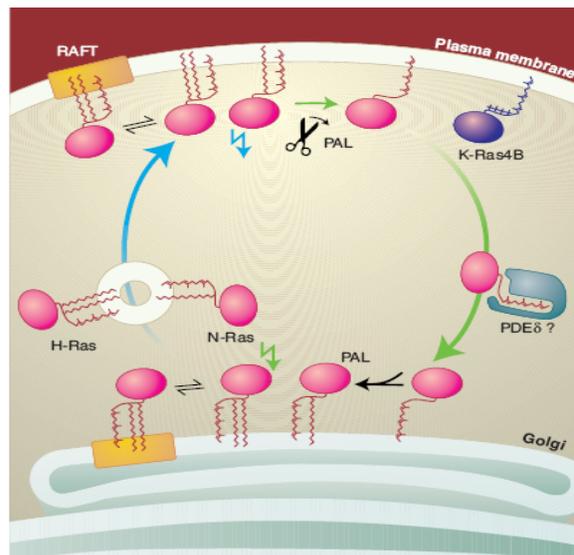


Abbildung 19: Schema des Ras-Zyklus in der Zelle

Ziel dieser Doktorarbeit sollte, im Rahmen mit Kooperationen der Arbeitsgruppen Waldmann, Wittinghoffer und Bastiaens vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie sein, weitere Einsichten in die dynamischen Prozesse des Ras-Zyklus zu erhalten. Zwei Fragestellungen standen im Mittelpunkt. Zum einen sollte der Mechanismus im Detail untersucht werden, der den raschen Rücktransport von Ras von der PM zum Golgi nach Depalmitoylierung ermöglicht. Dies sollte sowohl unter Zuhilfenahme semisynthetischer Proteinkonstrukte, als auch normaler Lipopeptide geschehen. In vitro Experimente von Silvius^[92] haben darauf hingewiesen, dass einfach lipidierte Proteine sich innerhalb von Sekunden zwischen verschiedenen Membranen bewegen können. Experimente von Hillig haben auf die Beteiligung von PDE δ (Phosphodiesterase δ) hingewiesen, welches in Analogie zu den GDI Proteinen den hydrophoben Prenylrest abschirmt und so die Löslichkeit im Cytosol erhöht.^[93]

Um die Antwort auf die Fragestellung der Einbeziehung von PDE δ in den Ras-Zyklus zu erhalten, sollte ein Konstrukt synthetisiert werden, das anstelle eines Farnesylrestes einen Geranylrest trägt, der kovalent mit einem Benzophenon verknüpft ist. Dies sollte im späteren Experiment dafür genutzt werden, in einer photochemischen Reaktion eine kovalente Bindung in der Bindungstasche von PDE δ zu erzeugen. Für diesen Ansatz sollte zuerst ein in vitro Experiment durchgeführt werden. Ein semisynthetisches N-Ras-Konstrukt **1**, das einen Photocrosslinker enthält, sollte mit dem aufgereinigten PDE δ zuerst in einem Puffergemisch interagieren. Nachdem sich der Photocrosslinker in der Bindungstasche eingefunden hat, sollte durch Belichtung mit UV-Licht eine kovalente Bindung erzeugt werden (Abbildung 20).

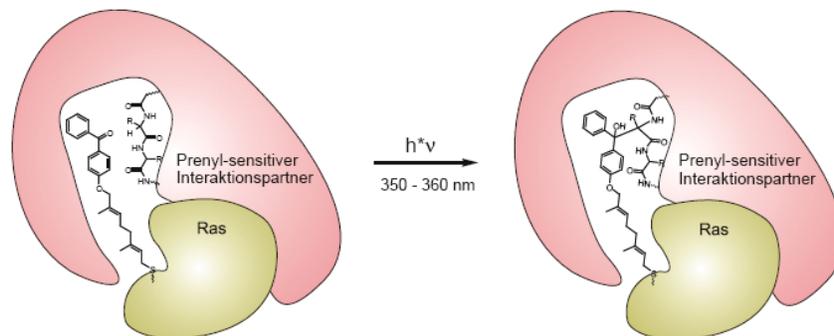


Abbildung 20: Photocrosslink des geranylierten Benzophenons mit PDE δ

Dazu sollte dieses Lipopeptid erstmalig komplett an der festen Phase aufgebaut werden (Abbildung 21). Deswegen sollte das Benzophenon gelabelte Cysteinderivat mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen werden, so dass man die bereits benutzte Strategie von kombinierter Lösungs- und Festphase und die damit verbundenen Aufreinigungsschwierigkeiten umgehen kann.^[100]

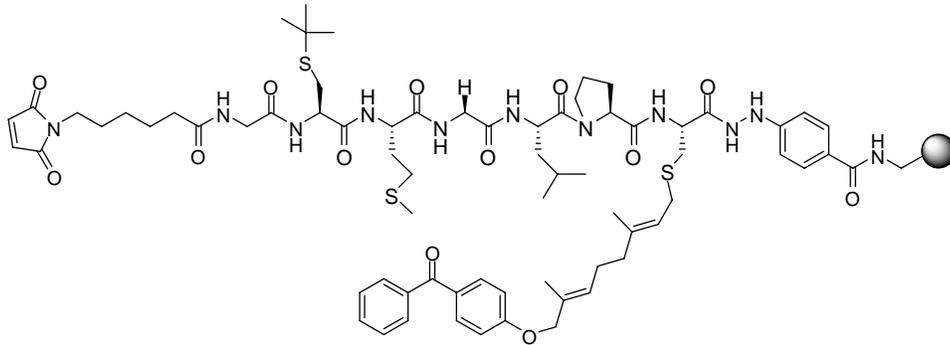


Abbildung 21: Immobilisierte N-Ras-Sequenz am Harz

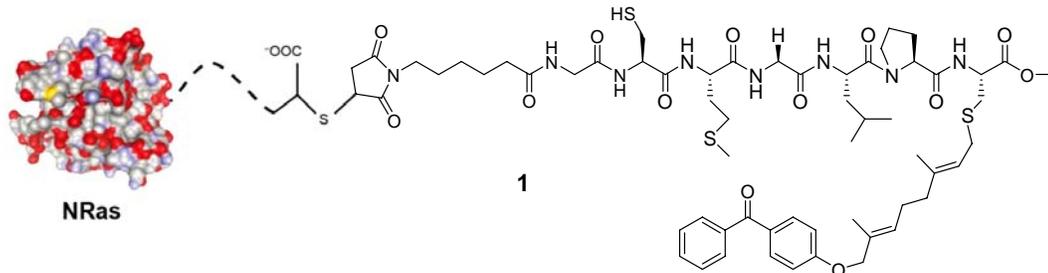


Abbildung 22 : Ligiertes Peptid an N-Ras (1-181) via MIC-Ligation

Das zweite zentrale Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe semisynthetischer Proteine weitere Einblicke in den bisher unzureichend charakterisierten Mechanismus der Palmitoylierung und Depalmitoylierung zu erhalten. Es wurde untersucht an welchen Orten in der Zelle beide Prozesse stattfinden und mit welcher Kinetik. Zu diesem Zweck wurden semisynthetische N-Ras Konstrukte generiert (Abbildung 23), die in die MDCK (Madin Darby Canine Kidney)-Zelle mikroinjiziert werden sollten. Durch eine Markierung mit dem Fluorophor Cy3 sollte die dynamische Lokalisierung der Konstrukte in der Zelle in Real-Time verfolgt werden. Dazu sollte nicht nur der native C-terminus mit und ohne Palmitoylgruppe synthetisiert werden, sondern auch einzelne Aminosäuren ausgetauscht

werden. Dadurch sollten Hinweise in Hinblick auf die Spezifität und die Lokalisierung erzielt werden. Zu diesem Zweck soll das zu palmitoylierende Cystein (183) gegen ein Serin ausgetauscht werden, das ein nicht palmitoylierbares Substrat darstellt. Des Weiteren soll das häufig konservierte Glycin (182) gegen das sterisch anspruchsvollere Leucin ausgetauscht werden.

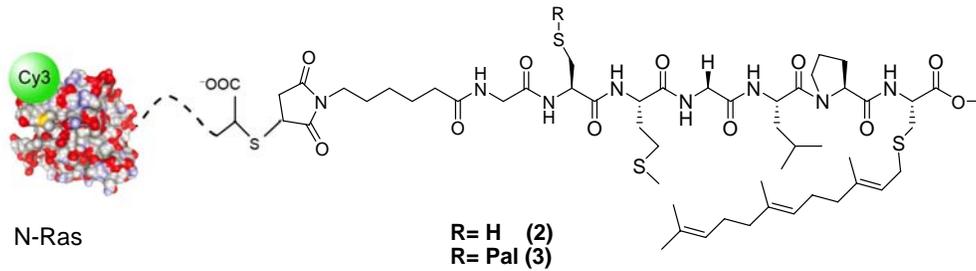


Abbildung 23: Cy3-gelabeltes semisynthetisches N-Ras

Letztlich sollte die Substratspezifität beider Reaktionen untersucht werden, indem die Stereoselektivität beider Prozesse mittels nicht-natürlicher Substrate untersucht werden soll. Dazu sollten einerseits semisynthetisch die N-Ras Konstrukte **4+5** generiert werden, die C-terminal ein Lipopeptid, bestehend aus D-Aminosäuren, aufwiesen und die semisynthetische N-Ras-Konstrukte **6+7** bestehend aus β -Aminosäuren (Abbildung 24).

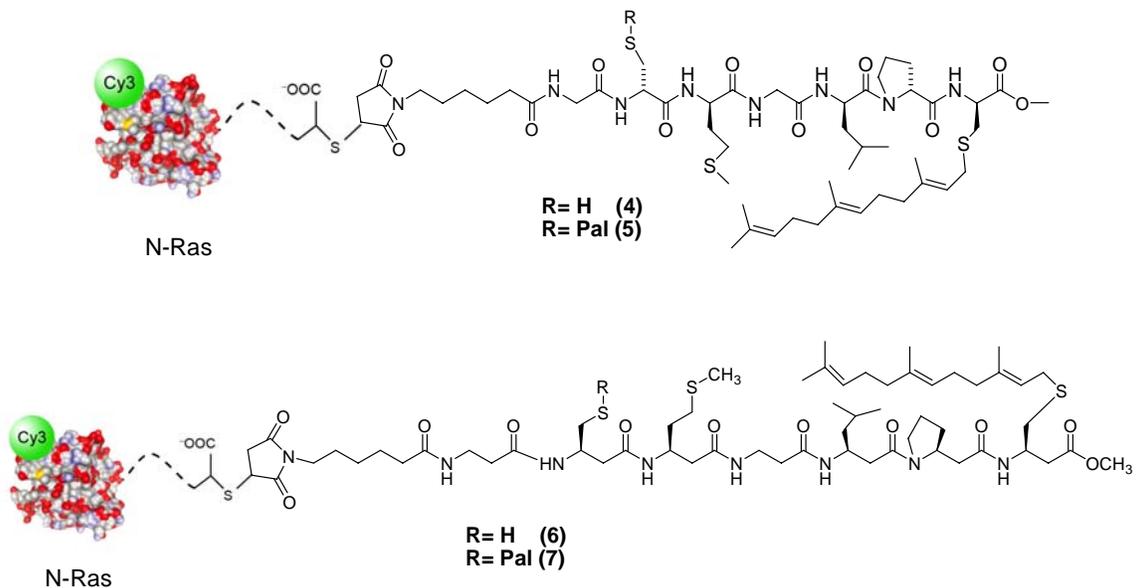
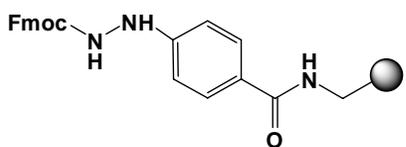


Abbildung 24: Semisynthetische N-Ras Konstrukte. Oben: Cy3 gelabeltes NRas mit legiertem D-Konfiguriertem Peptid. Unten: Cy3 gelabeltes NRas Konstrukt mit ligiertem β -Peptid.

Um diesen Fragestellungen gerecht zu werden bedurfte es einerseits einer erneuten Synthese von bereits bekannten Lipopeptiden, sowie auch völlig neuartigen Konstrukten. Um diese Aufgaben zu erfüllen, sollten die bereits etablierten Techniken zur Synthese von Lipopeptiden evaluiert und verbessert werden. Ebenso muss ein völlig neuer Ansatz entwickelt werden, um erstmalig synthetische β -Lipopeptide zu generieren. Nach der Fertigstellung der β -Lipopeptide sollte dann ebenfalls die Ligation der Konstrukte an die verkürzten N-Ras-Protein Konstrukte etabliert werden.

Alle zu synthetisierenden Lipopeptide sollten dann im Folgenden über eine MIC-Ligation an Cy3 gelabelte, verkürzte N-Ras Proteine fusioniert werden. Durch Mikroinjektion sollten nun die dynamischen Prozesse in der Zelle verfolgt werden.

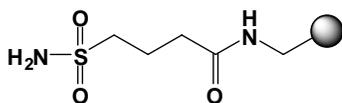
Außerdem sollte im Rahmen dieser Dissertation die verschiedenen Linker-Systeme zum Aufbau von Lipopeptiden evaluiert werden. Neben dem bereits bekannten Hydrazid Linker^[94], sollte des Weiteren der Sulfonamid-Linker^[95,96] für die Synthese für Lipopeptiden und Derivaten untersucht werden. Ebenfalls sollte das Tenta Gel Harz für die Synthese der lipidierten β -Peptide etabliert werden (Abbildung 25).



Hydrazid-Linker:

Basispolymer: Polystyrol quervernetzt mit 1.1 %

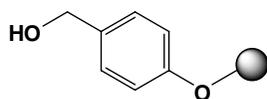
Divinylbenzol: Beladung 0.56 mmol/g



Sulfonamid-Linker:

Basispolymer: Polystyrol quervernetzt mit 1.1%

Divinylbenzol: Beladung 1.2 mmol/g



Tenta Gel R PHB:

Basispolymer: Polystyrol und quervernetzt mit

Polyethylenglycol-Einheiten, Beladung 0.23 mmol/g

Abbildung 25: Linker-Systeme für die Lipopeptidsynthese

4. Spezieller Teil

4.1. Peptidsynthese für die Photocrosslink-Experimente

In dieser Dissertation sollte das Ziel verfolgt werden, den vollständig posttranslationalen C-terminus von N-Ras Proteinen zu synthetisieren. Dies umfasst größtenteils sieben Aminosäuren, wobei die Cysteine entweder eine säurelabile Prenylgruppe tragen oder eine basenlabile Palmitoylthioestergruppe. Des Weiteren muss sich am N-terminus des Peptides eine zur Ligation befähigte funktionelle Gruppe befinden. Über diese Einschränkungen hinaus muss eine Strategie gewählt werden, die es ermöglicht das Peptid funktionell abzuspalten. In Falle von Ras bedeutet dies, dass der C-terminus als Methylester vorliegen muss.

Cystein und deren Derivate neigen zu einer höheren Racemisierungstendenz, weswegen in diesem Fall besondere Kupplungsreagenzien mit bestimmten Basen verwendet werden sollten. Auch die Wahl des Lösungsmittels hat hierauf großen Einfluss.

Ein Hauptaugenmerk sollte auf der Wahl der Schutzgruppen liegen, da die inkorporierten Lipidreste säure-und basenlabil sind.

Aus diesem Grund wurden die Peptide auf dem Hydrazid-Linker aufgebaut. Mittels Fmoc-Schutzgruppen Strategie können somit die Rahmenbedingungen erfüllt werden, die für die Synthese eine Lipopeptids erforderlich sind.

4.1.1. Photoaktivierbare Lipopeptide

Um Interaktionspartner von N-Ras zu finden, sollte mit Hilfe einer photoaktiven Verbindung ein Crosslink zwischen dem semisynthetischen N-Ras und dem Interaktionspartner PDE δ geknüpft werden.

Aus vorherigen Versuchen hatte sich ergeben, dass die Stelle für die Einbringung einer photoaktiven Gruppe im Peptid am besten an der Prenylgruppe sei^[100].

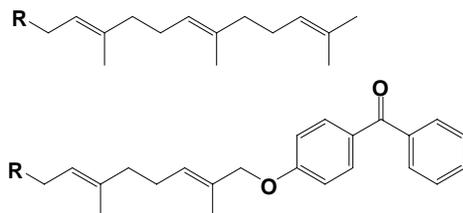


Abbildung 26: Farnesylrest und Benzophenon gekoppeltes Geranyl.

Somit sollten zuerst zwei photoaktivierbare Lipopeptide synthetisiert werden. Das erste Peptid **8** sollte an ein verkürztes N-Ras Protein ligiert werden können (Abbildung 27). Aus diesem Grund wurde an dem N-terminus Maleimidocaprinsäure (MIC) geknüpft, um in späteren Schritten über MIC-Ligation das Peptid mit dem Protein zu verknüpfen. Das zweite Cystein musste während der Synthese geschützt werden. Besonders bewährt hat sich dafür die *tert*-Butyldisulfid-Maskierung, die später nach der Ligation unter besonders milden reduktiven Bedingungen mit DTE entfernt werden kann. Aus diesem Grund wurde auch Benzophenon als photoaktivierbare Gruppe gewählt, da hier eine Aktivierung schon bei 350 nm möglich war, was für Proteine weitaus weniger schädlich ist, als z.B. die Verwendung von Aziden. So sind neben der geeigneten Wellenlänge auch weitere Eigenschaften dieses Photolabels von Vorteil: einerseits kann nach erfolgreicher Anregung in den Triplettzustand das Diradikal wieder in den Grundzustand relaxieren, wenn es keinen Bindungspartner findet. Im Gegensatz dazu dissoziieren die meisten anderen photoaktivierbaren Gruppen nach der Anregung und bleiben somit reaktiv und reagieren mit Wasser ab. Ebenso ist die Benzophenon-Gruppe kompatibel mit der auf Festphasen-Peptidchemie, also stabil unter Fmoc- und Boc-Bedingungen.^[97]

Der andere Vorteil liegt in der Beständigkeit gegenüber Wasser und somit proteinfreundlicher Umgebung.^[98]

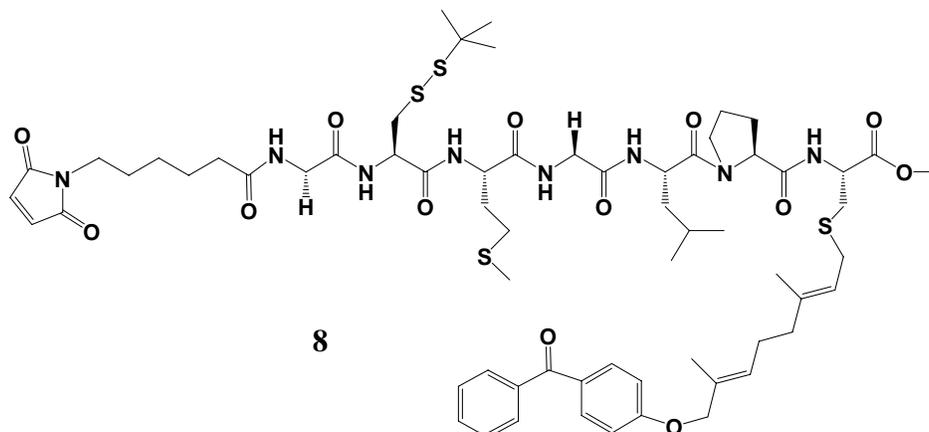


Abbildung 27: Benzophenon gelabeltes N-Ras Peptid 8

Als weiteres Konstrukt **9** sollte ein Derivat hergestellt werden, dessen N-terminale Gruppe die Möglichkeit zur Aufreinigung von Kopplungsprodukten bietet. Aus diesem Grund wurde hier N-terminal eine Desthiobiotin-Gruppe über einen Aminocaprinsäure-Linker eingeführt. Das Ziel hierbei war, dass nach erfolgreichem Photocrosslink zwischen dem Peptid und dem Interaktionspartner eine gezielte Aufreinigung über eine Streptavidin-Säule möglich ist. Aufgrund der schwächeren Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Desthiobiotin im Vergleich zu Biotin, sollte eine bessere Zugänglichkeit zu den Kupplungsprodukten möglich sein.

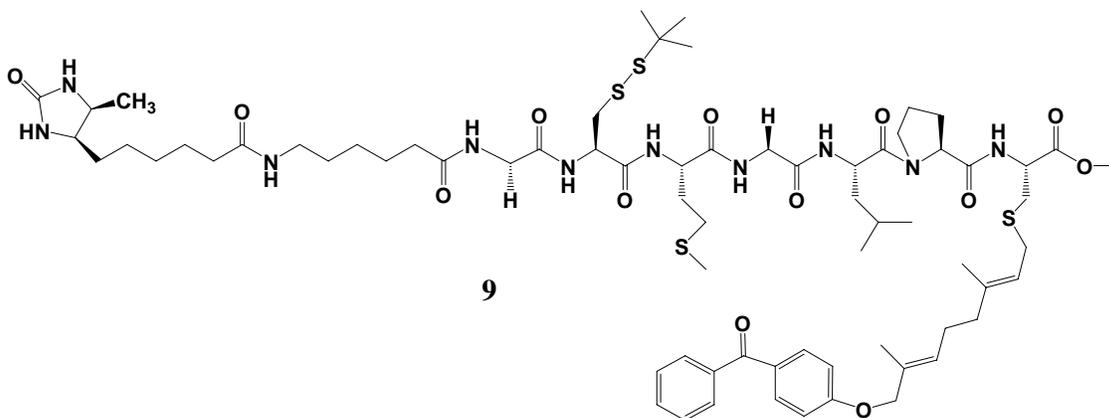


Abbildung 28: Benzophenon gelabeltes N-Ras Peptid 9 mit N-terminaler Desthio-Biotin Gruppe

4.1.2. Synthese der Benzophenon-markierten Farnesylanaloga

Für die Darstellung der N-Ras-Peptide musste zuerst das Fmoc-geschützte Cysteinderivat bereitgestellt werden. Um das Benzophenon an die Geranylgruppe zu knüpfen, bedarf es vorher einer Funktionalisierung des Geraniols **11** an der endständigen Methylgruppe (Abbildung 29). Zu diesem Zweck wurde eine allyliche Oxidation durchgeführt. Somit bestand der erste Schritt in der Schützung der Hydroxylgruppe des Geraniols **11** als Silylether **12** mit TBDMS-Cl und einer anschließenden allylischen Oxidation.^[99] Diese Strategie wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe verwendet.^[100] Die Ausbeute dieser Reaktion ist niedrig, was generell auf die Reaktion zurückzuführen ist. Dies ist insofern sehr nachteilig, da es sich hier um den ersten Schritt einer linearen Synthese mit sieben Schritten handelt.

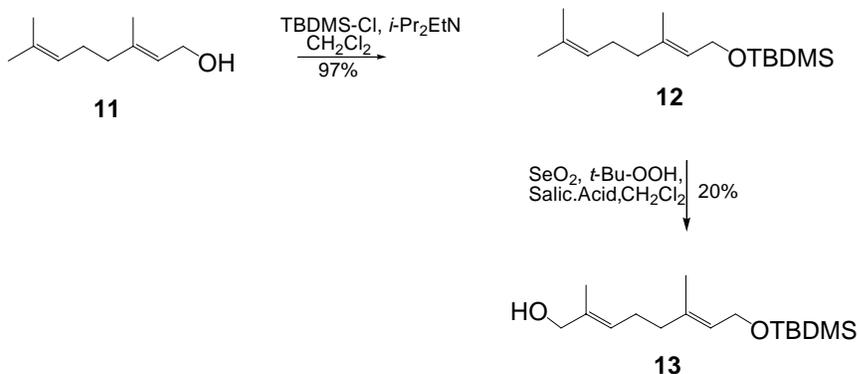


Abbildung 29 : Synthese von 8-Hydroxy-geranyl-t-butyltrimethylsilylether

Ein Problem bei dieser Reaktion war, dass die Hydroxylierung nicht streng regioselektiv verläuft. So kam es neben dem gewünschten Produkt, dem Alkohol **13**, zu Hydroxylierungen in dem Prenylsystem, sowie auch zu einer Weiteroxidation zum Aldehyd. Aus diesem Grund war die Ausbeute bei Farnesol niedriger als bei Geraniol (Abbildung 30).

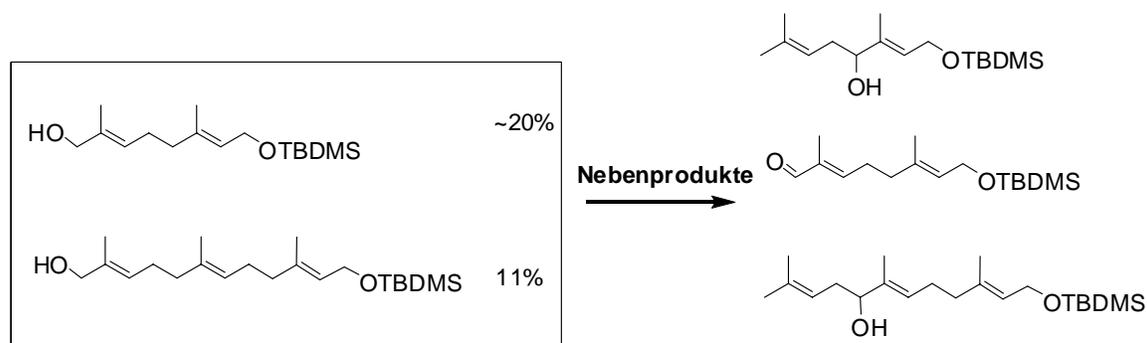


Abbildung 30: Ausbeutenvergleich bei der allylischen Oxidation

Den Grund für diese Reaktionsergebnisse, liefert der Mechanismus. Selendioxid kann als Oxidationsmittel für eine En-Reaktion verwendet werden, um den Allylalkohol herzustellen. Es fungiert hierbei als Enophil. Bei dieser Reaktion wird ein sechsgliedriger Übergangszustand angenommen. Untersuchungen von Fairlamb haben ergeben, dass die Endgruppe entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung des Übergangszustandes (Abbildung 31) und somit auf die Ausbeute hat.^[101] Dabei stellte sich heraus, dass eine Carbonylgruppe durch eine H-Brückenbindung eine derartige Stabilisierung erzielen kann. Dies würde mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmen, da das silylgeschützte Geraniol keine solche Stabilisierung erfährt.

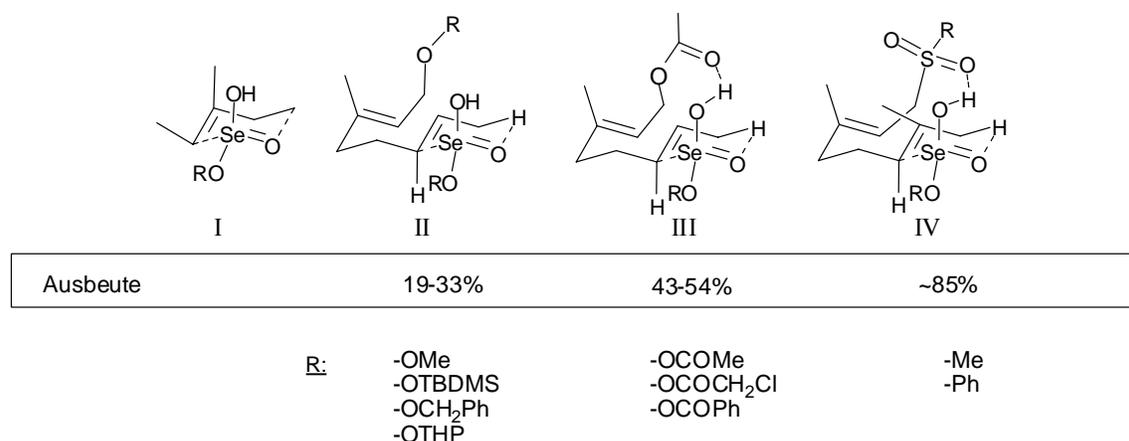


Abbildung 31: Bild der Übergangszustände bei verschiedenen Endgruppen während der Selendioxid-Reaktion

Der folgende Schritt beinhaltete die Knüpfung des Alkohols **13** mit p-Hydroxybenzophenon. Unter Mitsunobu-Bedingungen wurde der Ether **14** des Alkohols

gebildet.^[102] Hierbei wurde eine Ausbeute von über 60% erzielt. Im Anschluss wurde die Silyletherschutzgruppe quantitativ mit Tetrabutylammoniumfluorid entfernt, um das freie Isoprenylanalog **15** zu liefern.

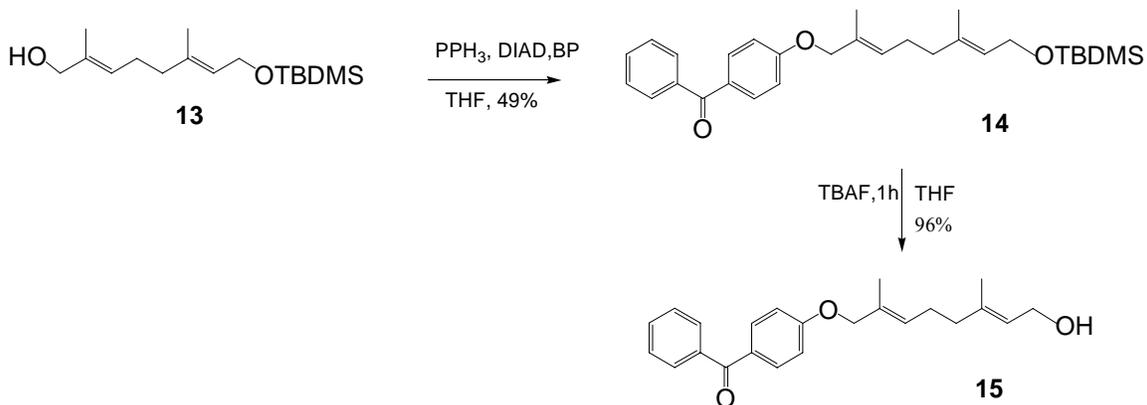


Abbildung 32: Synthese von 8-(4-Benzoylphenoxy)-geraniol

Um im späteren Verlauf das Cystein anzuknüpfen, musste zuerst das Isoprenylanalog **15** in eine reaktivere Spezies umgewandelt werden. Dazu musste die Hydroxyl-Funktion von **15** in ein Chlorid überführt werden. Dies wurde durch eine Corey-Kim-Reaktion erzielt. In der ursprünglichen Variante wurde damit ein primärer oder sekundärer Alkohol zum Aldehyd oder Keton oxidiert.^[103] Dabei stellte sich heraus, dass bei gleicher Reaktionsführung stabilisierte Kationen (wie hier bei dem Prenylsystem) das Chlorid lieferten.^[104] Dieser Sachverhalt wird sich nun zu Nutze gemacht, indem der Isoprenylalkohol **15** diesen Bedingungen unterworfen wird. Dabei wurde *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid auf -45°C abgekühlt auf 0°C erwärmt, um dann anschließend aus dem Alkohol das Prenylchlorid **16** zu erhalten. Das Ende dieser Reaktion erkennt man daran, dass die Lösung am Ende klar geworden ist. Die nächste Stufe umfasste die Prenylierung des Cysteins.^[105] Diese Reaktion konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dazu wurde das Cysteinhydrochlorid im Methanol vorgelöst und anschließend mit einer NH₃/MeOH-Lösung versetzt.^[106] Dabei sollte die Reaktionsführung so gestaltet werden, dass genau die Menge an NH₃/MeOH zugegeben wird damit die trübe Suspension zu einer klaren Lösung wird. Aufgrund großer Aufreinigungsprobleme, wegen der schlechten Löslichkeit des prenylierten Cysteins **17** wurde das Produkt unaufgereinigt für den nächsten Schritt verwendet.

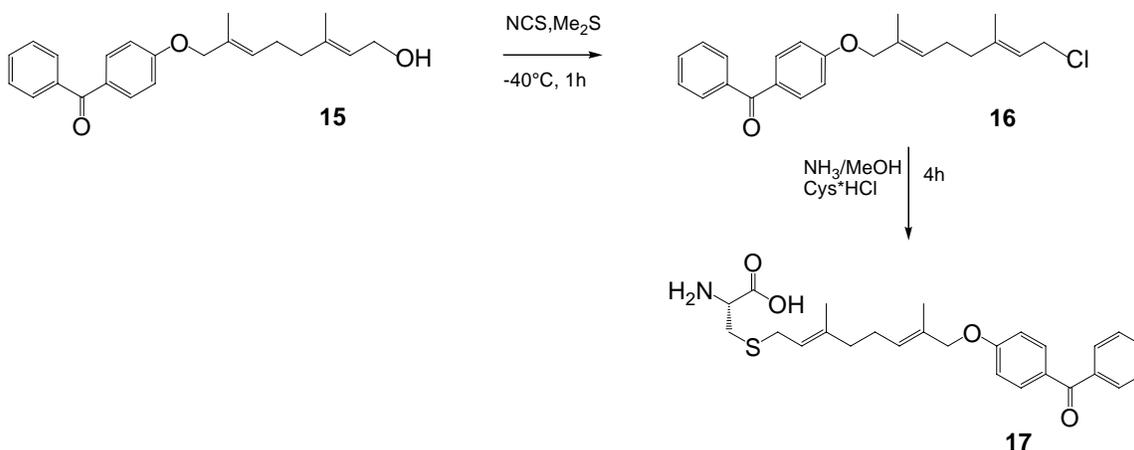


Abbildung 33: Synthese von Fmoc-Cys(Ger-BP)-OH

Die letzte Reaktion in dieser linearen Sequenz umfasste die Einbringung einer Fmoc-Schutzgruppe, das die Peptide vollständig an fester Phase aufgebaut werden sollen. Dazu wurde nun das Rohprodukt aus dem vorherigen Schritt mit Fmoc-Succinimid unter Zusatz von Triethylamin zum *N*-Fmoc-geschützten Derivat **18** umgesetzt.

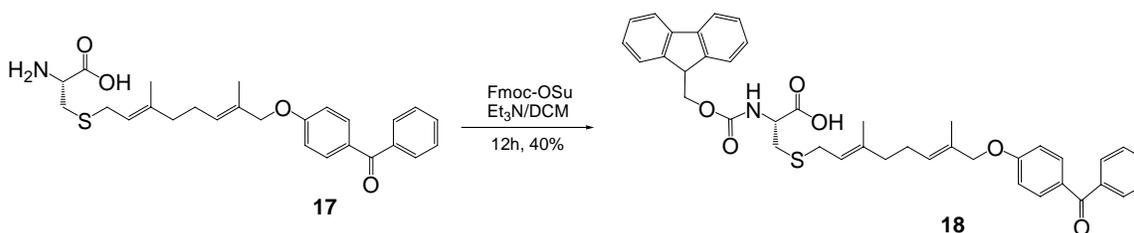


Abbildung 34: Fmoc-Schätzung des Benzophenon gelabelten Cysteinderivats.

Für das photoaktive Lipopeptid **9** musste eine Synthese für das Desthiobiotin entwickelt werden, dass mittels Capronsäure funktionalisiert wurde. Dafür wurde Desthiobiotin **19** mit 6-Aminosäurecapronsäureallylester-Toloulsulfonat **20**, welches freundlicherweise von Dirk Weinrich zur Verfügung gestellt wurde, mittels der Kupplungsreagenzien HOBt und EDC über eine Amidbindung verknüpft. Im Folgenden Schritt wurde die Allylschutzgruppe mit frisch hergestelltem Tetrakis(triphenylphosphin)palladium und Morpholin entfernt, um das gewünschte Produkt **22** zu erhalten.

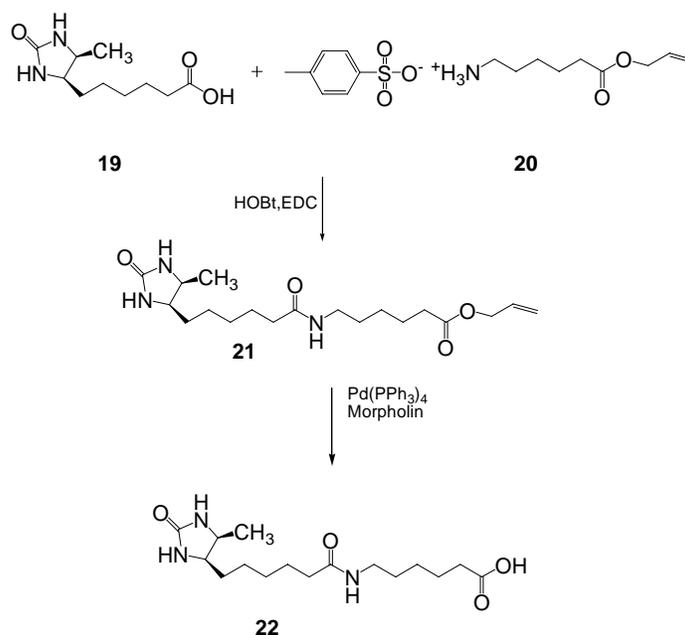


Abbildung 35: Synthese des Desthiobiotin Derivats

4.1.3. Synthese des photoaktivierbaren N-Ras C-terminus an der festen Phase

Bei der Synthese der Ras Peptide an der festen Phase wurde der Hydrazid-Linker verwendet. Alle Aminosäuren wurden linear am Harz (4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM Nova Gel) angebracht. Die Kupplungsbedingungen der Aminosäuren wurden auch für die N-terminalen Linker (MIC- und Desthiobiotin-Linker) verwendet. Die Fmoc-Schutzgruppen wurden mit einer Mischung aus Piperdin/DMF (1:1) entfernt. Für die erste Immobilisierung des Fmoc-geschützte Cysteinderivates mit Benzophenon wurden 3 Äquivalente benutzt. Es wurden dazu jeweils HBTU/ HOBt/ Collidin verwendet. Collidin wurde benutzt, um die eventuelle Racemisierung von Cysteinen zu unterdrücken. Nach mehrfachen Waschen wurden die nächsten Aminosäuren mit jeweils HBTU/HOBt und DIPEA gekuppelt. Schließlich wurden die Peptide mit einer Mischung

aus $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Pyridin und Methanol in Dichlormethan abgespalten und säulenchromatographisch aufgereinigt.

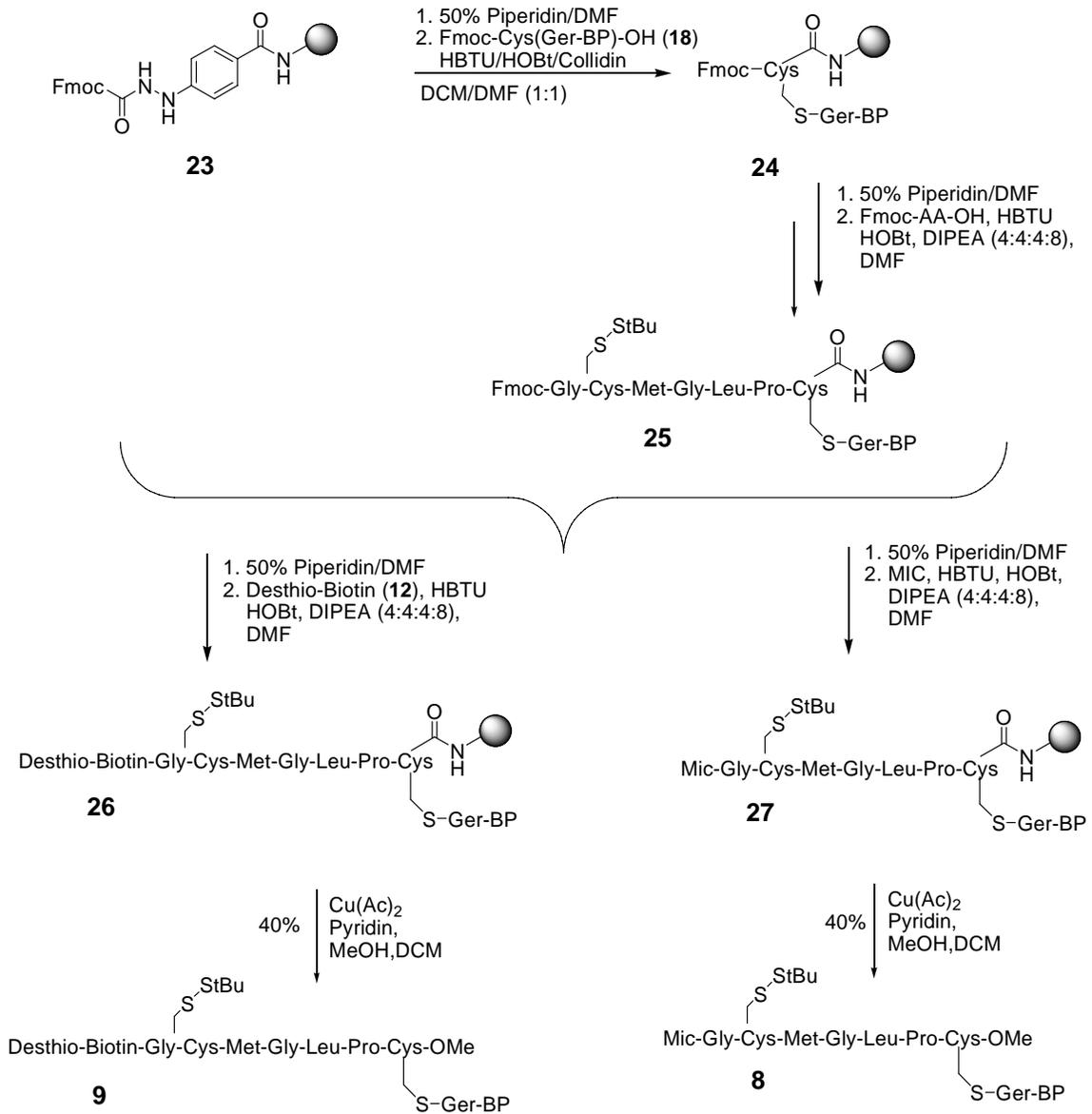


Abbildung 36: Synthese der gelabelten N-Ras Peptide an der festen Phase

4.1.4. Biologische Untersuchungen der Benzophenon-markierten Peptide

Photocrosslink in Vitro

In Zusammenarbeit mit dem Diplom-Biologen Michael Alexander und der Master-Studentin Natalie Timmermann aus der Arbeitsgruppe Wittinghofer am MPI für molekulare Physiologie wurden die photoaktiven Peptide für die Photocrosslink-Experimente verwendet. Dazu wurde das MIC-BP-Peptid **8** an ein verkürztes N-Ras-Protein ligiert. Durch das freie Cystein, das das Protein am C-terminus trägt, kann über eine Michael-Addition eine kovalente Bindung erzielt werden. Für die Ligation wird das Peptid **8** zusammen mit dem Protein in einer 1,1: 1 Mischung in der Detergens Triton-X 114 und Puffer bei 4°C inkubiert. Der Vorteil hierbei ist, dass Triton unterhalb von 30°C mit Wasser mischbar ist, aber oberhalb eine eigene hydrophobe Phase bildet. Da sich die lipidierten Proteine in der Tritonphase lösen, unligiertes N-Ras aber in der wässrigen Phase bleibt, kann man auf diese Weise eine Abtrennung erzielen (Abbildung 36a).

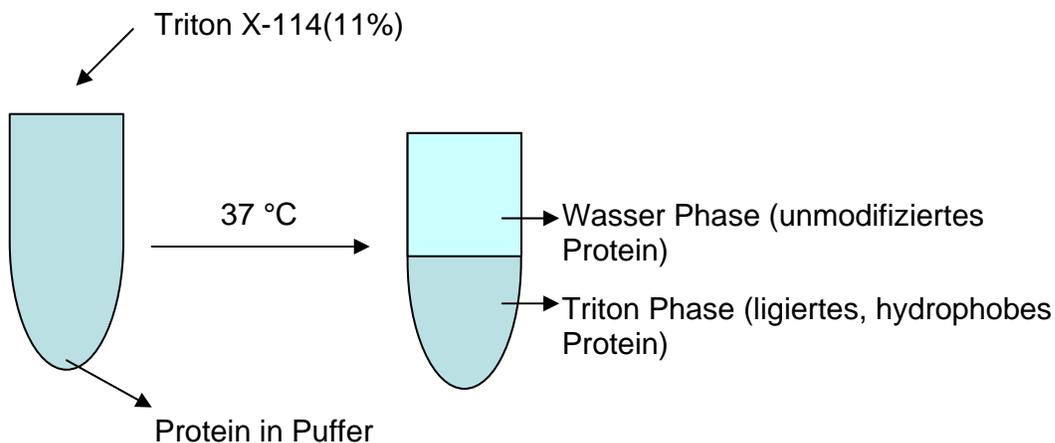


Abbildung 36a: Trennung des nicht-ligierten Peptids vom ligierten Peptid. Nachdem Erhitzen des Puffers erfolgt eine Separierung in zwei Phasen, wobei in der Triton Phase das lipidierte Peptid ist.

Aus vorherigen Untersuchungen war bereits bekannt, dass diese semisynthetischen Proteinkonstrukte biologisch aktiv waren. Durch Mikroinjektion von N-RasG12V, die auch mit dem photoaktiven Lipopeptid ligiert wurden, konnte man in Phaeochromocytomzellen (PC12) durch Bildung neuritenartiger Auswüchse erkennen, ob die betreffenden Konstrukte biologisch aktiv waren. Dabei wurde eine vergleichbare Aktivität ermittelt, wie bei Verwendung des nativen Protein.^[107]

Somit war das nächste Ziel dieser Experimente, die Prenylierungstasche von PDE δ (Phosphodiesterase δ) zu bestimmen. PDE δ wurde bereits als Interaktionspartner von verschiedenen prenylierten Proteinen diskutiert.^[108] Nancy zeigte durch eine Überexprimierung von PDE δ , dass dadurch die Ras Lokalisation beeinflusst wird.^[109]

Dadurch gab es erste Anhaltspunkte für ein Wechselspiel zwischen PDE δ und N-Ras.

Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, sollte der Benzophenon-Linker mit PDE δ interagieren, so dass nach Belichtung eine kovalente Bindung zustande kommt. Nach einer Belichtungszeit von 30min bei 350nm im Photoreaktor konnte man bereits auf dem SDS-Gel das Crosslink Produkt von *N-Ras*(1-181)-MIC-aca-Gly-Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(GerBP)-OMe (N-Ras-GerBP) erkennen (Linie 5). Die untere Bande repräsentiert N-Ras-GerBP (22kDa) und PDE δ (17kDa). Als Kontrolle wurde ein Crosslink-Experiment mit N-Ras-GerBP und GST (glutathione S-transferase) ausgeführt. Da GST nicht als Bindungspartner von NRas gilt, sollte keine Bande auftreten. In der Abbildung 37 ist auf dem SDS-Gel in den Linien 7-9 zu erkennen, dass keine Bande mit höheren Massen nach der Belichtung auftaucht.

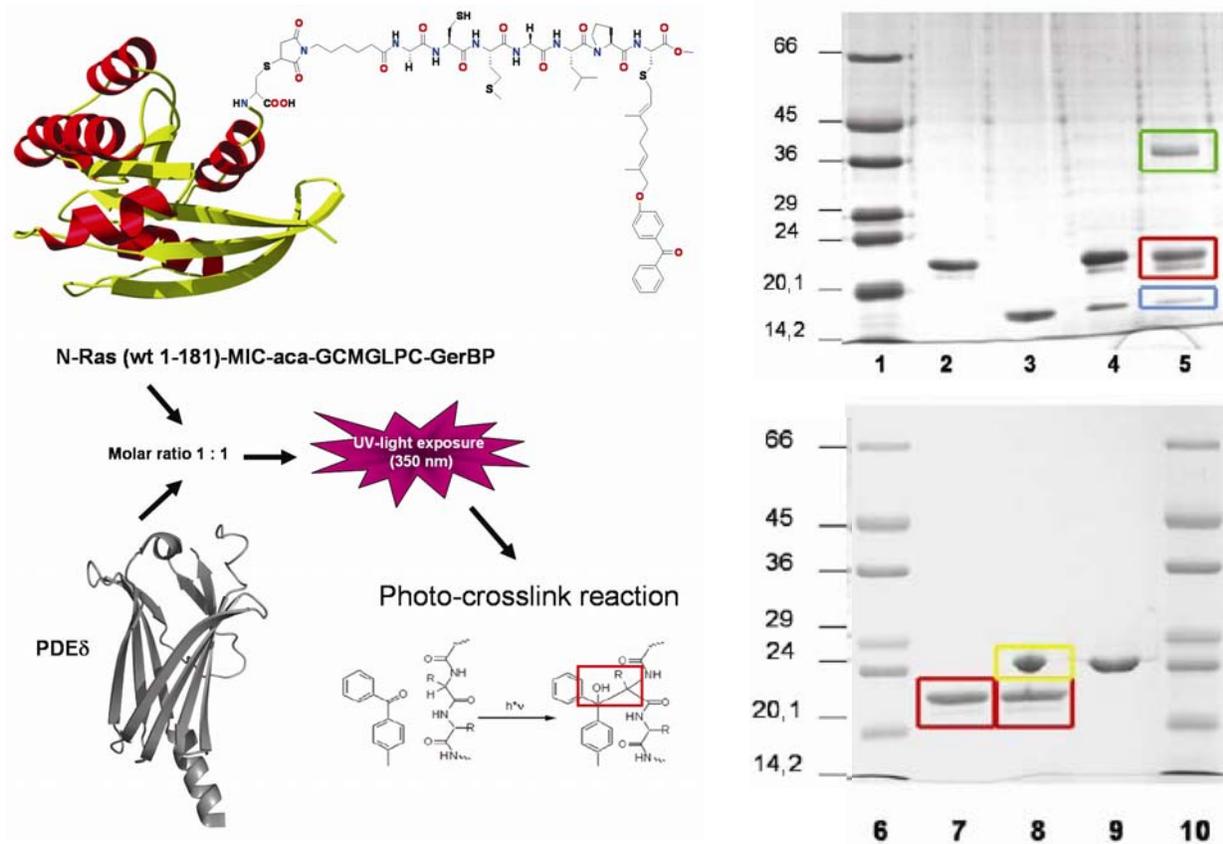


Abbildung 37: SDS- Gel nach dem Photocrosslink des semisynthetischen N-Ras Konstruktes und PDE δ Banden 1,6,10: Protein-Marker (SDS-7), Bande 2: N-Ras-GerBP, Bande 3: PDE δ , Bande 4: Reaktions-Mix vor der Photoreaktion, Bande 5: Reaktionsmischung nach 30 min Belichtung, Bande 7: N-Ras (181)-GerBP, Bande 8: N-Ras(181)-GerBP und GST nach 30 min Belichtung, Bande 9: GST

Nachdem das Photocrosslink Produkt sich gebildet hatte, wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und einer proteolytischen Spaltung mit Trypsin und Chymotrypsin für 12h bei 37°C unterzogen. Die Verdauprodukte wurden massenanalytisch interpretiert. Dazu wurden die Fragmente mit MALDI-TOF-MS analysiert. Um die Produkte der Proteolyse zuzuordnen wurde die Software PAWS verwendet, mit deren Hilfe man spezifische Verdaubedingungen und Randbedingungen wie Carboxymethylierung und Falschverdau einbeziehen kann. Dabei stellte sich heraus, dass für den Trypsin-Verdau 79% von N-Ras-GerBP und 45% von PDE δ zugeordnet werden konnte. Allerdings ließ sich kein einziges Crosslink-Fragment identifizieren.

Der Verdau mit Chymotrypsin lieferte eine Sequenzabdeckung von 33.7% für N-Ras-GerBP und 23.3% für PDE δ . Auch hier lieferten die Ergebnisse kein Crosslink-Fragment. Als Kontrolle wurde ebenfalls der Selbstverdau untersucht, der aber keine Fragmente zeigte, die von dem Photocrosslink-Produkt kommen. Aus diesen Gründen wurde nochmals die Analytik des reinen Peptides betrachtet, um Hinweise auf Fragmente zu erhalten, die von der Software nicht erkannt werden. Ein wichtiger Hinweis für die späteren Analysen war, dass das Peptid immer zwischen dem Prolin und dem Leucin fragmentiert. Dieser Prolin-Bruch ist eine typische Beobachtung bei der Massenspektrometrie von Peptiden.

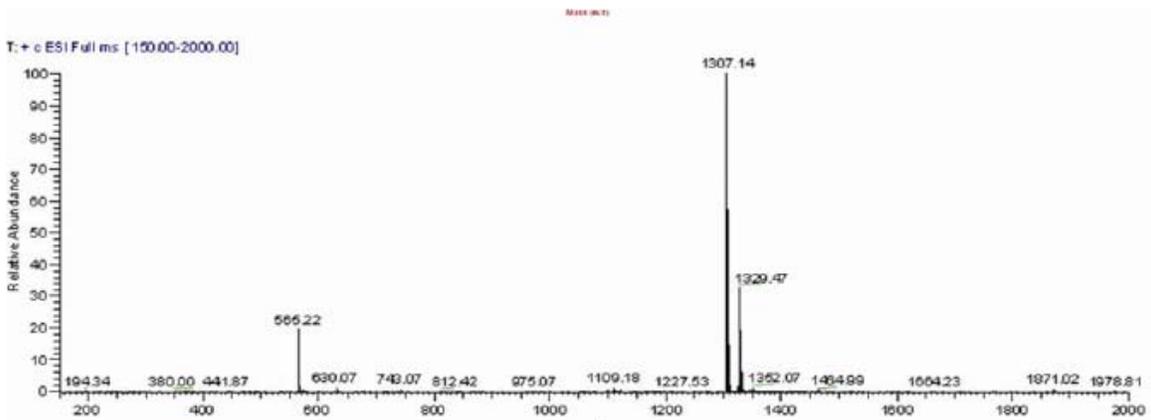


Abbildung 38: ESI-MS-Spektrum des photoaktiven Lipopeptids. Bei 565.22 Da handelt es sich um das Fragment nach dem Prolin-Bruch. Die Massen 1307.14 und 1329.47 entsprechen $[M+1]^+$ und $[M+Na]^+$

Dabei zeigte das ESI-MS Spektrum des Peptids **8** ein Fragment, das mit einer Masse von 565.2 Da auftrat. Wiederholte Analyse der Verdauungsfragmente, die diesen Prolin-Bruch mit einschlossen, zeigten ein Signal bei 2201.35 Da. Dieses Signal entstand nach dem Verdau mit Chymotrypsin des Photocross-Link Produktes. Das Fragment konnte einer kovalenten Bindung am C-terminus des PDE δ - Fragments (D₁₃₅-F₁₄₈) zugeordnet werden (Abbildung 39). Dieses Fragment wurde durch unabhängige Massenspektrometrie im MALDI-TOF-MS ebenfalls identifiziert. Insgesamt hatte dieses Fragment eine Masse von 2201.35 Da.

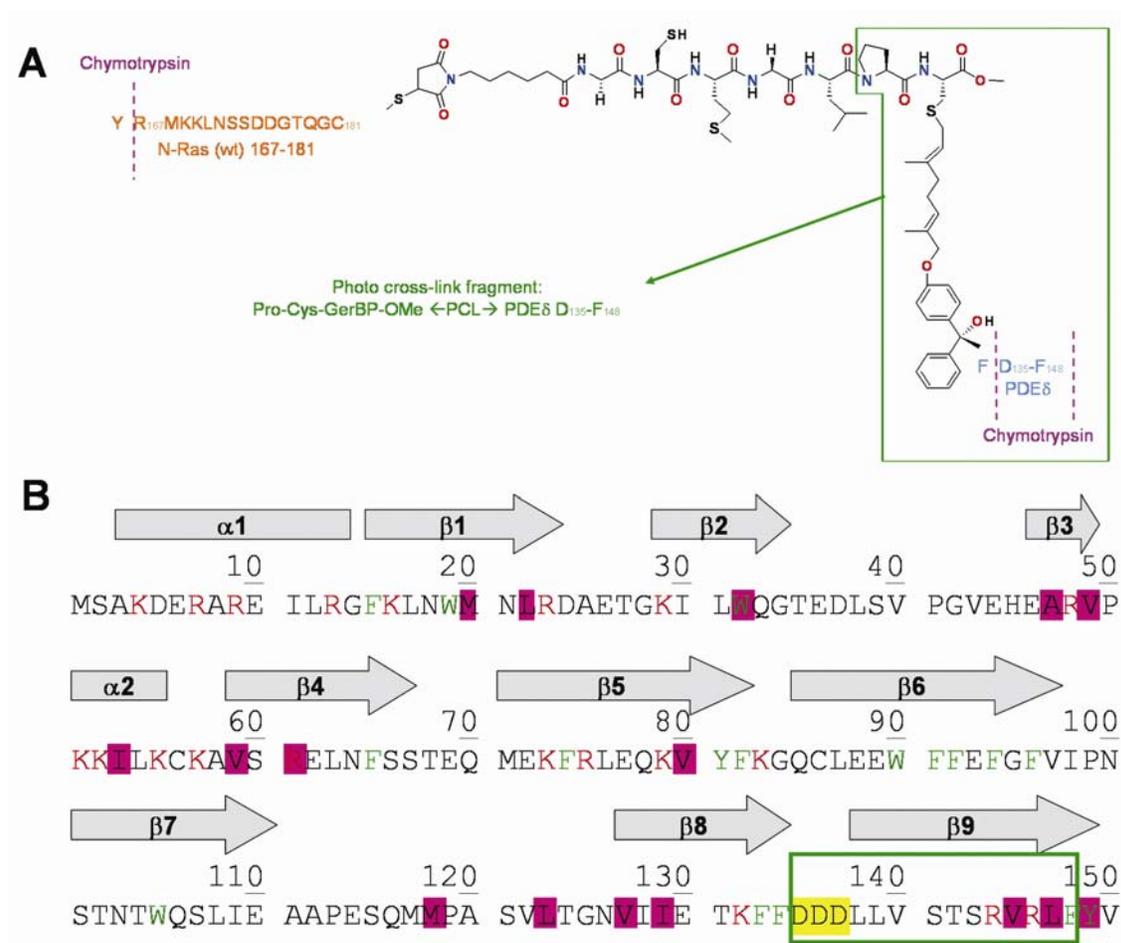


Abbildung 39: Sequenz des N-Ras-GerBP/ PDE δ -Fragments nach der MALDI-TOF MS und Chymotrypsin-Verdau. Der grün-markierte Bereich entspricht der Bindungsstelle der beiden Proteine.

Somit konnte erstmalig eine kovalente Bindung *in vitro* inklusive der Region bestimmt werden. Die Abbildung 40 zeigt die Fragmente nach der Maldi-TOF- Analyse. Die rot-markierten Massen entsprechen N-Ras-GerBP- und die blaue Fragmente PDE δ -Fragmenten. Das grün-markierte Produkt ist das nach dem Prolin-Bruch an das PDE δ gebundene Fragment.

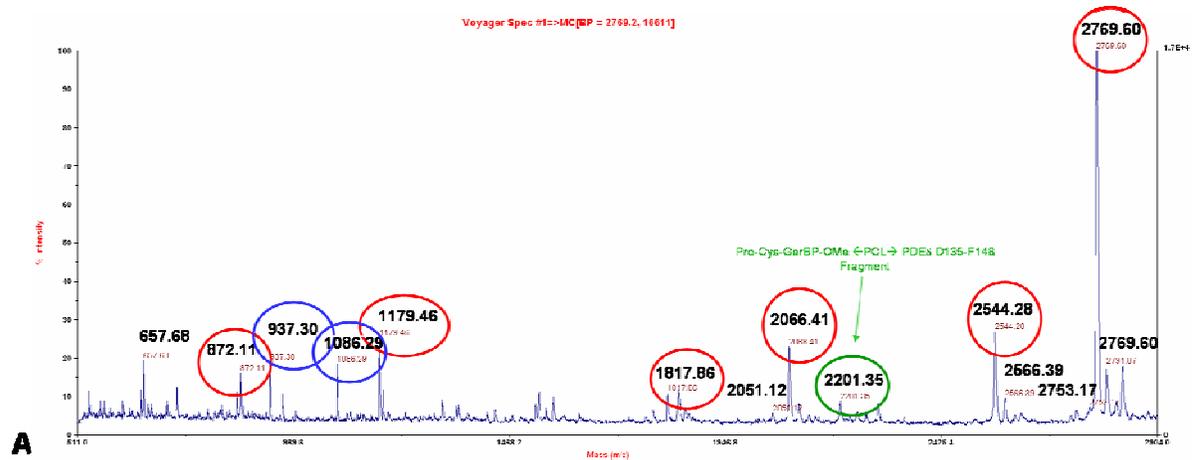


Abbildung 40: MALDI-TOF-Spektrum des Photocrosslink Produktes. Die rot-markierten Massen gehören zu dem N-Ras(GerBP)-Fragment. Die Massen in blau gehören zu PDEδ. Die Masse in grün gehört zum Crosslink-Produkt von PDEδ und N-Ras(GerBP).

Photocrosslink in Vivo

Nach der erfolgreichen Detektion des Crosslink-Fragments, sollten im weiteren Verlauf durch Pull-Down Experimente verschiedene Interaktionspartner, sowie PDEδ aus der Zelle herausgefischt werden. Zu diesem Zweck musste nicht das komplette N-Ras Konstrukt verwendet werden, sondern nur der für die Interaktion notwendige C-Terminus.

Dazu sollen die Zellen aufgeschlossen werden und mit dem speziell dafür synthetisierten Lipopetid **9** inkubiert werden. Durch die N-terminale Desthiobiotin-Gruppe ist ein herausfischen mittels einer Matrix möglich. Durch die Interaktion mit den Zielproteinen wird durch einen Photo-Crosslink eine kovalente Bindung erzeugt. In dem Aufreinigungsschritt können die mit dem Peptid **9** verbunden Proteine isoliert und in späteren Schritten analysiert werden (Abbildung 41).

Die Basis für diese Experimente bildeten das photoaktives Lipopeptid **9**, das am N-terminalen Ende eine Desthiobiotin-Gruppe trägt, um die kovalent gebundenen Interaktionspartner später mit Hilfe von magnetischen Streptavidin-Beads zu isolieren (Abbildung 42).

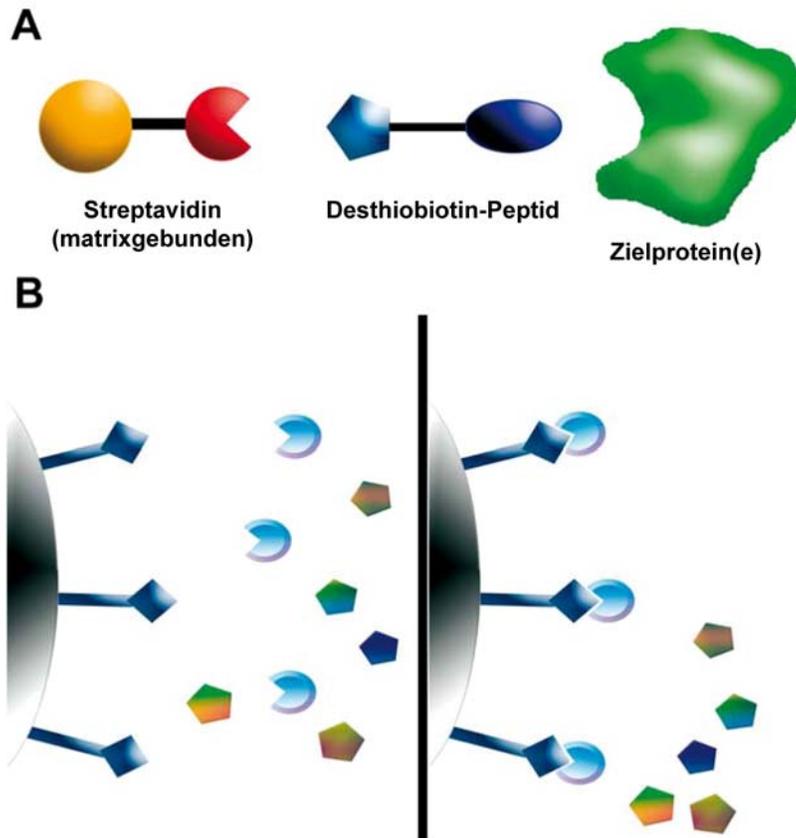


Abbildung 41: A) Prinzip der Affinitätsaufreinigung vor dem Photo-Crosslink, B) Prinzip der Aufreinigung nach dem Photocrosslink (nur die Crosslink-Produkte interagieren mit dem gebundenen Streptavidin)

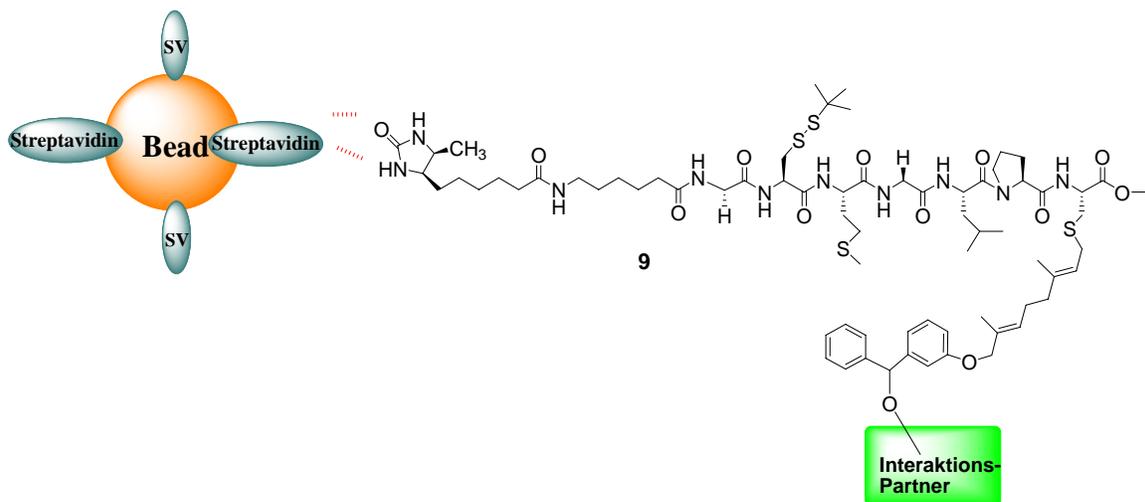


Abbildung 42: Prinzip des Pull-Down Experiments mit den magnetischen Streptavidin Beads mit dem Peptid 9.

Ein großer Vorteil dieser magnetischen Beads gegenüber den Neutravidin-Agarose-Beads ist eine verminderte unspezifische Bindung. Des Weiteren bestehen sie durch einfachere Handhabung. Um die Interaktionspartner zu finden wurden HeLa-Zellen aufgeschlossen. Bis zur Beendigung dieser Doktorarbeit wurden noch keine spezifischen Partner gefunden.

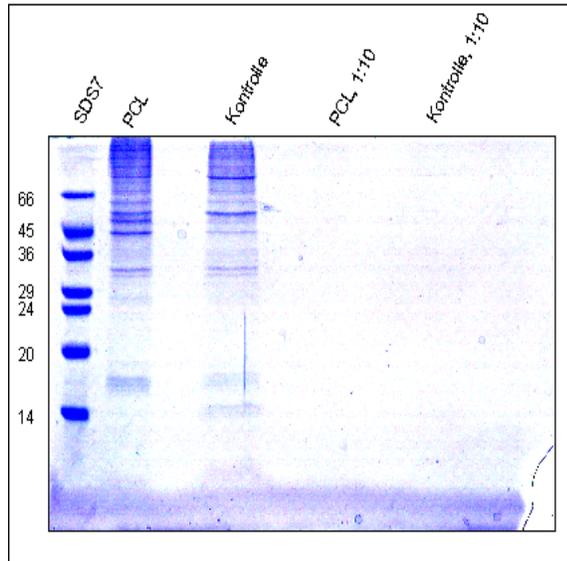


Abbildung 43: SDS- Gel nachdem Photocrosslink des Zell-Lysates

4.2. Peptidsynthese für die kinetischen Untersuchungen im Ras Zyklus

Es ist bereits bekannt, dass Ras zwischen den Zellkompartimenten (Golgi und PM) wandert. Um auf den bereits begonnenen Betrachtungen der dynamischen Ras Lokalisation weiter aufzubauen, sollten im Rahmen dieser Dissertation semisynthetische N-Ras Konstrukte erstellt werden, die es aufgrund ein Fluoreszenzmarkers (Cy3) erlauben, zelluläre Vorgänge in Real-Time zu verfolgen. Die Photobleaching-Experimente von Bastiaens gaben erste Hinweise auf einen dynamischen Ras-Zyklus zwischen der Plasmamembran und dem Golgi sowie dem Zytosol.^[91] In diesen

Experimenten wurde unter anderem in MDCK-Zellen ein YFP-Ras exprimiert und mit Cycloheximid behandelt, um die Proteinbiosynthese zu unterbinden. Nach Photobleaching am Golgi, kam es zu einem erneuten Fluoreszenzanstieg ($\sim 3-5$ min) an diesem Zellkompartiment (Abbildung 44). Aufgrund der Unterbrechung der Proteinbiosynthese konnte dieser Anstieg nur mit bereits vorhandenem YFP-Ras erklärt werden.

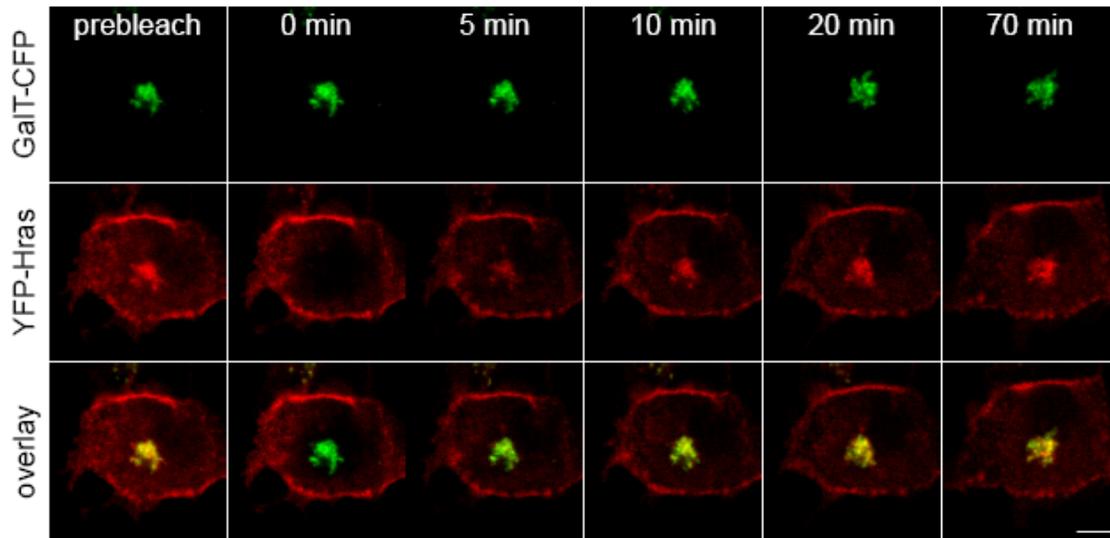


Abbildung 44: Photobleaching Experimente; obere Reihe: Golgi Marker (GalT-CFP), mittlere Reihe: Zeitverlauf des Photobleachings von YFP-H-Ras, untere Reihe: Überlagerung der Bilder

Weitere Experimente mit paGFP-Ras (ein photoaktivierbares GFP-Ras) zeigten, dass ein Anschalten dieses Konstruktes an der Plasmamembran zu einem zeitverzögerten Fluoreszenzsignal am Golgi führte. Mit Hilfe zweier semisynthetischer N-Ras-Konstrukte, die einerseits ein Lipopetid mit Palmitoyl- und Farnesylrest trugen, andererseits mit einem Hexadecyl- und einem Farnesylrest behaftet waren, konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich hierbei um ein dynamisches Gleichgewicht von Palmitoylierung und Depalmitoylierung handelt. Dieser Zyklus reguliert diese vorübergehende Membranassoziiierung und steuert dabei die Steady-State Lokalisierung und Funktion der betreffenden Proteine. Diese Lokalisierungsparameter und die dahinterstehenden Kinetiken sind die Bestimmungsgrößen für die räumliche Organisation der Proteine in der Zelle. Bis jetzt sind aber beide Parameter noch unklar.

Es besteht die Annahme, dass die Palmitoylierung sowohl an der Plasmamembran, dem Golgi und dem Endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Im Gegensatz dazu wurde herausgefunden, dass die Depalmitoylierung ausschließlich an der Plasmamembran stattfindet. Um tiefere Einsichten zu erhalten, sind klassische genetische oder biochemische Vorgehensweisen nicht geeignet, weil damit nicht spezifische Fragestellungen adressieren kann. Deswegen sollte durch semisynthetische Konstrukte die Lokalisierung und Kinetik evaluiert werden.

Um nun gezieltere Einsichten in dieses dynamische Geschehen zu erhalten, sollten verschiedene Konstrukte hergestellt werden, wobei das eine Konstrukt **2** (CysFar) dazu befähigt war zuerst einen Palmitoylierungsprozess zu unterlaufen und das andere Konstrukt **3** (PalFar) zuerst einen Depalmitoylierungsprozess unterlaufen musste (Abbildung 45). In späteren Experimenten sollten Peptide generiert werden, die weitere unnatürliche Modifikationen enthielten.

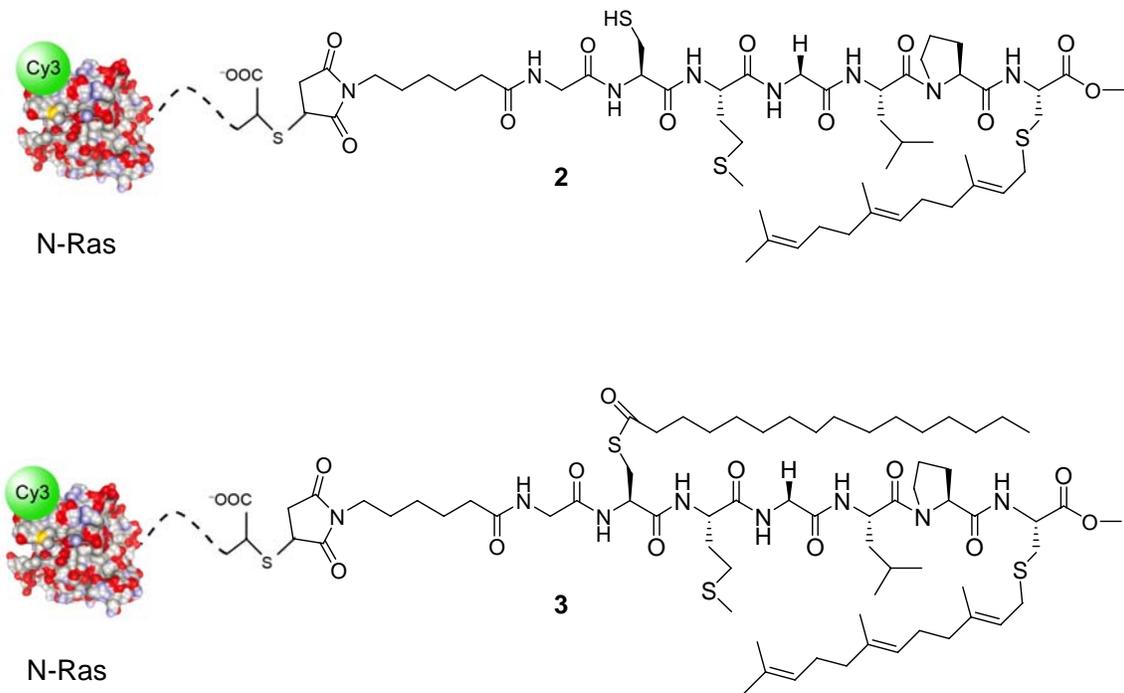


Abbildung 45 : Semisynthetische N-Ras Konstrukte gelabelt mit Cy3. A) Variante, um die Palmitoylierung zu untersuchen, B) Variante, um die Depalmitoylierung zu untersuchen

Die Zielpeptide für die Konstrukte **2**, **3** sollen an der festen Phase mit dem Hydrazid-Linker aufgebaut werden. Eine besondere Strategie in dieser Synthese beinhaltet das

palmitoylierte Peptid, da es hier nach der Fmoc-Entschützung zu einem S,N-Acylshift kommen kann (Abbildung 46). Dies erfordert eine spezielle Methodik und streng eingehaltene Reaktionsbedingungen.



Abbildung 46 : S,N-Shift nach der Entschützung. Nach Entfernen der Fmoc-Gruppe greift das Amin den Thioester an und es kommt so einem Acylshift.

4.2.1. Synthese der prelipidierten Bausteine

Für die Darstellung der N-Ras-Konstrukte an der festen Phase müssen zuerst die Fmoc-geschützten Cysteinderivate synthetisiert werden. Die N-Ras Sequenz enthält sowohl das palmitoylierte, als auch das farnesylierte Derivat. Neben diesen natürlichen Modifikationen müssen Derivate zugänglich sein, die nicht-natürliche Modifikationen enthalten, z.B einen Lipidrest mit der gleichen Struktur der Palmitinsäure, aber nicht hydrolysierbar sind. Aus diesem Grund muss ein entsprechender Thioether mit einer Hexadecylgruppe zugänglich sein. Hier sind die biophysikalischen Eigenschaften gleich (Membranverankerung), aber das chemische Verhalten sehr unterschiedlich. Ebenso sollen Derivate zugänglich sein, die in Nachbarstellung zum Schwefel sperrige Substituenten aufweisen. Durch diese Konstrukte kann man Fragestellungen hinsichtlich Enzymaktivitäten adressieren, da Enzyme empfindlich auf eine Veränderung der Raumstruktur ihrer Substrate reagieren. Dabei ist es von praktischer Bedeutung, dass alle Cysteinderivate schnell und im großen Maßstab erzeugt werden können. Dabei ist es vorteilhaft, wenn man in wenigen Schritten von entsprechenden kommerziell erhältlichen Substanzen ausgehen kann. Somit wird bei allen Alkylierungen von Cystein und bei allen

Thioesterverbindungen von der Fmoc-geschützten Trityl-Variante ausgegangen (Abbildungen 47, 47a).

Die Synthese bei Fmoc-Cys(Far)-OH **29** beruht auf der Alkylierung der Thiolgruppe des Cysteins nach Brown.^[110] Dabei wird das Prenylchlorid in alkalischer NH_3/MeOH -Lösung an das Cystein angebracht. Als Ausgangsstoff hat sich Cys·HCl **28** gegenüber dem Hydrat $\text{Cys}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{HCl}$ als vorteilhafter erwiesen, aufgrund seiner besseren Löslichkeit in Methanol. Nach der Alkylierung wurde ebenfalls wie beim oben genannten Benzophenonderivat das Cystein wegen seiner schlechten Löslichkeit nicht aufgereinigt. Die Fmoc-Schutzung durch Fmoc-OSu in Gegenwart von Triethylamin in Dichlormethan erreicht.

Ausgehend vom Cysteinhydrochlorid Hydrat wird unter basischen Bedingungen in DMF mittels Na_2CO_3 und Hexadecyliodid alkyliert (Abbildung 47). Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Amin mit der Fmoc-Gruppe geschützt, indem in Dioxan Fmoc-OSu hinzugegeben wird, um das gewünschte Produkt **34** zu erhalten.

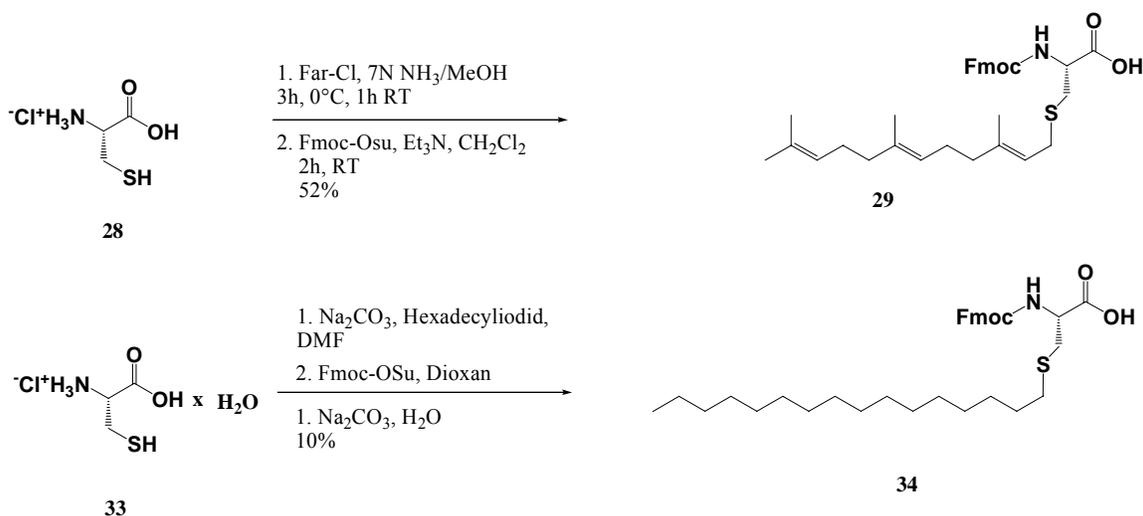


Abbildung 47: Synthese der lipidierten Cysteinderivate

Für die Synthese von Fmoc-Cys(Pal)-OH **31** wurde von Fmoc-Cys(Trt)-OH **30** ausgegangen. Zuerst entfernt man die Tritylgruppe mit TFA und fängt das Triphenylkation mit Triethylsilan ab. Nach dem Waschen mit Pentan wurde das

Rohprodukt mit Trimethylsilylchlorid in Dichlormethan unter Rückfluss gekocht, danach erfolgte die Zugabe von Palmitoylchlorid und Triethylamin.

In Analogie erhält man **32** beginnend von Fmoc-Pen(Trt)-OH **30**. Hierbei nutzt man den Vorteil der Reaktivität der Thiolgruppe aus. Nachdem Entfernen der Trityl-Schutzgruppe mittels TFA ist das frisch entschützte löslich in TFA, hingegen die Verunreinigungen nicht. Somit kann nach dem Abfiltrieren und Zugabe von Palmitinsäurechlorid das entsprechende Derivat **32** bereitgestellt werden.

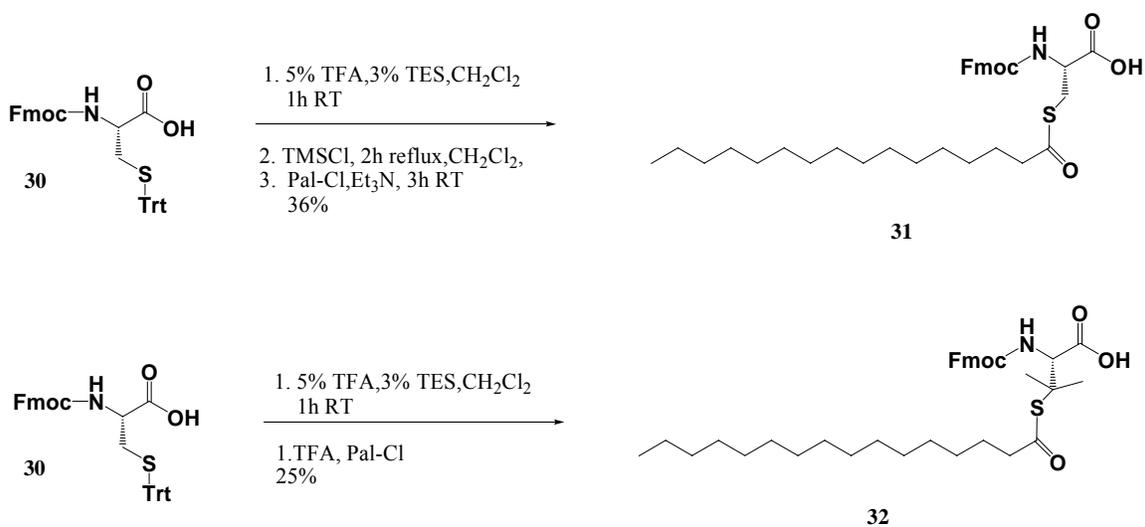


Abbildung 47a: Synthese der lipidierten Cysteinderivate

4.2.2. Synthese der Lipopeptide

Bei der Synthese der Ras Peptide an der festen Phase wurde der Hydrazid-Linker verwendet **35** (Abbildung 48). Alle Aminosäuren wurden linear am Harz (4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM Nova Gel) angebracht. Die Kupplungsbedingungen der Aminosäuren wurden ebenfalls auch für die N-terminalen Linker (MIC-Linker) verwendet. Die Fmoc-Schutzgruppen wurden mit einer Mischung aus Piperidin/DMF (1:1) entfernt. Für die erste Immobilisierung **36** des Fmoc-geschützten Cysteinderivates mit Farnesyl wurden 3 Äquivalente benutzt. Es wurden jeweils 3 Äquivalente HBTU/HOBT/Collidin für die Cysteinderivate verwendet. Um die Racemisierung zu unterdrücken wurde als Base 2,4,6-Trimethylpyridine (Collidin) verwendet. Nach mehrfachen Waschen, wurden die nächsten Aminosäuren mit jeweils 4 Äquivalenten HBTU/HOBT und 8 Äquivalenten DIPEA gekuppelt. Der entscheidende Unterschied in der Arbeitsweise, nach der Immobilisierung des palmitoylierten Cysteinderivats an das Harz **37**, war, dass nun die Fmoc-Schutzgruppe nicht mit Piperidin abgespalten werden konnte. Piperidin kann durch seine nukleophilen Eigenschaften dem aktiven Thioester die Palmitoylgruppe abspalten. Somit wurde DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7en) verwendet. Diese Base besticht einerseits durch hervorragende Basizität, aber aufgrund des sperrigen Gerüsts einer erniedrigten Nukleophilie. Dadurch kann in einer zügigen

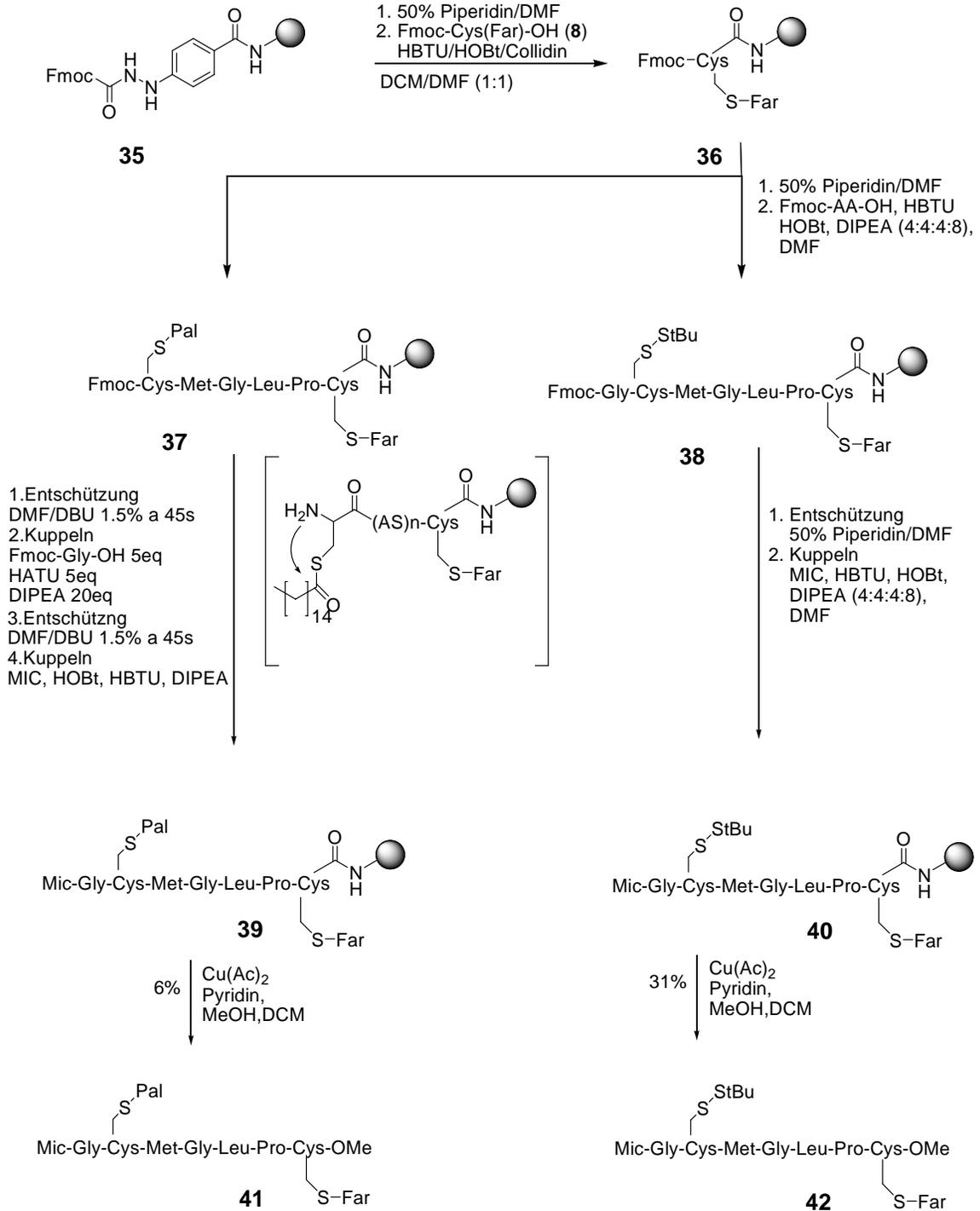


Abbildung 48: Syntheschema für die N-Ras Peptide: Links ist der Verlauf für ein palmitoyliertes und farnesyliertes Peptid dargestellt. Rechts ist der Verlauf für ein farnesyliertes Peptid dargestellt.

Entschützung der *S,N*-Acylshift vermieden werden. Schließlich werden die Peptide mit einer Mischung aus $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Pyridin und Methanol in Dichlormethan abgespalten und mittels Säulenchromatographie oder präparativer HPLC aufgereinigt.

Im Zuge dieser Methodik wurden insgesamt die folgenden Peptide synthetisiert. Als erstes eine C-terminale N-Ras Sequenz, die farnesyliertes Cystein enthält. Dies sollte, nach späterer Ligation an ein verkürztes N-Ras, als Substrat dienen, um die Lokalisation und Kinetik der Palmitoylierung in der Zelle zu betrachten.

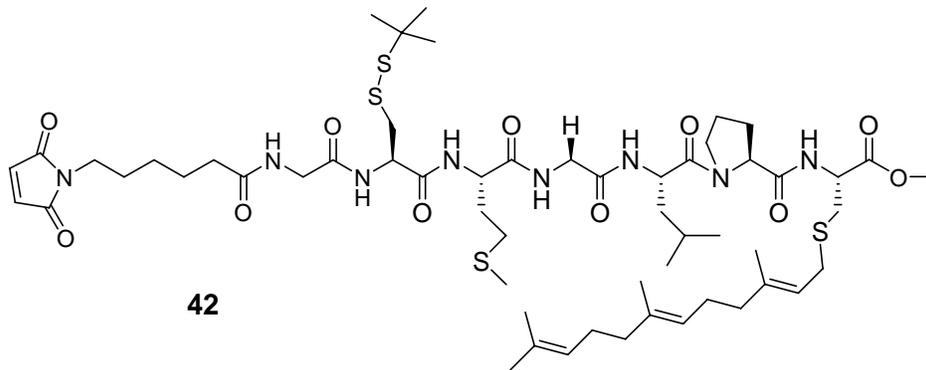


Abbildung 49: L-Far-Peptid 42

Als Gegenstück zu dem oben genannten wurde eine C-terminale N-Ras Sequenz synthetisiert, die sowohl ein palmitoyliertes- und farnesyliertes Cystein enthält. Diese Sequenz sollte nach der Ligation an ein verkürztes NRas als Substrat für die Lokalisation und Kinetik der Depalmitoylierung und Repalmitoylierung dienen.

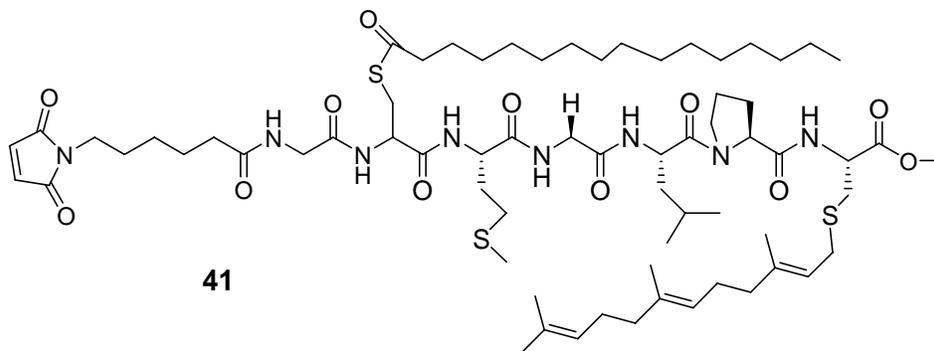


Abbildung 50: L-Pal/Far-Peptid 41

Als Referenzprobe für die beiden obigen sollte ebenso in Rahmen dieser Dissertation ein nicht palmitoylierbares, semisynthetisches Substrat in die Zellen mikroinjiziert werden. Dazu wurde das palmitoylierbare Cystein gegen ein Serin ausgetauscht, das zellulär nicht palmitoyliert werden kann.

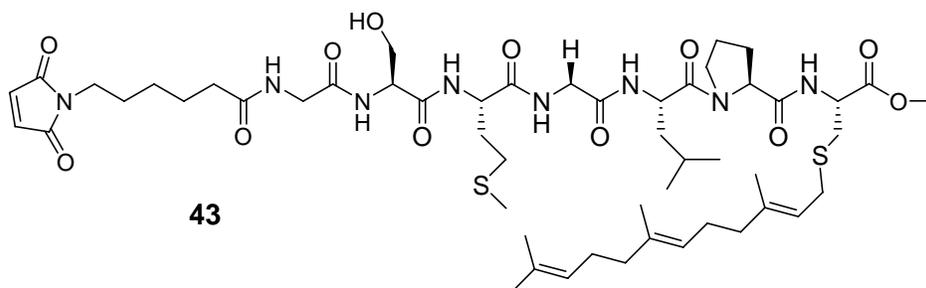


Abbildung 51: Ser/Far- Peptid 43

Im weiteren Zuge dieser Experimente sollte die Stereoselektivität dieses Prozesses untersucht werden. Da bereits bekannt war, dass N-terminale Proteine wie *Gia1*-YFP ebenfalls prozessiert werden, kann durch Verwendung nicht-nativer D-konfigurierter Aminosäuren im synthetischen Teil des N-Ras Proteins, ein Rückschluss auf die Enzymselektivität geschlossen werden.

Aus diesem Grund wurde eine C-terminale N-Ras-Sequenz in D-Konfiguration synthetisiert, um die Stereospezifität der Palmitoylierung zu untersuchen

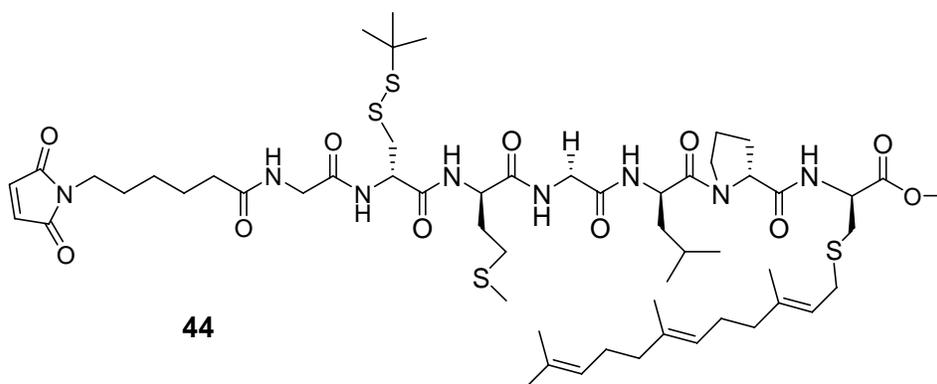


Abbildung 52: D-Far-Peptid 44

Ebenso sollte das palmitoylierte D-konfigurierte Analogon bereitgestellt werden, da in diesem Ras-Zyklus mindestens zwei Enzyme vorhanden sein sollten. Damit mit diesem

Konstrukt gleichzeitig eine Aussage über die Stereoselektivität der Depalmitoylierung getroffen werden kann.

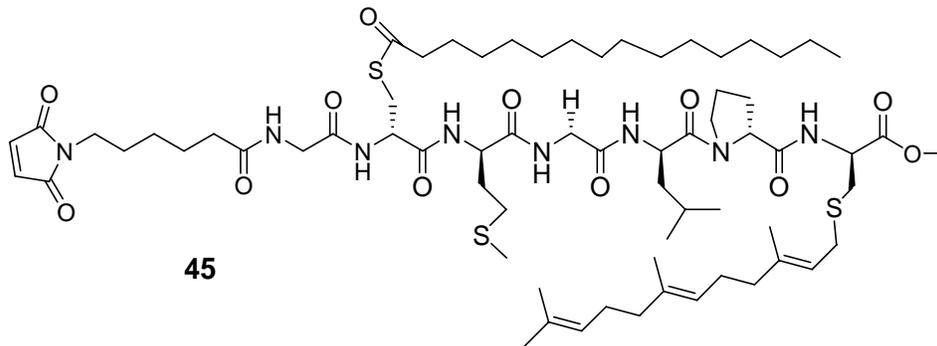


Abbildung 53: D-Pal/Far-Peptid 45

Um letztendlich ein komplette Bild dieses Prozesses zu erhalten, musste ebenfalls die Umgebung des zu palmitoylierenden Cysteins untersucht werden. Da bei den verschiedenen Ras-Typen eine konservierte Sequenz zu beobachten ist, sollte ein semisynthetisches Protein hergestellt werden, in dem das Glycin durch ein sperriges Leucin ausgetauscht wird.

NRAS_HUMAN	QYRMKKLNSSDDGTQ- G CMGLP-CVVM 189
HRAS_HUMAN	QHKLRKLNPPDESGP- G CMSC-KCVLS 189
RHOB_HUMAN	QKRYG-----SQN- G CINC--CKVL 196
RRAS_HUMAN	QELPPSPSAPRKKGG G C---P-CVLL 218

Abbildung 53: Sequenzvergleich der verschiedenen Ras-Isoformen

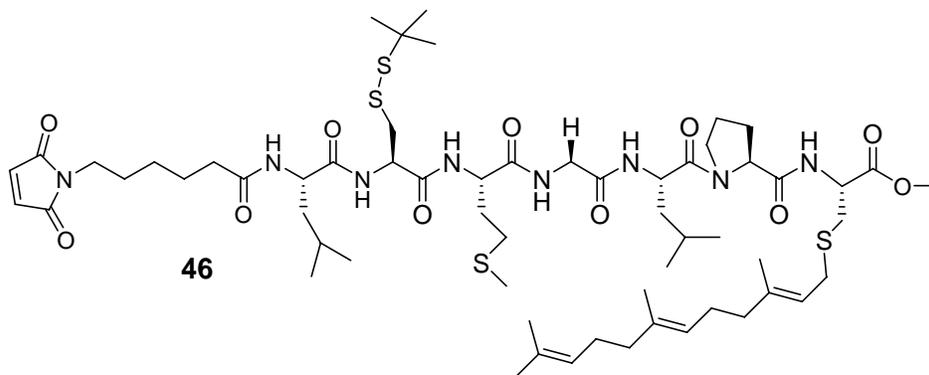


Abbildung 54: Leu/Far-Peptid 45

In dem anderen Fall wurde nicht die nebenstehende Aminosäure ausgetauscht, sondern

das Cystein wurde gegen ein Analog ausgetauscht, dass zwei Methylgruppen neben dem Schwefel trägt, um den sterischen Einfluss auf eine eventuelle Selektivität zu evaluieren.

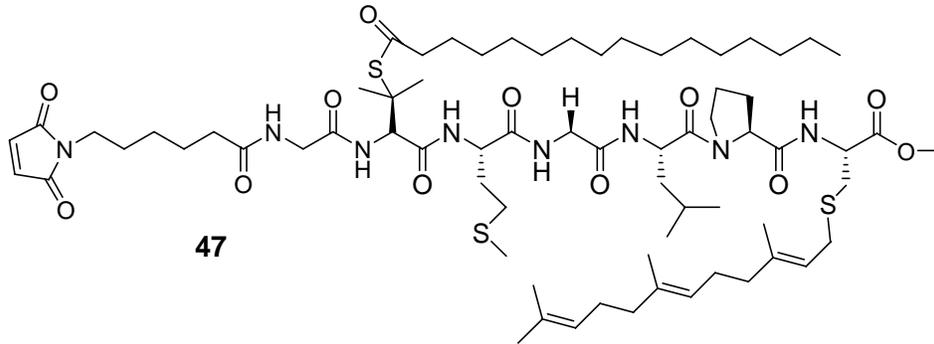


Abbildung 55: Pen/Far Peptid 47

4.3. Synthese des N-Ras C-terminus unter Verwendung von β -Aminosäuren

In weiteren Experimenten wurden semisynthetische N-Ras Konstrukte bereitgestellt werden, bei denen anstatt nativer α -Aminosäuren, β -Aminosäuren im C-terminus inkorporiert wurden. Anhand dieser Substrate sollte die Notwendigkeit des Peptidrückgrats für den zyklischen Palmitoylierungs- und Depalmitoylierungsprozess untersucht werden.

Dazu musste ein neuartiger Ansatz etabliert werden, da nachdem die Sequenz am Hydrazid-Linker aufgebaut wurde, kein β -Peptid in quantitativen Mengen isoliert werden konnte. Ein weiteres Problem war das Auftreten einer Massedifferenz von -2 bezüglich des erwartenden Massenfragments. Trotz zahlreicher MS/MS-Messungen konnte keine Erklärung für das Auftreten gegeben werden.

Ein Grund für die niedrige Ausbeute könnte in der Faltung des β -Peptides liegen, dass dann aufgrund seiner Nähe zum Hydrazid-Linker während des Abspaltungsprozesses irreversible an das Harz gebunden wird. Somit wurde das Tenta Gel R PHB Harz gewählt, da hier bereits Arbeiten mit normalen β -Peptiden publiziert wurden^[111]. Dazu sollte zuerst die Sequenz ausgehend vom β -Prolin an der festen Phase aufgebaut und anschließend in Lösung eine Fragment-Kupplung mit dem lipidierten β -Cysteinderivat ausgeführt werden, um ein lipidiertes β -Peptid zu erhalten (Abbildung 56).

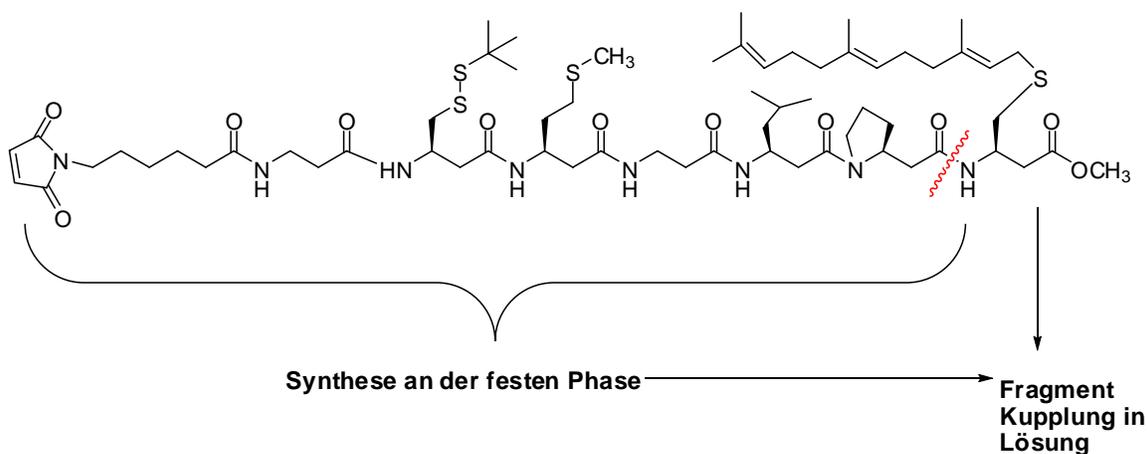


Abbildung 56: Synthesestrategie für das farnesylierte β -Peptid

In weiteren Experimenten sollte dann nach Etablierung dieser Methode eine Palmitoylgruppe eingeführt werden. Dazu erschien es sinnvoll, dass entschützte Cystein an der festen Phase zu palmitoylieren, da eine Building Block Synthese sehr zeitaufwendig wäre. Dafür lassen sich zwei Gründe anführen, einerseits sind β -Cysteine nicht kommerziell erhältlich und die normalen palmitoylierten Building Blocks erwiesen sich bisher immer als sehr schwierig in der Aufreinigung, was immer mit Substanzverlust verbunden war.

4.3.1. Synthese der prelipidierten Bausteine

Synthese des Fmoc- β -Cys(StBu)-OH **50**

Als Ausgangsstoff für die Synthese diente kommerziell erhältliches Fmoc-Cys(StBu)-OH **48** für die Arndt-Eistert Reaktion, um das Diazoketon zu erzeugen.^[112,113] Das Fmoc-geschützte Diazoketon **49** wurde in THF und Wasser gelöst und über Nacht in einem Photoreaktor bei 350 nm belichtet. Im darauffolgenden Schritt wurde nach der Entfernung des Lösungsmittels das gewünschte Produkt **50** zu erhalten.

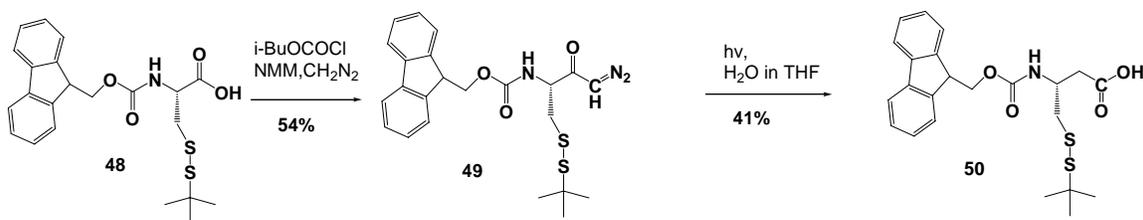


Abbildung 57: Synthese von Fmoc- β^3 -Cy(StBu)-OH

Synthese des H_2N - β -Cys(Far)-OMe **54**

Bei der Synthese des lipidierten Cysteinderivates wurde als Ausgangsstoff kommerziell erhältliches Fmoc-Cys(StBu)-OH **48** verwendet. Nach der Erzeugung des Diazoketons **49**, wurde die die Wolff-Umlagerung in einem Gemisch von Methanol mit THF unter Anwesenheit von Silberbenzoat durchgeführt. Das Produkt **51** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten.

Im nächsten Schritt sollte das Disulfid gespalten werden. Durch Verwendung von Tributylphosphin und anschließender Aufreinigung wurde das Produkt **52** erhalten. Anschließende Alkylierung mit Farnesylbromid ergab das Fmoc-geschützte lipidierte β -Cystein **53**. Die letzte Stufe umfasste die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe durch Verwendung von DBU in einer Lösung aus Methanol und Dichlormethan, so dass das gewünschte β -Cysteinderivat **54** erhalten werden konnte.

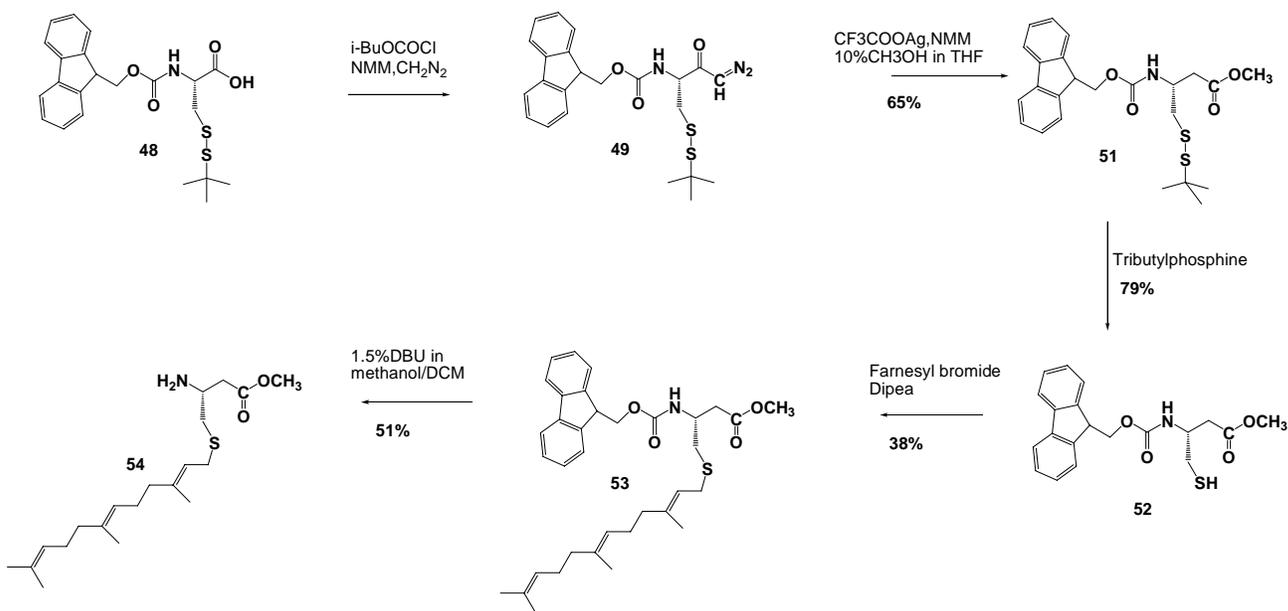


Abbildung 58: Synthese des farnesylierten Cysteinmethylesters Dipea **54**

4.3.2. Synthese des farnesylierten β -Peptids

Nachdem das Harz **55** in DCM gequollen wurde, erfolgte die Immobilisierung von Fmoc- β -Pro-OH zusammen mit DIC und DMAP . Anschließend wurde das Harz mit Essigsäureanhydrid gekappt, damit nun durch repetitive Schritte sukzessiv das β -Peptid aufgebaut werden konnte (Abbildung 59). Dazu wurde zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe zuerst mit einem Gemisch aus 20% Piperidin/DMF und im Folgenden mit einem Gemisch aus 2% Piperidin/2% DBU/NMP entfernt. Nach intensivem Waschen des Harzes wurden die Aminosäuren mittels PyBOP und DIPEA auf dem polymeren Träger

immobilisiert. Die Maleimidocaprinsäure wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Aminosäuren an das Harz geknüpft. Dabei wurde die Vollständigkeit einer jeden Kupplung durch den Bromophenolblau-Test überprüft.

Die Abspaltung erfolgte mit einer Mischung aus 2% TIS/2% H₂O/TFA für 2.5h. Die Aufreinigung des Peptids erfolgte mittels der präparativen HPLC.

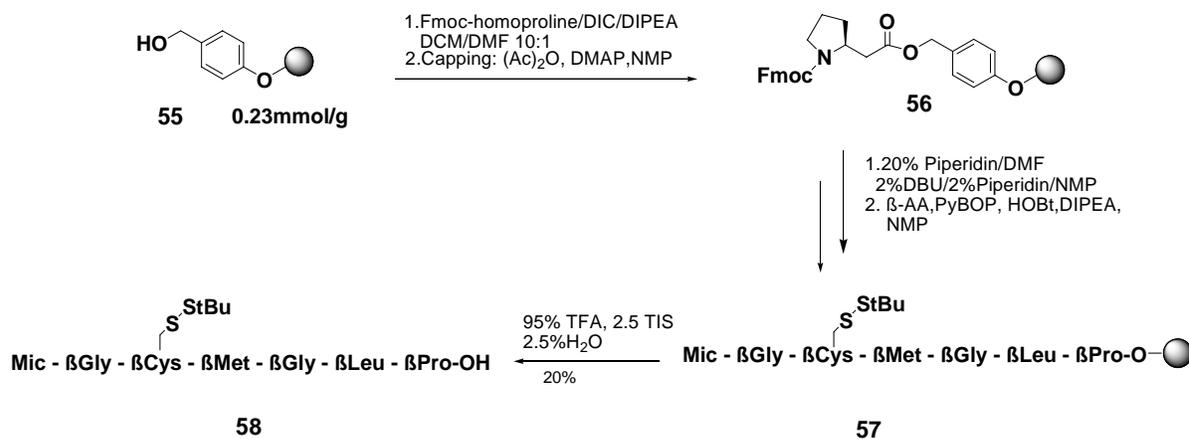


Abbildung 59: Synthese des β -Peptids

4.3.3. Fragmentkupplung in Lösung

Anschließend wurde das β -Cystein-Derivat **54** mit dem aufgereinigten β -Peptid **58** in Lösung gekuppelt. Hierzu wurde als Kupplungsreagenz Isobutylchloroformat und als Base Triethylamin verwendet. Aufgrund der guten Lösungseigenschaften für lipidierte Peptide wurde als Lösungsmittel Dichlormethan benutzt.

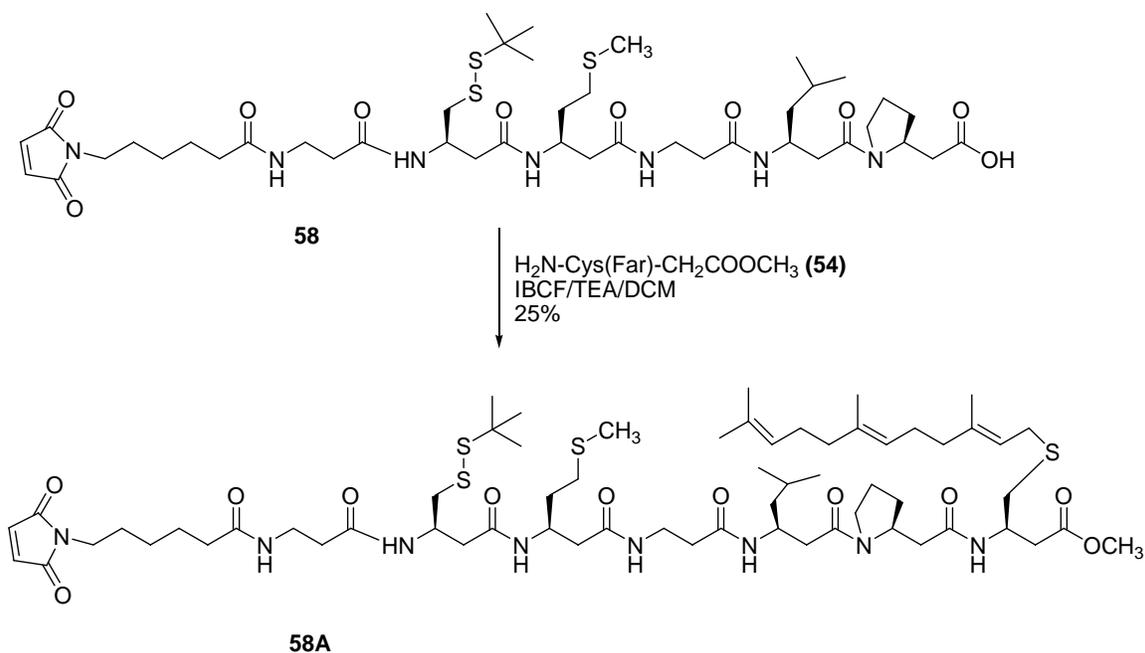


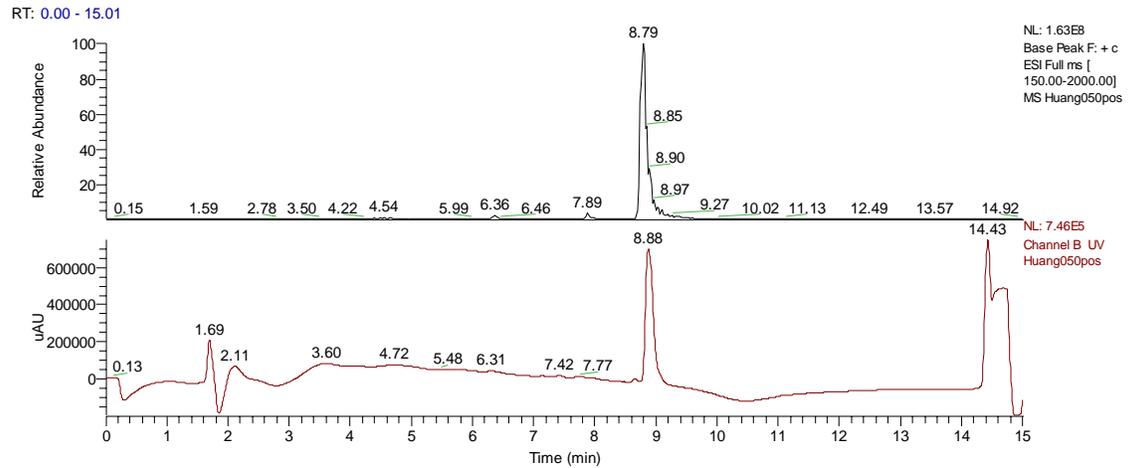
Abbildung 60: Fragmentkupplung des β -Peptids **58** mit dem lipidierten β -Cysteinderivat **54**

4.3.4. Aufreinigung des farnesylierten β -Peptids

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das β -Peptid mittels der präoperativen HPLC aufgereinigt. Da dieses lipidierte Peptid schlechte Lösungseigenschaften in Acetonitril besitzt musste es zuerst mit 30% des Endvolumens in Dichlormethan vorgelöst werden. Anschließend wurde Acetonitril zugegeben und das β -Peptid auf einer VP 125/21 Nucleodur C4 Gravity Säule und einem Gradienten von 60-100% Acetonitril (0-30 min) aufgereinigt.

Huang050pos

17.08.2006 20:20:02



Huang050pos #352-361 RT: 8.74-8.95 AV: 10 NL: 8.46E7
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

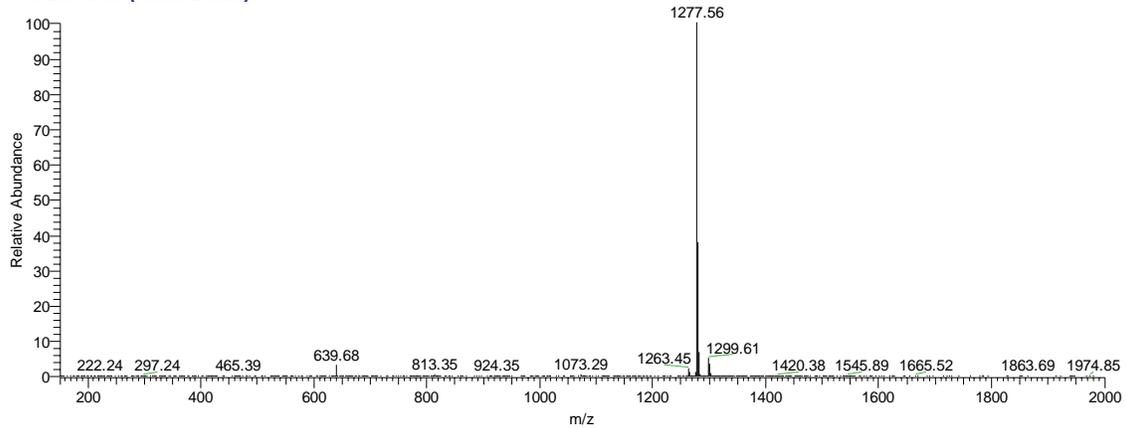


Abbildung 60a: LC-MS Spektrum des aufgereinigten β -Peptids 58A. Oben Massentrace, mittig UV-Detektion (210nm), unten Massenfragment $[M+1]^+$.

4.3.5. Synthese des N-Ras C-terminus unter Verwendung von β -Aminosäuren und Lipidierung am Harz

Hierbei wird das β -Peptid an der festen Phase aufgebaut werden. Des Weiteren soll die Palmitoylierung an der festen Phase ausgeführt werden. Dazu mussten erst geeignete Entschützungsbedingungen und geeignete Lipidierungsbedingungen etabliert werden, da das β -Peptid aufgrund seiner größeren Faltungswahrscheinlichkeit schlechte Zugangsmöglichkeiten zu den entsprechenden funktionellen Gruppen bietet.

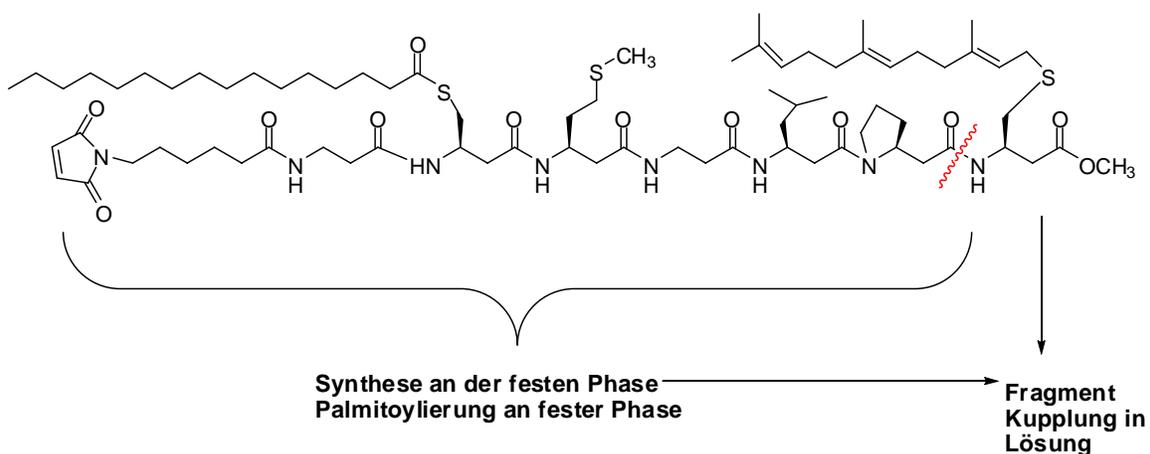


Abbildung 61: Syntheschema für das farnesylierte und palmitoylierte β -Peptid

Syntheseplan.

Das Peptid wurde analog dem vorherigen Peptid **58** aufgebaut, mit dem Unterschied, dass die Sequenz nicht bis zur MIC-Gruppe aufgebaut wurde, sondern nach dem zweiten Fmoc- β -Gly-OH zuerst die Palmitoylierung durchgeführt wurde.

Nachdem das Fmoc- β -Gly-OH inkorporiert wurde, sollte unter Zuhilfenahme verschiedener Entschützungsbedingungen die *S-tert*-Butylgruppe am β -Cystein entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde die gleiche Sequenz aufgebaut, mit dem Unterschied, dass anstelle von Fmoc- β -Cys(StBu)-OH, die α -Aminosäure (Fmoc-Cys(StBu)-OH) eingebaut wurde, um sich eine zeitaufwändige Neusynthese des β -Cysteins für diese Testreihe zu ersparen.

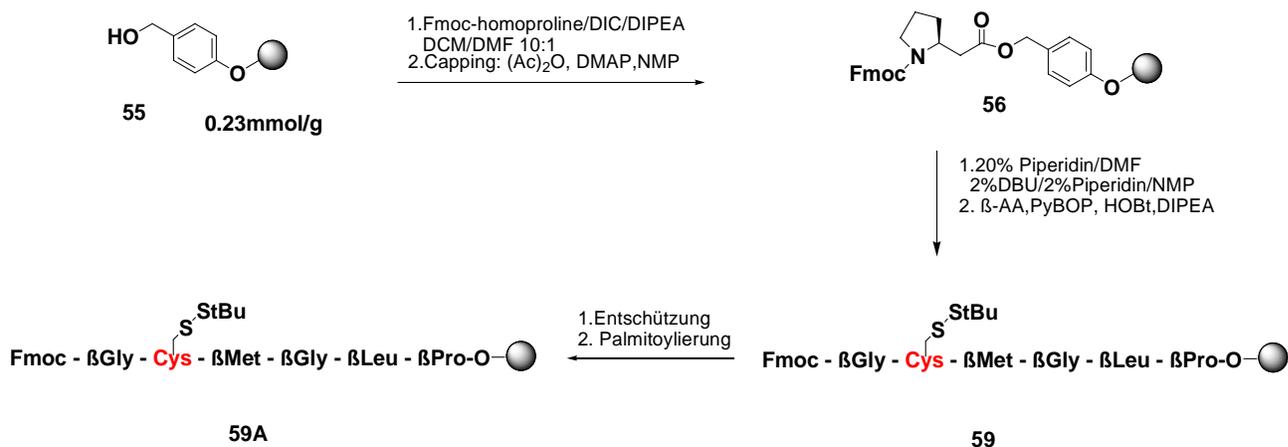


Abbildung 62: Aufbau des β -Peptides mit α -Cystein

Für die Entschützung wurden die Bedingungen aus Abbildung 64 getestet. Bei den Standardreagenzien (DTT, DTE und TCEP) für die Entschützung eines Cysteins erwies sich jedoch die Bindung als äußerst inert gegenüber diesen Bedingungen.

Hingegen stellte sich heraus, dass hohe Konzentrationen von $\text{P}(\text{Bu})_3$ und H_2O nicht nur eine Entschützung ergaben, sondern im hohen Maß zur Eliminierung führten. Dies beruht wahrscheinlich auf dem in Abbildung 63 dargestellten Mechanismus. Da im späteren Verlauf durch ESI-MS Analytik ein Fragment mit der Masse detektiert wurde, das genau einer Konvertierung von Cystein zu Alanin entspricht, erscheint dieser Verlauf sinnvoll.

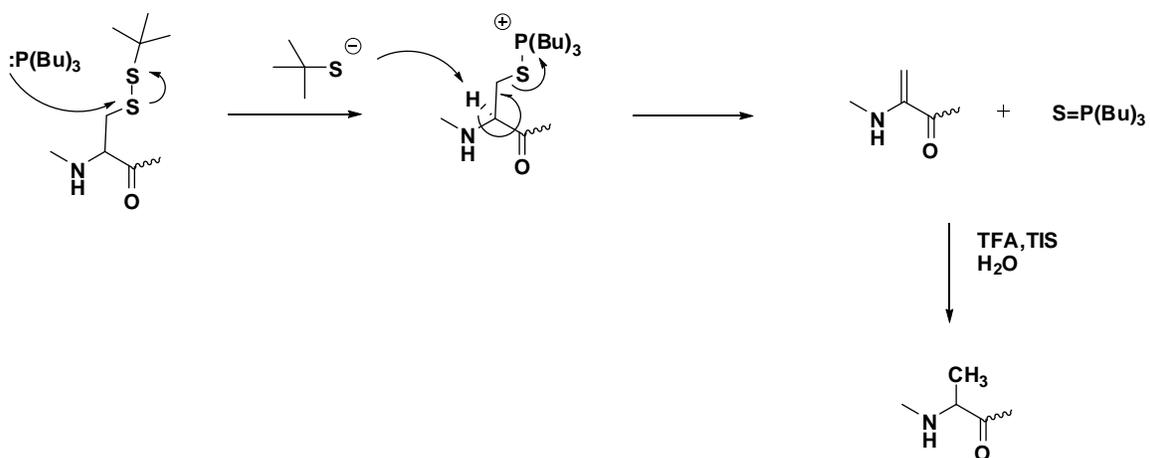


Abbildung 63: Mechanismus der Eliminierung

Wurden jedoch niedrige Mengen von $\text{P}(\text{Bu})_3$ und H_2O verwendet, kam es zur gewünschten Produktbildung. Ein entscheidender Faktor war neben der Konzentration die Dauer der Entschützung. Somit konnte die Reaktion in die Richtung getrieben werden, dass eine Eliminierung unterdrückt wurde. Bei einer Reaktionszeit von nur 1h wurde schließlich als Hauptprodukt das entschützte Peptid erhalten (LC-MS Kontrolle). Der anschließende Schritt beinhaltete die erfolgreiche Palmitoylierung des Cysteins. In den ersten Experimenten wurde dazu die Vorschrift von Waldmann übernommen.^[114] Trotz erster sehr erfolgreicher Ergebnisse (vollständige Palmitoylierung) war die Reproduzierbarkeit nicht gegeben. Somit wurden schließlich erfolgreich DIC/HOBt und DIPEA für die Generierung des Thioesters verwendet (Abbildung 64).

<u>Reagenzien</u>	<u>Lösungs- mittel</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Ergebnis</u>
100 eq PBU ₃ 400 eq H ₂ O	DMF/DCM	RT	12h	Elimination (Cystein - Alanine)
20eq Pal-Cl 21 eq HOBt, 21eq Et ₃ N	DMF/DCM 3:1	RT	18h	
2 eq DTT 3eq DIPEA	DCM	RT	2h	Keine Entschützung
4 eq DTT 6eq DIPEA	DCM	RT	2h	Keine Entschützung
10 eq DTE 15eq DIPEA	DCM	RT	4h	Keine Entschützung + Nebenprodukt
5eq TCEP	H ₂ O/ Acetatbuffer pH 4.5	RT	2.5h	Keine Entschützung
15 eq PBU ₃ 70eq H ₂ O	DMF/DCM	RT	1h	quantitativ
5eq PalOH 5eq HOBt, 5eq DIC	DMF/DCM	Mikrowelle 20min, dann RT	o/n	quantitativ

Abbildung 64: Bedingungen für die Entschützung der tert-butyl Schutzgruppe und Thioesterbildung

Diese Bedingungen konnten erfolgreich für das β -Peptid übernommen werden, dass vollständig aus β -Aminosäuren bestand. Das Peptid wurde bis zum zweiten β -Glycin an der festen Phase aufgebaut (Abbildung 64a). Anschließend wurde die Schutzgruppe mit 15eq P(Bu)₃ und 70eq H₂O entfernt. Danach wurde das frisch entschützte Peptid sofort palmitoyliert, wodurch Unterstützung mittels der Mikrowelle und mehrstündiger Reaktion im Schüttelreaktor ein guter Palmitoylierungsgrad erzielt wurde.

Im letzten Schritt wurde die MIC-Gruppe eingeführt. Dazu wurde die Fmco-Gruppe des Peptides **60A** durch eine 2% DBU-Lösung in DMF innerhalb von 1min entfernt, damit es nicht zu Nebenreaktionen des freien Amins mit dem Thioester kommt. Daraufhin wurde die bereits mit PyBOP und HOBt voraktivierte Maleimidocaprinsäure zum Harz gegeben. Anschließende Abspaltung mit TFA lieferte das gewünschte Peptid **60**.

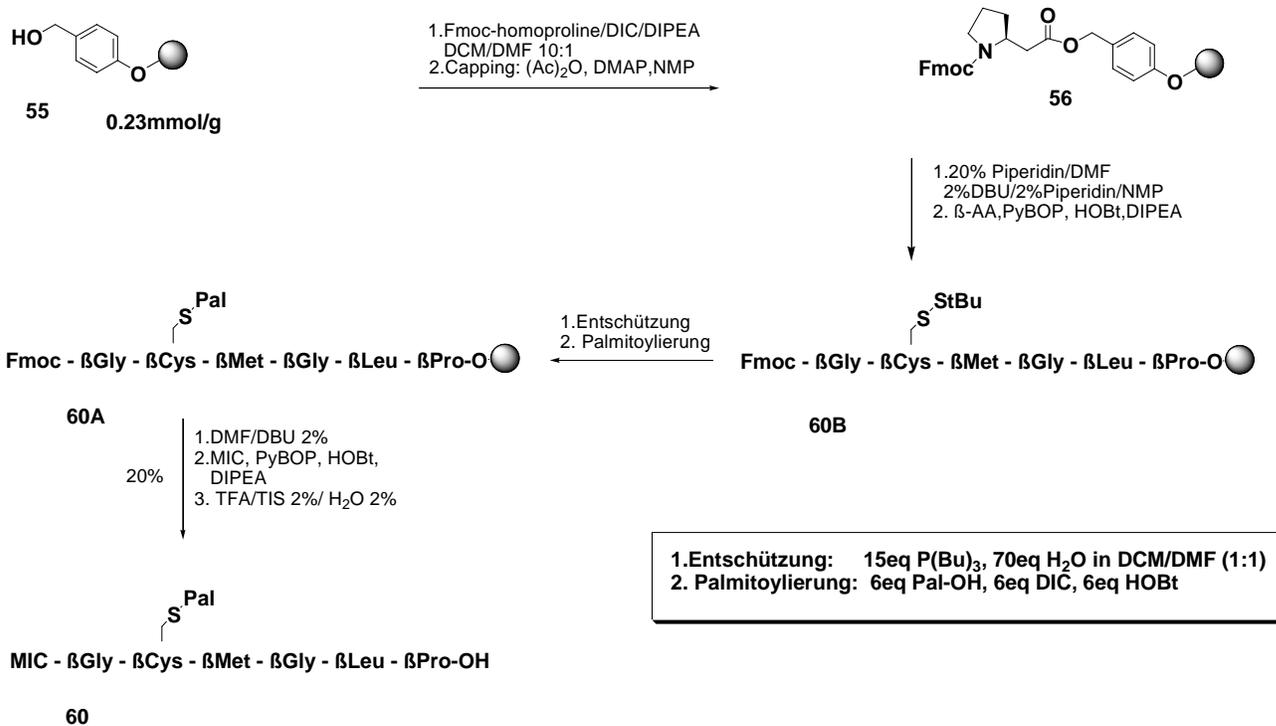


Abbildung 64a: Synthese des palmitoylierten β -Peptids an der festen Phase. Aufbau bis 60B und Entschützung mit 15eq $\text{P}(\text{Bu})_3$ und 70 eq H_2O . Palmitoylierung mit 6eq Pal-OH, 6eq DIC und 6eq HOBt: 15 min Mikrowelle und 12h Schüttelreaktor

Im letzten Schritt musste das lipidierte β -Peptid aufgereinigt werden. Da noch ein weiterer Syntheseschritt folgen sollte, war es wichtig, das lipidierte β -Peptid in größtmöglicher Reinheit zu erhalten. Deswegen erfolgte die Aufreinigung unter Zuhilfenahme der präparativen HPLC. Die Lösungseigenschaften von lipidierten Peptiden sind generell gering in Systemen mit Wasser oder Acetonitril. Deswegen wurde das Rohprodukt mit 100 μl Trifluorethanol vorgelöst und anschließend mit 650 μl Acetonitril weiter verdünnt. Die Aufreinigung erfolgte auf einer C4-Säule auf einer reversed-phase HPLC. Der benutzte Gradient startete mit 60% Acetonitril, da sonst das Peptid ausfallen kann.

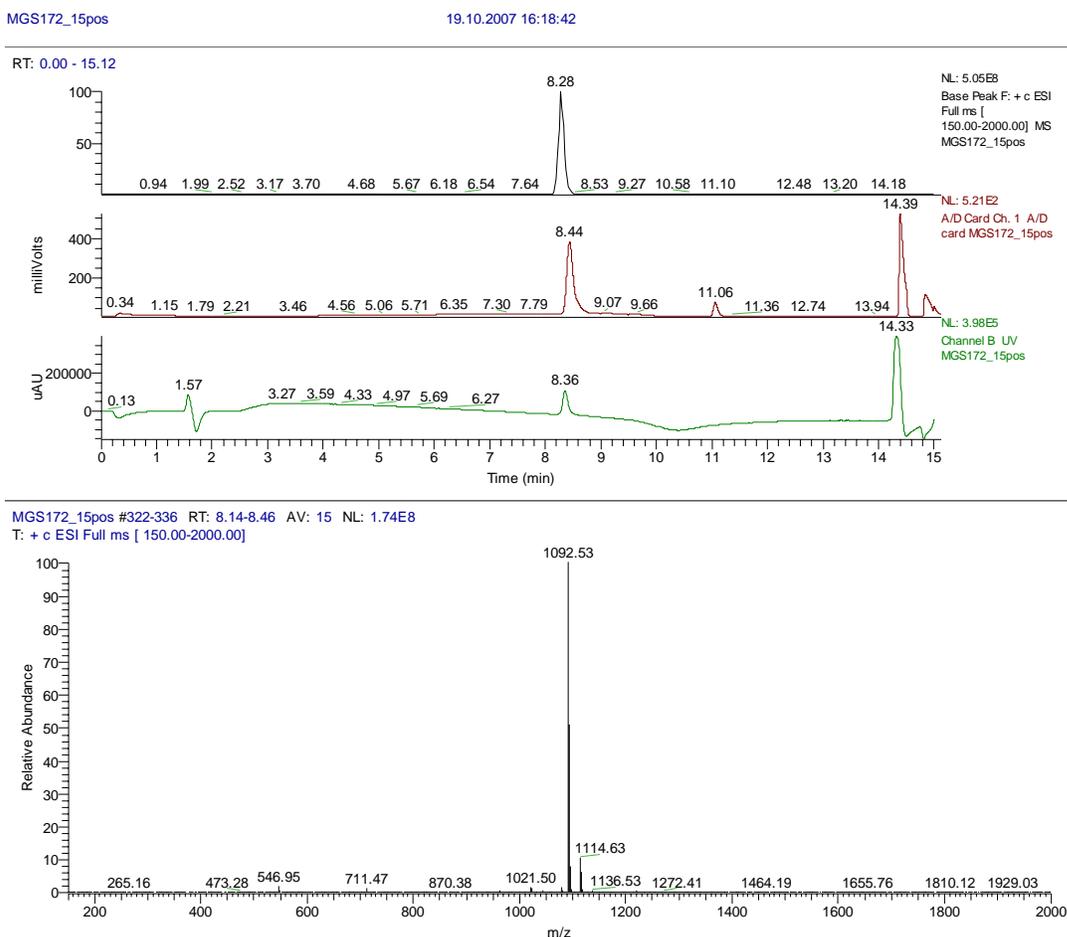
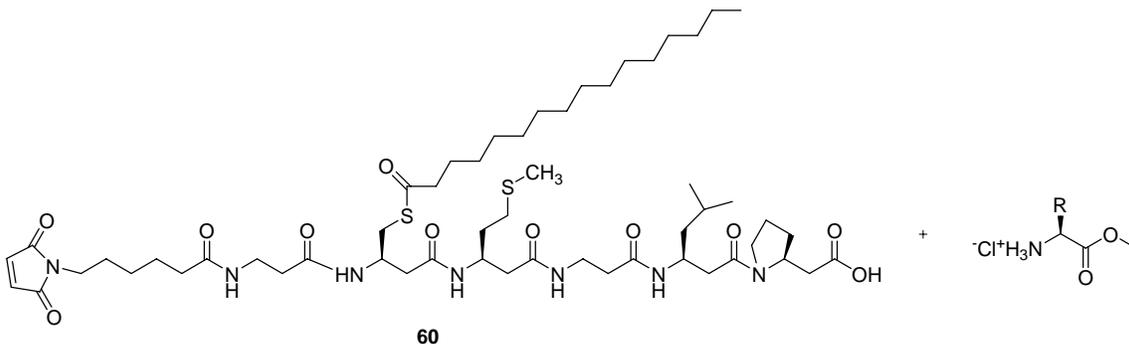


Abbildung 65: LC-MS Spektrum des aufgereinigten β -Peptids: Oben: Massendetektion (schwarz), Corona-Detektor (rot), UV-Detektion (grün). Unten: $[M+1]^+$ -Peak des Peptids 60

4.3.6. Fragmentkupplung in Lösung

Zuerst wurde die Methodik der bereits erfolgreichen Kupplung des ersten β -Lipopeptides mit Isobutylchloroformiat übernommen. Doch hier kam es anscheinend zu Nebenreaktionen mit dem Thioester und der Palmitinsäure. Da dies auch als ein Aktivester anzusehen ist, ist es wahrscheinlich, dass während des Kupplungsvorgangs das IBCF mit dem Thioester interagiert. Im NMR- Spektren des Rohproduktes war kein Palmitat mehr am Peptid gebunden.

Aus diesem Grund wurde als Testsystem die Fragmentkupplung mit dem palmitoylierten β -Peptid und Leucinmethylester bzw. farnesyliertem Cysteinmethylester durchgeführt, um nicht größere Mengen des lipidierten β -Cysteinmethylesters zu verbrauchen. Dabei schlugen die Kupplungen, mit den Kupplungsreagenzien PyBop und HATU durchgeführt wurden, fehl. Auch hier erwies sich die Verwendung von Carbodiimiden als vorteilhaft. Die Wahl des Lösungsmittels scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei Verwendung größerer Mengen an DMSO wurde ein besseres Endresultat erzielt. Dies liegt einerseits daran, dass das palmitoylierte β -Peptid bessere Löslichkeitseigenschaften in DMSO aufweist sowie an der Eigenschaft des DMSO, als sogenannter H-Brückenbrecher zu fungieren. Diese Eigenschaft könnte dabei helfen das β -Peptid zugänglicher zu machen.



Äquivalente der Aminosäure	Kupplungsreagenz	Lösungsmittel	Zeit	Ausbeute/HPLC-Det.
1.1eq Leu-OMe	1.1 eq PyBop	DCM	o/n	no
1.1eq Leu-OMe	1.1eq HATU	DCM/NMP	o/n	10%
1.1eq Leu-OMe	1.5eq HATU	DCM/NMP	o/n	10%
1.1eq Leu-OMe	1.1 eq EDC/HOBt TEA	DCM/DMSO DMF (10/5/1)	o/n	80%
1.1eq Cys(Far)-OMe	1.1 eq EDC/HOBt TEA	DCM/DMSO DMF (10/5/1)	o/n	80%

Abbildung 66: Kupplungsbedingungen bei der Fragmentkupplung

4.3.7. Synthese des palmitoylierten und farnesylierten β -Peptids

Das zuvor aufgereinigte palmitoylierte β -Peptid **60** wurde in einer Mischung aus Dichlormethan und DMSO gelöst. Parallel dazu wurde der farnesylierte β -Cysteinmethylester **54** in Dichlormethan gelöst. Daraufhin werden die Kupplungskomponenten HOBT, EDC·HCl und Triethylamin zum Peptid **60** gegeben. Nach einer fünfminütigen Voraktivierung wird das Cysteinderivat **54** zugegeben und die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird das Lösungsmittel über die Hochvakuumpumpe entfernt.

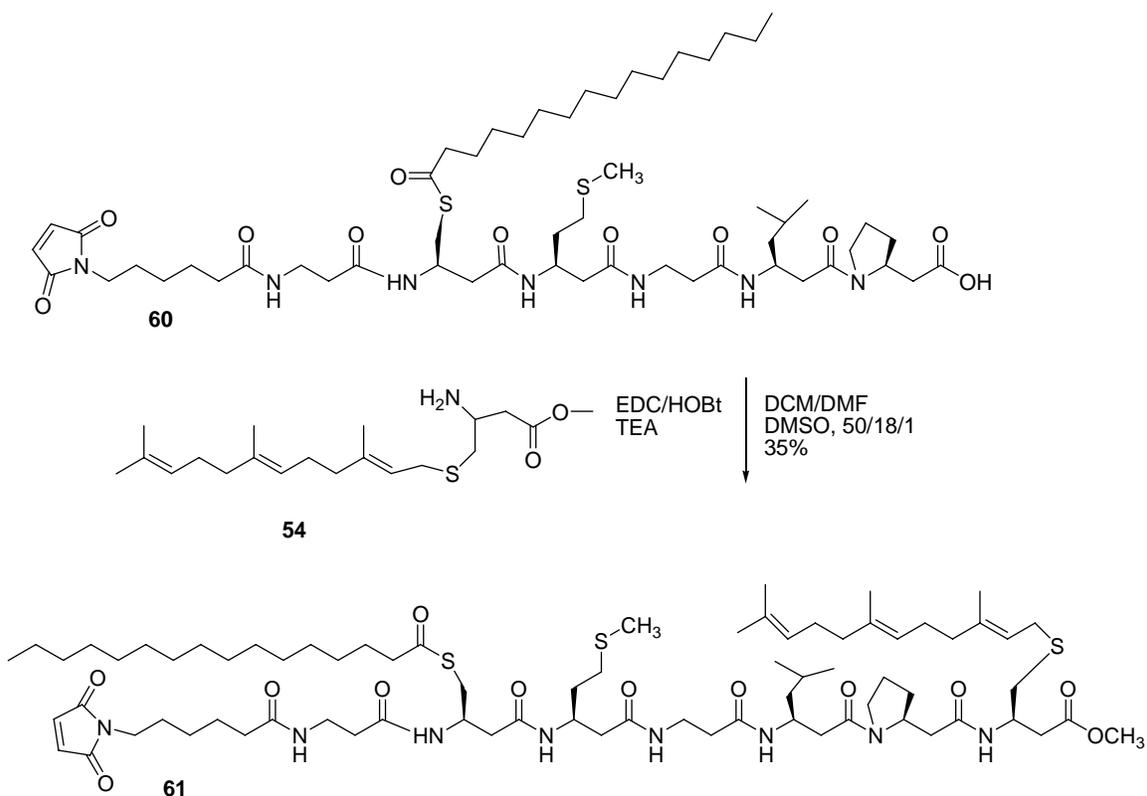


Abbildung 67: Synthese des lipidierten β -Peptids **61**

4.3.8. Aufreinigung des β -Peptids

Nachdem alle Lösungsmittelrückstände restlos entfernt wurden, musste das β -Lipopeptid zuerst wieder für den nachfolgenden Aufreinigungsschritt in der präoperativen HPLC in Acetonitril gelöst werden. Aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften für doppel-lipidierte Peptide mussten Kosolventien benutzt werden. Hierbei stellte es sich als besonders sinnvoll heraus, das Peptid jeweils mit 10% des Endvolumens Trifluorethanol und Dichlormethan vorzulösen. Anschließend wurde Acetonitril zugegeben. Das β -Peptid **61** wurde dann mittels einer VP 125/21 Nucleodur C4 Gravity Säule und einem Gradienten von 60%-100% Acetonitril (0-30 min) aufgereinigt und mit einer Ausbeute von 35% erhalten.

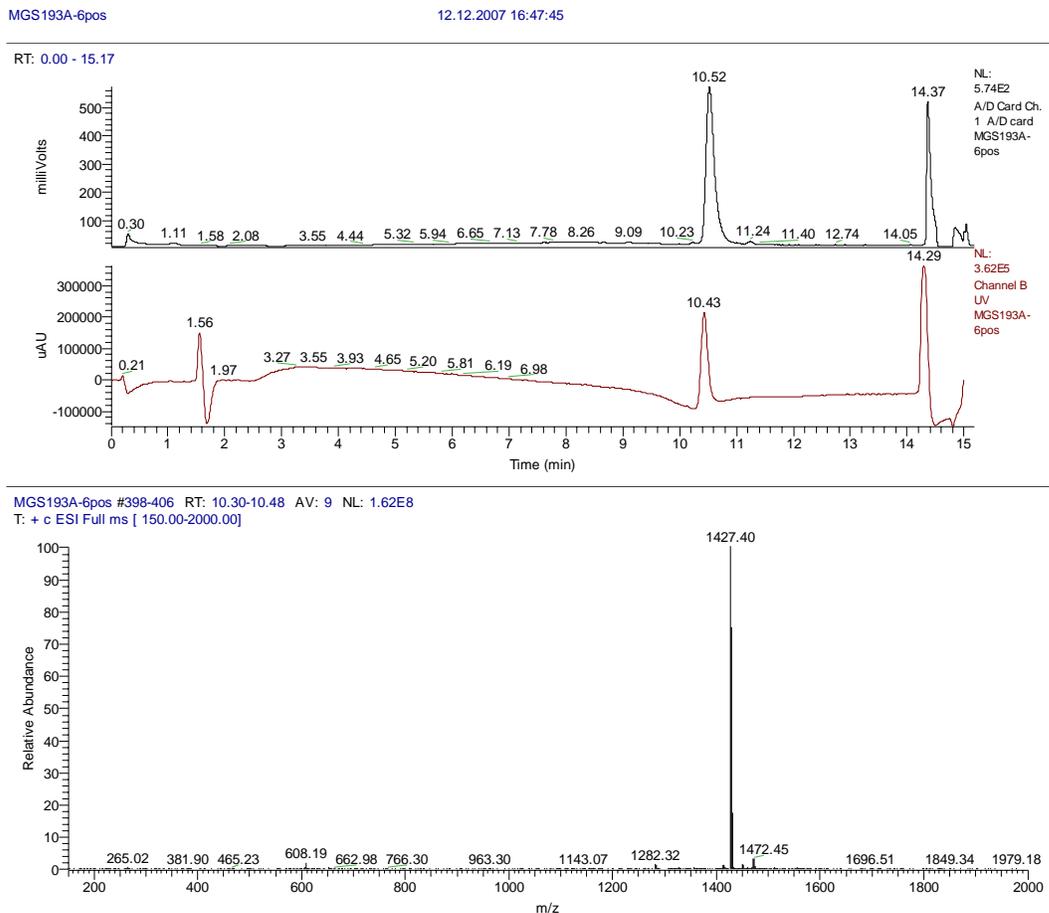


Abbildung 68: Reverse-Phase LC-MS Spektrum des Pal/Far- β -Peptids 61: Oben : Corona-Detektor (schwarz), UV-Detektion (grün). Unten : $[M+1]^+$ -Peak des Peptids 61

4.4. Biochemische Experimente

4.4.1. Mikroinjektion der gelabelten semisynthetischen Proteine

Die Mikroinjektion der semisynthetischen Proteine wurde von O.Rocks am EMBL Heidelberg und von R.Vetter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie ausgeführt. Für die Injektion wurden Borosilikat Glasskapillaren benutzt. Die Proben wurden im Puffer (65mM Tris, pH 7.5, 1mM MgCl₂) zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml verdünnt. Die Zelleexperimente wurden bei 37°C durchgeführt. Als Mikroskope dienten für die FRAP-Experimente ein Leica TCS SP2 AOBS-Mikroskop, für die Photoaktivierungsexperimente wurde ein Olympus Fluoview 1000 Mikroskop verwendet. Als Beispiel sei hier die Mikroinjektion der semisynthetischen Konstrukte **2** und **3** gezeigt.

4.4.2. Mikroinjektion des CysFar-Konstruktes (2)

Wie bereits eingangs erwähnt sind die Parameter für die Lokalisation und der betreffenden Kinetik der Palmitoylierung und Depalmitoylierung im N-Ras-Zyklus noch unbekannt. Die Palmitoylierung soll an verschiedenen Membrankompartimenten wie der Plasmamembran, dem Golgi und dem Endoplasmatischen Retikulum stattfinden. Um den Ort der Palmitoylierung und die darin beinhaltende Kinetik aufzuklären, wurde in dem Initialexperiment ein semisynthetisches farnesyliertes N-Ras-Konstrukt **2** verwendet. Abbildung 71 zeigt den Zeitverlauf vor und nach der Mikroinjektion von **2** in MDCK Zellen. Die obere Reihe zeigt die Fluoreszenzbilder der Probe. Die mittlere Reihe illustriert den Steady-State Zustand von YFP-N-Ras, das durch vorherige transiente Transfektion exprimiert wurde. In der dritten Reihe ist die Überlagerung der beiden dargestellt, damit eine zeitabhängige Änderung der lokalen Fluoreszenzintensität des injizierten Proteins am Golgi und der Plasmamembran hervorgehoben werden kann. Als weitere Kontrolle sind in der untersten Reihe Fluoreszenzbilder des Marker-Proteins Galactosyl-Transferase (GalT-CFP, Fusion mit CFP) dargestellt, um die spezifische Golgi-Lokalisation von N-Ras und zugleich die spezifische lokale Akkumulation der

Probe zu dokumentieren. Die Aufnahmen starten vor der Injektion (Bild oben Links: pre). Beim nächsten Zeitpunkt sind 10s nach der Injektion vergangen. Die Injektion erfolgte von der oberen rechten Seite und man erkennt, dass sich die Probe nach 20s gleichmäßig in der Zelle verteilt und eine Erhöhung des Fluoreszenzsignal am Golgi zu erkennen ist. Da das CysFar Konstrukt sich unspezifisch in Membranen setzen konnte, aber aufgrund seines einzelnen Lipidrestes auch wieder schnell heraustreten konnte, gelangte es aufgrund dieser Dynamik schnell zum Golgi. Vorherige Untersuchungen zeigten, dass hier die Palmitoylierung stattfindet und das Ras wieder zur Plasmamembran gelangt. In dem letzten Fluoreszenzbild (720s) erkennt man die Erhöhung des Signals an der Plasmamembran. Somit gelangte das Konstrukt innerhalb kürzester Zeit für die Palmitoylierung zum Golgi und anschließend zur Plasmamembran.

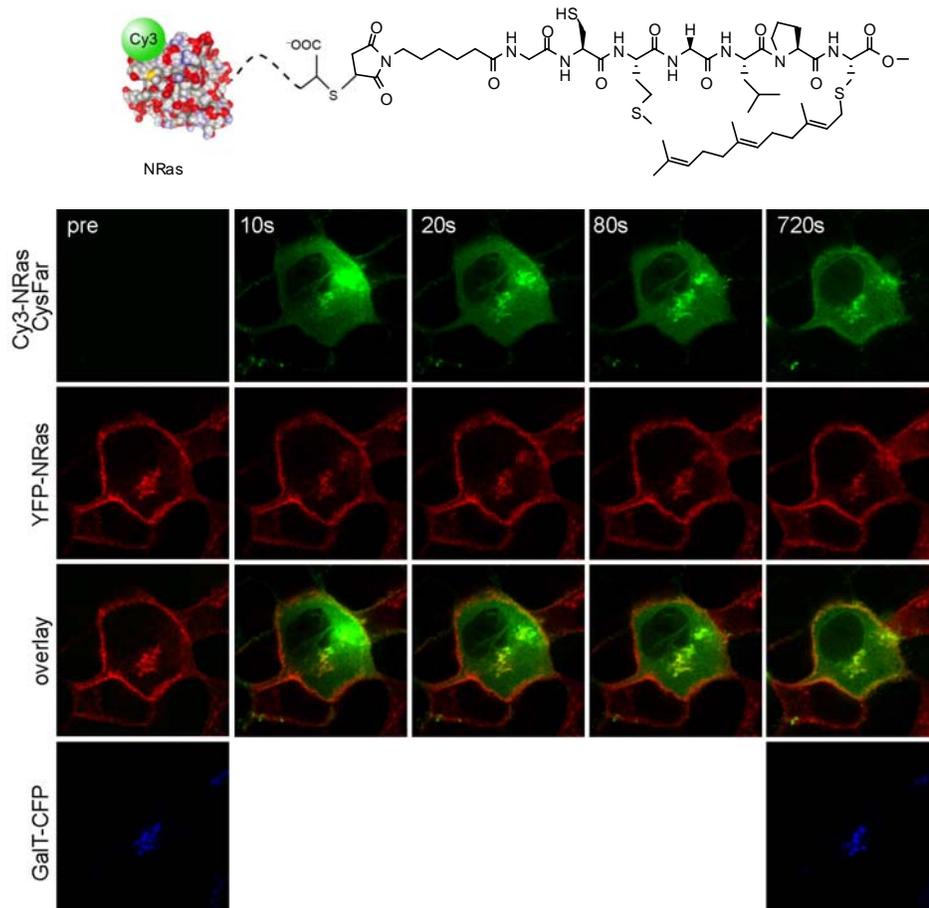


Abbildung 71: Zeitverlauf der Fluoreszenz nach Mikroinjektion der CysFar-Probe 2 Obere Reihe: Zeitverlauf vor der Mikroinjektion (pre) bis zu dem Zeitpunkt ($t=720s$) nach der Mikroinjektion. Zweite Reihe: Steady-State des YFP-NRas. Dritte Reihe: Überlagerung der beiden oberen Reihen. Unterste Reihe: Visualisierung des Golgi durch den Golgimarker GalT-CFP

4.4.3. Mikroinjektion des PalFar-Konstruktes (3)

Das nächste Experiment sollte den Ort und die Kinetik des Depalmitoylierungsprozesses evaluieren. Dafür wurde ein semisynthetisches N-Ras-Konstrukt in die Zelle mikroinjiziert, das sowohl eine Farnesyl- als auch eine Palmitoylrest enthält. Abbildung 72 zeigt einen Zeitverlauf vor und nach der Mikroinjektion von PalFar **3** in MDCK Zellen. In der oberen Reihe sind Fluoreszenzbilder der Cy3-gelabelten Probe dargestellt. Die mittlere Reihe repräsentiert als Referenz die Steady-State Lokalisation von YFP-N-Ras, welches von den Zellen durch vorherige transiente Transfektion exprimiert wird. Die dritte Reihe von oben zeigt die Überlagerung der beiden Bilder, um zeitabhängige Änderungen der lokalen Fluoreszenzintensität des injizierten Proteins am Golgi und der Plasmamembran zu verdeutlichen. Auf den beiden untersten Bilder links und rechts ist der Golgi mittels des Golgimarkers GalT-CFP zu sehen.

Die Aufnahmen beginnen vor Injektion des PalFar-Konstruktes (Bild oben links: pre). Die zweite Aufnahme wurde 20s nach der Injektion gemacht. Die Injektion erfolgte in dieser Zelle an der linken oberen Seite. Man erkennt, dass die Probe sich zunächst rasch und nahezu gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt hat. Diese initiale Lokalisation der Probe ist eine Folge der unspezifischen und zugleich festen Membraninsertation des doppel-lipidierten Peptides in jegliche Membran in der Zelle. Überraschenderweise ist aber gleichzeitig bereits schon nach 20s eine beginnende spezifische Akkumulation der Probe am Golgi zu erkennen, die nach ca einer Minute ein Gleichgewicht erreicht. Ein Anstieg der PalFar Fluoreszenz an der PM unmittelbar nach der Injektion ist hingegen nicht zu beobachten. Erst nach ca. zwei Minuten ist eine dortige Anreicherung der Probe zu erkennen. Gleichzeitig nimmt die Fluoreszenzintensität im Cytosol auf anderen Membranen ab.

HDFar, ein doppelt lipidmodifiziertes Kontrollprotein, welches nicht einem Zyklus aus Palmitoylierung und Depalmitoylierung unterworfen ist, zeigt keinerlei spezifische Golgi Akkumulation sondern lokalisiert auch nach mehreren Minuten im Steady-State unspezifisch an allen Membranen.^[93]

Die Anreicherung von PalFar am Golgi kann nur durch Depalmitoylierung der injizierten Probe und anschließende lokale Repalmitoylierung am Golgi erfolgt sein. Die Tatsache,

dass dieser Prozess innerhalb von Sekunden abläuft, lässt nur den Schluss zu, dass Depalmitoylierung auf allen zellulären Membranen stattfindet und nicht lokal auf die PM beschränkt ist. Wäre letzteres der Fall, würde die Golgi Akkumulation von PalFar einen um mehrere Größenordnungen langsameren Verlauf nehmen. Die PM nimmt nur einen Bruchteil der Oberfläche aller zellulären Membranen ein im Vergleich z.B. zum Endoplasmatischen Retikulum oder endosomalen Vesikeln, in welche PalFar nach der Injektion gleichermaßen unspezifisch inseriert. Lokale Depalmitoylierung an der PM würde also nur einen Bruchteil der gesamten injizierten Probe mobilisieren und in den Palmitoylierungszyklus schleusen, der große Rest bliebe unprozessiert. Jede zusätzliche Depalmitoylierung würde den Austausch von PalFar auf anderen Membransystemen mit der PM erfordern. Diese Austauschprozesse erfordern jedoch Minuten und nicht Sekunden. Die obigen Schlussfolgerungen wurden durch FRAP Experimente weiter bekräftigt, in denen das injizierte PalFar ca zwei Minuten nach der Injektion am Golgi photogeblicht und anschließend der Wiederanstieg (Recovery) der lokalen Fluoreszenz gemessen wurde. Dieses lokale Bleichen zerstört die Fluoreszenz aller zuvor mobilisierten PalFar Moleküle. Würde Depalmitoylierung nur an der PM stattfinden, würden alle an der PM mobilisierten PalFar Proteine nun nicht mehr sichtbar sind und die Recovery würde den Zeitrahmen des (langsamen) Austauschs anderer Membranen mit der PM reflektieren, welcher Nachschub an mobilisierbarer Probe garantieren würde. Das Experiment ergab jedoch eine Recovery ($t_{1/2}$) innerhalb von 45s. Demnach ist schneller Nachschub an depalmitoyliertem Substrat auch zu einem späteren Zeitpunkt gewährleistet, wenn der initiale PM Pool mobilisiert worden ist.

Die verzögerte Anreicherung von PalFar an der PM ist eine Folge des anterograden Transports von PalFar, das vom Golgi über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gelangt ist.

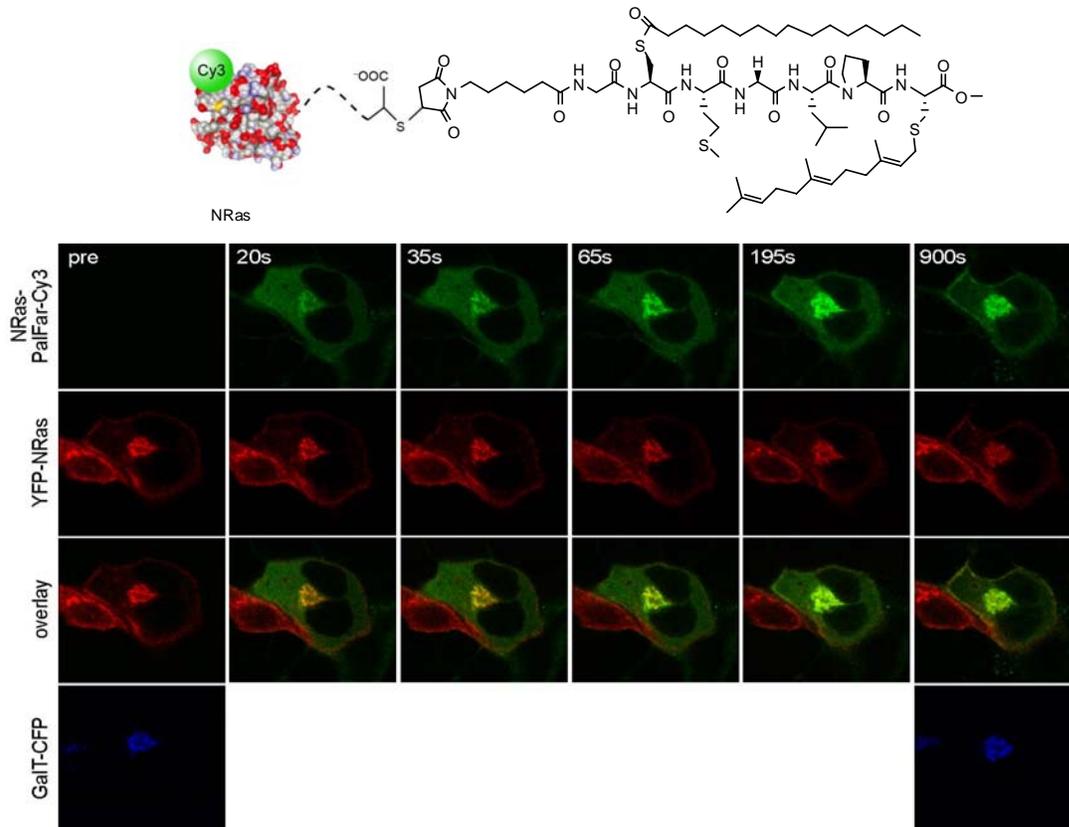
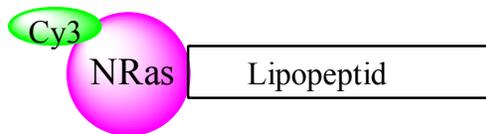


Abbildung 72: Zeitverlauf der Fluoreszenz nach Mikroinjektion der PalFar-Probe 3. Obere Reihe: Zeitverlauf vor der Mikroinjektion (pre) bis zu dem Zeitpunkt (t=900s) nach der Mikroinjektion. Zweite Reihe: Steady-State des YFP-NRas. Dritte Reihe: Überlagerung der beiden oberen Reihen. Unterste Reihe: Visualisierung des Golgi durch den Golgimarker GalT-CFP

4.4.4. Ergebnisse der Mikroinjektion der semisynthetischen Proteine

Nachdem alle semisynthetischen Proteine mikroinjiziert wurden, kann im Folgenden ein zusammenfassendes Bild über die Lokalisation und Kinetiken gegeben. Die mikroinjizierten Konstrukte mit den Peptiden **41** und **42** verhalten dienten als Grundlage, um erste Einblicke in die Kinetiken der Palmitoylierung sowie der Depalmitoylierung zu erhalten. Das Konstrukt mit dem Lipopetid **46** wurde nicht palmitoyliert. Aufgrund dieser Grundlagen, konnten verschiedene nicht natürliche Peptidsequenzen in ihrem Verhalten mit den natürlichen Sequenzen verglichen werden. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl alle Konstrukte (**44**, **46**, **58A**) in dem gleichen Zeitraum palmitoyliert werden, wie auch die Konstrukte (**45**, **61**) depalmitoyliert werden. Einzig das Konstrukt **47** zeigte keine Prozessierung (Abbildung 74).



Lipopeptid	Ort der subzellulären Anordnung	Interpretation
$\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{Mic-Gly-Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-OMe} \\ \\ \text{S-Far} \end{array}$	Lokalisierung am Golgi $t/2: 14 \pm 8.3$ s	Palmitoylierung am Golgi
$\begin{array}{c} \text{Pal} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{Mic-Gly-Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-OMe} \\ \\ \text{S-Far} \end{array}$	Lokalisierung am Golgi $t/2: 27 \pm 8.6$ s	Depalmitoylierung überall in der Zelle
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Mic-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-OMe} \\ \\ \text{S-Far} \end{array}$	In der gesamten Zelle verteilt	Keine Palmitoylierung
$\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{Mic-Leu-Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys-OMe} \\ \\ \text{S-Far} \end{array}$	Lokalisierung am Golgi $t/2: \text{entsprechend } 42$	Palmitoylierung am Golgi

Abbildung 73. Oben: Cy3-N-Ras mit dem legierten Lipoptid. Unten: Ergebnisse der verschiedenen semisynthetischen N-Ras Proteine bei den Mikroinjektions-Experimenten. Dargestellt sind die jeweiligen Lipopetide.

Anscheinend macht die zelluläre Prozessierungsmaschinerie keinen Unterschied zwischen den entsprechenden Substraten. Ebenso waren die Zeiträume für die jeweiligen Prozesse in Sekundenbereich, Grössenordnungen schneller als bisher angenommen. Des Weiteren musste aufgrund dieser schnellen Kinetiken für den Depalmitoylierungsprozess dieser überall in der Zelle stattfinden.

Lipopeptid		Ort der subzellulären Anordnung	Interpretation
Mic-Gly- <i>D</i> -Cys- <i>D</i> -Met-Gly- <i>D</i> -Leu- <i>D</i> -Pro- <i>D</i> -Cys-OMe	44	Lokalisierung am Golgi t/2: entsprechend 42	Palmitoylierung am Golgi
			
Mic-Gly- <i>D</i> -Cys- <i>D</i> -Met-Gly- <i>D</i> -Leu- <i>D</i> -Pro- <i>D</i> -Cys-OMe	45	Lokalisierung am Golgi t/2: entsprechend 41	Depalmitoylierung überall in der Zelle
			
Mic-Gly- <i>D</i> -Cys- <i>D</i> -Met-Gly- <i>D</i> -Leu- <i>D</i> -Pro- <i>D</i> -Cys-OMe	47	In der gesamten Zelle verteilt	Keine Depalmitoylierung
			
Mic- β -Ala- β -Cys- β -Met- β -Ala- β -Leu- β -Pro- β -Cys-OMe	58A	Lokalisierung am Golgi t/2: entsprechend 42	Palmitoylierung am Golgi
			
Mic- β -Ala- β -Cys- β -Met- β -Ala- β -Leu- β -Pro- β -Cys-OMe	61	Lokalisierung am Golgi t/2: entsprechend 41	Depalmitoylierung überall in der Zelle
			

Abbildung 74: Ergebnisse der verschiedenen semisynthetischen N-Ras Proteine bei den Mikroinjektions-Experimenten. Dargestellt sind nicht natürliche Modifikationen.

4.4.5. Prozesse nach der Mikroinjektion

In den nachfolgenden Bildern sind die Prozesse, die sich in der Zelle nach der Mikroinjektion des N-Ras Pal/Far.Konstruktes **3** illustriert. Dabei sind auf der linken Seite jeweils schematisch die Prozesse dargestellt, die im rechten Bild in der Zelle zu sehen sind. In Abbildung 75 erkennt man, dass sich das Konstrukt zuerst in allen Membranen festsetzt.

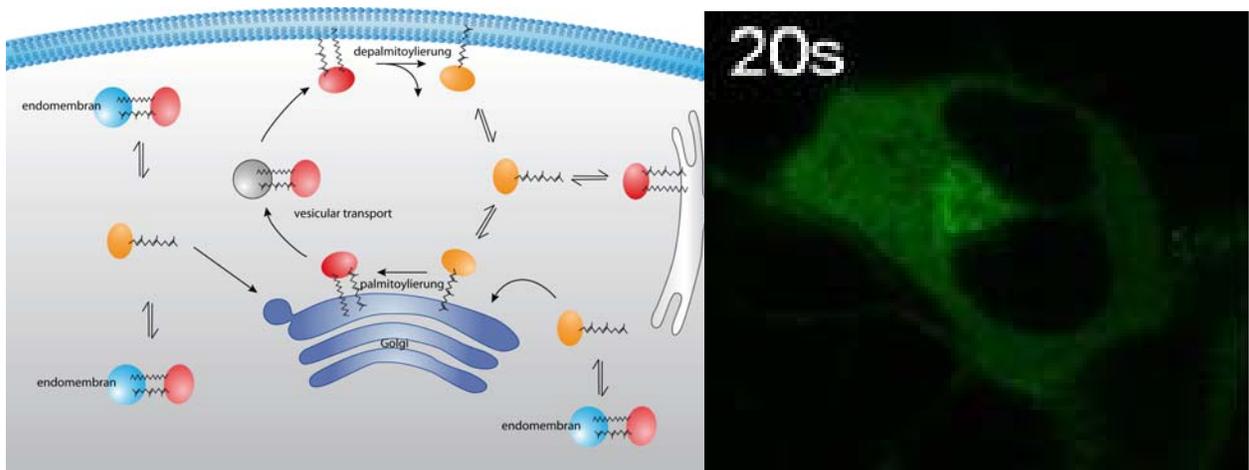


Abbildung 75: Linkes Bild: Endomembrancompartimente (blau) mit dem Pal/Far-Konstrukt (rot). Einfach farnesyliertes Konstrukt (orange). Rechtes Bild: Nach der Mikroinjektion (20s) ist das grün fluoreszierende-Konstrukt in der ganzen Zelle auf verschiedenen Endomembranen verteilt.

Dieser Bilder stellen den Zustand nach 20s da. Nach bereits 65s hat sich ein anderer Zustand eingestellt. Es ist eine deutliche Anreicherung des Konstruktes **3** am Golgi zu erkennen (Abbildung 76). Dies bedeutet, dass ein Großteil des Konstruktes depalmitoyliert wurde und sich nun am Golgi wieder für eine Repalmitoylierung anreichert. Schließlich wird über den sekretorischen Weg das palmitoylierte Peptid zur Plasmamembran gebracht. Somit ist es nun komplett im Ras Zyklus integriert. Es ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz an der Plasmamembran in Abbildung 77 zu erkennen.

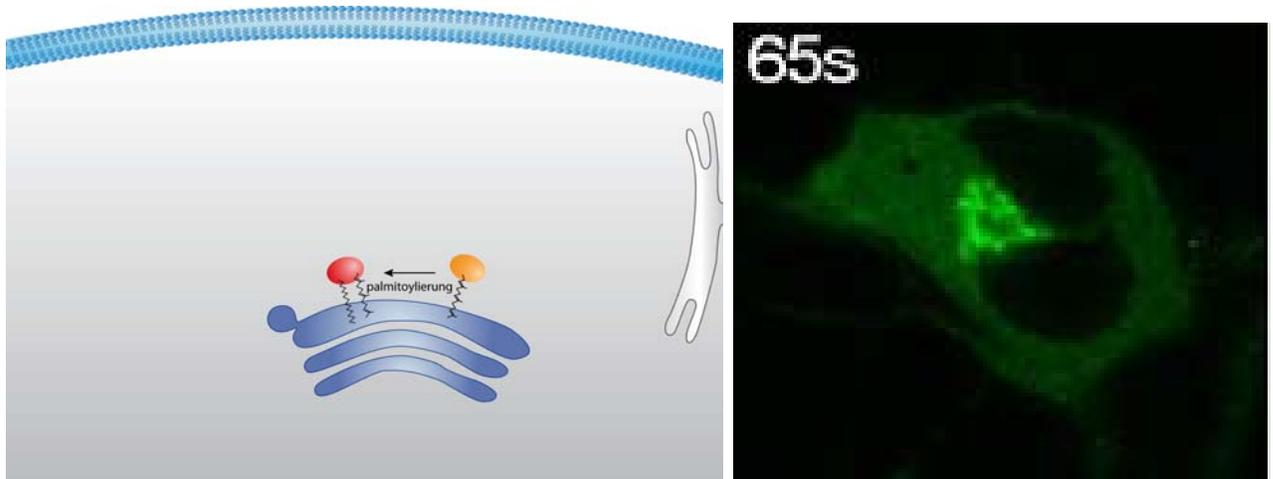


Abbildung 76: : Skizze: Das einfach farnesylierte N-Ras-Konstrukt (orange) wird durch die Repalmitoylierung zum PalFar-Konstrukt (rot). Nach wenigen Sekunden befindet sich praktisch ein Hauptteil des einfach farnesylierten N-Ras-Konstruktes am Golgi. Hier findet die Palmitoylierung statt

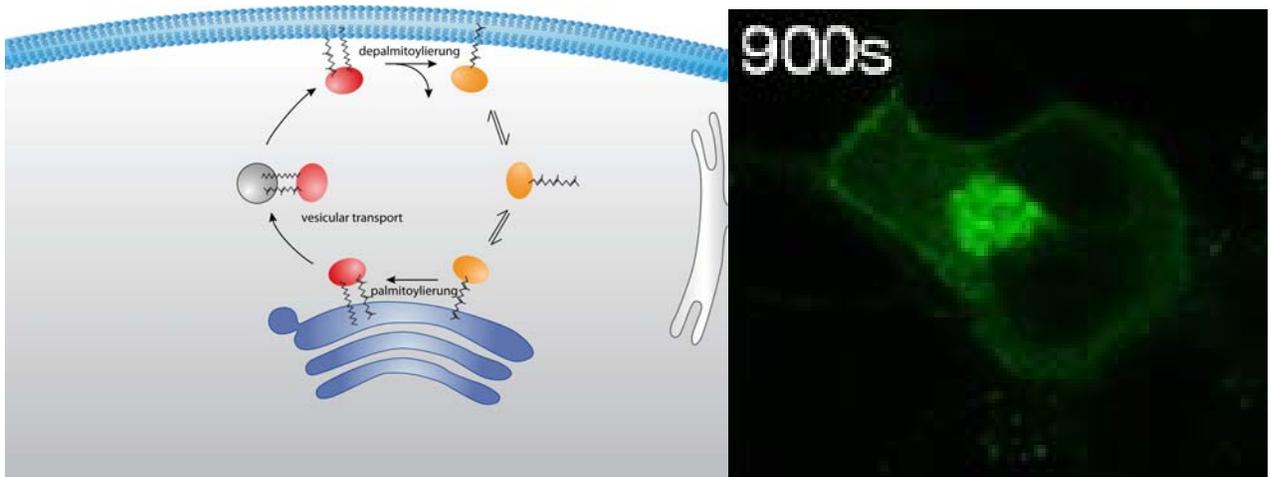


Abbildung 77: In der Skizze: Endomembrankompartimente (blau) mit dem PalFar-Konstrukt (rot). Einfach farnesyliertes Konstrukt (orange). Durch die Repalmitoylierung erreicht das PalFar-Konstrukt die Plasmamembran und der Ras-Zyklus ist wieder hergestellt

4.5. Sulfonamid Linker

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein neues Linkersystem für die Synthese von Lipopeptiden evaluiert werden. Dieses Linkersystem sollte die Möglichkeit bieten eine komplette C-terminale N-Ras-Sequenz auf dem Harz aufzubauen. Des Weiteren sollte es möglich sein das Peptid während des Abspaltens zu funktionalisieren. Wie bereits in der Einleitung beschrieben sind hier besondere Rahmenbedingungen zu berücksichtigen. Als ein geeignetes System sollte der Safety-Catch Linker untersucht werden, der von Ellman beschrieben wurde.^[95,96] Dieser Linker beruht auf dem von Kenner entwickelten System mit Modifizierungen des Linkers und der Abspaltungsbedingungen.

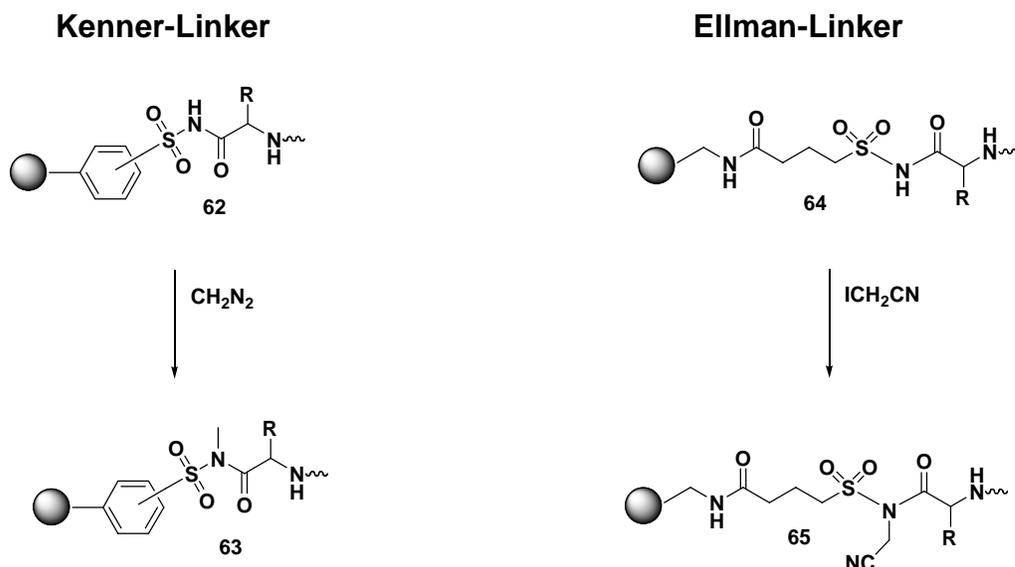


Abbildung 82: Kenner- und Ellman Linker. Die Aktivierung des Kenner-Linkers erfolgt über Diazomethan, die des Ellman Linkers über Iodacetonitril

Als Ziel sollten palmitoylierte und farnesylierte Peptide auf dem polymeren Träger synthetisiert werden. Dabei sollte die Beladung der ersten Aminosäure verbessert werden, da die von Ellman entwickelte Vorschrift eine Beladung bei -20°C mit PyBop vorsieht. Der Grund für eine starke Aktivierung ist die niedrige Reaktivität der Sulfonamid-Gruppe, die der einer Hydroxylgruppe gleichkommt. Ebenso sollte die Kompatibilität eines Lipopeptides getestet werden. Durch die großen Substituenten an den Cysteinen

kann es zu unvollständigen Kupplungen kommen. Ebenso kann während der Aktivierung mit Iodacetonitril eine Alkylierung des Schwefels stattfinden.

Schließlich sollte das System auch die Möglichkeit liefern mit anderen Nucleophilen abzuspalten, als mit den bereits von Ellman verwendeten Aminderivaten, da die N-Ras-Lipopeptide eine C-terminale Methylestergruppe enthalten.

In Abbildung 82a ist das Schema dargestellt. Die rot markierten Schritte stellen diejenigen da, die vollständig neu evaluiert werden sollen.

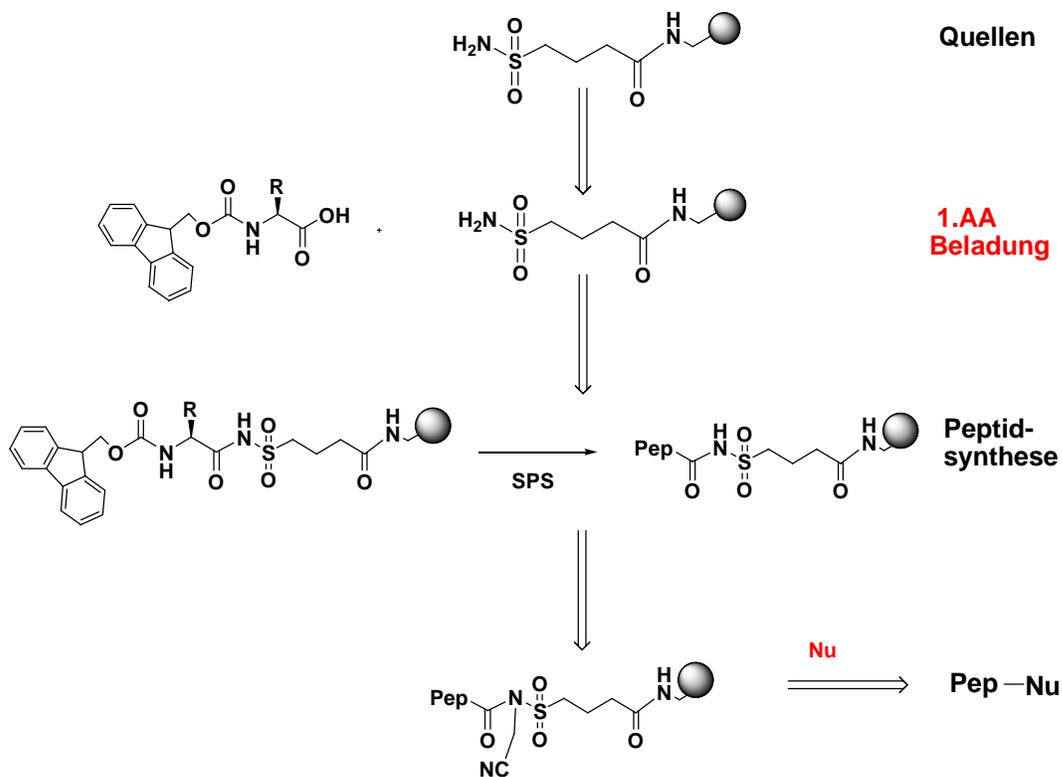


Abbildung 82a: Ellman Linker, Synthese-Schema

4.5.1. Syntheschema für den Ellman-Linker

Die Synthese wurde auf dem kommerziell erhältlichen 4-Sulfamylbutyryl AM Harz (Novabiochem) ausgeführt. Nach dem Quellen im trockenen Dichlormethan wurden verschiedene Bedingungen für die Beladung der ersten Aminosäure getestet. Zuerst wurden die Bedingungen von Ellman ausgeführt, jedoch führten diese zu einer unzureichenden Beladung. Stärkere Reagenzien wie die Benutzung von DAST, führten zu einer Fluorierung des Farnesylrestes. Letztendlich wurde durch die Verwendung von TFFH unter sehr trockenen Bedingungen eine gute Beladung erzielt (Abbildung 83).

Aminosäure	Reagenz	Base	Lösungs- mittel	Zeit	Beladung	Ausbeute
Fmoc-Cys(Far)-OH	PyBop (-20°C)	DIPEA	CHCl ₃	8h	0.08	11
Fmoc-Met-OH	PyBop (-20°C)	DIPEA	CHCl ₃	8h	0.79	78
Fmoc-Met-OH	DIC/HOBt	1-MIM	DMF/DCM (1:1)	18h	0.09	4
Fmoc-Cys(Far)-OH	DAST	Pyridin	DCM	40min	0.08	2
Fmoc-Cys(Far)-OH	TFFH	DIPEA	DCM	1.5h	0.10	14
Fmoc-Leu-OH	TFFH	DIPEA	DCM	1.5h	0.11	14
Fmoc-Pro-OH	TFFH	DIPEA	dDCM	4h	0.55	70
Fmoc-Leu-OH	TFFH	DIPEA	dDCM	1.5h	0.55	71
Fmoc-Cys(Far)-OH	TFFH	DIPEA	dDCM	4h	0.49	71

Abbildung 83: Kupplungsbedingungen: dDCM: trockenes Dichlormethan

Die weiteren Schritte umfassten eine Evaluierung der besten Kupplungsbedingungen für das Lipopeptid. Dazu wurden verschiedene Kupplungsreagenzien getestet. Um zu visualisieren, welche Kupplung quantitativ verläuft wurde der Bromophenolblau-Test benutzt, da dieser sensitiver als der übliche Kaiser-Test ist. Dabei stellte sich heraus, dass die Kombination von DIC/HOBt oder PYBOP/HOBt eine quantitative Anbringung der Aminosäure ergab (Abbildung 84).

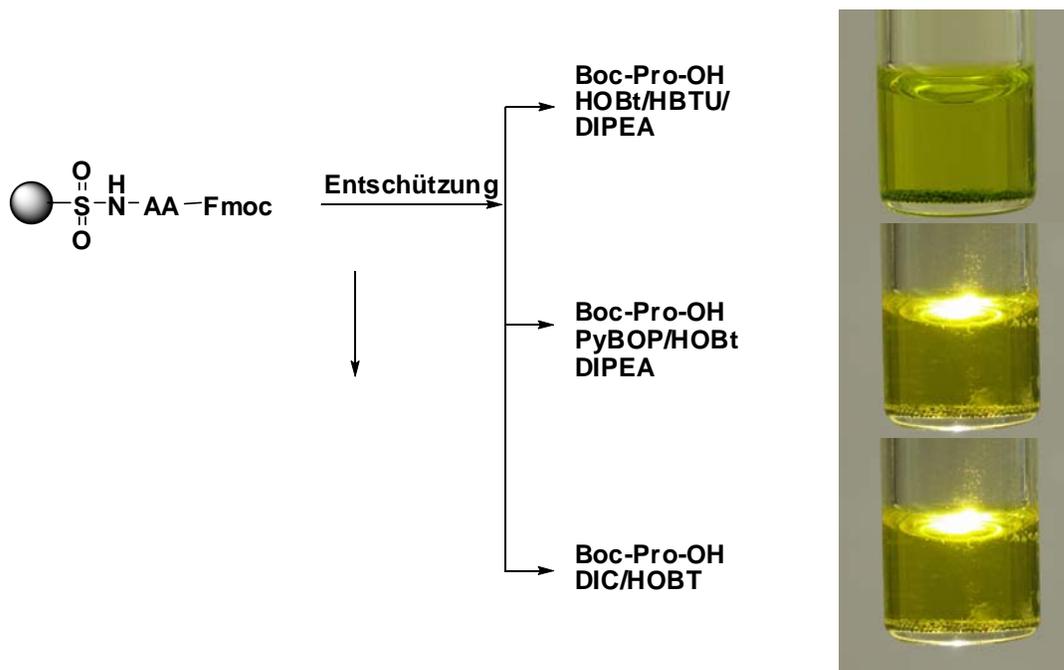


Abbildung 84: Bromophenol-Blau Test nach Amidknüpfung. HOBt/HBTU zeigt eine Blaufärbung, die anderen Kupplungsbedingungen zeigen keine freien Amine an.

Die erzielten Ergebnissen stehen im Einklang mit den von Hachmann^[115] veröffentlichten, der zehn verschiedene Kupplungsreagenzien getestet hat. Dabei stellte sich heraus, dass das System DIC/HOBT im allgemeinen die besten Kupplungsergebnisse erzielte.

Nachdem die Bedingungen für die Immobilisierung der ersten Aminosäure, wie auch die Ausarbeitung der optimalen Kupplungsreagenzien evaluiert worden waren, sollten in den nächsten Experimenten die Abspaltungsbedingungen betrachtet werden. Ein Charakteristikum der N-Ras-Sequenz ist der C-terminale Methylester. Neben der Abspaltung als Methylester wäre es für ein größeres Anwendungsgebiet von Vorteil, wenn sich das Peptid auch noch mit Hilfe anderer funktioneller Gruppen abspalten ließe. So ließe sich eine größere Diversität erzielen.

Somit wurden zuerst Testsequenzen aufgebaut, um verschiedene Bedingungen zutesten. Der Nachteil von Methanol gegenüber den von Ellman benutzten Amine, ist die

verminderte Nucleophilie. Aus diesem Grund wurde dem Methanol während des Abspaltungsvorganges DMAP zugefügt. Um eine generelle Tendenz festzustellen, wurde in den ersten Experimenten Fmoc-Cys(Far)-OH an den polymeren Träger gebunden. Nach der Aktivierung mit Iodacetonitril wurden verschiedene Abspaltungen durchgeführt. Dabei wurde folgender Trend sichtbar (Abbildung 85). Die Aminogruppe erzielte eine bessere Abspaltung in Bezug auf Reinheit und Ausbeute. Mittels HPLC-ESI wurde die Reinheit bestimmt und die eingewogenen Rohprodukte ließen Rückschlüsse auf die Ausbeute zu.

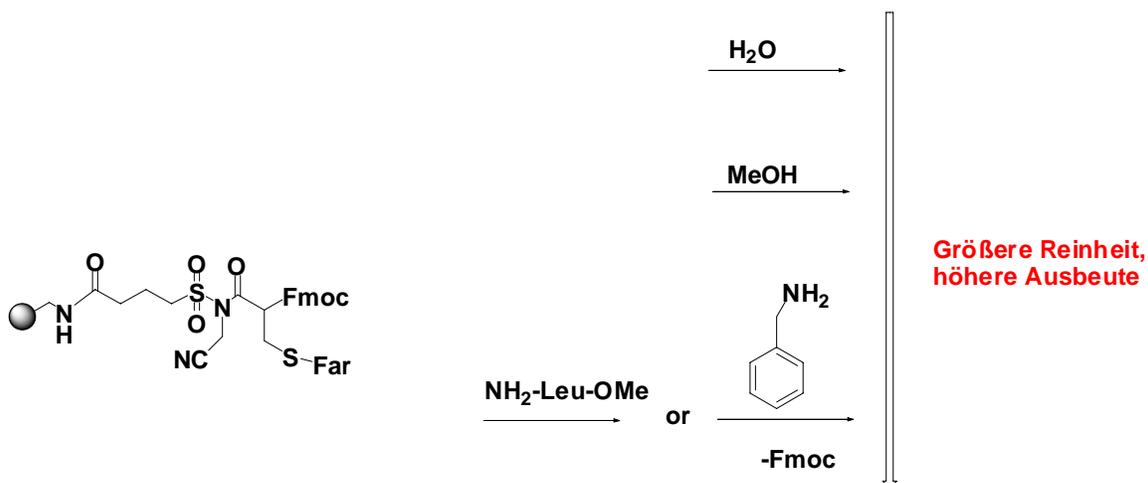


Abbildung 85: Reaktivität der verschiedenen Nucleophile

4.5.2. Experimente zur Racemisierung

Um die Resultate mit den von Ellman publizierten Ergebnissen zu vergleichen, wurde analog die gleiche Sequenz aufgebaut (Leu-Phe-Boc). Ebenso wurden in Lösung die Referenzprodukte Methyl-(N-Boc-L-phenylalanin)-L-Leucinate **68A** und Methyl-(N-Boc-L-phenylalanin)-D-Leucinate **68B** synthetisiert.

Ein Ansatz wurde mit Benzylamin abgespalten, der andere mit Methanol und katalytischen Mengen an DMAP. Dabei ließen sich die Ergebnisse von Ellman reproduzieren, wobei das Rohprodukt bereits in hoher Reinheit erhalten wurde (> 90%). Das Abspaltungsprodukt mit Methanol hingegen lieferte nur eine geringe Ausbeute. Folgende NMR-Studien zeigten zwei Methylesterpeaks, die auf eine Racemisierung zurückzuführen waren. Um die Racemisierung auszuschließen, die von der Initialbeladung mit Leucin kam, wurde die Sequenz exakt nach der Vorschrift von Ellman synthetisiert, da bei diesen Beladungsbedingungen (-20°C , PyBOP) keine Racemisierung auftrat. Auch hier wurden nach der Aktivierung und Abspaltung mit Methanol und DMAP zwei Methylesterpeaks detektiert.

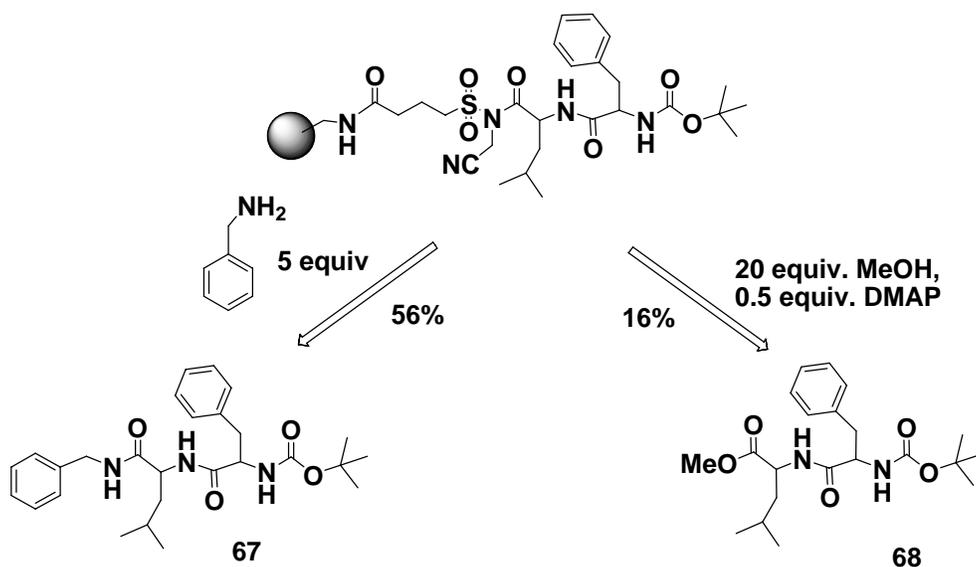


Abbildung 86: Testsequenzen für die verschiedenen Abspaltungsbedingungen

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine C-terminalen N-Ras Sequenz auf dem Harz aufgebaut, um die eventuelle Sequenzabhängigkeit der Racemisierung zu überprüfen. Als Referenz wurde die Sequenz und die der Diastereomere **69H** und **70H** auf dem Hydrazid-Linker aufgebaut.

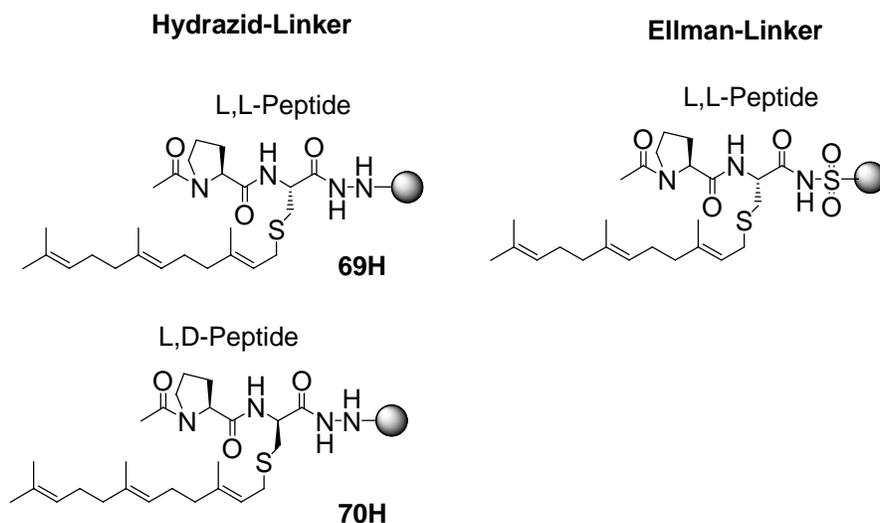


Abbildung 87: Aufbau der Ac-Pro-Cys(Far)-Sequenzen auf dem Hydrazid- und Ellman Linker. Auf dem Hydrazid-Linker wurde zusätzlich zu dem L,L-Peptid das L,D-Peptid aufgebaut.

Nachdem die Diastereomere L,L-Peptid **72** und L,D-Peptid **73** von dem Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC aufgereinigt wurden, konnte anhand der $^1\text{H-NMR}$ Spektren ein Vergleich zu dem Abspaltungsprodukt des Ellman-Linkers gezogen werden. Es sind hier zwei Methylesterpeak aufgrund der cis-trans-Isomerie am Prolin zuerkennen (Abbildung 89,90). Ebenso treten die N-H Signale zweimal aufgrund dieser Isomerie auf. Das letzte Spektrum zeigt die Mischung der beiden Diastereomere und man erkennt die Verdopplung der Signale (Abbildung 91).

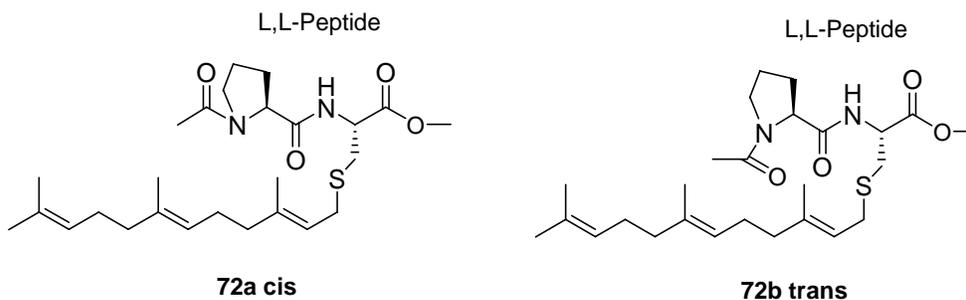


Abbildung 88: Ac-L-Pro-L-Cys(Far)-OMe, cis-trans-Isomerie

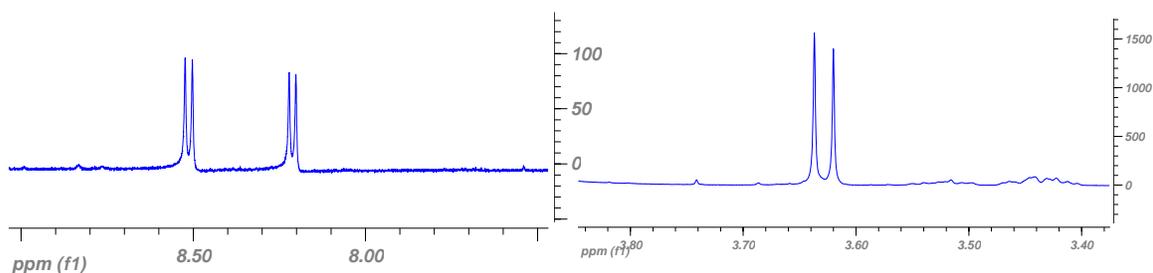


Abbildung 89: Ac-L-Pro-L-Cys(Far)-OMe in DMSO_d. Links: NH-Proton (cis, trans Konfiguration). Rechts: Methylesterprotonen (cis, trans Konfiguration).

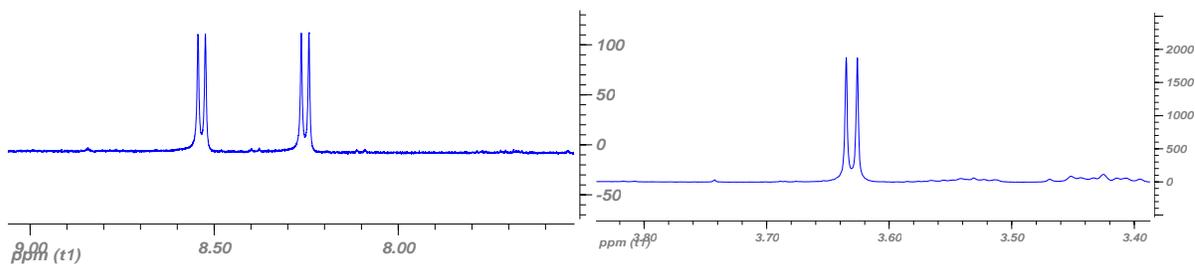


Abbildung 90: Ac-L-Pro-D-Cys(Far)-OMe in DMSO_d. Links: NH-Proton (cis, trans Konfiguration). Rechts: Methylesterprotonen (cis, trans Konfiguration).

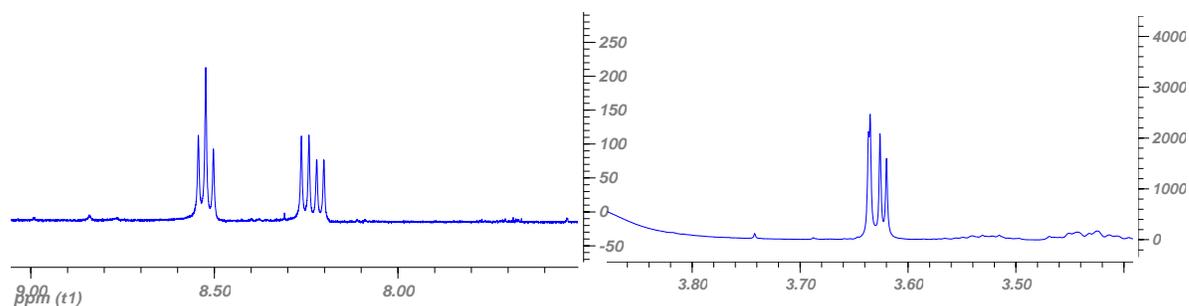


Abbildung 91 : Mischung von Ac-L-Pro-D-Cys(Far)-OMe and Ac-L-Pro-L-Cys(Far)-OMe in DMSO_d. Links: NH-Proton (cis, trans Konfiguration). Rechts: Methylesterprotonen (cis, trans Konfiguration).

Auf diesen Ergebnissen basierend, kann man die Racemisierungstendenz für das gleiche Peptid auf dem Ellman-Linker untersuchen. Nach Aktivierung wurde das Peptid mit 22eq

MeOH und 0.9 eq DMAP abgespalten. Das Harz wurde danach mehrmals mit Dichlormethan gewaschen und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das in DMSO aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt deutlich einer Verdopplung der entscheidenden Protonen (Abbildung 92).

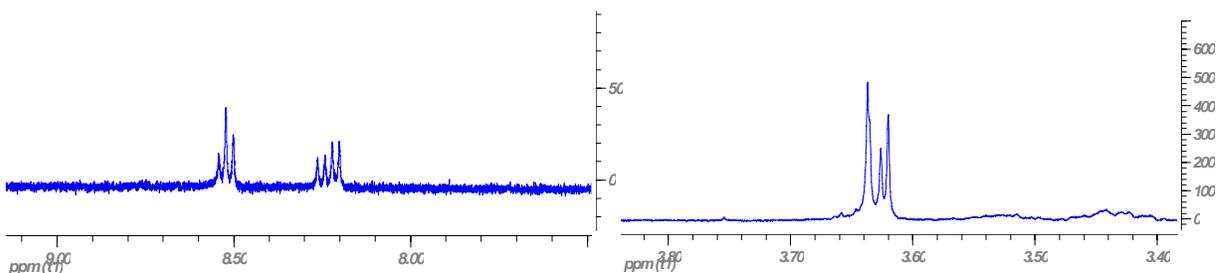


Abbildung 92: Mischung von Ac-L-Pro-D-Cys(Far)-OMe und Ac-L-Pro-L-Cys(Far)-OMe in DMSO_d. Die abgespaltene Sequenz stammt von dem Ellman-Linker

Diese Ergebnisse wurden durch nachfolgende Experimente auf der chiralen HPLC (normal Phase) untermauert. Dazu wurden die beiden Referenzdiastereomere koinjiziert, wie auch das Dipeptid vom Ellman-Linker. Bei beiden Läufen wurden jeweils zwei Peaks detektiert.

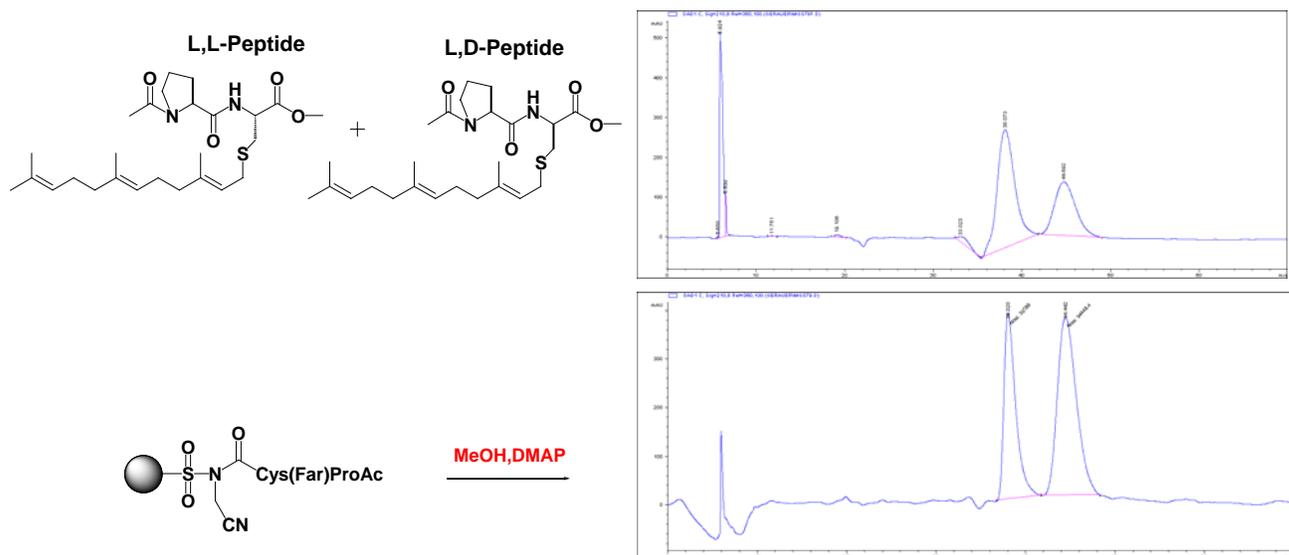


Abbildung 92a: LC-Spektrum der Testsequenzen. Oberes Spektrum: Diastereomere, 1.Peak L,L, 2.Peak L,D Peptid. Unteres Spektrum: Testpeptid vom Ellman-Linker

Auf diesen Ergebnissen basierend, sollte durch weitere Experimente eine Möglichkeit gefunden werden, die gewünschten C-terminalen Methylester zu erhalten.

Dazu könnte man das Peptid als Aktivester von Harz abspalten und in einem folgenden Schritt mit Methanol verestern. Dieser Aktivester wird mit Thiophenol generiert und anschließende Zugabe von Methanol sollte die Umesterung bewirken.

Eine andere Möglichkeit ist die Abspaltung mit dem farnesylierten Cysteinmethylester.

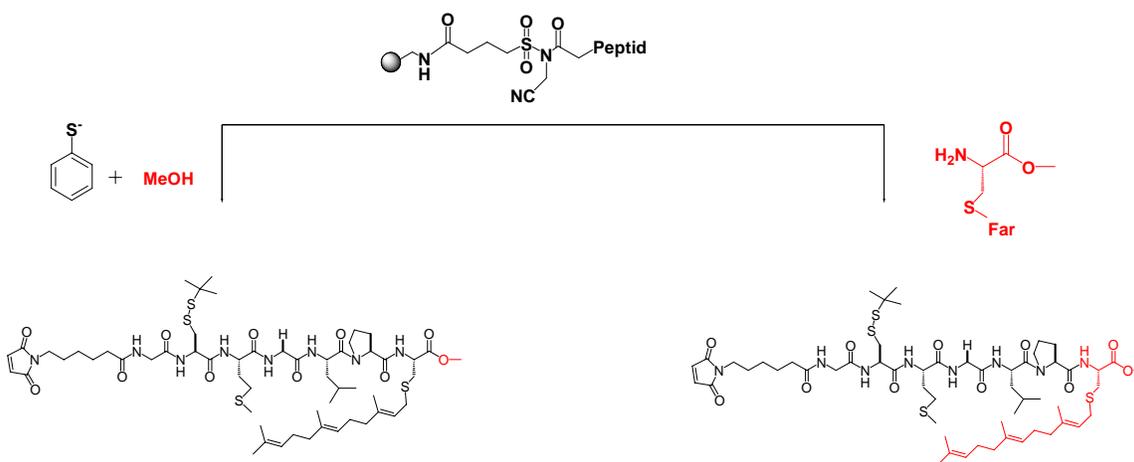


Abbildung 93: Variation der Abspaltungsbedingungen

Hierbei wurde zuerst sukzessiv die Menge an Thiophenol und Methanol erhöht. Dabei stellte sich heraus, dass ab einer Menge von 1eq Natriumthiophenolat es zu enormen Löslichkeitsproblemen kommt, weswegen die Mengen an Methanol erhöht werden mussten (Abbildung 94).

	A	B	C
MeOH	25eq	25eq	100eq
Thiophenol	0.1eq	0.5eq	1eq
Solvent	DCM/THF 1:1	THF/DCM 1:1	THF/DCM 1:1

Abbildung 94: Variation der Abspaltungsbedingungen

Nach Aufarbeitung der Produkte mittels präparativer HPLC, stellte sich heraus, dass bei den Ansätzen A und B sich der C-terminale Thioester gebildet hatte, während es bei Ansatz C zu dem gewünschten Produkt kam. Die folgenden NMR-Analysen verdeutlichten auch hier zwei Methylesterpeaks, die nur durch Epimerisierung entstanden sein konnten.

Durch diese Resultate veranlasst, wurde die Strategie aufgegriffen, das Peptid C-terminal vom Prolin ausgehend auf dem Harz aufzubauen, um es anschließend mit der freien Aminogruppe des Cysteinmethylesters abzuspalten (Abbildung 93).

Hier zeigt sich aber nach Immobilisierung der N-Ras Sequenz und dem N-terminalen MIC-Linker, dass während der Aktivierung und Abspaltung die Maleimido-Gruppe angegriffen wird, da keine Signale im NMR-Spektrum mehr zu finden sind. Aus diesem Grund ist der Ellman-Linker nicht geeignet, um Lipopeptide für Ligationszwecke zu synthetisieren. Dies ist zum einen durch die Racemisierungstendenz begründet, die auftritt, wenn das Peptid als Methylester abgespalten werden soll. Zum anderen ist es nicht möglich eine MIC-Gruppe zu immobilisieren, da sie die Abspaltungsbedingungen nicht übersteht, selbst wenn man die Racemisierung umgeht, indem mit einem Cysteinmethylesterderivat abspaltet.

4.6. ADIFAB-Assay

Ein wichtiges Enzym, welches zellulär als der „ bona fide player“ für die Palmitoylierung und die Depalmitoylierung gilt, ist APT1. Studien haben gezeigt, dass es in der Lage ist D-konfigurierte Peptide zu depalmitoylieren.^[116] Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein unnatürliche, semisynthetischen N-Ras-Protein als Substrat für APT1 getestet werden.

Die zentrale Fragestellung ist die Spezifität von APT1. Da ein D-konfiguriertes, semisynthetisches N-Ras Protein nach der Mikroinjektion genauso wie ein L-konfiguriertes prozessiert wird, sollte ein in vitro Experiment mit APT1 und dem semisynthetischen Konstrukt klären, ob APT1 in der Lage sei dieses zu depalmitoylieren. Es wurde hierbei der von Kleinfeld entwickelte ADIFAB (acrylodated intestinal fatty acid binding protein)-Assay verwendet.^[117] Dabei handelt es sich um einen fluoreszenz-basierenden biochemischen Assay, bei dem eine freie Fettsäure von einem fettsäurebindenden Protein gebunden wird. Der Konzentrationsbereich der zu detektierenden Fettsäure kann dabei im Bereich von 1nM bis 20µM reichen. Acrylodan, das Chromophor, ist kovalent an das I-FABP (intestinal fatty acid binding protein) gebunden, weswegen dieses Konstrukt ADIFAB genannt wird.

In reiner Form befindet sich Acrylodan in der Bindungstasche für Fettsäuren des I-FABP. Bei Zugabe einer Fettsäure verdrängt sie das Acrylodan aus der Bindungstasche. Durch die Verdrängung des Acrylodans kommt es zu einer bathochromen Verschiebung, der spektroskopisch verfolgt werden kann. Bei einer Anregungswellenlänge von 390nm emittiert der Fluorophor in der unpolaren Bindungstasche von ADIFAB bei 435nm. Nachdem der Fluorophor durch die Fettsäure in der Bindungstasche ersetzt worden ist, verschiebt sich das Fluoreszenzsignal nach 505nm.

Das Absorptionsspektrum von ADIFAB besteht aus einer Bande mit einem Peak bei 386nm und 286nm. APT1 zeigt eine charakteristische Absorption bei 280nm für Proteine. Das mit Cy3 gelabelte, semisynthetische PalFar-Konstrukt zeigt im Absorptionsspektrum Banden bei 553nm (Maximum) und zusätzliche Peaks bei 523nm und 486nm sowie die charakteristische Proteinbande bei 280nm.

Nach Anregung bei 386nm zeigt das Emissionsspektrum von ADIFAB ein Maximum bei 435nm (Abbildung 79). Nachdem die Fettsäure gebunden wurde, kommt es zu drei zusätzlichen Peaks bei 470nm, 510nm und 564nm (Abbildung 79).

Ebenso zeigt bei gleicher Anregungswellenlänge das Emissionsspektrum von APT1 eine Bande bei 444nm. Das Emissionsspektrum von dem Cy3 gelabelten semisynthetischem N-Ras Konstrukt zeigt drei Banden bei 571nm (Maximum) und 603nm und 671nm. Ein Fret-Signal zwischen dem Cy3 gelabelten N-Ras-Konstrukt und ADIFAB wurde nicht detektiert. Somit störte Cy3 nicht bei den Messungen. Die Funktionalität von ADIFAB wurde mittels Zugabe von Palmitinsäure (400 μ M) zu ADIFAB (200 μ M) in einer Assaypufferlösung (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, pH=7.4) geprüft.

Nach der Zugabe wurde die Bande bei 435nm kleiner, wohingegen zwei neue Banden bei 470nm und 510 nm entstanden. Das Emissionsspektrum von ADIFAB wird nicht durch die Zugabe von dem semisynthetischen PalFar-Konstrukt (3.3 μ M) beeinflusst, wodurch eine Interaktion der Bindungstasche mit dem semisynthetischen Konstrukt ausgeschlossen werden kann.

Ebenfalls zeigte die Messung von ADIFAB (200 μ M) und APT1 (33nM) keine Veränderung des Emissionssignals von ADIFAB.

Werden jedoch das PalFar-Konstrukt (3 μ M), ADIFAB (200 μ M) zusammen mit APT1 (33nM) vermessen, werden 3 Banden bei 471nm, 510nm und 564nm detektiert

Das erste durchgeführte Experiment umfasste die Messung von ADIFAB und Palmitinsäure, um ein Vergleichsspektrum zu erhalten (Abbildung 78). Daneben konnten systematische Fehler ausgeschlossen werden, die bei der anschließenden Messung zu falschen Aussagen geführt hätten.

Nachdem Herstellen der ADIFAB-Lösung (100 μ M), wurde in eine mit 500 μ l Assay-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, pH=7.4) gefüllte Glasküvette 1 μ l ADIFAB-Lösung zugegeben, damit die Endkonzentration 200 nM betrug. Anschließend wurde bei 386 nm angeregt und das Emissionsspektrum aufgenommen. Dann wurde 2.37 mg Palmitinsäure in 843 μ l DMSO gelöst und 1:100 mit dem Assay-Puffer verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden 2 μ l in die

Küvette gegeben, um eine Endkonzentration von 400 nM zu erzielen. Über eine Zeitdauer von 12 min wurden mehrere Emissionsspektren aufgenommen. Es ist eine Verkleinerung des ADIFAB-Signals bei 435 nm zu erkennen, und eine Verschiebung des Signals bei 505nm zu beobachten.

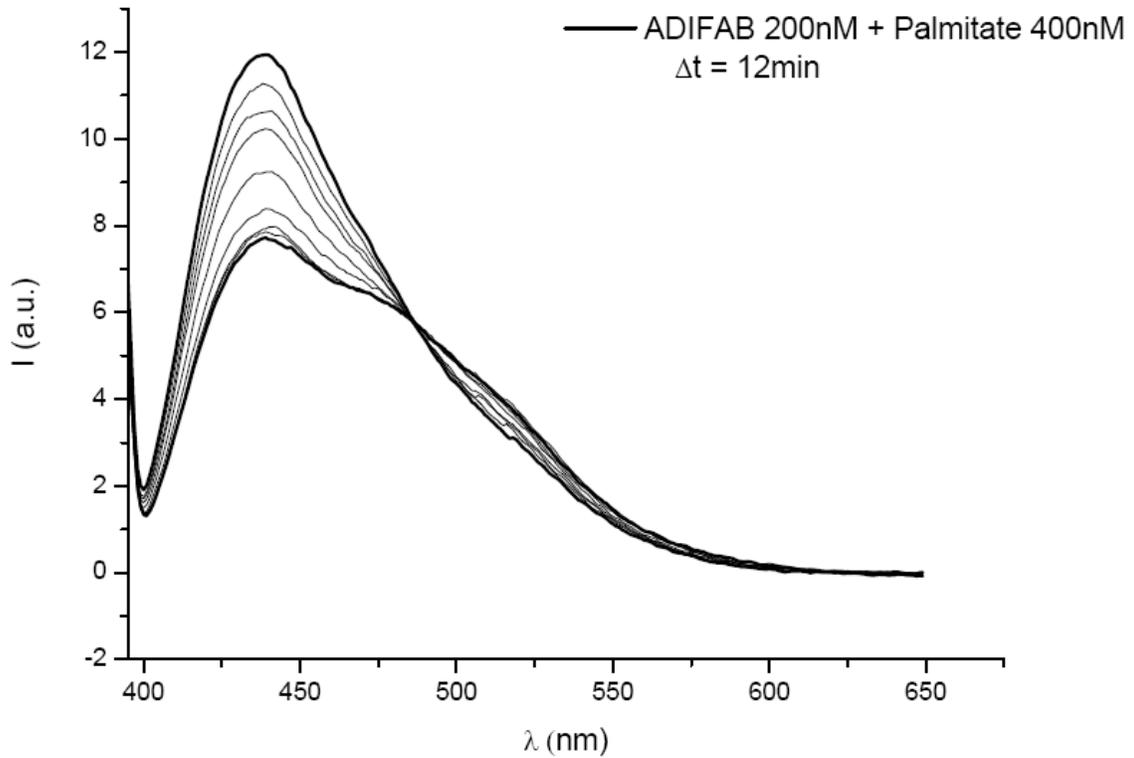


Abbildung 78: : ADIFAB-Assay: ADIFAB + Palmtinsäure ($\Delta t = 12$ min)

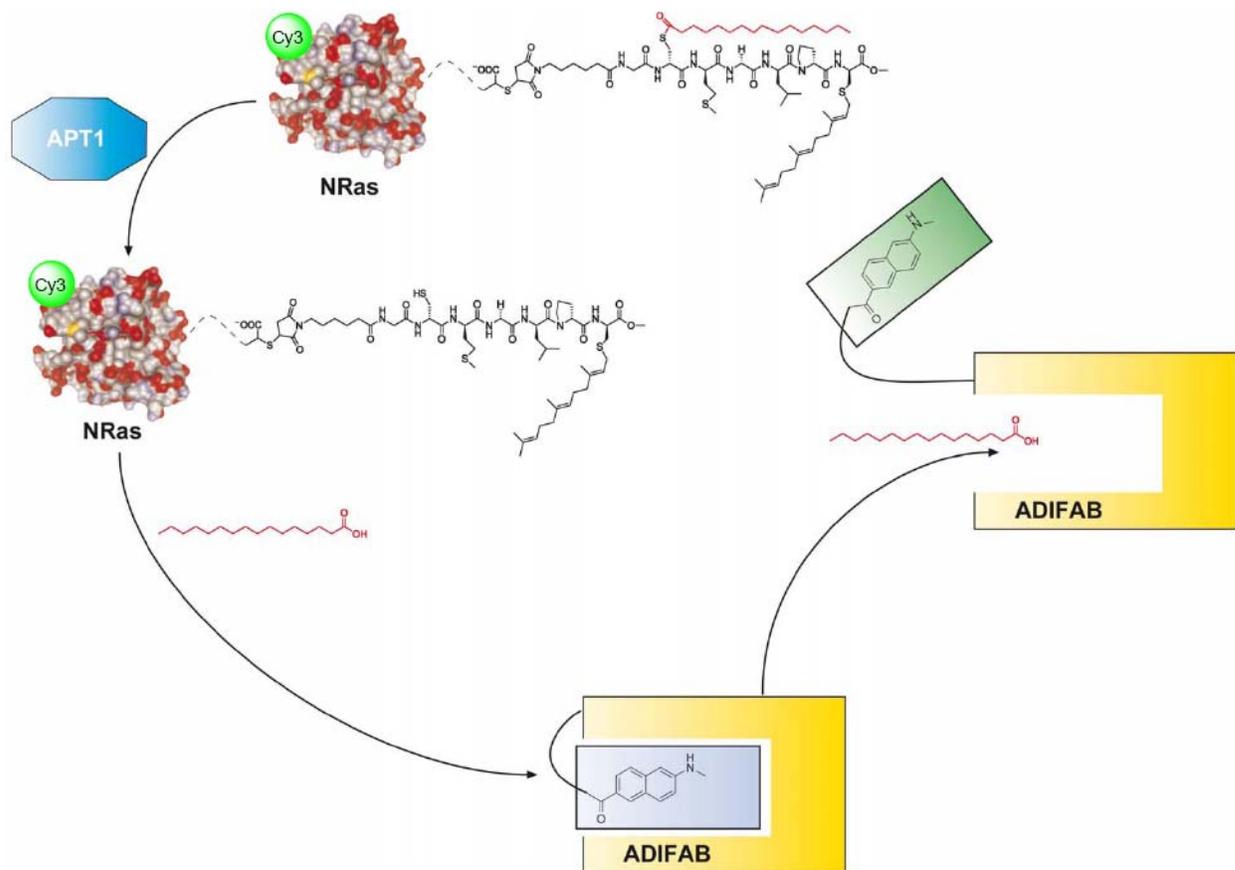


Abbildung 79: ADIFAB-Assay: Ein semisynthetisches Protein wird von APT1 depalmitoyliert. Die freie Palmitinsäure verdrängt den Fluorophor aus der Bindungstasche und es kommt zu einer Abnahme der Fluoreszenz bei 432nm und zu einem Anstieg der Fluoreszenz bei 505nm.

Im Zuge dieses Experimentes stellte sich heraus, dass APT1 das semisynthetische, D-konfiguriertes N-Ras-Konstrukt depalmitoyliert. Dazu wurden entsprechend Abbildung 80 die Fluoreszenz-Spektren von den Komponenten aufgenommen, um unspezifische Interaktion auszuschließen. Mann erkennt sehr klar, dass erst durch Zugabe aller drei Proteine Palmitinsäure freigesetzt wird (APT1) und mittels ADIFAB detektiert wird. Dies bekräftigt die zellulären Ergebnisse, dass APT1 als möglicher Kandidat für die Depalmitoylierung in Frage kommt. In der Abbildung 80a ist ein Zeitverlauf (0-20min) dieses Experimentes illustriert. Dabei kann man deutlich erkennen, dass der Depalmitoylierungsprozess innerhalb der ersten Minuten bereits abgeschlossen ist. Die

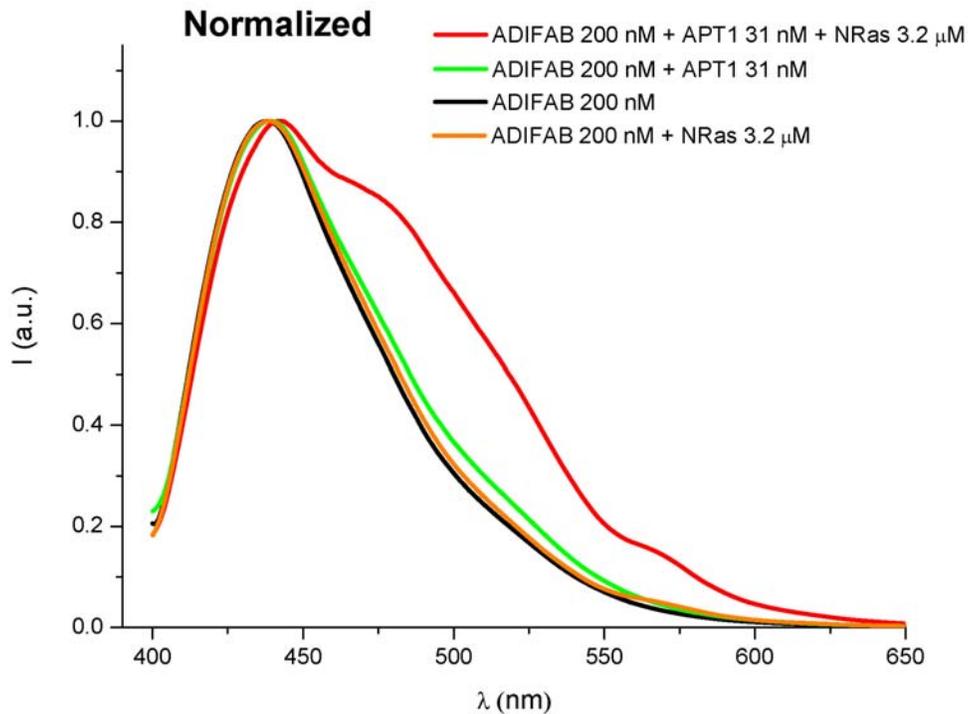


Abbildung 80: Die Studie umfasst vier Spektren. Schwarze Kurve: Spektrum von ADIFAB nach der Anregung mit 386nm. Grüne Kurve: ADIFAB + APT1. Orange Kuve: Negativkontrolle N-Ras und ADIFAB. Rote Kurve: ADIFAB, APT1 und N-Ras-Konstrukt 5

Graue Linie zeigt das Fluoreszenz-Spektrum vor Zugabe des D-konfigurierten N-Ras Konstruktes. Nach bereits zwei Minuten ist die charakteristische Fluoreszenz bei 505nm zu erkennen. Nach 20min ist über den gesamten Zeitraum keine Veränderung des Signals zu erkennen. Dies zeigt, dass APT1 bereits in den ersten Minuten das Konstrukt depalmitoyliert hat.

Ein Vergleich mit den zellulären Mikroinjektionsexperimenten zeigt hinsichtlich der Zeiträume für diesen Prozess eine gute Übereinstimmung. Somit wurde durch dieses Experiment APT1 als Kandidat, zuständig für die Depalmitoylierung, für den zellulären Prozess bekräftigt.

Adifab 200nM + APT1 31 nM + NRas 3.2 μ M
0min bis 20min

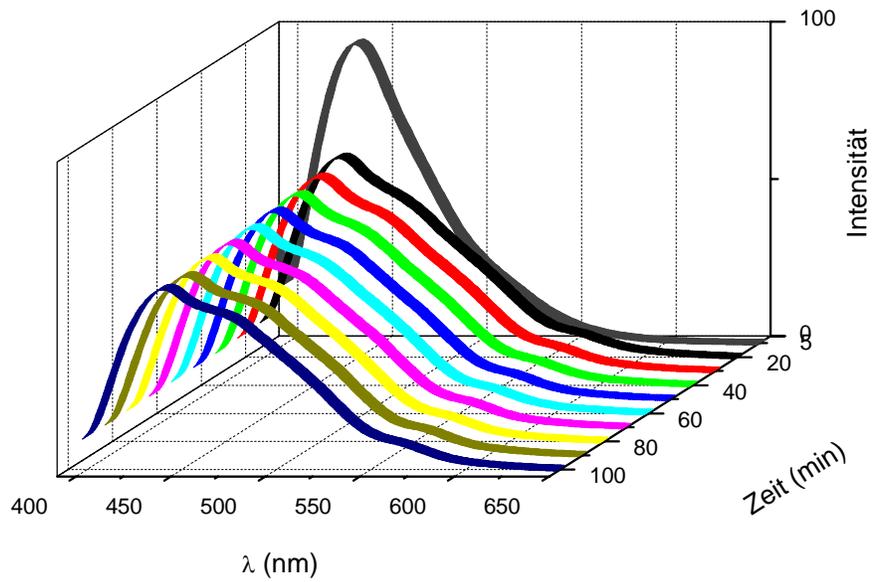


Abbildung 81: Zeitverlauf des ADIFAB-Experiments. Über eine Zeitspanne von 20 min wird der Prozess spektroskopisch verfolgt. Graue Linie: Start des Experiments (vor Zugabe des N-Ras Konstruktes 5). Schwarze Linie: 2min nach Zugabe des N-Ras Konstruktes.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Ras Zyklus

Das Verständnis der zellulären Netzwerke wird die Thematik des 21. Jahrhunderts im Bereich der Life-Science Wissenschaften sein. Wurden bisher immer nur einzelne zelluläre Aspekte (= einzelne Proteine) in der experimentellen Forschung betrachtet, zeigt sich immer mehr, dass z.B. im Bereich der Tumorgenese ein hochorganisiertes Wechselspiel herrscht.

Das Verständnis der Dynamik der zellulären Prozesse erfordert neue Methoden zur Beobachtung und Manipulation von Proteinen und deren Verhalten, so dass auf diesem Wege die zeitlichen und örtlichen Prozesse verfolgt werden können. Deswegen ist die Chemische Biologie unverzichtbar, weil nur mit ihrer Methodik maßgeschneiderte Proben hergestellt werden können.

Tiefgehende Einsichten können nur auf molekularer Ebene erlangt werden, so dass die Chemie hier unabdingbar ist. Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen mit einem kombinierten Ansatz molekularbiologischer Methoden und Organischer Chemie semisynthetische Proteine herzustellen, die zur Aufklärung dynamischer, zellulärer Prozesse führten. Dabei wurden gentechnisch hergestellte Proteinfragmente mit chemisch synthetisierten Peptiden ligiert. Letztere enthielten native posttranslationale sowie weitere unnatürliche Modifikationen. Des Weiteren wurden Peptide synthetisiert, die aus nicht natürlichen D-konfigurierten oder β -Aminosäuren bestanden.

Dazu mussten die Peptide in einer hohen Reinheit generiert werden, was teilweise neue Aufreinigungsverfahren erforderte, wie die Benutzung der präoperativen HPLC. Ebenso mussten neue Linker-System für die Lipopeptide evaluiert und etabliert werden. Es wurden erstmalig photoaktive Lipopeptide komplett an der festen Phase aufgebaut, wobei das eine N-terminal mit einer MIC-Gruppe, das andere mit einer Desthiobiotin-Gruppe versehen wurde. In einem in vitro Experiment konnte durch eine Photocrosslink-Reaktion zwischen einem semisynthetischen N-Ras-Protein und PDE δ die Bindungstasche von PDE δ beschrieben werden. Dieses Basisexperiment lässt hoffen, dass mit Hilfe des N-

terminalen Desthiobiotin-Lipopeptids erfolgreiche Pull-Down Experimente in Zukunft durchgeführt werden können.

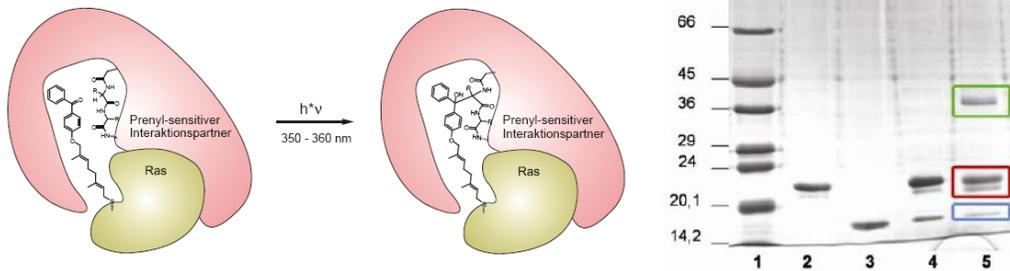


Abbildung 95: Linkes Bild: Schema des Photocrosslinks. Rechtes Bild: SDS-Gel des Photocrosslink Experiments. Bande 1: Größenmarker, Bande 2: N-Ras-GerBP, Bande 3: PDE δ , Bande 4: Reaktionsmischung vor der Photoreaktion, Bande 5: Reaktionsmischung nach 30 min Belichtung

Unter Verwendung dieser semisynthetischen Proteine ist es auch gelungen, Einblicke in den bislang nur unzureichend verstandenen Mechanismus der zellulären Palmitoylierung zu erhalten. Für diese Untersuchungen wurden einerseits native Proteine (Abbildung 96) wie auch nicht native Proteine (Abbildung 97) generiert.

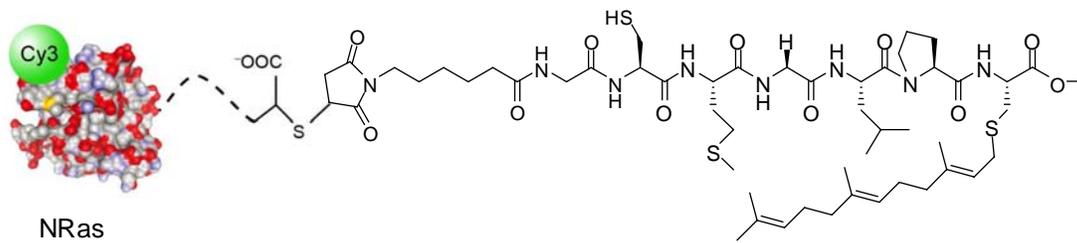


Abbildung 96: Semisynthetisches N-Ras-Protein (Far-Protein), nativ

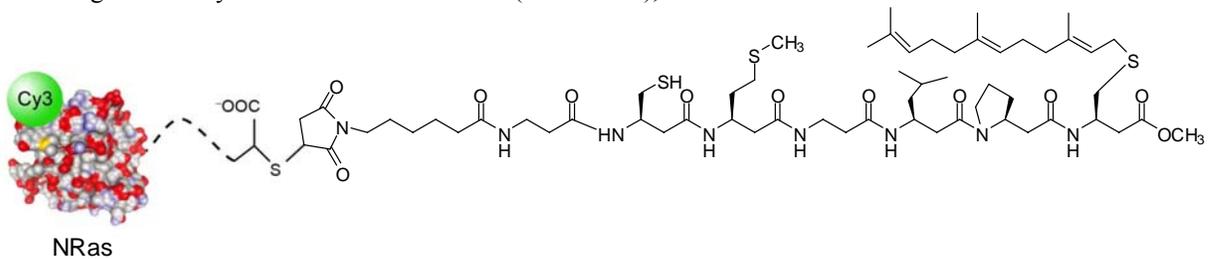


Abbildung 97: Semisynthetisches N-Ras-Protein (β -Far-Protein), nicht nativ

Mit Hilfe dieser Proben konnte gezeigt werden, dass Palmitoylierung ausschließlich an der Oberfläche des Golgi Apparats stattfindet, nicht aber an anderen Membransystemen,

wie z.B. der Plasmamembran. Zudem ergab sich, dass die Palmitoylierung in einem Zeitrahmen von Sekunden abläuft und nicht in Stunden, wie vorher angenommen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Depalmitoylierung überall in der Zelle und nicht lokal begrenzt stattfinden muss und dass auch dieser Prozess innerhalb von Sekunden stattfindet und damit mit einer um mehrere Größenordnungen schnelleren Kinetik als bisher angenommen.

Weitere Experimente mit den semisynthetischen Konstrukten bewiesen eine große Substrattoleranz, da sowohl D-konfigurierte Lipopeptide als auch β -Lipopeptide depalmitoyliert und auch wieder repalmitoyliert wurden. Dies steht im Widerspruch zu einer Reihe bisheriger Publikationen, in denen diverse substratspezifische Palmitoyltransferasen postuliert wurden.

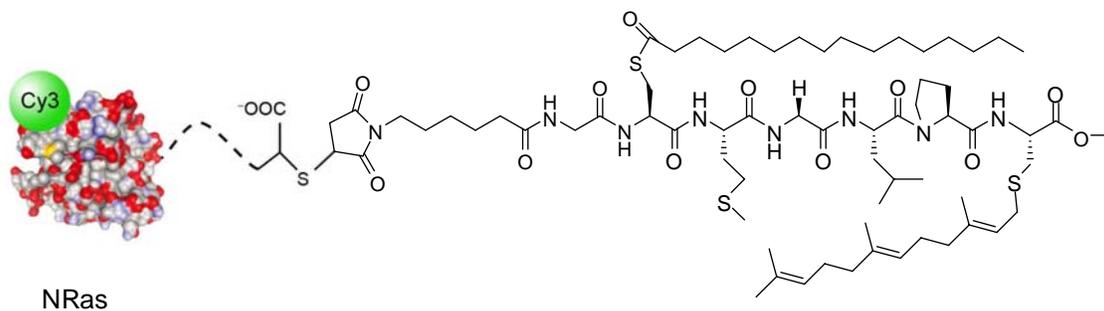


Abbildung 98: Semisynthetisches N-Ras-Protein (PalFar-Protein): C-terminal ist über einen MIC-Linker ein palmitoyliertes und farnesyliertes Peptid angehängt. Das Protein ist Cy3 gelabelt.

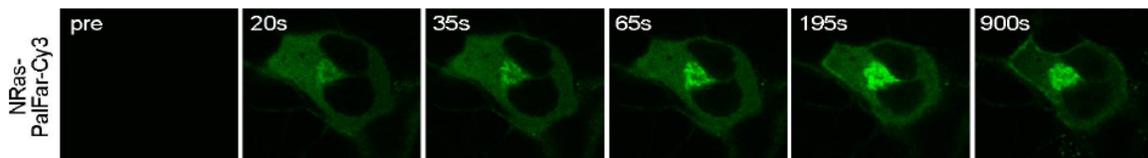


Abbildung 99: Zeitverlauf des PalFar-Proteins nach der Mikroinjektion. Nach 65s ist eine Anreicherung am Golgi zu erkennen. Nach 900s eine Anreicherung an der Plasmamembran

Diese PATs (Protein-Acyl-Transferasen) stammen aus der Familie der sogenannten DHHC-CRD-(Asp-His-His-Cys-cysteine rich domain) Proteine, welche ihrerseits palmitoyliert sind. Anhand der neuen Ergebnisse wurde ein neues Modell zum

Mechanismus der Proteinpalmitoylierung entwickelt. In diesem Modell weisen zumindest einige der DHHC-Proteine eine breite Substrattoleranz auf und können damit jegliche potentielle Spezifität anderer DHHC-Proteine neutralisieren. Nahezu alle der 23 DHHC Proteine im Menschen lokalisieren am Golgi.^[118] Es ist daher denkbar, dass alle DHHC Proteine im Kollektiv eine Palmitoylierungsmaschinerie bilden, die lokal am Golgi für die Aufnahme, Speicherung und Weitergabe von Pal-CoA sorgen. Trotzdem hinterfragen unsere Studien, ob es überhaupt ein typisches PAT-Substrat Paar gibt, wie es für Ras postuliert wird.

Auch wenn es in der DHHC-Familie Proteine mit hoher Substratspezifität geben sollte, müssen einige eine gewisse Toleranz aufweisen. Denn nur so ist die Prozessierung der verschiedenen semisynthetischen Konstrukte möglich. Dabei könnte Palmitoyl-Coenzym A der Donor für die Palmitoylgruppe sein. Wenn die DHHC-Proteine in der Weise palmitoyliert werden, könnte die Gesamtheit als eine Einheitspalmitoylierungsmaschinerie dienen. Da der Palmitoyltransfer auf dem gleichen Energielevel passiert, könnte die Triebkraft in der hohen lokalen Konzentration der Palmitoylgruppen und der Abdiffusion der palmitoylierten Substrate liegen. So wäre der Prozess als enzymatisch anzusehen, aber nicht im klassischen Sinne, dass für ein Substrat ein spezifisches Enzym zum Einsatz kommt. Dies ist aber auch aus anderen Beispielen bekannt, wo ein Enzym mit verschiedenen Substraten interagieren kann, wie z.B. bei den Endopeptidasen Trypsin oder Chymotrypsin. Hier ist auch z.B. im Fall von Chymotrypsin nur eine aromatische Aminosäuren von Nöten, um die Peptidbindung zu spalten. Dabei spielt es keine Rolle welche Sequenz das Peptid enthält.

Diese Einsichten haben deswegen Auswirkungen auf zukünftige Strategien, in Bezug auf Drug-Development. Die gängigen Strategien, dass man in die Proteinpalmitoylierung eingreifen sollte, müssen aufgrund dieser Unspezifität neu evaluiert werden.

5.2. Linker-Systeme

Für die Synthese der β -Lipopeptide wurde das Tenta Gel R PHB Harz evaluiert. Basierend auf diesem Linker wurde die Synthese für β -Lipopeptide etabliert. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit β -Lipopeptideanaloge der N-Ras-Sequenz mit sowohl einem Farnesylrest synthetisiert, wie auch mit einem Farnesyl- und einem Palmitoylrest. Dabei wurde die Sequenz vom C-terminalen β -Prolin aufgebaut. Nach der Abspaltung des β -Peptids wurde es in Lösung an das β -Cysteinderivat **54** gekuppelt.

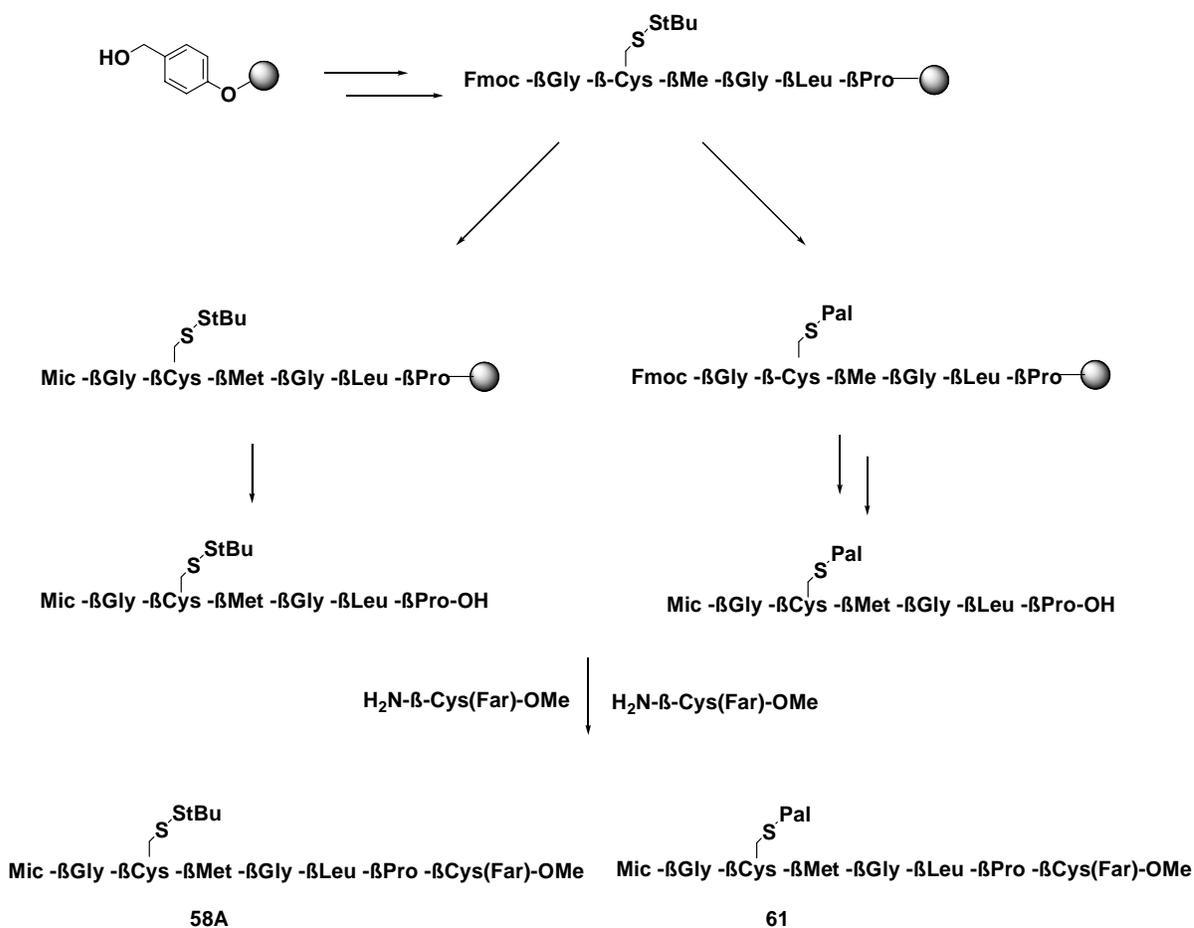


Abbildung 100: Synthese der β -Peptide: a) Route für die analoge N-Ras-Sequenz, b) Palmitoylierung an fester Phase

5.3. Ellman-Linker

Aufgrund der bei der Abspaltung entstehenden Radikale bei dem Hydrazid-Linker und den damit verbundenen Nebenreaktionen, sollte der Ellman-Linker als weiterer Alternative für die Festphasensynthese von Lipopeptiden untersucht werden. Durch seine Eigenschaft als Safety-Catch Linker schien er ein geeigneter Kandidat für die säure- und basenempfindlichen Gruppen der Lipopeptide zu sein. Dabei wurden zuerst die Beladungsbedingungen optimiert. Durch Verwendung von TFFH als Kupplungsreagenz wurde in situ ein Säurefluorid erzeugt, das für ein sehr gutes Beladungsergebnis sorgt. Erzielt wurde diese quantitative Beladung durch die Verwendung trockener Lösungsmittel und das Vortrocknen des Harzes.

Die weiteren Schritte zur Erhaltung des gewünschten Lipopeptides bestanden in der Optimierung der Kupplungsbedingungen. Es wurde für die Kupplung der Aminosäure DIC und HOBt verwendet.

Weitere detaillierte Analysen zeigten, dass unter den Abspaltungsbedingungen, die in der Literatur verwendet werden, um einen C-terminalen Methylester zu generieren, Racemisierung auftrat. Der Gebrauch von Methanol und DMAP sorgte für eine Racemisierung der an das Harz gebundenen Aminosäure.

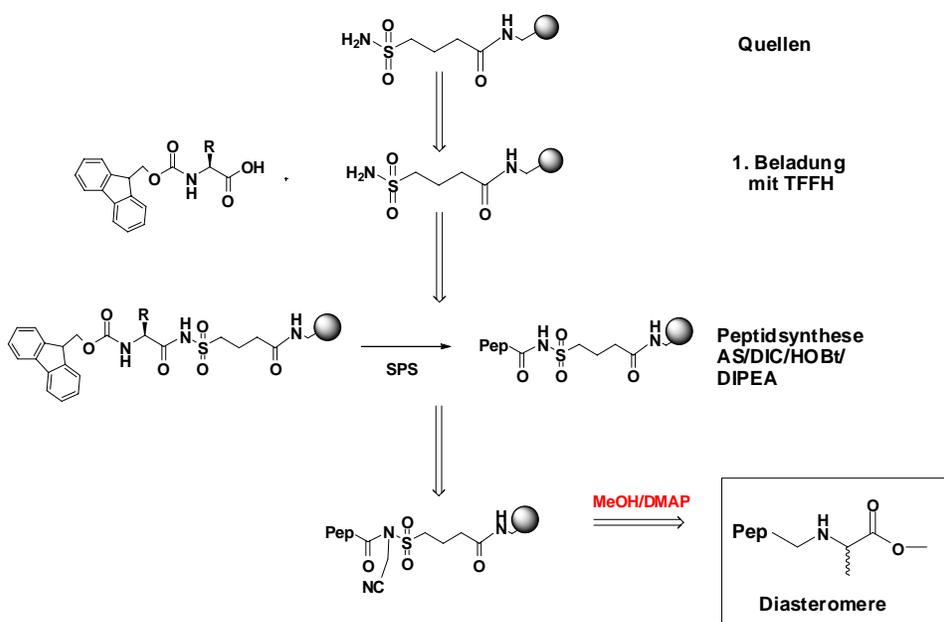


Abbildung 101: Syntheschema für den Ellman-Linker

Um diese unerwünschte Reaktion zu umgehen, wurde das Lipopeptid dadurch dargestellt, das mit dem Methyl ester des Cysteinderivates abgespalten wurde.

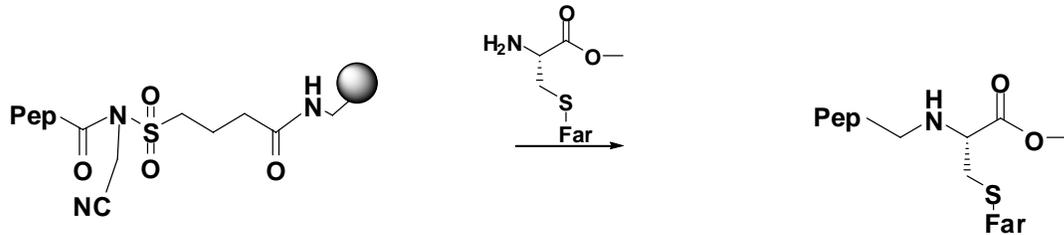


Abbildung 102: Variation der Abspaltungsbedingung

Trotz dieser sanften Abspaltungsbedingungen ist es nicht möglich die notwendigen Lipopeptide für die biologischen Zwecke auf diesem Linker zu synthetisieren. Um die Peptide für spätere biologische Experimente verwenden zu können, wird N-terminal eine Maleimidocaprinsäure angeknüpft. Hier stellte sich heraus, dass nach der Immobilisierung die Maleimidogruppe, diese die Aktivierungs- und Abspaltungsbedingungen nicht übersteht. Somit ist trotz der vielversprechenden Möglichkeiten, die ein Safety-Catch System bietet durch detaillierte Untersuchungen herausgekommen, dass dieses Linker-System aufgrund der bereits genannten Nachteile nicht geeignet ist, um generell Lipopeptide zu erzeugen.

6. Experimenteller Teil

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

6.1. Allgemeines

NMR-Spektroskopie

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

Varian Mercury 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR
Bruker AMX 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR
Bruker DRX 500	500 MHz ^1H -NMR, 125.8 MHz ^{13}C -NMR
Varian Unity Inova	600 MHz ^1H -NMR, 150.8 MHz ^{13}C -NMR

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

Massenspektrometrie

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

Optische Rotation

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer 241 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in mg/10 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

UV-Vis-Spektroskopie

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

Schmelzpunkte

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

Chromatographie

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

Reagenz A: 2,5 g Molybdätdiphosphorsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser.

Reagenz B: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm).

Zur Größenausschlußchromatographie wurde die Biobeads Bio-Beads S-X3 der Firma Bio-Rad verwendet.

HPLC-ESI-MS Spektren wurden mit einer Hewlett-Packard Agilent 1100 HPLC, einem Finnegan LCQ Massenspektrometer und Corona Detektor (Charged Aerosol Detection) aufgenommen. Die Detektion erfolgte bei 210nm (Channel B), 254nm (Channel A), 280nm (Channel C) und 350nm (Channel D). Als Säulen dienten analytische Nucleosil C4, C18HD oder C18-Nautilus Säulen von Macherey&Nagel und wurden mit einem Gemisch von CH₃CN + 0.1 % Ameisensäure / H₂O + 0.1 % Ameisensäure oder CH₃CN + 10 mM NH₄OH / H₂O + 10 mM NH₄OH und einer Flussrate von 1ml/min betrieben. Verwendete Gradienten : 20-100% ACN

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

Für die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde eine Firma Agilent (1100 Series) verwendet. Die verwendeten Säulen der Firma Macherey-Nagel sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben, es wurden Flussraten von 27 ml/ min eingesetzt. Das Lösungsmittel der Produktfraktionen wurde anschließend durch Lyophilisieren entfernt.

Chemikalien

Alle verwendeten Ausgangskemikalien wurden bei den Firmen Acros Chimica, Aldrich, Avocado, Bachem, Fluka, Novabiochem, Molecular Probes, Riedel de Haen, Senn Chemicals oder Sigma erworben mit Ausnahme einiger Aminosäuren aus Schenkungen der Degussa AG. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über einem nach Laborstandard üblichen Trockenmittel destilliert und bei Bedarf nach Standardvorschriften absolutiert. Falls unter Argon als Schutzgas gearbeitet wurde, ist dies vermerkt.

Proteine, Zellkulturen und Mikroinjektionen

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

7. Versuche zu dem Kapitel 4

7.1. Allgemeine Arbeitsweise

Es wurde 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM Nova Gel (Beladung 0.56 mmol/g) der Firma Novabiochem, Tenta Gel R PHB Harz (Beladung 0.23mmol/g) der Firma Rapp Polymere GmbH und ein Sulfonamid-Harz (Beladung 1.1 mmol/g) der Firma Novabiochem benutzt. Alle Reaktionen wurden bis 600 mg Harz in einem 50 ml Rosenbaumreaktor ausgeführt, bei Harzmengen über 600 mg wurde ein 100 ml Rosenbaumreaktor verwendet. Der Reaktor besitzt eine Fritte am Ende, die ein schnelles Filtrieren und Waschen ermöglicht. Des Weiteren besitzt der Reaktor einen Seitenarm, um Argon zur Reaktion zuzuleiten. Die Durchmischung des Harzes erfolgte mit Hilfe eines Kreisschüttlers (GFL 3005) der Firma GFL, indem der Reaktor eingespannt wurde.

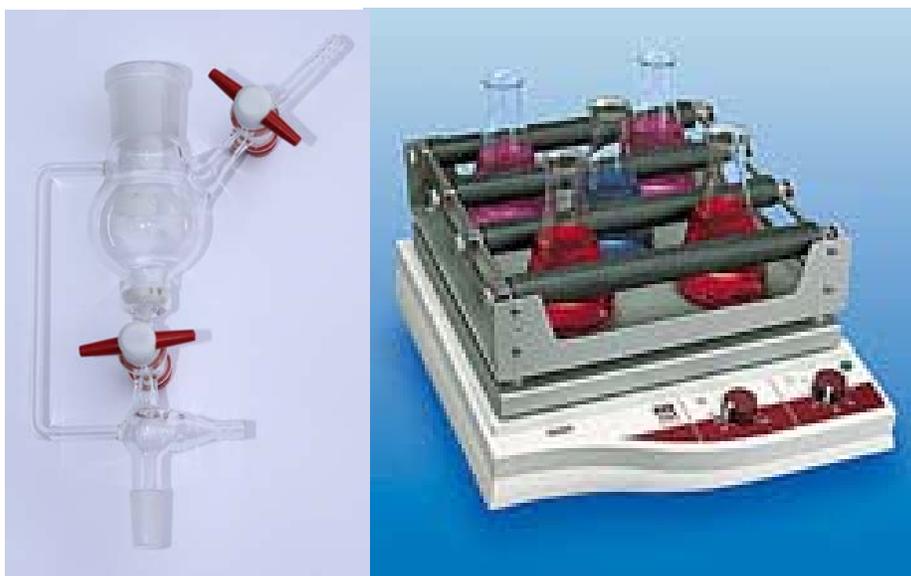


Abbildung 103: Links ein 50ml Rosenbaumreaktor, Rechts ein Orbitalshaker

Bestimmung des Harz-Belegungsgrades von Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine eingewogene Menge zwischen 2 und 5 mg Polymer wird mit 10 mL einer Lösung von Piperidin (20%) in DMF versetzt und für 10 min geschüttelt. Die UV-Absorption der Lösung bei 301 nm wird bestimmt. Die Konzentration, und damit der Belegungsgrad, lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Bromophenol-Blau Test

Die Lösung besteht aus 25 mg Bromophenol-Blau in 50 ml Essigsäuredimethylamid. Um die Vollständigkeit der Amidkupplung zu detektieren wird als Test-System zur Detektion freier Amine der Bromophenol-Blau Test durchgeführt. Dazu wird ein kleiner Teil des Harzes in ein kleines Glasvial überführt und mehrmals mit Dichlormethan und Methanol gewaschen. Die Beads werden kurz im Argon-Strom angetrocknet und es erfolgt die Zugabe von 200 μl Bromophenol-Blau Lösung. Ist die Lösung über den Beads wie auch die Beads nicht verfärbt, ist der Test negativ in Bezug auf freie Amine.

Basenvermittelte Spaltung von Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppen an der festen Phase

Für die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurden verschiedene Entschützungsreagenzien verwendet. Es handelt sich dabei um die in folgenden aufgeführten Zusammensetzungen.

Arbeitsvorschrift E1

1. Ein Gemisch von trockenen DMF/redestillierten Piperidin (1:1) wird mit Argon 15 min entgast und zum Polymer gegeben. Das Harz wird 5 min geschüttelt, danach wird der Vorgang zweimal wiederholt.

Anschließend wird das Harz fünfmal mit trockenem, entgastem DMF gewaschen.

Arbeitsvorschrift E2

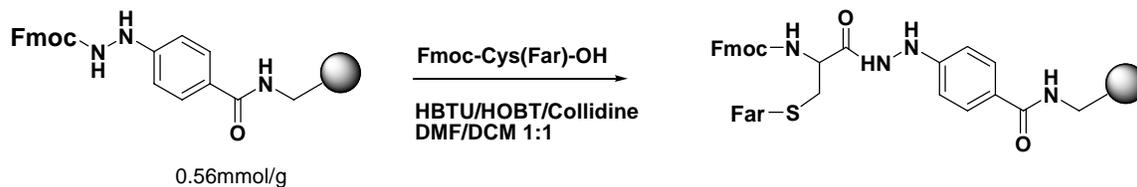
2. Ein Gemisch von trockenen DMF/redestillierten Piperidin (4:1) wird mit Argon 15 min entgast und zum Polymer gegeben. Das Harz wird 15 min geschüttelt, dann wird die Entschützungslösung abgelassen.

Arbeitsvorschrift E3

3. Zuerst wird trockenes NMP 15 min mit Argon entgast. Danach wird ein Gemisch von trockenen NMP, redestillierten Piperidin und DBU hergestellt, so dass die Mischung eine Zusammensetzung von NMP/Piperidin 2%/DBU 2% enthält. Die Lösung wird für 15 min zum Harz gegeben.

Danach wird das Harz fünfmal mit trockenem DMF gewaschen.

7.2. Synthese am Hydrazid-Harz



Quellen:

Arbeitsvorschrift H1

Zuerst wird das Harz jeweils zweimal für 5min mit trockenem DCM, dann mit trockenem DMF gequollen. Anschließend erfolgt nach Arbeitsvorschrift E1 die Entschützung der Fmoc-Gruppe.

Beladung:

Arbeitsvorschrift H2

Es werden 3eq (Fmoc-Cys(Far)-OH oder Fmoc-Cys(Ger-BP)-OH), 3eq HOBt, 3eq (HBTU oder HCTU) eingewogen und mit einer entgasten Mischung aus DCM/DMF (1:1) unter Rühren versetzt. Daraufhin werden 3eq Collidin zugegeben und die Lösung wird 3min voraktiviert. Danach wird die gesamte Lösung zum Harz gegeben. Nach 8h wird das Harz dreimal mit DCM gewaschen, anschließend dreimal mit DMF. Die Beladung des Harzes wird bestimmt, um für die weiteren Schritte die genaue Menge an einzuwiegenden Komponenten zu kennen.

Anschließend wird die Fmoc-Gruppe entfernt, indem das Harz nach Arbeitsvorschrift E1 behandelt wird.

Aufbau der Peptidsequenz

Arbeitsvorschrift H3

Alle weiteren Aminosäuren werden mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt oder HCTU/HOBt an der Festphase immobilisiert. Dazu werden 4eq Aminosäure, 4eq (HBTU oder HCTU) und 4eq HOBt in DMF für 2min gelöst. Daraufhin werden 8eq DIPEA zugegeben und für weiter 2min voraktiviert, bevor es zum für 2h bei RT zum Harz gegeben wird. Nach dieser Zeit wird das Harz abfiltriert und anschließend mehrmals mit DMF gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Bromphenol-Test detektiert. Bei unvollständiger Kupplung wird die Kupplung wiederholt.

Bei vorhandener Fmoc-Gruppe wird die Fmoc-Schutzgruppe nach Arbeitsvorschrift E1 abgespalten.

Kupplung von Fmoc-Cys(Pal)-OH oder Fmoc-Pen(Pal)-OH

Arbeitsvorschrift H4

Für die Immobilisierung der Cysteinderivate werden jeweils 3eq des Derivates, 3eq HOBt und 3eq HBTU in DCM/DMF (1:1) vorgelöst, gefolgt von der Zugabe 3eq Collidin und einer 3 minütigen Voraktivierung.

Der nächste Schritt umfasst die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Dazu wird eine Lösung aus DMF/DBU (2%) (1.5ml/0.1g Harz, 2 x 60s) genommen. Danach wird

fünfmal mit DMF für jeweils 5s gewaschen und sofort die nächste Aminosäure zur Kupplung zugegeben.

Um den S,N-Shift zu vermeiden, wird Fmoc-Gly-OH (5eq), HATU (5eq) in DCM/DMF (4:1) für 15 min voraktiviert. Die Kupplungszeit beträgt 3h. Danach wird mehrmals mit DMF gewaschen.

Kupplung von Maleimidocaprinsäure an eine Palmitoylgruppe enthaltende-Sequenz

Arbeitsvorschrift H5

Für die N-terminale Anbringung der Maleimidocaprinsäure wird zuerst die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Dazu wird eine Lösung aus DMF/DBU (2%) (1.5ml/0.1g Harz, 2 x 60s) genommen. Es erfolgt fünfmaliges Waschen für jeweils 5 s. Danach wird eine Lösung aus 5eq MIC (1) oder (2), 5eq HBTU, 5eq HOBT und 5eq DIPEA in DMF zugegeben und für 3h gekuppelt. Nach Beendigung der Kupplung wird das Harz fünfmal mit DMF gewaschen.

Kupplung von Maleimidocaprinsäure (A) und Desthiobiotincaprinsäure (B) an den N-Terminus

Arbeitsvorschrift H6

Zuerst wird die Fmoc-Schutzgruppe nach Arbeitsvorschrift E1 abgespalten. Dann werden 4eq von Substanz (A) oder (B), 4eq (HBTU oder HCTU) und 4eq HOBT in DMF für 2 min gelöst. Daraufhin werden 8eq DIPEA zugegeben und für weiter 2 Minuten voraktiviert, bevor es zum für 2 Stunden bei RT zum Harz gegeben wird. Nach dieser Zeit wird das Harz abfiltriert und anschließend mehrmals mit DMF gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Bromophenol-Test detektiert. Bei unvollständiger Kupplung wird die Kupplung wiederholt.

Abspaltung des Lipopeptids

Arbeitsvorschrift H7

Vor der Abspaltung des Peptids wird das Harz dreimal mit trockenem DCM gewaschen.

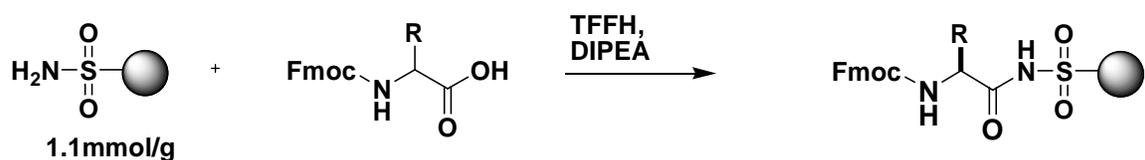
Dann wird eine Lösung aus $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (0.55eq), Pyridin (35eq) und Methanol (215eq) in DCM zugegeben. Das Harz wird während des Abspaltungsprozesses nicht mehr unter Argon gelagert, sondern die Reaktion wird im offenen Rosenbaumreaktor ausgeführt.

Bei Lipopeptiden, die eine Palmitoylgruppe enthalten, werden zusätzlich 35eq Essigsäure zugegeben.

Das Harz wird für 2.5h geschüttelt und nach Filtration mehrmals mit DCM gewaschen.

Die organische Phase wird mit Wasser extrahiert und anschließend entfernt. Das Rohprodukt wird dann mehrmals mit Toluol koevaporiert und anschließend aufgereinigt.

7.3. Synthese am Ellman-Linker



Beladung:

Arbeitsvorschrift EL1:

Zuerst wird das Harz ($m \leq 600\text{mg}$) in einen Spritzenreaktor (10ml) mit PE-Fritte gegeben und im Hochvakuum für 30 min getrocknet. Danach wird der Reaktor an die Vakuumlinie angeschlossen und mit Argon sekuriert, dadurch wird das Harz weiter angetrocknet.

Anschließend wird das Harz dreimal mit trockenem DCM gewaschen und gequollen. Währenddessen werden 3eq (bezogen auf die Anfangsbeladung des Harzes) einer Aminosäure und 3eq TFFH zusammen eingewogen und ebenfalls mehrmals sekuriert. Im Folgenden wird eine Mischung aus DCM/DMF (1:1) zugegeben und die Feststoffe unter starkem Rühren gelöst. Anschließen werden 6eq redestilliertes DIPEA zu der Lösung zugegeben und 10 min in einer Argon-Atmosphäre unter starkem Rühren aktiviert. Die Lösung wird nun mit dem Spritzenreaktor aufgenommen und wird 4h auf dem Schüttelreaktor inkubiert.

Anschließend wird das Harz mehrmals mit DCM gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es erfolgt nun ein Fmoc-Belegungsgradtest nach oben genannter Arbeitsvorschrift.

Anschließend wird das Harz in einen Rosenbaumreaktor überführt und zuerst mit DCM und anschließend mit DMF gequollen.

Aufbau der Peptidsequenz:

Arbeitsvorschrift EL2:

Zuerst wird die Fmoc-Schutzgruppe nach der Arbeitsvorschrift E2 und dann E3 entfernt. Es werden 4eq Aminosäure, 4eq DIC und 4eq HOBt zusammen in trockenem NMP gelöst und drei Minuten voraktiviert, dann zum frisch-entschützten Harz gegeben. Die Mengen beziehen sich auf die ermittelte Beladung.

Das Harz wird für 2.5h auf dem Orbitalshaker im Rosenbaumreaktor geschüttelt und dann fünfmal mit trockenem NMP gewaschen. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mit dem Bromophenol-Blau Test überprüft.

Aktivierung:

Arbeitsvorschrift EL3:

Das Harz wird fünfmal mit trockenem NMP gewaschen. Iodacetonitril wird durch basisches Aluminiumoxid gefiltert. Dann werden 20eq Iodacetonitril in trockenem NMP gelöst und zum Harz gegeben. Anschließend werden 10eq DIPEA zum Harz getropft und das Harz gegenüber Licht abgeschirmt und 24 h geschüttelt. Es folgt der Waschvorgang, indem fünfmal mit trockenem NMP für jeweils 10 min das Harz gewaschen wird. Danach wird das Harz dreimal mit trockenem DCM gewaschen.

Abspaltung:

Arbeitsvorschrift EL4:

Abspaltung mit Methanol

Es werden 22eq Methanol und 0.9eq DMAP in THF/DCM (1:1, 1.2ml/100mg Harz) gelöst. Die Lösung wird zum frisch aktivierten Harz gegeben und für einen Zeitraum von 16-20h geschüttelt. Danach wird mehrmals mit DCM gewaschen.

Abspaltung mit H₂N-Cys(Far)-OMe / H₂N-Leu-OMe

Von dem Aminosäurederivat werden 3eq in trockenem DCM (1.2ml/100mg Harz) gelöst und anschließend zum Harz gegeben und geschüttelt. Nach 6-8h wird die Lösung abfiltriert und das Harz noch dreimal mit DCM gewaschen.

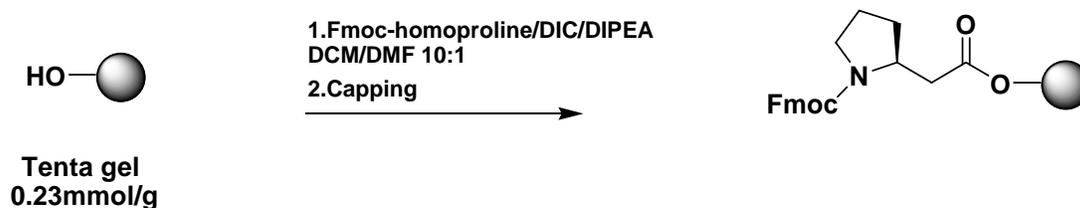
Abspaltung mit H₂O

Die Abspaltung mit H₂O (40eq) wird in Gegenwart von DMAP (0.8eq) ausgeführt. Beide Komponenten werden in THF (1.2ml/100mg Harz) gelöst und für einen Zeitraum von 16-20h geschüttelt. Danach wurde die Lösung abfiltriert und mehrmals mit THF gewaschen.

Abspaltung mit Benzylamin

Es wird 5eq Benzylamin in trockenem DCM (1.2ml/100mg Harz) gelöst und zum Harz gegeben. Nachdem 6-8h auf dem Orbitalshaker im Rosenbaumreaktor geschüttelt wird, wird die Lösung abfiltriert und das Harz noch mehrmals mit DCM gewaschen. Das Benzylamin wird mit 1M NaHSO₄ extrahiert. .

7.4. Synthese am Tenta Gel R PHB Harz



Beladung:

Arbeitsvorschrift TG1

Tenta Gel R PHB Harz (500mg) wird zweimal im trockenen DCM in einem Rosenbaumreaktor für 10min gequollen. Eine Lösung Fmoc- β^3 -Pro-OH (3eq bezüglich der Initialbeladung), DIC (1.5eq) werden in trockenem DCM (1ml/ 100mg Harz) unter Rühren gelöst. Nach 10min werden (1.5eq) DMAP zugegeben und die resultierende Lösung wird zum Harz gegeben und für 18h geschüttelt. Danach wird das Harz fünfmal mit DCM jeweils 1 Minute gewaschen. Am Ende findet eine Fmoc-Bestimmung statt, indem ein kleiner Teils des Harzes separat getrocknet wird und spektrometrisch die Beladung nach der oben genannten Arbeitsvorschrift bestimmt wird.

Die OH-Gruppen, die nicht mit Fmoc- β^3 -Pro-OH reagiert haben, werden mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid (100eq bezogen auf die ermittelte Beladung) und DMAP (1.1eq) in NMP (1ml /100mg Harz) für 1h gecappt. Anschließend wird das Harz fünfmal mit NMP gewaschen.

Aufbau der Peptidsequenz:

Arbeitsvorschrift TG2

Nach dem Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe nach Arbeitsvorschrift E2, gefolgt von Arbeitsvorschrift 3, wird die nächste Aminosäure gekuppelt. Dazu werden 3eq β -Aminosäure, 2.8eq PyBop, 2.8eq HOBt und 8.4 eq DIPEA zusammen in trockenem NMP gelöst und zum Harz gegeben.

Nach 2h wird die Kupplungslösung abfiltriert und das Harz fünfmal mit trockenem NMP gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mit dem Bromophenol-Blau Test überprüft. Maleimidocaprinsäure wird unter den gleichen Bedingungen gekuppelt wie die Aminosäure.

Palmitoylierung am Harz:

Arbeitsvorschrift TG3

Nachdem als letzte Aminosäure am N-terminalen Ende Fmoc- β -Gly-OH angebracht worden ist, wird das Harz jeweils zweimal mit trockenem, entgastem DCM und DMF gewaschen. Es wird eine Lösung aus 15eq PBU₃ und 70eq H₂O in DCM/DMF (1:1)

hergestellt. Die Lösung wird zum Harz gegeben und das Cystein wird binnen 1h entschützt. Daraufhin wird das Harz viermal mit DCM/DMF (1:1) gewaschen.

Zu dem frisch entschütztem Harz wird eine Lösung gegeben, die 6eq Pal-OH, 6eq DIC und 6eq HOBt in DCM/DMF (1:1) gelöst, enthält.

Das Harz wird im nächsten Schritt in einer Quarzküvette in den Mikrowellenreaktor (CEM-Discover) überführt und bei 70°C und 50W für 15min den Mikrowellen ausgesetzt.

Danach wird das Harz über Nacht geschüttelt und anschließend mit DCM/DMF gewaschen und wieder in den Rosenbaumreaktor überführt.

Es erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des β -Glycins. Dazu wird das Harz zweimal mit DMF/DBU (2%) für 1 min versetzt und anschließend fünfmal für 10s mit DMF gewaschen.

Es erfolgt sofort die Kupplung von 3eq MIC, 2.8eq PyBop, 2.8 eq HOBt und 8.4 eq DIPEA in NMP für 2h. Das Harz wird zuletzt fünfmal mit NMP gewaschen.

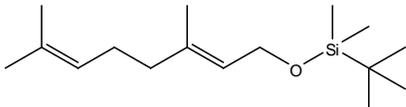
Abspaltung:

Arbeitsvorschrift TG4

Das Harz wird fünfmal mit trockenem DCM gewaschen und für 2h am Hochvakuum getrocknet. Danach wurde eine Lösung bestehend aus 2% v/v Wasser und 2% v/v Triisopropylsilan (TIS) in TFA zum Harz gegeben und für 2h auf dem Shaker geschüttelt. Es wird die Lösung abfiltriert und erneut mit TFA/DCM (10%) zweimal gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wird, kann das gewünschte Peptid mittels präoperativer HPLC aufgereinigt werden. Dazu wird es über die C4 VP125/21 Nucleodur Gravity Säule gegeben.

7.5. Synthese der Cysteinderivate

Geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**12**)



Zu einer Lösung von Geraniol (**11**) (8.76mL, 0.05mol, 1eq) und Diisopropylethylamin (17.39mL, 0.10mol, 2eq) in abs. DCM (50mL) wird *t*-Butyldimethylsilylchlorid (7.53g, 0.05mol, 1eq) in abs. DCM (10mL) bei 0°C unter Rühren langsam zugegeben. Nach 4h Rühren bei RT wird fünfmal mit 50mL 0.2 N wässrige HCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden einmal mit 50mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wird das Gemisch filtriert und im Vakuum konzentriert und Geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**12**) als weiß-gelbes Öl erhalten.

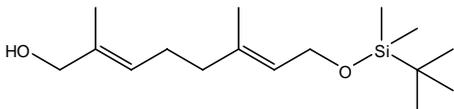
Ausbeute: 13.02 g (48.6 mmol, 97 %)

GC-MS (DB_100_S): $t_R = 4.14$ min; $m/z = 268$ (6 %), 211 (23 %), 135 (30 %), 75 (100 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.07$ (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.60 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.98-2.12 (m, 4H), 4.19 (d, ³ $J = 6.24$ Hz, 2H), 5.10 (t, ³ $J = 1.46$ Hz, 1H), 5.30 (t, ³ $J = 1.96$ Hz, 1H) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = -4.6$ (CH₃), 16.6 (CH₃), 18.0 (C_q), 18.7 (CH₃), 26.0 (CH₃), 26.3 (CH₃), 26.7 (CH₂), 39.88 (CH₂), 60.7 (CH₂), 124.4 (CH), 124.7 (CH), 131.8 (C_q), 137.1 (C_q) ppm

8-Hydroxy-geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**13**)



Zu einer Lösung von Selendioxid (0.291g, 2.62mmol, 0.1eq) und Salicylsäure (0.362g, 2.62mmol, 0.1eq) in abs. DCM (150mL) wird *t*-Butylhydroperoxid (13.08mL, 104.48 mmol, 4eq) bei 0 °C unter Rühren langsam zugetropft. Nach 30 min bei 0 °C Rühren wird Geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**12**) (7g, 26.12mmol, 1eq) zugegeben. Nach 5h bei Raumtemperatur Rühren wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur nicht über 36 °C). Es wird jeweils mit zweimal 100mL Toluol versetzt und am Rotationsverdampfer entfernt. Dann wird mit 50mL Diethylether verdünnt und dreimal mit 10mL ges. NaHCO₃ gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet. Nach dem Filtrieren wird es im Vakuum konzentriert. Die Aufreinigung erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie mit Cyclohexan/Ethylacetat (5:1). Das Produkt wird als gelbes Öl erhalten.

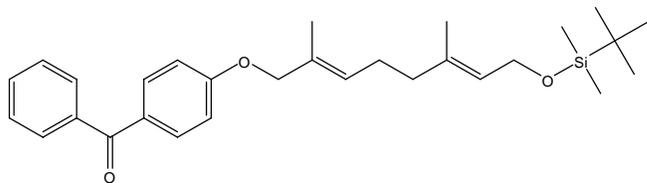
Ausbeute: 0.85 g (2.99 mmol, 11.5 %)

R_f = 0.30 (Cyclohexan/Ethylacetat (5:1))

GC-MS (DB_100_S): t_R = 4.90 min; m/z = 283 (1 %), 135 (28 %), 105 (27 %), 93 (30 %), 75 (100 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.06 (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.62 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 2.04 (t, ³J = 4.8 Hz), 2.14 (s, ³J = 7.5 Hz), 3.98 (s, 2H), 4.18 (d*d, ³J = 6.28 Hz, 2H), 5.30 (m, 1H), 5.38 (m, 1H) ppm

8-(4-Benzoylphenoxy)-geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**14**)



Zu einer Lösung von 8-Hydroxy-geranyl-*t*-butyldimethylsilylether (**13**) (4.00g, 14.08 mmol, 1eq), *p*-Hydroxybenzophenon (3.35g, 16.90mmol, 1.2eq) und Triphenylphosphin (5.54g, 21.31mmol, 1.5eq) in THF (30 mL) wird Azadicarbonsäurediisopropylester (4.18 mL, 21.13mmol, 1.5eq) unter Eis-NaCl-Kühlung bei -20°C und Rühren langsam zugetropft. Nach 4 h bei RT wird Ether (150mL) und Wasser (50mL) zugegeben und die

Phasen getrennt. Die organische Lösung wird zweimal mit 30mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet. Nach der Filtration wird es im Vakuum konzentriert. Die Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie mit Cyclohexan/Ethylacetat (10:1). Das Produkt wird als gelber Feststoff erhalten.

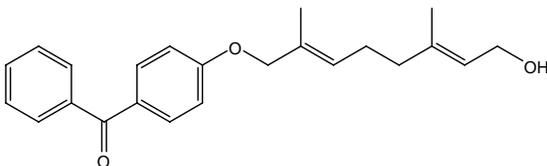
Ausbeute: 3.17 g (6.83 mmol, 48.8 %)

R_f = 0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat (10:1))

GC-MS (DB_100_S): t_R = 10.61 min; m/z = 407 (40 %), 333 (7 %), 249 (11 %), 207 (16 %), 105 (100 %) 75 (50 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.07 (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.64 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.07 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 2.21 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H), 4.19 (d, ³J = 6.44 Hz 2H), 4.46 (s, 2H), 5.32 (t, ³J = 6.94 Hz, 1H), 5.56 (t, ³J = 7.52 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 6.69 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.81 (m, 2H) ppm

8-(4-Benzoylphenoxy)-geraniol (15)



Zu einer Lösung von TBDMS-Ether (**14**) (1.63g, 3.5 mmol, 1eq) in abs. THF (20mL) wird 1M TBAF-Lösung (in THF; 4.21mL, 4.21mmol, 1.2eq) bei 0 °C unter Rühren zugegeben. Nach der Farbveränderung von gelbe nach orange wird noch 1h bei RT gerührt. Dann wird mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und zweimal mit 20 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden mit MgSO₄ trocknet. Nach Filtrieren wird im Vakuum konzentriert. Die Aufreinigung erfolgt durch Flash-Säulenchromatographie mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1). Das Produkt wird als weiß-gelber Feststoff erhalten.

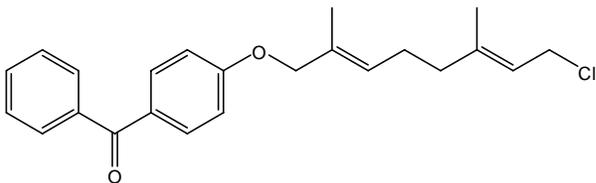
Ausbeute: 1.18 g (3.37 mmol, 96 %)

$R_f = 0.55$ (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.69$ (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.12 (t, $^3J = 7.52$ Hz, 2H), 2.22 (t, $^3J = 7.52$ Hz, 2H), 4.14 (d, $^3J = 6.84$ Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 5.41 (t, $^3J = 6.74$ Hz, 1H), 5.55 (t, $^3J = 7.02$ Hz, 1H), 6.96 (t, $^3J = 9$ Hz, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.80 (m, 2H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.5$ (CH_3), 16.8 (CH_3), 26.5 (CH_2), 39.5 (CH_2), 60.0 (CH_2), 74.7 (CH_2), 105.0 (CH), 124.5 (CH), 128.8 (CH), 129.5 (CH), 130.3 (CH), 131.1 (CH), 132.5 (C_q), 133.1 (C_q), 139.5 (C_q), 163.2 (C_q), 196.2 (C_q) ppm

8-(4-Benzoylphenoxy)-geranylchlorid (16)



Zu einer Lösung von N-Chlorsuccinimid (0.96g, 7.22mmol, 1.1 eq) in abs. DCM (20 mL) wird Dimethylsulfid (0.97mL, 13.12mmol, 2eq) bei -45 °C (Trockeneis in Aceton) unter Rühren langsam zugetropft. Nach 5min bei 0 °C wird 8-(4-Benzoylphenoxy)-geraniol (**15**) (2.30g, 6.65mmol, 1eq) in abs. DCM (10mL) bei -45 °C (Trockeneis in Aceton) unter Rühren langsam zugetropft. Nach 2h wird auf 0°C aufgewärmt wobei die Reaktionsmischung klar wird. Dann wird mit 50mL Cyclohexan verdünnt und 2-mal mit 20mL eiskalter ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, und danach im Vakuum entfernt. Weil das Produkt nicht stabil ist, wird das Rohprodukt nicht aufgereinigt. Dünnschichtchromatographie-Kontrolle mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1).

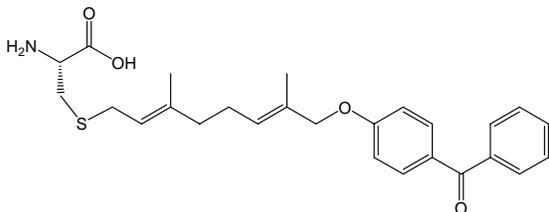
$R_f = 0.86$ (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1))

NMR für Roh-Produkt:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.60$ (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.12 (t, $^3J = 7.52$ Hz, 2H), 2.22 (t, $^3J = 7.52$ Hz, 2H), 4.08 (d, $^3J = 8$ Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 5.45 (t, $^3J = 8.1$ Hz,

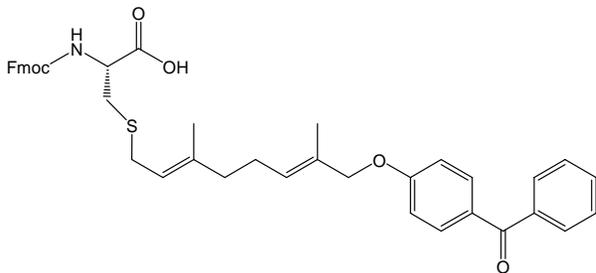
1H), 5.54 (t, $^3J = 7.52$ Hz, 1H), 6.96 (d, $^3J = 8.76$ Hz, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.81 (m, 2H) ppm

S-[8-(4-Benzoylphenoxy)-geranyl]-L-Cystein (17)



Zu einer Lösung von L-Cysteinhydrochlorid (1.25g, 7.98mmol, 1.2eq) in 7M NH_3/MeOH -Lösung (18.6mL, 100mmol, 16eq) wird das Rohprodukt des 8-(4-Benzoylphenoxy)-geranylchlorids (**16**) (2.4g, 6.56mmol, 1eq) in abs. MeOH (20 mL) bei 0 °C unter Rühren langsam zugetropft. Nach 3h wird auf RT aufgewärmt und weitere 2h gerührt. Nach dem Entfernen der Lösungsmittels wird ein weißer Feststoff erhalten. Das Produkt wird ohne weiter Aufreinigung für den nächsten Schritt verwendet.

N-Fmoc-S-[8-(4-Benzoylphenoxy)-geranyl]-L-Cystein (18)



Zu einer Lösung von S-[8-(4-Benzoylphenoxy)-geranyl]-L-Cysteinmethylester (**17**) (6.56mol, 1eq) in DCM (50mL) wird NEt_3 (3mL, 21.28mmol, 3.2eq) bei RT unter Rühren zugegeben. Nach 10 min wird Fmoc-OSu (7.18g, 21.28mol, 3.2eq) zugegeben. Nach 9h wird im Vakuum aufkonzentriert. Zuerst erfolgt eine säulenchromatographische Aufreinigung mit Cyclohexan/Ethylacetat (2/1), anschließend erfolgt die Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Dichlormethan/Methanol (10:1). Das Produkt wird als weiß-gelber Feststoff erhalten.

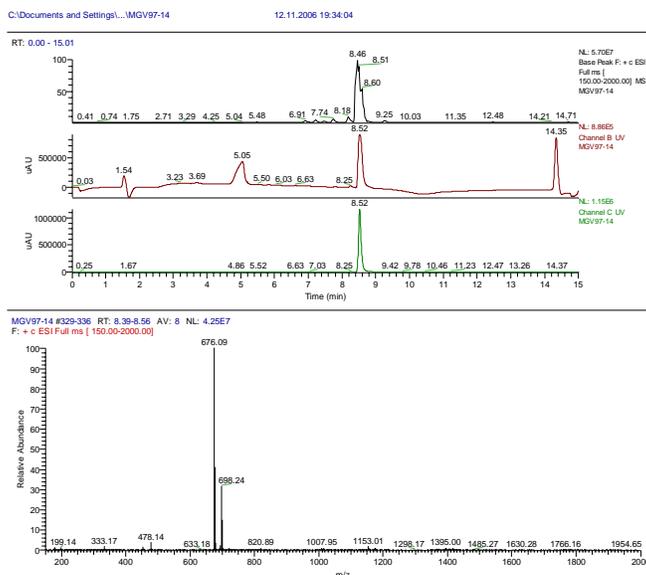
Ausbeute: 2.16 g (40%)

$[\alpha]_D^{20} = 15.5$ ($c = 0.65$, CHCl_3)

$R_f = 0.41$ Dichlormethan/Methanol (10:1)

HPLC-Kontrolle: (in C-4 Säule)

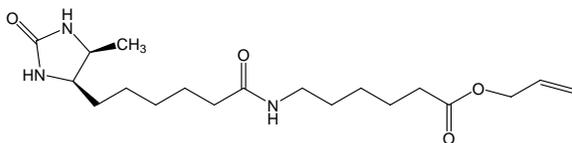
Dazu wird das Cysteinderivat **18** in DCM gelöst und diese Lösung in Acetonitril gegeben und vermessen. Aufgrunddessen ist ein DCM-Peak im Spektrum bei 5.05 min zu sehen.



HR-MS(FAB): für $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ berechnet exakte Molmasse: 675.2655; gemessene Masse 675.2626 (M^+), 676.2715 (M^+H)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 2.10 (d, $^3J = 7.24$ Hz, 2H), 2.19 (d, $^3J = 6.94$ Hz, 2H), 2.99 (m, 2H), 3.20 (m, 2H), 4.23 (t, $^3J = 6.94$ Hz, 1H), 4.40 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.60 (m, 1H), 5.22 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H), 5.49 (t, $^3J = 6.84$ Hz, 1H), 6.95 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.58 (m, 3H), 7.74 (m, 4H), 7.78 (m, 2H) ppm

Desthio-Biotin-Allyl-capronsäure (**21**)

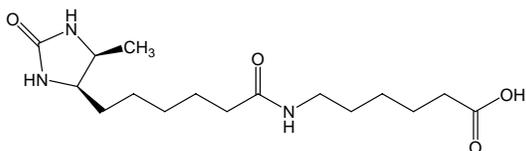


Eine Lösung von Desthiobiotin (432mg) und 6-Aminocapronsäureallylester-Toluolsulfonat (1.215g), gelöst in 16 ml DMF, wird unter Argon mit NEt_3 versetzt. Anschließend wird $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (950mg) und HOBT (675mg) zugegeben. Dabei entsteht eine orange gefärbte Suspension. Die Reaktion wird über Nacht gerührt. Darauf wird DMF restlos entfernt und der Rückstand mit 40 ml DCM versetzt und dreimal mit 0.5N HCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet.

Das Produkt wurde mit DCM:MeOH 5% säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute 60%

Desthiobiotincapronsäure (22)

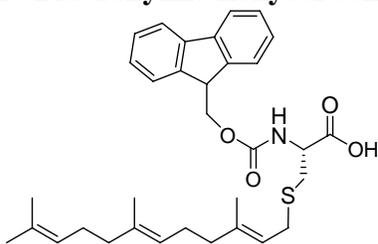


Es werden 140mg (0.38mmol) des Allylesters **21** in 4mL trockenem DCM gelöst. Anschließend werden unter Argon 40 μL (0.45mmol) Morpholin zugetropft und 5mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.0043mmol) zugegeben. Nach 1h werden erneut 2mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.00173 mmol) zugegeben. Die Mischung wird über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit DCM:MeOH (5%) aufgereinigt. Danach wird das Produkt in einer Mischung aus Ethylacetat/ H_2O /Essigsäure/Methanol (3:2:3:3) ausgefällt und wiederum mit Dichlormethan/Methanol (5%) säulenchromatographisch aufgereinigt.

$R_f = 0.40$ (Dichlormethan/Methanol (5%))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, *MeOH*) ppm 1.11 (d, $J = 6.46$ Hz, 3H), 1.32-1.69 (m, 14H), 2.18 (t, $J = 7.44, 7.44$ Hz, 2H), 2.29 (t, $J = 7.36, 7.36$ Hz, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 3.67-3.72 (m, 1H), 3.82 (qd, $J = 7.88, 6.46, 6.46, 6.45$ Hz, 1H) ppm

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-farnesyl-L-Cystein (Fmoc-Cys(Far)-OH) (29)



Zu einer Lösung von 1.0 g (5.7mmol, 1eq) L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat (**28**) in 11mL Methanol werden bei 0°C langsam 15 ml einer 7M Ammoniaklösung in Methanol gegeben. Während der Zugabe wird die Lösung trübe, am Ende ist sie klar.

Nach 5 min werden 1.5 mL (5.7mmol, 1eq) Farnesylchlorid zugetropft. Man rührt 3 h bei 0°C und 1h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der verbleibende Feststoff wird mit Pentan (3 x 20mL) gewaschen und für 5min am Hochvakuum getrocknet, anschließend werden 50 ml Dichlormethan zugegeben. Die Suspension wird in einem Eisbad gekühlt und 0.88 ml (6.28 mmol, 1.1eq) Triethylamin und 2.11g (6.28mmol, 1.1eq) Fmoc-Succinimid werden zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der Niederschlag abdekantiert/abfiltriert. Der Niederschlag wird nochmals mit DCM gewaschen und wiederum abfiltriert. Die organische Phase wird dann im Vakuum eingengt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 0-5%) als gelbes, zähflüssiges Öl erhalten.

Ausbeute: 1.6 g (3.0 mmol), 52%

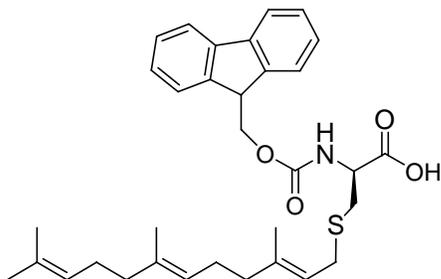
R_f = 0.45 (Dichlormethan/ Methanol (5:1))

[α]_D²⁰ = -4.3 (c = 0.8, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.60 (s, 3H, CH₃ Far); 1.62 (s, 3H, CH₃ Far); 1.65 (s, 3H, CH₃ Far); 1.70 (s, 3H, CH₃ Far); 1.98-2.13 (m, 8H, CH₂ Far); 2.94 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 3.04 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.21 (tr, *J* = 6.6 Hz, 2H, Far CH₂-S); 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.39 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.63 (m, 1H, α-CH Cys); 5.11 (m, 2H, CH Far); 5.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Far); 5.97 (m, 1H, NH); 7.29 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.37 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* =

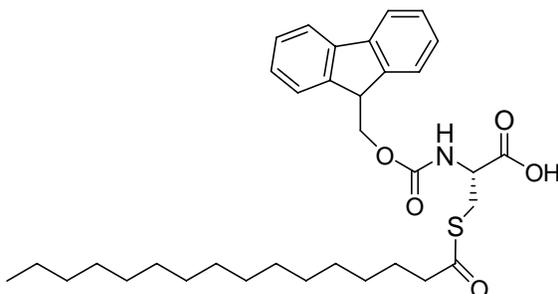
7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc); 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc) ppm

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-farnesyl-*D*-Cystein (Fmoc-*D*-Cys(Far)-OH) (29D)**



Die Synthese entspricht der von (29).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-palmitoyl-*L*-Cystein (Fmoc-Cys(Pal)-OH) (31)**



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

Stunde gerührt und dann im Vakuum eingengt. Das Produkt wird nach chromatographischer Reinigung am Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 0-25%) als weißer Feststoff erhalten.

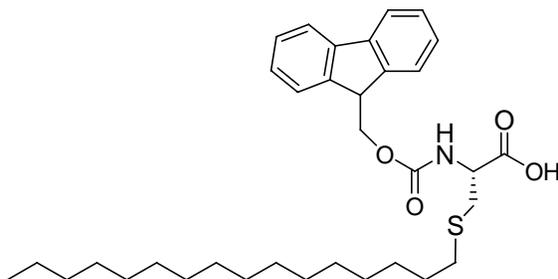
Ausbeute: 0.64 g (1.07 mmol), 36%

R_f = 0.6 (Ethylacetat/ Cyclohexan 2:1, 1% Essigsäure)

[α]_D²⁰ = +5.4 (c = 0.93 in CHCl₃).

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

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-hexadacyl-*L*-Cystein (Fmoc-Cys(HD)-OH) (34)**



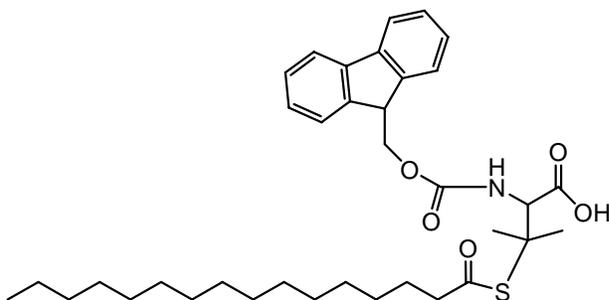
In einen 50mL Kolben werden 551mg (3.5mmol) Cysteinhydrochlorid Hydrat (**33**) gegeben. Danach wurden in 8.5mL DMF hinzugefügt und anschließend 741mg (7mmol) Na₂CO₃ und 1.233g (3.5mmol) Hexadecyliodid zugegeben. Nach 16h unter starkem Rühren erhält man ein weißes, geliges Gemisch. Das DMF wird restlos entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 8 ml Dioxan und 1.17g Fmoc-OSu (3.5mmol). Zuletzt erfolgt die Zugabe von Na₂CO₃ gelöst in 1mL H₂O. Das Gemisch wird 12h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt mit 0.2N HCl, gefolgt von 40ml DCM. Die Phasen werden getrennt. Die organische Phase einrotiert und säulenchromatographisch aufgereinigt. (DCM/MeOH 10%).

Ausbeute: 0.199 g (0.35 mmol), 10%

$[\alpha]_D^{20} = -6.2$ (c = 0.3, CH₂Cl₂)

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

(Fmoc-Pen(Pal)-OH) (32)



Es wird 1g Fmoc-Pen(Trt)-OH (**30**) in trockenem DCM gelöst, danach erfolgt die Zugabe von 1ml TFA und 500 µL TES. Dabei verfärbt sich die Lösung von klar bis tieforange und wieder zurück. Nach 1.5h wird das Lösungsmittel abgezogen und mit 15 mL TFA versetzt. Der ausfallende weiße Rückstand wird abfiltriert und das Filtrat wird auf 0°C abgekühlt. Palmitoylchlorid (930 mg) werden zugegeben. Nach 3.5h wird der Ansatz durch Zugabe von Wasser gequentscht.

Die Aufreinigung erfolgt mit Dichlormethan/Methanol (5%) und man erhält einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 0.215 g (1.07 mmol), 25%

$R_f = 0.25$ (Dichlormethan/Methanol 5%)

$[\alpha]_D^{20} = -5.82$ (c = 1.03 in CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.88 (t, *J* = 6.89, 6.89 Hz, 1H), 1.21-1.55 (b, 27H), 1.58 (s, 3H, β-Dimeth.), 1.62 (s, 3H, β'-Dimeth.), 2.49 (t, *J* = 7.51, 7.51 Hz, 1H), 4.25 (t, *J* =

7.29, 7.29 Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 7.44$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 9.17$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 7.61$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 7.45, 7.45$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 1.22$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 1.14$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 1.12$ Hz, 1H) ppm

7.6. Synthese der β -Cysteinderivate

Darstellung von Diazomethan im DiazalKit[®]

Für diese Synthese wurde der Aldrich Mini Diazald[®] verwendet.

Vorsichtsmaßnahmen :

1. Diazomethan sollte immer hinter einem Sicherheitsschild im Abzug generiert und gebraucht werden.
2. Nie konzentrierte Lösungen verwenden.
3. Nie Glasapparaturen mit rauen Oberflächen benutzen.(keine Schliffe!).
4. Diazomethan nie lagern, sondern mit Essigsäure neutralisieren.

Nachdem die Apparatur, wie in Abbildung 104 aufgebaut wird, wird der Kondensierer mit Trockeneis befüllt. Man löst KOH (5g) in Wasser (8mL) und verdünnt die Lösung mit 95% Ethanol (10mL). Diese Mischung wird in einen Kolben gegeben. Ein 100mL Auffangkolben wird an den Kondensierer angeschlossen, der im NaCl-Eisbad gekühlt wird. Eine Ether-Auffangfalle wird an diesen Kolben geschlossen, indem ein Verbindungsschlauch in ein Reagenzglas geleitet wird, das 2-3 mL Ether enthält und sich ebenfalls im NaCl-Eisbad befindet. Der Scheidetrichter wird über den Reaktor gehängt und mit Diazald (5g), in 45mL Ether gelöst, versehen. Der Reaktor wird auf 65°C erhitzt. Die Diazald-Lösung wird nun über einen Zeitraum von 20min zu der KOH-Lösung getropft. Die Zutropfrate sollte ungefähr der Destillationsrate entsprechen. Nachdem alles an Diazald verbraucht worden ist, werden noch mal 10mL Ether in den Scheidetrichter

gegeben und die Destillation fortgesetzt bis das Destillat farblos ist. Die Ether-Lösung enthält nun 700mg (16.6mmol) Diazomethan.

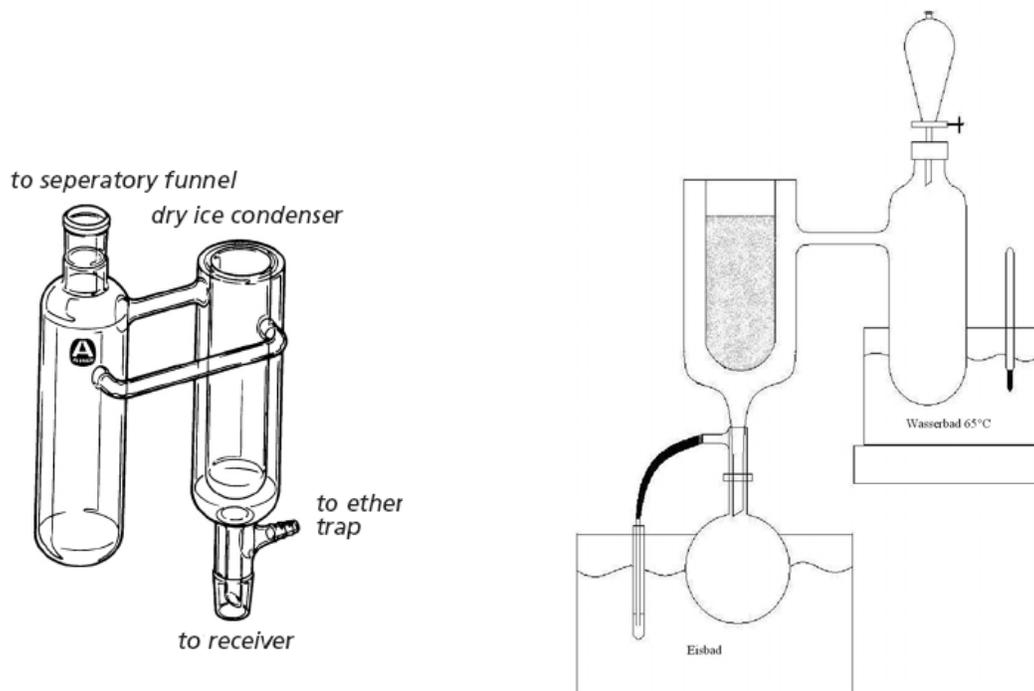
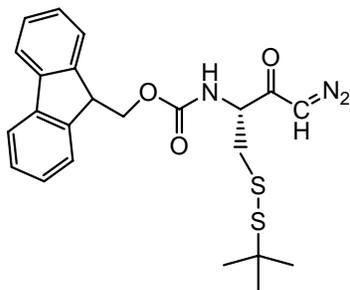


Abbildung 104: Versuchsaufbau zur Herstellung von Diazomethan. Links: Generator von Aldrich zur Herstellung von Diazomethan®. Rechts: Schematischer Aufbau

Synthese der lipidierten β -Cysteinderivate

Fmoc-Cys(*St*Bu)-N₂ (49)



Fmoc-Cys(StBu)-OH (**48**) wird als Ausgangsmaterial für die Arndt-Eistert Reaktion genommen, um das Diazoketon zu generieren. Fmoc-Cys(StBu)-OH (4.32g, 10mmol) wird in 30mL THF gelöst, auf -20°C gekühlt und mit 1.154mL NMM und 1.369mL Isobutylchloroformiat versetzt.

Danach wird weitere 20min bei - 20 °C gerührt und anschließend auf -5°C aufgewärmt.

Es erfolgt nun vorsichtig die Zugabe des zuvor erzeugtem Diazomethan (in Ether, im Eisbad gelagert). Die Zugabe erfolgt tropfenweise mit einer abgerundeten Pipette.

Die Lösung wird gelb und 4h gerührt. Danach werden 300 -500µL Essigsäure zugegeben, um das restliche Diazomethan zu zerstören. Daraufhin wird mit 150mL Ether verdünnt.

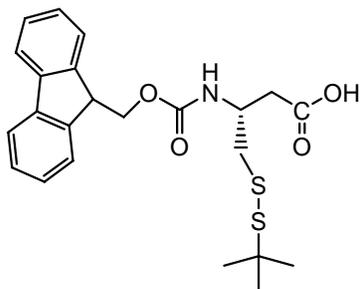
Die Aufarbeitung erfolgt durch jeweils zweimaliges Waschen mit NaHCO₃, 1M HCl und NaCl-Lösung. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch mit Cyclohexan/Ethylacetat (4:1)

Ausbeute: 2.5 g (54%)

R_f = 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat (4:1))

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ= 1.33 (s, 9H), 3.06 (s, 2H), 4.23 (t, *J* = 6.66, 6.66 Hz, 1H), 4.42-4.50 (m, 3H), 5.45 (s, 1H), 5.65 (d, *J* = 7.80 Hz, 1H), 7.30-7.33 (m, 2H), 7.38-7.42 (m, 2H), 7.59-7.61(m, 2H), 7.76-7.77 (m, 2H) ppm

Fmoc-β-Cys(StBu)-OH (**50**)



Es werden 2.4g (5.27mmol) des Fmoc-geschützte Diazoketons (**49**) in einem Becherglas in 240mL THF und 60mL H₂O gelöst. Das Gefäß wird in einen UV-Photoreaktor (Rayonet RPR-100, Connecticut, USA) über Nacht bei 350nm belichtet.

Danach werden die Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 100mL Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 5%). Man erhält 950 mg eines braunen, klebrigen Feststoffes.

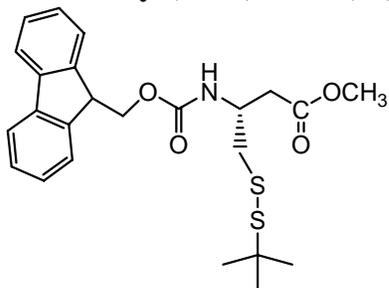
Ausbeute: 950 mg, 41%

R_f = 0.4 (Dichlormethan/Methanol 5%)

[α]_D²⁰ = -11.5 (c = 0.26 in CHCl₃).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (s, 9H), 2.75-2.87 (m, 2H), 2.95 (dd, *J* = 13.15, 6.37 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 13.27, 6.36 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 6.19, 6.19 Hz, 1H), 4.28 (b, 1H), 4.38 (b, 1H), 5.46 (d, *J* = 7.96 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.52 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.39 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.43, 7.43 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.34, 7.34 Hz, 1H) ppm

Fmoc-β-Cys(StBu)-OMe (51)



Es werden 2.0g (4.38 mmol) des frisch generierten Diazoketon (**49**) in einem Gemisch aus jeweils 9mL THF und Methanol bei 0°C gelöst. Anschließend werden 110mg (0.48mmol) Silberbenzoat, gelöst in 1200 μL NMM (N-Methylmorpholin) zugegeben.

Man lässt die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht reagieren.

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. (Cyclohexan: Ethylacetat 0-20%)

Ausbeute: 1.3g (65%)

R_f = 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat (4:1))

[α]_D²⁰ = -12.3 (c = 1.06 in CHCl₃).

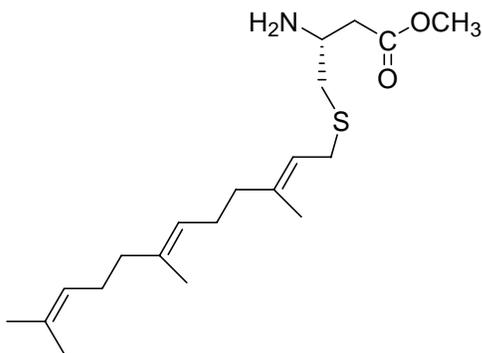
Es werden 370mg (1mmol) des frisch entschütztem Cysteins (**52**) in 10mL DCM gelöst und auf 0°C herabgekühlt. Danach erfolgt die Zugabe von 428µL (1.5mmol) Farnesylbromid und 209µL (1.5mmol) Triethylamin. Die Reaktion wird auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Cyclohexan:Ethylacetat (0-25%)) aufgereinigt.

Ausbeute: 218mg (38%)

$R_f = 0.31$ (Cyclohexan/Ethylacetat (4:1))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.59$ (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.68 (s, 6H), 1.95-2.10 (m, 8H), 2.67-2.77 (m, 4H), 3.19 (d, $J = 6.99$ Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 4.14-4.16 (b, 1H), 4.23 (t, $J = 7.03$, 7.03 Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 6.67$ Hz, 1H), 5.06-5.11 (m, 2H), 5.23 (t, $J = 7.52$, 7.52 Hz, 1H), 5.43 (d, $J = 7.96$ Hz, 1H), 7.31 (dt, $J = 7.45$, 7.44, 1.19 Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.50$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 0.81$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 7.52$ Hz, 1H) ppm

H₂N-β-Cys(Far)-OMe (54**)**



Es wird 57.6mg (0.1mmol) von dem farnesylierten Cysteinderivat (**53**) in Methanol/DCM (1mL/0.5mL) gelöst. Danach werden 15µL (0.1mmol) DBU zugegeben und nach einer weiteren Stunde noch mal 5 µL DBU. Zuletzt wird dreimal mit 0.5M HCl waschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 5%) aufgereinigt.

Ausbeute: 18.2mg (51%)

$[\alpha]_D^{20} = -24.0$ (c = 0.20 in CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.60 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.95-2.15 (m, 8H), 2.35-2.46 (m, 2H), 2.58-2.63 (m, 2H), 3.14- 3.28 (m, 3H), 3.68 (s, 3H), 5.07-5.13 (m, 2H), 5.22-5.26 (m, 1H) ppm

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ = 16.0, 16.2, 17.7, 26.3, 26.3, 26.4, 29.8, 39.5, 39.6, 39.7, 51.7, 52.4, 119.0, 124.0, 131.3, 135.3, 172.2 ppm

7.7. Synthese der Peptide für die Racemisierungsversuche

Aufbau der Sequenzen Ac-Pro -Cys(Far)OMe am Hydrazid-Harz

Das Harz (350mg) wird nach Arbeitsvorschrift (AV) H1 gequollen und entschützt. Danach werden 321.6mg (0.588 mmol) Fmoc-L-Cys(Far)-OH (**29**) an die feste Phase mittels AV H2 gebunden. Dazu werden 90mg (0.588mmol) HOBt, 215mg (0.588mmol) HBTU und 78.3µL (0.588mmol) Collidin benutzt. Nach dem Fmoc-Belegungsgradtest und Entschützung wird die Sequenz weiter aufgebaut. Durch Verwendung von 3.4eq (181.4mg, 0.53mmol) Fmoc-Pro-OH, 3.3eq (197.1mg, 0.52mmol) HBTU, 3.4eq (82.3 mg, 0.53mmol) HOBt und 6.8 eq (184µL, 1.06mmol) DIPEA wird die Sequenz nach AV H3 verlängert. Als letztes wird das freie Amin mit Essigsäure nach AV H3 acetyliert, um es dann schließlich nach AV H7 abzuspalten.

Ac-L-Pro-L-Cys(Far)-OMe (**72**)

$[\alpha]_D^{20} = -13.3$ (c = 1.06 in CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.55(s, 6H), 1.62(s, 1.5H, Isomer1), 1.62(s, 1.5H, Isomer2), 1.63(s, 1.5H, Isomer 1), 1.63(s, 1.5H, Isomer 2), 1.84 (s, 3H), 1.86-2.27(m, 12H), 2.70 (dd, J = 13.80, 9.45 Hz, 0.5H), 2.72 (dd, J = 13.77, 10.14 Hz, 0.5H), 2.80 (dd, J = 13.77, 5.60 Hz, 0.5H), 2.90 (dd, J = 13.75, 4.61 Hz, 0.5H), 3.09-3.21 (m, 2H), 3.29-3.35 (m, 0.5H), 3.40-3.46 (m,1H), 3.49-3.55 (m, 0.5H), 3.62 (s,1.5H, Isomer 1), 3.63 (s,1.5H Isomer 2), 4.32-44.45 (m,1H), 4.48 (dd, J = 6.86, 3.11 Hz, 1H), 4.51 (dd, J =

6.89, 3.06 Hz, 1H), 5.04-5.09 (m, 2H), 5.14-5.17 (m, 1H), 8.21 (d, $J = 7.90$ Hz, 0.5H), 8.51 (d, $J = 8.41$ Hz, 0.5H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, *DMSO*): $\delta = 15.6, 15.6, 17.4$ (3 CH_3 Far), 23.9 (N-CO- CH_3), 25.3 (CH_3 Far), 25.7, 26.0 (2 CH_2 Far), 28.3, 28.7 (S- CH_2 Far), 29.2 (CH_2 , γ -Pro), 31.5 (β - CH_2 Cys, Isomer1), 31.7 (β - CH_2 Pro), 31.6 (β - CH_2 Cys, Isomer2), 46.1 (δ - CH_2 , Isomer1), 47.3 (δ - CH_2 , Isomer2), 51.4, 51.4 (O- CH_3 , Isomer 1+2), 51.6, 51.9 (α - CH_2 Cys, Isomer 1+2), 58.7, 60.3 (α - CH_2 Pro, Isomer 1+2), 117.8 (CH Far), 123.5, 123.9 (CH Far), 168.2, 168.5 (C=O, Isomer 1+2), 170.8, 170.9 (C=O, Isomer 1+2), 171.7, 172.1 (C=O, Isomer 1+2) ppm

Ac-L-Pro-D-Cys(Far)-OMe (73)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -51.1$ ($c = 0.20$ in CHCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, *DMSO*): $\delta = 1.55$ (s, 6H), 1.62-1.63 (m, 6H), 1.85-2.27(m, 12H), 1.85 (s, 3H), 2.63 (dd, $J = 13.86, 8.58$ Hz, 0.5H), 2.73 (dd, $J = 13.82, 9.84$ Hz, 0.5H), 2.82 (dd, $J = 13.81, 5.53$ Hz, 0.5H), 2.89 (dd, $J = 13.78, 4.70$ Hz, 0.5H), 3.08-3.21 (m, 2H), 3.30-3.36 (m, 0.5H), 3.39-3.46 (m, 1H), 3.51-3.56 (m, 0.5H), 3.62 (s, 1.5H, Isomer 1), 3.63 (s, 1.5H Isomer 2), 4.34 (dd, $J = 8.11, 2.50$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J = 8.54, 2.78$ Hz, 1H), 4.40-4.48 (m, 1H), 5.04-5.09 (m, 2H), 5.14-5.17 (m, 1H), 8.25 (d, $J = 8.36$ Hz, 0.5H), 8.53 (d, $J = 8.07$ Hz, 0.5H) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, *DMSO*): $\delta = 15.6, 15.6, 17.4$ (3 CH_3 Far), 23.9 (N-CO- CH_3), 25.4 (CH_3 Far), 25.7, 26.0 (2 CH_2 Far), 28.4, 28.6 (S- CH_2 Far), 29.5 (CH_2 , γ -Pro), 31.4 (β - CH_2 Cys, Isomer1), 31.7 (β - CH_2 Pro), 32.0 (β - CH_2 Cys, Isomer2), 46.1 (δ - CH_2 , Isomer1), 47.3 (δ - CH_2 , Isomer2), 51.4, 51.4 (O- CH_3 , Isomer 1+2), 51.8, 51.9 (α - CH_2 Cys, Isomer 1+2), 58.7, 60.1 (α - CH_2 Pro, Isomer 1+2), 119.8 (CH Far), 123.5, 123.9 (CH Far), 168.2, 168.5 (C=O, Isomer 1+2), 170.8, 170.9 (C=O, Isomer 1+2), 171.7, 172.1 (C=O, Isomer 1+2) ppm

Aufbau von Ac-L-Pro-L-Cys(Far)OMe am Ellman-Linker

Das Harz (300mg) wird nach Arbeitsvorschrift EL1 getrocknet und mit 542.22mg Fmoc-Cys(Far)-OH (**29**) beladen. Anschließend erfolgt der Aufbau der Peptidsequenz nach der Arbeitsvorschrift EL2. Bevor das Peptid abgespalten wird, muss das Harz nach Arbeitsvorschrift EL3 aktiviert werden. Die anschließende Abspaltung erfolgt nach Arbeitsvorschrift EL4 mittels Methanol. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Peptid auf der präoperativen HPLC aufgereinigt.

Ac-Pro-Cys(Far)-OMe (Ellman Linker)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.55(s, 12H), 1.62-1.63 (m, 12H), 1.85-2.27(m, 24H), 1.85, 1.87 (s, 6H), 2.59-2.91 (m, 8H), 3.09-3.21 (m, 4H), 3.40-3.46 (m, 2H), 3.49-3.55 (m, 1H), 3.62, 3.62, 3.63 (s, 6H), 4.32-4.52 (m, 4H), 5.04-5.09 (m, 4H), 5.11-5.17 (m, 2H), 8.21 (d, J = 7.87 Hz, 0.5H), 8.25 (d, J = 8.59 Hz, 0.5H), 8.53 (d, J = 7.94 Hz, 0.5H), 8.51 (d, J = 8.38 Hz, 0.5H) ppm

Synthese von Methyl-(N-Boc-L-phenylalanin)-L-Leucinate (68A)

Die Synthese und Aufreinigung des Dipeptides in Lösung erfolgte nach der Vorschrift von Boruah^[119].

Ausbeute: 75%

$[\alpha]_D^{20}$ = -25.0 (c = 1.50 in MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (d, J = 6.42 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.29 Hz, 3H), 1.44-1.59 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 3.07 (d, J = 6.96 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.34 (q, J = 7.12, 6.95, 6.95 Hz, 1H), 4.53-4.59 (m, 1H), 4.98 (br, 1H), 6.23 (d, J = 7.59 Hz, 1H), 7.20-7.31 (m, 5H) ppm

Synthese von Methyl-(N-Boc-L-phenylalanin)-D-Leucinate (68B)

Die Synthese und Aufreinigung des Dipeptides in Lösung erfolgte nach der Vorschrift von Boruah^[119].

Ausbeute: 67%

$[\alpha]_D^{20}$ = -24.6 (c = 1.52 in MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, *CDCl*₃): δ = 0.86 (d, *J* = 6.13 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.28 Hz, 3H), 1.35-1.52 (m, 3H), 1.40 (s, 9H), 3.06 (d, *J* = 7.10 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.34(br, 1H), 4.50-4.55 (m, 1H), 5.01 (br, 1H), 6.19 (d, *J* = 8.27 Hz, 1H), 7.19-7.31 (m, 5H) ppm

Aufbau von Boc-*L*-Ph-*L*-Leu-NHBn (67) am Ellman-Linker

Das Harz (182mg) wird nach Arbeitsvorschrift EL1 getrocknet und mit 212.22mg Fmoc-Leu-OH beladen. Anschließend erfolgt der Aufbau der Peptidsequenz nach der Arbeitsvorschrift EL2. Bevor das Peptid abgespalten wird, muss das Harz nach Arbeitsvorschrift EL3 aktiviert werden. Die anschließende Abspaltung erfolgt nach Arbeitsvorschrift EL4 mittels Benzylamin. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Peptid auf der präoperativen HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.022 g (0.026 mmol), 56%

HPLC (C4): R_f = 7.39 min

¹H NMR (400 MHz, *CDCl*₃): δ = 0.89 (d, *J*=6.3Hz, 6H), 1.36 (s, 9H), 1.41-1.50 (m, 2H), 1.67-1.73 (m, 1H), 3.03 (dd, , *J*= 2.7, 13.1Hz, 1H), 3.06 (dd, , *J*=2.3, 13.01H), 4.25-4.30 (m, 1H), 4.44 (d, *J*= 4.7Hz 2H), 4.45-4.49 (m, 1H), 4.90 (bs, 1H), 6.21 (d, *J*=8.2Hz,1H), 6.51 (bs,1H), 7.15-7.17 (m, 2H), 7.22-7-33 (m, 8H) ppm

Aufbau von Boc-*L*-Ph-*L*-Leu-OMe (68) am Ellman-Linker

Das Harz (182mg) wird nach Arbeitsvorschrift EL1 getrocknet und mit 212.22mg Fmoc-Leu-OH beladen. Anschließend erfolgt der Aufbau der Peptidsequenz nach der Arbeitsvorschrift EL2. Bevor das Peptid abgespalten wird, muss das Harz nach Arbeitsvorschrift EL3 aktiviert werden. Die anschließende Abspaltung erfolgt nach Arbeitsvorschrift EL4 mittels Methanol. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Peptid auf der präoperativen HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.006 g (0.015 mmol), 16%

HPLC (C4): R_f = 7.03 min

¹H-NMR (400 MHz, *CDCl*₃): δ = 0.81-0.91 (m, 12H, Isomer 1+2), 1.40 (s, 9H, Isomer 1), 1.41 (s, 9H, Isomer 2), 1.45-1.62 (m, 6H, Isomer 1+2), 3.07 (d, *J* = 6.69 Hz, 4H, Isomer 1+2), 3.69 (s, 3H, Isomer 1), 3.70 (s, 3H, Isomer 2), 4.31-4.37 (m, 2H, Isomer

1+2), 4.54-4.59 (m, 2H, Isomer 1+2), 5.02 (d, $J = 7.48$ Hz, 2H, Isomer 1+2), 6.28 (d, $J = 8.19$ Hz, 2H, Isomer 1+2), 7.19-7.31 (m, 10H, Isomer 1+2) ppm

7.8. Synthese der Lipopeptide

MIC-Gly-*D*-Cys(Pal)-*D*-Met-Gly-*D*-Leu-*D*-Pro-*D*-Cys(Far)-OMe (45)

Hierzu werden 350mg Harz verwendet, mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-*D*-Cys(Far)-OH (**29D**) entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HCTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 und H4, für die Einführung des palmitoylierten Cystein, wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird an den N-Terminus nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 17.8mg Cu(OAc)₂, 510μL Pyridin, 430 μL Essigsäure und 1.54mL Methanol in 8mL DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.036 g (0.027 mmol), 20%

$[\alpha]_D^{20} = 37.9$ (c = 0.25, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 10.51 min

¹H-NMR (500MHz, DMSO): δ = 0.83-0.88 (m, 9H, ω-CH₃ Leu, CH₃ Pal), 1.22 (s, 24H, CH₂ Pal, CH₂ MIC), 1.43-1.53 (m, 8H, CH₂ MIC, CH₂ Pal, β-CH₂ Leu), 1.55 (s, 6H, CH₃ Far), 1.62 (s, 3H CH₃ Far), 1.63 (s, 3H CH₃ Far), 1.79-2.06 (m, 13 H, β-CH₂ Met, γ-CH₂ Pro, CH₂ Far, γ-CH Leu), 2.02 (s, 3H S-CH₃), 2.10 (t, $J = 7.47, 7.47$ Hz, 2H, α-CH₂ MIC), 2.36-2.46 (m, 4H, γ-CH₂ Met, β-CH₂ Pro), 2.55 (t, $J = 7.37, 7.37$ Hz, 2H, α-CH₂ Pal), 2.63 (dd, $J = 13.71, 8.72$ Hz, 1H, β-CH₂ Cys_{Far}), 2.82 (dd, $J = 13.79, 5.18$ Hz, 1H, β-CH₂ Cys_{Far}), 3.05 (dd, $J = 13.45, 8.36$ Hz, 1H, Cys_{Pal}), 3.10-3.18 (m, 2H, α-CH₂ Far), 3.26 (dd, $J = 13.53, 5.24$ Hz, 1H, Cys_{Pal}), 3.37 (t, $J = 7.10, 7.10$ Hz, 1H, NCH₂ MIC), 3.50-3.55 (m, 1H, δ-CH_{2a} Pro), 3.60-3.73 (m, 5H, α-CH₂ Gly, δ-CH_{2b} Pro), 3.64 (s, 3H, O-CH₃), 4.24-4.28 (m, 1H, α-CH Met), 4.30-4.39 (m, 1H, α-CH Pro), 4.40-4.45 (m, 1H,

Experimenteller Teil

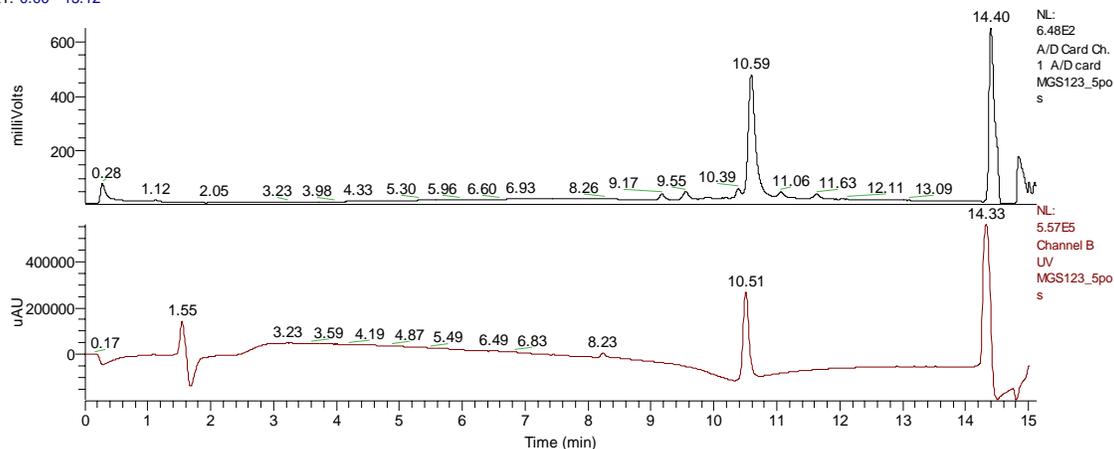
α -CH Cys_{Pal}), 4.45-4.49 (m, 1H, α -CH Cys_{Far}), 4.58 (dd, $J = 13.73, 8.71$ Hz, 1H, α -CH Leu), 5.04-5.08 (m, 2H, CH Far), 5.14 (t, $J = 7.61, 7.61$ Hz, 1H, CH Far), 6.99 (s, 2H, CH=CH MIC), 7.96 (d, $J = 8.13$ Hz, 1H, CONH, Leu), 8.00-8.05 (m, 2H, CHNH Gly), 8.08 (d, $J = 8.05$ Hz, 1H, CONH Cys_{Pal}), 8.15 (d, $J = 7.65$ Hz, 1H, CONH Met), 8.24 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H, CONH Cys_{Far})

MS (ESI) : ber. $[M + H]^+$ 1329.75, gef. 1329.40

MGS123_5pos

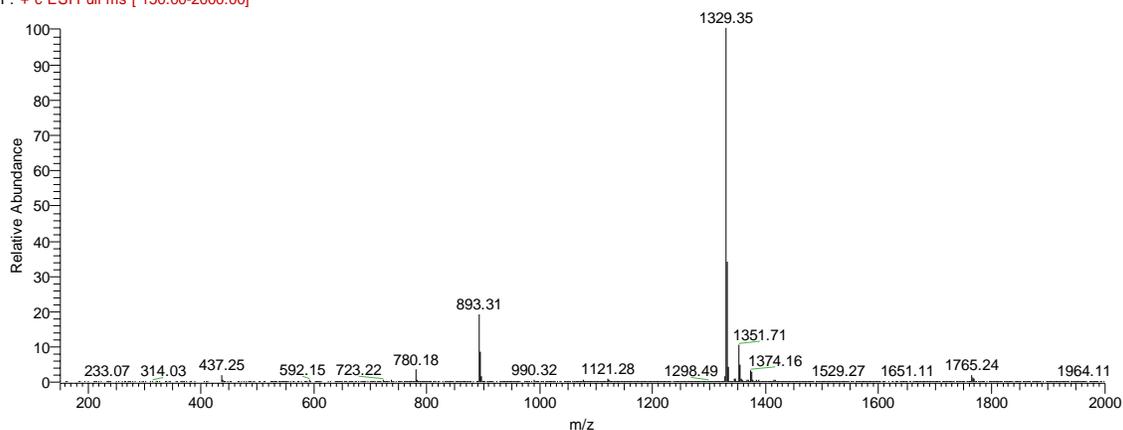
05.06.2007 23:11:24

RT: 0.00 - 15.12



MGS123_5pos #414-421 RT: 10.51-10.68 AV: 8 NL: 1.29E7

F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Gly- Ser- Met-Gly -Leu- Pro- Cys(Far)-OMe (43)

Hierzu werden 350mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Far)-OH (**29**) entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren (einschließlich Fmoc-Ser(Trt)-OH) nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird an den N-Terminus nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt.

Die Entschützung der Trt-Gruppe des Serins erfolgt am Harz mittels DCM/2% TES/ 2% TFA in DCM für jeweils zweimal 30min. Anschließend wird das Harz mehrmals mit DCM gewaschen.

Zuletzt wird das Peptid durch 15.7mg Cu(OAc)₂, 448μL Pyridin und 1.35mL Methanol in 8ml DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels präoperativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.003 g (0.0028 mmol), 5%

$[\alpha]_D^{20} = -33$. (c = 0.95, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 8.05 min

¹H-NMR (500MHz, DMSO): δ = 0.83-0.89 (m, 6H, ω-CH₃ Leu), 1.19 (td, J = 14.96, 7.67, 7.67 Hz, 2H CH₂ MIC), 1.41-1.67 (m, 21H, CH₂ MIC, γ-CH₂ Pro, γ-CH Leu, β-CH₂ Leu, CH₃ Far), 1.81-2.06 (m, 12H, CH₂ Far, CH₂ β-Pro, CH₂ β-Met), 2.02 (s, 3H S-CH₃) 2.10 (t, J = 7.42, 7.42 Hz, 2H, α-CH₂ MIC), 2.37-2.51 (m, 2H, γ-CH₂ Met), 2.66-2.72 (m, 1H, β-CH₂ Cys_{Far}), 2.76-2.81 (m, 1H, β-CH₂ Cys_{Far}), 3.10-3.21(m, 2H, α-CH₂ Far), 3.37 (t, J = 7.10, 7.10 Hz, 1H, NCH₂ MIC), 3.48-3.55 (m, 2H, CH β-Ser, δ-CH_{2b} Pro), 3.61-3.65 (m, 2H, CH β-Ser, δ-CH_{2a} Pro), 3.61 (s, 3H, O-CH₃), 3.68 (d, J = 5.72 Hz, 2H α-CH₂ Gly), 3.72 (d, J = 5.52 Hz, 2H α-CH₂ Gly), 4.27-4.32 (m, 2H, α-CH Ser, α-CH Met), 4.36-4.37 (m, 2H, α-CH Cys, α-CH Pro), 4.57 (dd, J = 12.85, 9.52 Hz, 1H, α-CH Leu), 5.04 (t, J = 5.37, 5.37 Hz, 1H, Ser-OH), 5.01-5.08 (m, 2H CH Far), 5.14-5.21 (m, 1H CH Far), 7.00 (s, 2H, CH=CH MIC), 7.94-7.97 (m, 2H, CONH, Leu, Ser), 8.01 (t, J =

Experimenteller Teil

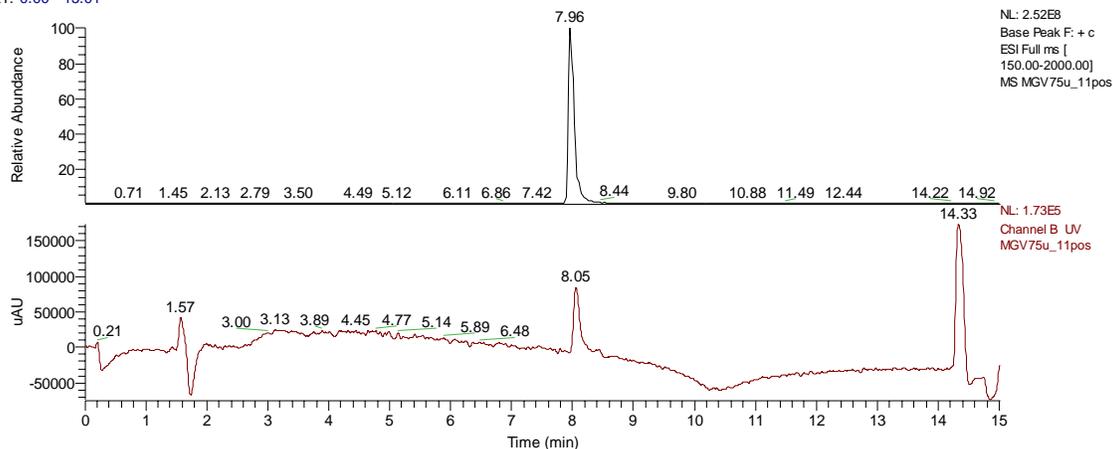
5.69, 5.69 Hz, 1H CONH Gly), 8.09 (d, $J = 7.51$ Hz, 1H CONH Gly), 8.07 (d, $J = 5.67$ Hz, 1H CONH Met), 8.23 (d, $J = 7.19$ Hz, 1H CONH Cys)

MS (ESI) : ber. $[M + H]^+$ 1075.54, gef. 1075.19

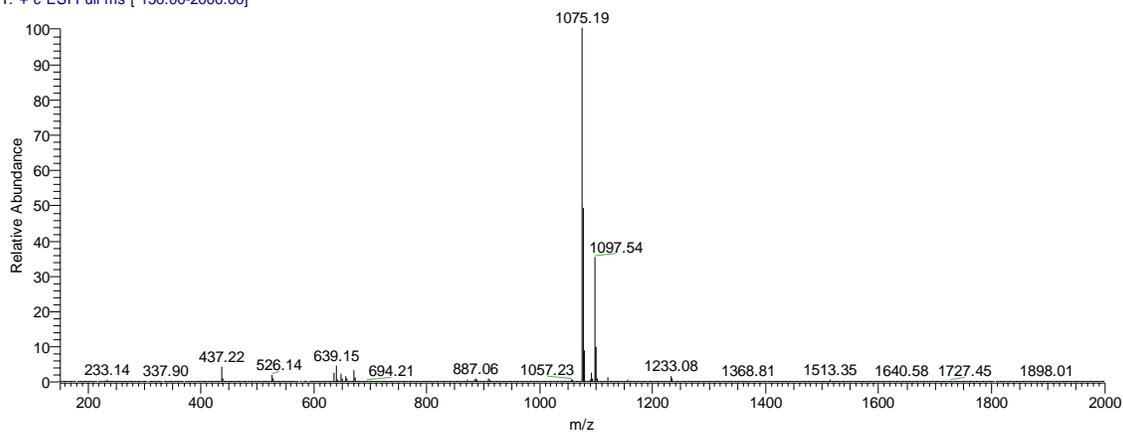
MGV75u_11pos

24.06.2006 03:09:25

RT: 0.00 - 15.01



MGV75u_11pos #306-321 RT: 7.78-8.15 AV: 16 NL: 7.37E7
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (41)

Hierzu werden 370mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-Cys(Far)-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HCTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 und H4, für die Einführung des palmitoylierten

Cysteins, wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 17.8mg Cu(OAc)₂, 510µL Pyridin, 430 µL Essigsäure und 1.54mL Methanol in 8mL DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels präoperativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.015 g (0.011mmol) 6%

[α]_D²⁰ = -31 (c = 0.1, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 10.63 min

¹H-NMR (400MHz, DMSO): δ = 0.83-0.88 (m, 9H, ω -CH₃ Leu, CH₃ Pal), 1.22 (s, 24H, CH₂, Pal, CH₂ MIC), 1.42-1.50 (m, 8H, CH₂ MIC, CH₂ Pal, β -CH₂ Leu), 1.55 (s, 6H, CH₃ Far), 1.61 (s, 3H CH₃ Far), 1.62 (s, 3H CH₃ Far), 1.82-2.06 (m, 13 H, β -CH₂ Met, γ -CH₂ Pro, CH₂ Far, γ -CH Leu), 2.02 (s, 3H S-CH₃), 2.10 (t, J = 7.71, 7.71Hz, 2H, α -CH₂ MIC), 2.40-2.56 (m, 6H, γ -CH₂ Met, β -CH₂ Pro, α -CH₂ Pal), 2.59-2.68 (m, 1H, β -CH₂ Cys_{Far}), 2.82 (dd, J = 13.85, 5.22 Hz, 1H, β -CH₂ Cys_{Far}), 3.02-3.25 (dd, 4H, Cys_{Pal}, α -CH₂ Far, Cys_{Pal}), 3.33 (br, H₂O), 3.48-3.55 (m, 1H, δ -CH_{2a} Pro), 3.60-3.73 (m, 5H, α -CH₂ Gly, δ -CH_{2b} Pro), 3.63 (s, 3H, O-CH₃), 4.23-4.29 (m, 1H, α -CH Met), 4.37-4.52 (m, 3H, α -CH Pro, α -CH Cys_{Pal}, α -CH Cys_{Far}), 4.53-4.61 (m, 1H, α -CH Leu), 5.02-5.08 (m, 2H, CH Far), 5.14 (t, J = 7.76, 7.76 Hz, 1H, CH Far, Isomer 1), 6.98 (s, 2H, CH=CH MIC), 7.94 (d, J = 8.24 Hz, 1H, CONH, Leu), 7.98-8.08 (m, 2H, CHNH Gly, CONH Cys_{Pal}), 8.14 (d, J = 7.76 Hz, 1H, CONH Met), 8.22 (d, J = 8.42 Hz, 1H, CONH Cys_{Far})

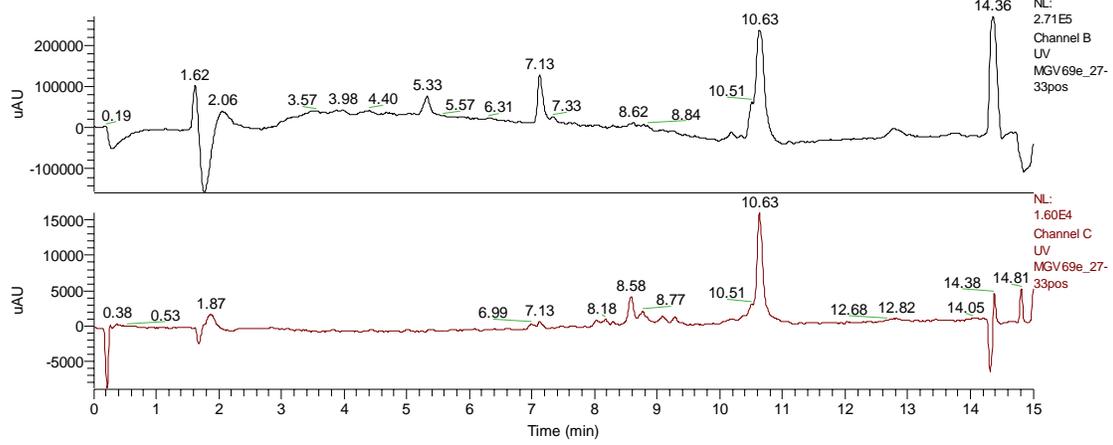
MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1329.75, gef. 1329.19

Experimenteller Teil

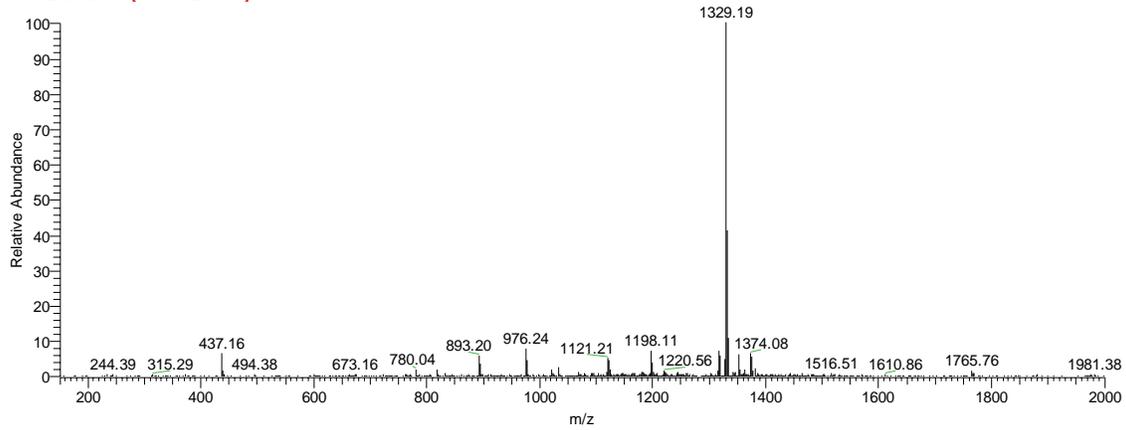
MGV69e_27-33pos

09.05.2006 23:17:11

RT: 0.00 - 15.00



MGV69e_27-33pos #408-422 RT: 10.38-10.73 AV: 15 NL: 7.51E5
F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Gly-Cys(StBu)- Met-Gly -Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (42)

Hierzu werden 400mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Far)-OH (**29**) entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 14.5mg Cu(OAc)₂, 456µL Pyridin und 1.40mL Methanol in 5ml DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels präoperativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.011 g (0.0093 mmol), 31%

$[\alpha]_D^{20} = 47.2$ (c = 0.25, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 8.99 min

¹H-NMR (500MHz, DMSO): δ = 0.88 (t, J = 6.84, 6.84 Hz, 6H, ω-CH₃ Leu), 1.17-1.23 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.28 (s, 9H S-C(CH₃)₃), 1.42-1.55 (m, 6H, CH₂ MIC, β-CH₂ Leu), 1.55 (s, 6H, CH₃ Far), 1.62 (s, 6H, CH₃ Far), 1.82-2.06 (m, 15H, CH₂ Far, CH₂ β-Pro, CH₂ β- Met, CH₂ γ -Pro, γ-CH Leu), 2.02 (s, 3H, S-CH₃), 2.11 (t, J = 7.51, 7.51 Hz, 2H, α-CH₂ MIC), 2.37-2.47 (m, 2H, γ-CH₂ Met), 2.78 (dd, J = 13.74, 5.79 Hz, 1H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.68 (dd, J = 13.73, 7.82 Hz, 1H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.95 (dd, J = 13.07, 8.80 Hz, 1H β-CH₂ Cys_{StBu}), 3.11-3.22(m, 3H, β-CH₂ Cys_{StBu}, α-CH₂ Far), 3.37 (t, J = 7.15, 7.15 Hz, 2H NCH₂ MIC), 3.48-3.54(m, 1H, δ-CH_{2b} Pro), 3.60-3.66 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro), 3.62 (s, 3H, O-CH₃), 3.69 (s,br, 2H, α-CH₂ Gly), 3.72 (s, br, 2H α-CH₂ Gly), 4.25-4.28 (m, 1H, α-CH Met), 4.36-4.40 (m, 2H, α-CH Pro, α-CH Cys_{Far}), 4.47-4.52 (m, α-CH Cys_{StBu}), 4.50-4.60 (m, α-CH Leu), 5.04-5.09 (m, 2H CH Far), 5.16 (t, J = 7.86, 7.86 Hz, 1H, CH Far), 6.99 (s. 2H, CH=CH MIC), 7.93-7.99(m, 2H, CONH, Leu Gly), 8.07 (t, J = 5.19, 5.19 Hz, 1H CONH Gly), 8.12 (d, J = 7.96 Hz, 1H CONH Met), 8.19-8.22 (m, 2H CONH, Cys_{Far}, Cys_{StBu})

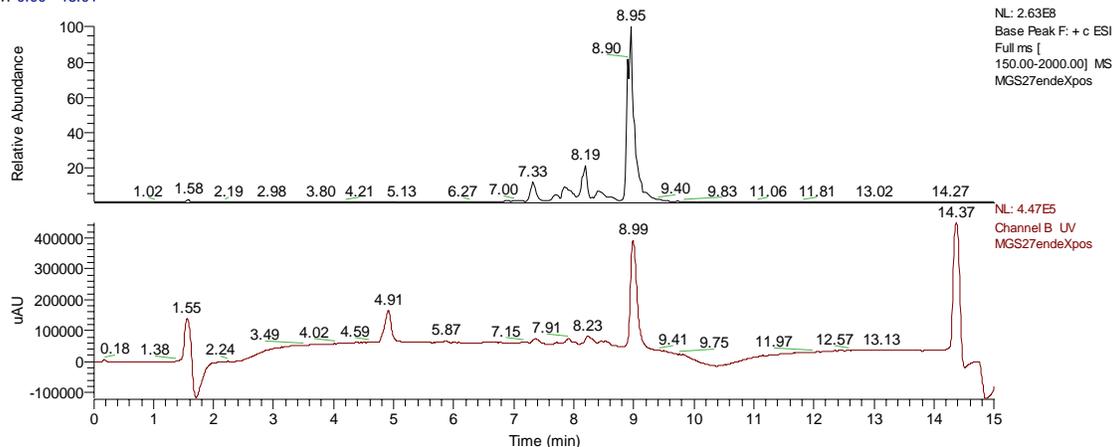
MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1179.56, gef. 1179.13, [M + Na]⁺ 1202.56, gef. 1202.47

Experimenteller Teil

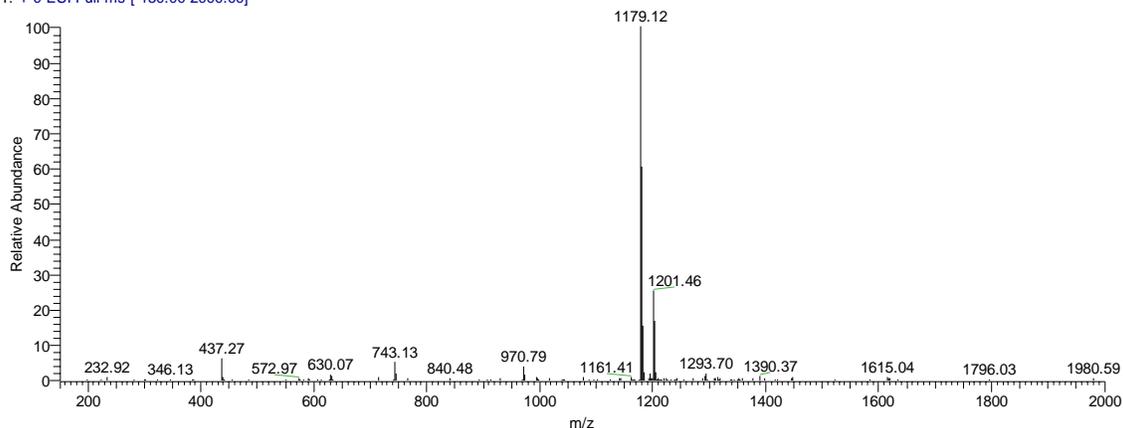
MGS27endeXpos

01.02.2006 02:49:53

RT: 0.00 - 15.01



MGS27endeXpos #357 RT: 8.99 AV: 1 NL: 1.29E8
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Leu-Cys(StBu)- Met-Gly -Leu- Pro- Cys(Far)-OMe (46)

Hierzu werden 260mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Far)-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 13.5mg $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 370 μL Pyridin und 1.16mL Methanol in 8mL DCM (Arbeitsvorschrift H7)

abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 5%)

Ausbeute: 0.021 g (0.017 mmol), 29%

$[\alpha]_D^{20} = -27$ (c = 0.1, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 9.36 min

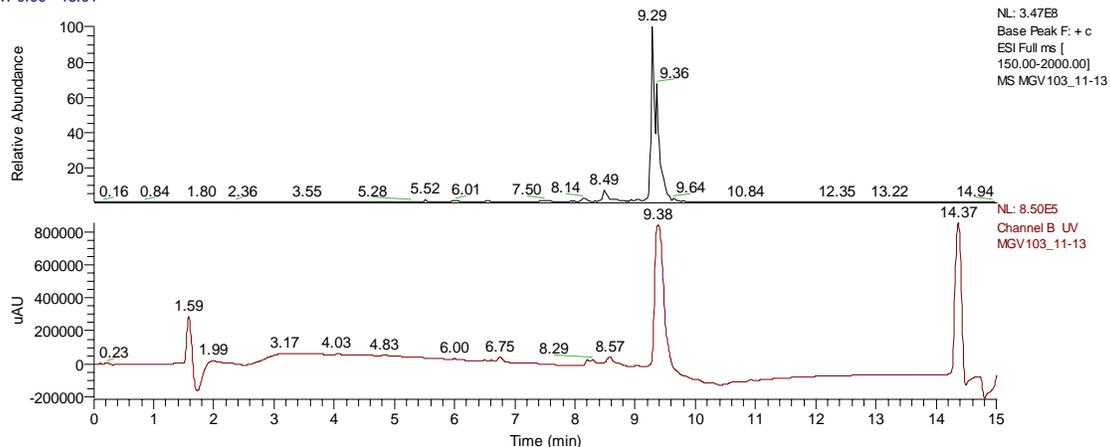
¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ=0.83-0.89 (m, 6H, ω-CH₃ Leu), 0.94 (d, J = 4.71 Hz, 3H ω-CH₃ Leu), 0.93 (d, J = 4.73 Hz, 3H ω-CH₃ Leu), 1.20-1.28 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.32 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.42-1.48 (m, 4H, β-CH₂ Leu), 1.55-1.81 (m, 6H CH₂ MIC, γ-Leu), 1.65(s, 6H, CH₃ Far), 1.67 (s, 6H, CH₃ Far), 1.95-2.12 (m, 14H, CH₂ Far, CH₂ β-Pro, CH₂ β-Met, CH₂ γ-Pro), 2.08 (s, 3H, S-CH₃), 2.22 (t, J = 7.50, 7.50 Hz, 2H, α-CH₂ MIC), 2.30-2.40 (m, 2H, γ-Met), 2.56 (dd, J = 13.48, 7.65 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.65 (dd, J = 13.33, 7.49 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.63 (dd, J = 15.40, 8.17 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.74 (dd, J = 13.55, 6.67 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{Far}), 2.93-3.19 (m, 4H β-CH₂ Cys_{StBu}, α-CH₂ Far), 3.51 (t, J = 7.11, 7.11 Hz, 2H NCH₂ MIC), 3.58-3.63 (m, 2H δ-CH₂ Pro), 3.74 (s, 3H, O-CH₃), 3.92 (br, 2H, α-CH₂ Gly), 4.25-4.34 (m, 2H, α-CH Met, α-CH Pro), 4.57-4.59 (m, 1H, α-CH Cys_{Far}), 4.57-4.59 (m, 1H, Cys_{StBu}), 4.71-4.76 (m, 2H α-CH₂ Leu), 5.06-5.10 (m, 2H CH Far), 5.16 (t, J = 7.49, 7.49 Hz, 1H CH Far), 6.69(s, 2H CH=CH MIC), 6.73 (br, NH), 7.42 (br, NH), 7.61 (br, NH), 7.51 (d, J = 6.76 Hz, NH), 8.07 (d, J = 6.58 Hz, NH)

MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1235.62, gef. 1235.07

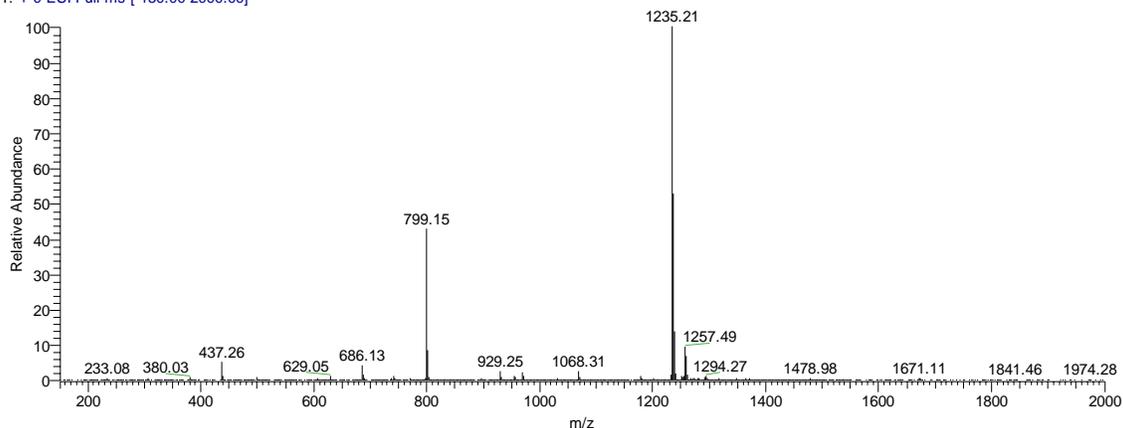
MGV103_11-13

27.11.2006 18:05:27

RT: 0.00 - 15.01



MGV103_11-13 #361-376 RT: 9.17-9.52 AV: 16 NL: 1.02E8
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



Mic-Gly-D-Cys(StBu)-D-Met-Gly-D-Leu-D-Pro-D-Cys(Far)-OMe (44)

Hierzu werden 260 mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Far)-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 10.3mg Cu(OAc)₂, 292µL Pyridin und 0.885mL Methanol in 5mL DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 0.010 g (0.0084 mmol), 12%

$[\alpha]_D^{20} = 47.2$ (c = 0.25, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 8.88 min

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃/CD₃OD): δ = 0.95 (t, J = 6.85, 6.85 Hz, 6H ω-CH₃ Leu), 1.29-1.39 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.32 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.55-1.80 (m, 6H, β-CH₂ Leu, CH₂ MIC), 1.58 (s, 6H, CH₃ Far), 1.65 (s, 3H, CH₃ Far), 1.67 (s, 3H, CH₃ Far), 1.93-2.14 (m, 14H CH₂ Far, CH₂ β-Pro, CH₂ β-Met, CH₂ γ-Pro), 2.07 (s, 3H S-CH₃), 2.24 (t, J = 7.30, 7.30 Hz, 2H, α-CH₂ MIC), 2.49-2.76 (m, 4H, β-CH₂ Cys_{Far}, CH₂ γ-Met), 2.92 (dd, J = 13.81, 4.98 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{StBu}), 3.00 (dd, J = 13.46, 7.01 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{StBu}), 3.08-3.14 (m, 2.5H, β-CH₂ Cys_{StBu}, α-CH₂ Far), 3.21 (dd, J = 13.23, 8.30 Hz, 0.5H β-CH₂ Cys_{StBu}), 3.49 (t, J = 7.06, 7.06 Hz, 2H NCH₂ MIC), 3.61 3.66 (m, 2H δ-CH₂ Pro), 3.73 (s, 3H, O-CH₃), 3.82-3.97 (m, 4H, α-CH₂ Gly), 4.20-4.26 (m, 1H α-CH Pro, α-CH Met), 4.52-4.55 (m, 1H α-CH Cys_{Far}), 4.56-4.60 (m, 1H α-CH Cys_{StBu}), 4.60-4.67 (m, 1H α-CH Leu), 5.04-5.05 (m, 2H CH Far), 5.19 (t, J = 7.77, 7.77 Hz, 1H CH Far), 6.76 (s, 2H CH=CH MIC), 7.71 (br, NH), 7.95 (br, NH), 8.06 (m, NH), 8.35 (d, J = 7.94 Hz, NH), 8.53 (d, J = 6.43 Hz, NH)

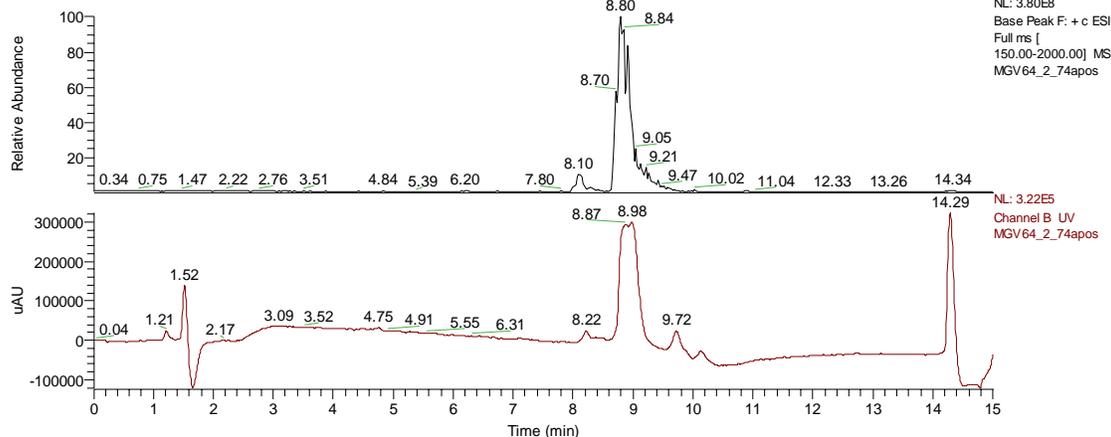
MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1179.56, gef. 1179.19

Experimenteller Teil

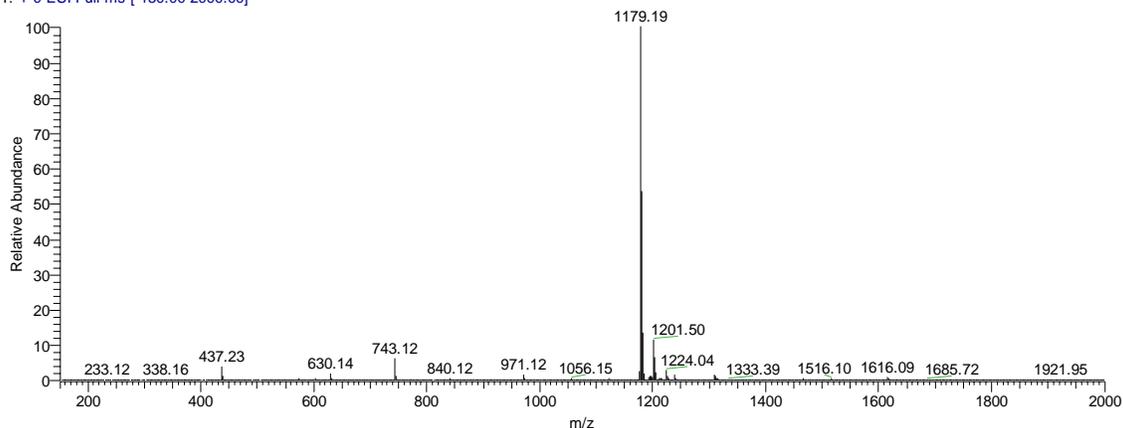
MGV64_2_74apos

30.03.2006 18:50:19

RT: 0.00 - 15.01



MGV64_2_74apos #332-368 RT: 8.51-9.35 AV: 37 NL: 1.19E8
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Gly- Pen(Pal)- Met-Gly -Leu- Pro- Cys(Far)-OMe (47)

Hierzu werden 350mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Far)-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HCTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 und H4, für die Einführung des palmitoylierten Cysteinderivates, wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird das N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 16.0mg Cu(OAc)₂, 410µL Pyridin, 500µL

Experimenteller Teil

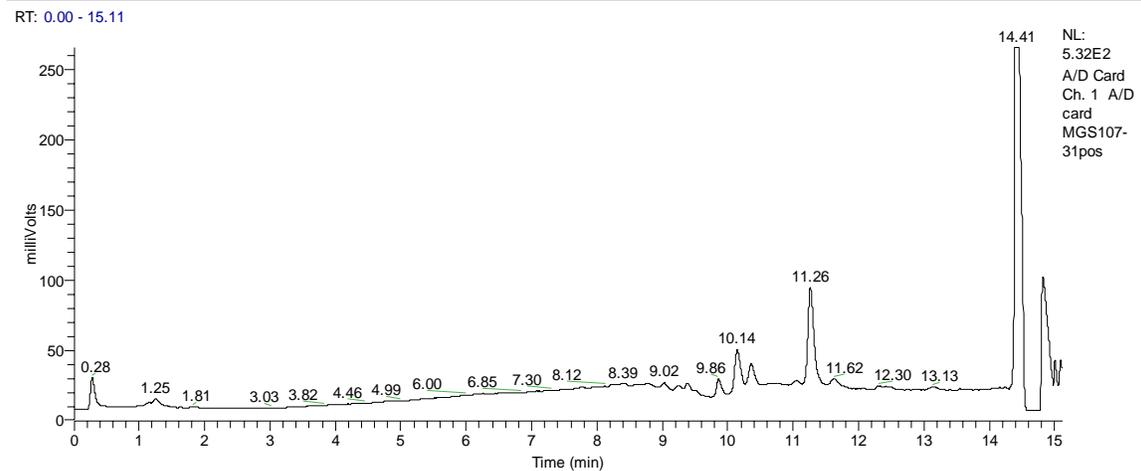
Essigsäure und 1.42mL Methanol in 8mL DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird mittels säulenchromatographisch aufgereinigt. (CHCl₃/HCOOH/MeOH/Isopropanol: 100:5:0.5:3).

Da das Peptid schon nach der Abspaltung stark verschmutzt war, konnte durch die Aufreinigung kein komplett aufgereinigtes Peptid erhalten werden. Am Ende wurden 0.8 mg des Peptides zur Ligation benutzt, die Aufgrund der nachfolgenden Analytik als erfolgreich angesehen werden konnte.

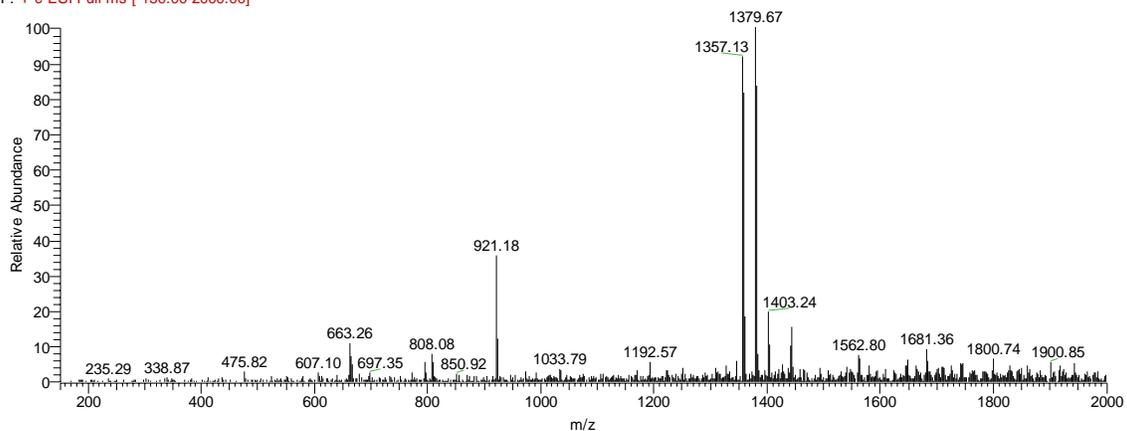
HPLC (C4): R_f = 11.26 min

MGS107-31pos

20.03.2007 15:09:31



MGS107-31pos #428-435 RT: 11.12-11.30 AV: 8 NL: 3.17E5
F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC-Gly- Cys(StBu)- Met-Gly -Leu- Pro- Cys(GerBP)-OMe (8)

Hierzu werden 350 mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Ger-BP)-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird das N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die MIC-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 15.7 mg Cu(OAc)₂, 448 µl Pyridin und 1.35 ml Methanol in 8 ml DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 5%).

Ausbeute: 0.075 g (0.057 mmol), 40%

HPLC (C4): R_f = 8.32 min

¹H-NMR (600MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (t, *J* = 7.28, 7.28 Hz, 6H ω-CH₃ Leu), 1.16-1.20(m, 2H, CH₂ MIC), 1.27 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.42-1.51 (m, 6H, CH₂ MIC, β-CH₂ Leu), 1.57-1.61 (m, 1H, γ-Leu), 1.63 (s, 3H, CH₃ Ger), 1.68 (s, 3H, CH₃ Ger), 1.86-1.96 (4H, CH₂ β-Met, CH₂ β-Pro), 2.01 (s, 3H, S-CH₃), 2.03-2.18 (m, 6H, CH₂ MIC, CH₂ Ger), 2.34-2.46 (m, 4H, CH₂ γ-Met, CH₂ γ-Pro), 2.69 (dd, *J* = 13.81, 7.89 Hz, 1H, β-CH₂ Cys_{Ger}), 2.78 (dd, *J* = 13.77, 5.75 Hz, β-CH₂ Cys_{Ger}), 2.95 (dd, *J* = 13.04, 8.80 Hz, 1H, β-CH₂ Cys_{StBu}), 3.10-3.23 (m, 3H, β-CH₂ Cys_{StBu}, α-CH₂ Ger), 3.37 (t, *J* = 7.10, 7.10 Hz, 2H NCH₂ MIC), 3.48-3.52 (m, 1H, δ-CH Pro), 3.61 (s, 3H, O-CH₃), 3.63-3.76 (m, 5H, α-CH₂ Gly, δ-CH Pro), 4.25-4.29 (m, 1H, α-CH Met), 4.36-4.41 (m, 2H, α-CH Cys(BP), α-CH Pro), 4.48-4.50 (m, 1H, α-CH Cys_{StBu}), 4.49(s, 2H, BP-O-Ger), (4.54-4.59 (m, 1H, α-CH Leu), 5.17 (t, *J* = 7.49, 7.49 Hz, 1H, CH Ger), 5.55 (t, *J* = 6.71, 6.71 Hz, 1H CH Ger), 6.99 ((s, 2H CH=CH MIC), 7.08 (d, *J* = 8.84 Hz, 2H, BP), 7.55 (t, *J* = 7.57, 7.57 Hz, 2H, BP), 7.64 (d, *J* = 7.41 Hz, 2H, BP), 7.67-7.68 (m, 2H, BP), 7.73 (d, *J* = 8.81 Hz, 1C), 7.93- 7.97 (m, 2H, NH Gly, NH Leu), 8.07 (t, *J* = 5.65, 5.65 Hz, 1H, NH Gly), 8.11 (d, *J* = 7.82 Hz, 1H, NH Met), 8.22-8.22 (m, 2H, NH Cys)

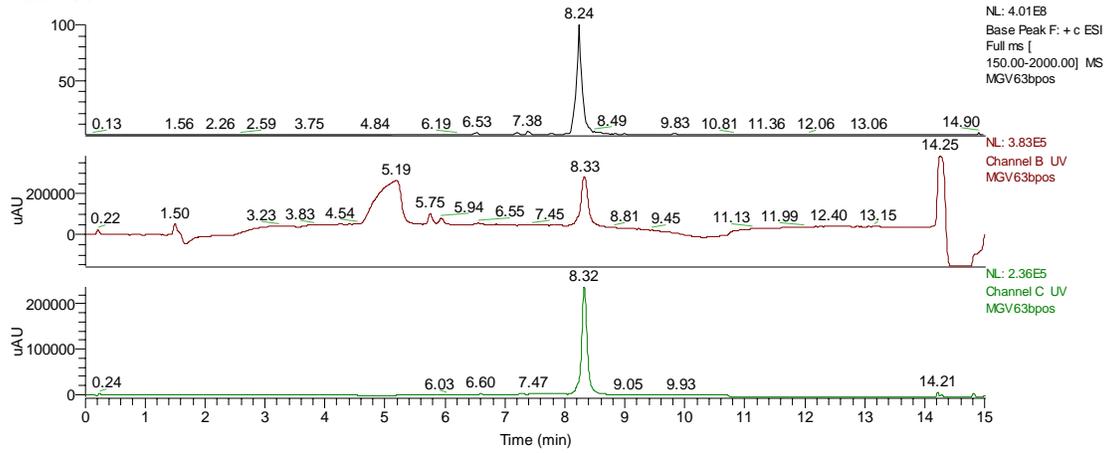
MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1307.55, gef. 1307.13

Experimenteller Teil

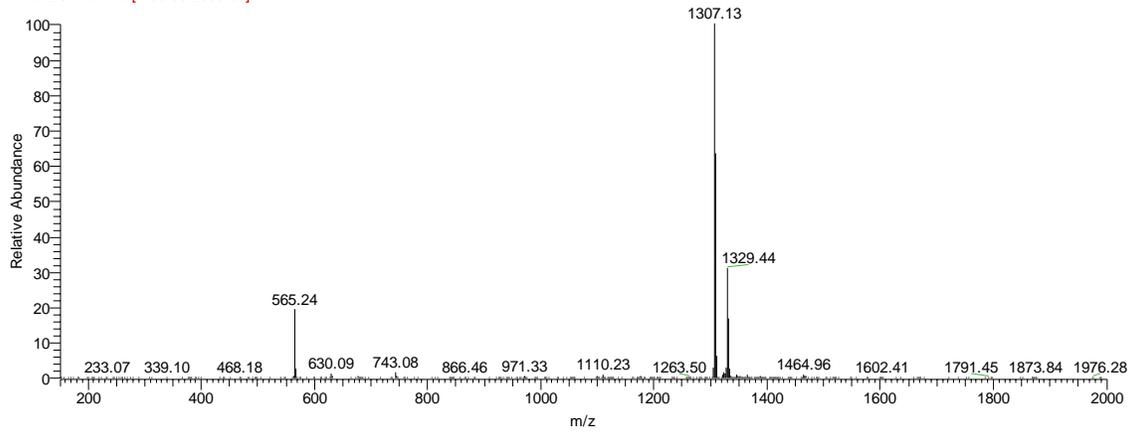
C:\Documents and Settings\...MGV63bpos

08.02.2006 08:38:34

RT: 0.00 - 15.01



MGV63bpos #318-321 RT: 8.15-8.21 AV: 4 NL: 1.74E8
F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



Desthiobiotin-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(GerBP)-OMe (9)

Hierzu werden 260 mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschriften H1 gequollen und mit 3eq Fmoc-L-Cys(Ger-BP)-OH (**18**) entsprechend der Arbeitsvorschrift H2 mit HBTU/HOBt an dem Harz immobilisiert und die Fmoc-Gruppe entfernt. Nach Ankupplung von Carbonsäuren nach Arbeitsvorschrift H3 wird das Peptid um die entsprechenden Komponenten verlängert. Anschließend wird N-terminal nach Arbeitsvorschrift H6 die Desthiobiotin-Gruppe gekuppelt. Zuletzt wird das Peptid durch 13.5mg Cu(OAc)₂, 370µL Pyridin und 1.15mL Methanol in 8 mL DCM (Arbeitsvorschrift H7) abgespalten und aufgearbeitet. Das Peptid wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 5%)

Ausbeute: 0.023 g (0.016 mmol), 40%

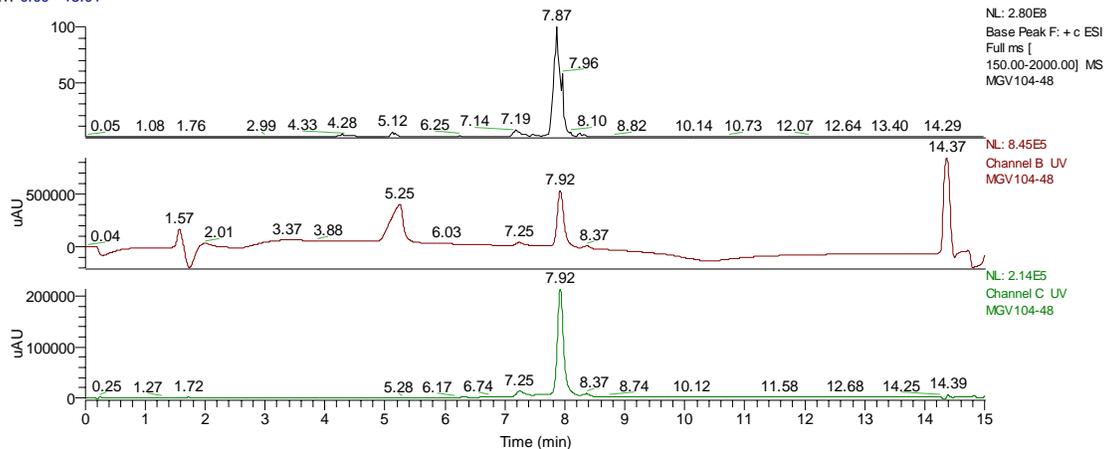
$[\alpha]_D^{20} = -41.7$ (c = 0.23 CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 8.32 min

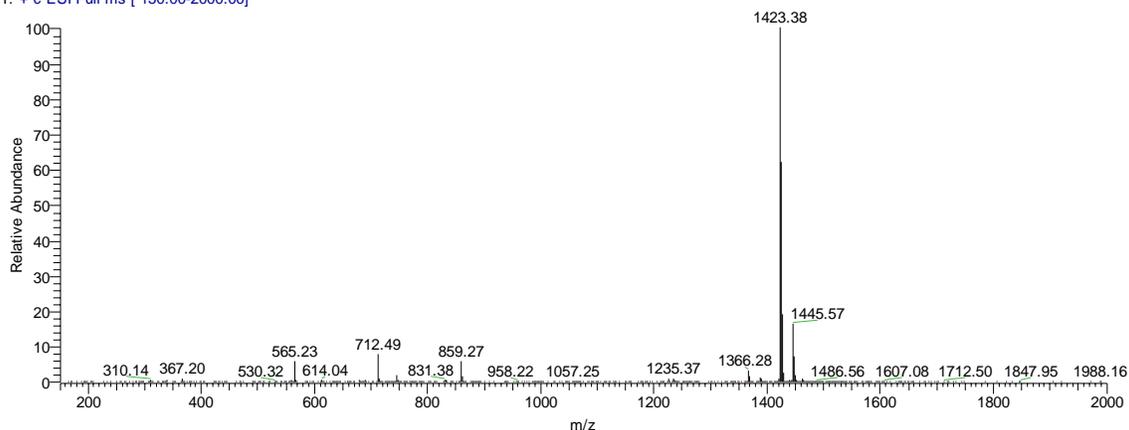
¹H-NMR (600MHz, CDCl₃): δ = 0.85 (t, J = 6.46, 6.46 Hz, 6H ω-CH₃ Leu), 0.93 (d, J = 6.38 Hz, 2H, CH₂CONH Desthiobiotin), 1.26 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.40-1.50 (m, 2H, -CH₂ Leu), 1.56-1.62 (m, 1H, γ-Leu), 1.62 (s, 3H, CH₃ Ger), 1.66 (s, 3H, CH₃ Ger), 1.79-1.95 (4H, CH₂ β-Met, CH₂ β-Pro), 1.97-2.08 (m, 8H, CH₂ Ger, CH₂ Desthiobiotin), 2.00 (s, 3H, S-CH₃), 2.34-2.44 (m, 4H CH₂ γ-Met, CH₂ γ-Pro), 2.64-2.79 (m, 2H, β-CH₂ Cys_{Ger}), 2.90-3.00 (m, 3H, β-CH Cys_{StBu}, NH-CH₂ Desthiobiotin), 3.08-3.19 (m, 3H, β-CH Cys_{StBu}, α-CH₂ Ger), 3.40-3.72 (m, 6H, α-CH₂ Gly, δ-CH₂ Pro), 3.59 (s, 3H, O-CH₃), 4.22-4.38 (m, 3H, α-CH Met, α-CH Pro, α-CH Cys(BP), 4.46-4.59 (m, 2H, α-CH Cys(StBu), α-CH Leu), 4.50 (s, 2H, 2H, BP-O-Ger), 5.16 (t, J = 7.57, 7.57 Hz, 1H, CH Ger), 5.53 (t, J = 6.83, 6.83 Hz, 1H, CH Ger), 7.05-7.07 (m, 1.7H, BP Konformer), 7.12-7.25 (m, 0.3H, BP Konformer), 7.51-7.72 (m, 7H, BP), 7.93-7.97 (m, 1NH), 8.04-8.11 (m, 2NH), 8.19-8.22 (m, 2NH)

MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 1423.68, gef. 1423.33

RT: 0.00 - 15.01



MGV104-48 #311-317 RT: 7.87-8.00 AV: 7 NL: 1.50E8
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



MIC- β -Gly- β -Cys(StBu)- β -Met- β -Gly - β -Leu- β -Pro-OH (58)

Hierzu werden 505 mg Harz verwendet und mittels der Arbeitsvorschrift TG1 gequollen und mit 3eq Fmoc- β -Pro-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift TG1 mit DIC und DMAP an dem Harz immobilisiert. Nach dem Capping (TG1) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens der Fmoc-Schutzgruppe entsprechend Arbeitsvorschrift TG2 und Ankupplung der Carbonsäuren nach TG2 die entsprechende Sequenz aufgebaut. Anschließend wird ,entsprechend der Arbeitsvorschrift TG4, das Peptid abgespalten.

Ausbeute: 0.020 g (0.020 mmol), 20%

$[\alpha]_D^{20} = 3.7$ (c = 0.7, CHCl₃)

HPLC (C4): R_f = 6.32 min

¹H-NMR (600MHz, DMSO): δ = 0.84 (d, *J* = 6.73 Hz, 3H ω-CH₃ Leu), 0.82 (d, *J* = 6.50 Hz, 3H ω-CH₃ Leu), 1.14-1.19 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.22-1.28 (m, 1H, CH β-Leu), 1.26 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.31-1.37 (m, 1H, CH β-Leu), 1.43-1.48 (m, 4H, CH₂ MIC), 1.52-1.60 (m, 2H, CH γ-Leu, CH β-Met), 1.64-1.69 (m, 2H, CH β-Met, CH β-Pro), 1.79-1.86 (m, 1H, CH γ-Pro), 1.87-1.94 (m, 2H, CH β-Pro, CH γ-Pro), 2.00-2.02 (m, 2H, α-CH₂ MIC), 2.00 (s, 3H S-CH₃), 2.14 (dd, *J* = 15.66, 10.35 Hz, 1H, β²-Pro), 2.16-2.24 (m, 7H, β²-Gly, β²-Leu, γ-Met), 2.25-2.35 (m, 3H, β²-Met, β²-Cys), 2.37-2.45 (m, 2H, β²-Leu, β²-Met), 2.73 (dd, *J* = 15.60, 3.26 Hz, 1H, β²-Pro), 2.88 (d, *J* = 6.49 Hz, 2H, β-Cys), 3.11-3.28 (m, 4H, α-CH₂Gly), 3.37 (t, *J* = 7.13, 7.13 Hz, 2H, NCH₂ MIC), 3.37-3.39 (m, 1H, δ-CH Pro), 3.47-3.49 (m, δ-CH Pro), 4.04-4.05 (m, 1H, α-CH Met), 4.12-4.14 (m, 2H, α-CH Pro, α-CH Leu), 4.20-4.25 (m, 1H, α-CH Cys), 6.99 (s, 2H, CH=CH MIC), 7.66-7.68 (m, NH, Leu), 7.71-7.73 (m, NH Gly), 7.74-7.76 (m, NH Met), 7.82-7.89 (m, NH, Cys, Gly)

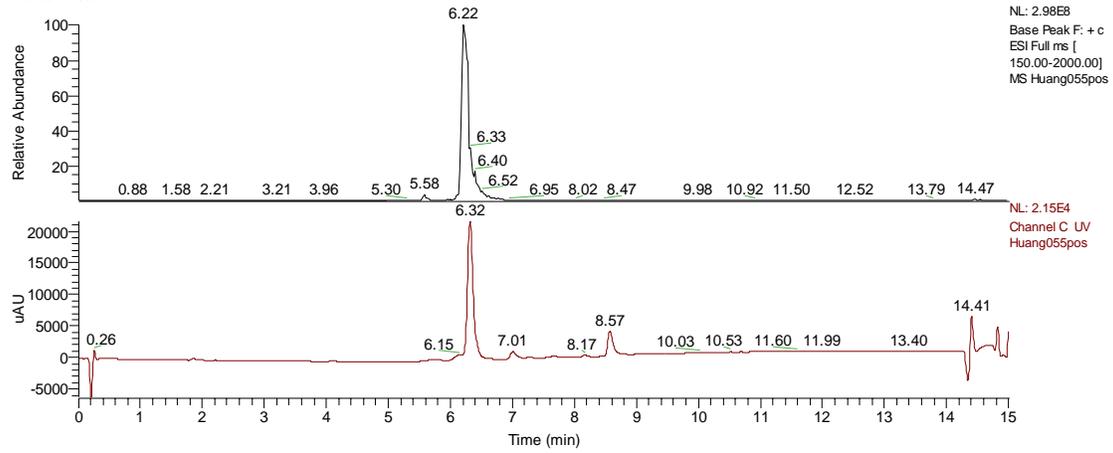
MS (ESI) : ber. [M + H]⁺ 942.44, gef. 942.37

Experimenteller Teil

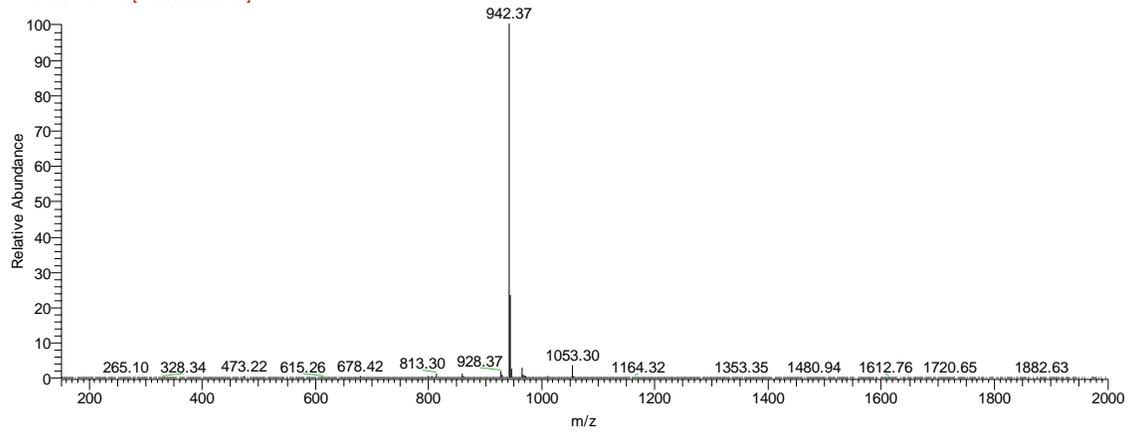
Huang055pos

19.08.2006 17:20:36

RT: 0.00 - 15.01



Huang055pos #242-253 RT: 6.05-6.31 AV: 12 NL: 1.29E8
F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



Mic-β-Gly- β-Cys(StBu)- β-Met-β-Gly –β-Leu- β-Pro-β-Cys(Far)-OMe (58A)

Es werden 18mg des β-Peptids **58** in 1.3mL DCM gelöst. Nach der Zugabe von 3.2μL (1.15eq) Triethylamin wird die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wird 3.2μL (1.15eq.) Isobutylchloroformiat in 300μL DCM gelöst und zu der Lösung gegeben. Zuletzt erfolgt der Zusatz des farnesylierten β-Cysteins **54**, gelöst in 300μL DCM, und nochmals 3.2μL (1.15eq.) Triethylamin. Innerhalb von 5min wird die Reaktionsmischung auf RT gebracht und für weitere 4h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Entfernen des Lösungsmittels auf der präparativen HPLC (Agilent Series 1100/LC/MSD VL (ESI) and a VP 125/21 Nucleodur C4 Gravity column), indem es in Acetonitril/Dichlormethan (3:1) gelöst und anschließend auf die Säule gegeben wurde. (Gradient: 60-100% Acetonitril (0-30min))

Ausbeute: 0.06. g (0.005 mmol), 25%

$[\alpha]_D^{20} = -18.0$ (c = 0.05, CHCl₃)

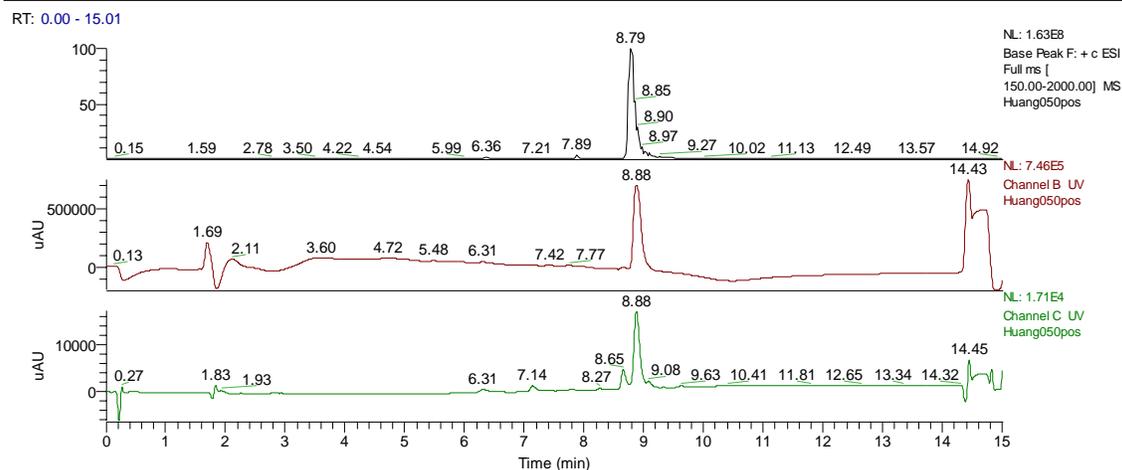
HPLC (C4): R_f = 8.88 min

¹**H-NMR** (600MHz, DMSO): δ = 0.81-0.84 (m, 6H ω-CH₃ Leu), 1.14-1.19 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.22-1.28 (m, 1H, CH β-Leu), 1.26 (s, 9H, S-C(CH₃)₃), 1.31-1.37 (m, 1H, CH β-Leu), 1.43-1.48 (m, 4H, CH₂ MIC), 1.55 (s, 6H CH₃ Far), 1.55-1.60 (m, 2H, CH γ-Leu, CH β-Met), 1.62 (s, 3H CH₃ Far), 1.63 (s, 3H CH₃ Far), 1.65-1.72 (m, 1H, CH β-Met, CH β-Pro), 1.77-1.89 (m, 1H, CH γ-Pro), 1.91-1.93 (m, 2H CH β-Pro, CH γ-Pro), 1.97-2.06 (m, 10H, CH₂ MIC, CH₂Far), 2.07 (s, 3H, S-CH₃), 2.15-2.21 (m, 7H, β²-Gly, β²-Leu, γ-Met), 2.23-2.46 (m, 6H, β²-Met, β²-Cys, β²-Leu, β²-Pro), 2.52-2.62 (m, 3H β-Cys_{Far}, β²-Pro), 2.88 (d, J = 6.46 Hz, 2H, Cys_(Stbu)), 3.14 (d, J = 7.73 Hz, 2H, α-CH₂ Far), 3.16-3.24 (m, 4H, α-CH₂ Gly), 3.35-3.37 (m, 1H, δ-CH Pro), 3.37 (2H NCH₂ MIC), 3.46-3.49 (m, 1H, δ-CH Pro), 3.57 (s, 3H, OCH₃, konformer A), 3.57 (s, 3H, OCH₃, konformer B), 4.03-4.05 (m, 1H, α-CH Met), 4.11-4.13 (m, 1H, α-CH Leu), 4.15-4.24 (m, 3H, α-CH Cys_(StBu), α-CH Pro, α-CH-Cys_{Far}), 5.04-5.08 (m, 2H, CH Far), 5.16 (t, J = 7.66, 7.66 Hz, 1H CH Far), 6.99 (s, 2H CH=CH MIC), 7.66-7.69 (m NH Leu), 7.71-7.73 (m NH Gly), 7.74-7.77 (m NH Met), 7.82-7.90 (m, NH, Cys_{StBu}, Cys_{Far}, Gly)

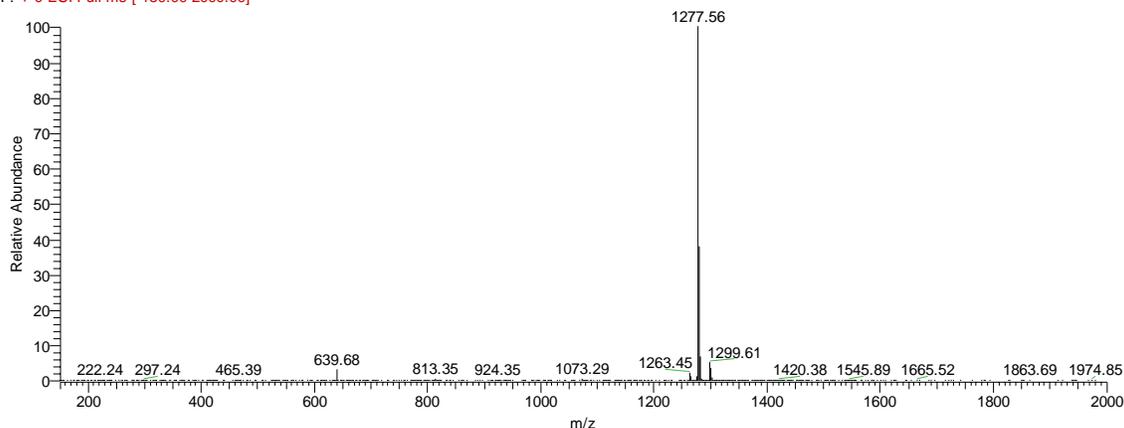
MS (HRMS) : ber. $[M + H]^+$ 1277.6707, gef. 1277.6792

Huang050pos

17.08.2006 20:20:02



Huang050pos #352-361 RT: 8.74-8.95 AV: 10 NL: 8.46E7
 F: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



Mic- β -Gly- β -Cys(Pal)- β -Met- β -Gly - β -Leu- β -Pro- β -Cys(Far)-OMe (61)

Zuerst werden 500 mg Harz verwendet, mittels Arbeitsvorschrift TG1 gequollen und mit 3eq Fmoc- β -Pro-OH entsprechend der Arbeitsvorschrift TG1 mit DIC und DMAP an dem Harz immobilisiert. Nach dem Capping (TG1) wird durch repetitive Schritte des Abspaltens der Fmoc-Schutzgruppe entsprechend Arbeitsvorschrift TG2 und Ankupplung der Carbonsäuren nach TG2 die Sequenz bis zum zweiten β -Alanin (Abbildung 100) aufgebaut. Es erfolgt die Entschützung und Palmitoylierung des Cysteins gemäß

Arbeitsvorschrift TG3. Die Sequenz wird N-terminal um die MIC-Gruppe verlängert (TG3). Anschließend wird das Peptid entsprechend TG4 abgespalten und aufgereinigt. Das β -Pal Peptid **60** (20.5mg) wird in 4ml DCM und 1.8 ml DMSO gelöst. Das β -Cysteinderivat **54** (β -Cystein(Far)-OMe) wird in 350 μ l DCM gelöst. Es werden 3.044 mg HOBt in 100 μ l DCM und 100 μ l DMF gelöst. EDC x HCl und TEA werden in jeweils 200 μ l DCM gelöst. Danach wird zum β -Peptid zuerst EDC, dann HOBt und TEA gegeben und 5 min voraktiviert. Anschließend erfolgt die Zugabe von β -Cystein(Far)-OMe (7.29mg) und es wird über Nacht inkubiert in Schüttelreaktor. Nach dem Entfernen des Lösungsmittles wird das Peptid in 200 μ l DCM/Trifluoethanol (9:1) gelöst und mit Acetonitril auf 900 μ l aufgefüllt. Die Aufreinigung erfolgt über die präparative HPLC (C4 –Säule) und einem Gradienten von 60-100% Acetonitril (0-30min).

Ausbeute: 0.09. g (0.0065 mmol), 35%

$[\alpha]_D^{20} = 2.70$ (c = 0.37, CHCl₃)

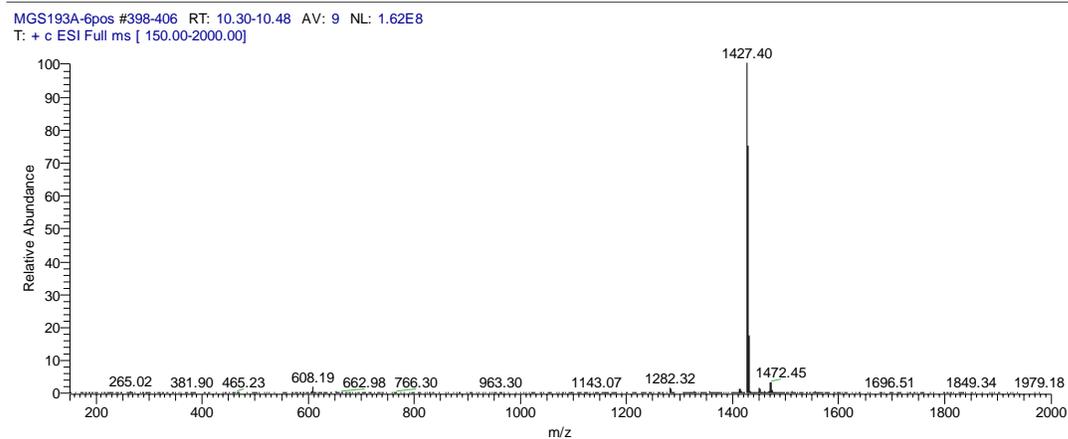
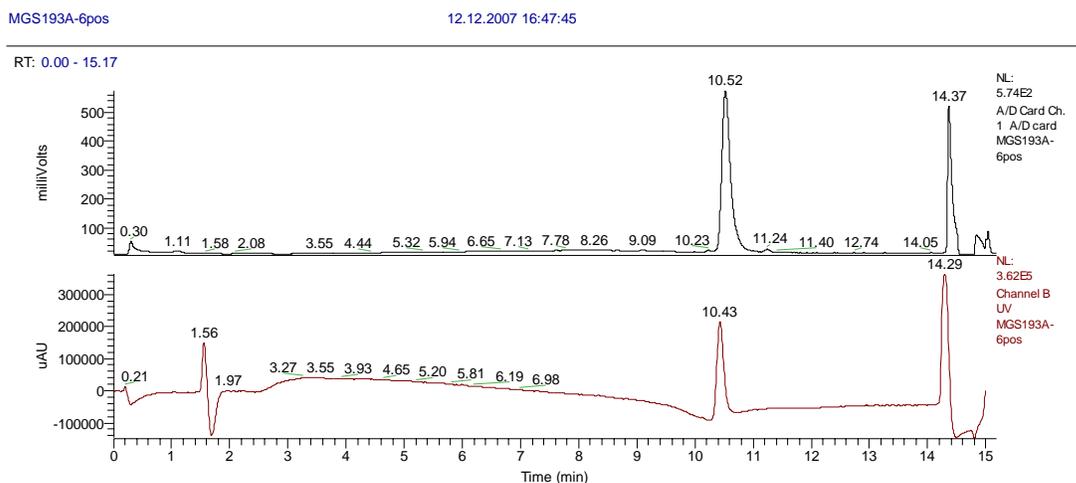
HPLC (C4): R_f = 10.43 min

¹H-NMR (600MHz, DMSO): $\delta =$ 0.81-0.85 (m, 9H ω -CH₃ Leu, CH₃ Pal), 1.14-1.19 (m, 2H, CH₂ MIC), 1.22 (br, 27H, CH₂ Pal, CH₂ MIC, β -CH Leu), 1.30-1.35 (m, 1H, β -CH Leu), 1.43-1.49 (m, 4H, CH₂ MIC), 1.50-1.58 (m, 4H, CH₂ Pal CH γ -Leu, CH β -Met), 1.55 (s, 6H, CH₃ Far), 1.61 (s, 3H, CH₃ Far), 1.62 (s, 3H, CH₃ Far), 1.64-1.71 (m, 2H, CH β -Met, CH β -Pro), 1.75-1.87 (m, CH₂ γ -Pro), 1.91-1.95 (m, 3H, CH β -Pro, CH₂- Far), 1.96-2.06 (m, 8H, CH₂ MIC, CH₂ Far), 1.99 (s, 3H, S-CH₃), 2.14-2.29 (m, 10H, γ -Met, β^2 -Leu, β^2 -Gly, β^2 -Met, β^2 -Cys), 2.30-2.47 (m, 4H, β^2 -Leu, β^2 -Met, β^2 -Pro, β -Cys_{Far}), 2.51-2.62 (m, 4H, β^2 -Pro, β -Cys_{Far}, CH₂-Pal), 2.88 (dd, $J = 13.37, 7.55$ Hz, 1H, β -CH Cys_{Pal}), 3.09-3.12 (m, 1H, β -CH Cys_{Pal}), 3.13 (d, $J = 7.79$ Hz, 2H, α -CH₂ Far), 3.16-3.27 (m, 4H, α -CH₂ Gly), 3.35-3.37 (m, 1H, δ -CH Pro), 3.36 (t, $J = 7.13, 7.13$ Hz, 2H, NCH₂ MIC), 3.46-3.50 (m, m, 1H, δ -CH Pro), 3.56 (s, 3H, OCH₃, Konformer A), 3.57 (s, 3H, OCH₃, Konformer B), 4.04-4.09 (m, 1H, α -CH Met), 4.12-4.25 (m, 3H, α -CH Cys_{Pal}), α -CH Pro, α -CH Leu, α -CH-Cys_{Far}), 5.04-5.07 (m, 2H, CH Far), 5.16 (t, $J = 7.78, 7.78$ Hz, 1H CH Far), 7.00 (s, 1.4H CH=CH MIC, Konformer A), 7.08 (s, 0.3 H CH=CH MIC,

Experimenteller Teil

Konformer B), 7.17 (s, 0.3H CH=CH MIC Konformer C), 7.63-7.71 (m NH Leu), 7.73-7.78 (m NH Gly), 7.76-7.78 (m NH Met), 7.83 (d, $J = 8.22$ Hz, NH, Cys_{Pal}), 7.86-7.89 (m, NH, Cys_{Far}, Gly), 8.04 (d, $J = 8.27$ Hz, NH, Cys_{Far} Konformer (cis,trans))

MS (ESI) : ber. $[M + H]^+$ 1426.86, gef. 1427.40



7.9. ADIFAB-Assay

ADIFAB + Palmitinsäure

1. Zuerst wird die ADIFAB-Lösung hergestellt. Dazu werden 200µg ADIFAB in 130µl Puffer (50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5nM PMSF) pH=8.0, damit eine Endkonzentration von 100µM ADIFAB [$M = 15000\text{g/mol}$] entsteht.
2. Anschließend werden 500µl Assaypuffer in eine Glasküvette gegeben. (Assaypuffer: 20 mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM Na_2HPO_4 , pH=7.4)
3. Es werden 2.73mg Palmitinsäure eingewogen und mit 843µl DMSO verdünnt. Diese Lösung wird mit dem Assaypuffer 1:100 verdünnt (0.1µM)
4. Es erfolgt die Zugabe von 1µl ADIFAB-Lösung, Endkonzentration 200nM
5. Das Emissionsspektrum wird aufgenommen (Anregungswellenlänge 386nm) in dem Wellenlängenbereich von 400-620 nm.
6. Zuletzt werden 2µl der verdünnten Palmitinsäurelösung (0.1µM) in die Küvette gegeben und das Spektrum erneut gemessen.

ADIFAB + N-Ras + APT1

1. Zuerst wird die ADIFAB-Lösung hergestellt. Dazu werden 200µg ADIFAB in 130µl Puffer (50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5nM PMSF) pH=8.0, damit eine Endkonzentration von 100 µM ADIFAB [$M = 15000\text{g/mol}$] entsteht.
2. Anschließend werden 500µl Assaypuffer in eine Glasküvette gegeben. (Assaypuffer: 20mM HEPES, 150mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM Na_2HPO_4 , pH=7.4)
3. Es erfolgt die Zugabe von 1µl ADIFAB-Lösung, Endkonzentration 200nM
4. Das Emissionsspektrum wird aufgenommen (Anregungswellenlänge 386nm) in dem Wellenlängenbereich von 400-620 nm.
5. Es werden 1µl APT1-Lösung ($1.56 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) zugegeben, dass eine Endkonzentration von 31nM erzielt wird. Dann wird ein Spektrum gemessen.

6. Zuletzt erfolgt die Zugabe von Cy3-NRas-D-PalFar, 4.3 μ l (376 μ M), um eine Endkonzentration von 3.2 μ M zu erhalten. Anschließend wird das Spektrum gemessen.

8. Literatur- & Abkürzungsverzeichnis

- [1] Klar, T. A., S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner and S. W. Hell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97(15): 8206-8210
- [2] Willig, K. I., Kellner R. Medda R., R., Hein B., Jakobs S., Hell S. W, *Nature Methods* **2006**, 3 (9): 721-723.
- [3] Bader B, Kuhn K, Owen DJ, Waldmann H, Wittinghofer A, Kuhlmann J, *Nature*, **2000** ;403(6766):223-6
- [4] Ouyang S., Zhu W., Hamilton J., Lin H., Campbell M., Childs K., Thibaud-Nissen, F., Malek R. L., Lee Y., Zheng L., Orvis J., Haas B., Wortman J., and Buell C. R. **2007**. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *NAR* 35 Database Issue: D846-851
- [5] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **2004** ;431(7011):931-45
- [6] Eckert Lynn B., Repasky G. A., Ülkü A. S., McFall A., Zhou H., Sartor C. I., Der C. J., *Cancer Res.* **2004** 64: 4585-4592
- [7] Bos J.L., *Cancer Res.* **1989** 49: 4682-4689
- [8] Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA, *Nature*, **1983**, 303, 396 – 400
- [9] Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. *Nat Rev Drug Discov.* **2007** Jul;6(7):541-55
- [10] Bos J.L, Rehmann H, Wittinghofer A, *Cell.* **2007** Jun 1;129(5):865-77
- [11] Malumbres M, Barbacid M, *Nat Rev Cancer.* **2003** Jun;3(6):459-65
- [12] Bos J.L, Rehmann H, Wittinghofer A, *Cell.* **2007**, 129(5):865-77
- [13] Vetter I.R, Wittinghofer A, *Science.* **2001**;294(5545):1299-304
- [14] Rocks O, Dissertation, Universität Bochum **2005**
- [15] Sprang S.R, *Annu Rev Biochem.* **1997**;66:639-78
- [16] Donovan, S., Shannon, K. M. & Bollag, G. *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1602, 23–45
- [17] Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A, *Biochemistry* **1998** ;37(20):7420-30

- [18] Trahey M, McCormick F, *Science*. **1987**;238(4826):542-5
- [19] Davis R.J, *Mol Reprod Dev*. **1995**;42(4):459-67
- [20] Zuber J, Tchernitsa O.I, Hinzmann B, Schmitz A.C, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schäfer R, *Nat Genet*. **2000**;24(2):144-52
- [21] Boguski M.S, McCormick F, *Nature*. **1993** ;366(6456):643-54
- [22] Pronk G.J, Bos J.L, The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling, *Biochim Biophys Acta*. 1994 ;1198(2-3):131-47
- [23] McKay M.M, Morrison D.K, *Oncogene*. **2007** ;26(22):3113-21
- [24] Waters S.B, K Yamauchi, and Pessin J.E *Mol. Cell. Biol*. **1995**, 15: 2791-2799
- [25] Aronheim A., Engelberg D., Li N., al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M., *Cell* **1994**,78, pp. 949–961
- [26] Bondeva T, Balla A, Várnai P, Balla T, *Mol Biol Cell*. **2002**;13(7):2323-33
- [27] Kolch W, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2005**;6(11):827-37
- [28] Robinson M.J, Cobb M.H , *Curr Opin Cell Biol*. **1997**;9(2):180-6
- [29] Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang X.F , *J Biol Chem*. **1998** ;273(10):5439-42
- [30] Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J, *Curr Biol*. **2002**;12(4):253-65
- [31] Feig L.A, Buchsbaum R.J, *Curr Biol*. **2002**;12(7):R259-61
- [32] Koolmann J, Röhm K-H, Taschenatlas der Biochemie, 3.vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, 62, **2003**
- [33] Konstantinopoulos P.A, Karamouzis M.V, Papavassiliou A.G, *Nat Rev Drug Discov*. **2007** ;6(7):541-55
- [34] Gelb M.H, Brunsveld L, Hrycyna C.A, Michaelis S, Tamanoi F, Van Voorhis W.C, Waldmann H, *Nat Chem Biol*. **2006**;2(10):518-28
- [35] Quatela S.E, Sung P.J, Ahearn I.M, Bivona T.G, Philips M.R, *Methods Enzymol*. **2008**;439:87-102
- [36] Rocks O, Peyker A, Bastiaens PI, *Curr Opin Cell Biol*. **2006** ;18(4):351-7
- [37] Vaudry D, Stork P.J, Lazarovici P, Eiden L.E, *Science* **2002** 31;296(5573):1648-9
- [38] Chiu V.K, Bivona T, Hach A, Sajous J.B, Silletti J, Wiener H, Johnson R.L 2nd, Cox A.D, Philips M.R, *Nat Cell Biol*. **2002**;4(5):343-50

- [39] de Castro I. P., Bivona T. G., Philips M. R., Pellicer A., *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 3485
- [40] Rocks O, Peyker A, Kahms M, Vermeer P.J, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI, *Science* **2005**;307(5716):1746-52
- [41] Shappard, R.C, *Ann. Rep.* **1963**, 60, 448
- [42] Fischer E, Otto E, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1903**, 36 2106-16
- [43] Bergmann M, Zervas L., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen* **1932**, 65B 1192-1201
- [44] du Vigneaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G., Gordon S.. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75, 4879-80
- [45] du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G., *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76, 3115-21
- [46] Merrifield R B, Solid-Phase Peptide Synthesis. 3, *Biochemistry* **1964**, 3 1385-90
- [47] Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. *J. Am. Chem. Soc.*; **1963**; 85(14); 2149-2154
- [48] Carpino L. A., Han G. Y., *J. Am. Chem. Soc.*; **1970**; 92(19); 5748-5749
- [49] Wang S.S, *J. Am. Chem. Soc.*; **1973**; 95(4); 1328-1333
- [50] Guillier F, Orain D, Bradley M, *Chem Rev.* **2000** ;100(6):2091-158
- [51] James Ian W, *Tetrahedron* **1999**, 55, 4855-4946
- [52] Waldmann, H, Naegele, E, *Angewandte Chemie, International Edition in English* **1995**, 34(20), 2259-62
- [53] Lumbierres M, Palomo J. M. Kragol G, Roehrs S, Mueller O, Waldmann H, *Chemistry-A European Journal* **2005**, 11(24), 7405-7415
- [54] Brunsveld L, Kuhlmann J, Alexandrov K, Wittinghofer A, Goody RS, Waldmann H, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2006**;45(40):6622-46
- [55] Han S-Y., Kim Y.A., *Tetrahedron* **2004**, 60(11), 2447-2467
- [56] Albericio F., Chinchilla R., Dodsworth D. J., Najera C, *Organic Preparations and Procedures International* **2001**, 33(3), 203-303
- [57] Scott F.L, Glick R.E, Winstein S, *Experientia* **1957**,13, 183

- [58] Miyazawa T, Otomatsu T, Fukui Y, Yamada T, Kuwata S, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 419-420
- [59] Miyazawa T, Donkai T, Yamada T, Kuwata S, *Int J Pept Protein Res.* **1992** ;40(1):49-53
- [60] DeLos F. DeTar, Richard Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.*; **1966**; 88(5); 1020-1023
- [61] Carpino L. A, Ionescu D, El-Faham A, *Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61(7), 2460-5
- [62] Di Fenza A, Tancredi M, Galoppini C, Rovero P, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39(46), 8529-8532
- [63] Han Y., Albericio F., Barany G. J., *Org. Chem.* **1997**, 62 , 4307–4312
- [64] Barlos K., Gatos D., Koutsogianni S., *J. Pept. Res.* **1998**, 51 , 194–200
- [65] Høeg-Jensen T., Olsen C.E., Holm A., *J. Org. Chem.* **1994**, 59 , 1257–1263
- [66] Liu P., Sun B.-Y., Chen X.-H., Tian G.-I., Ye Y.-H., *Synth. Commun.* **2002**, 32, 473–480
- [67] Rose K, *J. Am. Chem. Soc.*; **1994**; 116(1), 30–33
- [68] Schnolzer M, Kent S.B.H, *Science* **1992**, 256, 221–225
- [69] Liu C.F, Tam J.P, *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91,6584–6588
- [70] Englebretsen D.R., Garnham B.G., Bergman D.A., Alewood P.F., *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8871–8874
- [71] Kemp D.S., *Biopolymers* **1981**, 20, 1793–1804
- [72] Dawson PE, Muir TW, Clarklewis I, Kent SBH, *Science* **1994**; 266:766-9
- [73] Wieland T, Bokelmann E, Bauer L, Lang HU, LauH, *Annalen Der Chemie-Justus Liebig* **1953**; 583:129-49
- [74] Kochendoerfer, G. G., Chen, S. Y., Mao, F., Cressman, S., Traviglia, S., Shao, H., Hunter, C. L., Low, D. W., Cagle, E. N., Carnevali, M, *Science* **2003**, 299, 884–887
- [75] Becker, C. F., Hunter, C. L., Seidel, R., Kent, S. B., Goody, R. S. & Engelhard, M, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100:, 5075–5080
- [76] Tam J P, Lu Y A, Liu C F, Shao J. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995** ;92:12485–12489
- [77] Offer J., Boddy C.N.C., Dawson P.E., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 17, 4642 - 4646
- [78] Tam JP., Yu QT., *Bioploymers* **1998**; 46:319-27

- [79] Quaderer R., Sewing A, Hilvert D., *Helv Chim Acta* **2001**; 84:1197-206
- [80] Zhang LS., Tam JP., *Tetrahedron Lett* **1997**;38:3-6
- [81] Yan L.Z., Dawson P.E., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4, 526 - 533, 2001
- [82] Chong S., Mersha F.B., Comb D.G., Scott M.E., Landry D., Vence L.M., Perler F.B., Benner J., Kucera R.B., Hirvonen C.A., Pelletier J.J., Paulus H., Xu M.Q, *Gene* **1997**, 192, 271– 281
- [83] Muralidharan V, Muir T.W., *Nature Methods* **2006**, Vol3, 6, 429-438
- [84] Ozawa T., Kaihara A., Sato M., Tachihara K., Umezawa Y., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2516-2521
- [85] Hackeng T.M., Griffin J.H., Dawson P.E, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999, 96, 10068– 10073.
- [86] Nilsson B.L., Hondal R.J., Soellner M.B., Raines R.T., *J Am Chem Soc* **2003**, 125 , pp. 5268–5269
- [87] Merckx R., Rijkers D.T.S., Kemmink J., Liskamp R.M.J., *Tetrahedron Lett* **2003**, 44 , 4515–4518
- [88] Chang T.K., Jackson D.Y., Burnier J.P., Wells J.A., *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91 ,12544–12548.
- [89] Braisted A.C., Judice J.K., Wells J.A., *Method Enzymol* **1997**, 289, 298–313
- [90] Machova Z., von Eggelkraut-Gottanka R., Wehofsky N., Bordusa F., Beck-Sickinger A.G., *Angew Chem Int Ed* **2003**, 42, 4916–4918
- [91] Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI., *Science* **2005** ;307(5716):1746-52
- [92] Shahinian S, Silviu JR, *Biochemistry* **1995** ;34(11):3813-22
- [93] Hanzal-Bayer M, Renault L, Roversi P, Wittinghofer A, Hillig RC. *EMBO J.* **2002** ;21(9):2095-106
- [94] Kragol G, Lumbierres M, Palomo JM, Waldmann H, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2004** ;43(43):5839-42
- [95] Backes B. J., Ellmann J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11171-11172
- [96] Backes B. J., Virgilio A. A., Ellman A. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3055-3056
- [97] Brunner J, *Annual Review of Biochemistry* **1993**, Vol. 62: 483-514

- [98] Dankbar D.M, Gauglitz G, *Anal Bioanal Chem.* **2006** ;386(7-8):1967-74
- [99] Umbreit M. A, Sharpless K. B, *J. Am. Chem. Soc.*; **1977**; 99(16); 5526-5528
- [100] Völkert M, Uwai K, Tebbe A, Popkirova B, Wagner M, Kuhlmann J, Waldmann H., *J Am Chem Soc.* **2003** ;125(42):12749-58
- [101] Fairlamb Ian J.S, Dickinson J. M, Pegg M , *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 11, 2205-2208
- [102] Mitsunobu O., *Synthesis* **1981**, 1-28
- [103] Corey E. J., Kim C. U., *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94(21), 7586-7
- [104] Corey E. J, Kim C. U, Takeda M, *Tetrahedron Letters* **1972**, 13, 4339-4342
- [105] Brown M. J, Milano P. D, Lever D. C.; Epstein W. W, Poulter C. D, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113(8), 3176-7
- [106] Alexandrov K, Heinemann I, Durek T, Sidorovitch V, Goody RS, Waldmann H, *J Am Chem Soc.* **2002**;124(20):5648-9
- [107] Tebbe A, Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum , **2001**
- [108] Hanzal-Bayer M, Renault L, Roversi P, Wittinghofer A, Hillig RC, The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function, *EMBO J.* 2002 May 1;21(9):2095-106
- [109] Nancy V, Callebaut I, El Marjou A, de Gunzburg J, The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):15076-84
- [110] M.J. Brown, P.D. Milano, D.C. Lever, W.W. Epstein, C.D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 3176
- [111] Vaz E, Brunsveld L, Stable helical beta 3-peptides in water via covalent bridging of side chains, *Org Lett.* 2006 Sep 14;8(19):4199-202
- [112] Guichard, G.; Abele, S.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 187-206
- [113] Müller, A.; Vogt, C.; Seewald, N. *Synthesis* **1998**, 837-841
- [114] B. Ludolph, Dissertation, Universität- Dortmund, **2004**
- [115] Hachmann J, Lebl M, *Biopolymers.* **2006**; 84(3):340-7

- [116] Deck P, Pendzialek D, Biel M, Wagner M, Popkirova B, Ludolph B, Kragol G, Kuhlmann J, Giannis A, Waldmann H, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2005** ;,44(31):4975-8
- [117] Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM, *Biochemistry* **1993** ;32(29):7574-80
- [118] Ohno Y, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, *Biochim Biophys Acta.* **2006**; 1761(4):474-83
- [119] Boruah A, Rao IN, Nandy JP, Kumar SK, Kunwar AC, Iqbal J, *J Org Chem.* **2003** Jun 13;68(12):5006-8

8. Abkürzungen

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dDMSO	deutertes Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
Äq	Äquivalent(e)
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
FAB	fast atom bombardement Massenspektrometrie
FG	funktionelle Gruppe
Fmoc	Fluorenmethyloxycarbonyl
Fmoc-OSu	Fluorenmethyloxycarbonyl-Succinimidylester
GC(-MS)	Gaschromatographie (mit massenselektiven Detektor)
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)

HBTU	O-Benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -
tetramethyluroniumhexafluorophosphat	
HCTU	(2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium
hexafluorophosphate)	
His-Tag	Histidin-Markierung (X_6 = sechs Histidine)
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol Hydrat
HPLC	Hochdruckflüssigchromatografie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
Hz	Hertz
k	kilo
konz.	Konzentriert
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	Multiplett (NMR); milli (Konzentration)
M	molar
μ	mikro
Me	Methyl
min	Minuten
mM	milimolar = mmol/l
MS	Massenspektrum
NCL	Native Chemical Ligation
n.d.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Pbf	2,2,4,6,7,-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pen	β,β -diemthyl Cys
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
PS	Polystyrol

PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
qu	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
sec	Sekunde
STV	Streptavidin
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
<i>tert</i>	tertiär
TES/TIS	Triethylsilan/Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
Trityl	Triphenylmethyl
Trt	Trityl
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VIS	visible light

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

Danke

Herrn Prof. Dr. Waldmann danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die anspruchsvolle Aufgabenstellung, sowie für die finanziellen und technischen Mittel, die mir im Rahmen des Promotionsvorhabens zur Verfügung gestellt worden sind. Insbesondere danke ich Ihm für das in mich gesetzte Vertrauen, diese Arbeit mit zunehmender Selbstständigkeit zu verwirklichen.

Für die zahlreichen Hilfestellungen und Motivationsschübe danke ich Lucas Brunsveld. Ohne seine anfängliche Unterstützung hätte diese Arbeit nicht die jetzigen Ergebnisse erzielt.

Ebenso möchte ich Oliver Rocks für die fruchtbare Zusammenarbeit und den vielen Nachhilfestunden in Molekularbiologie danken. Dodo Wasserberg danke ich vielmals für die spektroskopischen ADIFAB Untersuchungen.

Dortmund war nie die Stadt meiner Träume, aber viele haben es mir hier erträglicher gemacht. Mein Dank geht an meine „Nachfolger“ Sebastian Koch, mit seinem immer wieder aufmuntern „Sprachfluss“, ebenso an Gemma Triola und Kristina Görmer, für die gute Teamarbeit. Meinem Azubi Sven Schieke danke ich für die Unterstützung.

Wolle Wilk danke ich für alle normalen Unterhaltungen in diesem Institut. Ebenso meinen vielen Laborkollegen, Jayant Umarye und Ana Garcia (A.3.35) für die tolle Anfangszeit hier. Luc Eberhardt, Hanna Schuster, Anja Richter und Remi Martinez für den Spass während der Arbeit. Ebenso Tanja Knoth und Dirk Weinrich für die Unterstützung bei der präp. HPLC. Zuletzt danke ich allen im Arbeitskreis für jegliche Diskussion und Hilfe.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern für die Ermöglichung des Studiums, meinen Freunden und Carmen, die mich lange während dieses Weges begleitet hat.