

Synthese und biologische Evaluierung von N-Ras-Proteinen mit nicht-natürlichem C-Terminus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie

an der Technischen Universität Dortmund

angenommene

DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin

Kristina Görmer

geboren in Halle/Saale

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Mathias Christmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von April 2007 bis Mai 2011 angefertigt.

FÜR BENJAMIN
UND MEINE FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Ras-Superfamilie	1
1.2	Posttranslationale Lipidmodifikationen	4
1.2.1	Posttranslationale Lipidierungen an extrazellulär orientierten Proteinen	5
1.2.2	Posttranslationale Lipidierung an zytosolischen Proteinen	7
1.3	Der Acylierungszyklus	12
1.4	Synthese lipidierter Peptide	15
1.4.1	Synthese lipidierter Peptide an fester Phase	16
1.5	Proteinsemisynthese	21
1.6	Peptoide	25
1.6.1	Peptoidsynthese	27
2	Zielsetzung	30
3	Ergebnisse und Diskussion	32
3.1	Synthese lipidierter Peptide	32
3.1.1	Optimierung der Lipopeptidsynthese am Fmoc-4-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™ Harz	32
3.1.2	Entwicklung einer Lipopeptidsynthese am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung in Lösung	34
3.2	Synthese lipidierter Peptoid-/Peptidhybridsequenzen des C-terminalen N-Ras-Heptapeptids	36
3.2.1	Synthese der Fmoc-geschützten Bausteine	38
3.2.2	Synthese farnesylierter Peptoid-/Peptid Hybridsequenzen	42
3.2.3	Synthese farnesylierter und palmitoylierter Peptoid-/Peptidsequenzen	46
3.3	MIC-Ligation der lipidierten Peptoid-/Peptidsequenzen	49
3.3.1	Ligation der farnesylierten Peptoid-/Peptidsequenzen	49
3.3.2	Ligation der doppelt lipidierten Sequenzen an das verkürzte, Cy-3 markierte N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$)	53
3.4	Darstellung semisynthetischer N-Ras-Proteine mit nicht-natürlichem C-Terminus	53
3.4.1	Semisynthese eines Ras-Proteins, dessen palmitoylierbares Cystein durch ein Penicillaminderivat ausgetauscht wurde	53
3.4.2	Darstellung semisynthetischer N-Ras-Proteine, deren Aminosäuren zwischen den Lipidierungsstellen durch nicht-natürliche Elemente ersetzt werden	64
3.5	Untersuchung der Depalmitoylierung <i>in vitro</i>	71

3.5.1	Untersuchung der Depalmitoylierungsaktivität von APT 1, APT 2 und LYPLAL 1 unter Verwendung von farnesylierten und palmitoylierten N-Ras	74
3.5.2	Untersuchung der palmitoylierten, farnesylierten Modifikationen als Substrate für APT 1 und APT 2	76
3.6	Untersuchungen der semisynthetischen Proteine in Zellen.....	77
3.6.1	Differenzierungsuntersuchung mit PC12-Zellen.....	77
3.6.2	Lokalisationsstudien in MDCK-Zellen.....	79
4	Zusammenfassung	84
5	Experimenteller Teil.....	88
5.1	Messgeräte und Hilfsmittel.....	88
5.2	Materialien und Geräte für die biologischen Experimente	90
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	91
5.4	Versuche zu Kapitel 3.1.....	95
5.5	Versuche zu Kapitel 3.2.1.....	99
5.6	Versuche zu Kapitel 3.2.2.....	110
5.7	Versuche zu Kapitel 3.2.3.....	114
5.8	Versuche zu Kapitel 3.3.....	122
5.9	Versuche zu Kapitel 3.4.1.....	124
5.10	Versuche zu Kapitel 3.4.2.....	139
5.11	ADIFAB Assay	149
5.12	Zellkultur	151
5.12.1	Puffer und Lösungen.....	151
5.12.2	Subkultivierung der PC12-Zellen.....	151
5.12.3	Bestimmung der Zellzahl.....	152
5.12.4	Kryokonservierung der PC12-Zellen	152
5.13	PC12 Differenzierungstest	153
5.13.1	Mikroinjektion.....	153
5.13.2	Testdurchführung	153
6	Literaturverzeichnis	155
7	Abkürzungsverzeichnis.....	161
8	Anhang	166

1 Einleitung

Mit der Unterzeichnung des *National Cancer Acts* am 23. Dezember 1971 durch US-Präsident Richard Nixon wurde der Grundstein für Investitionen von etwa 90 Milliarden US-Dollar zur Erforschung, Therapie und Prävention von Krebs in den Vereinigten Staaten von Amerika gelegt.¹ Durch diese Initiative, die die Krebsforschung des vergangenen Jahrhunderts entscheidend prägte, konnten bei der Behandlung mancher Krebsarten erhebliche Fortschritte erreicht werden. Beispielsweise können heute bei akuter lymphatischer Leukämie etwa 70 % aller Kinder geheilt werden² und die relative Überlebenschance für alle Krebsarten ist seit den 1970er Jahren um ca. 70 % gestiegen.³ Dennoch kann der metaphorisch als *Kreuzzug gegen den Krebs* bezeichnete Kampf nicht als gewonnen angesehen werden. Laut der aktuellen globalen Krebsstatistik wurden im Jahr 2008 12,7 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert und 7,6 Millionen Patienten starben an der Krankheit.⁴ Krebs stellt somit die häufigste Todesursache in Industrieländern und die zweithäufigste in Entwicklungsländern bei den unter 85-Jährigen dar und steht daher immer noch im Mittelpunkt der Forschung. Trotz der Bemühungen der letzten vier Jahrzehnte sind die komplexen Zusammenhänge und verschiedenen Faktoren, die zur Entstehung von Krebs führen, längst noch nicht vollständig verstanden.⁵ Man weiß jedoch, dass das unkontrollierte Zellwachstum, das zur Entstehung von Tumoren führt, unter anderem durch mutierte Gene, sog. Onkogene, hervorgerufen wird.

1.1 Die Ras-Superfamilie

Ras-Gene, die in retroviralen Sarkomen in Ratten gefunden und danach benannt wurden (*rat sarcoma*), gehören zu den ersten erkannten Onkogenen.⁶ Diese viralen Gene wurden als mutierte Formen zellulärer Proto-Onkogene identifiziert und entsprechend der Stämme, aus denen sie hervorgingen, Harvey- (*H-ras*)⁷, Kirsten- (*K-ras*)⁸ und Neuroblastoma-*ras* (*N-ras*), genannt.⁸ In Menschen kodieren diese drei *ras*-Gene vier Proteine, H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A und K-Ras 4B, wobei es sich bei den letzten beiden um Splicevarianten des *K-ras*-Gens handelt. Diese Proteine gehören zu den am besten charakterisierten Pro-Onkoproteinen und sind der Namensgeber der Ras-Superfamilie, zu denen mehr als 100 kleine, monomere GTPasen zählen, deren Molekulargewicht zwischen 20 und 40 kDa liegt und die an der Übertragung extrazellulärer Signale in intrazelluläre Ereignisse maßgeblich beteiligt sind.⁹ Die Ras-Superfamilie lässt sich in mindestens fünf Unterklassen unterteilen. Neben der Ras-Unterfamilie unterscheidet man die Rho-, Rab-, Ran- und Sar1/Arf-Proteine. Trotz ihrer unterschiedlichen biologischen Funktionen weisen alle GTPasen eine hochkonservierte GTP (Guanosintriphosphat)/GDP (Guanosindiphosphat)-bindende Domäne auf und wirken als molekulare Schalter zwischen dem aktiven GTP gebundenen und dem inaktiven Zustand,

in dem das Protein GDP gebunden hat.¹⁰ Der Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand erfolgt durch die Dissoziation des vom Protein gebundenen GDPs, die von sich aus relativ langsam verläuft, aber durch GEFs (Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren, **g**uanin-**n**ucleotide **e**xchange **f**actors) beschleunigt wird. GEFs stabilisieren auch den nukleotidfreien Zustand des Proteins, bevor dieses GTP bindet und dadurch aktiviert wird. Die zelluläre Konzentration von GTP ist dabei deutlich höher als die von GDP, und das Protein besitzt eine höhere Affinität zu GTP als zu GDP.¹¹ Der Wechsel in die inaktive Konformation beinhaltet die irreversible Hydrolyse von GTP zu GDP. Diese GTPase-Reaktion ist intrinsisch ebenfalls langsam und wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt.¹⁰ Mutierte Ras-Proteine, wie beispielsweise die G12V-Mutante, haben diese GTPase-Aktivität verloren und können somit nicht mehr in den inaktiven Zustand zurückschalten (Abbildung 1). Diese permanente Aktivierung kann zu Karzinogenese führen. Etwa 30 % aller humanen Tumore weisen Mutationen in den *ras*-Genen auf, wobei die einzelnen Genmutationen je nach Krebsart unterschiedlich verteilt sind. Beispielsweise werden über 80 % aller Bauchspeicheldrüsentumore durch Mutationen in den *K-ras*-Genen ausgelöst. In Blasenkarzinomen werden vornehmlich *H-ras*-Mutationen gefunden, wohingegen sie bei akuter lymphatischer Leukämie und in Melanomen in den *N-ras*-Genen lokalisiert sind.¹²

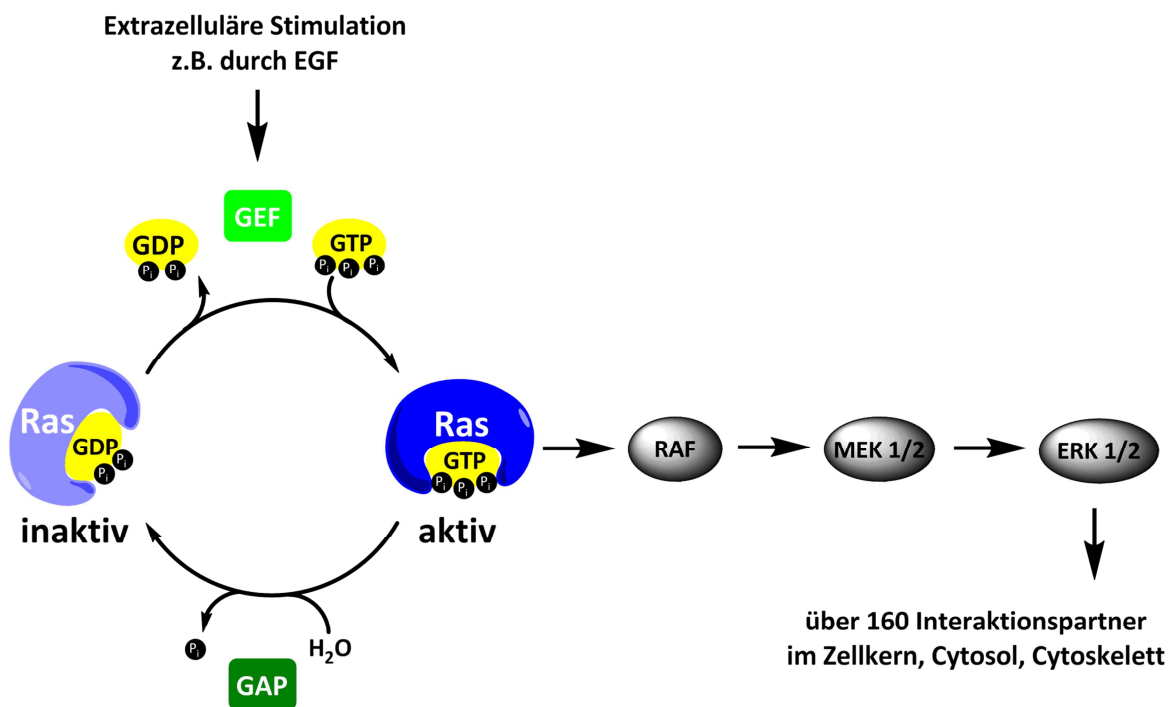


Abbildung 1: Ras-Proteine fungieren als molekulare Schalter.¹⁰ Nach extrazellulärer Stimulation, beispielsweise durch EGF, werden Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren (GEF) aktiviert, die die Aktivierung von Ras durch den Austausch von GDP gegen GTP vermitteln.¹³ In seiner aktiven Konformation wechselwirkt Ras mit nachgeschalteten Effektoren, wie Raf, wodurch die Phosphorylierung von MEK 1/2 und ERK 1/2 ausgelöst wird. Als Haupteffektor interagiert ERK mit Proteinen und Effektoren im Zellkern, Zytosol und Zytoskelett.¹⁴ Durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) wird die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysiert, wodurch Ras wieder in seinen inaktiven Zustand zurückschaltet.¹⁰

Neben den Ras-Isoformen (H-, N- und K-Ras) gehören Proteine, wie Rap (**Ras** related **p**roteins), R-Ras, Ral und Rheb (**Ras** homolog enriched in **b**rain), zur Ras-Unterfamilie. Ras-Proteine können als Signalknoten verstanden werden, die auf extrazelluläre Stimuli reagieren und diese durch Interaktion mit zahlreichen nachgeschalteten Effektorproteinen, beispielsweise im Raf - MEK - Erk - Signalweg weiterleiten.¹⁵ Aktiviertes Ras rekrutiert Raf (rapid fibrosarcoma), eine Serin/Threonin-Kinase, an die Plasmamembran, wodurch die Dephosphorylierung und Phosphorylierung verschiedener Effektoren ausgelöst wird, und schließlich zur Phosphorylierung der Tyrosin/Threonin-Kinasen MEK 1 und 2 (MAP/ERK - Kinase) führt, die wiederum ERK 1 und 2 (*extracellular regulated kinase*) phosphorylieren. Phosphoryliertes ERK, der Haupteffektor dieser Signalkaskade, wechselwirkt im Folgenden mit über 160 Interaktionspartnern im Zytosol, Zytoskelett und Zellkern, beispielsweise mit Transkriptionsfaktoren wie ELK-1 (Abbildung 1).¹⁶

Die Rho-Subfamilie mit ihren ca. 20 Mitgliedern nimmt, ebenso wie Ras, eine Schlüsselfunktion in der Weiterleitung extrazellulärer Reize in die Zelle ein, wodurch sich der Name dieser Gruppe als **Ras-Homologe** erklärt. Rho-Proteine regulieren hauptsächlich die Organisation des Aktinzytoskeletts, sind aber auch in die Zelladhäsion und -beweglichkeit sowie Genexpression involviert. Die größte Untergruppe mit mehr als 60 Mitgliedern stellen die Rab-Proteine, die erstmals im Hirn entdeckt und entsprechend benannt wurden (**Ras-like** proteins in **b**rain). Sie sind für die Regulation des intrazellulären Vesikeltransportes, inklusive der Internalisierung von Rezeptoren verantwortlich. Die Ran (**Ras-like** nuclear proteins) - Familie, die häufigste kleine GTPase der Zelle, steuert den Proteintransport in und aus dem Zellkern während der Interphase und ist auch in die Mitose involviert.¹⁷ Die Sar1/Arf-Familie (**ADP-Ribosylierungsfaktor**) ist, wie die Rab-Familie, an der Steuerung des Vesikeltransportes, speziell der Vesikelknospung beteiligt.^{15,18}

Damit Ras-Proteine biologisch aktiv sind, ist ihre Membranassoziation essentiell. Diese wird durch posttranslational eingeführte Lipidmodifikationen gewährleistet. Das folgende Unterkapitel gibt einen Überblick über posttranslationale Lipidmodifikationen.

1.2 Posttranslationale Lipidmodifikationen

Fast alle Proteine durchlaufen nach ihrer Synthese in den Ribosomen weitere sog. posttranslationale Modifikationen, die für ihre Funktionsfähigkeit von entscheidender Bedeutung sind. Zu den häufigsten posttranslationalen Veränderungen gehören proteolytische Spaltungen, beispielsweise die exoproteolytische Abspaltung des Initiationsmethionins, das den Proteinaufbau einleitet, oder auch tryptische Peptidbindungsspaltungen, die Proproteine durch Abbau von Peptidsequenzen in aktive Proteine überführen. Bekannte Beispiele hierfür sind Insulin oder Kollagen. Neben proteolytischen Spaltungen finden chemische Veränderungen durch kovalente Modifikationen am C- bzw. N-Terminus statt, aber vor allem an den Seitenketten der Aminosäuren. Es sind mehr als 150 verschiedene kovalente Seitenkettenmodifikationen bekannt, die an allen Aminosäuren außer Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Valin stattfinden. Man unterscheidet unter anderem Acetylierung, Glycosylierung, Hydroxylierung, Methylierung, Nukleotidylierung, Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung. Eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation ist die Ubiquitinierung, die an den Lysinseitenketten von Proteinen stattfindet und diese dadurch für den Abbau markiert.¹⁹

Neben den vorstehend genannten posttranslationalen Modifikationen spielt die Lipidierung eine entscheidende Rolle. Speziell im Bereich der Signaltransduktion sind posttranslationale Lipidierungen essentiell für die biologische Aktivität und zelluläre Lokalisation der Proteine. Bereits 1951 entdeckte J. Folch die ersten lipidierten Proteine bei der Extraktion von Hirngewebe.²⁰ Der Beweis dafür, dass der Lipidrest kovalent mit dem Protein verknüpft ist, ließ jedoch über 20 Jahre auf sich warten. Im Jahr 1978 wurde durch Edman-Abbau und enzymatische Hydrolyse eines Reifungsfaktors des Pilzes *Rhodospiridium toruloides* das erste farnesylierte Peptid entdeckt, wobei der Farnesylrest über einen Thioether mit dem C-terminalen Cystein verknüpft war.²¹ Seither steigt die Zahl der identifizierten Lipoproteine kontinuierlich. Die bekannten Lipidmodifikationen sind dabei jedoch begrenzt und lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Lipide, die an extrazellulär orientierten Proteinen auftreten und solche, die an zytosolischen Proteinen gefunden werden (Abbildung 2).

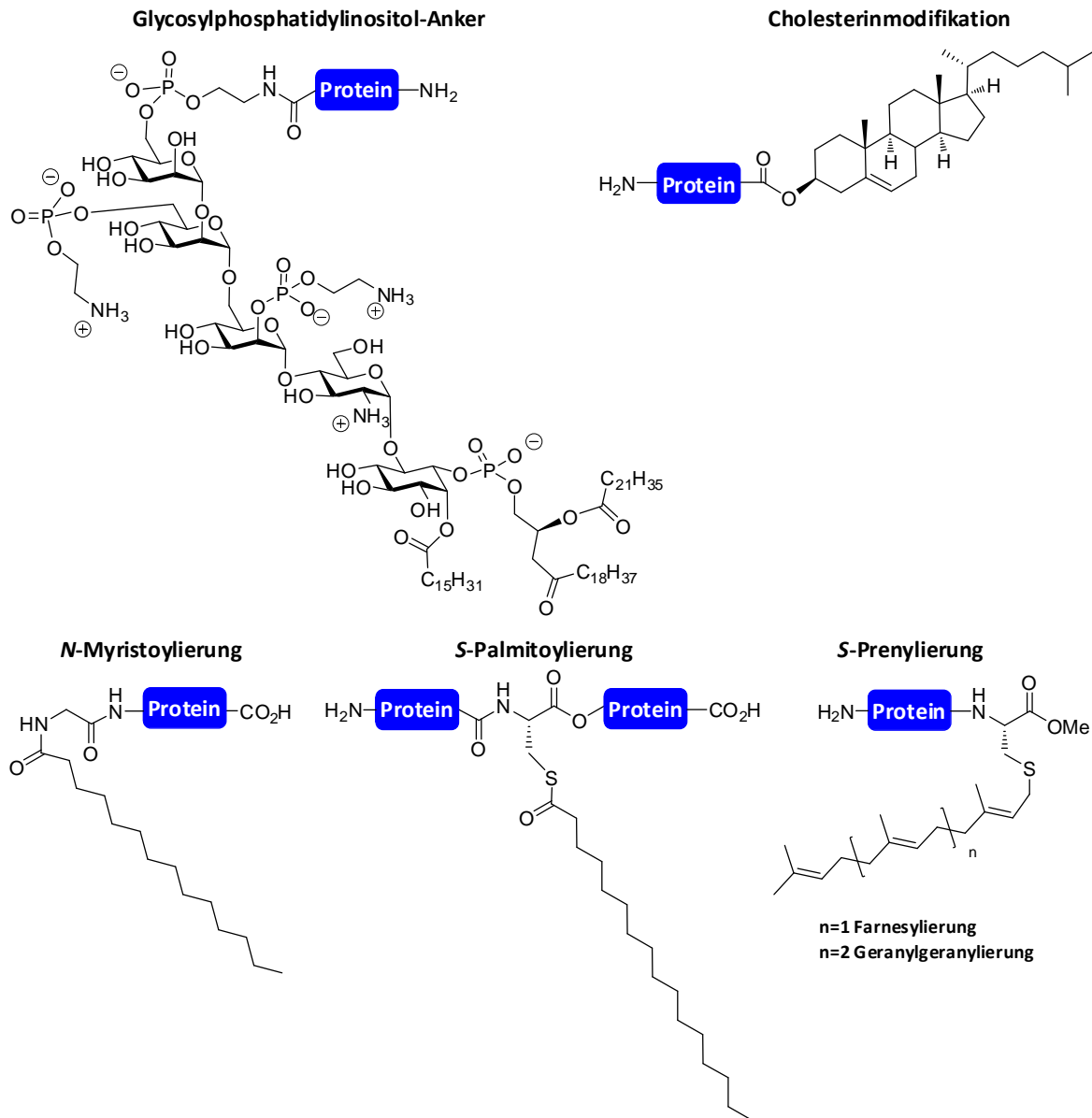


Abbildung 2: Überblick über eukaryotische posttranslationale Lipidmodifikationen.

1.2.1 Posttranslationale Lipidierungen an extrazellulär orientierten Proteinen

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker

Etwa 1% aller in Eukaryoten kodierten Proteine, bzw. 10 - 20% aller sekretorischen Membranproteine, werden posttranslational mit dem sog. GPI-Anker derivatisiert. Diese Proteine haben vielfältige Funktionen, beispielsweise in der Signaltransduktion, der Immunantwort, der Krebszelleninvasion sowie in der Metastase und Pathobiologie von Parasiten.²² In Abbildung 2 ist die Struktur des GPI-Ankers der menschlichen Erythrozyten-Acetylcholinesterase dargestellt. Die Verknüpfung mit dem C-Terminus des Proteins erfolgt über einen Phosphoethanolaminlinker. An der Phosphorseite ist dieser mit dem primären Alkohol einer Mannose verbunden, die zu einem hochkonservierten

Polysaccharidgerüst (Man- α -(1,2)-Man- α -(1,6)-Man- α -(1,4)-GlcN- α -(1,6)-*myo*-Inosit) gehört. Durch Palmitoylierung der 2-Hydroxygruppe des Inosits wird die Spaltung durch Phospholipase C verhindert. Verschiedene Ethanolaminphosphate können optional an dem Glykangerüst angebracht werden, außerdem können weitere Zuckerreste im Golgi hinzugefügt werden. Nachdem der GPI-Anker auf das Protein übertragen wurde, wird der Palmitoylrest im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgespalten und verschiedene ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren können mit dem Glycerolteil verbunden werden. An der Biosynthese des GPI-Ankers, die immer noch nicht vollständig verstanden ist, sind mehr als 20 Proteine beteiligt. Die ersten zwei Schritte der Synthese finden auf der zytosolischen Seite des ERs statt, dann folgt ein Wechsel zum Lumen des ERs, wo die Biosynthese vollendet wird. Der Anker wird dann auf Proteine, die eine Erkennungssequenz aufweisen, übertragen. Nach der Sekretion befinden sich die GPI-modifizierten Proteine auf der Zelloberfläche, wo sie in Hefen kovalent mit der Zellwand verknüpft sind. Die genaue Funktion des hoch komplexen GPI-Ankers ist noch umstritten, da man neben der Membraneinlagerung noch weitere Funktionen vermutet.²³

Cholesterinmodifikation

Die Zellproliferation und -differenzierung wird in Metazoen von sekretorischen Proteinen, sog. Morphogenen, bestimmt. Hedgehog-Proteine stellen eine essentielle Klasse der Morphogene dar und werden im Anschluss an ihre Expression als Proproteine posttranslational lipidiert.²⁴ Dabei wird im sekretorischen Weg eine *N*-terminale Erkennungssequenz abgespalten. Anschließend folgt die autokatalytische Spaltung des 45 kDa großen Proproteins in ein 19 kDa großes *N*-terminales Fragment an einer hochkonservierten Spaltungsstelle zwischen einem Glycin und einem Cystein. Durch eine *N, S*-Verschiebung wird der *C*-Terminus in einen Thioester überführt, der im Folgenden durch Cholesterin substituiert wird, wodurch die Einlagerung in die Membrandoppelschicht ermöglicht wird. Neben der Einführung des Cholesterins wird das Hedgehog-Protein an der Thiolseitenkette eines *N*-terminalen Cysteins palmitoyliert und über eine *S, N*-Verschiebung zu einem *N*-terminalen Palmitoylrest umgelagert. Dank beider Lipidmodifikationen weist das Protein eine sehr hohe Affinität zu Membranen auf und kann so an der Membran Signale übertragen.

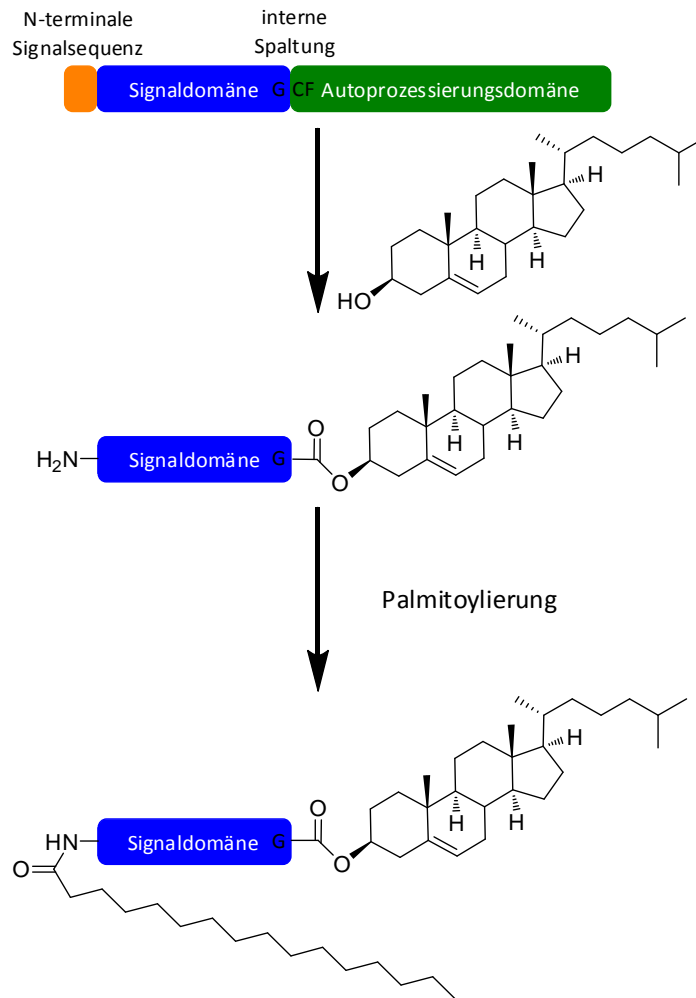


Abbildung 3: Posttranslationale Modifikation des Hedgehog-Proteins.²⁴

1.2.2 Posttranslationale Lipidierung an zytosolischen Proteinen

N-Myristoylierung

Unter *N-Myristoylierung* versteht man die irreversible Verankerung einer ungesättigten C14-Fettsäure an einem *N*-terminalen Glycin. Die stabile Amidbindung wird in Eukaryoten und Viren co-translational nach Abspaltung des Initiator-methionins gebildet, aber auch posttranslational, beispielsweise in dem proapoptotischen Protein BH3, das nach Spaltung durch Caspase 8 ein *N*-terminales Glycin aufweist.²⁵ Myristoylierte *N*-Termini konnten in vielen Proteinklassen nachgewiesen werden, beispielsweise in Src-Kinasen, den myristoylierten, alaninreichen Proteinkinase C-Substraten (MARCKS), dem HIV-Nef-Phosphoprotein oder auch in α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine.²⁶ Der Myristoyltransfer wird durch eine monomere *N-Myristoyltransferase* katalysiert, die hochspezifisch nur Myristoyl-CoA als Substrat akzeptiert. Im Allgemeinen führt Myristoylierung nur zu schwachen, reversiblen Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder

zwischen Membranen und Proteinen. Meist wirken sie in Kombination mit anderen Mechanismen. Beispielsweise beobachtete man bei den MARCKS- und Src-Proteinen einen sog. Myristoyl-elektrostatischen *Switch*, bei dem die Membranassoziation durch das Zusammenspiel aus einem Myristoylrest und der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen positiv geladenen Seitenketten des Proteins und den negativ geladenen Phospholipiden bewirkt wird. In Arf-Proteinen, einer der fünf Untergruppen der Ras-Superfamilie, wird durch die Bindung von GTP eine Konformationsänderung ausgelöst, die die Myristoylierung des *N*-Terminus erlaubt.^{27,28} Membranassoziation wird auch durch ein Zusammenspiel von Palmitoylierung mit Myristoylierung erreicht, beispielsweise bei Fyn und Lck-Proteinen, die zur Src-Familie gehören, in α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).²⁹

S-Prenylierung

Die kovalente Anknüpfung von Isoprenyleinheiten über einen Thioether an die Thiolseitenkette eines C-terminalen Cysteins wird Prenylierung genannt. Zu den prenylierten Proteinen zählen neben Reifefaktoren von Pilzen nukleare Lamine, Ras, Ras-verwandte GTP-bindende Proteine, die Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, Proteinkinasen, und virale Proteine.³⁰ Nach Entdeckung des prenylierten Reifefaktors aus einem Pilz dauerte es noch über zehn Jahre bis das erste prenylierte Säugerprotein, das Kernhüllenprotein Lamin B, entdeckt wurde.³¹ Etwa zur gleichen Zeit entdeckte man, dass Ras-Proteine ebenfalls farnesyliert werden. Durch Sequenzuntersuchungen wurde ein gemeinsames Erkennungsmotiv farnesylierter Proteine, die CAAX-Box, identifiziert.³² Hierbei steht das C für Cystein, A für eine aliphatische und X für jede beliebige Aminosäure. Des Weiteren entdeckte man, dass die Farnesylierung nur die erste von mehreren posttranslationalen Modifikationen darstellt, die farnesylierte Proteine durchlaufen (Abbildung 4). Während der Studien zur Farnesylierung wurde der Geranylgeranylrest als weiterer Prenylrest identifiziert, dessen Anteil den des Farnesylrestes in der Zelle sogar überwiegt. Damit einher ging die Entdeckung geranylgeranylierter Proteine, die nicht die CAAX-Erkennungssequenz aufwiesen. Diese wurden der Rab-Familie zugeordnet und werden auf eine andere Weise prozessiert (Abbildung 5) und besitzen ein bzw. zwei geranylgeranylierte, C-terminale Cysteine. Entsprechend lassen sich prenylierte Proteine in zwei Klassen unterteilen: in Proteine, die mit CAAX-Box exprimiert werden und in Proteine, die dieses Motiv nicht aufweisen, letztere werden CC- oder CXC-haltige Proteine genannt.

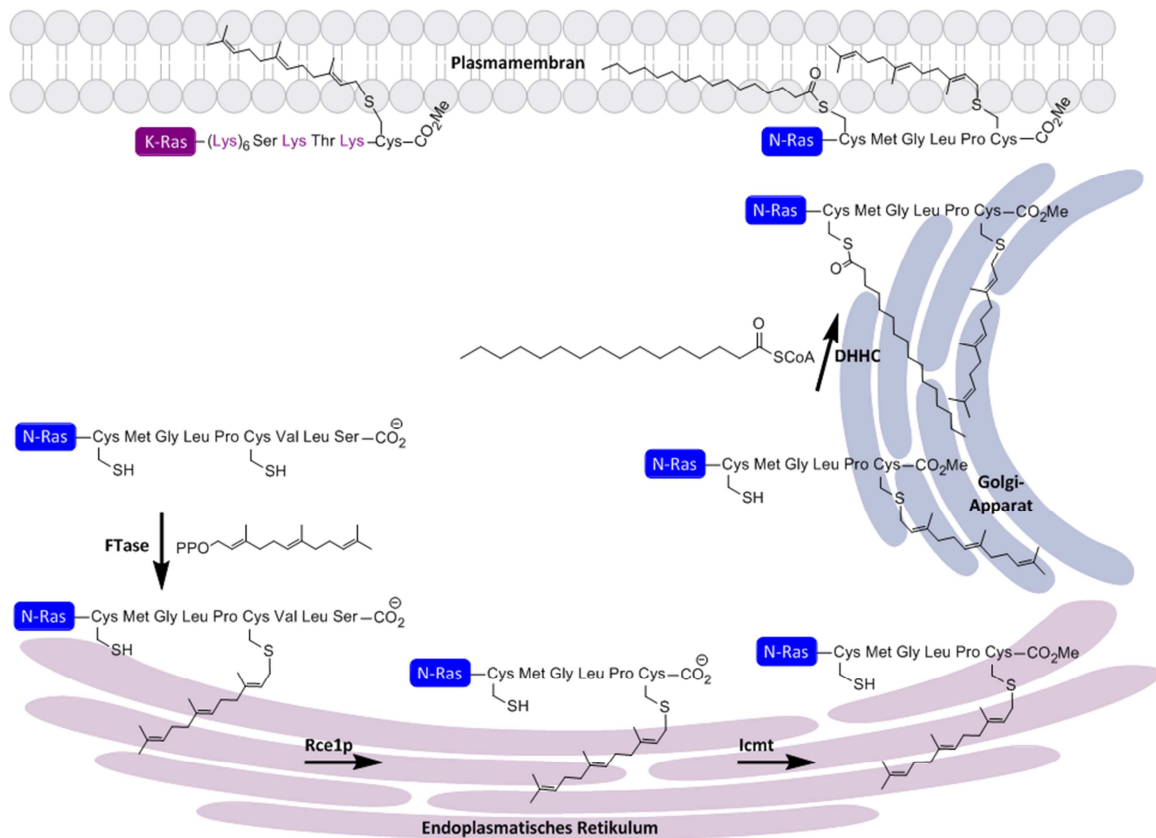


Abbildung 4: Posttranslationale Modifikation der mit CAAX-Box exprimierten Proteine, am Beispiel von N-Ras. K-Ras durchläuft ebenfalls die ersten drei Schritte, bestehend aus Farnesylierung, proteolytischer Abspaltung der letzten drei Aminosäuren sowie Carboxymethylierung, wird im Anschluss jedoch nicht weiter lipidisiert. Hier erfolgt die Membranassoziation über einen lysinreichen, C-terminalen Abschnitt, der neben dem farnesylierten Cystein mit den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran interagiert.³³

Die Klasse der mit CAAX-Box exprimierten Proteine ist relativ groß und heterogen. Zu ihr gehören neben den Ras-Proteinen eine Vielzahl von G-Proteinen, diverse Proteinkinasen und Phosphatasen.³⁴ Die Übertragung des Farnesylrestes wird durch eine Farnesyltransferase (FTase) katalysiert, die Farnesylpyrophosphat (FPP) als Substrat verwendet. In Analogie dazu wird von der Geranylgeranyltransferase (GGTase) ein Geranylgeranylpyrophosphat an dem C-terminalen Cystein angebracht. Das X der CAAX-Erkennungssequenz bestimmt, welche Isopreneinheit eingebaut wird. Im Falle eines Serins, Methionins oder Glutamins wird ein Farnesylrest eingebaut, wohingegen ein Leucin von der GGTase erkannt wird und entsprechend zur Geranylgeranylierung führt. Nach Übertragung des Prenylrestes im Zytosol,³⁵ werden die Proteine ins ER gelenkt, wo die letzten drei Aminosäuren proteolytisch durch die Endoprotease Rce1p abgespalten werden.³⁶ Im Anschluss wird das prenylierte Cystein durch die Isoprenylcysteinylcarboxymethyltransferase (Icmt) methyliert, wobei S-Adenosylmethionin die Methylgruppe liefert (Abbildung 4).^{33,37} Die drei Ras-Isoformen, H-, N- und K-Ras, beschreiten im Anschluss an die Farnesylierung unterschiedliche Wege, die durch ihre C-Termini bestimmt werden. K-Ras wird keiner weiteren Lipidierung unterworfen und erhält seine stabile Membranassoziation durch einen polybasischen Abschnitt, der sich im C-Terminus befindet.

Dieser kann mit der negativ geladenen Plasmamembran wechselwirken und somit an dieser verankert werden, bis die Phosphorylierung von Serin-181 durch die Proteinkinase C die Membrandissoziation von K-Ras bewirkt. Im C-Terminus von N- und H-Ras finden sich weitere Cysteine, die ebenfalls lipidiert werden. Im Golgi erfolgt je nach Isoform die Palmitoylierung von einem (N-Ras) bzw. zwei Cysteinen (H-Ras), die die stabile Plasmamembranadressierung von N- und H-Ras gewährleisten.⁹ Im folgenden Unterkapitel wird die Palmitoylierung detailliert beschrieben.

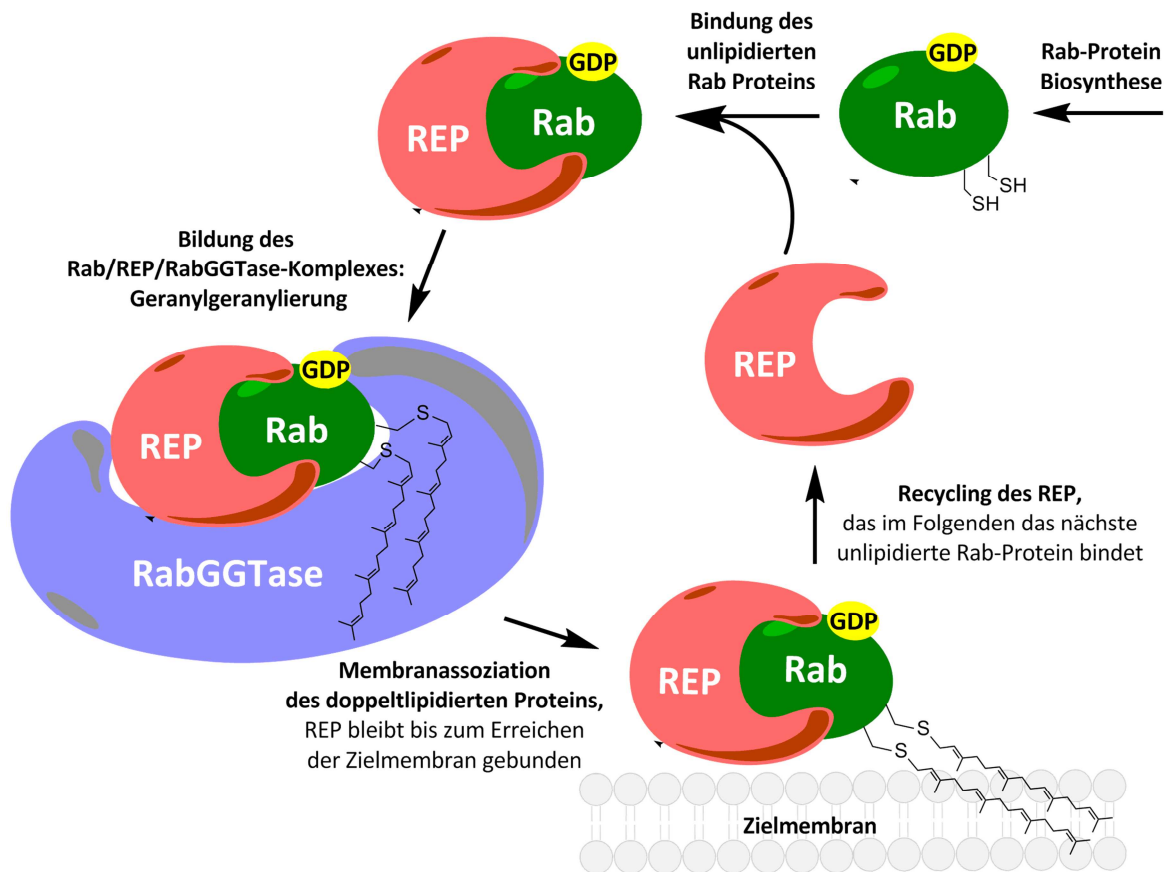


Abbildung 5: Mechanismus der Geranylgeranylierung der Rab-Proteine, die ohne CAAX-Box exprimiert werden. Das nicht-lipidierte Rab-Protein wird von REP, dem Rab Escort Protein, gebunden. RabGGTase erkennt den Komplex aus Rab und REP und überträgt anschließend die Geranylgeranylreste unter Verwendung von Geranylgeranylpyrophosphat als Substrat.³⁸

Die zweite Klasse der prenylierten Proteine gehört zur Rab-Familie und reguliert den intrazellulären Membrantransport. Diese Proteine werden ohne CAAX-Box exprimiert und durchlaufen einen anderen Prenylierungsmechanismus.³⁸ Das Enzym, das die Lipidierung katalysiert, die Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGTase) erkennt hierbei nicht eine C-terminale Sequenz sondern einen Komplex, der sich aus dem zu prenylierenden Protein und einem Hilfsenzym, dem **Rab Escort Protein (REP)** bildet. REP bindet das nicht-lipidierte Protein und bringt es in die Nähe des katalytischen Dimers der RabGGTase. Im Anschluss an die Geranylgeranylierung bleibt der Komplex zwischen Rab und REP bestehen, bis das doppelt lipidierte Protein erfolgreich in die Membran eingelagert wurde (Abbildung 5).³⁹

S-Acylierung

Unter *S*-Acylierung versteht man die reversible Anbringung einer Fettsäure an einem Protein über einen Thioester. Am häufigsten wird Palmitinsäure eingebracht, daher wird der Begriff *S*-Palmitoylierung häufig synonym für Acylierung verwendet. Aber auch andere gesättigte und ungesättigte Fettsäuren werden zur Proteinacylierung genutzt, beispielsweise Myristin-, Öl-, Stearin- oder Arachidonsäure.⁴⁰ Aufgrund der labilen Thioesterbindung kann ein Protein mehrfach acyliert und deacyliert werden, daher dient Palmitoylierung der dynamischen Signalregulation. Entsprechend finden sich in der Familie der palmitoylierten Proteine viele Proteine, die Schlüsselfunktionen in wichtigen biologischen Prozessen, wie Signaltransduktion oder Membranverkehr, und somit auch in der Karzinogenese einnehmen. Dazu gehören beispielsweise GTPasen, aber auch Tyrosinkinasen, wie Fyn, Lck, Yes und eNOS.⁴¹ Hinsichtlich der Lipidierungsstelle unterscheidet sich die Acylierung von Myristoylierung, die auf den *N*-Terminus beschränkt ist und von Prenylierung, die am *C*-Terminus stattfindet. Man beobachtet Acylierung an verschiedenen Stellen eines Proteins, meist in der Nähe von zwei oder mehreren Cysteinen. Proteine mit Transmembrandomänen werden häufig an der Grenzfläche zwischen Zytosol und Membran oder am zytosolischen Ende palmitoyliert. Bisher wurde noch keine Konsensussequenz identifiziert, jedoch tritt Palmitoylierung meist in der Nähe von prenylierten oder myristoylierten Stellen auf, wobei die Aminosäuren, die das palmitoylierte Cystein umgeben, meist basisch oder hydrophob sind.⁴²

Die Frage, ob der Acyltransfer enzymatisch^{43,44} oder spontan^{45,46} verläuft, wurde lange kontrovers diskutiert, bis im Jahr 2002 die ersten Palmitoyltransferasen (PAT) in Hefen identifiziert wurden. Mithilfe einer nicht farnesylierten Ras2-Mutante, die aber palmitoyliert wird und deren Palmitoylierung essentiell für das Überleben der Hefe ist, wurde ein Komplex aus Erf 2 und Erf 4 (**E**ffect on **R**as **f**unction)⁴⁷ und Ark 1⁴⁸ als potentielle Palmitoyltransferasen gefunden. Erf 2 und Ark 1 waren die ersten Mitglieder einer neuen Proteinfamilie, die sich durch ein 50 Reste großes, zinkfingerähnliches DHHC-CRD-Motiv (Aspartat-Histidin-Histidin-Cystein – cysteinreiche Domäne) auszeichnet. Neben dieser Domäne weisen diese integralen Membranproteine wenig bis keine Homologie auf, jedoch geht man davon aus, dass sie eine ähnliche Topologie mit vier oder mehr Transmembrandomänen haben, wobei die DHHC-Domäne zum Zytoplasma orientiert ist.⁴⁹ Eine Analyse mithilfe des BLAST-Algorithmus identifizierte neben Erf 2 und Ark 1 fünf weitere DHHC-Proteine in Hefen und 23 DHHC-Proteine im menschlichen Genom.⁴¹ Daher könnte man vermuten, dass die Regulation der Acylierung über eine eventuelle Substratspezifität der DHHC-Proteine erfolgt. Alternativ könnte die Regulation dieser Lipidmodifikation auch auf dem Level der Deacylierung stattfinden. Dieser Prozess verläuft zweifelsfrei enzymatisch, wobei bisher erst zwei Thioesterasen gefunden wurden, die die Deacylierung katalysieren. Bei APT 1 (**A**cy**P**rotein**T**hioesterase 1) handelt es sich um ein zytosolisches Protein der Größe 24 kDa, das ursprünglich als Lysophospholipase I aus

Rattenleber isoliert wurde,⁵⁰ jedoch eine höhere Substrataffinität für palmitoylierte Proteine aufweist.⁵¹ In *in vitro*-Testverfahren wurde relativ niedrige Substratspezifität festgestellt. Verschiedenste Proteine wie Ras,⁵¹ die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine,^{51,52} eNOS⁵³ sowie verschiedene virale Proteine⁵⁴ werden *in vitro* durch APT 1 deacyliert, die biologische Relevanz bleibt jedoch fraglich. In zellbasierten Assays konnte APT 1 als Thioesterase bestätigt werden, im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen wurde hierbei eine gewisse Spezifität festgestellt.⁴⁰ Weiterhin unterscheidet sich die Effizienz der Deacylierung, beispielsweise werden die $G\alpha$ -Untereinheiten in Hefen 70 mal schneller depalmitoyliert als Ras.⁵² In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Deacylierung von $G\alpha_{i1}$ in Hefen, deren *apt 1*-Gen ausgeschaltet worden war, nicht mehr stattfand, wohingegen die Deacylierung von H-Ras unbeeinträchtigt blieb.⁵² Die Kristallstruktur der humanen APT 1 wurde im Jahr 2000 gelöst, und das Protein konnte der großen Klasse der α/β -Hydrolasen mit der klassischen katalytischen Triade, Serin-114, Histidin-203 und Aspartat-169, zugeordnet werden.⁵⁵ Durch eine Suche mithilfe des BLAST-Algorithmus wurden APT 1-Sequenzhomologe in einer Vielzahl von Spezies, in Menschen, Säugern bis hin zu niederen Organismen gefunden.⁵⁵ Die zweite Thioesterase, PPT 1 (Protein-Palmitoyl-Thioesterase 1), die isoliert werden konnte, gehört zu den lysosomalen Proteinen und ist daher vermutlich am lysosomalen Abbau acylierter Proteine beteiligt.^{40,56}

Neben der Membranassoziation kann durch die Acylierung auch die Stabilität und Lokalisierung von Proteinen reguliert werden.⁵⁷ So kann Acylierung als Qualitätskontrolle fungieren. Beispielsweise wird die Chitinsynthase Chs 3 der Hefe nur palmitoyliert, wenn das Protein mit seinen sechs bis acht Transmembrandomänen korrekt gefaltet ist.⁵⁸ Ein weiteres Beispiel, in dem die Palmitoylierung den Abbau des Proteins verhindert, ist das transmembrane SNARE Protein Tlg 1, das am Golgi zu finden ist. Nur im nicht-palmitoylierten Zustand erfolgt eine Wechselwirkung mit der E3-Ubiquitinligase und somit der Proteinabbau.⁵⁹ Bei der Lokalisation von Proteinen, vor allem der kleinen GTPasen H-Ras und N-Ras, spielt die dynamische Acylierung eine entscheidende Rolle. Da der Acylierungszyklus von essentieller Bedeutung für diese Arbeit ist, wird er im folgenden Kapitel detailliert erläutert.

1.3 Der Acylierungszyklus

Aufgrund der reversiblen Natur der Acylierung lässt sich durch das Anbringen bzw. das Entfernen des Palmitoylrestes die subzelluläre Lokalisation von Proteinen regulieren. Mithilfe semisynthetischer, fluoreszenzmarkierter Proteinsonden gelang die Aufklärung des Acylierungszyklus, der die Lokalisation palmitoylierter Proteine in der Zelle bestimmt. Es konnte durch semisynthetische N-Ras-Derivate gezeigt werden, dass nicht nur ein zweiter Lipidanker für die korrekte Lokalisation nötig ist, sondern die dynamische De- und Repalmitoylierung dafür von essentieller Bedeutung ist. Nach Mikroinjektion einer palmitoylierten und farnesylierten Sonde, die dem natürlichen Protein

entspricht, stellte sich binnen kürzester Zeit der Gleichgewichtszustand ein, bei dem das Protein vorwiegend am Golgi-Apparat und an der Plasmamembran zu finden ist. Mithilfe von FRAP-Experimenten (Fluorescence recovery after photobleaching), bei denen die Fluoreszenz am Golgi ausgelöscht wurde, ließ sich die Dynamik des Systems untersuchen.⁶⁰ Bereits nach zwei Minuten beobachtete man deutlich eine Wiederkehr der Fluoreszenz, die von Proteinen stammt, die zuvor an der Plasmamembran lokalisiert waren, depalmitoyliert wurden und anschließend wieder zum Golgi zurücktransportiert wurden, um erneut palmitoyliert zu werden und über den sekretorischen Weg wieder an die Plasmamembran zu gelangen (Abbildung 6 A). Wurde jedoch ein hexadecyliertes N-Ras-Derivat injiziert, das aufgrund der stabilen Thioetherbindung nicht hydrolysiert werden kann, so führte dies zu unspezifischer Verteilung über alle Endomembranen. Bevor die Fluoreszenz am Golgi-Apparat ausgelöscht wurde, waren aufgrund der wahllosen Verteilung einige Proteine auch am Golgi lokalisiert, jedoch wurde nach der Auslöschung keine Rückkehr der Fluoreszenz am Golgi beobachtet, da die Proteine aufgrund der doppelten Lipidverankerung in den jeweiligen Membrankompartimenten blieben (Abbildung 6 B).⁶¹

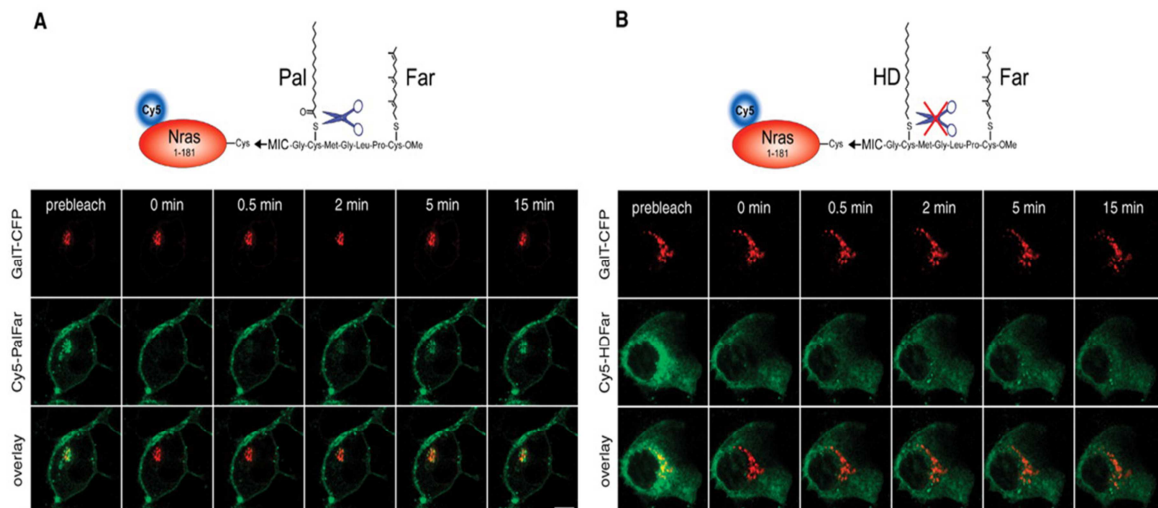


Abbildung 6: Der dynamische De/Repalmitoylierungszyklus bestimmt die Lokalisation von Ras-Proteinen in ihrem Gleichgewichtszustand. A) Mikroinjektion in GalT-CFP transfizierte MDCK-Zellen und FRAP-Untersuchung eines Cy5-markierten, palmitoylierten und farnesylierten N-Ras-Proteins. In seiner typischen Lokalisation akkumuliert das Protein am Golgi und an der Plasmamembran. Nach Auslöschung der Fluoreszenz am Golgiapparat kehrt die Fluoreszenz wieder zurück und das Gleichgewicht stellt sich wieder ein. B) Mikroinjektion in GalT-CFP transfizierte MDCK-Zellen und FRAP-Untersuchung eines Cy5-markierten N-Ras-Proteins, das C-terminal einen nicht hydrolysierbaren Hexadecyl- und Farnesyrest trägt. Das Protein verteilt sich unspezifisch über die Endomembranen.⁶⁰

In folgenden Experimenten mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten, semisynthetischen Proteinsonden stellte man fest, dass die Palmitoylierung auf den Golgi beschränkt ist, wohingegen die Depalmitoylierung überall in der Zelle stattfinden kann. Zuvor war man davon ausgegangen, dass auch die Depalmitoylierung ortsgebunden sei und nur an der Plasmamembran auftrete. Beide Reaktionen laufen nicht stereoselektiv ab und scheinen sehr substrattolerant zu sein. Auch

Proteinsonden, deren C-Terminus aus D-konfigurierten bzw. aus β -Aminosäuren aufgebaut worden war, wurden de- bzw. repalmitoyliert und zeigten die gleiche Lokalisation, wie das natürliche Protein. Mithilfe einer C-terminalen H-Ras-Sequenz, die an ein GFP-Protein ligiert worden war und immer noch die gleiche Lokalisation am Golgi-Apparat und der Plasmamembran, wie das natürliche Ras-Protein aufwies, konnten eventuelle Wechselwirkungen der Maschinerie mit dem Protein ausgeschlossen werden. Sowohl die Palmitoylierung als auch die Depalmitoylierung laufen binnen Sekunden ab, sodass durch dieses Zusammenspiel und die rasche Kinetik das kontrollierte Zurückführen misslokalisierter Proteine über das Golgiverteilungssystem ermöglicht wird. Der gerichtete Transport sorgt dabei für den Erhalt eines angemessenen Gleichgewichtszustands. Die (De-) Acylierungsmaschinerie unterscheidet sich somit grundlegend von konventionellen Rezeptor-mechanismen und wirkt der unspezifischen, entropiegetriebenen Umverteilung palmitoylierter peripherer Membranproteine über alle Endomembranen durch spontanen Membranaustausch entgegen.^{60,62,63}

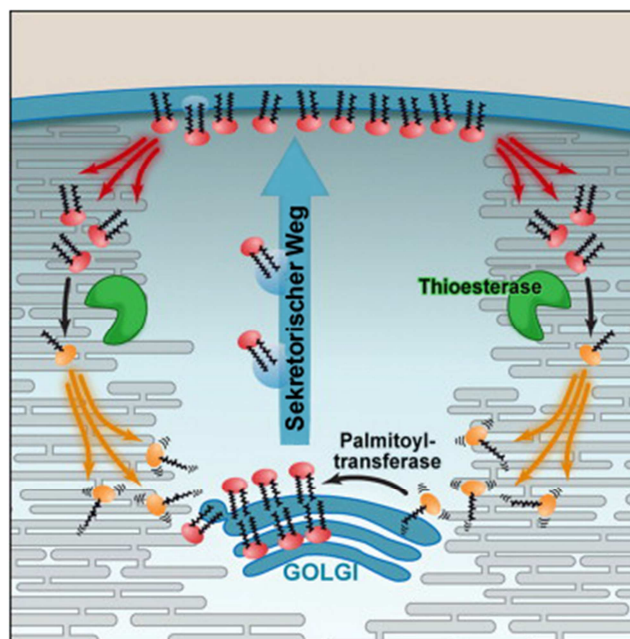


Abbildung 7: Der Acylierungszyklus peripherer Membranproteine.⁶³ Die Palmitoylierung findet nur am Golgi-Apparat statt, wohingegen die Depalmitoylierung überall in der Zelle, katalysiert durch Thioesterasen, abläuft. Nach der Palmitoylierung werden die doppelt lipidierten Proteine über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert.^{62,63}

Für den chemisch-biologischen Ansatz, der für die Aufklärung des Acylierungszyklus verfolgt wurde, war sowohl die Synthese einfach und doppelt lipidierter Peptide als auch deren Ligation an Proteine nötig. In den beiden folgenden Unterkapiteln sollen zum einen die Methoden für die Synthese verschiedener Lipopeptide vorgestellt und zum anderen auf die Möglichkeiten der Proteinsemisynthese eingegangen werden.

1.4 Synthese lipidierter Peptide

Bei der Synthese lipidierter Peptide können verschiedene Strategien verfolgt werden. Zum einen unterscheidet man zwischen der Synthese an fester Phase oder in Lösung, zum anderen zwischen der Einbringung der Lipidreste in Form von prälipidierten Bausteinen oder der Lipidierung des zuvor aufgebauten Peptids. Bei der Synthese an der Festphase müssen neben der temporären Schutzgruppe, bei der zwischen der *tert*-Butoxycarbonyl- (Boc) und der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc) Gruppe unterschieden wird, auch die permanenten Schutzgruppen sowie der Linker entsprechend des Lipidierungsmusters gewählt werden. Die folgenden Kriterien gilt es dabei zu beachten:

- Prenylreste sind säurelabil und erlauben nur den Einsatz von maximal 1 % Trifluoressigsäure. Anderenfalls kann die Säure die Doppelbindung angreifen und zu Isomerisierung führen.⁶⁴
- Die Doppelbindungen der Prenylreste sind weiterhin ein Grund für die Vermeidung hydrogenolytisch spaltbarer Schutzgruppen.
- *S*-Palmitoylierte Peptide stellen aufgrund des gegen Nukleophile labilen Thioesters⁶⁵ eine besondere Herausforderung dar. Wenn die α -Aminogruppe des acylierten Cysteins ungeschützt vorliegt, kann es zu einer schnellen *S, N*-Verschiebung des Thiolrestes auf die Aminogruppe kommen.
- Bei prenylierten Dipeptiden mit einem *C*-terminalen Methylester kann nach *N*-terminaler Entschützung schnelle Diketopiperazinbildung auftreten.

Die Strategie für den Aufbau lipidierter Peptide ist abhängig von der Anzahl und Art der Lipide. *N*-myristoylierte Peptide stellen die einfachste Klasse der Lipopeptide dar, da der Lipidrest am *N*-Terminus als letzter Schritt der Synthese eingeführt wird. Für den Aufbau *S*- und *O*-palmitoylierter Peptide bietet sich aufgrund der Säurestabilität der (Thio-)Ester die Boc-Schutzgruppenstrategie an. Die *O, N*- und auch die noch schnellere *S, N*-Verschiebung auf die α -Aminogruppe des acylierten Serins bzw. Cysteins stellt bei der Verwendung prälipidierter Bausteine eine besondere Herausforderung dar. Wie zuvorstehend erwähnt, muss beim Einbringen von Prenyleinheiten auf die Säureempfindlichkeit dieses Restes geachtet werden. Der Einbau verschiedener Lipidgruppen kann je nach Zusammensetzung anspruchsvolle Synthesestrategien erfordern. Eine Kombination aus dem säurelabilen Farnesylrest und dem nukleophilempfindlichen Palmitoylrest stellt eine besondere Herausforderung dar, die besonders milder und selektiver Schutzgruppen bedarf, die mit beiden Lipidmodifikationen kompatibel sind. Für die Schützung von Amino- bzw. Carboxylfunktionen haben sich palladium(0)-sensitive Schutzgruppen, wie der Allylester (All) und die Allyloxycarbonylurethangruppe (Aloc), bewährt.⁶⁶⁻⁶⁹ Alternativ können sowohl die Amino- als auch die Carboxylfunktion mit enzymlabilen Schutzgruppen versehen werden. Die *p*-Acetoxybenzyloxycarbonyl-

urethangruppe (AcOZ) wurde für die Maskierung der Aminofunktion und die Cholinestergruppe zum Schutz der Carboxylgruppe entwickelt. AcOZ wird bei pH 5 - 6 von einer Lipase aus *Mucor miehei* oder einer Acetylerase aus Orangenschale gespalten. Der Cholinester lässt sich unter neutralen Bedingungen durch Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase spalten. Beide enzymatisch spaltbaren Gruppen wurden für die Synthese des C-terminalen N-Ras-Heptapeptides genutzt.^{65,70} In der Synthese des N-myristoylierten und zweifach S-palmitoylierten N-Terminus der α -Einheit des humanen G_{αo}-Proteins wurde erfolgreich eine Kombination von Schutzgruppen eingesetzt, die palladiumkatalysiert und enzymvermittelt gespalten werden.⁷¹

1.4.1 Synthese lipidierter Peptide an fester Phase

Bei der Lipopeptidsynthese an der Festphase wird zwischen zwei generellen Vorgehensweisen unterschieden. Der Lipidrest kann entweder über prälipidierte Bausteine eingebracht werden oder die Lipidierung findet nach Aufbau des Peptids an fester Phase statt. Normalerweise werden Lipidierungen an der Festphase mit einem großen Überschuss an Lipidierungsreagenz durchgeführt. Dies kann im Falle von teuren Reagenzien, wie isotope markierten Resten problematisch werden. Alternativ kann ein Dehydroalanin in die Sequenz eingebracht werden, welches anschließend von einem Thio-Nukleophil angegriffen wird.⁷² Eine weitere Option wurde 2001 von W. van der Donk entwickelt, wobei Aziridin-2-carbonsäuren in die Sequenz eingebaut wurden. Aufgrund der elektrophilen Struktur der nicht-proteinogenen Aminosäure reagiert sie stereospezifisch mit Thiolnukleophilen, wie beispielsweise anomeren Kohlenhydratthiolen, Farnesylthiol und einem biotinylierten Thiol.⁷²

Im Gegensatz dazu kann der Einbau der Lipide über zuvor lipidierte Bausteine erfolgen. Diese Strategie ermöglicht den Einbau von Reportergruppen, die für biologische Studien genutzt werden.⁷³

Linkersysteme für die Festphasensynthese lipidierter Peptide

Das Prinzip der Peptidfestphasensynthese beruht auf der kovalenten Immobilisierung einer Aminosäure über die Carboxylfunktion an einem polymeren Träger, wobei die α -Aminogruppe mit einer temporären Gruppe blockiert wird. Die Verankerung des Reaktionsproduktes am Harz erlaubt den Einsatz großer Reagenzienüberschüsse, sodass eine vollständige Kupplung erreicht werden kann. Im Anschluss an die Reaktion lassen sich Reaktionsrückstände durch Filtration entfernen und aufwendige Aufreinigungsverfahren werden vermieden. Nach Entfernung der Schutzgruppe wird die nächste Aminosäure gekuppelt, bis nach dem Aufbau der gewünschten Peptidsequenz die kovalente Bindung zwischen dem polymeren Träger und dem Produkt selektiv gespalten wird. Auch auf dem Gebiet der Lipopeptide hat sich der Schwerpunkt auf die Synthese an der Festphase verlagert, und es besteht großes Interesse an der Entwicklung effizienter Festphasenmethoden. Ein ideales Linkersystem sollte orthogonal zu den permanenten und temporären Schutzgruppen sowie zu den

verschiedenen Lipidresten sein, wobei auch die Abspaltungsbedingungen mit den verschiedenen Lipiden kompatibel sein sollten und die Funktionalisierung des C-Terminus erlauben sollten (Abbildung 8). Verschiedene Linkersysteme wurden für Lipopeptide entwickelt.

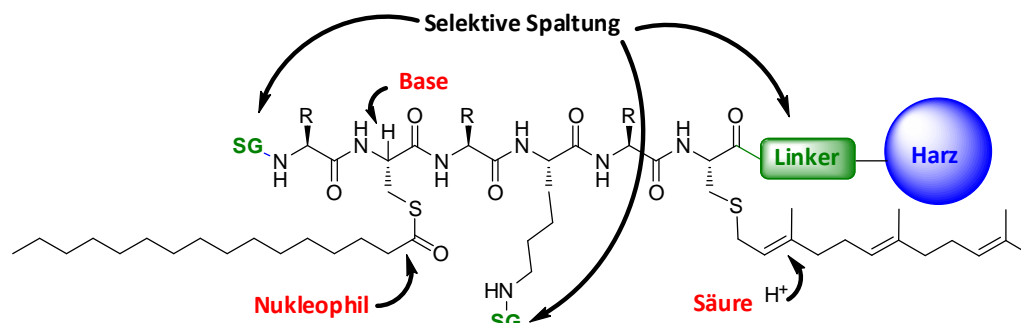


Abbildung 8: Überblick über die Anforderungen an ein ideales Linkersystem, das neben der Orthogonalität zu den verschiedenen Lipidresten auch Funktionalisierung in C-terminaler Richtung ermöglichen sollte.

Hydrazinlinker

Der oxidationslabile Hydrazinanker basiert auf Arbeiten von T. Wieland *et al.* aus dem Jahr 1970⁷⁴ und wurde für den Aufbau kleiner Peptidester und -amine genutzt.⁷⁵ Die Abspaltung der Peptide erfolgt dabei durch Oxidation des Linkers zum Acyldiazon, gefolgt vom Angriff eines geeigneten Nucleophils. Das Nucleophil, beispielsweise Wasser, ein Amin oder Alkohol, wird dabei am C-Terminus eingebaut. Man unterscheidet zwei Abspaltungsmethoden: zum einen die Oxidation durch Kupfer(II)acetat, Sauerstoff und einem Nucleophil und zum anderen eine zweistufige Variante, bei der zunächst mit *N*-Bromsuccinimid oxidiert und anschließend ein geeignetes Nucleophil hinzugegeben wird. Das Linkersystem ist orthogonal zu den klassischen Urethanschutzgruppen, wie Fmoc, Boc und Alloc und man beobachtet keine Racemisierung während der Abspaltung. Die Vorzüge des Arylhydrazinlinkers kommen bei der Synthese lipidierter Peptide, besonders bei C-terminalen Peptiden der Ras-Superfamilie, zum Tragen, da dieser die Möglichkeit der Einführung eines C-terminalen Methylesters, bei Verwendung von Methanol als Nucleophil, bietet. In Abbildung 9 ist eine repräsentative Sequenz veranschaulicht. Ausgehend von kommerziell erhältlichem 4-Fmoc-Hydrazinbenzoylharz wird in iterativen Zyklen aus Fmoc-Entschützung und Kupplung der jeweiligen Fmoc-Aminosäure das Peptid aufgebaut. Die lipidieren Cysteine werden aufgrund ihrer hohen Racemisierungstendenz unter Verwendung einer äquimolaren Menge Collidin, HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) und HOBt (Hydroxybenzotriazol) in einem Gemisch aus Dichlormethan und DMF (1:1) über Nacht gekuppelt.⁷⁶ Nach der Einführung des

palmitoylierten Cysteins besteht die Gefahr einer *S, N*-Verschiebung, sodass die Fmoc-Entschützung mit einer 1 % DBU enthaltenden DMF-Lösung zügig durchgeführt wird und die folgende Kupplung der Aminosäure mit 5 Äquivalenten HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) in Gegenwart von 20 Äquivalenten DIPEA in einem Gemisch aus Dichlormethan/DMF (7:1) erfolgt.⁷⁷ Die Abspaltung wird durch Oxidation mittels Kupfer(II)acetat und Sauerstoff mit Methanol als Nukleophil erreicht. Diese Methode bietet Zugang zu doppelt lipidierten Peptiden mit C-terminalen Methylestern. Jüngste Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass zum Teil beobachtete niedrige Ausbeuten sich auf eine während der Abspaltung stattfindende Nebenreaktion zurückführen lassen, bei der das Peptid nach oxidativer Abspaltung über eine noch nicht näher charakterisierte Bindung wieder am polymeren Träger immobilisiert wird.⁷⁸

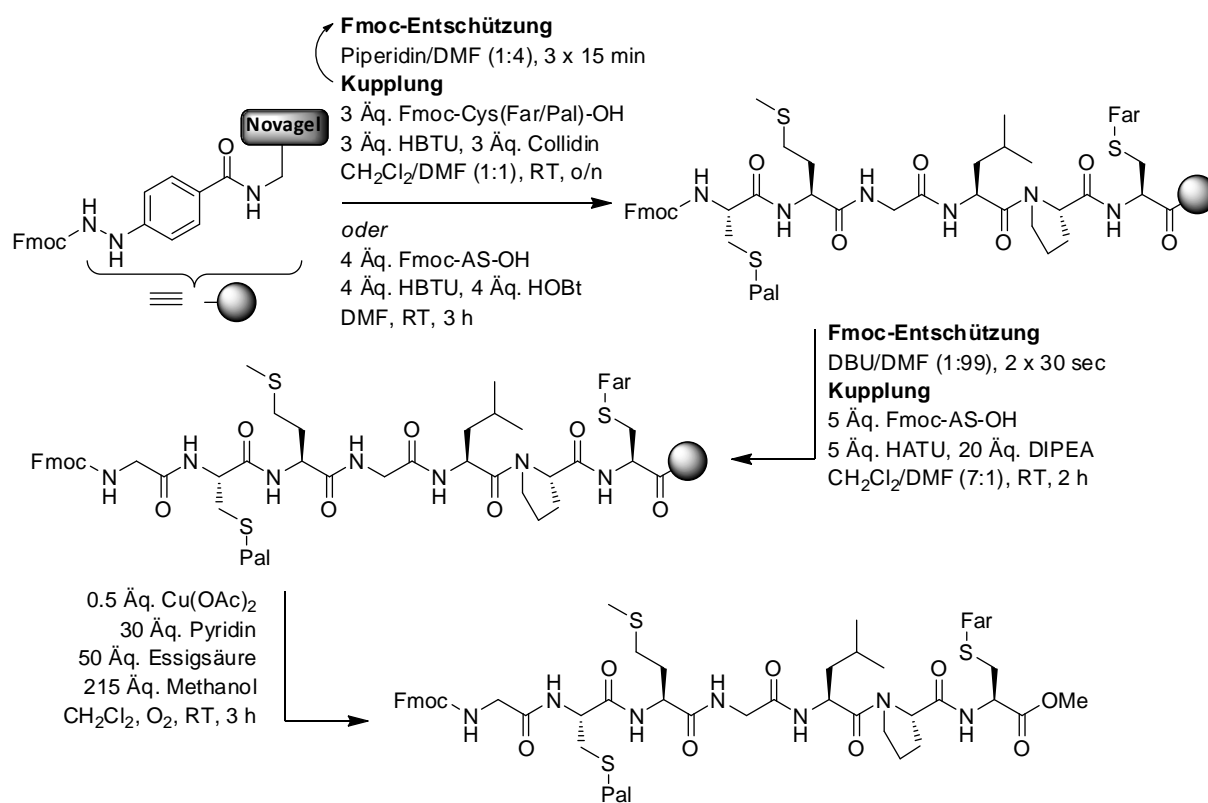


Abbildung 9: Synthese des Heptapeptids des N-Ras C-Terminus am Hydrazinlinker.⁷⁷

Ellman-Sulfonamidanker

Dieser Safety-Catch Anker, der ursprünglich von G. W. Kenner⁷⁹ entwickelt und später von J. A. Ellman⁸⁰ optimiert wurde, stellt aufgrund seiner Stabilität unter sauren und basischen Bedingungen ein attraktives System für die Synthese von Lipopeptiden dar. Sein Vorteil liegt in der

Stabilität sowohl während der Entschützung der temporären Schutzgruppe als auch während der Kupplung der Aminosäure. Diese lässt sich durch selektive Alkylierung nach Ende der Peptidkettenverlängerung aufheben und ermöglicht anschließend durch den nukleophilen Angriff von beispielsweise Wasser, Aminosäuremethylestern oder Thiolen die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger. Eine Auswahl lipidierter Peptide konnte unter Verwendung dieses Linkers synthetisiert werden,⁸¹ jedoch wurden in einer umfangreichen Studie mehrere Schwachstellen des Ankersystems entdeckt und optimiert.⁸² Neben den Beladungsbedingungen, wurden die Verlängerung der Peptidkette und die Abspaltbedingungen untersucht und optimiert. Die Überführung der zu immobilisierenden Aminosäure, speziell eines lipidierten Cysteins, in ein Acylfluorid ermöglichte dabei die Beladung des Sulfonamidharzes ohne Racemisierung und in guter Ausbeute. Die anschließenden Aminosäuren sollten idealerweise mit DIC (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimid) und HOBT gekuppelt werden, um Nebenreaktionen mit dem Linker zu vermeiden. Durch Alkylierung wird das zuvor stabile Acylsulfonamid angreifbar für Nucleophile und führt so zur Abspaltung des Peptids. Die Abspaltung als Ester stellt aufgrund der schwachen Nucleophilie der Alkohole eine besondere Herausforderung dar. Dies kann durch Einsatz katalytischer Mengen DMAP kompensiert werden, jedoch führt dies auch zu erheblicher Racemisierung der C-terminalen Aminosäure. In einer racemisierungsfreien Alternative wird der aktivierte Linker nukleophil von der Aminogruppe der C-terminalen Aminosäure, die als Methylester eingesetzt wird, angegriffen.

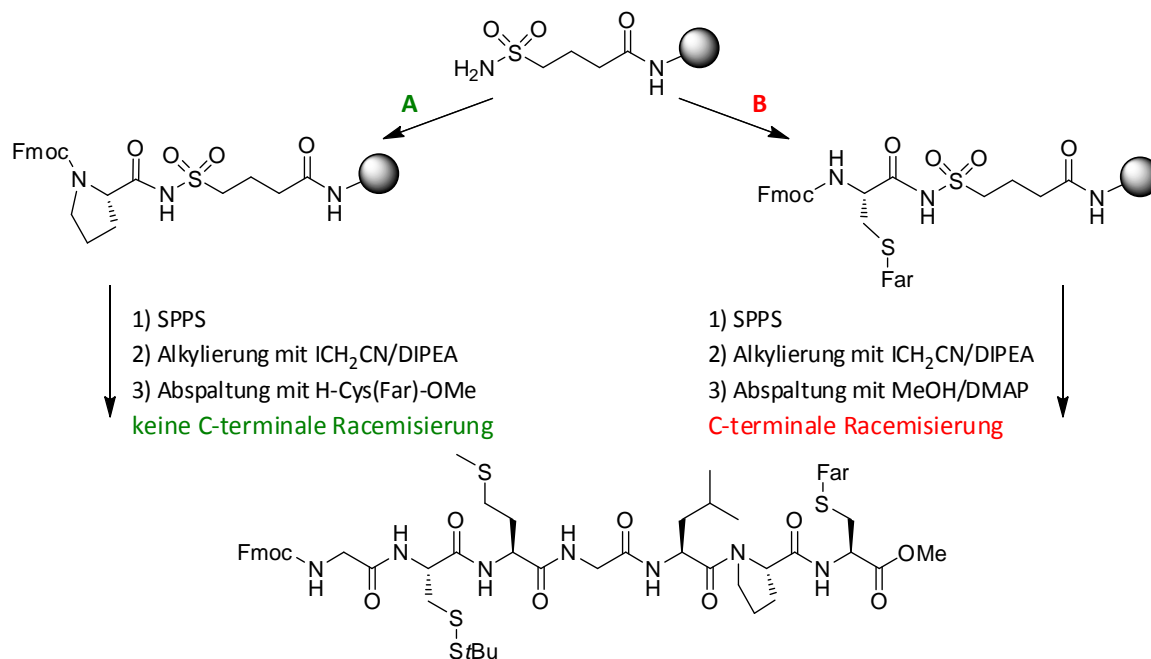


Abbildung 10: Allgemeine Synthesewege zu lipidierten Peptiden am Sulfonamidanker. Weg A führt unter nukleophilen Angriff des Cysteinmethylesters zum gewünschten Peptid. Bei Weg B tritt wegen des schwachen Nucleophils Methanol C-terminale Racemisierung auf.⁸²

Tritylanker

Für die Synthese säureempfindlicher Sequenzen hat sich der mit 1 % Trifluoressigsäure abspaltbare Trityllinker bewährt, jedoch wird das Peptid hierbei immer als freie Säure erhalten. Eine Alternative für die Einführung C-terminaler Funktionen bietet die Verankerung der vorletzten Aminosäure einer Sequenz am Harz. Im Fall von polybasischen Sequenzen, wie K-Ras 4B, Rho A oder D-Ral, gelang dies erfolgreich über die Verankerung der ϵ -Aminogruppe des C-terminalen Lysins^{67,83} und erst kürzlich wurde die C-terminale Sequenz von Rheb mittels Immobilisierung der Hydroxygruppe des C-terminalen Serins am Tritylharz aufgebaut.⁶⁸ Hierfür wurde das entsprechende Serin mit einem Allylester immobilisiert, der anschließend palladium(0)-katalysiert gespalten wurde. Durch Umsetzung der freien Carbonsäure mit einem farnesylierten Cysteinmethylester konnte die C-terminale Funktionalisierung eingeführt werden, bevor in N-terminaler Richtung unter Verwendung der Standard-Fmoc-Festphasenbedingungen die Peptidsynthese fortgesetzt wurde. Die Abspaltung fand unter sehr milden Bedingungen mit 1 % Trifluoressigsäure und einem Scavenger statt. Speziell für polybasische Lipopeptidsequenzen hat sich diese Strategie als sehr effizient erwiesen.

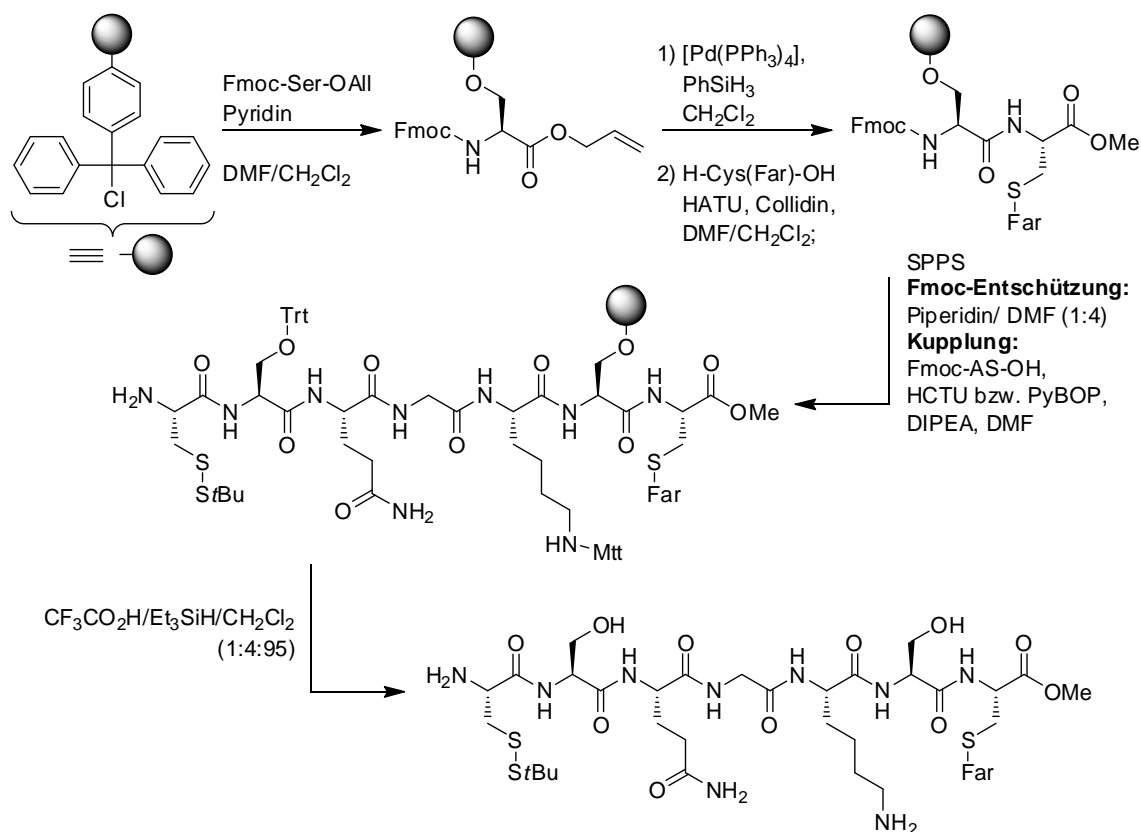


Abbildung 11: Synthese der farnesylierten, carboxymethylierten, C-terminalen Sequenz von Rheb.⁶⁸

1.5 Proteinsemisynthese

Für biologische Studien der Ras-Proteine ist die Verwendung vollständig posttranslational modifizierter Proteine essentiell, da ihre Lokalisation in erster Linie von dem lipidierten und carboxymethylierten C-Terminus bestimmt wird. Da diese posttranslationalen Modifikationen nur in Eukaryoten und nicht in prokaryotischen Systemen, wie *E. coli*, auftreten, sind vollständig lipidierte Ras-Proteine über klassische molekularbiologische Verfahren meist nur heterogen und in sehr geringen Ausbeuten zugänglich.⁸⁴ Eine Alternative bietet die Proteinsemisynthese, die biologische Methoden und organische Synthese miteinander verbindet und somit Zugang zu funktionalen semisynthetischen Proteinen ermöglicht. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über häufig verwendete Verfahren für die Proteinsemisynthese.

Native chemische Ligation (NCL) und Expressed Protein Ligation (EPL)

Die native chemische Ligation, die 1994 von S. B. H. Kent *et al.* entwickelt wurde, zählt zu den leistungsfähigsten und praktikabelsten Methoden, um Peptidfragmente miteinander zuverknüpfen.⁸⁵ Essentiell für die Ligation sind ein N-terminales Cystein in einem Fragment und ein C-terminaler Thioester in dem anderen Fragment. Die stattfindende Reaktion wurde erstmals von T. Wieland *et al.* beobachtet, der 1953 „die Umlagerung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten“ beschrieb.⁸⁶ Die Thiolgruppe des Cysteins greift in einer Gleichgewichtsreaktion den Thioester an, wobei diese Reaktion zwischen allen in der Sequenz vorhandenen Cysteinen und dem Thioester stattfinden kann. Die Folgereaktion, eine S, N-Acylwanderung, kann jedoch nur zwischen dem N-terminalen Cystein und dem zugehörigen Thioester stattfinden, sodass auf Seitenschutzgruppen für Thiole verzichtet werden kann und auch nicht die Gefahr der Racemisierung besteht. Da die native chemische Ligation auf die Synthese kleiner Proteine bzw. von Proteindomänen im Größenbereich von ca. 15 kDa beschränkt ist, entwickelte T. Muir im Jahre 1998 eine effiziente Erweiterung der nativen chemischen Ligation, die die chemoselektive Addition synthetischer Peptidsequenzen an rekombinant exprimierte Proteine mit C-terminalen Thioester erlaubt.⁸⁷ Nach Klonierung in einem geeigneten Vektor, exprimiert man in *E. coli* ein dreiteiliges Fusionsprotein, das neben dem gewünschten Protein ein Intein und eine chitinbindende Domäne (CBD) enthält. Über die chitinbindende Domäne erfolgt die Aufreinigung an einem Chitinharz, um durch die Zugabe von Thiolen, wie DTT, Thiophenol oder MESNA, den für die anschließende native chemische Ligation benötigten Thioester freizusetzen (Abbildung 12).

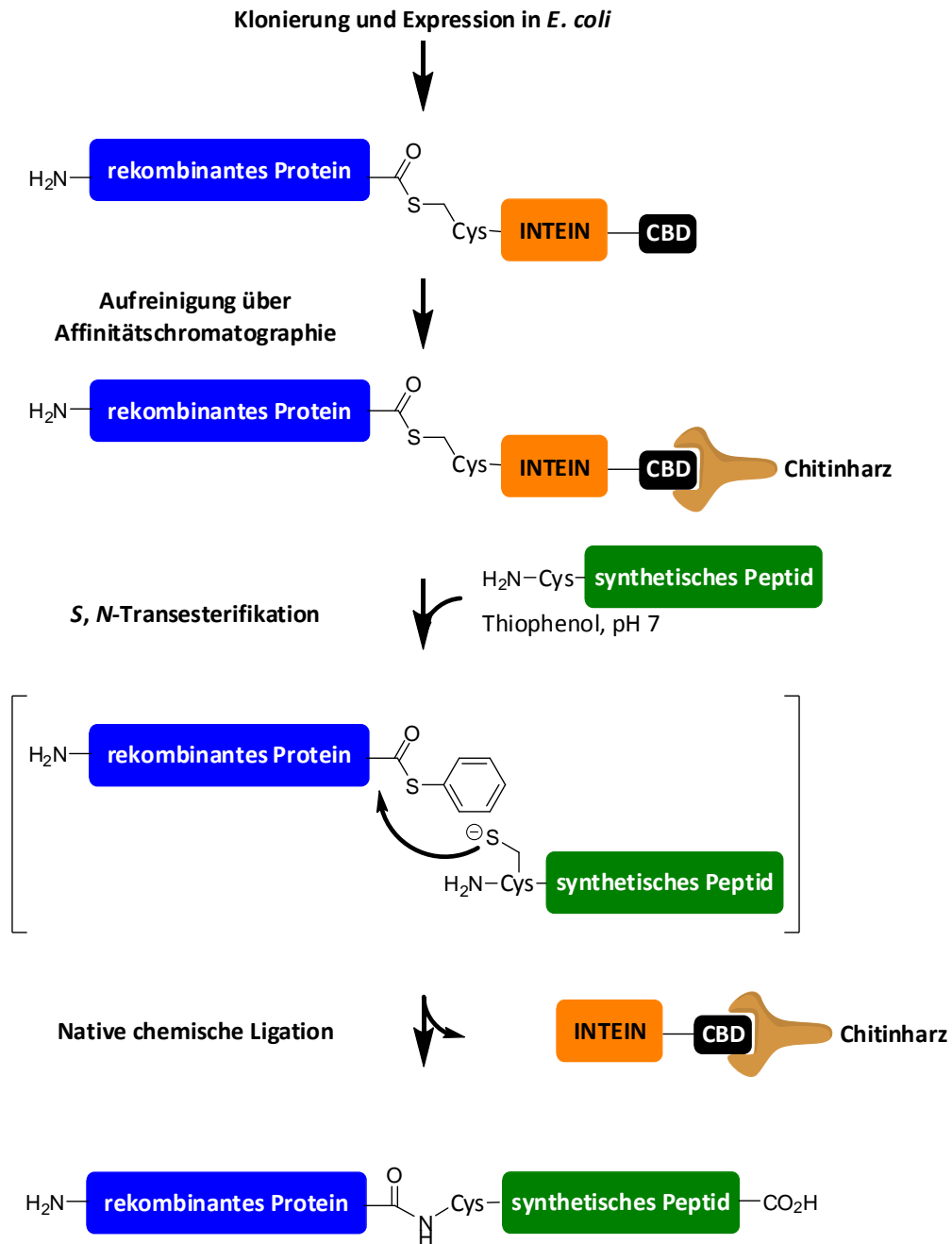


Abbildung 12: Prinzip der Expressed Protein Ligation in ihrer ursprünglichen Form. Der Thioester wird als dreigliedriges Fusionsprotein exprimiert, über Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels Thiolzugabe als Thioester abgespalten.⁸⁷

In den vergangenen zehn Jahren hat sich diese Methode zu einer der am weitesten verbreiteten in der Proteinbiochemie und chemischen Biologie etabliert. Sie ermöglicht die systematische Untersuchung von Proteinen, beispielsweise durch die Einbringung nicht-natürlicher Elemente oder Biomarker. Ein Beispiel aus der Semisynthese lipidierter Proteine ist die Synthese des farnesylierten und carboxymethylierten Rheb-Proteins, die im letzten Jahr durch erfolgreiche Expressed Protein Ligation verwirklicht wurde.⁶⁸

Staudinger-Ligation

Diese Ligation basiert auf der von H. Staudinger und J. Meyer entwickelten Reaktion zwischen einem Azid und Triarylphosphan.⁸⁸ Unter Abspaltung von Stickstoff bildet sich ein stabiles Iminophosphoran, auch Aza-Ylid genannt, das anschließend zu einem primären Amin und Phosphan(V)oxid hydrolysiert werden kann. Im Jahr 2000 nutzten C. R. Bertozzi *et al.* diese bioorthogonale Reaktion für die gezielte Zelloberflächenveränderung.⁸⁹ Die „spurlose“ Staudinger-Ligation bietet die Möglichkeit zwei Fragmente über eine natürliche Amidbindung miteinander zu verknüpfen, wobei im Gegensatz zur nativen chemischen Ligation kein *N*-terminales Cystein vorhanden sein muss (Abbildung 13).⁹⁰ Weitere Anwendung findet die Staudinger-Ligation in der Synthese von Glycopeptiden, Biokonjugaten und bei der Immobilisierung von Wirkstoffen auf phosphanderivatisierten dendrimerbeschichteten Glasoberflächen.^{91,92} Ein beeindruckendes Anwendungsbeispiel stellten R. T. Raines *et al.* vor, als sie Ribonuklease A in einer Kombination aus Staudinger-Ligation an fester Phase und nativer chemischer Ligation synthetisierten.⁹³

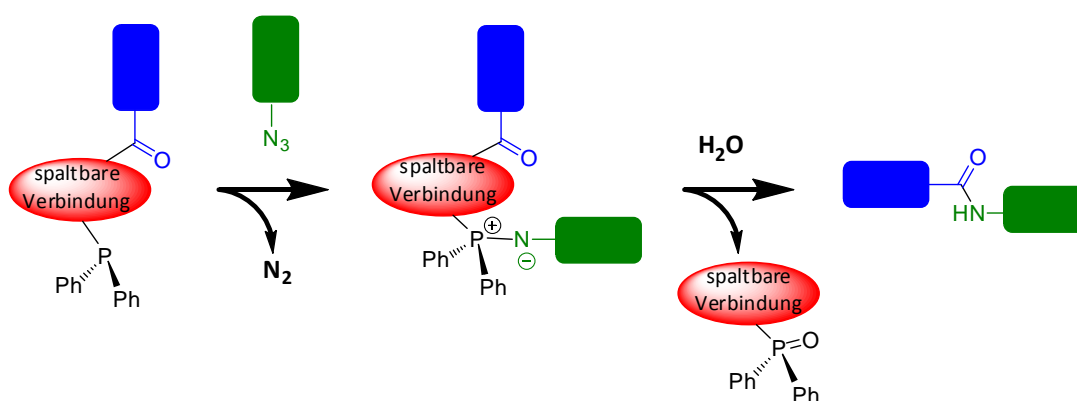


Abbildung 13: Prinzip der Staudinger-Ligation. Über eine native Amidbindung werden zwei nicht geschützte Fragmente miteinander verknüpft.

Maleimid-Ligation (MIC-Ligation)

Die Maleimid-Ligation findet seit Anfang der 1990er Jahre in der Konjugatchemie, beispielsweise bei der Synthese von Oligonucleotid-Enzym-Verbindungen, Anwendung.^{94,95} Speziell für die Semisynthese vollständig lipidierter H- und N-Ras-Proteine, die zuvor nur schwer und in heterogener Art zugänglich waren, hat sich diese Methode bewährt. In einer Michael-Addition wird das C-terminale Cystein eines zuvor in *E. coli* exprimierten, verkürzten N-Ras-Proteins ($\Delta 1-181$) mit einem synthetischen Lipopeptid, das eine Maleimidgruppe am N-Terminus trägt, verknüpft.^{66,96} Die Ligation verläuft selektiv mit dem C-terminalen Cystein des Proteins, da die anderen im Protein vorhandenen Cysteine unter den Ligationsbedingungen nicht zugänglich sind. Obwohl Maleimidgruppen auch mit Aminogruppen reagieren können, wird die Doppelbindung unter neutralen Bedingungen (pH 6.5 - 7.5) selektiv von Thiolen angegriffen. Des Weiteren reagiert die Maleimidgruppe 1000-mal schneller mit einem Thiol

als mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins.⁹⁷ Nach der Ligation wird das Lipoprotein vom nicht-ligierten Protein abgetrennt, indem man in einer Triton-Extraktion die unterschiedliche Hydrophobizität von Produkt und Edukt nutzt. Das lipidierte Protein reichert sich in der Tritonphase an und kann anschließend über Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden werden die Fragmente bei der MIC-Ligation nicht über eine natürliche Bindung verknüpft. Die Einführung der fünf Methylengruppen sowie des Maleimidrings hat jedoch keinen Einfluss auf die biologische Aktivität der Ras-Proteine. In biophysikalischen Untersuchungen interagierten die semisynthetischen Ras-Proteine in analoger Weise mit Effektoren, wie der Ras-bindenden Domäne (RBD) der Raf-Kinase, wie die exprimierten Ras-Proteine. Des Weiteren wurde auch in einem Differenzierungsassay in PC12-Zellen kein Unterschied zwischen dem exprimierten und semisynthetischen Ras-Protein festgestellt.⁹⁶ Durch die Kombination von Molekularbiologie und organischer Synthese ermöglicht die MIC-Ligation den Einbau nicht-natürlicher Gruppen in den C-Terminus. Beispielsweise wurden nicht hydrolysierbare Hexadecylreste anstelle des natürlichen Palmitoylrestes in das C-terminale N-Ras-Heptapeptid eingeführt, um im Anschluss an die Ligation den Einfluss der unterschiedlichen Lipidreste und des GTP/GDP-gebundenen Zustands auf die Membranlokalisation mittels Rasterkraftmikroskopie zu untersuchen (Abbildung 14).⁹⁸ Auch die Aufklärung des dynamischen Acylierungszyklus, der in Kapitel 1.3 erläutert wurde, wurde erst durch semisynthetische N-Ras-Proteine ermöglicht, deren C-Termini nicht-natürliche Modifikationen enthielten.^{60,63}

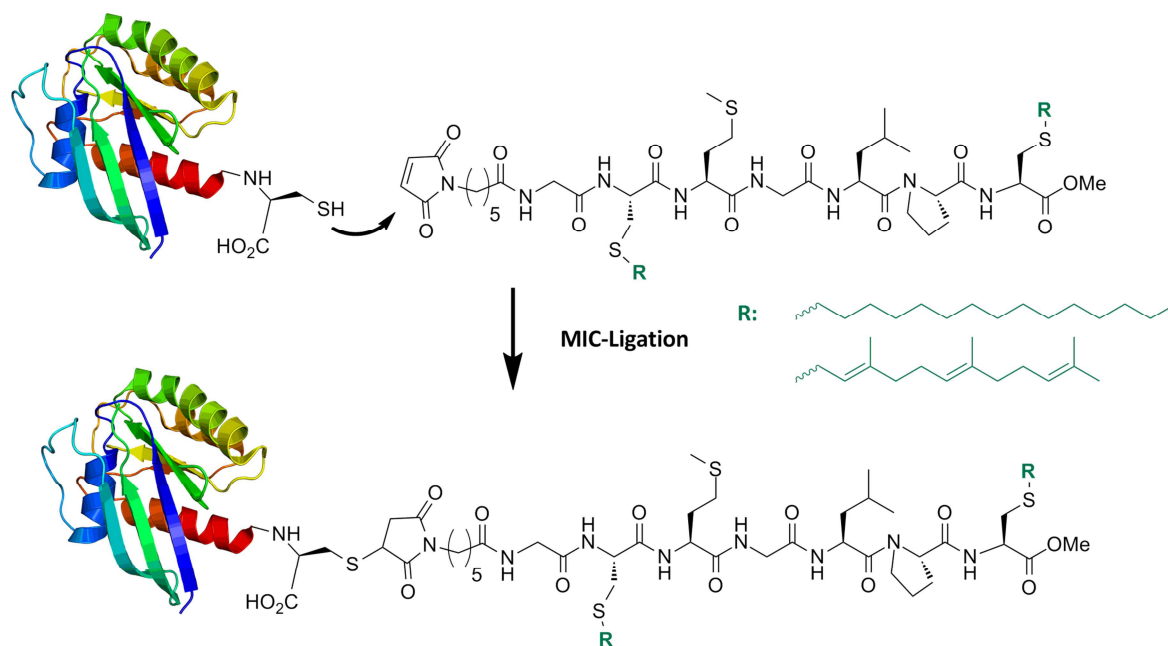


Abbildung 14: MIC-Ligation verschiedener N-Ras-Hybridproteine, die in Rasterkraftmikroskopiestudien verwendet wurden.⁹⁸

1.6 Peptoide

Peptoide wurden Ende der 1980er Jahre in dem Jungunternehmen Protos in Emeryville, CA entwickelt, um einen schnelleren Zugang zu neuen Wirkstoffen zu ermöglichen.⁹⁹ Im Gegensatz zu Peptiden ist die Seitenkette der α -Aminosäuren nicht mit dem α -Kohlenstoff, sondern mit dem Stickstoff verknüpft, sodass man Zugang zu nicht-chiralen, *N*-substituierten Oligoglycinen erhält (Abbildung 15). Der größte Vorteil dieser Peptidmimetikaklasse liegt in ihrer hohen metabolischen Stabilität gegenüber Proteasen, die sich durch die *N*-substituierte Struktur erklären lässt.¹⁰⁰⁻¹⁰²

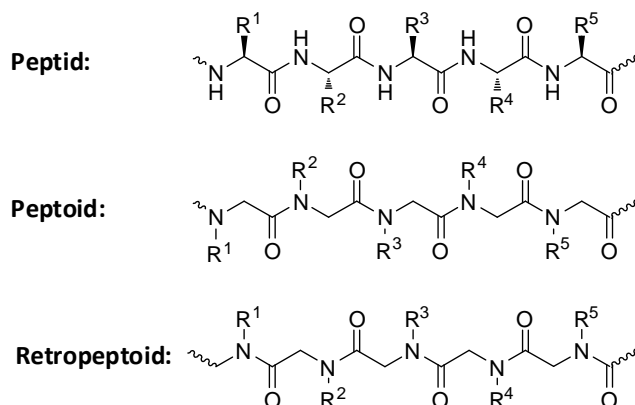


Abbildung 15: Allgemeine Struktur eines Peptids, Peptoids und Retropeptoids. Die Seitenkette der α -Aminosäure wird vom α -Kohlenstoff auf den Stickstoff verschoben.

Aufgrund der modularen Peptoidsynthese lassen sich durch das Einbringen verschiedener Alkylketten an der Aminogruppe schnell große kombinatorische Substanzbibliotheken aufbauen, die im Hochdurchsatzverfahren nach neuen biologisch aktiven Strukturen durchsucht und optimiert werden können. Erstmals erwähnt wurde der Begriff 1982 von P. S. Farmer und E. J. Ariens, die unter Peptoiden Peptidmimetika verstanden, die die biologische Funktion von Peptiden erfüllen, ohne diesen strukturell zu gleichen.¹⁰³ Da Peptide eine schlechte Bioverfügbarkeit aufweisen, wird nach Verbindungen gesucht, die die gleiche biologische Aktivität aber bessere Eigenschaften haben. Durch das Wegfallen des NH-Wasserstoffbrückendonors bei Peptoiden wird die Ausbildung sekundärer Strukturen, wie sie in Peptiden auftreten, verhindert. Dadurch sind Peptoide hydrophober, verfügen über bessere Zellpermeabilität und sind stabil sowohl gegenüber proteolytischen Abbau als auch gegenüber weiteren denaturierenden Bedingungen.

Peptoide finden hauptsächlich in der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen Anwendung. Da der direkte Einsatz von Peptiden bzw. Proteinen aufgrund des proteolytischen Abbaus stark limitiert ist, stellen Peptoide, als strukturelle Peptidisomere, ein leistungsfähiges Werkzeug für detaillierte Studien dar. Beispielsweise konnten in einer Substanzbibliothek mit ca. 5000 synthetischen dimeren und trimeren Peptoiden nanomolare Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit heptatransmembranen Domänen gefunden werden. Durch iterative Re-Synthese

wurde der in Abbildung 16 gezeigte Ligand für den α_1 -adrenergen Rezeptor identifiziert, auch wenn dieser relativ schlechte pharmakokinetische Eigenschaften aufwies.^{104,105} Weiterhin war durch den Einsatz von Peptoiden erstmals die Manipulation einer Protein-RNA-Wechselwirkung möglich. Das in Abbildung 16 auf der rechten Seite gezeigte Peptid/Peptoid-Hybrid ist ein nanomolarer Inhibitor der HIV-1 Tat/Tar-Interaktion, die von entscheidender Bedeutung für die Replikation des HI-Virus ist.¹⁰⁶ Mithilfe von Peptoidsequenzen konnte das Phänomen prolinreicher Erkennungssequenzen in regulierenden Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgeklärt werden. Zahlreiche Wechselwirkungen beruhen auf der Erkennung einer prolinhaltigen Sequenz. Beispielsweise binden SH 3-Domänen spezifisch Sequenzen mit einem PXXP-Motiv im mikromolaren Bereich. Diese Wechselwirkung beruht auf der Erkennung der *N*-Substitution und durch Einbringen spezifischer Peptoidseitenketten an der Position der Proline, den einzigen natürlich vorkommenden *N*-substituierten Aminosäuren, lässt sich die Bindungsaffinität der Peptid/Peptoidsequenzen deutlich, um bis zu 100-fach, erhöhen.^{107,108}

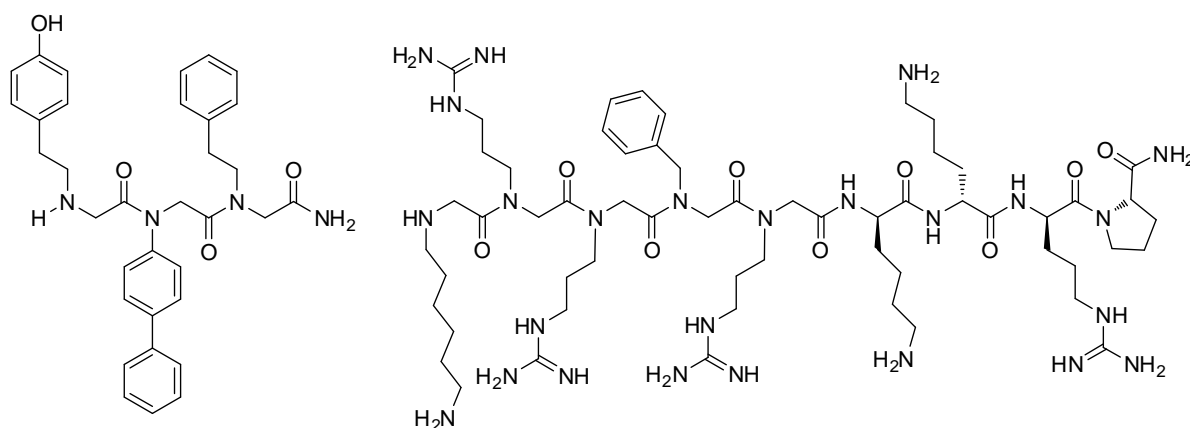


Abbildung 16: links: Ligand des α_1 -adrenergen Rezeptors¹⁰⁴; rechts: Inhibitor der HIV-1 Tat/Tar-Wechselwirkung.

Das Verschieben der Seitenkette vom Kohlenstoff auf den Stickstoff führt, wie bereits erwähnt, zu einem achiralen Rückgrat mit tertiären Amidbindungen. Diese weisen eine höhere Tendenz zur *cis/trans*-Isomerisierung als vergleichbare sekundäre Amidbindungen auf und verhindern die Ausbildung sekundärer Strukturen. Dennoch können auch Peptide unter bestimmten Bedingungen Sekundärstrukturen ausbilden, die mit denen der Polyprolinhelices vergleichbar und weitreichend lösungsmittel-, ladungs- und temperaturunempfindlich sind.¹⁰⁹ Statt der Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen hier sterische, hydrophobe, van-der-Waals oder elektrostatische Wechselwirkungen die Ausbildung sekundärer Strukturen. Kurze, heterooligomere Peptide bilden im Allgemeinen stabile α -Helices aus, wenn wenigstens 50 % der eingebauten Monomere α -chiral und aromatisch sind. Speziell im C-Terminus des Oligomers wirken die α -chiralen, aromatischen Reste helixstabilisierend, wobei sich diese Abschnitte periodisch wiederholen sollten, um die Wechselwirkung zwischen den aromatischen Flächen zu erhöhen.¹¹⁰

1.6.1 Peptidsynthese

Bei der Synthese von Peptoiden unterscheidet man zwei generelle Vorgehensweise, die Monomer- und die Submonomer-Strategie. Die Monomerstrategie wurde im Jahr 1992 von R. J. Simon *et al.* beschrieben, die sie für den Aufbau von zehn *N*-substituierte Oligoglycinen verwendeten und drei generelle Wege für die Darstellung der Peptoidmonomere vorstellten (Abbildung 17).¹⁰⁰ So können diese über reduktive Aminierung zwischen Glyoxylsäure und einem Amin hergestellt werden (Weg A), über Alkylierung eines Seitenkettenamins mit Chloressigsäure (Weg B) oder über eine Michael-Addition von Glycin an Acrylamid (Weg C). Die anschließende Umsetzung mit Fmoc-OSu liefert die Peptoidmonomere, die im Folgenden mittels standardisierter Peptidfestphasen-synthese zu Oligoglycinen zusammengefügt werden.

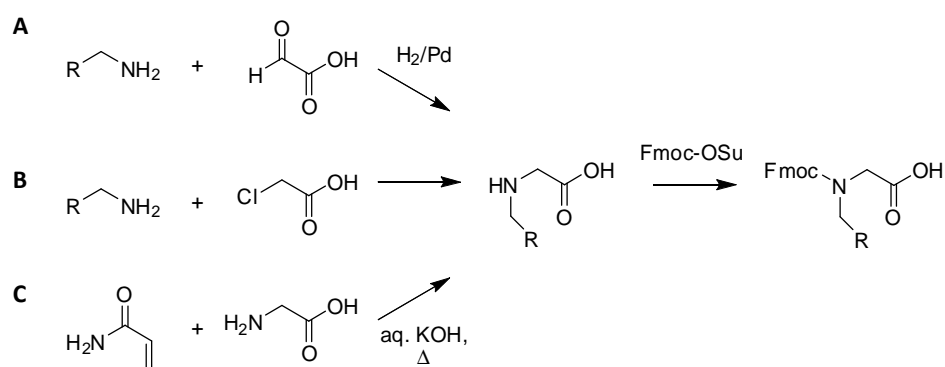


Abbildung 17: Synthesewege für die Darstellung der Peptoidmonomere.¹⁰⁰

Da Teile dieser Arbeit im Rahmen einer Kooperation mit R. M. J. Liskamp entstanden, wird im Folgenden die in seinem Arbeitskreis entwickelte Synthesestrategie näher erläutert.¹¹¹⁻¹¹³ Die dreistufige Synthese der Peptoidmonomere basiert auf dem in Abbildung 17 beschriebenen Weg B. Hierbei werden die meist kommerziell erhältlichen Amine in einer Substitutionsreaktion mit Bromessigsäureethylester in die *N*-substituierten Glycinester überführt, unter den von G. I. Tesser *et al.* entwickelten Bedingungen verseift¹¹⁴ und anschließend als Fmoc-Urethan geschützt. Die Bromessigsäure wird als Ester eingesetzt, um die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie zu erleichtern (Abbildung 18).¹¹² Diese Methode bietet einen effizienten Zugang zu Hybridsequenzen, die sowohl α -Aminosäure- als auch Peptideinheiten enthalten.

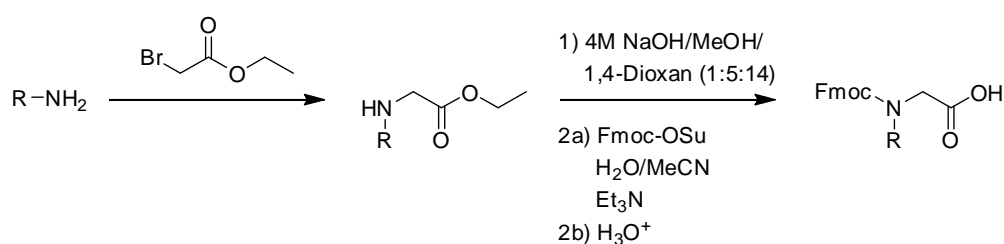
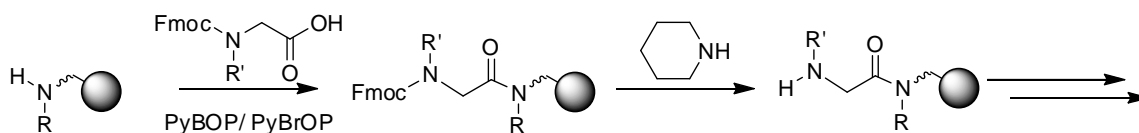


Abbildung 18: Dreistufige Peptoidmonomersynthese nach R. M. J. Liskamp *et al.*¹¹²

Der Aufbau der Oligomere unterteilt sich in abwechselnde Zyklen aus Fmoc-Entschützung und Monomerkupplung unter Verwendung von Reagenzien, wie PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat) bzw. PyBrOP (Bromo-tris-pyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat), die speziell für sterisch gehinderte oder N^α -disubstituierte Säuren entwickelt wurden (Abbildung 19). Durch den Einsatz schneller Syntheseroboter entwickelte sich die Monomersynthese bald zum Engpass der Peptidsynthese, was zur Entwicklung einer neuen effizienteren Synthese, der sog. Submonomer-Strategie führte.¹¹⁵ Bei dieser wird die Synthese der einzelnen Peptidmonomere vermieden, indem die N -substituierten Glycine aus zwei Unter-einheiten, einer α -Halogensäure sowie einem Amin, aufgebaut werden. Die Syntheserichtung verläuft, wie auch bei der normalen Peptidfestphasensynthese, vom C - zum N -Terminus. Inspiriert wurde diese Strategie durch Arbeiten von F. A. Robey und R. L. Fields, die N -Bromoacetylreste für Zyklisierungen und Peptid-Proteinkonjugate verwendeten¹¹⁶ und von E. Fischer, der in der Peptidsynthese Ammoniak zur Substitution von Haloalkylamiden einsetzte.¹¹⁷ Entsprechend erfolgt die Peptidbindung über eine Kondensationsreaktion zwischen der α -Halogensäure und dem immobilisierten Amin unter Verwendung von DIC als Kupplungsreagenz, sodass abwechselnde Copolymere zwischen Acetaten und Amineinheiten entstehen. Unter normalen Umständen kann die Acylierung eines sekundären Amins schwierig sein, aber durch Aktivierung mit DIC wird die α -Halogensäure zu einem stärkeren Acylierungsreagenz als aktivierte Carbonsäuren oder Aminosäuren. Dies lässt sich auf den elektronenziehenden Effekt des Halogens zurückführen und bewirkt meist eine vollständige Kupplung mit sekundären Aminen bereits nach Sekunden bei Zimmertemperatur, wobei die Reaktivität sich durch Variation des Halogens steuern lässt.⁹⁹ Die anschließende S_N2 -Reaktion ermöglicht die Einführung jeder beliebigen Seitenkette in die Peptidstruktur, wobei lediglich ein freies Amin vorhanden sein muss (Abbildung 19).

Monomer-Strategie:



Submonomer-Strategie:

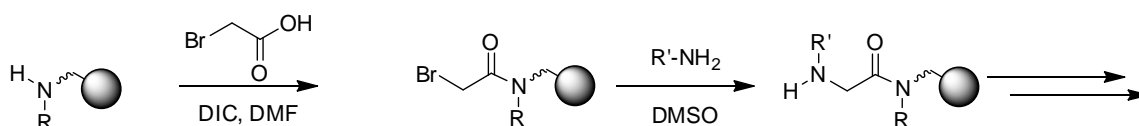


Abbildung 19: Monomere und submonomere Peptid-Festphasensynthese.

Die Submonomer-Methode gehört zu einem der effizientesten Wege, um synthetische Oligomere definierter Sequenz herzustellen. Besonders bemerkenswert ist, dass die Zyklen, die weder besonders

luft- noch wasserempfindlich sind, jeweils nur das Zusammenpipettieren stabiler Lösungen bei Zimmertemperatur beinhalten und der gesamte Prozess sich somit automatisieren lässt. Die längsten, in annehmbaren Ausbeuten synthetisierten Peptoide sind ungefähr 50 Monomere lang, somit liegt die Ausbeute jedes Zyklus über 99 %.^{99,118} Fast zwanzig Jahre nach ihrer Einführung wird die submonomere Peptoid-Festphasensynthese noch in ihrer ursprünglichen Form erfolgreich angewendet.^{119,120}

2 Zielsetzung

Der Acylierungszyklus peripherer palmitoylierter Proteine wird von der Zelle zur Gegensteuerung gegen die entropiegetriebene, wahllose Verteilung lipidierter Proteine genutzt. Durch das Zusammenspiel von ortsgebundener Palmitoylierung am Golgi-Apparat, dem anschließenden gerichteten Transport zur Plasmamembran und der ortsunabhängigen Depalmitoylierung zu jeder Zeit werden lokale zelluläre Proteinkonzentrationen aufrecht erhalten und somit Signalkaskaden gesteuert. In vorangegangenen Untersuchungen hat sich die De-/Repalmitoylierungsmaschinerie als sehr unspezifisch erwiesen, weder Stereoselektivität noch Wechselwirkungen mit dem globulären Teil der Zielproteine konnten festgestellt werden.^{60,62,63}

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten im Rahmen dieser Arbeit die Grenzen der Substrattoleranz des dynamischen Acylierungszyklus und der involvierten Enzyme sondiert werden. Hierfür sollten nicht-peptische Elemente in das C-terminale Heptapeptid des N-Ras-Proteins eingebaut werden. Diese veränderten Sequenzen sollten im Anschluss an ein zuvor in *E. coli* exprimiertes, verkürztes N-Ras-Protein ligiert und im Folgenden auf ihre biologische Aktivität untersucht werden. Geplant war die Synthese peptoidhaltiger Sequenzen. Diese Klasse der Peptidmimetika zeichnet sich vor allem durch ihre Achiralität und das Fehlen des Amidprotons aus, wodurch die Ausbildung sekundärer Wechselwirkungen verhindert wird. Um den Einfluss der einzelnen C-terminalen Aminosäuren zu studieren, sollte eine vollständige Peptoid-/Peptidhybridserie, in der die einzelnen Aminosäuren systematisch durch Peptoideinheiten ersetzt wurden, in farnesylierter und sowohl farnesylierter als auch palmitoylierter Form hergestellt werden. Die farnesylierten Hybridsequenzen sollten sowohl an das zuvor mit Cy3-fluoreszenzmarkierte Wildtypprotein, als auch an die G12V-Mutante ligiert werden. Dies sollte die Evaluierung durch Lokalisationsstudien in MDCK-Zellen und die Durchführung eines Differenzierungsassays in PC12-Zellen ermöglichen. Die doppelt lipidieren Peptoid-/Peptidsequenzen sollten neben den Lokalisationsstudien in MDCK-Zellen auch für die gezielte *in vitro* Untersuchung der Substratspezifität von Acylproteinthioesterasen genutzt werden.

Für den Aufbau der einfach und doppelt lipidieren Sequenzen sollten prälipidierte Bausteine verwendet werden. Entsprechend mussten effiziente Synthesewege für die benötigten, bisher noch nicht bekannten Fmoc-geschützten Bausteine im präparativen Maßstab entwickelt werden. Da sich die manuelle Synthese lipidierter Peptide am Hydrazinharz neben relativ niedrigen Ausbeuten auch durch einen hohen Zeitbedarf auszeichnet, sollte die Synthese automatisiert werden und gegebenenfalls sollten neue Synthesewege untersucht werden.

In Ergänzung zu den peptoidhaltigen Sequenzen sollten weitere nicht-natürliche Elemente eingebaut werden. Hierbei war die Synthese eines farnesylierten N-Ras-Proteins geplant, dessen palmitoylier-

bares Cystein durch Penicillamin ausgetauscht werden sollte. Bei Penicillamin handelt es sich um eine Cysteinmodifikation, die am β -Kohlenstoffatom zwei zusätzliche Methylgruppen trägt. Dadurch befindet sich die Thiolseitenkette in einer sterisch hochanspruchsvollen Umgebung, die hinsichtlich der Synthese des entsprechend geschützten Fmoc-Bausteins eine Herausforderung darstellt.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Aminosäuren zwischen den beiden lipidierten Cysteinen untersucht werden, wobei zum einen eine Triethylenglykolkette zwischen das farnesylierte und das palmitoylierbare Cystein eingebaut, und zum anderen eine Biphenyleinheit zwischen die Lipidierungsstellen gesetzt werden sollte. Auch diese nicht-natürlichen Peptidsequenzen sollten an das verkürzte, zuvor fluoreszenzmarkierte N-Ras-Protein ligiert und im Anschluss in Lokalisationsstudien biologisch evaluiert werden.

Durch diese unterschiedliche Zusammensetzung nicht-natürlicher Elemente können ein weites Substratspektrum der De-/Repalmitoylierungsmaschinerie sowohl *in cellulo* als auch *in vitro* untersucht und mögliche Grenzen der in den Acylierungszyklus involvierten Enzyme aufgeklärt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese lipidierter Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit sollten semisynthetische N-Ras-Proteine mit nicht-natürlichem C-Terminus als Sonden für die Untersuchung des Acylierungszyklus hergestellt werden. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wurden in der Vergangenheit verschiedene Wege für die Synthese von Lipopeptiden entwickelt. Da diese jedoch einige Schwachstellen, wie zum Beispiel manuelle Synthese und geringe Ausbeuten aufweisen, wurden verschiedene Optimierungsversuche für die Synthese der C-terminalen N-Ras-Sequenz unternommen.

3.1.1 Optimierung der Lipopeptidsynthese am Fmoc-4-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™ Harz

Die etablierte Methode für den Aufbau der C-terminalen N-Ras-Sequenz an dem kommerziell erhältlichen Fmoc-4-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™ Harz wurde zunächst manuell, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, durchgeführt. Die manuelle Synthese zeichnet sich durch aufwendige Entgasungsprozeduren aus, die für alle verwendeten Entschützungs-, Kupplungs- und Waschlösungen durchgeführt werden müssen. Des Weiteren muss die gesamte Synthese unter Schutzgasbedingungen durchgeführt werden, um mögliche Oxidationen und damit eine vorzeitige Abspaltung vom polymeren Träger zu vermeiden. Im Allgemeinen dauert die manuell durchgeführte Synthese des N-Ras C-Terminus etwa eine Woche und setzt sich aus mehreren Schritten zusammen, die in Abbildung 20 an der Beispielsequenz **1** veranschaulicht werden. Zunächst wird die Fmoc-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen entfernt und der Fmoc-geschützte Baustein **2** (Synthese siehe Kapitel 3.2.1) wird über Nacht durch Aktivierung mit HCTU ((2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium Hexafluorophosphat) und HOBT gekuppelt, wobei Collidin als Base verwendet wird, um die Racemisierung des Stereozentrums zu vermeiden.⁷⁶ Im Anschluss wird das Lipopeptid in abwechselnden Zyklen aus Fmoc-Entschützung und Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren sowie der N-terminalen Maleimidocaprinsäure am polymeren Träger aufgebaut. Die Abspaltung erfolgt in einem zweistufigen Prozess, wobei das Hydrazin zunächst durch Kupfer(II)acetat zum Acyldiazon oxidiert und dann von Methanol nukleophil angegriffen wird. Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde **1** als Methylester in 6.5 % iger Ausbeute erhalten. Dieses schlechte Ergebnis lässt sich zum Teil durch den zusätzlichen, im Anschluss an die Abspaltung durchgeführten Entschützungsschritt der Serinseitenkette erklären, spiegelt aber insgesamt die relativ niedrigen Ausbeuten wider, die bei manuellen Synthesen anderer Sequenzen am Hydrazinlinker beobachtet werden.⁷⁷ Da der zeitliche Aufwand für das natürliche C-terminale N-Ras-Heptapeptid in Anbetracht der niedrigen Ausbeuten relativ hoch ist, wurde die Synthese auf einen Syntheseroboter übertragen.

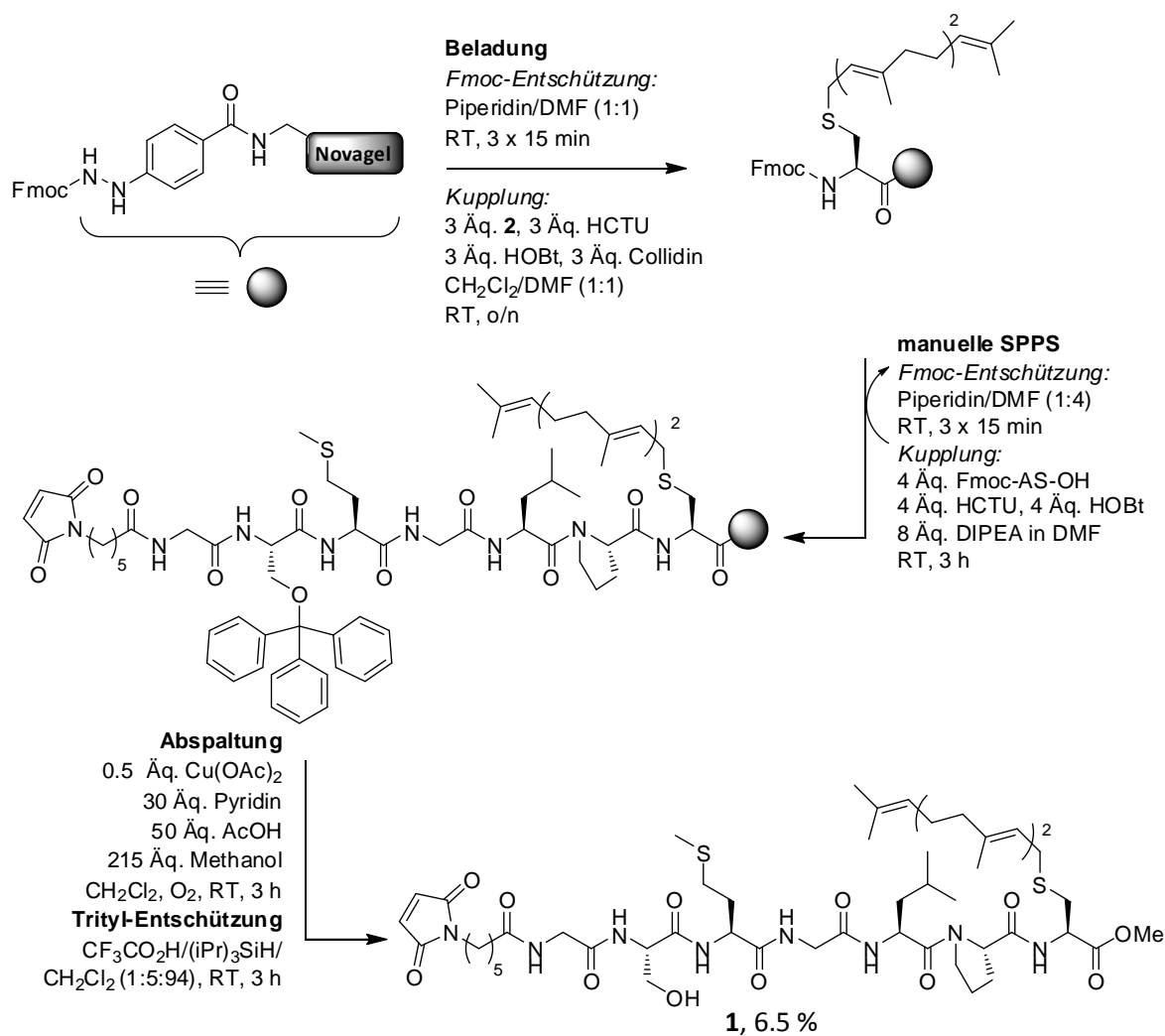


Abbildung 20: Synthese der Beispielsequenz 1.

Im Allgemeinen eignet sich die Festphasenpeptidsynthese aufgrund der sich wiederholenden Zyklen hervorragend zur Automatisierung, sodass R. B. Merrifield bereits 1965 die erste automatisierte Peptidsynthese präsentierte.^{121,122} Bisher wurde die Synthese am Hydrazinharz noch nicht auf einen Syntheseroboter übertragen. Durch den Einsatz des mikrowellenunterstützten Syntheseroboters *Liberty* der Firma CEM, der unter Verwendung von Stickstoff betrieben wird, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit erstmals versucht.

Dazu wurde die erste Aminosäure (**2**) zunächst noch manuell, wie zuvor beschrieben, über Nacht gekuppelt. Die Kupplung der restlichen Aminosäuren erfolgte unter Verwendung des Syntheseroboters, wobei die Reaktionszeiten aufgrund der Mikrowellenstrahlung drastisch reduziert wurden. Die Fmoc-Entschützung dauert etwa drei Minuten bei 75 °C, bei einer normalen Aminosäurekupplung wird das Harz nach Zugabe der Kupplungsmischung fünf Minuten bei 75 °C bestrahlt. Entsprechend lässt sich die für die Synthese einer Sequenz benötigte Zeit von zuvor etwa einer Woche auf sechs Stunden nach Beladung des Harzes mit **2** reduzieren. Das Heptapeptid des N-Ras C-Terminus **3** wurde auf diese Weise in 16 % nach Aufreinigung über präparative HPLC-MS erhalten.

Um die Synthese vollständig zu automatisieren, wurde auch der Beladungsschritt mit dem farnesylierten Fmoc-Cystein (**2**) im Syntheseroboter durchgeführt. Bemerkenswerterweise konnte die Reaktionszeit von zuvor ca. zwölf Stunden auf ebenfalls fünf Minuten, wie bei einer Standardkupplung, reduziert werden. In Analogie zur manuellen Beladung wurde als Base ebenfalls Collidin anstelle der Standardbase DIPEA verwendet, um Racemisierung zu vermeiden.⁷⁶

Durch die Übertragung der Synthese auf den mikrowellenunterstützten Syntheseroboter *Liberty* sind lipidierte Peptide somit schneller zugänglich. Da jedoch die Ausbeuten der am Hydrazinharz aufgebauten und mit Kupfer(II)acetat abgespaltenen Lipopeptide immer noch relativ niedrig blieben, sollte eine neue Methode für den Aufbau lipidierter Peptide mit C-terminalen Methylestern entwickelt werden.

3.1.2 Entwicklung einer Lipopeptidsynthese am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung in Lösung

Für die Synthese polybasischer Lipopeptidsequenzen hat sich das 2-Chlortritylchloridharz in der Vergangenheit als sehr wertvoll erwiesen.⁶⁸ Das Harz zeichnet sich durch seine Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und die unter mild-sauren Bedingungen durchführbare Abspaltung des am Harz aufgebauten Peptids aus. Jedoch lässt sich das Peptid nur als freie Säure abspalten, weswegen dieses Harz noch nicht für die Synthese von N-Ras-Peptiden, die einen C-terminalen Methylester tragen, verwendet wurde. In Zusammenarbeit mit Dr. G. Triola wurde eine neue Methode entwickelt, in der die Festphasensynthese am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung zum C-terminalen Methylester kombiniert wurde. Der Aufbau der Lipopeptidsequenz orientiert sich dabei an der Synthese am Hydrazinlinker, sodass die Einstellungen und Reaktionszeiten direkt übertragen wurden. Nach Abspaltung der Lipopeptidsequenz unter mild-sauren Bedingungen mit 1 % Trifluoressigsäure, werden die in der Regel sehr sauberen Rohprodukte mittels präparativer HPLC-MS (einfach lipidiert) bzw. säulenchromatographisch (doppelt lipidiert) aufgereinigt. Die Einführung des C-terminalen Methylesters wird anschließend durch Methylierung mit Trimethylsilyldiazomethan (TMSCHN₂) erreicht. Dieses Reagenz hat sich seit den 1980er Jahren als sichere, nicht-explosive Alternative zu Diazomethan etabliert, um Carbonsäuren chemoselektiv in die entsprechenden Methylester zu überführen.^{123,124} Speziell im Bereich der Gaschromatographie findet dieses einfach zu handhabende und zudem kommerziell erhältliche Reagenz umfangreiche Anwendung, um Carbonsäuren mittels Derivatisierung quantitativ zu bestimmen. Die Reaktion lässt sich aufgrund des kontinuierlichen Verschwindens der für Diazomethan typischen Gelbfärbung relativ einfach überwachen. Trotz seiner häufigen und erfolgreichen Verwendung wurde erst im Jahr 2007 der Mechanismus der Veresterung mittels Isotopenmarkierung aufgeklärt.¹²⁵ Demnach erfüllt die zu

veresternde Carbonsäure zwei Aufgaben, da sie zum einen der *in situ*-Freisetzung des Diazomethans aus Trimethylsilyldiazomethan dient, und zum anderen zum Methyl ester umgesetzt wird.

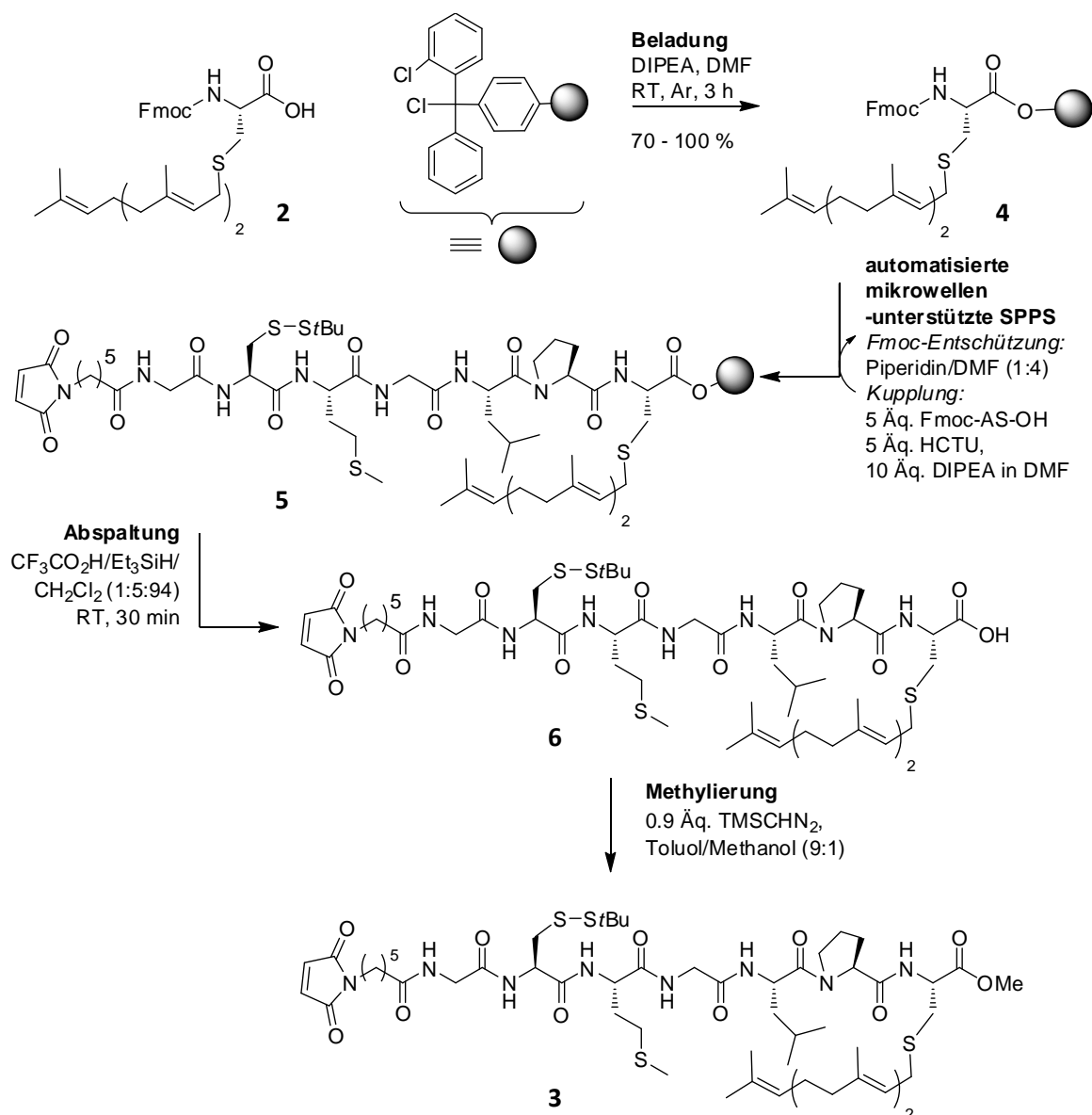


Abbildung 21: Synthese der farnesylierten C-terminalen N-Ras-Sequenz (**3**) am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung in Lösung.

In Abbildung 21 ist als Beispiel für diese Kombination aus Peptidfestphasensynthese sowie Methylierung in Lösung die Synthese des C-terminalen Heptapeptids von N-Ras (**3**) dargestellt. Auch diese Synthese startet mit der Immobilisierung des farnesylierten Fmoc-Cysteins (**2**). Im Gegensatz zum Hydrazinharz wird die Aminosäure nicht über eine Amidbindung am polymeren Träger verankert, sondern als Ester durch eine nukleophile Substitution des Chlorids unter basischen Bedingungen. Anschließend werden in *N*-terminaler Richtung alle Aminosäuren in abwechselnden Zyklen aus Fmoc-Entschützung und Fmoc-Aminosäurekupplungen im Syntheseroboter an **4** angefügt. Nachdem die aufgebaute Sequenz **5** unter mild-sauren Bedingungen abgespalten wurde, wird die

freie Carbonsäure **6** chemoselektiv mit Trimethylsilyldiazomethan zum C-terminalen Methylester **3** umgesetzt. Aufgrund der empfindlichen Maleimidfunktionalität am N-Terminus wird die Methylierung nicht mit einem Überschuss Trimethylsilyldiazomethan durchgeführt, sondern lediglich mit 0.9 Äquivalenten, um die labile MIC-Gruppe für die folgende Ligation zu erhalten.

In Tabelle 1 sind die Optimierungsschritte der Synthese lipidierter Peptide mit C-terminalem Methylester zusammengefasst. Von einer anfänglich sehr aufwendigen und langwierigen Synthese am Hydrazinlinker wurde zunächst die Verlängerung der Peptidkette auf den mikrowellenunterstützten Syntheseroboter übertragen, anschließend gelang der vollständige Aufbau der Peptidsequenz am Syntheseroboter. Da sich jedoch die unbefriedigenden Ausbeuten auch durch die Automatisierung nicht erhöhen ließen, wurde eine neue Methode untersucht, bei der das Lipopeptid nach manueller Immobilisierung der ersten Aminosäure als Ester automatisiert aufgebaut wurde. Als polymerer Träger wurde das 2-Chlorotriylchloridharz gewählt, das die Abspaltung der Peptidkette unter mild-sauren Bedingungen als freie Carbonsäure erlaubt. Diese konnte anschließend in teils sehr guten Ausbeuten unter Verwendung von Trimethylsilyldiazomethan chemoselektiv zum C-terminalen Methylester umgesetzt werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Synthese einfach lipidierter N-Ras-Sequenzen

Eintrag	Methode	Sequenzaufbau	Abspaltung	Ausbeute
1	Hydrazinlinker-manuelle Synthese (1)	4 - 5 d	2.5 h	6.5 %
2	Hydrazinlinker-manuelle Beladung; Peptidaufbau automatisiert (3)	2 d	2.5 h	16 %
3	2-Chlorotriylchlorid und Methylierung (3)	5 h	30 min + 30 min	24 % + 87 %

3.2 Synthese lipidierter Peptoid-/Peptidhybridsequenzen des C-terminalen N-Ras-Heptapeptids

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Acylierungszyklus mittels Proteinsonden, in deren C-terminale Sequenz nicht-natürliche Elemente eingebaut werden sollten. Basierend auf den Erkenntnissen, dass die Acylierungsmaschinerie weder eine spezielle Erkennungssequenz benötigt noch Stereoselektivität aufweist,^{62,63} sollte zunächst eine Serie von Proteinsonden mit Peptoid-elementen hergestellt werden. Dadurch sollte evaluiert werden, inwieweit das Wegfallen des Amidprotons und damit die Ausbildung sekundärer Strukturen sowie die Verschiebung der Seitenkette vom α -Kohlenstoff auf das Stickstoffatom die Lokalisation und Verteilung der Proteine beeinflusst. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. M. J. Liskamp am Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences der Universität Utrecht in den Niederlanden wurden die in

Abbildung 22 dargestellten semisynthetischen N-Ras-Proteine entworfen. Diese sollten sowohl in der einfach lipidierten als auch in der doppelt lipidierten Form synthetisiert werden. Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die biologische Aktivität zu untersuchen, sollte sowohl das farnesylierte (farnesylierte Sonde: **7**; palmitoylierte, farnesylierte Sonde: **8**) als auch das palmitoylierte Cystein (farnesylierte Sonde: **9**; palmitoylierte, farnesylierte Sonde: **10**) durch eine Homocystein-Peptideinheit ausgetauscht werden. Außerdem sollte ein semisynthetisches N-Ras-Protein untersucht werden, dessen C-terminales Methionin und Leucin (farnesylierte Sonde: **11**; palmitoylierte, farnesylierte Sonde: **12**) ersetzt wurden und in einer Sonde (farnesylierte Sonde: **13**; palmitoylierte, farnesylierte Sonde: **14**) sollten alle verfügbaren Aminosäuren durch Peptidbausteine ersetzt werden. Glycin und das zyklische Prolin, das in seiner natürlichen Form bereits kein Amidproton besitzt, bilden dabei die Ausnahmen und werden nicht ausgetauscht. Um die einfach lipidierten Proteinsonden in einem Differenzierungsassay mit PC12-Zellen⁹⁶ zu untersuchen, sollten diese neben der Ligation an Cy3-markiertes Wildtyp N-Ras auch an die permanent aktive G12V-Mutante ligiert werden.

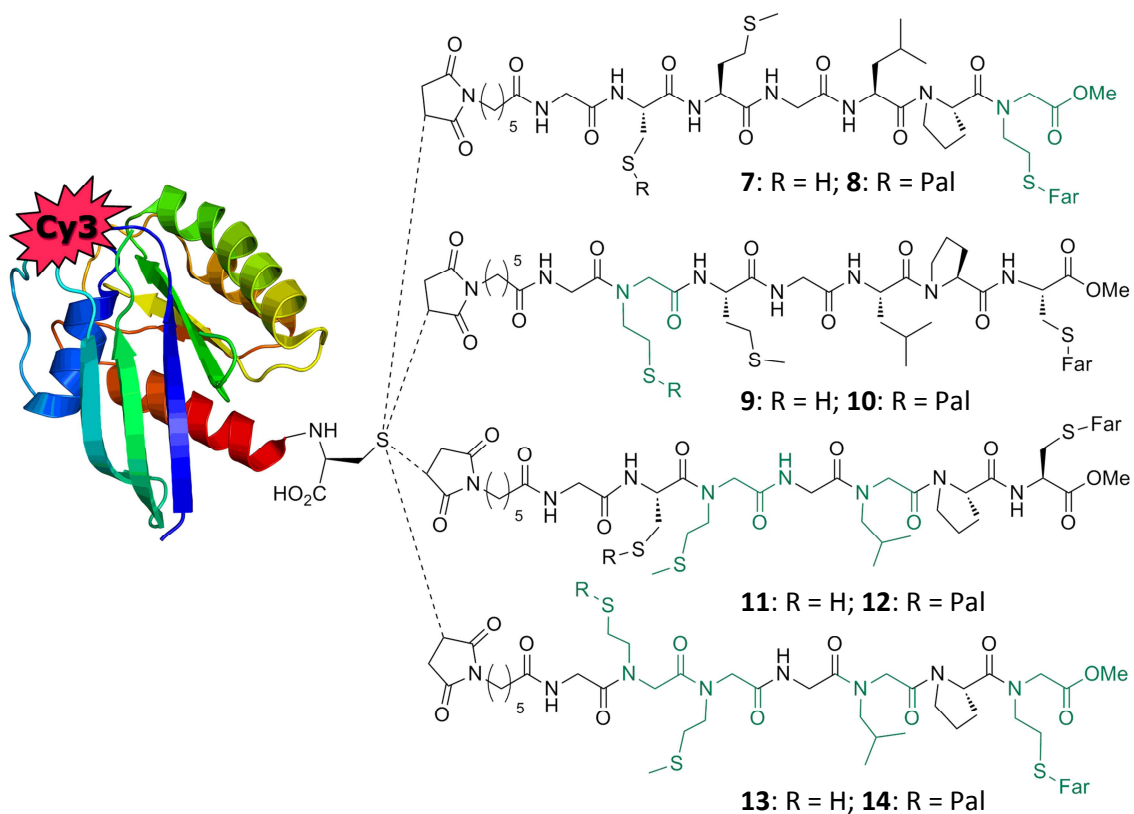


Abbildung 22: Übersicht über die N-Ras-Proteinsonden, deren lipidiertes C-Terminus Peptidbausteine enthält.

Da es sich bei den geplanten Sequenzen um Hybride handelt, die sowohl Peptid- als auch Peptidelemente enthalten, sollte die in Kapitel 1.6 bereits erwähnte, monomere Strategie verfolgt werden, wobei die Darstellung der Peptidbausteine auf der dreistufigen Synthese nach R. M. J. Liskamp *et al.* basieren sollte.¹¹¹⁻¹¹³ Bevor der Aufbau der entworfenen Sequenzen an fester Phase

begonnen wurde, mussten zunächst die in Abbildung 23 abgebildeten Fmoc-geschützten Bausteine im präparativen Maßstab hergestellt werden. Neben den bereits bekannten lipidierten Fmoc-Cysteinen **2** und **15** musste die Synthese der Fmoc-geschützten Homocystein-Peptoidbausteine, deren Thiofunktion farnesyliert (**16**), als Disulfid geschützt (**17**) und palmitoyliert (**18**) werden sollte, entwickelt werden. Die beiden Methionin (**19**) und Leucin (**20**)-Peptoidbausteine wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. M. J. Liskamps Arbeitskreis zur Verfügung gestellt und nach der in der Gruppe entwickelten Strategie synthetisiert.¹¹¹⁻¹¹³

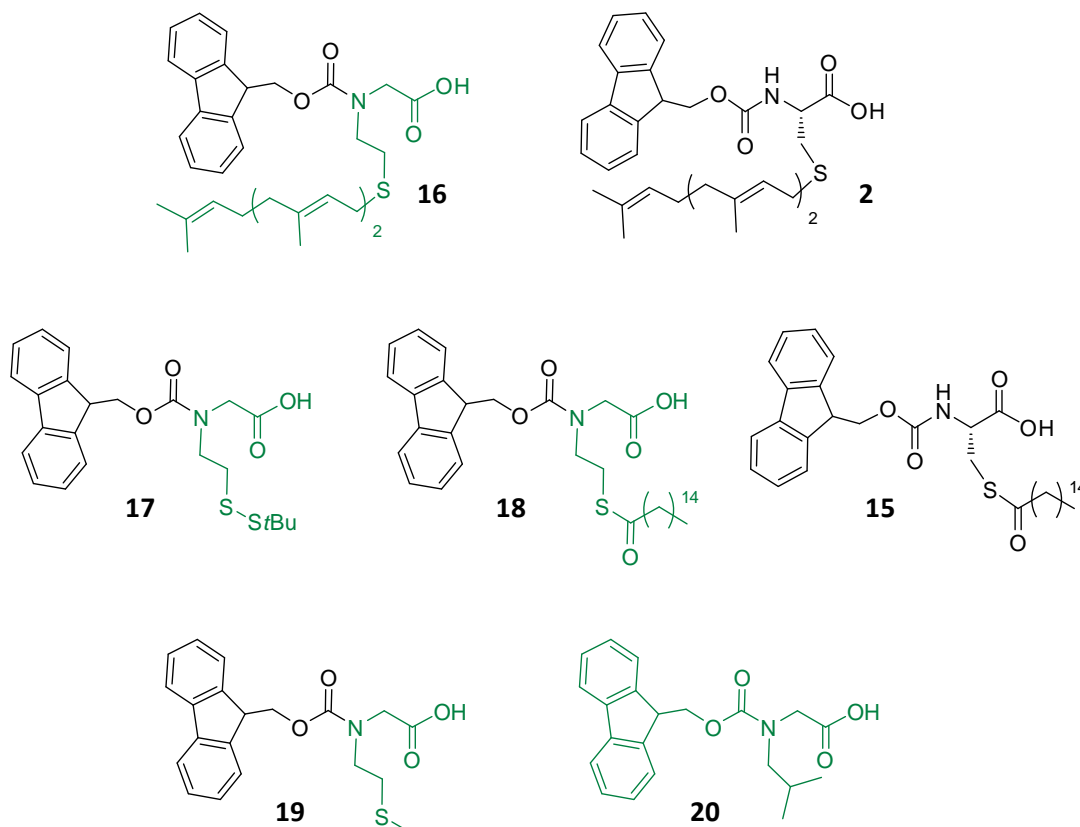


Abbildung 23: Übersicht über die benötigten Fmoc-geschützten Bausteine für die Synthese der peptoidischen Hybridsequenzen.

3.2.1 Synthese der Fmoc-geschützten Bausteine

Die Synthese des farnesylierten, Fmoc-geschützten Cysteins wurde nach der bereits etablierten Strategie durchgeführt.⁷⁷ Hierfür wurde Cystein-Hydrochlorid (**21**) in Gegenwart einer 7 N Ammoniakhaltigen Lösung mit *trans, trans*-Farnesylchlorid lipidiert. Anschließend wurde das primäre Amin (**22**) als Fmoc-Urethan geschützt und **2** wurde in 85 % iger Ausbeute isoliert (Abbildung 24).

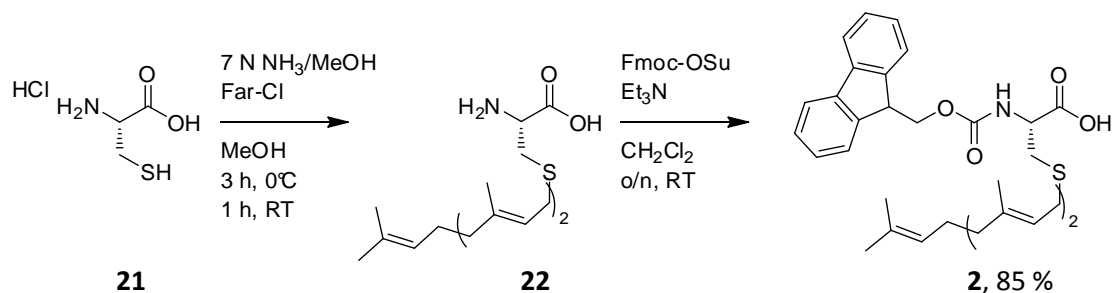


Abbildung 24: Synthese des farnesylierten Fmoc-geschützten Cysteins **2**.

Das palmitoylierte Fmoc-Cystein **15** wurde ebenfalls nach einem etablierten Protokoll⁷⁷ hergestellt. Hierfür wurde *S*-Trityl geschütztes Fmoc-Cystein (**23**) zunächst unter sauren Bedingungen entschützt, dann mit Trimethylsilylchlorid verestert, um im Anschluss den Palmitoylrest einzuführen (Abbildung 25).

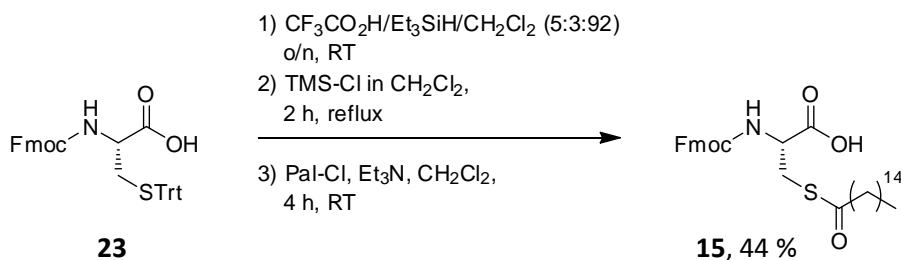


Abbildung 25: Synthese des palmitoylierten Fmoc-Cysteins **15**.

Basierend auf der bereits etablierten Synthese von **2** wurde die Synthese des farnesylierten Homocystein-Peptoidbausteins **16** entwickelt. Hierfür wurde Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) in Analogie zu **21** farnesyliert. Das farnesylierte Cysteamin **25** wurde anschließend in einer nukleophilen Substitution mit Bromessigsäureethylester zum entsprechenden Ester **26** umgesetzt. Nach basischer Verseifung¹¹⁴ wurde das sekundäre Amin in das Fmoc-urethan **16** überführt.

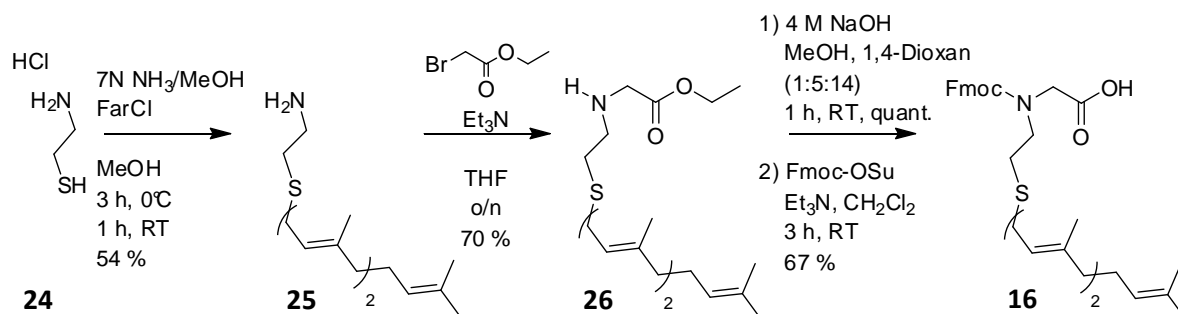


Abbildung 26: Synthese des farnesylierten Homocystein-Peptoidbausteins **16**.

Die Synthese des Disulfid geschützten Peptoidbausteins **17** gestaltete sich anspruchsvoller. Wie bei **16** wurde Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) als Edukt verwendet. Zunächst wurde die Thiofunktion quantitativ Trityl-geschützt, durch Umsetzung mit Bromessigsäureethylester wurde der S-Trityl-geschützte Ester **27** erhalten, der in zwei parallelen Routen eingesetzt wurde. Zum einen wurde der Ethylester verseift,¹¹⁴ das sekundäre Amin in das entsprechende Fmoc-Urethan mit Fmoc-OSu überführt und anschließend die Tritylschutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt. Verbindung **28** wurde anschließend mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid nach den von G. I. Tesser *et al.* beschriebenen Bedingungen umgesetzt.¹²⁶ Neben der gewünschten Aktivierung der Thiolgruppe wurde jedoch auch eine Aktivierung der Carboxylfunktion beobachtet. Dennoch wurde die anschließende Substitution mit 2-Methyl-2-propanthiol erfolgreich durchgeführt und das Disulfid **29** konnte erhalten werden, jedoch gelang die Abspaltung des gemischten Anhydrids zur freien Säure nicht, sodass Baustein **17** über diesen Weg nicht zugänglich war. In der zweiten Syntheseroute wurde Ester **27** ebenfalls verseift,¹¹⁴ anschließend die Tritylschutzgruppe entfernt und analog die Aktivierung nach G. I. Tesser durchgeführt.¹²⁶ Jedoch konnte an dieser Stelle der aktivierte Thiol **30** nicht in das entsprechende Disulfid **31** überführt werden, sodass auch diese Strategie nicht zu dem gewünschten Peptoidbaustein führte (Abbildung 27). Alternativ wurde versucht das Disulfid als erstes in das Molekül einzuführen. Durch Aktivierung von **24** mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid und anschließende Substitution durch 2-Methyl-2-propanthiol wurde das Disulfid **32** erhalten. Dieses ergab nach Umsetzung mit Bromessigsäureethylester Ester **33**, der jedoch unter verschiedenen Bedingungen nicht zur freien Säure **31** verseift werden konnte. Unter der Verwendung der von G. I. Tesser *et al.* entwickelten Bedingungen¹¹⁴ (A) wurde neben dem Ester auch das Disulfid gespalten. Ähnliches wurde mit schwächer konzentrierter Natronlauge (1M) (B) beobachtet und auch unter den von Corey beschriebenen Bedingungen¹²⁷ (C) konnte der Ester in Gegenwart des Disulfids nicht entschützt werden (Abbildung 27). Als Konsequenz aus den vorangegangenen Syntheseversuchen wurde für **17** eine alternative Syntheseroute entwickelt, bei der die Disulfidbildung wiederum unter den von G. I. Tesser *et al.* beschriebenen Bedingungen erreicht werden sollte, jedoch diesmal in Gegenwart der geschützten Säurefunktion, die im Anschluss ohne Beeinträchtigung des Disulfids entschützt werden sollte. Die Wahl fiel auf einen unter sauren Bedingungen spaltbaren *tert*-Butylester.

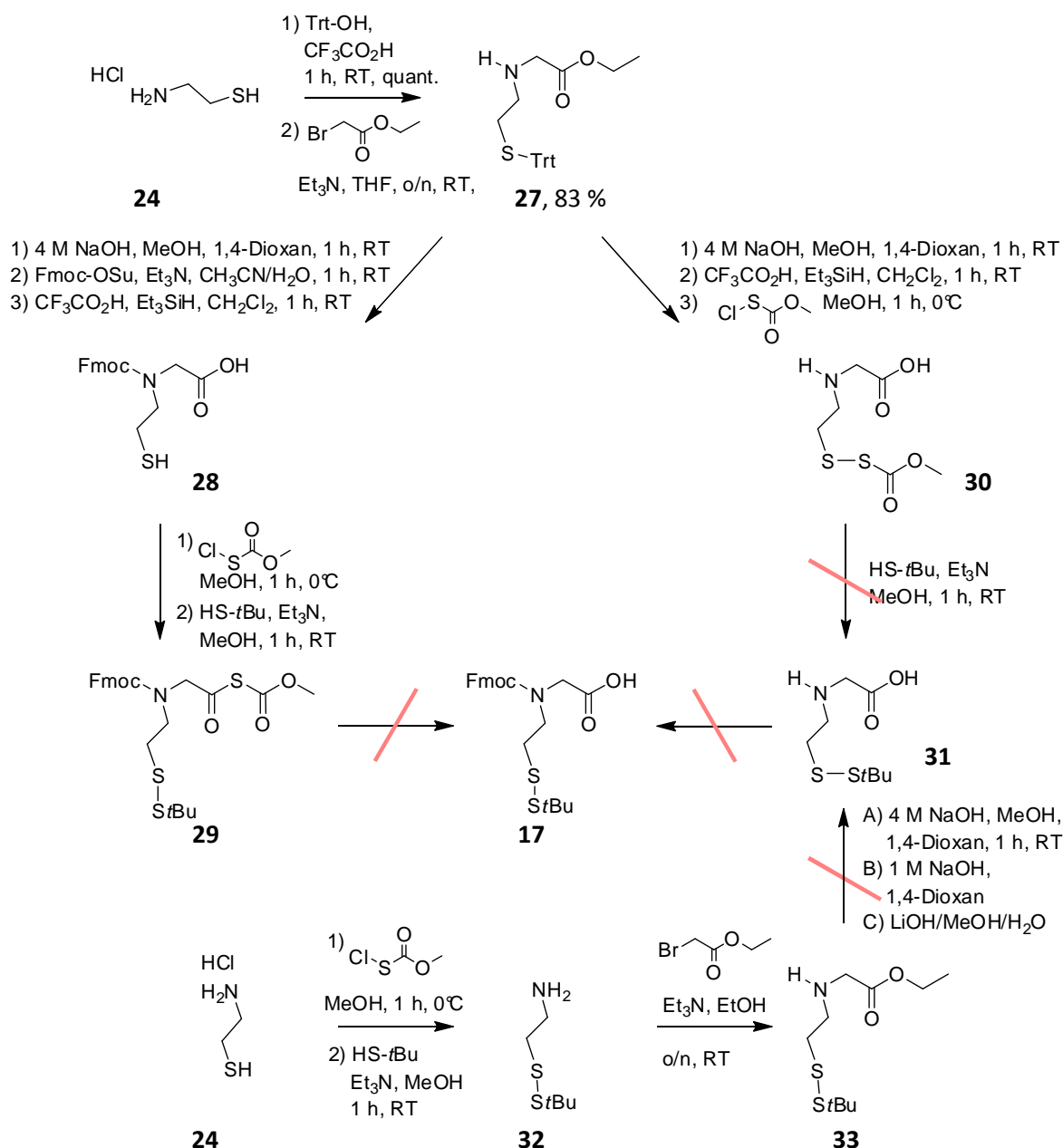


Abbildung 27: Ansätze für die Synthese des Homocystein-Peptoidbausteins 17.

Daher wurde abermals Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) als Edukt verwendet und seine Thiofunktion mit Triphenylmethanol geschützt. Durch eine Substitutionsreaktion mit Bromessigsäure-*tert*-butylester wurde der entsprechende Ester (**34**) erhalten, dessen sekundäre Aminfunktion als Fmoc-Urethan (**35**) geschützt wurde. Selektive Tritylentschützung unter mild-sauren Bedingungen lieferte **36**, dessen Thiofunktion unter den zuvor bereits verwendeten Bedingungen mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid aktiviert und anschließend zum Disulfid **37** umgesetzt wurde.¹²⁶ Durch Entfernung des *tert*-Butylesters unter stark sauren Bedingungen wurde schließlich der benötigte Peptoidbaustein (**17**) in 41 % iger Ausbeute über die letzten drei Schritte erhalten (Abbildung 28).

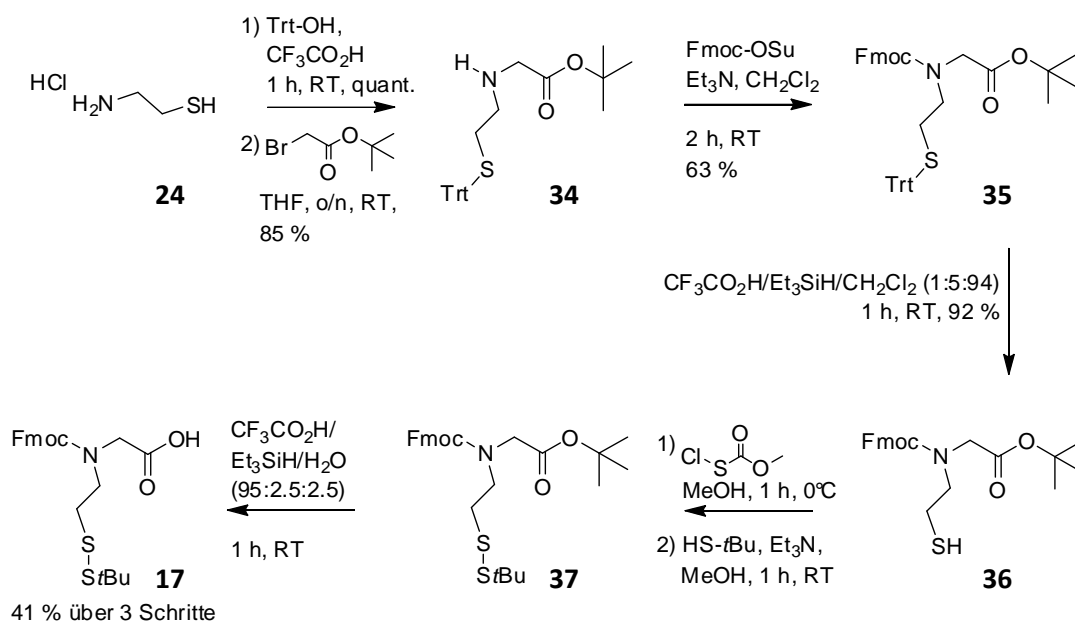


Abbildung 28: Synthese des *tert*-butylthiogeschützten Homocystein-Peptoidbausteins **17**.

Die Synthese des palmitoylierten Peptoidbausteins basierte auf der gleichen Route wie die des *tert*-butylthiogeschützten Bausteins **17**. Hierfür wurde **36**, dessen Thiofunktion zuvor selektiv entschützt worden war, mit Palmitoylchlorid in Gegenwart von Triethylamin in 82 % iger Ausbeute acyliert. Durch saure Spaltung des *tert*-Butylesters **38** wurde der benötigte palmitoylierte Peptoidbaustein **18** in 88 % iger Ausbeute erhalten (Abbildung 29).

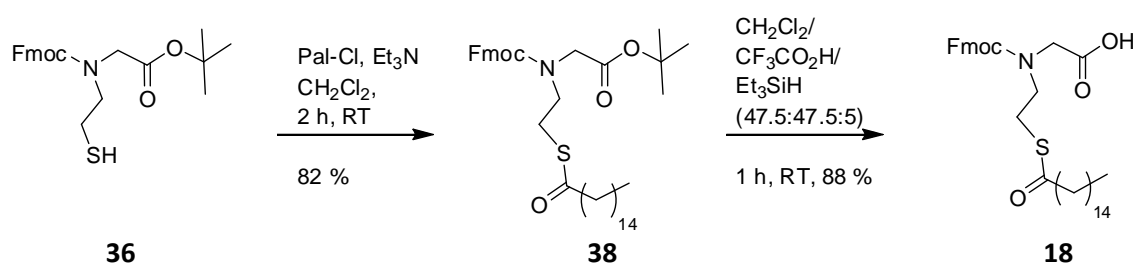


Abbildung 29: Synthese des palmitoylierten Homocystein Peptoidbausteins **18**.

3.2.2 Synthese farnesylierter Peptoid-/Peptid Hybridsequenzen

Nachdem die für die Synthese der Hybridsequenzen benötigten Fmoc-geschützten Bausteine im präparativen Maßstab hergestellt worden waren, wurde die Synthese der farnesylierten Peptoidhybride am Hydrazinlinker durchgeführt. Für Sequenz **39**, deren C-terminale Aminosäure durch den farnesylierten Baustein **16** ausgetauscht werden sollte, wurde **16** am Hydrazinharz in 80 % iger Ausbeute immobilisiert. Die Achiralität des Peptoidbausteins erlaubte hierbei die Verwendung des stärkeren Kupplungsreagenzes HATU und DIPEA als Aktivierungsbase. Der Aufbau der Sequenz

erfolgte an dem *ABI-Syntheseroboter* im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. M. J. Liskamp, wobei alle Fmoc-Aminosäuren mit HATU und DIPEA doppelt gekuppelt wurden, um Abbruchsequenzen zu vermeiden. Die *N*-terminale Maleimidocaprinsäure, die im Anschluss an die Abspaltung und Aufreinigung der Sequenz als Michael-Akzeptor für das verkürzte, bakteriell exprimierte N-Ras-(Δ 1-181) Protein dienen sollte, wurde lediglich einfach gekuppelt. Als Schutzgruppe der Cysteinseitenkette wurde die *tert*-Butylthiogruppe gewählt, da diese im Anschluss an die Ligation unter proteinfreundlichen Bedingungen im wässrigen Puffer entfernt werden kann, sich aber unter den Bedingungen der Fmoc-basierten Peptidsynthese und der Abspaltung stabil verhält. Das C-terminale Heptapeptid **40** wurde durch Oxidation des Hydrazinlinkers zum Acyldiazen mittels Kupfer(II)acetat und dem anschließenden nukleophilen Angriff von Methanol vom polymeren Träger als C-terminaler Methylester abgespalten und über präparative HPLC-MS aufgereinigt. Die farnesylierte Sequenz, deren C-terminales Cystein gegen eine Peptideinheit ausgetauscht wurde, konnte in einer Ausbeute von 9.5 % isoliert werden.

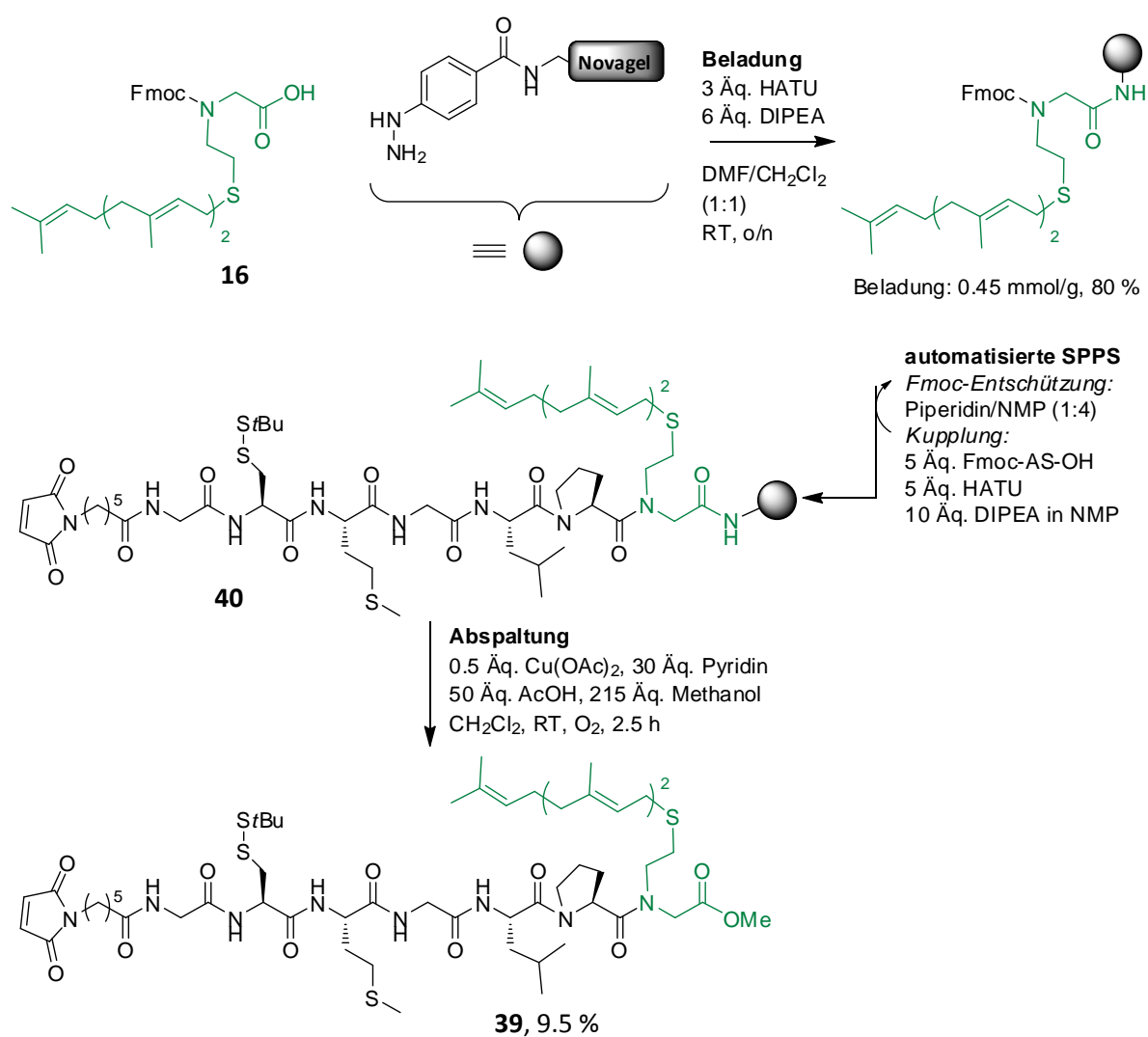


Abbildung 30: Synthese der Hybridsequenz **39**.

Nach der gleichen Strategie wurde die Hybridsequenz **41** synthetisiert, deren Methionin und Leucin gegen die entsprechenden Peptoidbausteine ausgetauscht wurden. Im Gegensatz zu der Hybridsequenz **39** wurde das natürliche farnesylierte Cystein **2** am Hydrazinharz verankert. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der hohen Racemisierungstendenz des Cysteins mit HBTU, HOBT und Collidin in einem Dichlormethan/DMF-Gemisch (1:1) gearbeitet. Nach colorimetrischer Beladungsbestimmung wurde eine Beladung 0.34 mmol/g (61 %) festgestellt. Für die anschließende Verlängerung der Peptidkette wurde, wie zuvor, HATU verwendet und alle folgenden Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden, doppelt gekuppelt, um Abbruchsequenzen zu vermeiden. Die Ausnahme bildete dabei, wie zuvor, die *N*-terminale Maleimidocaprinsäure, die aufgrund des niedrigen sterischen Anspruchs nur einfach gekuppelt wurde. Nach Abspaltung durch Oxidation des Hydrazinlinkers und anschließender nukleophiler Substitution durch Methanol wurde die peptoidische Sequenz **41**, deren Methionin und Leucin durch Peptoidbausteine ersetzt wurden, in einer Ausbeute von 20.5 % nach Aufreinigung mittels präparative HPLC-MS erhalten.

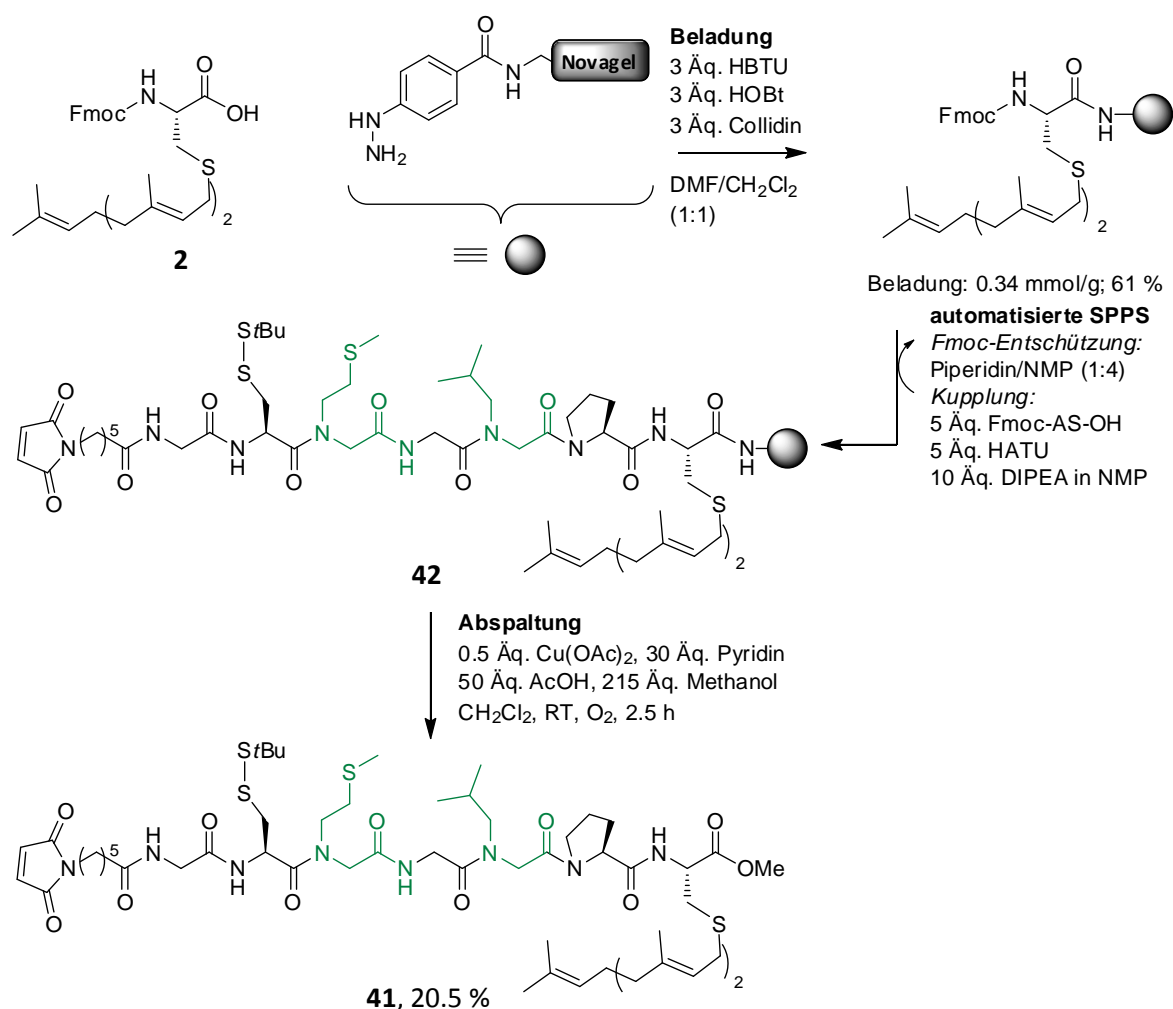


Abbildung 31: Synthese der farnesylierten Hybridsequenz **41**.

Auch Sequenz **43**, in der alle Aminosäuren, außer Prolin und Glycin, als Peptideinheiten eingebaut wurden, wurde mithilfe des Syntheseroboters im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. M. J. Liskamp synthetisiert. Hierfür wurde **16**, unter den gleichen Bedingungen wie bei Hybridsequenz **39**, am Hydrazinharz immobilisiert. Anschließend wurde die Kette in analoger Weise unter Verwendung von Doppelkupplungen bis zum zweiten Glycin verlängert, um dann *N*-terminal Maleimidocaprinsäure einfach zu koppeln. Auch hier erfolgte die Abspaltung vom polymeren Träger durch Oxidation, gefolgt von einer nukleophilen Substitution durch Methanol, um die Peptoidsequenz als C-terminalen Methylester freizusetzen.

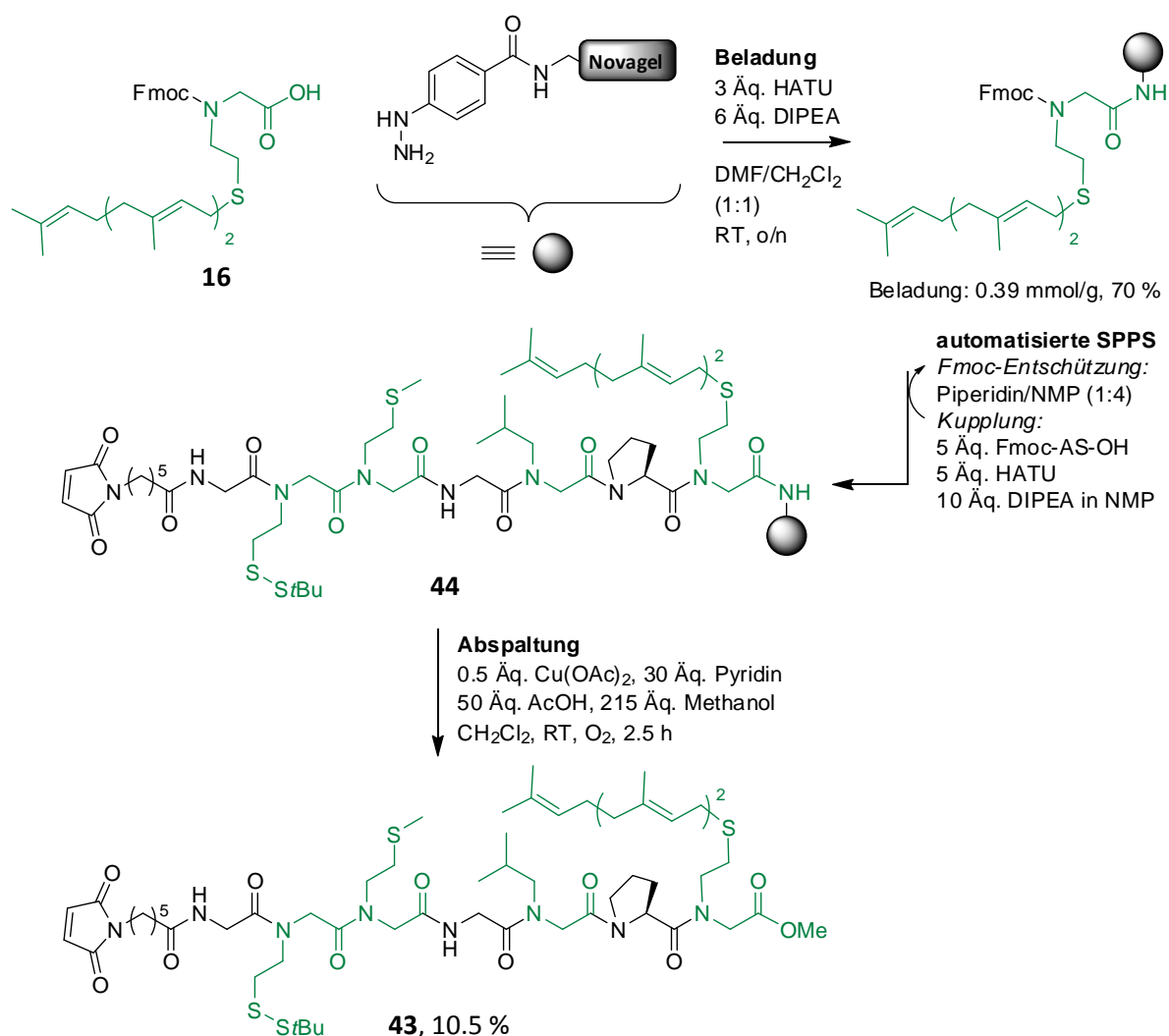


Abbildung 32: Synthese der Peptoidsequenz **43**.

Hybridsequenz **45**, deren palmitoylierbares Cystein durch die Disulfid geschützte Peptideinheit **17** ersetzt wurde, wurde im Gegensatz zu den anderen farnesylierten Hybridsequenzen vollständig am mikrowellenunterstützten Syntheseroboter *Liberty* der Firma CEM aufgebaut. Dabei wurde für die Kupplung von **2** ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und DMF im Verhältnis 1:1 und Collidin als Aktivierungsbase verwendet, um eventuelle Racemisierung auszuschließen.⁷⁶ Als Aktivator konnte

dank des Einsatzes der Mikrowellenstrahlung HCTU verwendet werden und außer Prolin wurden alle Bausteine durch Einfachkupplungen eingeführt, ohne dass Abbruchsequenzen detektiert wurden. Nach Einbringung der *N*-terminalen Maleimidocaprinsäure für die anschließende MIC-Ligation lieferte die oxidative Abspaltung vom Hydrazinlinker die gewünschte Hybridsequenz nach nukleophilen Angriff von Methanol in 10 % iger Ausbeute, nach Aufreinigung über präparative HPLC-MS.

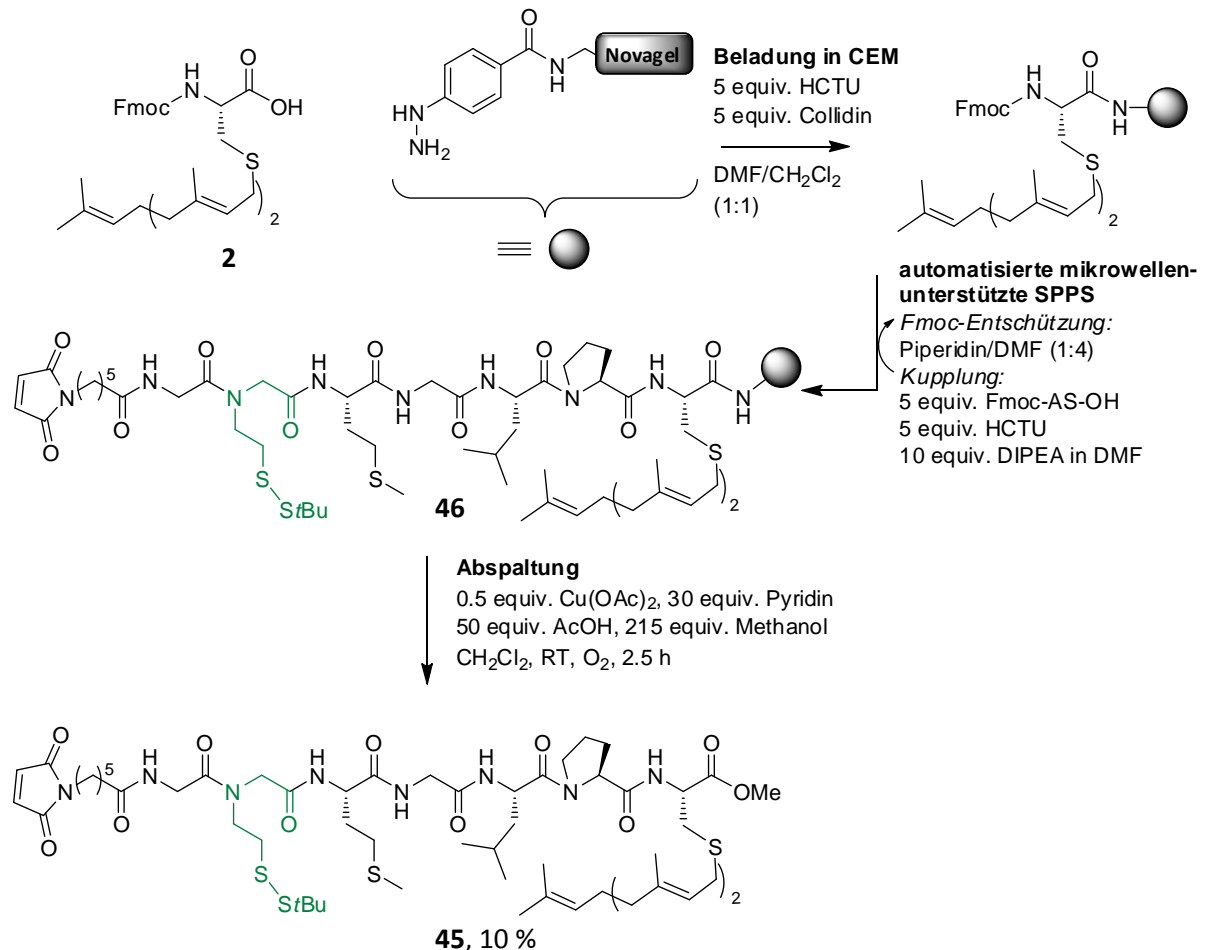


Abbildung 33: Synthese der Hybridsequenz 45.

3.2.3 Synthese farnesylierter und palmitoylierter Peptid-/Peptidsequenzen

Die Synthese lipidierter Peptide, die neben dem säureempfindlichen Farnesylrest auch einen instabilen Thioester tragen, stellt eine besondere Herausforderung dar, da neben der Empfindlichkeit gegenüber Nucleophilen auch eine schnelle *S*, *N*-Verschiebung stattfinden kann, sobald das Amin des Cysteins in ungeschützter Form vorliegt. Für die Synthese der palmitoylierten und farnesylierten Peptid-/Peptidsequenzen wurde die in Abbildung 34 am Beispiel von **47** veranschaulichte Strategie verwendet.

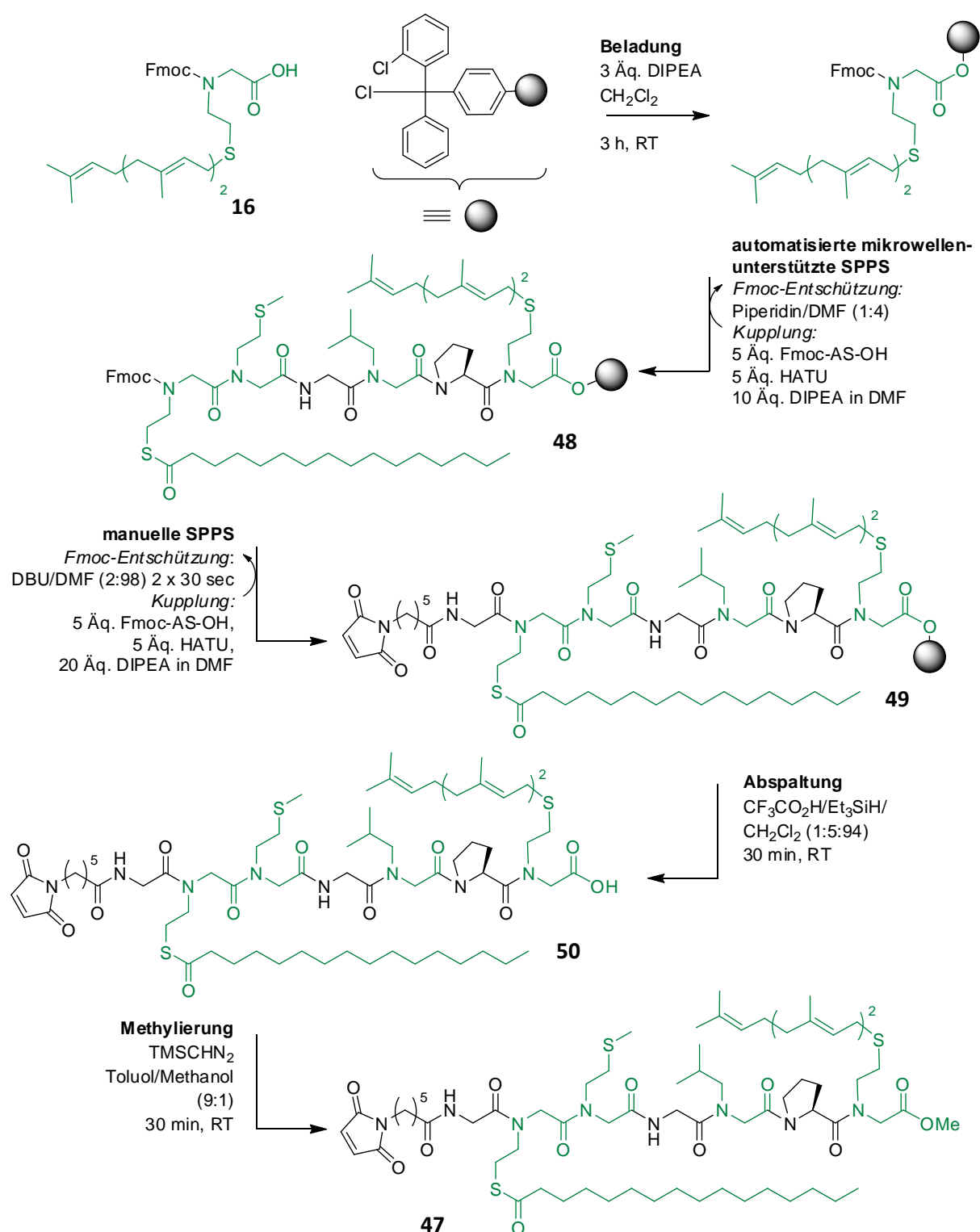


Abbildung 34: Synthese der farnesylierten und palmitoylierten Hybridsequenz **47**.

Zunächst wurde der farnesylierte Fmoc-geschützte Baustein **16** am 2-Chlortrityl-chloridharz als Ester in Gegenwart von DIPEA verankert. Wie zuvor wurde anschließend die Verlängerung der Peptidkette am mikrowellenunterstützten Syntheseroboter *Liberty* der Firma CEM durchgeführt. Außer Prolin, das doppelt gekuppelt wurde, wurden alle Bausteine in Einfachkupplungen mit HCTU als Aktivator

eingeführt. Bei den doppelt lipidierten Sequenzen erfolgte jedoch der automatisierte Aufbau, im Unterschied zu den einfach farnesylierten Sequenzen, nur bis zum Einbau des palmitoylierten Cysteins **15** bzw. des palmitoylierten Peptoidbausteins **18**. Aufgrund der hohen Labilität dieser am Harz immobilisierten palmitoylierten und farnesylierten Sequenz **48** wurden die letzten zwei Kupplungen manuell durchgeführt. Um die schnelle *S, N*-Verschiebung zu vermeiden, wurde die Fmoc-Gruppe durch zweimalige Behandlung mit einer 2 % DBU enthaltenden DMF-Lösung für jeweils 30 Sekunden entfernt. Nach zügigem Waschen wurde die mit 5 Äquivalenten HATU und 20 Äquivalenten DIPEA voraktivierte Kupplungsgemisch Säure hinzugegeben. Da die lipidierten Cysteine sterisch anspruchsvoller sind, als das zuvor eingebaute als *tert*-butylthiogeschützte Cystein, wurde an dieser Stelle eine Dreifachkupplung des folgenden Fmoc-Glycins durchgeführt, um Abbruchsequenzen, die im Anschluss sehr schwer bzw. nicht abtrennbar gewesen wären, zu vermeiden. Die abschließende Maleimidocaprinsäure wurde in analoger Weise doppelt gekuppelt, bevor die Hybridsequenz **49** unter mild-sauren Bedingungen abgespalten wurde. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung der freien Säure **50** wurde der C-terminale Ester durch Methylierung mit Trimethylsilyldiazomethan eingeführt und wiederum mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Abbildung 34). In Tabelle 2 sind die Ausbeuten der farnesylierten und palmitoylierten Sequenzen zusammengefasst. Die Sequenz, in der das farnesylierte Cystein durch **16** ersetzt wurde, konnte als freie Carbonsäure **51** in 46 % erhalten und durch Methylierung in einer Ausbeute von 21 % in den C-terminalen Methylester **52** überführt werden (Tabelle 2, Eintrag 1). Carbonsäure **53**, in der Baustein **18** anstelle des palmitoylierten Cysteins eingeführt wurde, wurde in sehr guten 96 % nach Abspaltung vom 2-Chlorotriethylharz und säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten und nach Umsetzung mit Trimethylsilyl-diazomethan wurde der Methylester **54** in 66 % iger Ausbeute erhalten (Tabelle 2, Eintrag 2). Die Sequenz, deren C-terminales Methionin und Leucin ausgetauscht wurden, konnte als freie Säure (**55**) in guter Ausbeute erhalten und in 32 % iger Ausbeute in den Methylester **56** überführt werden (Tabelle 2, Eintrag 3). Ähnlich gut verlief die in Abbildung 34 beschriebene Synthese, **50** wurde in 57 % und der Methylester **47** in 30 % erhalten (Tabelle 2, Eintrag 5).

Tabelle 2: Überblick über die Synthese der palmitoylierten und farnesylierten Sequenzen als freie Carbonsäuren sowie ihre Überführung in die entsprechenden C-terminalen Methylester.

Eintrag	Farnesylierte und palmitoylierte Sequenz	Carbonsäure		Methylester	
		Nr.	Ausbeute	Nr.	Ausbeute
1	MIC-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-NhCys(Far)	51	46 %	52	21 %
2	MIC-Gly-NhCys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)	53	96 %	54	66 %
3	MIC-Gly-Cys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-Cys(Far)	55	49 %	56	32 %
4	MIC-Gly-NhCys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-NhCys(Far)	50	57 %	47	30 %

3.3 MIC-Ligation der lipidierten Peptoid-/Peptidsequenzen

Um den Einfluss der C-terminalen Modifikationen auf die biologische Aktivität zu untersuchen, wurden die einfach farnesylierten Peptoid-/Peptidsequenzen über die N-terminale Maleimidfunktion an bakteriell exprimiertes N-Ras-Protein ligiert. Diese Methode wurde im Jahr 2000 in einer Kooperation zwischen den Abteilungen von Prof. Dr. H. Waldmann und der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. Kuhlmann (Abteilung von Prof. Dr. A. Wittinghofer) am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie entwickelt.^{66,96} Da die einfach lipidierten Hybridsequenzen sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation in MDCK-Zellen^{60,63} als auch hinsichtlich ihrer Aktivität im PC12-Differenzierungsassay⁹⁶ untersucht werden sollten, wurden diese Hybridsequenzen zum einen an das zuvor Cy-3 markierte Wildtypprotein und zum anderen an eine permanent aktive N-Ras-Mutante, deren Glycin-12 zu Valin mutiert worden war, ligiert (Abbildung 36). Die doppelt lipidierten Peptoid-/Peptidsequenzen wurden ausschließlich an das Cy-3 markierte Wildtypprotein ligiert. Die verkürzten N-Ras-Proteine ($\Delta 1-181$), sowohl Wildtyp als auch die G12V-Mutante, wurden dafür von C. Nowak in *E. coli* rekombinant exprimiert. Das Entfernen der letzten acht Aminosäuren beeinflusst weder die Expression in *E. coli* noch die Bindung des Nukleotids bzw. die Wechselwirkung mit Effektoren wie Cdc 25 oder der Ras-bindenden Domäne (RBD).⁹⁶

Das Wildtypprotein wurde vor der Ligation mit kommerziell erhältlichen Cy-3 NHS Ester unspezifisch an freien Aminen des Proteins fluoreszenzmarkiert. Die Effizienz dieser Markierung lag nach Aufreinigung mittels Gelfiltration zwischen 30 und 40 % (Abbildung 35).

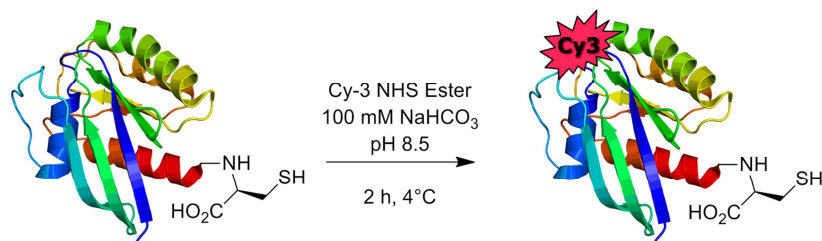


Abbildung 35: Cy-3 Markierung des verkürzten Wildtyp N-Ras-Proteins ($\Delta 1-181$).

3.3.1 Ligation der farnesylierten Peptoid-/Peptidsequenzen

Um die farnesylierten Hybridsequenzen mit dem N-Ras-Protein zu verknüpfen, wurde das Lipopeptid jeweils in Methanol gelöst. Nach Zugabe von Triton X-114 und dem Protein in DTE-freiem Tris-Puffer bei pH 7.4 wurde die Michael-Addition des Thiols der C-terminalen Cysteinseitenkette an die Maleimidfunktion der farnesylierten Peptidsequenzen durch vorsichtiges Schütteln über Nacht bei 4 °C erreicht. Das Peptid wurde im doppelten Überschuss, bezogen auf das Protein, eingesetzt, um zu gewährleisten, dass selektiv Cystein-181 reagierte. Die verkürzten N-Ras-Konstrukte besitzen neben

dem C-terminalen Cys-181 drei weitere Cysteine (Cys-51,-80 und -118). Es ist jedoch bekannt, dass Cys-51 und -80 aufgrund der tertiären Proteinstruktur nicht zugänglich sind. Cys-118 ist im Wasser bedingt zugänglich ist, sodass bei höherem Peptidüberschuss ebenfalls diese Thiolgruppe mit der MIC-Gruppe reagiert.^{128,129} Mittels Tritonextraktion¹³⁰ wurde anschließend das ligierte Protein aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität vom verkürzten Protein abgetrennt. Im Allgemeinen wechselwirken hydrophile, wasserlösliche Proteine kaum mit nicht-ionischen Detergenzien wie Triton, sodass sie sich in der wässrigen Phase einlagern. Das ligierte Protein weist jedoch aufgrund des angebrachten Lipidrestes eine erhöhte Hydrophobizität auf und wechselwirkt deshalb stark mit der Tritonphase, sodass eine Anreicherung des Ligationsproduktes in der Tritonphase erreicht wird. Durch den niedrigen Trübungspunkt von Triton X-114 lassen sich bei erhöhter Temperatur die wässrige und die tritonhaltige Phase gut voneinander trennen.

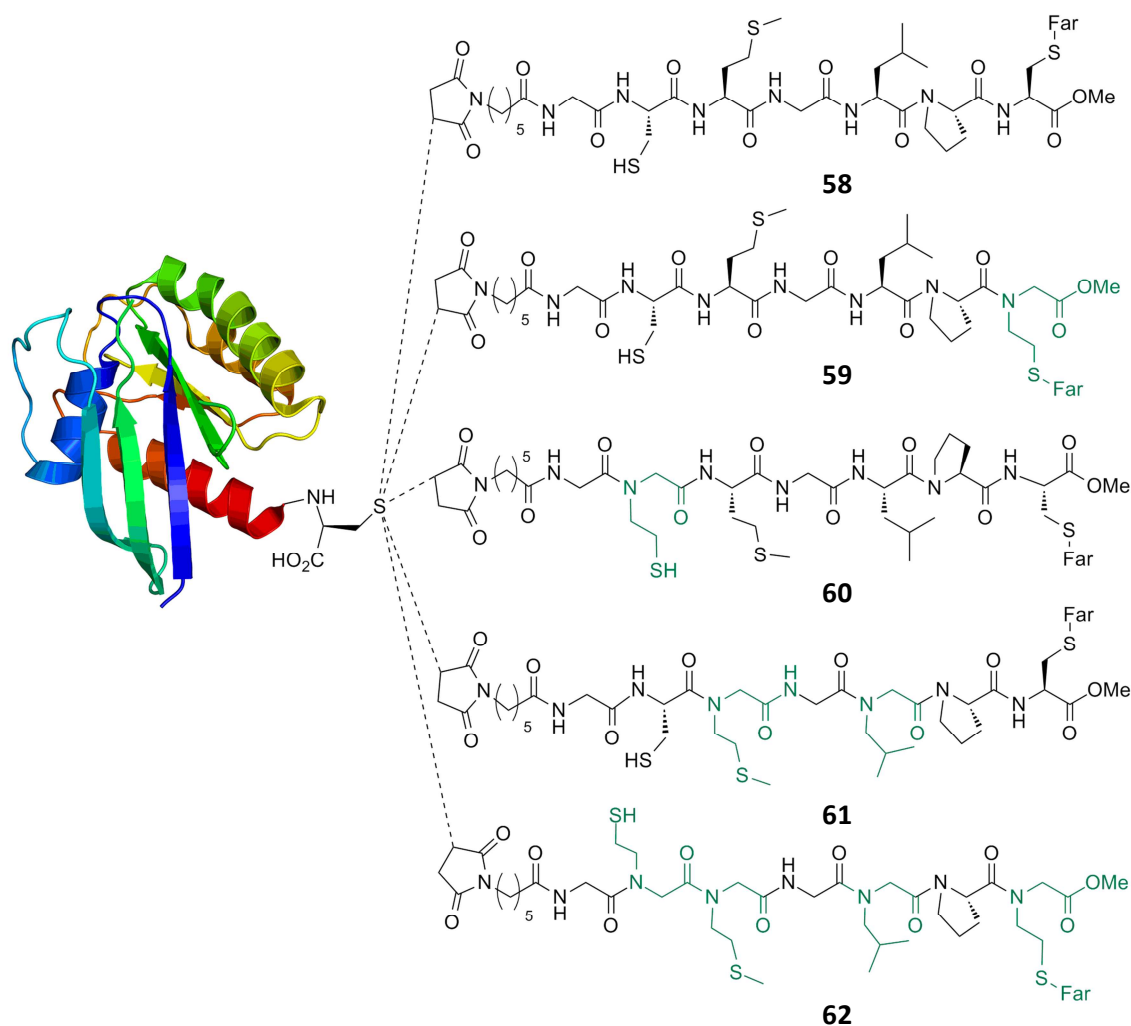


Abbildung 36:Übersicht über die einfach lipidierten Sonden für den Differenzierungsassay in PC12-Zellen, bei denen die farnesylierten Hybridsequenzen an die G12V-Mutante ligiert wurden.

Die Tritonphase wird im Anschluss mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt, sodass man das lipidierte Protein detergentfrei erhält. Die farnesylierten Hybridsequenzen besitzen in ihrem C-Terminus Cysteine bzw. Peptidbausteine, deren Thiofunktion sowohl während der Peptidsynthese, um Dimerisierung oder intramolekulare Reaktionen zu vermeiden, als auch während der Ligation, um Konkurrenzreaktionen auszuschließen, geschützt vorliegen müssen. Um in den geplanten Zellexperimenten mit dem freien Thiol arbeiten zu können, wurde im Anschluss an die Aufreinigung nach der Ligation die *tert*-Butylthiogruppe mit DTE über Nacht bei 4 °C entfernt.

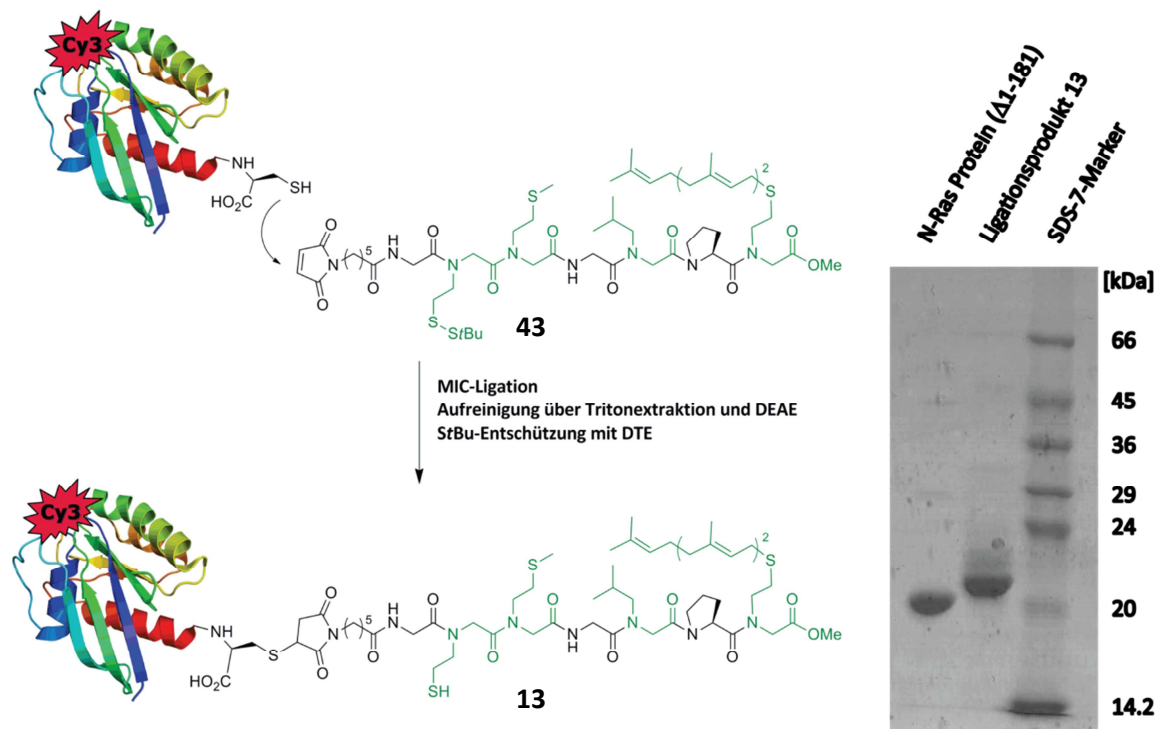


Abbildung 37: MIC-Ligation der Hybridsequenz **43** an das verkürzte, Cy-3 markierte Wildtyp N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$). SDS-Page der Ligation nach Coomassie-Färbung.

Wie in Abbildung 37 zusehen ist, weist das Ligationsprodukt im Vergleich zum verkürzten N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$) aufgrund seiner höheren Masse eine kürzere Laufstrecke im Gel auf. Auch mittels Massenspektrometrie konnte die erfolgreiche Ligation und anschließende *tert*-Butylthioentfernung nachgewiesen werden (Abbildung 38). Im Anschluss an die Charakterisierung mittels SDS-Page und MALDI-TOF wurden die semisynthetischen Proteine aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

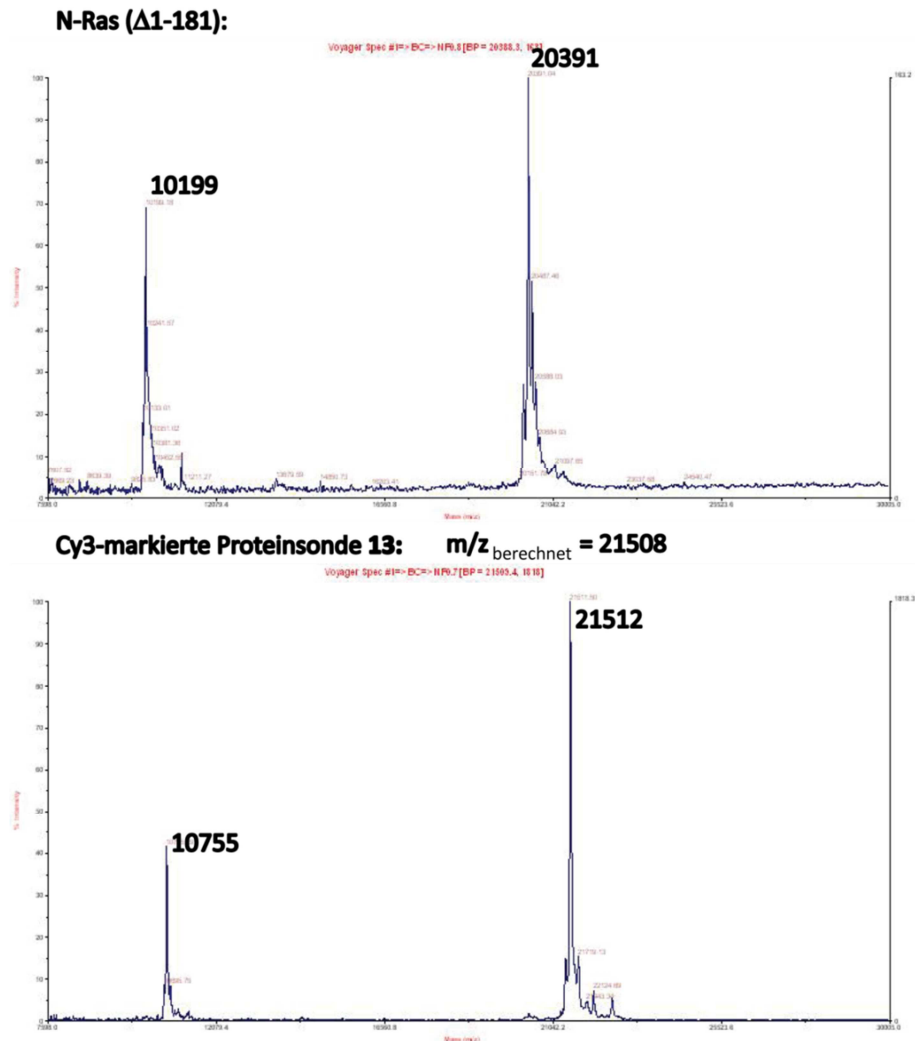


Abbildung 38: Massenspektrometrische Charakterisierung *oben*:MALDI-TOF des verkürzten N-Ras-Proteins; *unten*: MALDI-TOF des Ligationsproduktes **13**. Die Differenz der beiden Signale entspricht der Masse der lipidierten Peptid-/Peptidsequenz **43**.

In Tabelle 3 sind die Ausbeuten der jeweiligen Ligationen sowohl an das Wildtyp- als auch an das G12V N-Ras-Protein zusammengefasst, die Ausbeuten bewegten sich im Allgemeinen zwischen 20 - 30 %.

Tabelle 3: Überblick über die Ausbeuten der MIC-Ligation der farnesylierten Hybridsequenzen an die verkürzten N-Ras Proteine ($\Delta 1-181$), dem Cy-3 markierten Wildtyp und der G12V-Mutante.

Eintrag	Lipopeptid	Cy-3 markierter Wildtyp		G12V-Mutante	
		Lipoprotein	Ausbeute	Lipoprotein	Ausbeute
1	3	57	25 %	58	11 %
2	39	7	26 %	59	27 %
3	45	9	21 %	60	60 %
4	42	11	25 %	61	33 %
5	43	13	27 %	62	29 %

3.3.2 Ligation der doppelt lipidierten Sequenzen an das verkürzte, Cy-3 markierte N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$)

Die Ligation der farnesylierten und palmitoylierten Sequenzen erfolgte in Analogie zu den einfach lipidierten Variationen. Entsprechend wurde das jeweilige doppelt lipidierte Peptid in Methanol gelöst und Triton X-114 hinzugefügt wurde. Nach Zugabe des verkürzten, zuvor Cy-3 markierten N-Ras-Proteins in Tris-Puffer wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte, wie zuvor, über Tritonextraktion, gefolgt von Ionenaustauscherchromatographie. Hierbei wurde die Aufreinigung, im Unterschied zu den Ligationen der einfach farnesylierten Sequenzen, in DTE-freiem Puffer durchgeführt, um einen Angriff des Thiols an den Thioester zu vermeiden, der die Abspaltung des Palmitoylrestes zur Folge hätte. In Tabelle 4 sind die Ausbeuten der Ligationen aufgeführt, im Allgemeinen verliefen diese ebenfalls mit Ausbeuten zwischen 20 - 30 %.

Tabelle 4: Übersicht über die Ligationen der doppelt lipidierten Sequenzen an verkürztes, Cy-3 markiertes N-Ras-Protein ($\Delta 1-181$).

Eintrag	Protein	Farnesylierte und palmitoylierte C-terminale Sequenz	Ausbeute
1	8	MIC-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-NhCys(Far)-OMe (52)	22 %
2	10	MIC-Gly- NhCys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (54)	52 %
3	12	MIC-Gly-Cys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-Cys(Far)-OMe (56)	28 %
4	14	MIC-Gly-NhCys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-NhCys(Far)-OMe (47)	15 %

3.4 Darstellung semisynthetischer N-Ras-Proteine mit nicht-natürlichem C-Terminus

Neben den semisynthetischen N-Ras-Proteinen, deren C-Termini peptoidische Elemente beinhalten, sollten weitere Proteinsonden hergestellt werden, in deren C-Termini weitere nicht-natürliche Einheiten eingeführt werden sollten. Zum einen sollte eine Sonde synthetisiert werden, deren palmitoylierbares Cystein durch ein Penicillamin ausgetauscht wurde, und zum anderen sollten Derivate zugänglich gemacht werden, deren Aminosäuren zwischen den lipidierten Cysteinen durch nicht-peptidische Elemente, wie eine Triethylglykolkette bzw. eine Biphenyleinheit, ersetzt werden sollten.

3.4.1 Semisynthese eines Ras-Proteins, dessen palmitoylierbares Cystein durch ein Penicillaminderivat ausgetauscht wurde

Die Einbringung peptoidischer Elemente in die C-terminale Sequenz hat Auswirkungen auf die Ausbildung sekundärer Strukturen. Ergänzend zu diesen Variationen sollte eine Sonde hergestellt werden, in der die Umgebung um das Thiol, das als Anknüpfungspunkt für den Palmitoylrest fungiert, verändert wird. Hierbei fiel die Wahl auf Penicillamin, dessen β -Kohlenstoff im Vergleich zu Cystein

zwei zusätzliche Methylgruppen trägt. Die Thiolgruppe im Penicillamin befindet sich daher in einer sterisch höchst anspruchsvollen Umgebung, sodass eventuelle Einschränkungen beim Entfernen oder Anbringen des Palmitoylrestes denkbar sind. Für eine entsprechende Sonde (**63**) sollte daher zunächst Lipopeptid **64** synthetisiert werden, dessen Penicillamin als Disulfid geschützt werden sollte, um inter- und intramolekulare Nebenreaktionen während der Synthese und der MIC-Ligation zu vermeiden (Abbildung 39). Das *tert*-butylthiogeschützte Fmoc-Penicillamin **65** ist zwar kommerziell erhältlich, jedoch zu einem sehr hohem Preis (8000 €/g), sodass eine Synthese für diesen Baustein entwickelt werden sollte.

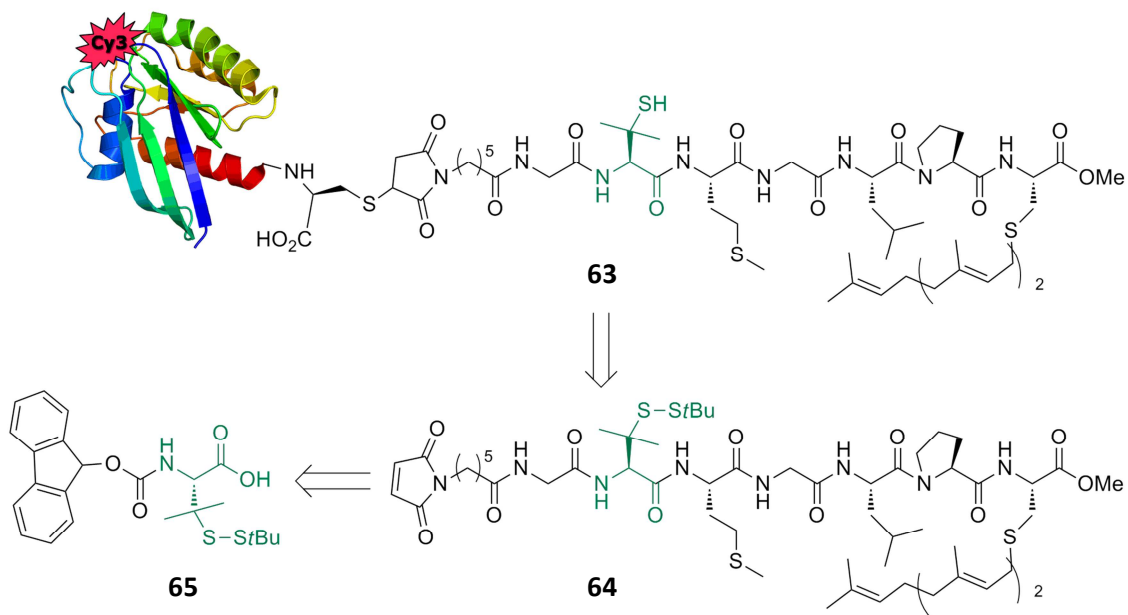


Abbildung 39: Retrosynthetische Analyse des penicillaminhaltigen, farnesylierten N-Ras-Proteins **63**.

Entwicklung einer neuen Methode für die Bildung unsymmetrischer Disulfide

Neben der essentiellen Rolle, die Disulfiden in der Natur bei der Faltung und Ausbildung tertiärer Proteinstrukturen zukommt,^{131,132} gewinnen sie auch in der Biochemie, der medizinischen und biologischen Chemie immer mehr an Bedeutung. In zahlreichen Anwendungen nutzt man die selektive Bildung der Disulfide sowie ihre Orthogonalität gegenüber vielen funktionellen Gruppen. Unter anderem werden Disulfide eingesetzt, um die Rückfaltung von Proteinen zu erleichtern oder aber auch um konformative Einschränkungen in Proteine einzuführen. In der medizinischen Chemie werden Disulfide in Propharmaka eingebaut, um erhöhte Hydrophobizität oder Zellpermeabilität zu erreichen. Aufgrund der hohen Glutathionkonzentration innerhalb der Zelle (15 mM innerhalb vs. 15 μ M außerhalb der Zelle)¹³³ wird die Disulfidbindung gespalten und die aktive Verbindung freigesetzt.^{134,135} Durch ihre Stabilität sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen

eignen sich unsymmetrische Disulfide als Schutzgruppen in der organischen Chemie, speziell in der Peptidchemie. Der prominenteste Vertreter dieser Klasse ist die *tert*-Butylthiogruppe, die der Abschirmung des nukleophilen und leicht oxidierbaren Thiols der Cysteinseitenkette dient.^{67,136-138}

In der Literatur finden sich verschiedene Ansatzpunkte zur Disulfidsynthese.¹³⁹ Häufig erfolgt dies durch die Oxidation der entsprechenden Thiole, die durch die Verwendung von Luftsauerstoff, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder stärkerer Oxidationsmittel, wie Iod oder Wasserstoffperoxid, erreicht werden kann. Für die Synthese unsymmetrischer Disulfide sind die Synthesemöglichkeiten begrenzter, speziell für unsymmetrische Cysteindisulfide.^{126,140-142} Im Allgemeinen erfolgt dabei die Aktivierung eines Thiols meist als Sulfonylderivat, das anschließend von einer Thiolgruppe angegriffen wird.¹⁴³ Etablierte Strategien beinhalten die Aktivierung als Sulfonylthiocyanat,¹⁴⁴ –thiocarbonat,^{126,145} S-alkyl¹⁴⁶ bzw. S-arylthiosulfat¹⁴⁷, oder als Thiophthalimid.¹⁴⁸ In Abbildung 40 A ist die von R. Hunter *et al.* entwickelte Eintopfsynthese dargestellt, bei der ein Thiol durch Umsetzung mit 1-Chlorbenzotriazol aktiviert und im Folgenden von einem zweiten Thiol angegriffen und in das unsymmetrische Disulfid überführt wird.²¹ Im Jahr 2008 gelang die Erweiterung des Substratspektrums von Aryl- und Alkylresten auf Cysteindisulfide.¹⁴⁰ Abbildung 40 B zeigt die von S. J. Brois *et al.* veröffentlichte Methode der Aktivierung des Thiols als Sulfonylthiocarbonat durch Umsetzung mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid,¹⁴⁵ das in der Arbeitsgruppe um G. I. Tesser *et al.* auf Cysteine übertragen wurde.¹²⁶ Diese Methode wurde in Kapitel 3.2.1 bei der Synthese des von Cystein abgeleiteten Fmoc-geschützten Peptoidbausteins **17** erfolgreich eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit bietet die Aktivierung des Thiols mit einem Sulfonylbromid, das durch Umsetzung von bis(5,5-Dimethyl-2-thioxo-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl)disulfid mit Brom entsteht. Das Disulfanylderivat kann im Anschluss mit Thiolen, unter anderem mit Cysteinen zum entsprechenden unsymmetrischen Disulfid reagieren (Abbildung 40 C).¹⁴¹ In einer weiteren, ebenfalls häufig verwendeten Methode wird ein Pyridylsulfonylderivat eingesetzt, wobei ein unsymmetrisches 2-Pyridyldisulfid durch *N*-Alkylierung aktiviert und anschließend durch nukleophile Substitution in das entsprechende unsymmetrische Disulfid sowie 1-Alkylpyridin-2-thiol überführt wird (Abbildung 40 D).¹⁴⁹ Viele dieser Methoden weisen jedoch Nachteile, wie lange Reaktionszeiten, hohe pH-Abhängigkeit¹⁵⁰ und die teilweise Unvereinbarkeit mit der Fmoc-basierten Peptidfestphasensynthese, beispielsweise durch die Instabilität der 2-Pyridyldisulfide unter basischen Bedingungen, auf.^{151,152}

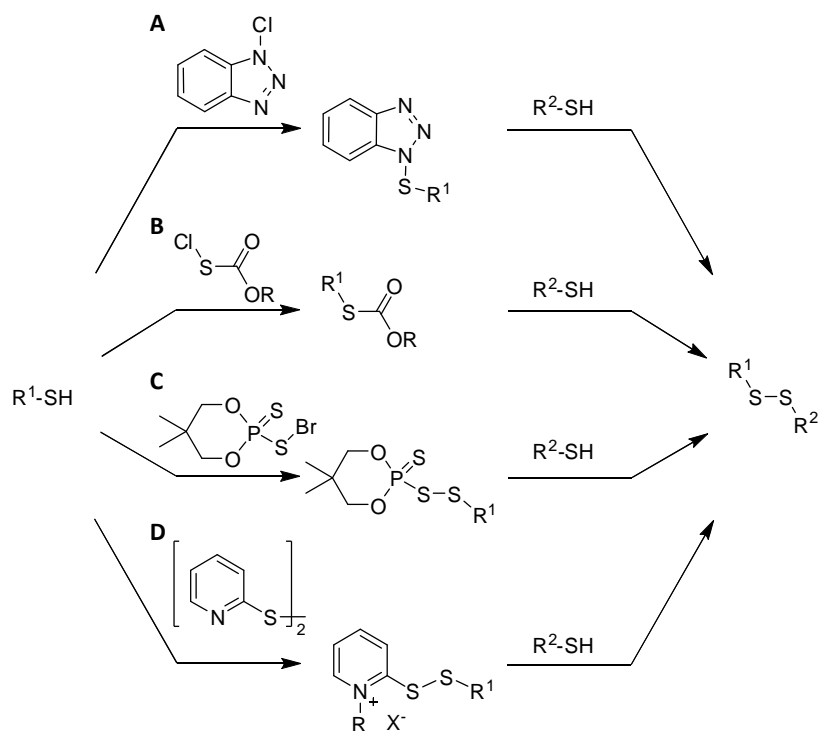


Abbildung 40: Überblick über verschiedene Methoden für die Synthese unsymmetrischer Disulfide. A) Aktivierung des Thiols mit 1-Chlorbenzotriazol in einer Eintopfsynthese;¹⁵³ B) Aktivierung des Thiols als Sulfonylthiocarbonat mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid;¹⁴⁵ C) Aktivierung als Disulfanylderivat nach D. Witt;¹⁴¹ D) Aktivierung eines unsymmetrischen 2-Pyridyldisulfids durch *N*-Alkylierung.¹⁴⁹

Für die Synthese des als Disulfid geschützten Fmoc-Penicillamins **65** wurde zunächst die von G. I. Tesser *et al.* entwickelte Methode der Aktivierung des freien Thiols mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid versucht, da sie mit Erfolg bei der Synthese des *tert*-butylthio-geschützten Peptoidbausteins **17** angewendet worden war (vergleiche 3.2.1).¹²⁶ Hierfür wurde das kommerziell erhältliche *S*-Trityl-geschützte Fmoc-Penicillamin **66** unter sauren Bedingungen zum freien Thiol **67** entschützt und anschließend mit Methoxycarbonylsulfonylchlorid aktiviert. Die folgende Umsetzung zum Disulfid misslang, vermutlich aufgrund des sterischen Anspruchs der beiden tertiären Thiole. Alternativ wurde die Disulfidbildung mittels radikalischer Dimerisierung durch UV-Bestrahlung bei 250 nm probiert. Das entschützte Thiol **67** wurde dafür in DMF gelöst, ein Überschuss 2-Methyl-2-propanthiol hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde mit Licht der Wellenlänge 250 nm bestrahlt. Auch nach sehr langen Reaktionszeiten (mehrere Tage) konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Die geringe Ausbeute (13 %) nach Aufreinigung über Säulenchromatographie und anschließend mittels präparativer HPLC-MS erforderte eine alternative Synthese.

Wie zuvor erwähnt, ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden der Disulfidbildung, die hauptsächlich für symmetrische Disulfide verwendet wird, die Oxidation der entsprechenden Thiole. Seit den 1950er Jahren ist die Oxidationskraft von DMSO bekannt.^{154,155} Im Wesentlichen findet die DMSO-vermittelte Oxidation von Thiolen¹⁵⁶ bei der Einführung von Disulfidbrücken in Peptiden und

Proteinen in gepufferten, wässrigen Lösungen in einem weiten pH-Bereich¹⁵⁷ oder auch im Zusammenspiel mit Metallkatalysatoren bei der Disulfidbildung in niedermolekularen Verbindungen Anwendung.¹³⁹ Die Vorteile von DMSO liegen in seiner weiten pH-Toleranz (pH 3 - 8) und seiner Selektivität. Beispielsweise beobachtet man mit stärkeren Oxidationsmitteln, wie Iod, teils Nebenreaktionen mit den Seitenketten anderer nukleophiler Aminosäuren, wie Methionin, Tryptophan oder Tyrosin.¹⁵⁸ Eingeschränkt wird die Nutzung von DMSO als Oxidationsmittel für die Synthese unsymmetrischer Disulfide durch die häufig auftretende Bildung von Homodimeren. Generell lässt sich bei der Oxidation zu Disulfiden eine abnehmende Oxidationstendenz von aromatischen, über primäre und sekundäre bis hin zu tertiären Thiolen feststellen, wobei sich tertiäre Thiole als nahezu unreaktiv erwiesen haben.¹³⁹ Aufgrund der unzufriedenstellenden Ergebnisse der Photoreaktion wurde im Folgenden die Oxidation mittels DMSO untersucht. Dafür wurde das unter sauren Bedingungen entschützte Thiol **67** in einem Ammoniumacetat-haltigen Gemisch aus Acetonitril und Wasser gelöst, und es wurden sowohl 20 % DMSO als auch ein Überschuss an Thiol hinzugefügt. Nach mehrtägigem Rühren der Reaktionslösung bei Zimmertemperatur wurde die Bildung des gewünschten Produktes beobachtet, jedoch wurde auch nach längeren Reaktionszeiten (10 Tage) nicht mehr als 50 % iger Umsatz erreicht. Um die Reaktionsgeschwindigkeit und -effizienz zu erhöhen, wurde Mikrowellenstrahlung eingesetzt.¹⁵⁹ Dafür wurde eine Reaktionslösung in Analogie zu der zuvor bei Zimmertemperatur durchgeführten Reaktion fünf Minuten bei 150 °C mit einer Anfangsleistung von 150 W bestrahlt.

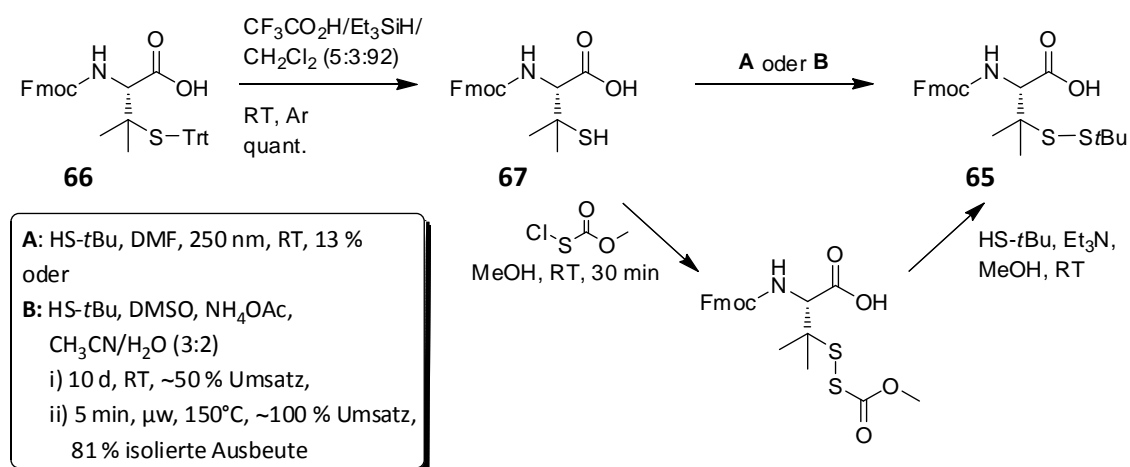


Abbildung 41: Synthese des *tert*-butylthiogeschützten Fmoc-Penicillaminbausteins **65**.

Unter diesen Bedingungen wurde **67** vollständig in das sterisch höchst anspruchsvolle Disulfid **65** überführt und konnte nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in 81 % iger Ausbeute

isoliert werden (Tabelle 5, Eintrag 1). Bemerkenswerterweise wurde die sonst bei DMSO-Oxidationen häufige Homodimerbildung nicht beobachtet.

Da der Einsatz der Mikrowellenstrahlung die Oxidation der beiden tertiären Thiole in sehr guten Ausbeuten ermöglichte, wurde im Folgenden das Anwendungsspektrum dieser neuen mikrowellenbeschleunigten und DMSO-vermittelten Disulfidbildungsmethode untersucht. Zunächst wurden die zuvor genannten Bedingungen auf die Synthese des kommerziell erhältlichen Fmoc-Cys(StBu)-OH (**68**) angewendet. Das unsymmetrische Disulfid konnte in nahezu quantitativer Ausbeute isoliert werden und auch in diesem Fall wurde keine Homodimerbildung beobachtet (Tabelle 5, Eintrag 2). Da bei Cysteinen häufig Racemisierung auftritt,⁷⁶ wurde die Reaktion in analoger Weise mit Fmoc-D-Cystein(Trt)-OH durchgeführt. Nach saurer Entschützung und anschließender DMSO-vermittelter, mikrowellenbeschleunigter Disulfidbildung wurden beide Enantiomere separat mit Trimethylsilyldiazomethan zu den entsprechenden Methylestern **69** carboxymethyliert, um die im Anschluss durchgeführte Trennung mittels chiraler HPLC zu erleichtern. Wie in dem Diagramm in Abbildung 42 zu sehen ist, wurde weder in der Probe des L-Enantiomers noch in der des D-Enantiomers Racemisierung beobachtet.

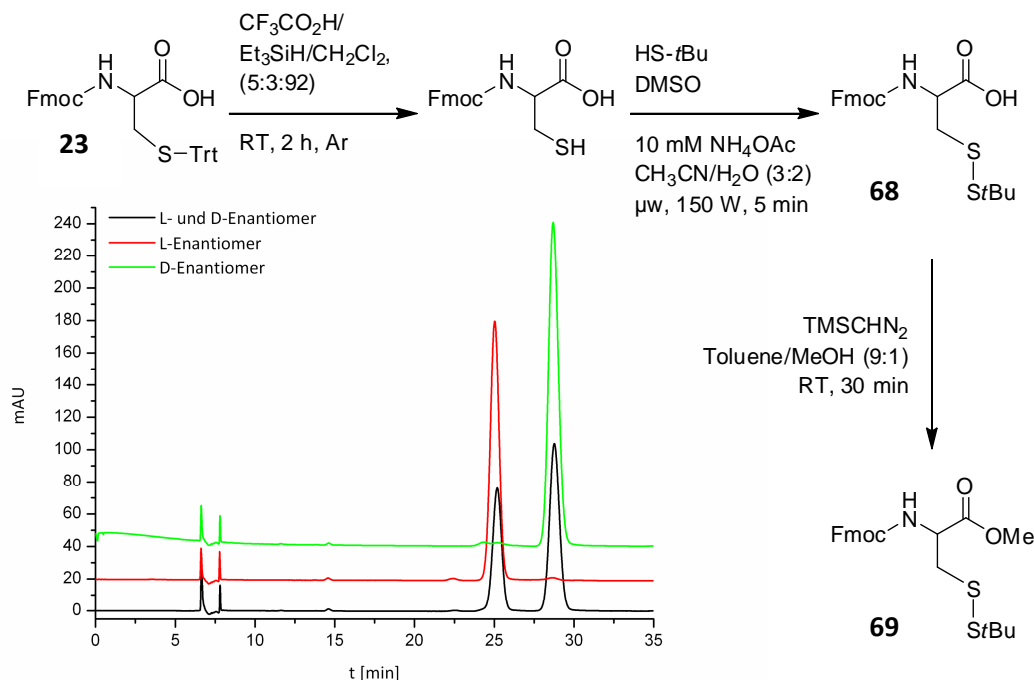
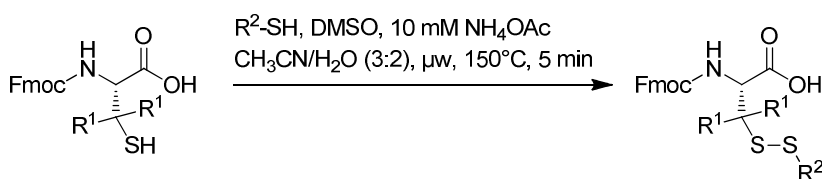


Abbildung 42: Ausschluss etwaiger Racemisierung mittels chiraler HPLC nach Disulfidbildung mit beiden Enantiomeren sowie anschließender Carboxymethylierung.

Um die generelle Anwendbarkeit der neuen Methode zu demonstrieren, wurde eine Auswahl an Thiolen unter den beschriebenen Bedingungen mit zuvor sauer entschütztem Fmoc-Cystein bzw. Fmoc-Penicillamin umgesetzt. Mit aromatischen Thiolen verlief die Disulfidbildung in guten

Ausbeuten (Tabelle 5, Eintrag 3 und 4), wobei mit Benzylthiol fast quantitative Umsetzung beobachtet wurde (Tabelle 5, Eintrag 5). Mit aliphatischen Thiolen wurden ebenfalls exzellente Ausbeuten erreicht (Tabelle 5, Eintrag 6 - 9). Bemerkenswerterweise waren nicht geschützte funktionelle Gruppen ebenfalls mit der Disulfidmethode kompatibel. So wurden Thiole, die freie Amine (Tabelle 5, Eintrag 7), Alkohole (Tabelle 5, Eintrag 8) und Ester (Tabelle 5, Eintrag 9) enthielten, ebenfalls in sehr guten Ausbeuten in die entsprechenden Disulfide überführt.

Tabelle 5: Anwendungsbereich der mikrowellenbeschleunigten, DMSO-vermittelten Disulfidbildung.



Eintrag	R ¹	R ² -SH	Verbindung	Ausbeute
1	CH ₃		65	81 %
2	H		70	98 %
3	CH ₃		71	85 %
4	H		72	65 %
5	CH ₃		73	99 %
6	H		74	92 %
7	H	HCl H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -SH	75	80 %
8	H	HO-CH ₂ -CH ₂ -SH	76	75 %
9	H	MeO-C(=O)-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -SH	77	86 %
10	H		79	44 %

Im Laufe der Untersuchung des Substratspektrums konnte der Überschuss, des zweiten Thiols (R²-SH) von anfänglich 7 - 10 Äquivalenten auf 5 Äquivalente reduziert werden, ohne dabei die Ausbeute zu beeinträchtigen. Abschließend sollte ein biologisch relevantes Thiol mit dem Fmoc-Cystein verbunden werden. Daher wurde das biotinylierte Thiol **78** als Edukt eingesetzt wurde. Biotin findet aufgrund seiner Affinität zu Streptavidin umfangreiche Anwendung in der Affinitätschromatographie und zahlreichen anderen biologischen Systemen.¹⁶⁰ Thiol **78** wurde zuvor in drei Schritten synthetisiert. Ausgehend von dem Biotinbaustein **80**, der von Dr. H. Dückert im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt worden war, wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure

sauer entfernt, das erhaltene freie Amin **81** wurde unter Verwendung von EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid), HOBT und Triethylamin an S-Trityl-3-mercaptopropionsäure gekuppelt (**82**). Nach Entfernung der Tritylschutzgruppe wurde das biotinylierte Thiol **78** erhalten, der anschließend mit Fmoc-Cystein zum Disulfid **79** umgesetzt wurde. Die mäßige Ausbeute von 44 % lässt sich durch die Zugabe von nur drei Äquivalenten von **78** erklären.

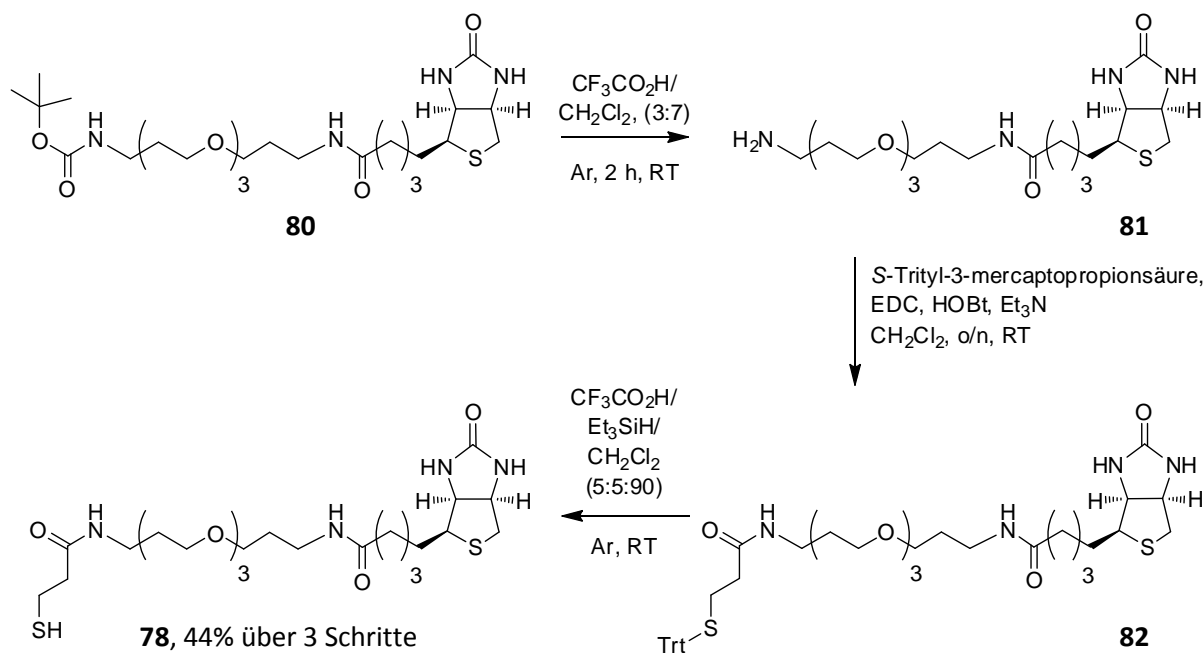


Abbildung 43: Synthese des biotinylierten Thiols **78**.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine neue effiziente Methode für die Darstellung unsymmetrischer Disulfide entwickelt wurde. Durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung konnte die Reaktionszeit drastisch verkürzt werden, ohne dass Racemisierung auftrat. Die neue Methode weist ein großes Substratspektrum auf. Es werden sowohl aromatische als auch aliphatische Thiole akzeptiert und auch Thiole mit ungeschützten Funktionalitäten, wie Alkohole und Amine, können als Edukte eingesetzt werden. Weiterhin zeichnet sich diese Reaktion durch ihre einfache Durchführbarkeit und die Vermeidung von sonst üblichen toxischen Reagenzien aus.

Semisynthese eines N-Ras-Proteins, dessen palmitoylierbares Cystein durch ein sterisch anspruchsvolles Penicillamin ersetzt wurde

Nachdem eine geeignete Methode für die Synthese des sterisch hoch anspruchsvollen Fmoc-geschützten Penicillaminbausteins **65** entwickelt worden war, wurde die entsprechende Peptidsequenz **64** am 2-Chlortritylchloridharz unter Verwendung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methode aufgebaut. Hierfür wurde **2** als Ester unter Baseneinwirkung am polymeren Träger immobilisiert. Die weitere Synthese wurde in dem mikrowellenunterstützten Syntheseroboter *Liberty* der Firma CEM durchgeführt, wobei **65** mit Collidin in Dichlormethan/DMF (1:1) eingeführt wurde.

Unter mild-sauren Bedingungen wurde das Peptid nach Kupplung der *N*-terminalen Maleimido-capronsäure abgespalten und nach präparativer HPLC-MS-Aufreinigung wurde die freie Carbonsäure **83** in 37 % iger Ausbeute erhalten.

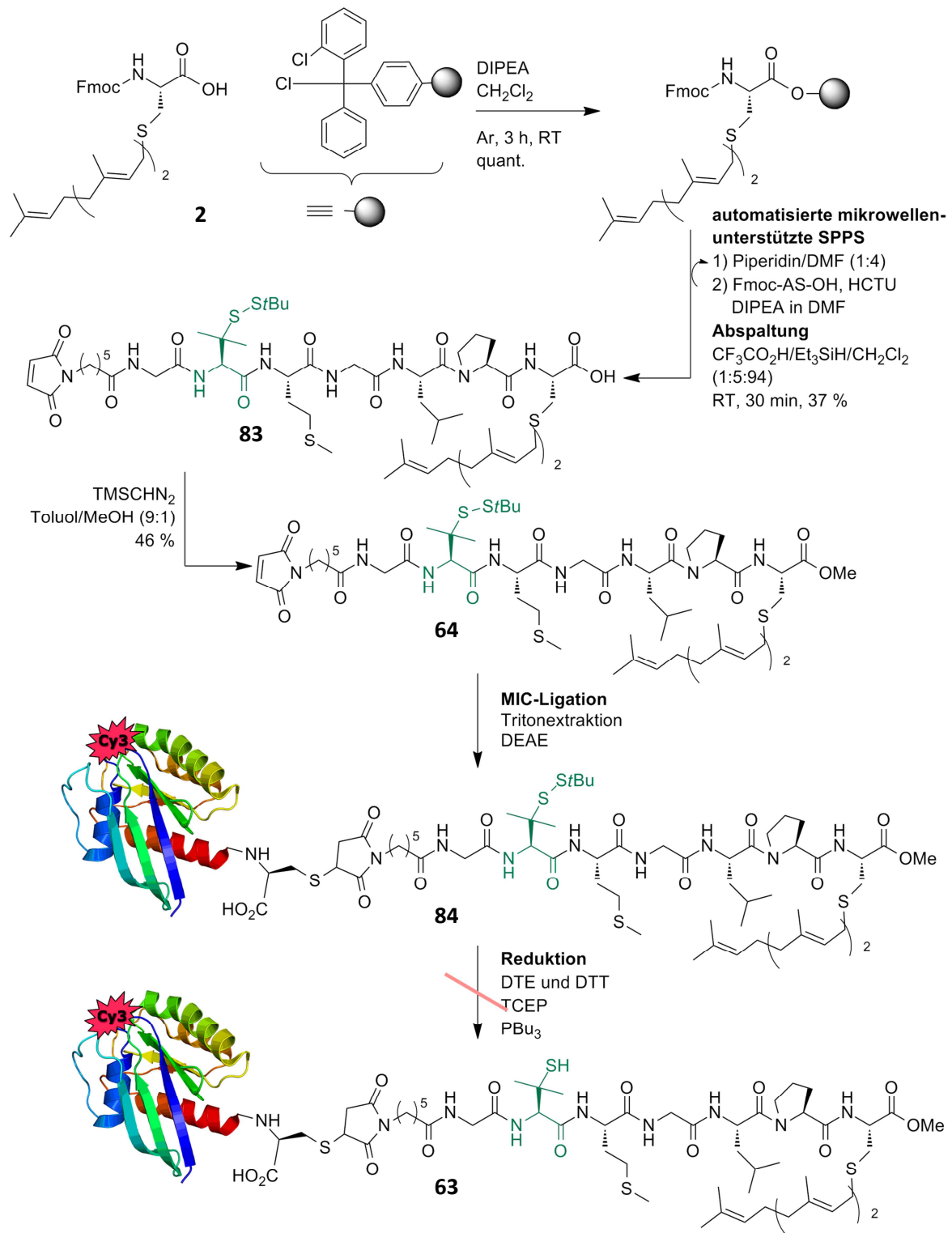


Abbildung 44: Ansatz zur Semisyntese des Cy-3 markierten, farnesylierten N-Ras-Proteins **63**, wobei in der Lipopeptidfestphasensynthese der Fmoc-geschützte Penicillaminbaustein **65** verwendet wurde.

Nach erfolgreicher Methylierung mit Trimethylsilyldiazomethan erfolgte die MIC-Ligation an das zuvor Cy-3 markierte, verkürzte N-Ras-Wildtypprotein ($\Delta 1-181$). Wie bei den farnesylierten, peptoidischen Hybridsequenzen sollte im Anschluss die *tert*-Butylthioschutzgruppe von **84** entfernt werden. Jedoch ließ sich die Schutzgruppe, in Analogie zur Synthese von **65**, vermutlich aufgrund des sterischen Anspruchs der beiden tertiären Thiole, nicht abspalten. Neben der üblichen Entschützung mit DTE wurde die Entschützung mit DTT, TCEP und Tributylphosphin versucht, jedoch konnte bei keinem dieser Reduktionsversuche die entsprechende Reaktion zu **63** mittels MALDI-TOF beobachtet werden (Abbildung 44).

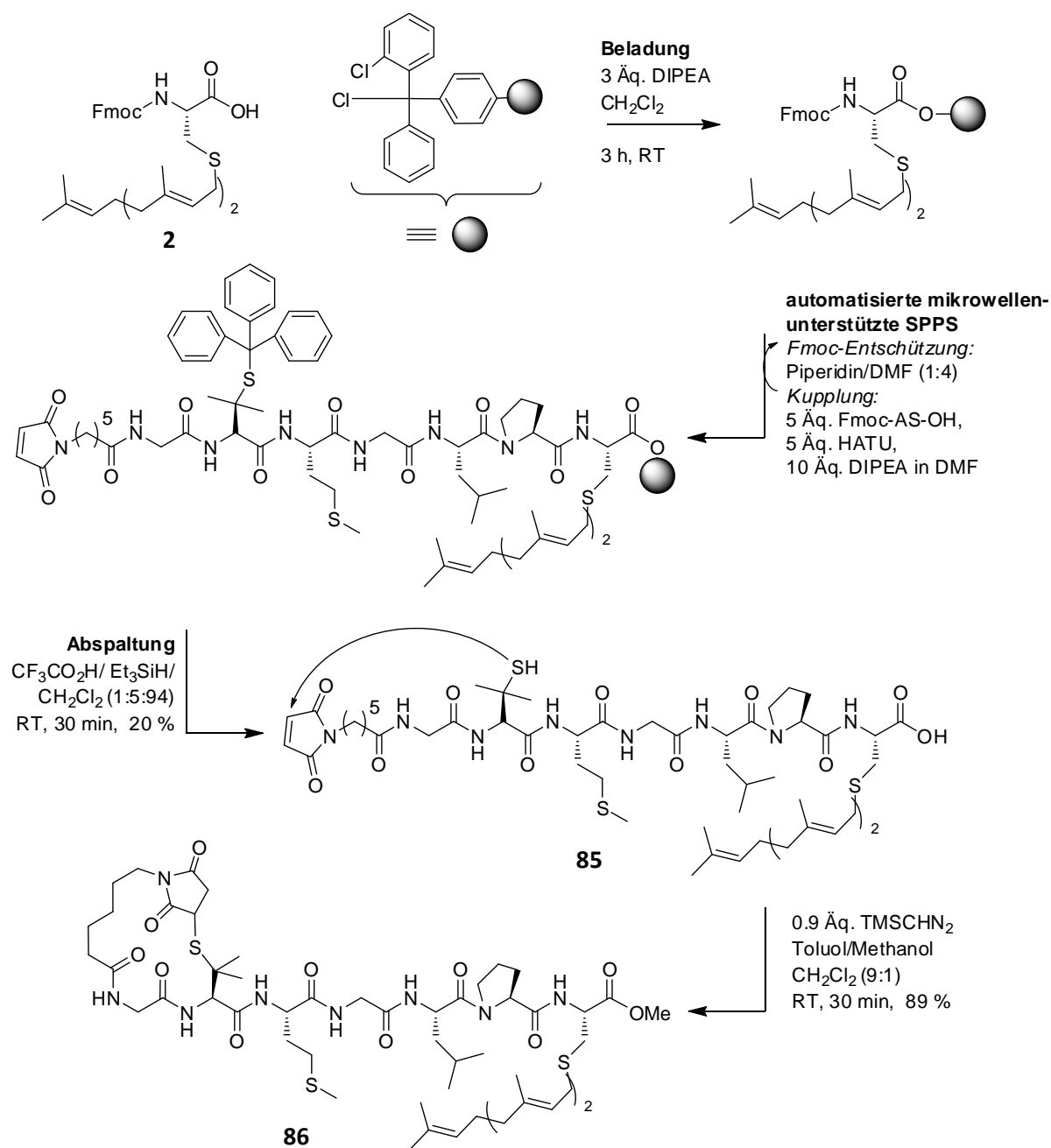


Abbildung 45: Ansatz für die Synthese eines penicillaminhaltigen Lipopeptids ohne Schutzgruppe des Seitenkettenthiois.

Da die Spaltung des Disulfids im Anschluss an die Proteinligation nicht möglich war und sich der Schwefel der Penicillaminseitenkette im Rahmen der Bausteinsynthese als verhältnismäßig unreaktiv erwiesen hatte, sollte die Synthese von **63** über ein lipidiertes Peptid verlaufen, dessen Thiolseitenkette während der Ligation ungeschützt vorliegen sollte. Hierfür wurde in analoger Weise eine Sequenz aufgebaut, bei der das Penicillamin als *S*-Trityl-geschütztes Derivat (**66**) verwendet wurde. Die Synthese der freien Säure **85** am 2-Chlortritylchloridharz gelang in einer Ausbeute von 20 %, wobei die Tritylschutzgruppe im Zuge der Abspaltung ebenfalls direkt entfernt wurde. Die freie Carbonsäure wurde anschließend mit Trimethylsilyldiazomethan methyliert. In einer Ausbeute von 89 % konnte der Methylester (**86**) isoliert werden, jedoch stellte sich bei der Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie heraus, dass das zuvor unreaktive Thiol doch in der Lage war, nukleophil an den Michael-Akzeptor anzugreifen (Abbildung 45).

Die Probleme bei der Entschützung von **84** wurden auf die beiden tertiären Thiole zurückgeführt. Daher sollte als Alternative eine Peptidsequenz (**88**) synthetisiert werden, deren Penicillaminbaustein nicht mit einer *tert*-Butylthio-, sondern mit einer Benzylthiogruppe geschützt war, entsprechend sollte ein primäres durch ein tertiäres Thiol ersetzt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung war dieser Baustein bereits erfolgreich in quantitativer Ausbeute hergestellt worden (Tabelle 5, Eintrag 5), sodass er direkt in die Sequenz eingebaut werden konnte. Entsprechend startete die Synthese wieder mit der basenvermittelten Immobilisierung von **2** am 2-Chlortritylchloridharz, und die Peptidkettenverlängerung erfolgte unter Mikrowellenbestrahlung im Syntheseroboter. Nach der Abspaltung vom polymeren Träger wurde **87** in 46 % iger Ausbeute erhalten und mit Trimethylsilyldiazomethan in 80 % iger Ausbeute zu **88** methyliert. Die anschließende MIC-Ligation an das verkürzte, Cy3-markierte Wildtyp N-Ras-Protein wurde, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, durchgeführt, jedoch wurde die Reduktion des Disulfids diesmal durch Zugabe von TCEP (Tris(2-chlorethyl)-phosphat) erreicht. Die erfolgreiche Entschützung zu **63** wurde mit MALDI-TOF überprüft (Abbildung 46).

auf die Lokalisation des Proteins haben könnte. Beispielsweise wurde für H-Ras festgestellt, dass die Palmitoylierung von Cys-181 ausreichend für korrekte H-Ras-Lokalisation ist, wohingegen die einfache Palmitoylierung von Cys-184 dafür nicht ausreicht.¹⁶² Um die Fragestellung zu klären, ob der Abstand und die Elemente des Peptidrückgrats für die korrekte Lokalisation und damit für die biologische Aktivität essentiell sind, wurden zwei Proteinsonden entworfen. Zum einen sollte ein semisynthetisches Protein (**89**) hergestellt werden, dessen C-terminale Aminosäuren durch eine Triethylenglykoleinheit ersetzt wurden, und zum anderen sollte eine Sonde (**90**) synthetisiert werden, bei der zwischen die Lipidierungsstellen eine Biphenyleinheit eingebaut wurde (Abbildung 47). Die Wahl des Lipidierungsmusters ergab sich hierbei chronologisch. Zunächst wurde Proteinsonde **89** in farnesylierter Form synthetisiert und in MDCK-Zellen mikroinjiziert (vergleiche Kapitel 3.6.2). Daher wurde auf die Synthese der palmitoylierten Variante verzichtet, da durch die *in vitro* Untersuchung eines solchen Proteins keine neuen Erkenntnisse erhalten worden wären. Im Gegensatz dazu wurde **90** später direkt in der doppelt lipidierten Form hergestellt, um somit die Untersuchung sowohl *in vitro* als auch *in cellulo* zu ermöglichen.

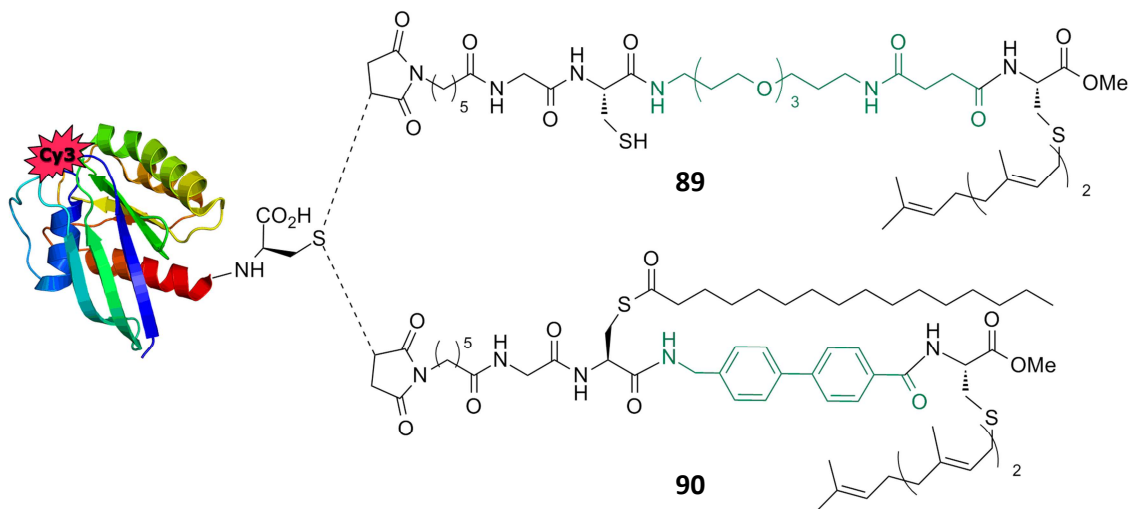


Abbildung 47: Semisynthetische N-Ras-Proteine, zwischen deren C-terminale Lipidierungsstellen zum einen eine Triethylenglykoleinheit (**89**) und zum anderen eine Biphenyleinheit (**90**) eingebaut werden sollte.

Synthese der triethylenglykolhaltigen Proteinsonde 89

Um die triethylenglykolhaltige, farnesylierte N-Ras-Modifikation zu realisieren, wurde der Triethylenglykolbaustein **91** benötigt, der neben einer Fmoc-Schutzgruppe eine Carboxylgruppe beinhaltet, um ihn basierend auf der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methode in eine farnesylierte Sequenz einbauen zu können. Daher wurde selektiv eine Aminofunktion des 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamins (**92**) mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und die verbliebene freie Aminofunktion mit Fmoc-OSu als Fmoc-Urethan (**91**) geschützt (Abbildung 48).¹⁶³

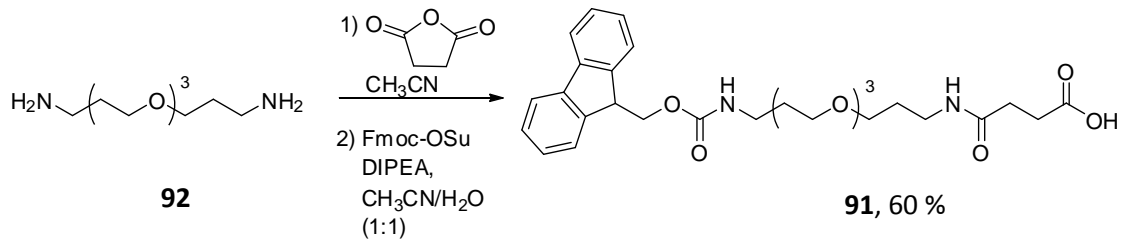


Abbildung 48: Synthese des Fmoc-geschützten Triethylglykolbausteins **91**.

Die erhaltene Triethylglykoleinheit wurde anschließend in der Festphasensynthese am 2-Chlortritylchloridharz eingebaut. Hierfür wurde zunächst, wie zuvor beschrieben, das farnesylierte Cystein **2** am polymeren Träger immobilisiert. Der Einbau der Triethylglykoleinheit sowie der weiteren Aminosäuren erfolgte mikrowellenunterstützt am Syntheseroboter. Nach Abspaltung unter mild-sauren Bedingungen wurde **93** erhalten, jedoch zeigte die Untersuchung des Rohproduktes ein weiteres Signal, dessen Masse einer Abbruchsequenz (**94**) entsprach, bei der **91** nicht gekuppelt worden war. Mittels präparativer HPLC-MS war die Trennung der beiden Verbindungen möglich, sodass **93** in 17 % und **94** in 22 % isoliert werden konnte. Anschließend wurde **93** mit Trimethylsilyldiazomethan methyliert und **95** wurde, unter den gleichen Bedingungen wie die einfach farnesylierten Peptoidhybridsequenzen, an das zuvor Cy-3 markierte, verkürzte N-Ras-Protein ligiert. Wie zuvor wurde die Reduktion zum freien Thiol mit DTE durchgeführt (Abbildung 49).

Synthese einer N-Ras-Sonde, deren farnesyliertes und palmitoyliertes Cystein über eine Biphenyleinheit verbunden sind.

In dem semisynthetischen Protein **89** sind die beiden Lipidierungsstellen über eine Triethylglykoleinheit miteinander verbunden, die linear mehr Bindungen enthält als die Aminosäuren, die sich in der natürlichen C-terminalen Sequenz befinden. Um den Einfluss der Elemente zwischen beiden Cysteinen zu untersuchen, sollte das doppelt lipidierte Protein **96** hergestellt werden, dessen C-Terminus zwischen den lipidierten Cysteinen keine peptidischen Elemente enthält, sondern in dem diese durch eine Biaryleinheit miteinander verknüpft werden sollte (Abbildung 47). Daher wurde zunächst der entsprechende Fmoc-geschützte Carbonsäure-Biarylbaustein **97** benötigt. Dafür wurde (4-Aminomethylphenyl)-Boronsäure-Hydrochlorid (**98**) zunächst mit Fmoc-OSu in Gegenwart von Triethylamin in das entsprechende Fmoc-Urethan **99** überführt. Anschließend sollte über eine palladiumkatalysierte Suzuki-Kupplung die Arylboronsäure mit 4-Bromobenzoessäure-methylester (**100**) verbunden werden.

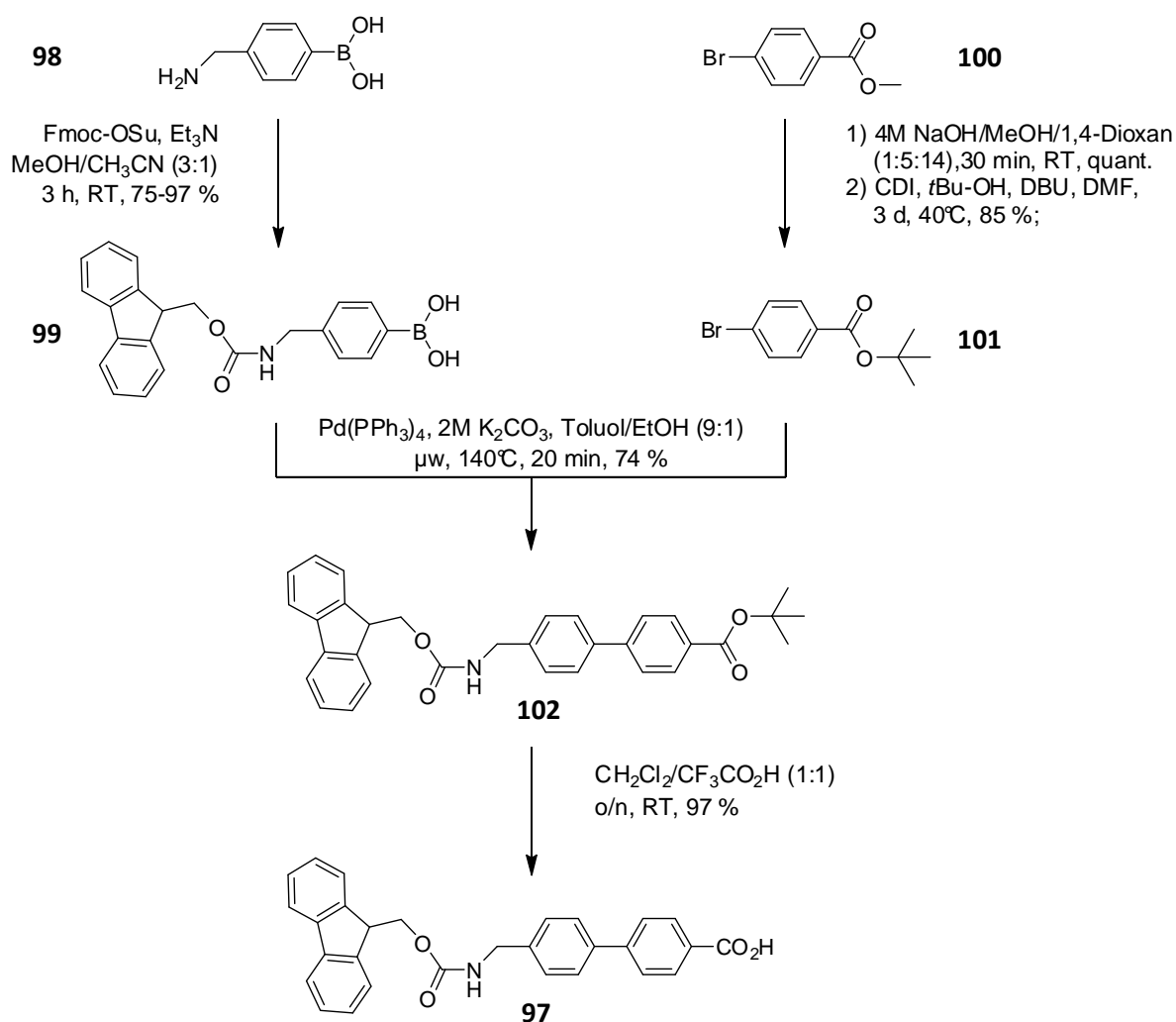


Abbildung 50: Synthese des Fmoc-geschützten Biarylbausteins **97**.

Die Kupplung gelang, jedoch war der erhaltene Fmoc-Biarylmethylester sehr schlecht löslich. Des Weiteren verlief die folgende Spaltung des Methylesters in sehr geringer Ausbeute, sodass ein anderer Ester eingeführt wurde. Hierfür wurde **100** zunächst nach den bereits verwendeten Bedingungen¹¹⁴ quantitativ verseift und die freie Carbonsäure nach Aktivierung mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) und durch Zugabe von *tert*-Butanol in Gegenwart von DBU in den *tert*-Butylester **101** überführt. Es folgte die mikrowellenunterstützte, palladium(0)-katalysierte Suzuki-Kupplung. Schließlich wurde der *tert*-Butylester **102** unter sauren Bedingungen entschützt, sodass **97** in 97 % iger Ausbeute erhalten wurde (Abbildung 50). Nachdem die Biaryleinheit **97** im Gramm-Maßstab hergestellt worden war, wurde die palmitoylierte und farnesylierte Peptidsequenz in Analogie zu den zuvor beschriebenen doppelt lipidierten Sequenzen synthetisiert. Dafür wurde erneut **2** am 2-Chlortritylchloridharz immobilisiert. Im Syntheseroboter *Liberty* wurden die Fmoc-geschützte Biaryleinheit **97** und das palmitoylierte Fmoc-Cystein **15** mikrowellenunterstützt gekuppelt, und dann die Synthese manuell fortgesetzt, um die schnelle *S,N*-Verschiebung zu vermeiden. Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit einer 2 % DBU enthaltenden DMF-Lösung entfernt und sowohl Fmoc-Glycin als auch Maleimidocaprinsäure wurden mit 5 Äquivalenten HATU und 20 Äquivalenten DIPEA in einer Dreifach- bzw. Doppelkupplung in die Sequenz eingebracht. Nach Abspaltung und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde die freie Säure **103** in 37 % iger Ausbeute isoliert und konnte mit 1.2 Äquivalenten Trimethylsilyldiazomethan in 46 % iger Ausbeute in den Methylester **104** überführt werden. Im Anschluss wurde die MIC-Ligation an das zuvor Cy3-markierte, verkürzte N-Ras-Protein (Δ 1-181), wie bei den anderen doppelt lipidierten Sequenzen, in DTE freiem Puffer durchgeführt (Abbildung 51).

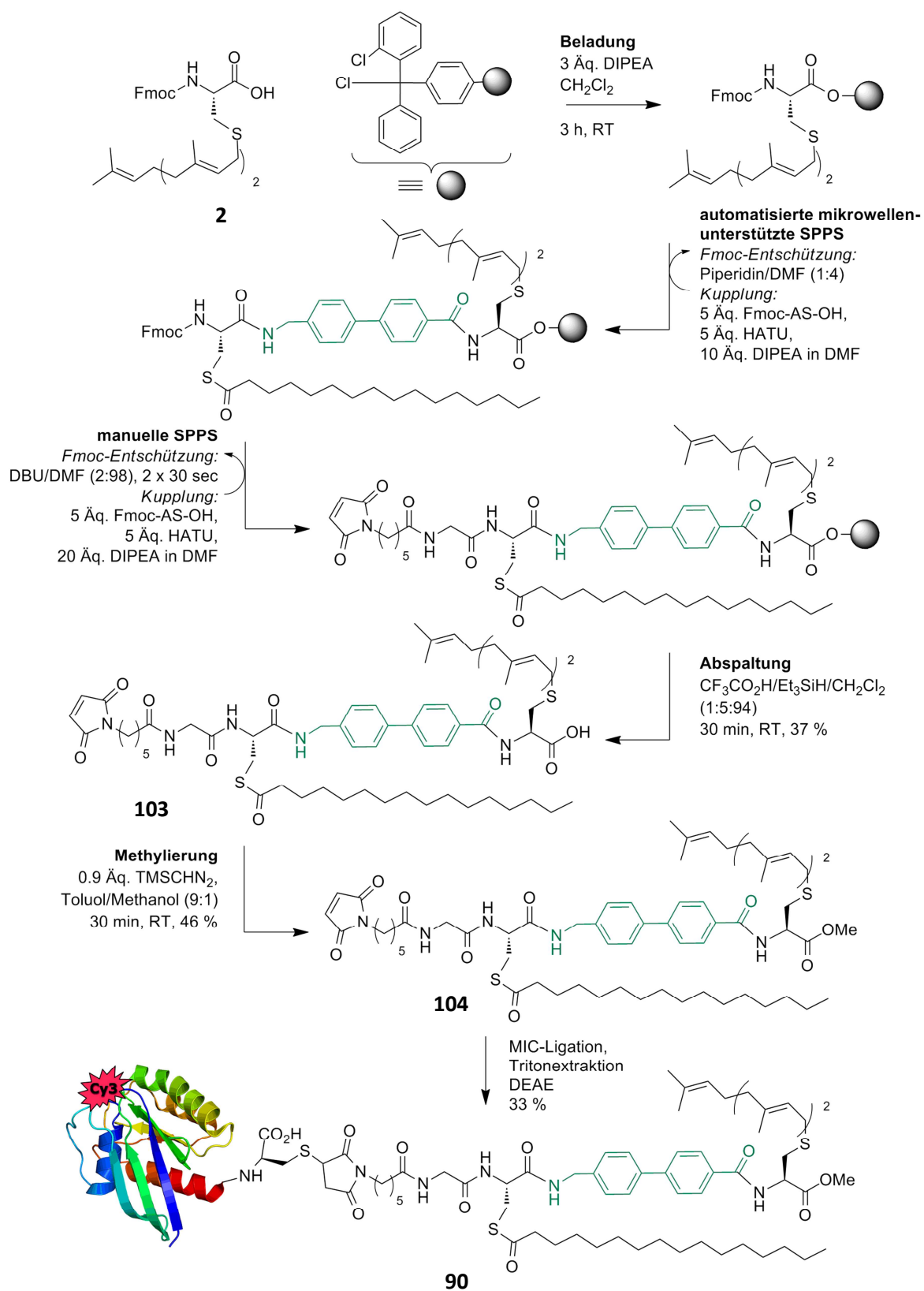


Abbildung 51: Synthese des semisynthetischen Proteins **90**, in dessen palmitoylierten und farnesylierten C-Terminus die Biarylseinheit **97** eingebaut wurde.

3.5 Untersuchung der Depalmitoylierung *in vitro*

Um nähere Einblicke in die Grenzen der Substrattoleranz der in den De-/Reacylierungszyklus involvierten Enzyme zu erlangen, sollten die doppelt lipidierten, semisynthetischen Proteine *in vitro* auf ihre Eignung als Substrat für Acylproteinthioesterasen APT 1 und APT 2 (vergleiche Kapitel 1.2.2) getestet werden. APT 1 wurde kürzlich in einem chemisch-biologischen Ansatz, in dem selektiv APT 1 durch Palmostatin B inhibiert wurde, als Depalmitoylierungsenzym von Ras bestätigt.^{62,63}

A

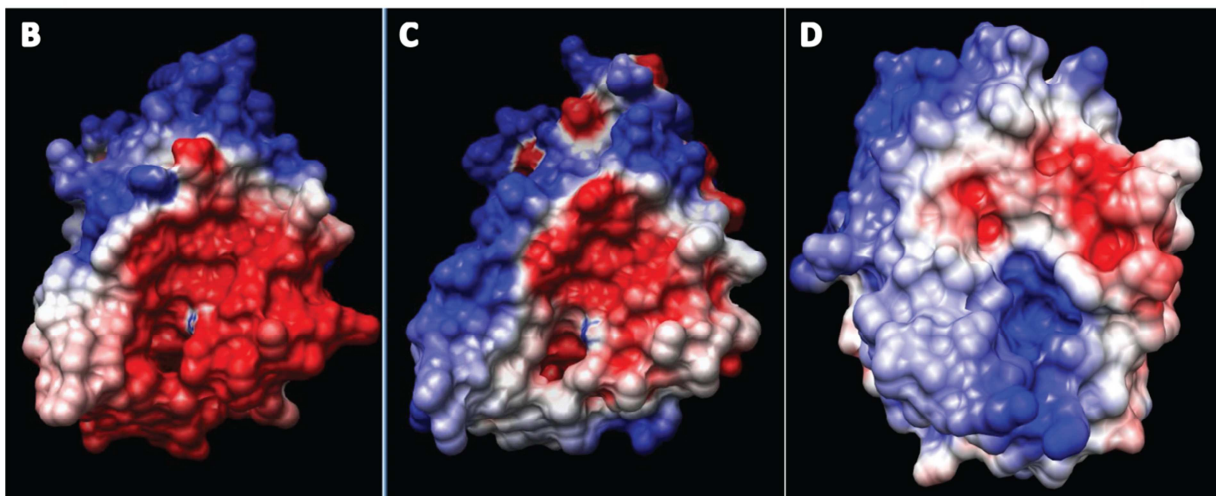
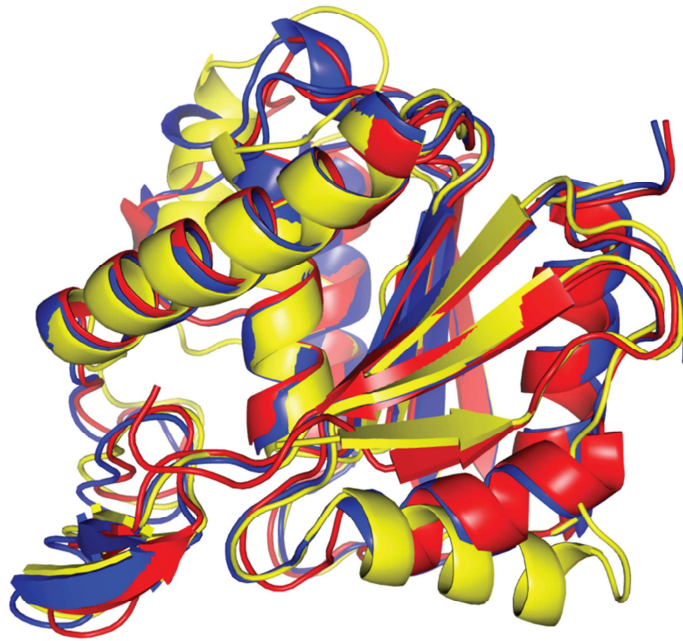


Abbildung 52: A) Überlagerung der Proteinstrukturen von APT 1 (rot), APT 2 (blau) und LYPLAL 1 (gelb). Elektrostatische Potentiale von APT 1 (B), APT 2 (C) und LYPLAL 1 (D), wobei rot für negatives und blau für positives Potential steht.¹⁶⁴

Im Rahmen seiner Doktorarbeit gelang es M. Bürger sowohl APT 2 als auch LYPLAL 1 (Lysophospholipase-like 1) heterolog zu exprimieren, aufzureinigen und zu kristallisieren. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Sequenzhomologe von APT 1, wobei APT 2, das zuvor Lysophospholipase II genannt wurde, 64 % und LYPLAL 1 31 % Sequenzübereinstimmung aufweist.¹⁶⁴ Obwohl die biologische Aktivität beider Proteine bisher unbekannt ist, wurde spekuliert, dass APT 2 ebenfalls in die Ras-Depalmitoylierung involviert sein könnte.⁴⁰ Über LYPLAL 1 ist verhältnismäßig wenig bekannt; kürzlich wurde es jedoch in Verbindung mit dem Fettmetabolismus gebracht.^{165,166} Wie in der Überlagerung der drei Proteinstrukturen in Abbildung 52 A zu sehen ist, weisen die drei Proteine eine nahezu identische Faltung auf und auch ihre aktiven Zentren sind identisch. Im Gegensatz zu APT 1 und APT 2 ist der Tunnel am aktiven Zentrum von LYPLAL 1 geschlossen, sodass eine Hydrolyse langkettiger Substrate vermutlich nicht stattfinden kann. Weitere Unterschiede wurden bei der Betrachtung der elektrostatischen Oberflächenpotenziale beobachtet. Wie die Darstellung in Abbildung 52 B zeigt, ist die Umgebung um das aktive Zentrum von APT 1 stark negativ geladen, wohingegen dies nur in deutlich abgeschwächter Form für APT 2 beobachtet wurde (Abbildung 52 C) und für LYPLAL1 gegenläufig ist, hier weist die Umgebung um das aktive Zentrum ein positives Potential auf (Abbildung 52 D).

In einem *in vitro*-Assay sollte daher zunächst die Depalmitoylierungsaktivität der drei potentiellen Acylproteinthioesterasen bezüglich der natürlichen N-Ras-Sequenz **105** getestet werden. Für den Test wurde das palmitoylierte N-Ras-Protein mit den potentiellen APTs in Gegenwart von ADIFAB (**A**crylo**D**ated **I**ntestinal **F**atty **A**cid **B**inding Protein) inkubiert (Abbildung 53). Bei ADIFAB handelt es sich um ein intestinales fettsäurebindendes Protein (I-FABP), dessen Lysin-27 über die ϵ -Aminogruppe kovalent mit Acrylodan (6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen) verbunden wurde, sodass freie Fettsäuren in einem Bereich zwischen 1 nM bis > 20 μ M detektiert werden können.¹⁶⁷ Wenn sich freie Fettsäure im Reaktionsansatz befindet, wird diese in der hydrophoben Tasche gebunden, in der sich anderenfalls Acrylodan befindet, und verdrängt es somit. Dadurch befindet sich der polaritätsempfindliche Sensor in einer anderen Umgebung, was zu einer Änderung im Fluoreszenzspektrum führt (Abbildung 53). In dem verwendeten *in vitro*-Test wurde der Quotient der Fluoreszenzintensität bei 505 nm und 432 nm bestimmt, wobei bei 386 nm angeregt und das Emissionsspektrum zwischen 400 und 650 nm aufgezeichnet wurde. Wenn sich keine freie Palmitinsäure in der Reaktionslösung befindet, weist das Emissionsspektrum einen Hauptpeak bei ca. 432 nm auf und eine kleine Schulter bei 505 nm. Mit steigender Palmitinsäurekonzentration sinkt die Fluoreszenzintensität bei 432 nm und der Wert der Fluoreszenzintensität bei 505 nm steigt, sodass man insgesamt eine Erhöhung des R-Wertes (Quotient $\frac{F_{505}}{F_{432}}$) beobachtet (Abbildung 54).

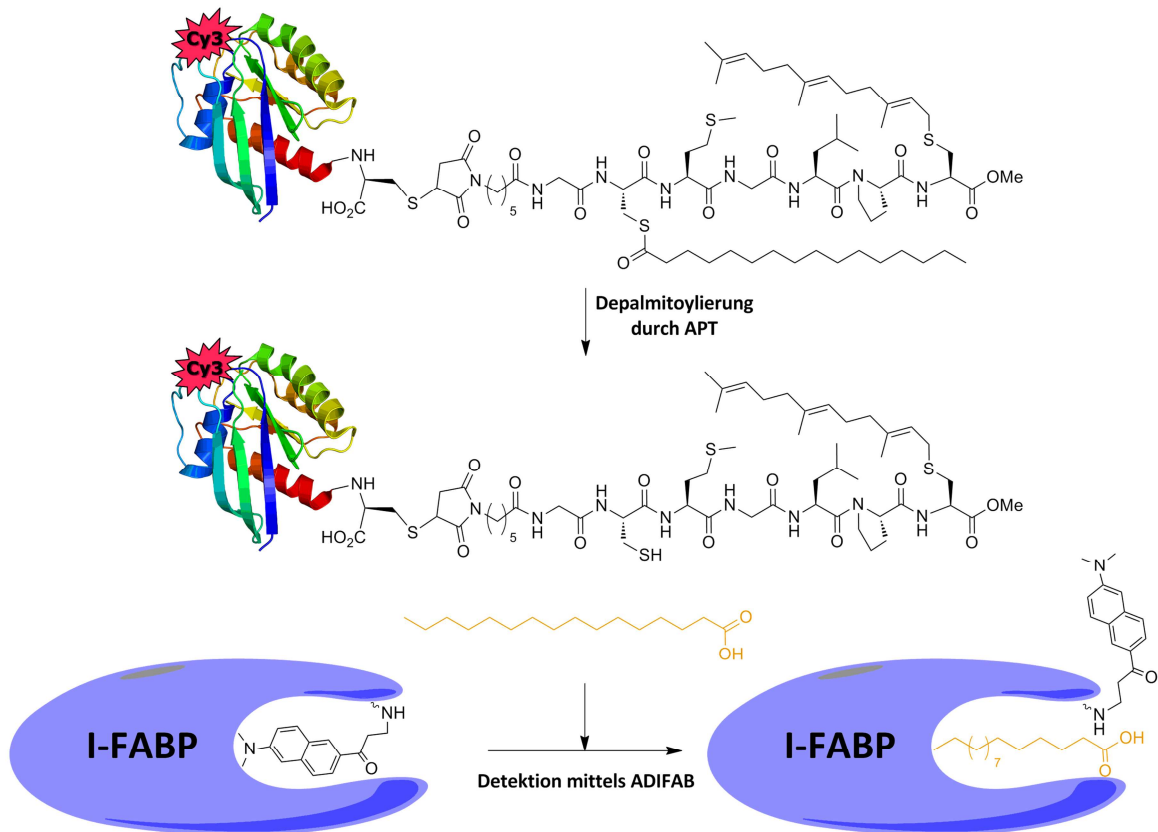


Abbildung 53: Prinzip des *in vitro*-Depalmitoylierungstests. Das palmitoylierte N-Ras-Protein wird mit potentiellen Acylproteinthioesterasen inkubiert. Die abgespaltene Palmitinsäure wird mithilfe des ADIFAB-Proteins quantitativ detektiert.

Mithilfe der von A. Kleinfeld *et al.* entwickelten Gleichung lässt sich die Fettsäurekonzentration anschließend quantifizieren.¹⁶⁷

$$n(\text{PalOH}) = K_D(\text{PalOH}) \cdot Q \cdot V \cdot \frac{R - R_0}{R_{\text{max}} - R}$$

mit $K_D(\text{PalOH}) = 0.32 \mu\text{M}$

$R =$ Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$

$R_0 =$ Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$, ungebundener Zustand

$R_{\text{max}} = 11.5$; Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$, maximal gebundener Zustand

$Q = 19.5$ Fluoreszenzintensität von $\frac{F_0}{F_{\text{max}}}$ bei 432 nm

$V = 400 \mu\text{L}$ Reaktionsvolumen.

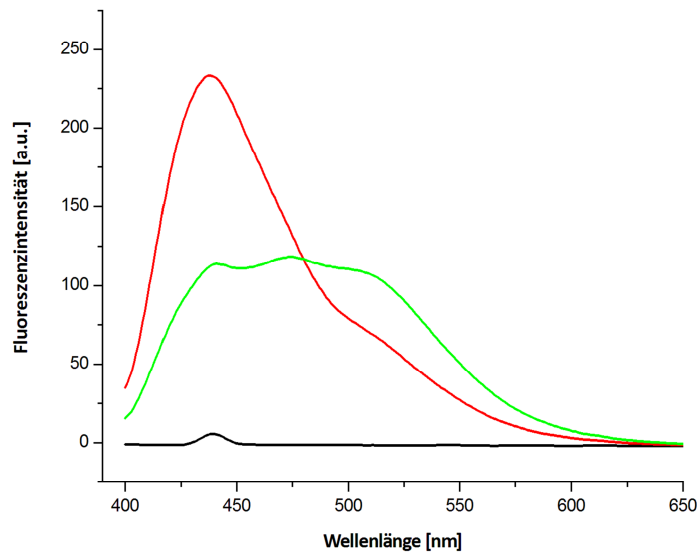


Abbildung 54: Fluoreszenzspektrum von ADIFAB: in Schwarz ist das Emissionsspektrum des Assaypuffers zu sehen, die rote Linie entspricht dem Emissionsspektrum von 200 nm ADIFAB und in Grün ist die Verschiebung der Fluoreszenz nach Zugabe von 400 nm Palmitinsäure in DMSO gezeigt. Die Intensität bei 432 nm sinkt, während die bei 505 nm steigt, sodass R (F_{505}/F_{432}) insgesamt in Gegenwart von freier Palmitinsäure steigt.

3.5.1 Untersuchung der Depalmitoylierungsaktivität von APT 1, APT 2 und LYPLAL 1 unter Verwendung von farnesylierten und palmitoylierten N-Ras

Die Depalmitoylierungsaktivität von APT 1 wurde bereits umfangreich untersucht. Das Enzym weist hohe Substrattoleranz auf, beispielsweise wurde Deacylierung der C-Termini kleiner GTPasen in D- und L-Form beobachtet,^{62,63} aber auch die Depalmitoylierung anderer G-Proteine^{51,168}, viraler Glycoproteine⁴⁶ und Lysophospholipide durch APT 1 wurde festgestellt.¹⁶⁹ Das Substratspektrum von APT 2 und LYPLAL 1 wurde bisher noch nicht untersucht.

Um die Depalmitoylierungsaktivitäten der drei Proteine mithilfe des ADIFAB-Proteins zu untersuchen, wurde die Depalmitoylierungsreaktion von N-Ras durch das Hinzufügen der potentiellen Acylproteinthioesterasen in Gegenwart von ADIFAB gestartet. In 70 Sekunden-Intervallen wurde das Fluoreszenzspektrum aufgenommen und anschließend jeweils der Quotient der Intensitäten $\frac{F_{505}}{F_{432}}$ gebildet, um mithilfe von Kleinfelds Gleichung die Stoffmenge der freigesetzten Palmitinsäure zu berechnen (Abbildung 55). Unter Verwendung von APT 2 als Depalmitoylierungsenzym wurden ca. 40 pmol Palmitinsäure detektiert, wohingegen die freigesetzte Stoffmenge bei der Deacylierung durch APT 1 nur etwa halb so groß war. Bei Zugabe des APT 1-Sequenzhomologs LYPLAL 1 wurde keine Palmitinsäure freigesetzt. Daraus lässt sich schließen, dass das semisynthetische, palmitoylierte N-Ras-Protein **105**, zumindest *in vitro*, kein Substrat für LYPLAL 1 ist. Dies steht im Einklang mit der

Kristallstruktur, wonach der Tunnel im Gegensatz zu APT 1 und APT 2 nicht lang genug für einen Palmitoylrest sein sollte.¹⁶⁴ Damit kann LYPLAL 1 als potentielle Acylproteinthioesterase der N-Ras-Proteine wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaeliskonstante zu bestimmen, wurde eine Serie analoger Experimente mit verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt.

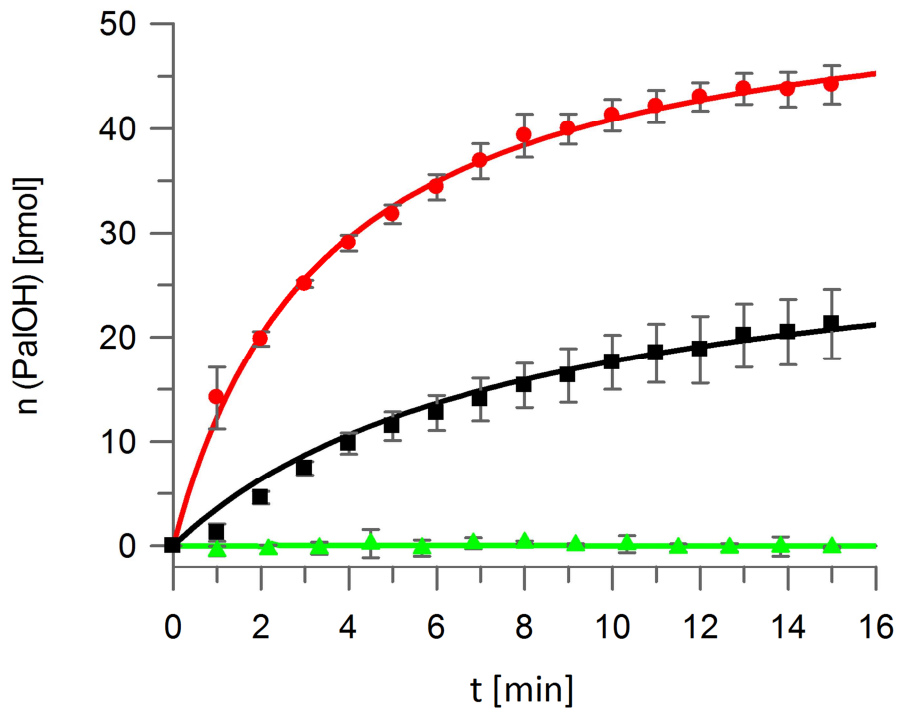


Abbildung 55: *In vitro*-Depalmitoylierung des semisynthetischen, palmitoylierten N-Ras-Proteins. Der Graph zeigt die freigesetzte Stoffmenge Palmitinsäure, aufgetragen gegen die Zeit. N-Ras (2.5 μM) wurde in Gegenwart von ADIFAB (200 nM) mit APT 1 (50 nM) (schwarz), APT 2 (50 nM) (rot) und LYPLAL 1 (50 nM) (grün) inkubiert. APT 2 depalmitoyliert N-Ras schneller als APT 1. Bei LYPLAL 1 wurde keine freigesetzte Palmitinsäure detektiert.

Nach der Auswertung der kinetischen Daten mithilfe des Programms XL Fit wurden die Affinitäten von N-Ras zu APT 1 und APT 2 errechnet, beide Enzyme weisen eine Michaeliskonstante im niedrig mikromolaren Bereich auf. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unterschied sich, wie zuvor bei einer N-Ras-Konzentration von 2.5 μM deutlich. APT 2 wies mit $0.48 \pm 0.02 \text{ nmol/L*s}$ eine fast doppelt so hohe Maximalgeschwindigkeit wie APT 1 ($0.29 \pm 0.00 \text{ nmol/L*s}$) auf (Tabelle 6, Eintrag 1).

In Kontrollexperimenten wurden die Wechselwirkungen des palmitoylierten N-Ras-Proteins **105** mit ADIFAB und die Wechselwirkung von APT 1 bzw. APT 2 und ADIFAB ausgeschlossen, auch nach mehreren Stunden wurde in keiner der Kontrollküvetten eine Änderung der Fluoreszenz beobachtet.

3.5.2 Untersuchung der palmitoylierten, farnesylierten Modifikationen als Substrate für APT 1 und APT 2

Nachdem die *in vitro*-Depalmitoylierung der natürlichen N-Ras-Sequenz **105** durch APT 1 und APT 2 nachgewiesen werden konnte, wurden die nicht-natürlichen, doppelt lipidierten Derivate ebenfalls als Substrate für die Acylproteinthioesterasen untersucht. Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau gewählt, sodass das jeweilige Derivat, in verschiedenen Konzentrationen, mit jeweils 50 nM APT 1 bzw. APT 2 inkubiert wurde und die freigesetzte Palmitinsäure in analoger Weise mit ADIFAB (200 nM) detektiert wurde. Überraschenderweise wurden alle Modifikationen als Substrat sowohl von APT 1 als auch von APT 2 angenommen. Tabelle 6 zeigt die mittels XL Fit berechneten kinetischen Parameter. Generell wurde bei allen Proteinen der bereits für die natürliche Sequenz beobachtete Trend bestätigt, dass die Depalmitoylierungsreaktion in Gegenwart von APT 2 etwa doppelt so schnell abläuft wie mit APT 1. Die Maximalgeschwindigkeiten lagen bei allen Derivaten, außer **14**, unter der von N-Ras. Bei den Affinitäten gegenüber APT 1 und APT 2 lässt sich keine eindeutige Tendenz erkennen. Wie vorstehend erwähnt, lagen die Michaeliskonstanten für N-Ras in einem ähnlichen Bereich (Tabelle 6, Eintrag 1). Ähnliches wurde für Derivat **14**, bei dem alle verfügbaren C-terminalen Aminosäuren gegen die entsprechenden Peptoidbausteine ersetzt wurden, festgestellt. Der K_M -Wert von APT 1 lag bei $1.30 \pm 0.09 \mu\text{mol/L*s}$ und der von APT 2 bei $1.49 \pm 0.19 \mu\text{mol/L*s}$ (Tabelle 6; Eintrag 5). Bei den anderen Modifikationen wurde eine deutlich höhere Affinität für APT 1 als für APT 2 beobachtet (Tabelle 6, Eintrag 2 - 4, 6).

Tabelle 6: Kinetische Parameter der Depalmitoylierung der semisynthetischen palmitoylierten Ras-Variationen durch APT 1 und APT 2.

Eintrag	Protein	Maximalgeschwindigkeit		Michealiskonstante	
		v_{max} (APT 1) [nmol/L*s]	v_{max} (APT 2) [nmol/L*s]	K_M (APT 1) [$\mu\text{mol/L}$]	K_M (APT 2) [$\mu\text{mol/L}$]
1	105	0.29 ± 0.00	0.48 ± 0.02	1.16 ± 0.02	1.43 ± 0.28
2	8	0.19 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.53 ± 0.32	3.27 ± 0.15
3	10	0.17 ± 0.00	0.43 ± 0.00	0.80 ± 0.06	1.66 ± 0.07
4	12	0.07 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.30 ± 0.06	0.86 ± 0.08
5	14	0.55 ± 0.01	0.94 ± 0.03	1.30 ± 0.09	1.49 ± 0.19
6	90	0.11 ± 0.00	0.35 ± 0.00	1.08 ± 0.01	5.72 ± 0.42

Auch wenn diese Experimente nur *in vitro* durchgeführt wurden und somit nicht unter den physiologischen Bedingungen der Zelle stattfanden, lässt sich aus ihnen dennoch schließen, dass

sowohl APT 1 als auch APT 2 eine hohe Substrattoleranz aufweisen. Beide Acylproteinthioesterasen waren in der Lage die Depalmitoylierung von allen Derivaten zu katalysieren.

3.6 Untersuchungen der semisynthetischen Proteine in Zellen

Nach erfolgreicher Synthese der semisynthetischen Proteine mit nicht-natürlichem C-Terminus sollten diese als Molekülsonden für die Untersuchung der De-/Repalmitoylierungsmaschinerie benutzt werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen sollten die peptoidischen, einfach lipidierten Sonden in einem Differenzierungstest mit PC12-Zellen benutzt werden, wofür sie an die onkogene G12V-Mutante ligiert worden waren. Nach Injektion wurde der neuronale Auswuchs bewertet, woraus sich Rückschlüsse auf die biologische Aktivität ziehen lassen. Zum anderen sollten die Cy3-markierten Proteine in Lokalisationsstudien zum Einsatz kommen. Diese Experimente wurden mit dem Wildtypprotein durchgeführt und die Proteine wurden in MDCK-Zellen injiziert. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustands sollte dann die Bewertung ihrer Lokalisation und somit ihrer biologischen Aktivität erfolgen.

3.6.1 Differenzierungsuntersuchung mit PC12-Zellen

Die Tumorzelllinie PC12 wurde aus einem transplantierbaren Phäochromocytom einer Ratte erhalten. Durch Stimulation dieser Zellen mit NGF (*nerve growth factor*) wird die Proliferation ausgesetzt, sie differenzieren und bilden neuritenartige Ausläufer aus, die aber bereits 24 h nach Entfernung des Hormons wieder zurückgebildet werden. Etwa 72 h später setzt die Proliferation wieder ein.¹⁷⁰ Die Neuriten können auch durch Transfektion oder Mikroinjektion onkogener Ras-Proteine induziert werden. Daher kann man den Differenzierungsassay nutzen, um die Fähigkeit der nicht-natürlichen Konstrukte, den Neuritenauswuchs auszulösen, mit der des natürlichen N-Ras C-Terminus zu vergleichen und dadurch Rückschlüsse auf die biologische Aktivität der Modifikationen zu ermöglichen. Für den in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsassay wurden die PC12-Zellen vor der Mikroinjektion durch dreitägige Stimulation mit NGF synchronisiert.¹⁷¹ Nach Entfernung des Wachstumsfaktors bildeten sich die Ausläufer zurück und zwei Tage später wurden die Proteinsonden in die PC12-Zellen injiziert, wobei die Konzentration der verwendeten Proteinlösungen jeweils 100 µM betrug. Parallel wurde der Farbstoff FITC-Dextran co-injiziert, um zwei Tagen nach der Mikroinjektion die injizierten von den nicht injizierten Zellen unterscheiden zu können. Der Assay erwies sich als relativ störungsanfällig, was sich in Schwankungen der Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrolle äußerte. Dies lässt sich auf die empfindlichen PC12-Zellen, deren Passagenummer nicht über 12 liegen sollte, und das Wachstumshormon zurückführen. Experimente zeigten, dass der neuronale Auswuchs ohne Synchronisierung unter identischen Bedingungen zwischen 2 - 35 % variieren kann.¹⁷¹

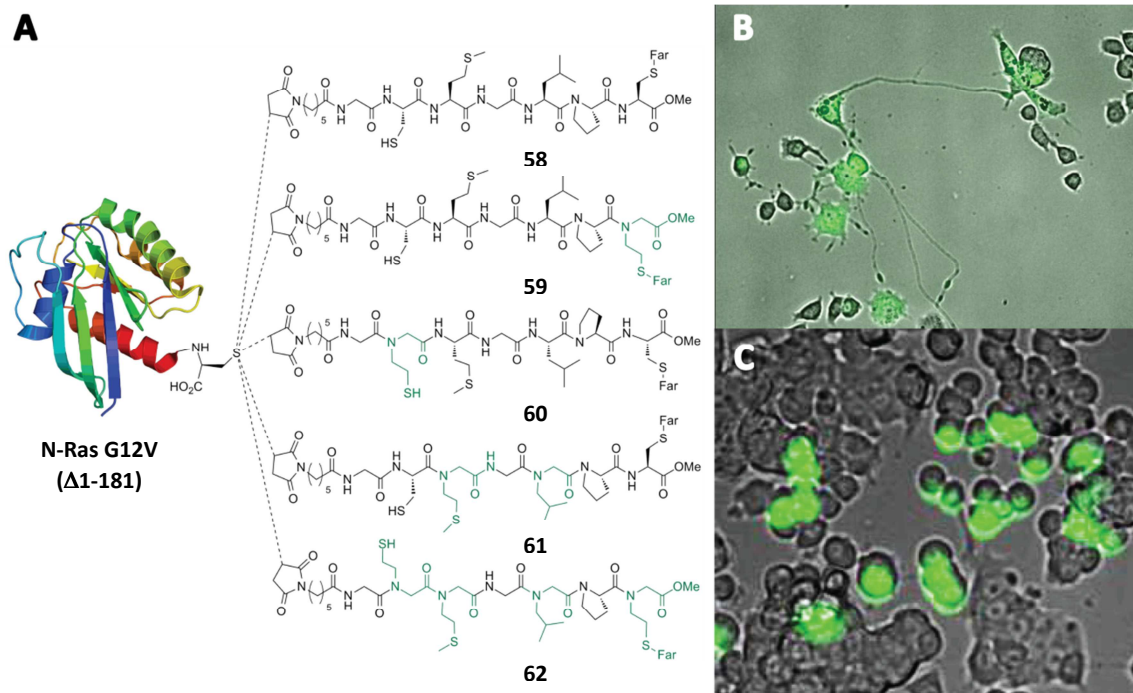


Abbildung 56: A) Strukturen der im PC12-Differenzierungsassay verwendeten Sonden. B) und C) Überlagerung des Durchlichtbildes und des Fluoreszenzbildes. Die injizierten Zellen fluoreszieren und bilden bei der Positivkontrolle **58** Neuriten aus (B), wohingegen nach der Injektion der Negativkontrolle N-Ras G12V ($\Delta 1-181$) die Zellen keine Neuriten aufweisen (C).

Die Tendenz der in Tabelle 7 aufgeführten Ergebnisse konnte in drei voneinander unabhängigen Ergebnissen bestätigt werden. Bei der Positivkontrolle **58**, bei der die natürliche C-terminale Sequenz **3** an die G12V-Mutante ligiert wurde, wiesen im Allgemeinen 40 - 70 % aller Zellen Neuriten, die länger als der doppelte Zelldurchmesser waren, auf. Da diese Werte häufig schwankten wurden die erhaltenen Zellzahlen auf die Positivkontrolle normiert. Das Protein **61**, dessen C-terminales Methionin und Leucin gegen die entsprechenden Peptoidbausteine ausgetauscht wurden, wies dabei mit 93 % die höchste Differenzierungsquote auf (Tabelle 7, Eintrag 4). Bei den Proteinsonden, in denen das farnesylierte (**59**) bzw. palmitoylierbare Cystein (**60**) ersetzt wurde, wurde die Differenzierungseffizienz um ca. 25 % reduziert (Tabelle 7, Eintrag 2 und 3). Im Fall des Proteins, in dem alle verfügbaren Aminosäuren durch die entsprechenden Peptoidbausteine ersetzt wurden, war die Anzahl der Zellen, die Neuriten ausbildeten auf 58 % reduziert (Tabelle 7, Eintrag 5) und lag damit in etwa im Bereich der Negativkontrolle. Als Negativkontrolle wurde das verkürzte N-Ras-Protein verwendet, in diesem Protein fehlt der für die Lokalisation, und biologische Aktivität essentielle C-Terminus (Tabelle 7, Eintrag 6).

Tabelle 7: Ergebnisse des PC12-Differenzierungsassays, bezogen auf die Positivkontrolle **58**.

Eintrag	Protein	Bezogen auf 58
1	58	100 %
2	59	77 %
3	60	74 %
4	61	93 %
5	62	58 %
6	N-Ras G12V (Δ 1-181)	45 %

Aus den Untersuchungen der farnesylierten, peptoidischen Sonden im Differenzierungsassay lässt sich eine erste Tendenz erkennen, dass die Modifikationen, die in den C-Terminus eingebracht wurden, die biologische Aktivität der Proteine beeinflussen. Der Austausch des C-terminalen Methionins und Leucins in der Sonde **61** wies einen mit der natürlichen Sequenz vergleichbaren neuronalen Auswuchs auf, wohingegen die Veränderung der lipidierten Cysteine (**59** und **60**) zu einem Verlust von etwa 25 % der biologischen Aktivität führte. Bei Austausch aller Aminosäuren (**62**) wurden nur noch 58 % Restaktivität beobachtet, sodass dies den Schluss zulässt, dass die Modifikationen die Aktivität der Proteine beeinträchtigen, jedoch nicht zu vollständig inaktiven Proteinen führen.

3.6.2 Lokalisationsstudien in MDCK-Zellen

Der dynamische Acylierungszyklus (vergleiche Kapitel 1.3) bestimmt die Lokalisation palmitoylierter Proteine. Für das native N-Ras wird eine Anreicherung am Golgi, wo die Palmitoylierung stattfindet, und an der Plasmamembran, wohin das acylierte Protein über den sekretorischen Weg transportiert wird, beobachtet. Um den Einfluss der C-terminalen Modifikationen auf die Lokalisation in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die Cy-3 markierten Sonden von Dr. N. Vartak im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung für systemische Zellbiologie von Prof. Dr. P. I. H. Bastiaens am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in MDCK-Zellen mikroinjiziert. Die Lokalisation im Gleichgewichtszustand der semisynthetischen Proteine wurde mittels Konfokalmikroskopie bestimmt und sowohl mit transfiziertem mCitrin-N-Ras als auch mit einem Golgimarker verglichen. In vorangegangenen Arbeiten haben sich MDCK-Zellen (**Madin Darby canine kidney**) als Untersuchungsplattform für diese Experimente bewährt, da diese Zellen aufgrund ihrer Morphologie die Beobachtung des Golgi-Apparates und der Plasmamembran in einer Ebene erlauben.^{60,62,63} Um die Lokalisation der Sonden mit dem nativen N-Ras vergleichen zu können, wurden die MDCK-Zellen 12-

18 Stunden vor der Mikroinjektion transient mit einem fluoreszierenden Fusionsprotein N-Ras-Plasmid (mCitrin-N-Ras) und einem Golgi-Marker (GalT-Cerulean) transfiziert. Die untersuchten Peptoidsonden (**7**, **9**, **11** und **13**) besitzen jeweils ein Thiol, das palmitoyliert werden kann. Bei erfolgreichem Durchlaufen des Acylierungszyklus sollten die Sonden am Golgi lokalisieren, wo die Palmitoylierung stattfindet. Anschließend erfolgt der vesikuläre Transport über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran, wo man ebenfalls eine Anreicherung der injizierten Sonde erwarten würde, wie bei nativem N- bzw. H-Ras. Die Mikroinjektion der fluoreszenzmarkierten Sonden erfolgte in Analogie zu vorangegangenen Experimenten.^{60,62,63,172}

Im Gegensatz zu der *in vitro*-Untersuchung, bei der die entsprechenden palmitoylierten Varianten der peptoidischen Proteine als Substrate sowohl von APT 1 als auch von APT 2 identifiziert wurden, wurde nur bei Injektion der Sonde **11**, in der das zwischen den Lipidierungsstellen liegende Methionin und Leucin durch die entsprechenden Peptoidbausteine ersetzt wurde, eine Gleichgewichtsverteilung beobachtet, die der des nativen N-Ras Proteins ähnelt. Wie in Abbildung 57 C zu erkennen ist, zeigt die injizierte Probe die gleiche Verteilung, wie das transfizierte mCitrin-N-Ras und weist am Golgi eine deutliche Übereinstimmung mit dem Golgimarker GalT-Cerulean auf. Daher kann man davon ausgehen, dass dieses semisynthetische Protein von der De-/Repalmitoylierungsmaschinerie erkannt und prozessiert wird. Die drei peptoidischen Sonden **7**, **9** und **13**, bei denen Veränderungen an den lipidierten Cysteinen eingeführt wurden, zeigten im Gegensatz dazu nicht die typische N-Ras-Verteilung. Die injizierten Proben verteilten sich über alle Endomembranen, jedoch wurde eine signifikante Anreicherung am Golgiapparat beobachtet, die speziell im Vergleich mit dem Golgimarker GalT-Cerulean und in der Überlagerung der Bilder des transfizierten N-Ras und der injizierten Sonden deutlich wird (Abbildung 57 A, B und D). Unter Berücksichtigung der *in vitro*-Resultate lassen sich die Ergebnisse der Mikroinjektion durch effiziente Depalmitoylierung in Zusammenspiel mit unzureichender Palmitoylierung erklären. Bei ineffizienter Palmitoylierung würde der Palmitoylierungsschritt länger dauern, was somit zu einer ungerichteten, entropiegetriebenen Verteilung der einfach lipidierten Proteine über die zellulären Membranen führen würde. Der Depalmitoylierungsschritt im Anschluss an den vesikulären Transport an die Plasmamembran führt dann erneut zu unspezifischer Verteilung. Daher kann die beobachtete Lokalisation der Proteine aufgrund der signifikanten Anreicherung am Golgi-Apparat dahingehend interpretiert werden, dass die Palmitoylierung der C-terminal veränderten Sonden nicht mit der gleichen Effizienz wie bei nativem N- bzw. H-Ras abläuft. Der Depalmitoylierungsschritt hingegen scheint durch die eingeführten Modifikationen unbeeinträchtigt. Die in die De- und Repalmitoylierung involvierten Enzyme scheinen somit Veränderungen zwischen den Lipidierungsstellen zu tolerieren, wohingegen Modifikationen an der Farnesylierungs- bzw. Palmitoylierungsstelle zu Störungen des Acylierungszyklus führen.

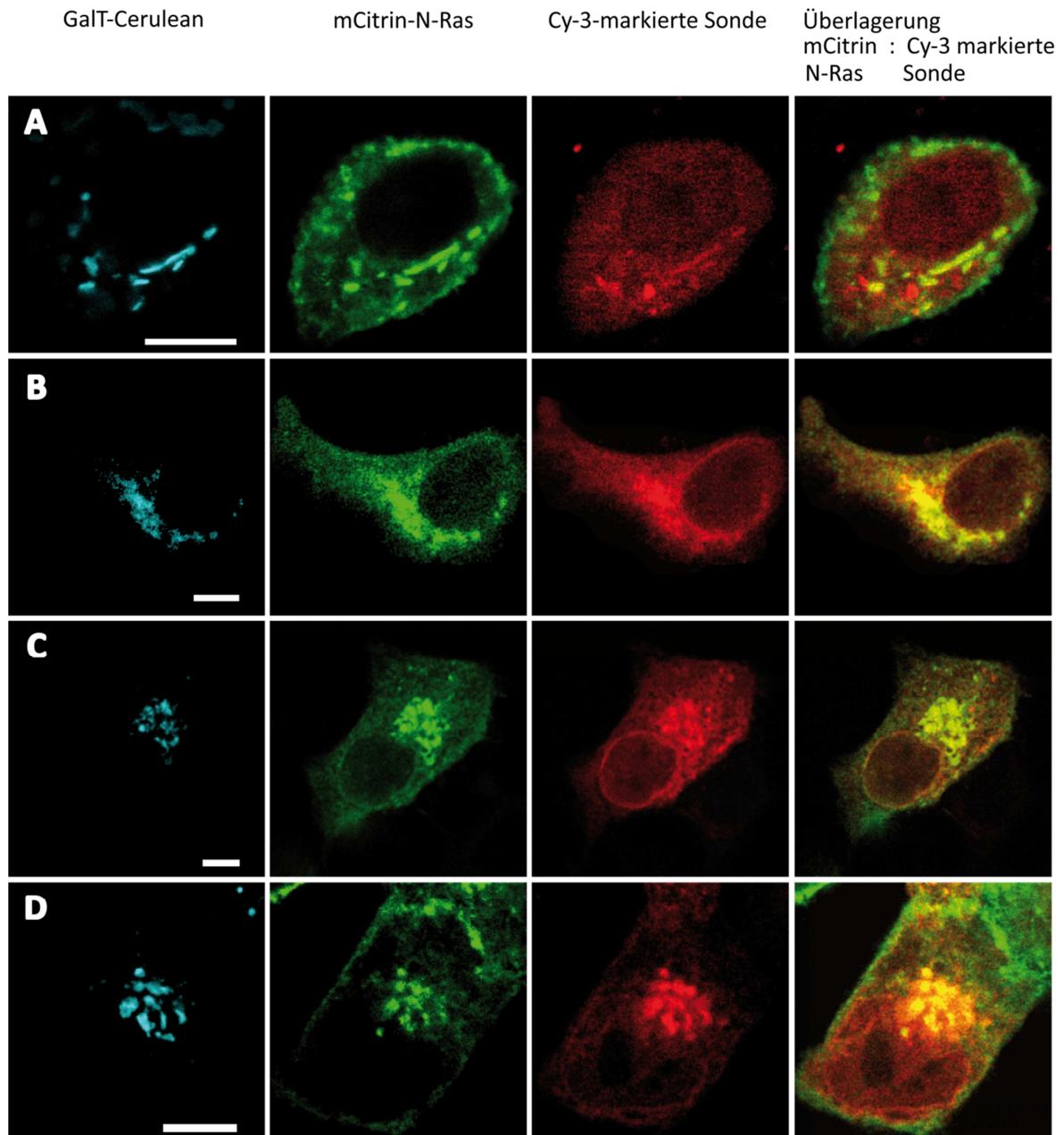


Abbildung 57: Lokalisation der mikroinjizierten Cy-3 markierten Sonden **7** (A), **9** (B), **11** (C), **13** (D), 1 h nach der Injektion in MDCK-Zellen, die am Tag zuvor mit mCitrin-N-Ras und GaIT-Cerulean transfiziert worden waren. Nur Sonde **11**, bei der NMet und NLeu anstelle der Aminosäuren eingebaut wurden, zeigt eine mit dem nativen N-Ras vergleichbare Lokalisation (C). Die Sonden, **7** (Austausch des farnesylierten Cysteins, A) bzw. **9** (Austausch des palmitoylierbaren Cysteins, B) und Sonde **13** (Austausch aller C-terminalen Aminosäuren durch Peptideinheiten, C), bei denen die Lipidierungsstellen verändert wurden, zeigen keine N-Ras-typische Gleichgewichtsverteilung. Sie sind über die Endomembranen verteilt, jedoch wird auch eine Anreicherung am Golgi-Apparat beobachtet. Maßstabballen: 10 µm.

Diese Hypothese wird durch die Mikroinjektion der weiteren N-Ras-Sonden mit nicht-natürlichem C-Terminus unterstützt. Die Sonde **63**, deren palmitoylierbares Cystein durch das sterisch anspruchsvolle Penicillamin ersetzt wurde, zeigt ebenfalls eine unspezifische Verteilung über die Endomembranen. Entsprechend wird am Golgi-Apparat auch eine Co-Lokalisation mit dem Golgimarker und dem transfizierten mCitrin-N-Ras beobachtet. Im Gegensatz zu dem transfizierten N-Ras findet sich die injizierte Probe jedoch nicht an der Plasmamembran. Daraus lässt sich

schließen, dass diese Sonde nicht von den Enzymen der Acylierungsmaschinerie erkannt wird und daher nicht den Acylierungszyklus durchlaufen kann (Abbildung 58 A). Im Gegensatz dazu zeigt die triethylglykolhaltige Sonde **89** eine Gleichgewichtsverteilung, die der des nativen N-Ras entspricht. Die Überlagerung des transfizierten mCitrin-N-Ras und der injizierten Probe deutet auf nahezu identische Lokalisation hin. Entsprechend wird auch mit dem Golgimarker Co-Lokalisation beobachtet (Abbildung 58 B). Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass die Maschinerie Veränderungen an den Aminosäuren toleriert, die zwischen den C-terminalen Lipidierungsstellen liegen. Überraschenderweise zeigte die palmitoylierte Sonde **90**, deren C-terminale Aminosäuren zwischen den lipidierten Cysteinen durch eine starre Biphenyleinheit ersetzt wurden, nicht die erwartete Lokalisation am Golgi und der Plasmamembran. Dieses semisynthetische Protein wies eindeutig eine unspezifische Verteilung über alle Endomembranen auf, wobei die Sonde an der Plasmamembran gar nicht zu finden war. Diese Lokalisierung lässt sich mit der des nicht-hydrolysierbaren, hexadecylierten N-Ras-Derivats vergleichen, das sich aufgrund der beiden Lipidanker ebenfalls unspezifisch über alle Endomembranen verteilt.^{60,63} Besonders in der Überlagerung wird deutlich wie unspezifisch das semisynthetische Konstrukt in der Zelle verteilt ist (Abbildung 58 C). Diese Beobachtung lässt sich mit der fehlenden Flexibilität des C-Terminus erklären. Derivat **89** weist im Gegensatz zu der starren Biphenyleinheit eine hochflexible Triethylglykolkette auf, durch die sowohl das farnesylierte Cystein als auch das palmitoylierte Cystein in eine Membran eingelagert werden können. Diese konformative Freiheit ist durch die starre Biphenyleinheit in **90** nicht gegeben, sodass die Zugänglichkeit des palmitoylierten Cysteins eingeschränkt sein könnte und somit die De- bzw. Repalmitoylierung nicht mehr stattfinden kann, auch wenn dieses Protein *in vitro* als Substrat von APT 1 und APT 2 bestätigt wurde.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die in den C-Terminus eingebrachten peptoidischen Modifikationen zu verminderter Prozessierung im Acylierungszyklus führen, wenn sie an den Lipidierungsstellen eingebaut werden. Der Palmitoylierungsschritt scheint nur noch unzureichend abzulaufen, wohingegen der Depalmitoylierungsschritt unbeeinträchtigt ist. Die Aminosäuren zwischen den lipidierten Cysteinen scheinen mehr Veränderungen zuzulassen, da sowohl Sonde **11** als auch **89** eine dem nativen N-Ras vergleichbare Lokalisation zeigten. Der starre Biphenyllinker in Protein **90** könnte aufgrund der fehlenden Flexibilität die Zugänglichkeit des zu (de-)palmitoylierenden Cysteins beeinträchtigen, was sich in der unspezifischen Verteilung über alle Endomembranen widerspiegelt. Man kann daraus schließen, dass der C-Terminus über ausreichende Flexibilität verfügen sollte, damit die Palmitoylierung effizient ablaufen kann. Das Penicillaminderivat **63** wurde nicht prozessiert, was sich durch die sterisch anspruchsvolle Umgebung um das zu (de-)palmitoylierenden Thiol erklären lässt.

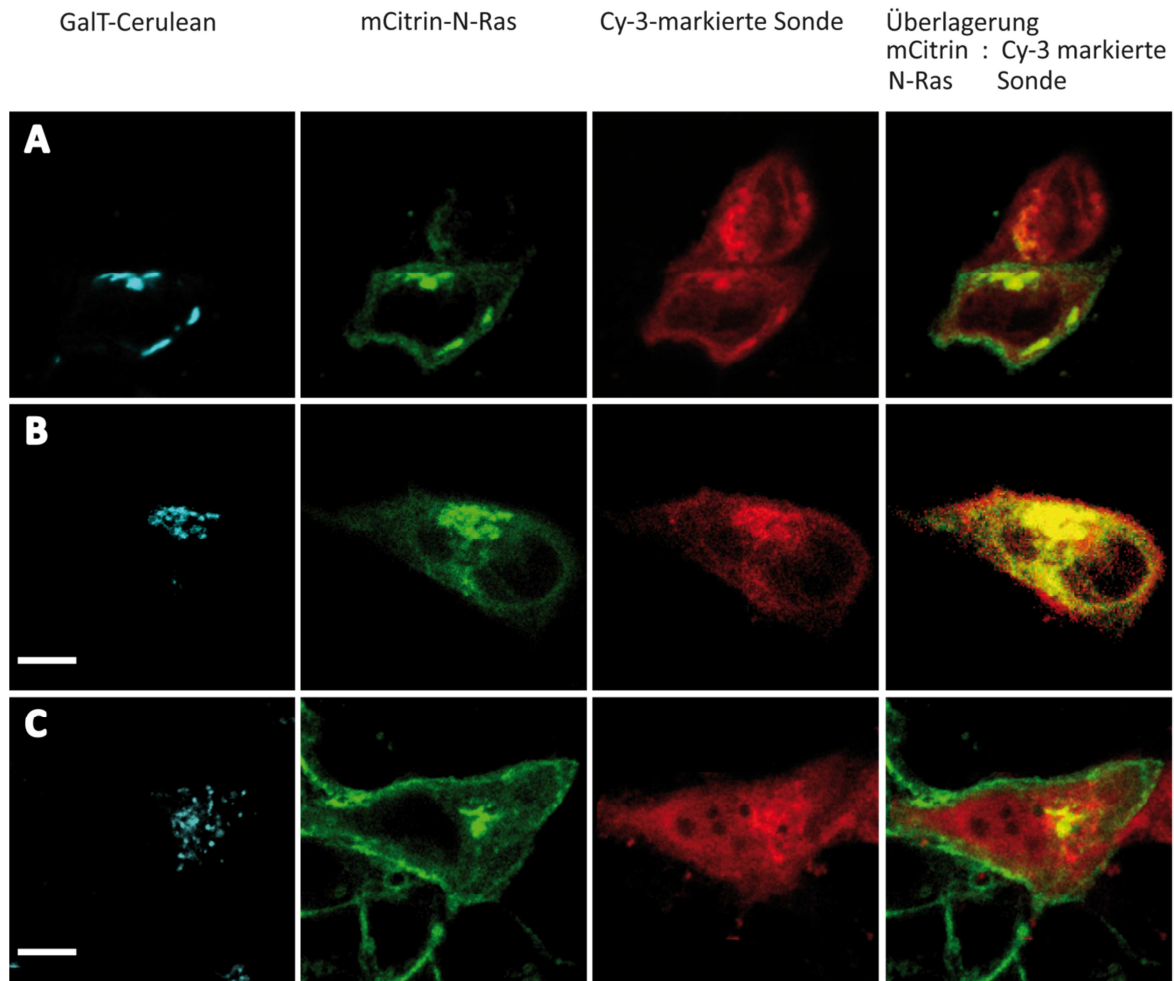


Abbildung 58: Lokalisation der mikroinjizierten Cy-3 markierten Sonden **63** (A), **89** (B) und **90** (C), 1 h nach der Injektion in MDCK-Zellen, die am Tag zuvor mit mCitrin-N-Ras und GaT-Cerulean transfiziert worden waren. Sonde **89**, deren lipidierte Cysteine über eine flexible Triethylenglykolkette verbunden sind, zeigt eine nahezu identische Lokalisation wie das transfizierte mCitrin-N-Ras (B). Die Sonde **63**, deren palmitoylierbares Cystein durch das sterisch anspruchsvolle Penicillamin ersetzt wurde, verteilt sich unspezifisch über die Endomembranen und zeigt keine Lokalisation an der Plasmamembran (A). Noch stärker ist dies bei der palmitoylierten Sonde **90**, deren C-terminale Aminosäuren zwischen den Lipidierungsstellen durch eine starre Biphenyleinheit ersetzt wurden, ausgeprägt (C). Maßstabballen: 10 μm .

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Substratspezifität des Acylierungszyklus peripherer Membranproteine. In vorangegangenen Arbeiten erwies sich die Maschinerie, die die Palmitoylierung und Depalmitoylierung der Ras-Proteine steuert als sehr substrattolerant, sodass im Rahmen dieser Arbeit die eventuellen Grenzen dieser Maschinerie ausgelotet werden sollten. Hierfür wurden einfach und doppelt lipidierte N-Ras-Proteinsonden in einer Kombination aus Molekularbiologie und organischer Chemie synthetisiert, in deren C-Termini verschiedene nicht-natürliche Elemente eingebaut wurden. Die entsprechenden lipidierten Peptidsequenzen wurden an fester Phase aufgebaut, wobei anfänglich eine manuelle Synthese am Hydrazinharz durchgeführt wurde, die in mehreren Schritten automatisiert wurde. Da die Synthese am Hydrazinharz aufgrund einer Nebenreaktion im Zuge der Abspaltungsreaktion teilweise relativ niedrige Ausbeuten liefert, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Triola eine neue Methode für die Synthese lipidierter N-Ras-Peptide entwickelt. Diese nutzt das 2-Chlortritylchloridharz, an dem die erste, in der Regel farnesylierte Aminosäure immobilisiert wird. Nach dem automatisierten Aufbau der Sequenz wird das Lipopeptid als Carbonsäure freigesetzt und im Anschluss an die Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS bzw. Säulenchromatographie mit Trimethylsilyldiazomethan in den C-terminalen Methyl-ester überführt.

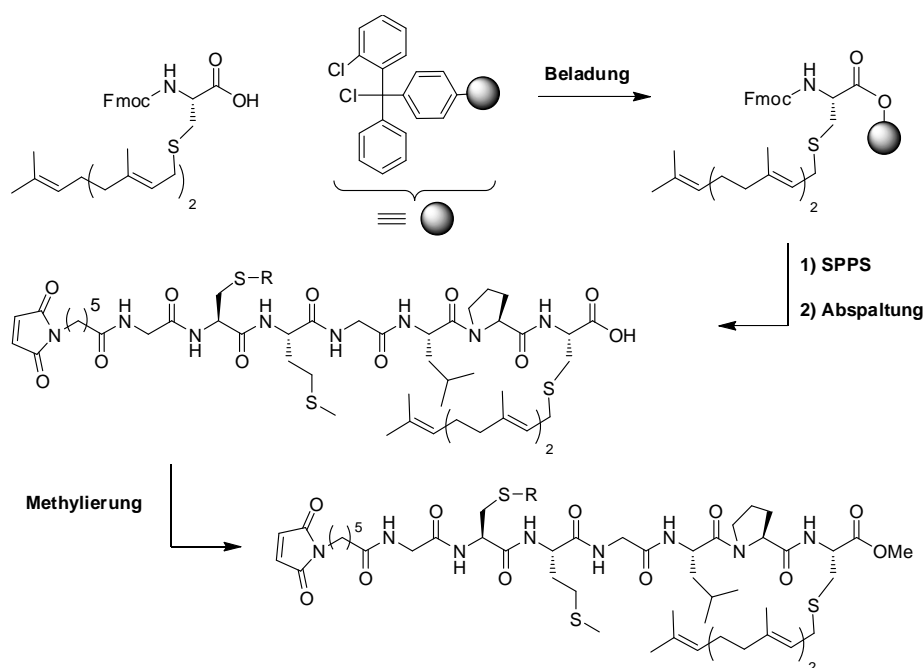


Abbildung 59: Strategie der neu entwickelten Synthese für das lipidierte Heptapeptid von N-Ras am 2-Chlortritylchloridharz mit anschließender Methylierung in Lösung

Für die Synthese der lipidierten Peptidsequenzen wurde die Strategie der prälipidierten Bausteine genutzt, daher wurden effiziente Synthesewege für die nicht-natürlichen Elemente im präparativen Maßstab entwickelt. Im Rahmen der Synthese der benötigten Fmoc-geschützten Bausteine war die Entwicklung einer neuen Methode für die Bildung unsymmetrischer Disulfide notwendig, da die bekannten Strategien bei der Disulfidbildung zwischen zwei tertiären Thiolen versagten. Abhilfe konnte der Einsatz von Dimethylsulfoxid als Oxidationsmittel schaffen und durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung wurde vollständiger Umsatz binnen 5 min erreicht. Abbildung 60 zeigt die synthetisierten Proteinsonden. Es wurde eine vollständige Serie peptoid-haltiger Proteine in farnesylierter und sowohl farnesyliert als auch palmitoylierter Form hergestellt. Die einfach farnesylierten Peptid-/Peptoidsequenzen (**39**, **45**, **41** und **43**) wurden sowohl an Cy3-fluoreszenz-markiertes, verkürztes N-Ras-Wildtypprotein als auch an die verkürzte G12V-Mutante ligiert. Die doppelt lipidierten, peptoidischen Sequenzen (**52**, **54**, **56** und **47**) sowie die weiteren nicht-natürlichen Modifikationen (**88**, **95** und **104**) wurden ausschließlich an das fluoreszenz-markierte, verkürzte N-Ras-Protein ligiert.

In einem *in vitro*-Assay wurde unter Verwendung eines semisynthetischen, farnesylierten und palmitoylierten N-Ras-Proteins die Depalmitoylierungsaktivität von APT 1, APT 2 und LYPLAL 1 untersucht. Die Acylproteinthioesterasen APT 1 und APT 2 akzeptieren N-Ras als Substrat im Gegensatz zu LYPLAL 1, das die Depalmitoylierung von N-Ras, zumindest *in vitro*, nicht katalysiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die palmitoylierten Modifikationen (**8**, **10**, **12**, **14** und **90**) ebenfalls hinsichtlich ihrer Eignung als Substrat für APT 1 und APT 2 getestet und die kinetischen Parameter bestimmt. Sowohl APT 1 als auch APT 2 wiesen dabei hohe Substrattoleranz auf. Die peptoidhaltigen Proteine (**8**, **10**, **12**, **14**) und das Biphenylderivat **90** wurden depalmitoyliert. Alle betrachteten Reaktionen wiesen unter Verwendung von APT 2 eine etwa doppelt so hohe Reaktionsgeschwindigkeit wie mit APT 1 auf.

Die einfach lipidierten peptoidischen Proteinsonden (**59**, **60**, **61** und **62**), die an die G12V-Mutante ligiert worden waren, wurden in einem Differenzierungsassay in PC12-Zellen untersucht. Es wurde für alle Modifikationen eine verminderte biologische Aktivität festgestellt, wobei diese am stärksten bei dem Protein **62**, in dem alle Aminosäuren ausgetauscht wurden, auftrat und am wenigsten ausgeprägt bei der Modifikation **61**, in der das Methionin und Leucin zwischen den lipidierten Cysteinen ersetzt wurde. Die Proteine **59** und **60**, deren lipidierte Cysteine jeweils durch die entsprechenden Peptoideinheiten ersetzt worden waren, zeigten etwa ein Viertel weniger neuronalen Auswuchs.

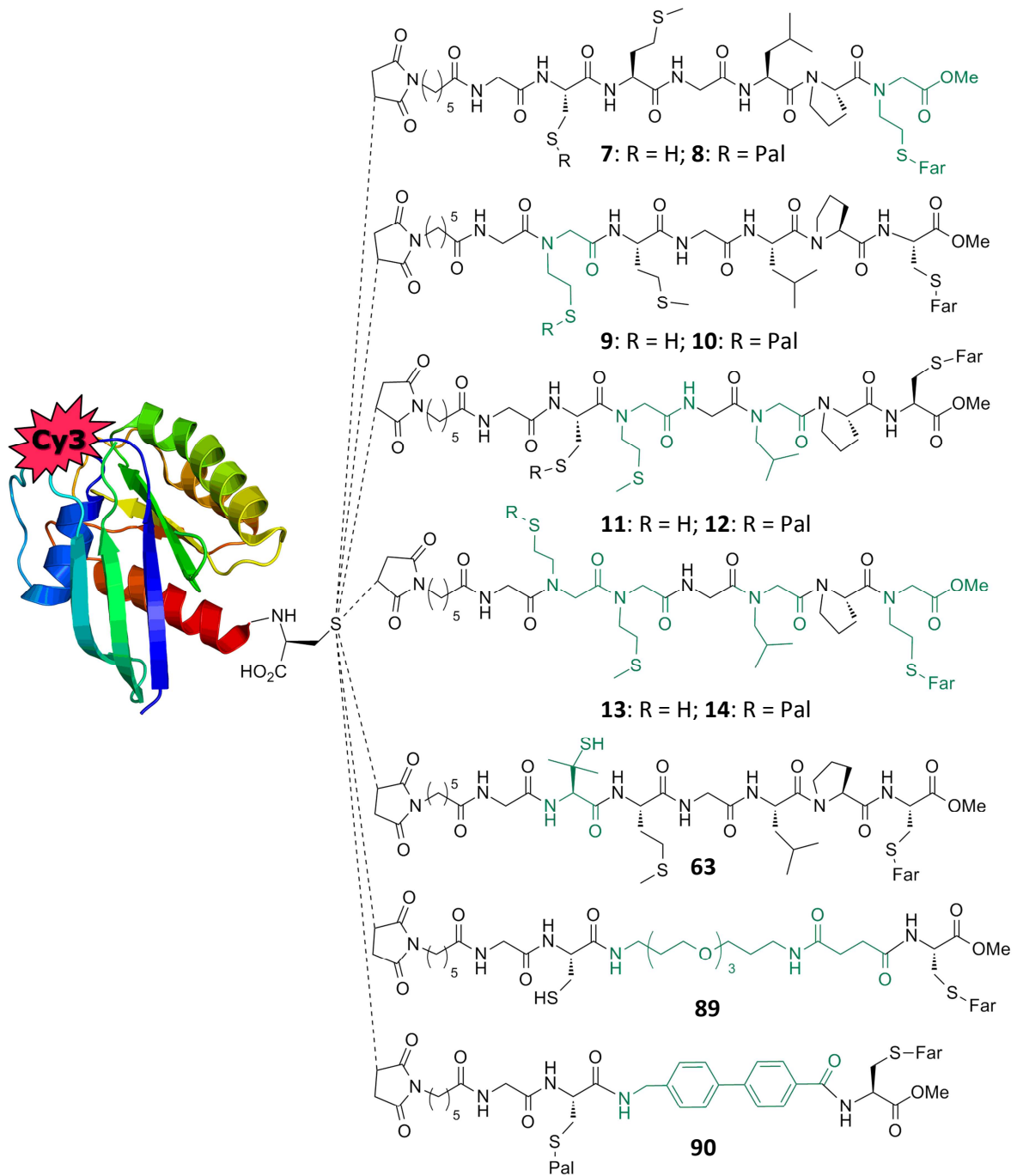


Abbildung 60: Übersicht über die Cy3-markierten, semisynthetischen N-Ras-Proteinsonden mit nicht-natürlichem C-Terminus.

In einer Kooperation mit der Abteilung für systemische Biologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie wurden die einfach lipidierten, peptoidischen Proteine (**7**, **9**, **11** und **13**) sowie die weiteren Derivate mit nicht-natürlichem C-Terminus (**63**, **89** und **90**) von Dr. N. Vartak in MDCK-Zellen mikroinjiziert und mittels Konfokalmikroskopie hinsichtlich ihrer Lokalisierung untersucht. Die peptoidischen Sonden (**7**, **9**, und **13**) zeigten nicht die N-Ras-typische Verteilung. Jedoch wurde bei allen Sonden eine signifikante Akkumulation am Golgi-Apparat beobachtet, sodass

sich daraus schließen lässt, dass diese Analoga nur unzureichend palmitoyliert werden können und dementsprechend sich nicht, wie für das native N-Ras üblich, an der Plasmamembran anreichern. Lediglich das Derivat **11** zeigte eine dem nativen N-Ras ähnliche Verteilung in den Zellen, was die Hypothese zulässt, dass Veränderungen zwischen den beiden lipidierten Cysteinen von der De-/Re-palmitoylierungsmaschinerie toleriert werden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Mikroinjektion von **89**, bei der eine dem transfizierten N-Ras nahezu identische Lokalisation für die injizierte Sonde beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde das Protein **90**, vermutlich aufgrund des starren Biphenyllinkers, nicht prozessiert, sondern verteilte sich unspezifisch über alle Endomembranen. Ähnliches zeigte sich auch für das Penicillamin-Derivat **63**, hier scheiterte die Prozessierung vermutlich an der sterisch höchstanspruchsvollen Umgebung des zu palmitoylierenden Thiols. Die Maschinerie, die den Acylierungszyklus reguliert, weist zusammenfassend eine relativ hohe Substrattoleranz auf, speziell der Bereich zwischen der Farnesylierungs- und Palmitoylierungsstelle scheint für die involvierten Enzyme nicht relevant zu sein. Die lipidierten Cysteine hingegen scheinen weniger Veränderungen zu tolerieren und es lässt sich vermuten, dass der C-Terminus über einen gewissen Grad an konformativer Freiheit verfügen muss, damit das zu palmitoylierende Cystein für die Acylierung zugänglich ist.

In dieser Arbeit konnten damit erstmals Restriktionen des Acylierungszyklus gefunden werden. Die den Depalmitoylierungsschritt katalysierenden Enzyme APT 1 und APT 2 wiesen *in vitro* sehr hohe Substrattoleranz auf, sodass sich vermuten lässt, dass die für die Palmitoylierung verantwortlichen Proteine ein engeres Substratspektrum aufweisen und somit für die Regulation der Acylierung zuständig sein könnten.

5 Experimenteller Teil

5.1 Messgeräte und Hilfsmittel

^1H und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury Plus 300 MHz (300 MHz (^1H) und 75 MHz (^{13}C)), einem Varian Mercury-VX 400 (400 MHz (^1H) und 101 MHz (^{13}C)), einem Bruker Avance DAX 500 (500 MHz (^1H) und 126 MHz (^{13}C)) oder einem Varian Unity Inova (600 MHz (^1H)) Spektrometer aufgenommen. Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen wurden auf die jeweiligen Restsignale des Lösungsmittels kalibriert: CDCl_3 ($\delta = 7.24$ ppm (^1H) bzw. 77.23 ppm (^{13}C)), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 2.50$ ppm (^1H) bzw. 39.51 ppm (^{13}C)) bzw. D_2O ($\delta = 4.80$ ppm (^1H)). Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), br (breites Singulett), d (Dublett), dd (dupliziertes Dublett), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multipllett). Die Zuordnungen erfolgten auf Grundlage der entsprechenden 2D-Spektren (gCOSY, TOCSY, NOESY, gHSQC).

Hochaufgelöste Massen wurden mittels ESI (Electro Spray Ionisation) an einem LTQ Orbitrap Spektrometer der Firma Thermo Scientific, das mit einem „Accela“ HPLC-System verbunden war, gemessen. Hierbei wurde Wasser + 0.1 % HCO_2H (Eluent A) und Acetonitril + 0.1 % HCO_2H (Eluent B), in einer 1:1 Mischung verwendet. Die Flussrate betrug 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ und es wurden jeweils 5 μL mittels „flow-injection“ injiziert. Parallel erfolgte eine UV-Detektion zwischen 200 und 600 nm.

Spezifische Drehwerte wurden an einem Schmidt & Hänsch Polartronic HHP Polarimeter, bezogen auf die Natrium-D-Linie (589 nm), bei Zimmertemperatur ermittelt. Die Konzentration c (in g/100 mL) sowie das verwendete Lösungsmittel sind bei der jeweiligen Substanz angegeben.

Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktapparatur der Firma Büchi bestimmt und sind unkorrigiert.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Voyager DETM Pro Biospectrometry Workstation der Firma ABSCIEX aufgenommen.

Infrarotspektren (FT-IR) wurden mit einem Bruker Tensor 27 Spektrometer (ATR, neat), das mit einem DTGS Detektor und einer Pike MIRacle ATR-Bauteil mit einem Diamantkristall ausgerüstet war, aufgenommen.

Analytische HPLC-MS-Daten wurden an einem Agilent Series 1100-System mit einer CC125/Nucleodur Gravity C4 Säule (4 mm ID, 5 μm) der Firma Machery-Nagel, das an ein LCQ Advantage MAX ESI-Massenspektrometer der Firma Thermo gekoppelt war, ermittelt. Parallel erfolgte eine UV-Detektion bei 210 nm und 254 nm, gefolgt von einer Corona-Detektion. Die

Flussrate betrug 1 mL/min. Unter Einsatz der Laufmittel A (Wasser + 0.1 % HCO₂H) und Laufmittel B (Acetonitril + 0.1 % HCO₂H bzw. Methanol + 5 % THF + 0.1 % HCO₂H) wurde, wenn nicht anders vermerkt, folgender Gradienten verwendet:

C4-Standard: 10 % B 0 min → 100 % B 10 min → 100 % B 12 min → 10 % B 12.1 min (Dauer 15 min)

Für die doppelt lipidierten Peptidsequenzen wurde folgender Gradient verwendet und als C4-doppelt lipidiert gekennzeichnet:

C4-doppelt lipidiert: 50 % B 0 min → 100 % B 7 min → 100 % B 12 min → 50 % B 12.1 min (Dauer 15 min).

Die Aufreinigung mittels **präparativer HPLC-MS** erfolgte an einem Agilent Series HPLC 1100 System mit LC/MSD VL (ESI-MS) Massendetektor sowie paralleler UV-Detektion bei 210 nm und 254 nm. Die Verbindungen wurden über eine VP125 Nucleodur Gravity C4 Säule (21 mm ID, 5 µm) getrennt, der eine VP50 Nucleodur Gravity C4 Vorsäule (21 mm ID, 5 µm) vorgeschaltet wurde. Die Flussrate betrug 20 mL/min und folgende Eluierungsmittel wurden eingesetzt: Laufmittel A: Wasser + 0.1 % CF₃CO₂H und Laufmittel B: Acetonitril + 0.1 % CF₃CO₂H bzw. Methanol + 5 % Tetrahydrofuran + 0.1 % CF₃CO₂H. Folgender Gradient wurde angewendet: 10 % B 0 min → 100 % B 15 min → 100 % B 22 min → 10 % B 22.1 min (Dauer 25 min). Für die ESI-MS Detektion wurde 1 ‰ des Lösungsmittelflusses mit Wasser/Acetonitril (1:1) + 0.1 % HCO₂H (Flussrate 0.5 mL/min) verdünnt.

Zum Einengen der Substanzen nach der präparativen HPLC-MS-Aufreinigung wurde ein alpha 2-4 **Gefriertrockner** der Firma Christ benutzt.

Chiral HPLC Analyse wurde an einem Agilent Serie HPLC 1100 System mit einem einer 250 Chiralpak IC Säule (4.6 mm ID) durchgeführt. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min und als Eluent wurde 10 % Ethanol in *iso*-Hexan isokratisch verwendet.

Für die **mikrowellen-unterstützte Peptidsynthese** wurde ein Liberty-12 Channel Automated Peptide Synthesizer der Firma CEM verwendet, dessen Discovereinheit die Single-Mode Technik benutzt, wobei die Temperatur mittels Fiber Optic reguliert wurde.

Die **mikrowellen-unterstützte Synthese** wurde an einer Single-Mode Discover Einheit der Firma CEM, die an ein Explorersystem, ebenfalls von der Firma CEM, gekoppelt war, durchgeführt. Die Reaktionen wurden unter magnetischer Rührung in geschlossenen 10 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt, wobei die Temperatur über einen IR-Temperaturfühler reguliert wurde.

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet. Die Detektion erfolgt über UV-Licht (254 nm) oder durch Anfärben mit folgenden Reagenzien:

Permanganat-Lösung: 1 g $KMnO_4$, 6.6 g K_2CO_3 , 1.7 mL 5 % NaOH (aq.) in 100 mL H_2O

Molybdato-phosphorsäure-Lösung: 5 g $H_3Mo_{12}O_{40}P$ in 100 mL Ethanol

Ninhydrin-Lösung: 0.3 g Ninhydrin, 3 mL AcOH in 100 mL EtOH

Für die **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel (Partikelgröße 35-70 μm) der Firma Acros verwendet.

Die **polymeren Träger** der Peptidsynthese stammten von der Firma CBL Patras (2-Chlortritylchloridpolystyrolharz (Copolymer, 1.45 mmol/g, 1 % DVB, 100-200 mesh)) sowie von der Firma Novabiochem (4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel). Die Reaktionen, bei denen getrocknete Lösungsmittel eingesetzt wurden, wurden unter Argon als Schutzgas durchgeführt. Falls notwendig wurden die kommerziell erhältlichen Lösungsmittel unter Verwendung der Standardmethoden getrocknet.¹⁷³ Weiter Chemikalien wurden von Acros, Aldrich, Alfa Aesar, BaChem, Fluka, Merck oder Novabiochem bezogen.

5.2 Materialien und Geräte für die biologischen Experimente

Laborgeräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller, Produktname</i>
CO ₂ -Inkubator	Integra Biosciences, NUAIRE Autoflow
Eismaschine	Scotsman, AF80
pH-Meter	Schott, CG840
Pipetten	Gilson und Eppendorf, verschiedene Versionen
Reinstwassersystem	Millipore, Milli-Q Advantage A-10
Sterilbank	NuncNalge, HERA Safe HS12
Vortex	Carl Roth, Vortex Genie 2
Wasserbad	Memmert, WB7
Zentrifugen	Eppendorf, Minispin; Centrifuge 5415R und 5810R

Verbrauchsmaterial

Serologische Pipetten	Becton Dickinson
Gewebekulturflaschen	Becton Dickinson
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Reaktionsgefäße (0.5; 1.5 und 2 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	Sarstedt
Microcons (0.5 mL, MWCO 10 kDa)	Millipore

Microcons (10 mL, MWCO 10 kDa)	Millipore
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva
DMEM	PAA
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich
Kälberserum (FCS)	GIBCO-Invitrogen
nicht-essentielle Aminosäuren, 100x	GIBCO-Invitrogen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Sodium Pyruvat, 100x	GIBCO-Invitrogen
Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO-Invitrogen

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes mit Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**)

2-Chlortritylchloridharz (800 mg, 0.56 mmol, Beladung: 0.7 mmol/g) wird in einem begasbaren Festphasenreaktor über Nacht im Hochvakuum getrocknet. In einem separaten Kolben wird Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**) (1 g, 1.85 mmol, 3.3 Äq.) ebenfalls über Nacht im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Harz wird mit destilliertem Dichlormethan (7 mL) versetzt und bei Zimmertemperatur 30 min unter Argonatmosphäre geschüttelt. Das getrocknete Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**) wird in destilliertem Dichlormethan (5 mL) gelöst und es wird trockenes DIPEA (0.63 mL, 3.7 mmol, 6.6 Äq.) hinzugefügt. Nach 5 min wird das gequollene Harz mit der Fmoc-Cys(Far)-OH Lösung versetzt und 3 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wäscht man dreimal 3 min mit destilliertem Dichlormethan (5 mL), dreimal 5 min mit einer Lösung aus Dichlormethan/Methanol/DIPEA (17:2:1) und dreimal 3 min mit Dichlormethan (5 mL). Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird die Beladung des Harzes mittels UV-Spektroskopie nach AAV 3 bestimmt.

AAV 2: Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes mit Fmoc-NhCys(Far)-OH (**16**)

2-Chlortritylchloridharz (800 mg, 0.56 mmol, Beladung: 0.7 mmol/g) wird in einem begasbaren Festphasenreaktor über Nacht im Hochvakuum getrocknet. In einem separaten Kolben wird Fmoc-NhCys(Far)-OH **16** (1.04 g 1.85 mmol, 3.3 Äq.) eingewogen und ebenfalls über Nacht im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Harz wird mit destilliertem Dichlormethan (7 mL) versetzt und bei Zimmertemperatur 30 min unter Argonatmosphäre geschüttelt. Das getrocknete Fmoc-NhCys(Far)-OH (**16**) wird in destilliertem Dichlormethan (5 mL) gelöst und es wird trockenes DIPEA (0.63 mL, 3.7 mmol, 6.6 Äq.) hinzugefügt. Nach 5 min wird das gequollene Harz mit der Fmoc-NhCys(Far)-OH Lösung versetzt und 3 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wäscht man dreimal 3 min

mit destilliertem Dichlormethan (5 mL), dreimal 5 min mit einer Lösung aus Dichlormethan/Methanol/DIPEA (17:2:1) (6 mL) und dreimal 3 min mit Dichlormethan (5 mL). Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird die Beladung des Harzes mittels UV-Spektroskopie nach AAV 3 bestimmt.

AAV 3: Bestimmung der Harzbeladung mit Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine geringe Menge (1-2 mg) des zu bestimmenden Harzes wird mit einer Piperidin/DMF (1:4)-Lösung (10 mL) versetzt und 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach 10 min wird die UV-Absorption der Lösung bei 301 nm bestimmt, wobei als Nullprobe eine Piperidin/DMF (1:4)-Lösung verwendet wird. Der Beladungsgrad des Harzes lässt sich mithilfe des Lambert-Berrschen Gesetzes berechnen ($\epsilon = 7800 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

AAV 4: Aufbau von Lipopeptiden an der Festphase mithilfe des CEM Liberty - 12-Channel Automated Microwave Peptide Synthesizers

Der Aufbau der Peptide wird am CEM *Liberty - 12-Channel Automated Microwave Peptide Synthesizer* durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, werden folgende Lösungsmittel und Konzentrationen verwendet:

- Fmoc-Aminosäuren: 0.2 M in DMF (5 Äq.)
- Lipidierte Fmoc-Cysteine: 0.2 M in CH_2Cl_2 (5 Äq.)
- HCTU: 0.5 M in DMF (5 Äq.)
- DIPEA: 2 M in NMP (10 Äq.)
- Collidin: 0.2 M in DMF (5 Äq.)

Je nach Kupplungsart werden folgende Mikrowelleneinstellungen gewählt:

Tabelle 8: Bedingungen für die Festphasensynthese im Liberty Peptide synthesizer.

Peptidkupplung	Leistung [W]	T [°C]	Zeit [sec]	Kupplungsreagenzien
Einfachkupplung	20	75	300	HCTU/DIPEA
Einfachkupplung (lipidierte Fmoc-Cysteine)	20	75	300	HCTU/2,4,6-Collidin
Einfachkupplung (Fmoc-CysStBu-OH)	0 25	RT 50	120 240	HCTU/DIPEA
Fmoc-Entschützung	(Piperidin/DMF, 1:4)			
1. Entschützung	40	75	30	-
2. Entschützung	40	75	180	-

AAV 5: Aufbau von Lipopeptiden an der Festphase mithilfe des *Applied Biosystems 433A Peptide Synthesizer* unter Verwendung des FastMoc Protocol der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. M. J. Liskamp am Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht, Niederlande

Fmoc-Entschützung	Piperidin/NMP (1:4)
Kupplung	5 Äq. Fmoc-Aminosäure
	5 Äq. HATU
	10 Äq. DIPEA in NMP

AAV 6: Testabspaltung eines Peptids vom 2-Chlortritylharz

Um analytische Mengen des am 2-Chlortritylharz immobilisierten Lipopeptids abzuspalten, werden 5-10 mg des beladenen Harzes mit einer Abspaltungslösung aus Trifluoressigsäure, Triethylsilan und Dichlormethan (1:4:95) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol bzw. Acetonitril gelöst, filtriert und mittels HPLC-MS analysiert.

AAV 7: Abspaltung eines Peptids vom 2-Chlortritylharz

Das am 2-Chlortritylharz immobilisierte Peptid wird in einem Spritzenreaktor (10 mL) dreimal 3 min mit Dichlormethan (7 mL) gewaschen. Anschließend wird eine Abspaltungslösung aus Trifluoressigsäure, Triethylsilan und Dichlormethan (1:4:95) in den Spritzenreaktor aufgezogen und das Harz 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Abspaltungslösung wird weitere zweimal 15 min auf das Harz gegeben. Im Anschluss wird das Harz dreimal 3 min mit Dichlormethan (7 mL) gewaschen. Die gesammelten Lösungen werden mit Toluol mehrmals co-evaporiert. Die Aufreinigung erfolgt entweder durch präparative HPLC-MS oder Säulenchromatographie.

AAV 8: Manuelle Beladung des 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGels™ mit Fmoc-Cys(Far)OH (2)

Die verwendeten Lösungen werden vor Benutzung 30 min unter Argonatmosphäre im Ultraschallbad entgast. Kommerziell erhältliches 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™ (600 mg, 0.34 mmol, Beladung: 0.56 mmol/g) wird in einem begasbaren Festphasenreaktor (50 mL) unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan (10 mL) 15 min gequollen. Anschließend wird das Dichlormethan entfernt und das Harz wird in trockenem DMF (10 mL) ebenfalls unter Argonatmosphäre 15 min gequollen. Durch Zugabe von trockenem Piperidin/DMF (1:1) (3 x 15 min) wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Nachdem das Harz mit trockenem DMF (10 mL) (5 x 5 min) und mit trockenem Dichlormethan (10 mL) (3 x 5 min) gewaschen wurde, wird eine Lösung von 3 Äq. Fmoc-Cys(Far)-OH (2), 3 Äq. HBTU, 3 Äq. HOBt und 3 Äq. Collidin in trockenem Dichlormethan/DMF (1:1) (7 mL) zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur

geschüttelt. Das Lösungsmittel wird durch Filtration entfernt und das Harz wird mit trockenem DMF (10 mL) (3 x 5 min) und trockenem Dichlormethan (10 mL) (3 x 5 min) gewaschen. Anschließend wird das Harz im Hochvakuum getrocknet und nach AAV 3 der Beladungsgrad bestimmt.

AAV 9: Manuelle Beladung des 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGels™ mit Fmoc-NhCys(Far)-OH (16)

Die verwendeten Lösungen werden vor Benutzung 30 min unter Argonatmosphäre im Ultraschallbad entgast. Kommerziell erhältliches 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl AM NovaGel™ (600 mg, 0.34 mmol, Beladung: 0.56 mmol/g) wird in einem begasbaren Festphasenreaktor (50 mL) unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan (10 mL) 15 min gequollen. Anschließend wird das Dichlormethan entfernt und das Harz wird in trockenem DMF (10 mL) ebenfalls unter Argonatmosphäre 15 min gequollen. Durch Zugabe von trockenem Piperidin/DMF (1:1) (3 x 15 min) wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Nachdem das Harz mit trockenem DMF (10 mL) (5 x 5 min) und mit trockenem Dichlormethan (10 mL) (3 x 5 min) gewaschen wurde, wird eine Lösung von 3 Äq. Fmoc-NhCys(Far)-OH (**16**), 3 Äq. HATU und 6 Äq. DIPEA in trockenem Dichlormethan/DMF (1:1) (7 mL) zum Harz gegeben und die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wird durch Filtration entfernt und das Harz wird mit trockenem DMF (10 mL) (3 x 5 min) und trockenem Dichlormethan (10 mL) (3 x 5 min) gewaschen. Anschließend wird das Harz im Hochvakuum getrocknet und nach AAV 3 der Beladungsgrad bestimmt.

AAV 10: Abspaltung des Peptids vom Hydrazinharz

Das am Hydrazinharz immobilisierte Peptid wird in einem Festphasenreaktor mit einer Abspalllösung aus 0.5 Äq. Cu(OAc)₂, 30 Äq. Pyridin, 50 Äq. Essigsäure und 215 Äq. Methanol in Dichlormethan (7 mL) versetzt und unter Sauerstoffatmosphäre 2.5 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz dreimal je 3 min mit Dichlormethan (10 mL) und zweimal je 3 min mit Dichlormethan/Methanol (1:1) (10 mL) gewaschen. Die erhaltene Lösung wird mehrmals mit Toluol co-evaporiert. Anschließend wird mit gesättigter NaCl-Lösung und Dichlormethan extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Hochvakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt.

AAV 11: Manuelle Fmoc-Entschützung und Kupplung mit HATU nach 15 bzw. 18

Um die schnelle *S*, *N*-Verschiebung des Palmitoylrestes zu vermeiden, wird die Fmoc Schutzgruppe des Peptides durch zweimalige Zugabe (jeweils 30 sec.) einer DBU/DMF (2:98)-Lösung (5 mL) zum Harz entfernt. Anschließend wird fünfmal je 5 sec mit DMF gewaschen und es erfolgt die Zugabe einer Lösung, die die zu kuppelnde Säure (Fmoc-Gly-OH bzw. MIC-OH) (5 Äq.), HATU (5 Äq.) und DIPEA (20 Äq.) in DMF (5 mL) enthält, zu dem Harz. Nach 2 h wird das Harz dreimal 3 min mit DMF (5 mL) gewaschen.

AAV 12: Disulfidbildung

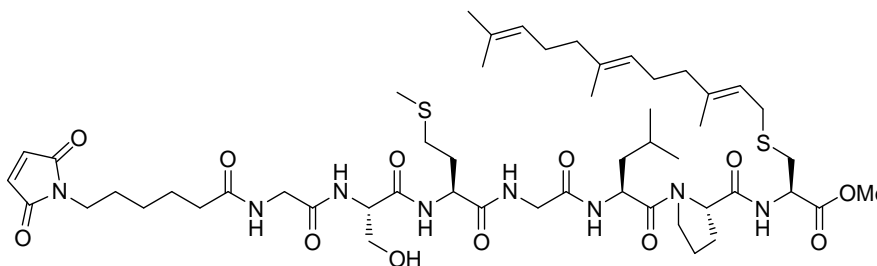
Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) bzw. Fmoc-Pen(Trt)-OH (**66**) wird durch Zugabe einer Lösung aus Trifluoressigsäure, Triethylsilan und Dichlormethan (5:3:92) und mehrstündigem Rühren des Reaktionsgemisches bei Raumtemperatur entschützt.⁷⁷ Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Trifluoressigsäure gelöst, filtriert und mit Toluol mehrfach co-evaporiert. Das entschützte Fmoc-Thiol (0.27 M) wird in einem 10 mM NH₄OAc-haltigen Acetonitril-Wasser-Gemisch (3:2) gelöst und es werden 5 - 10 Äq. des Thiols und 0.75 mL Dimethylsulfoxid hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird in einem Single-Mode Mikrowellengerät bestrahlt (P= 150 W, t= 2 min ramp, 5 min hold, T_{max}= 150 °C). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und konzentriert. Die Aufreinigung der Rohprodukte erfolgt über Säulenchromatographie bzw. präparativer HPLC-MS.

AAV 13: Bestimmung der Proteinkonzentration nach M. Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von M. Bradford unter Verwendung des Bradford-Reagenzes der Firma BIO-RAD durchgeführt, wobei die Absorption der jeweiligen Proteinlösungen bei 595 nm gemessen wurde.¹⁷⁴ Mittels einer Eichgerade gegen BSA wurde die Konzentration des sich in der Lösung befindenden Proteins errechnet.

5.4 Versuche zu Kapitel 3.1

Synthese von MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (**1**)



Die gesamte Peptidsynthese wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt und alle Lösungen für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren und alle Waschlösungen wurden vor ihrer Verwendung mind. 20 min im Ultraschallbad unter Argonatmosphäre entgast. 4-Fmoc-Hydrazinobenzoyl AM Novagel Harz (350 mg, 0.625 mmol, Beladung: 0.56 mmol/g) wurde nach AAV 8 mit Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**) unter Verwendung von HCTU als Aktivator beladen. Nach AAV 3 wurde eine Beladung des Harzes von 0.46 mmol/g (82 %) bestimmt. Nach je 5 minütigen, dreimaligen Waschen mit DMF (7 mL), zweimal (je 5 min) mit Dichlormethan (7 mL) und erneuten drei Mal (je 5 min) mit DMF (7 mL), erfolgte der Aufbau der Peptidsequenz in iterativen Zyklen aus Fmoc-Entschützung und Aminosäurekupplung. Für die Fmoc-Entschützung wurde jeweils dreimal ein

Gemisch aus Piperidin/DMF (1:4) (7 mL) 15 min zum Harz gegeben und anschließend fünfmal 5 min mit DMF (7 mL) gewaschen. Die Fmoc-Aminosäurekupplungen wurden in der Regel über einen Zeitraum von ca. 2.5 - 3 h durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Gemisch aus Fmoc-AS-OH (4 Äq.), HCTU (4 Äq.), HOBt (4 Äq.) und DIPEA (8 Äq.) in DMF (7 mL) zu dem Harz gegeben. Im Anschluss an die Kupplung wurde die Kupplungslösung entfernt und dreimal mit DMF (7 mL) für 5 min gewaschen, bevor der nächste Zyklus folgte. Nach Kupplung der Maleimidocaprinsäure wurde das aufgebaute Lipopeptid nach AAV 10 vom polymeren Träger abgespalten, und es wurden 171 mg Rohprodukt erhalten. In einem Gemisch aus $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/(\text{iPr})_3\text{SiH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:5:94) wurde bei Zimmertemperatur binnen 3 h die Tritylschutzgruppe der Serinseitenkette entfernt. Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurden 11.2 mg (0.01 mmol, 6.5 %) des gewünschten Peptids **1** erhalten.

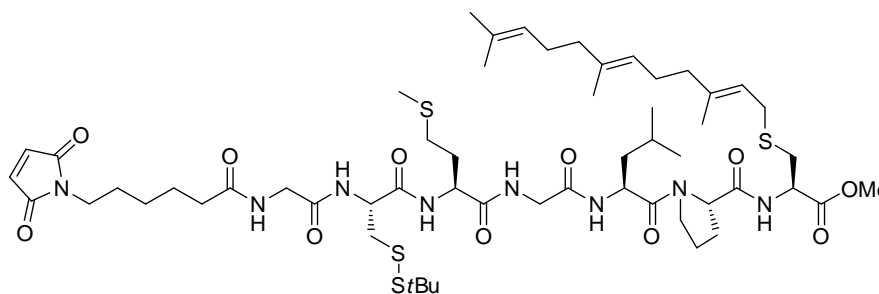
Ausbeute: 11.2 mg (0.01 mmol, 6.5 %);

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6) δ = 8.23 (d, J = 7.19 Hz, 1H, NH-Cys), 8.07 (d, J = 5.67 Hz, 1H, NH-Met), 8.09 (d, J = 7.51 Hz, 1H, NH-Gly), 8.01 (t, J = 5.69 Hz, 1H, NH-Gly), 7.96 (m, 2H, NH-Leu, NH-Ser), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.17 (m, 1H, CH-Far), 5.05 (m, 2H, CH-Far), 5.04 (t, J = 5.37 Hz, 1H, Ser-OH), 4.57 (dd, J = 12.85, 9.52 Hz, 1H, C_αH -Leu), 4.36 (m, 2H, C_αH -Cys, C_αH -Pro), 4.30 (m, 2H, C_αH -Ser, C_αH -Met), 3.72 (d, J = 5.52 Hz, 2H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ -Gly), 3.68 (d, J = 5.72 Hz, 2H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ -Gly), 3.61 (s, 3H, CO_2Me), 3.63 (m, 2H, C_βH_2 -Ser, C_βH_2 -Pro), 3.52 (m, 2H, C_βH_2 -Ser, C_βH_2 -Pro), 3.37 (t, J = 7.10 Hz, 2H, CH_2 -MIC), 3.15 (m, 2H, CH_2 -S Far), 2.79 (m, 1H, C_βH_2 -Cys), 2.69 (m, 1H, C_βH_2 -Cys), 2.39 (m, 2H, $\text{C}_\gamma\text{H}_2$ -Met), 2.10 (t, J = 7.42 Hz, 2H, CH_2 -MIC), 2.02 (s, 3H, CH_3 -Met), 1.93 (m, 12H, CH_2 -Far, C_βH_2 -Pro, C_βH_2 -Met), 1.62 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.61 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.56 (m, 9H, CH_2 -MIC, $\text{C}_\gamma\text{H}_2$ -Pro, C_γH -Leu, C_βH_2 -Leu), 1.54 (s, 6H, CH_3 -Far), 1.19 (td, J = 14.96, 7.67 Hz, 2H, CH_2 -MIC), 0.86 (m, 6H, CH_3 -Leu);

HPLC-MS: t_R = 7.85 min; m/z berechnet für $\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_2$: 1075.56 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 1075.29;

$[\alpha]_D^{20}$ = -33.0 (CHCl_3 , c = 0.95).

Synthese von MIC-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (**3**)



Das Peptid wurde an 4-Fmoc-Hydrazinobenzoyl AM Novagel Harz (Beladung: 0.56 mmol/g) hergestellt, wobei die C-terminale Aminosäure **2** nach AAV 8 immobilisiert wurde. Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach AAV 4 im 0.1 mmolaren Maßstab. Die Abspaltung erfolgte nach AAV 10 und nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde **3** in 16 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 18.8 mg (0.016 mmol, 16 %);

Alternativ wurde **3** unter den in AAV 4 angegebenen Bedingungen an 4-Fmoc-Hydrazinobenzoyl AM Novagel Harz (Beladung: 0.56 mmol/g) im 0.1 mmolaren Maßstab aufgebaut. Die Abspaltung erfolgte nach AAV 10 und nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde **3** in 16 % iger Ausbeute erhalten.

Des Weiteren wurde **3** durch Methylierung von **6** erhalten. Hierfür wurde **6** (10 mg, 8.58 μ mol), gelöst in einem Toluol/Methanol-Gemisch (9:1) (0.5 mL) langsam über 30 min bei Raumtemperatur mit 0.9 Äq. TMSCHN₂ (7.72 μ L, 2M in Hexan), gelöst in 0.5 mL Toluol/Methanol (9:1), versetzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt. Das Produkt wurde in 87 % iger Ausbeute (8 mg, 6.78 μ mol) erhalten.

Ausbeute: 8 mg (6.78 μ mol, 87 %);

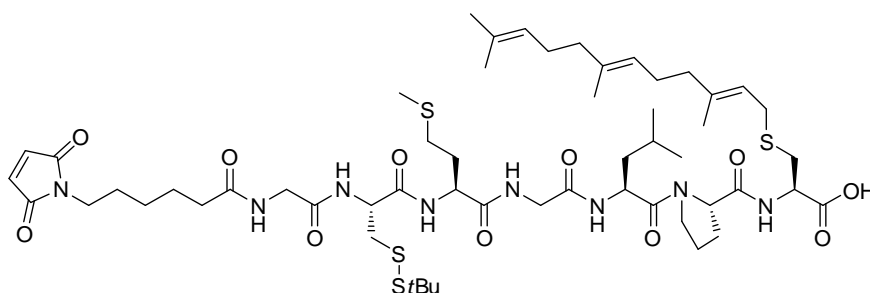
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.22 (d, *J* = 7.39 Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.20 (d, *J* = 7.18 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH-Met), 8.07 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH-Gly), 7.96 (m, 2H, NH-Gly, NH-Leu), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH-Far), 4.58 (m, 1H, C _{α} H-Leu), 4.49 (m, 1H, C _{α} H-Cys(StBu)), 4.37 (m, 2H, C _{α} H-Cys(Far), C _{α} H-Pro), 4.28 (dd, *J* = 13.0, 8.5 Hz, 1H, C _{α} H-Met), 3.67 (m, 5H, C _{α} H₂-Gly, C _{α} H₂-Gly, C _{δ} H₂-Pro), 3.62 (s, 3H, CO₂Me), 3.51 (m, 1H, C _{δ} H₂-Pro), 3.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.15 (m, 3H, CH₂-S Far, C _{β} H₂-Cys(StBu)), 2.95 (dd, *J* = 13.0, 8.8 Hz, 1H, C _{β} H₂-Cys(StBu)), 2.78 (dd, *J* = 13.8, 5.7 Hz, 1H, C _{β} H₂-Cys(Far)), 2.66 (m, 1H, C _{β} H₂-Cys(Far)), 2.43 (m, 2H, C _{γ} H₂-Met), 2.11 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂-MIC), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 1.93 (m, 14H, CH₂-Far, C _{β} H₂-Pro, C _{β} H₂-Met, C _{γ} H₂-Pro), 1.632 (s, 3H, CH₃-Far), 1.628 (s, 3H, CH₃-Far), 1.61 (m, 1H, C _{γ} H-Leu), 1.560 (s, 3H,

CH₃-Far), 1.556 (s, 3H, CH₃-Far), 1.44 (m, 6H, CH₂-MIC, C_βH₂-Leu), 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃-Cys(StBu)), 1.18 (m, 2H, CH₂-MIC), 0.87 (dt, *J* = 11.2, 5.6 Hz, 6H, CH₃-Leu);

HPLC-MS: *t_R* = 9.03 min; *m/z* berechnet für C₅₆H₉₀N₈O₁₁S₄: 1178.56 [M+H]⁺, gefunden 1178.94 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -48.7 (CHCl₃, *c* = 0.68).

Synthese von MIC-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OH (6)



Die Sequenz wurde an 2-Chlortritylchloridharz (Beladung: 0.7 mmol/g) synthetisiert. Unter den in AAV 1 beschriebenen Bedingungen wurde **2** immobilisiert und gemäß AAV 3 wurde eine Beladung von 0.7 mmol/g bestimmt. Der Aufbau der Sequenz erfolgte nach AAV 4 im 0.25 mmolaren Maßstab. Nach Abspaltung des Lipopeptids nach AAV 7 und Aufreinigung über präparative HPLC-MS wurde **3** in 24 %iger Ausbeute als freie Säure **6** erhalten.

Ausbeute: 70 mg (0.06 mmol, 24 %);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.79 (br, 1H, CO₂H), 8.22 (d, *J* = 7.84 Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.11 (d, *J* = 7.84 Hz, 1H, NH-Met), 8.07 (t, *J* = 5.61 Hz, 1H, NH-Gly), 8.01 (d, *J* = 7.82 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 7.96 (m, 2H, NH-Gly, NH-Leu), 6.99 (s, 2H, CH₂-MIC), 5.16 (t, *J* = 7.42 Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (q, *J* = 6.96 Hz, 2H, CH-Far), 4.58 (dt, *J* = 8.86, 5.12 Hz, 1H, C_αH-Leu), 4.51 (dt, *J* = 8.35, 4.98 Hz, 1H, C_αH-Cys(StBu)), 4.41 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.33 (dt, *J* = 7.70, 5.64 Hz, 1H, C_αH-Cys(Far)), 4.28 (dt, *J* = 8.40, 5.02 Hz, 1H, C_αH-Met), 3.71 (m, 4H, C_αH₂-Gly, C_αH₂-Gly), 3.66 (dd, *J* = 13.5, 6.2 Hz, 1H, C_δH₂-Pro), 3.51 (dd, *J* = 13.47, 6.57 Hz, 1H, C_δH₂-Pro), 3.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.19 (dd, *J* = 13.07, 8.14 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.16 (dd, *J* = 13.76, 7.95 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.12 (dd, *J* = 13.08, 4.93 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(StBu)), 2.95 (dd, *J* = 13.05, 8.81 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(StBu)), 2.80 (dd, *J* = 13.70, 5.29 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.68 (dd, *J* = 13.72, 7.73 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.42 (m, 2H, C_γH₂-Met), 2.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-MIC), 2.02 (s, 3H, Met-CH₃), 1.93 (m, 14H, CH₂-Far, C_βH₂-Pro, C_γH₂-Pro, C_βH₂-Met), 1.66 (m, 1H, C_γH-Leu), 1.630 (s, 3H, CH₃-Far), 1.625 (s, 3H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.44 (m, 6H, CH₂-MIC, C_βH₂-Leu), 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃-Cys(StBu)), 1.19 (m, 2H, CH₂-MIC), 0.88 (dd, *J* = 8.14, 6.81 Hz, 6H, CH₃-Leu);

HPLC-MS: $t_R = 10.62$ min; m/z berechnet für $C_{55}H_{89}N_8O_{11}S_4$: 1165.55281 $[M+H]^+$, gefunden 1165.06 $[M+H]^+$;

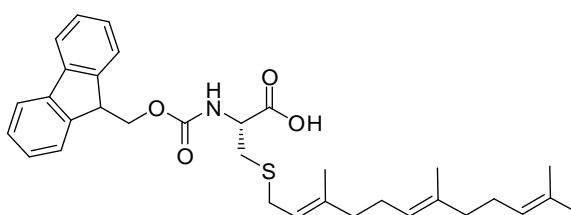
HR-MS: m/z berechnet für $C_{55}H_{89}N_8O_{11}S_4$: 1165.55281 $[M+H]^+$; gefunden: 1165.55465 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -39.4$ ($CHCl_3$, $c = 1.1$).

5.5 Versuche zu Kapitel 3.2.1

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-farnesyl-L-cystein (**2**)

Fmoc-Cys(Far)-OH



Zu einer Lösung von L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat (**21**) (3 g, 19.03 mmol) in Methanol (33 mL), die auf 0 °C abgekühlt wurde, wurde eine 7 N Ammoniak in Methanol-Lösung (45 mL) hinzugeetropt. Nach 5 min wurde *trans, trans*-Farnesylchlorid (4.5 mL, 17.12 mmol) hinzugegeben und das Gemisch wurde 3 h bei 0 °C und 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mehrfach mit *n*-Pentan gewaschen, um verbliebenes Farnesylchlorid zu entfernen. Der zurückgebliebene Feststoff **22** wurde in Dichlormethan (150 mL) suspendiert und abermals auf 0 °C abgekühlt. Triethylamin (2.64 mL, 18.93 mmol) und Fmoc-OSu (6.33 g, 18.76 mmol) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Dichlormethan/ Methanol, 98:2) und Verbindung **2** (8.8 g, 16.24 mmol, 85 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 8.8 g (16.24 mmol, 85 %);

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 7.72 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, $C_{Ar}H$ -Fmoc, NH), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 5.17 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH-Far), 5.05 (m, 2H, CH-Far), 4.28 (m, 3H, CH-Fmoc, CH_2 -Fmoc), 4.15 (m, 1H, $C_\alpha H$), 3.17 (m, 2H, CH_2 -S Far), 2.86 (dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz, 1H, $C_\beta H_2$), 2.67 (dd, $J = 13.6, 9.6$ Hz, 1H, $C_\beta H_2$), 1.93 (m, 8H, CH_2 -Far), 1.62 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.61 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.54 (s, 6H, CH_3 -Far);

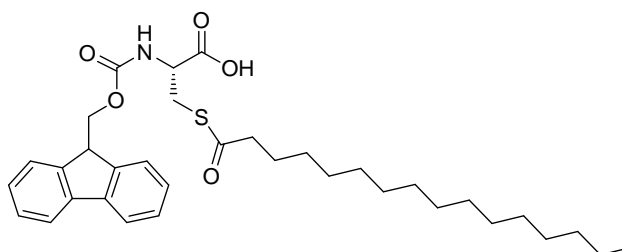
^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 172.4 (C_q , CO_2H), 156.0 (C_q , $C=O$ Fmoc), 143.8 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 140.7 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 138.4 (C_q , Far), 134.5 (C_q , Far), 130.6 (C_q , Far), 127.6 (CH, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 127.0 (CH, $C_{Ar}H$ -

Fmoc), 125.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 124.1 (CH, Far), 123.6 (CH, Far), 120.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, Far), 65.7 (CH₂, Fmoc), 53.9 (CH, C_αH), 46.6 (CH, Fmoc), 39.7 (CH₂, Far), 39.1 (CH₂, Far), 32.0 (CH₂, C_βH₂), 28.8 (CH₂, CH₂-S Far), 26.2 (CH₂, Far), 25.9 (CH₂, Far), 25.4 (CH₃, Far), 17.5 (CH₃, Far), 15.76 (CH₃, Far), 15.73 (CH₃, Far);

HPLC-MS: t_R = 11.09 min; m/z berechnet für C₃₃H₄₇NO₄S: 548.2835 [M+H]⁺, gefunden 548.04 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -9.3 (CHCl₃, c = 1.2).

Synthese von N-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-(palmitoyl)-L-cystein (**15**)



Zu einer Lösung von Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (3 g, 5.12 mmol) in Dichlormethan (75 mL) wurden Trifluoressigsäure (3.75 mL) und Triethylsilan (2.25 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Toluol co-evaporiert und der Rückstand mit *n*-Pentan gewaschen, um das entstandene Triphenylmethan zu entfernen. Der erhaltene farblose Feststoff, gelöst in Dichlormethan (32.5 mL), wurde Chlortrimethylsilan (0.72 mL, 5.63 mmol) versetzt und die Reaktionsmischung wurde 2 h unter Rückfluss erhitzt. Zu der abgekühlten Lösung wurde Palmitoylchlorid (4.65 mL, 15.32 mmol) gegeben und über 3 h wurde eine Lösung aus Triethylamin (1.17 mL, 8.39 mmol) in Dichlormethan (22.5 mL) unter Argonatmosphäre zugetropft. Die Reaktionslösung wurde eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol/HCO₂H, 98:2:1) aufgereinigt. Verbindung **15** (1.32 g, 2.26 mmol, 44 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 1.32 g (2.26 mmol, 44 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.70 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.44 (m, 3H, C_{Ar}H-Fmoc, NH), 7.32 (dd, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.18 (m, 3H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 4.04 (m, 1H, C_αH), 3.44 (dd, *J* = 12.9, 4.1 Hz, 1H, C_βH₂), 3.03 (dd, *J* = 13.4, 9.1 Hz, 1H, C_βH₂), 2.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 1.47 (m, 2H, CH₂-Pal), 1.20 (m, 24H, CH₂-Pal), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃-Pal);

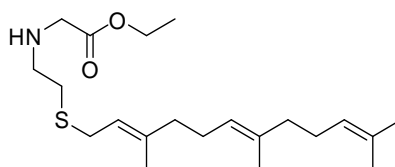
^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198.1 (C_q , S-C=O), 171.8 (C_q , CO_2H), 155.9 (C_q , C=O Fmoc), 143.7 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 140.7 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 127.5 (CH, C_{Ar} -H-Fmoc), 127.0 (CH, C_{Ar} -H-Fmoc), 125.2 (CH, C_{Ar} -H-Fmoc), 120.0 (CH, C_{Ar} -H-Fmoc), 65.8 (CH_2 , Fmoc), 53.4 (CH, C_αH), 46.6 (CH, Fmoc), 43.3 (CH_2 , (C=O) CH_2 -Pal), 31.3 (CH_2 , C_βH_2), 29.9 (CH_2 , Pal), 29.08 (CH_2 , Pal), 29.07 (CH_2 , Pal), 29.06 (CH_2 , Pal), 29.05 (CH_2 , Pal), 29.04 (CH_2 , Pal), 29.03 (CH_2 , Pal), 29.00 (CH_2 , Pal), 28.8 (CH_2 , Pal), 28.73 (CH_2 , Pal), 28.69 (CH_2 , Pal), 28.2 (CH_2 , Pal), 25.0 (CH_2 , Pal), 22.1 (CH_2 , Pal), 13.9 (CH_3 , Pal);

HPLC-MS: t_R = 11.69 min; m/z berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{NO}_5\text{S}$: 582.3253 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 581.93 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_D^{20}$ = -2.2 (CHCl_3 , c = 1.16).

Synthese von *N*-(Ethyl-*S*-thiofarnesyl) Glycinethylester (**26**)

$\text{H}(\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{S-Far})\text{-GlyCO}_2\text{Et}$

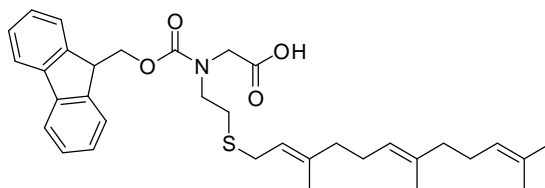


Zu einer Lösung von Cysteamin-Hydrochlorid **24** (1 g, 8.8 mmol) in Methanol (17 mL) wurde bei 0 °C 7 N Ammoniak in Methanol Lösung (23 mL) langsam zugetropft. Nach 3 min wurde *trans, trans*-Farnesylchlorid (2.34 mL, 8.8 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 3 h bei 0 °C und eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mehrmals mit *n*-Pentan gewaschen. Das Amin **25** wurde in Tetrahydrofuran (15 mL) gelöst und bei Zimmertemperatur wurde Triethylamin (2.45 mL, 17.6 mmol) und eine Lösung von Bromessigsäureethylester (0.98 mL, 8.8 mmol) in Tetrahydrofuran (10 mL) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Ethanol, 95:5) aufgereinigt. Verbindung **26** (2.5 g, 6.8 mmol, 77 %) wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 2.5 g (6.8 mmol, 77 %);

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.18 (t, J = 7.7 Hz, 1H, CH-Far), 5.03 (m, 2H, CH-Far), 3.93 (br, 1H, NH), 4.13 (q, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Et}$), 3.36 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 3.10 (d, J = 7.7 Hz, 2H, S- CH_2 Far), 2.74 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N- CH_2), 2.56 (t, J = 6.5 Hz, 2H, S- CH_2), 1.97 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-Far}$), 1.615 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.610 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.54 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Et}$).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl (*N*(Ethylthio *S*-Farnesyl)) Glycin (16**)**



Zu einer Lösung von **26** (2.5 g, 6.8 mmol) in 1,4-Dioxan (28 mL) und Methanol (10 mL) wurde 4 M NaOH (2 mL) hinzugefügt und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 15 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in Dichlormethan (30 mL) gelöst und mit Fmoc-OSu (2.53 g, 7.48 mmol) versetzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 8-9 eingestellt und die Lösung wurde bei Zimmertemperatur 3 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **16** als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2.6 g (4.56 mmol, 67 %);

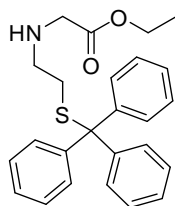
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.53 (m, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.31 (m, 4H, C_{Ar}H-Fmoc), 5.18 (m, 1H, CH-Far), 5.06 (m, 2H, CH-Far), 4.51 und 4.43 (2 d, *J*₁ = 6.0 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.21 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.04 und 3.96 (2 s, 2H, CH₂CO₂H), 3.48 und 3.32 (2 t, *J*₁ = 6.8 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 2H, CH₂N), 3.15 und 3.02 (2 d, *J* = 7.7 Hz, 2H, SCH₂-Far), 2.62 und 2.40 (2 t, *J*₁ = 6.9 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 2H, CH₂S), 2.00 (m, 8H, CH₂-Far), 1.61 (m, 12H, CH₃-Far). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 179.5 (C_q, CO₂H), 167.6 (C_q, Fmoc C=O), 144.1 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 141.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 139.7 (C_q, Far), 135.8 (C_q, Far), 131.7 (C_q, Far), 128.1 (CH, C_{Ar}-Fmoc), 127.5 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.4 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 124.7 (CH, Far), 120.4 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, Far), 68.1 (CH₂, Fmoc), 49.7 (CH₂, CH₂CO₂Et), 49.0 (CH₂, N-CH₂), 47.6 (CH, Fmoc), 40.1 (CH₂, Far), 40.0 (CH₂, Far), 30.0 (CH₂, S-CH₂), 27.1 (CH₂, S-CH₂ Far), 26.8 (CH₂, Far), 26.1 (CH₂, Far), 18.1 (CH₃, Far), 16.5 (CH₃, Far), 16.4 (CH₃, Far);

HPLC-MS: *t*_R = 10.49 min; *m/z*: berechnet für C₃₄H₄₄O₄NS 562.29856 [M+H]⁺, gefunden 561.99 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z*: berechnet für C₃₄H₄₄O₄NS 562.29856 [M+H]⁺, gefunden 562.29808 [M+H]⁺.

Synthese von *N*-(Ethyl-*S*-trityl) Glycinethylester (**27**)

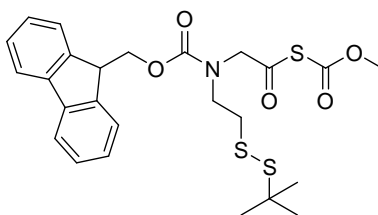


Eine Lösung aus Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) (4 g, 35.21 mmol) und Triphenylmethanol (9.17 g, 35.21 mmol) in Trifluoressigsäure (20 mL) wurde 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert und der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und mit Natronlauge, Wasser sowie gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 11 g (34.43 mmol) des *S*-Trityl-geschützten Cysteamins erhalten. Davon wurden 8.4 g (26.36 mmol) in Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde eine Lösung von Bromessigsäureethylester (2.9 mL, 26.36 mmol) in Tetrahydrofuran (25 mL) und Triethylamin (7.3 mL, 52.71 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Diethylether gelöst. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Ethanol, 97:3) aufgereinigt. Verbindung **27** (9.1 g, 22.5 mmol) wurde in 76 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 9.1 g (22.5 mmol, 76 %);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (m, 6H, C_{Ar}H), 7.22 (m, 9H, C_{Ar}H), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂, Et), 3.25 (s, 2H, CH₂, CH₂-CO₂Et), 2.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, N-CH₂), 2.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂-S), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃, CH₃-Et).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*N*(ethyl-*tert*-butyldisulfanyl)) ethylaminoessigsäuremethylesterthioanhydrid (**29**)



Eine Lösung von Verbindung **27** (6.4 g, 15.8 mmol) in 4 M NaOH, Methanol und 1,4-Dioxan (1:5:14) wurde bei Zimmertemperatur eine Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem

Druck entfernt, und das Rohprodukt in Wasser (15 mL) gelöst. Der pH-Wert wurde auf pH 9 eingestellt und eine Lösung von Fmoc-OSu (5.06 g, 15 mmol) in Acetonitril (15 mL) wurde hinzuge tropft, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Triethylamin zwischen pH 8 - 9 gehalten wurde. Nach einer Stunde wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst, und der pH-Wert wurde mit 1 N KHSO₄ auf pH 2 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit KHSO₄-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO₄ getrocknet und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 9:1) aufgereinigt. Die freie Säure (3.6 g, 6 mmol) wurde in Dichlormethan (30 mL) gelöst und zur Entschützung der Tritylschutzgruppe wurde Trifluoressigsäure (3 mL) und Triethylsilan (2.4 mL) hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert. Es wurden 2.14 g (6 mmol) des freien Thiols **28** erhalten.

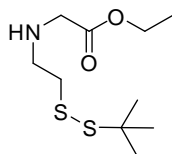
Zu einer Lösung von Methoxycarbonylsulfonylchlorid (1.1 mL, 12 mmol) in Methanol (7 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung von **28** (2.14 g, 6 mmol) in HCl-haltigen Methanol (7 mL) langsam hinzuge tropft. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Behandlung mit Diethylether wurde gewünschte Verbindung (1.3 g, 2.9 mmol) erhalten und in Dichlormethan/Methanol (1:1) (8 mL) gelöst. Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 2-Methylpropan-2-thiol (0.65 mL, 5.8 mmol) und Triethylamin (0.36 mL, 2.61 mmol) in Methanol (5 mL) langsam hinzuge tropft. Nach einstündigem Rühren bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt (1.4 g) mittels Säulenchromatographie (Hexan/Diethylether, 5:3.5) aufgereinigt. Verbindung **29** wurde in 16 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (2.46 mmol, 16 %);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.56 und 7.49 (2 d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.29 (m, 4H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.46 und 4.39 (2 d, *J*₁ = 6.2 Hz, *J*₂ = 6.6 Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.20 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.00 und 3.94 (2 s, 2H, CH₂C(=O)S CO₂Me), 3.69 und 3.65 (2 s, 3H, CO₂Me), 3.57 und 3.40 (2 t, *J* = 6.9 Hz, 2H, N-CH₂), 2.84 und 2.56 (2 t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-S), 1.29 und 1.26 (2 s, 9H, C(CH₃)₃). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.3 (C_q, C(=O)S), 156.4 (C_q, SCO₂Me), 155.9 (C_q, C=O Fmoc), 144.1 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 141.6 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 128.0 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.9 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.4 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 67.9 (CH₂, Fmoc), 52.42 (CH₃, CO₂Me), 50.3 (CH₂, N-CH₂), 49.0 (CH₂, CH₂C(=O)SCO₂Me), 48.3 (C_q, C(CH₃)₃), 47.4 (CH, Fmoc), 38.1 (CH₂, CH₂-S), 30.1 (CH₃, C(CH₃)₃);

Synthese von *N*-(Ethyl-*S*-thio-*tert*-Butyl) Glycinethylester (**33**)

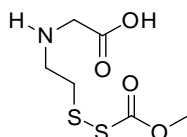


Zu einer Lösung von Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) (1 g, 8.8 mmol) in Methanol (10 mL) wurde langsam ein Gemisch von Methoxycarbonylsulfonylchlorid (1.6 mL, 17.6 mmol) in Methanol (11 mL) bei 0 °C hinzuge tropft. Nach einer Stunde wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und nach Behandlung mit Diethylether wurde das aktivierte Sulfonylderivat, gelöst in Methanol (5 mL), zu einer Lösung aus 2-Methylpropan-2-thiol (0.99 mL, 17.6 mmol) und Triethylamin (1.1 mL, 7.92 mmol) in Methanol (8 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und nach Behandlung mit Diethylether und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde **32** in Ethanol (20 mL) gelöst. Es wurde mit Bromessigsäureethylester (0.98 mL, 8.8 mmol) und Triethylamin (2.45 mL, 17.6 mmol) versetzt und das Gemisch wurde 6 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Verbindung **33** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/EtOH, 9:1) erhalten.

Ausbeute: 600 mg (2.39 mmol, 27 %);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (q, *J* = 14.7, 7.5 Hz, 2H, CH₂-Et), 3.42 (s, 2H, CH₂, CH₂CO₂Et), 2.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, N-CH₂), 2.79 (m, 2H, CH₂-S), 1.33 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃-Et).

Synthese von *N*-(Ethyl-*S*-thiomethoxycarbonylsulfonyl)-Glycin (**30**)



Eine Lösung von Verbindung **27** (4 g, 9.88 mmol) in 4 M NaOH (2.5 mL), Methanol (12.5 mL) und 1,4-Dioxan (35 mL) wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand (3.5 g) wurde in Dichlormethan (30 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (3 mL) und Triethylsilan (2 mL) versetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Nach mehrfacher Co-Evaporation mit Toluol wurde der Rückstand

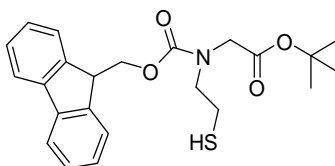
mit *n*-Pentan und Diethylether mehrfach gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Der erhaltene Feststoff (1 g, 7.4 mmol) wurde in Methanol (10 mL) gelöst und es wurde 30 min Chlorwasserstoff durch die Lösung geleitet. Diese Lösung wurde dann langsam zu einer Lösung von Methoxycarbonylsulfenylchlorid (1.34 mL, 14.8 mmol) in Methanol (11 mL) bei 0 °C hinzugegossen und das Gemisch wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Diethylether behandelt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 1.39 g (6.17 mmol, 62 %) der Verbindung **30** erhalten.

Ausbeute: 1.39 g (6.17 mmol, 62 %);

¹H-NMR (300 MHz, D₂O) δ 3.96 (s, 3H, CO₂Me), 3.88 (s, 2H, CH₂, CH₂CO₂H), 3.51 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂), 3.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-S).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) *N*-(2-((thio)ethyl) Glycin-*tert*-butylester (**36**)

Fmoc-NhCys-OtBu



Ein Lösung von Cysteamin-Hydrochlorid (**24**) (4 g, 35.21 mmol) und Triphenylmethanol (9.17 g, 35.21 mmol) in Trifluoressigsäure (20 mL) wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit Natronlauge, Wasser sowie gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zu einer Lösung des *S*-Tritylgeschützten Cysteamins (11 g, 34.43 mmol) in Tetrahydrofuran (55 mL) wurde bei 0 °C Triethylamin (9.55 mL, 68.87 mmol) und eine Lösung von Bromessigsäure-*tert*-butylester (5.08 mL, 34.43 mmol) in Tetrahydrofuran (10 mL) hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der *tert*-Butylester **34** (12.55 g, 28.94 mmol) wurde als farbloses Öl nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol, 95:5) isoliert. Es wurden 8 g (18.41 mmol) des erhaltenen Esters **34** in Dichlormethan (60 mL) gelöst und bei 0 °C wurde Fmoc-OSu (6.22 g, 18.45 mmol) und Triethylamin (2.57 mL, 18.45 mmol) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Diethylether, 5:1) aufgereinigt. Der Fmoc-geschützte Ester **35** (7.76 g, 11.66 mmol) wurde als

farbloser Schaum erhalten. Für selektive Tritylentschützung wurde dieser mit einer Lösung aus Dichlormethan (94 mL), Trifluoressigsäure (1 mL) und Triethylsilan (5 mL) versetzt. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde mit Triethylamin (1.8 mL) neutralisiert, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **36** (4.43 g, 10.73 mmol) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat, 8:1) als farbloses Öl erhalten.

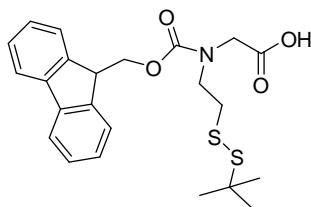
Ausbeute: 4.43 g (10.73 mmol, 49 %);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (dd, *J* = 7.0 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.38 (m, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.30 (m, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.56 und 4.39 (2 d, *J*₁ = 5.5 Hz, *J*₂ = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.15 (m, 1H, CH-Fmoc), 3.57 und 3.53 (2 s, 2H, CH₂, CH₂CO₂*t*Bu), 2.98 und 2.80 (2 m, 2H, N-CH₂), 2.50 und 2.26 (2 m, 2H, CH₂-S), 1.44 und 1.42 (2 s, 9H, C(CH₃)₃), 1.14 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, SH). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.9 und 168.8 (C_q, CO₂*t*Bu), 156.2 und 156.1 (C_q, C=O Fmoc), 144.1 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 141.6 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 141.5 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.9 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 124.9 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 82.3 und 82.1 (C_q, C(CH₃)₃), 68.1 und 67.3 (CH₂, Fmoc), 52.9 und 52.3 (N-CH₂), 51.0 und 50.9 (CH₂, CH₂CO₂*t*Bu), 47.5 und 47.4 (CH, Fmoc), 28.2 (CH₃, C(CH₃)₃), 22.9 und 22.8 (CH₂-S). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

HPLC-MS: *t*_R = 10.28 min, *m/z* berechnet für C₂₃H₂₈NO₄S: 414.17 [M+H]⁺; gefunden: 413.71 [M+H]⁺.

Synthese von N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N'-(Ethylthio *tert*-Butyldisulfanyl) Glycin (**17**)



Zu einer Lösung von Methoxycarbonylsulfenylchlorid (1.39 mL, 15.26 mmol) in Methanol (11 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung von **36** (2.72 g, 7.63 mmol) in HCl-haltigem Methanol (10 mL) langsam hinzuge tropft und bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch 40 min gerührt. Dann wurde es mit Triethylamin (10 mL) versetzt und die Reaktionslösung wurde mit verdünnter NaHCO₃- und

gesättigter NaCl Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde in Methanol (20 mL) gelöst, mit Triethylamin (0.96 mL, 6.87 mmol) und 2-Methylpropan-2-thiol (1.72 mL, 15.26 mmol) versetzt und das Gemisch wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand (**37**) wurde mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure (19 mL), Triethylsilan (0.5 mL) und Wasser (0.5 mL) (95:2.5:2.5) versetzt und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 40 min gerührt. Es wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert, der Rückstand mit *n*-Hexan gewaschen und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt. Verbindung **17** wurde in 41 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 1.40 g (3.14 mmol, 41 %);

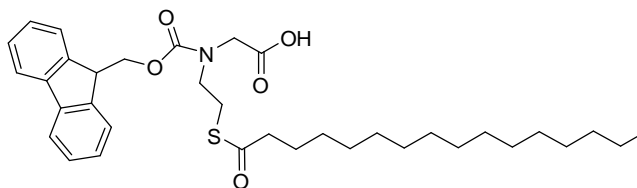
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.73 (dd, $J = 13.5, 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.54 (dd, $J = 20.8, 7.3$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.30 (m, 4H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 4.53 und 4.46 (2 m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.21 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.10 und 3.96 (2 s, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3.57 und 3.43 (2 t, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 8.1$ Hz, 2H, N-CH_2), 2.83 und 2.55 (2 t, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 2H, S-CH_2), 1.30 und 1.27 (2 s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 175.2 und 174.9 (C_q , CO_2H), 156.6 und 155.8 (C_q , C=O Fmoc), 143.9 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 141.5 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 128.0 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.9 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.4 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.3 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 125.0 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 120.24 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 120.17 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 68.0 und 67.9 (CH_2 , Fmoc), 50.2 und 50.1 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 48.8 und 48.5 (N-CH_2), 48.3 (C_q , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 (CH-Fmoc), 38.0 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 30.1 (CH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 9.53$ min, m/z berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_4\text{S}_2$: 446.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 445.82 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_4\text{S}_2$: 446.1454 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 446.1453 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) *N'*-(2-((palmitoylthio)ethyl) glycin (**18**) Fmoc-NhCys(Pal)-OH



Zu einer Lösung von **36** (4.93 g, 11.92 mmol) in Dichlormethan (120 mL) wurde Palmitoylchlorid (10.9 mL, 35.78 mmol) und Triethylamin (3.3 mL, 23.84 mmol) hinzugefügt und die Lösung wurde 3 h

bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Ester **38** (6.36 g, 9.76 mmol) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat, 98.5:1.5) als farbloses Öl erhalten. Zu einer Lösung von **38** in Dichlormethan (50 mL), wurden Trifluoressigsäure (15 mL) und Triethylsilan (5 mL) hinzugefügt und das Gemisch wurde 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Es wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/ HCO_2H , 98:2:1) aufgereinigt. Verbindung **18** (5.11 g, 8.58 mmol, 72 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.11 g (8.58 mmol, 72 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (dd, $J = 16.8, 7.6$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.52 (dd, $J = 21.2, 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.34 (m, 4H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 4.55 und 4.45 (2 d, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.25 und 4.17 (2 t, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 6.1$ Hz, 1H, CH-Fmoc), 4.04 und 3.94 (2 s, 2H, $\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 3.42 und 3.20 (2 t, $J = 7.3$ Hz, 2H, N-CH_2), 2.99 und 2.67 (2 t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.50 (m, 2H, $(\text{C=O})\text{CH}_2\text{-Pal}$), 1.60 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Pal}$), 1.26 (m, 24H, $\text{CH}_2\text{-Pal}$), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Pal}$). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

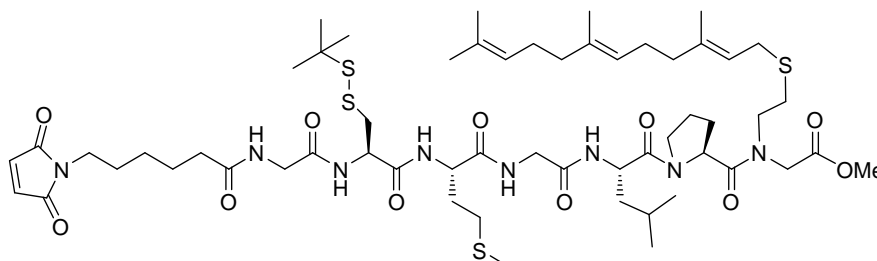
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 199.8 und 199.5 ($\text{C}_q, \text{SC=O}$), 175.0 ($\text{C}_q, \text{CO}_2\text{H}$), 155.8 ($\text{C}_q, \text{C=O Fmoc}$), 144.0 ($\text{C}_q, \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 143.9 ($\text{C}_q, \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 143.8 ($\text{C}_q, \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 141.6 ($\text{C}_q, \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 141.5 ($\text{C}_q, \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 128.0 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.9 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.4 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.3 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 125.0 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 120.2 ($\text{CH}, \text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 68.0 und 67.9 (CH_2, Fmoc), 49.9 und 49.4 ($\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 49.0 und 48.50 ($\text{CH}_2, \text{N-CH}_2$), 47.40 und 47.39 (CH, Fmoc), 44.4 ($\text{CH}_2, (\text{C=O})\text{CH}_2$), 32.1 (CH_2, Pal), 29.91 (CH_2, Pal), 29.90 (CH_2, Pal), 29.89 (CH_2, Pal), 29.87 (CH_2, Pal), 29.85 (CH_2, Pal), 29.81 (CH_2, Pal), 29.63 (CH_2, Pal), 29.57 (CH_2, Pal), 29.4 (CH_2, Pal), 29.2 (CH_2, Pal), 27.0 (CH_2, Pal), 26.9 (CH_2, Pal), 25.8 (CH_2, Pal), 22.9 (CH_2, Pal), 14.33 (CH_3, Pal). Das Spektrum zeigt Signale für zwei Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 11.38$ min, m/z berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{NO}_5\text{S}$: 596.34 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 595.99 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{NO}_5\text{S}$: 594.32587 $[\text{M}-\text{H}]^-$; gefunden: 594.32511 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5.6 Versuche zu Kapitel 3.2.2

Synthese von MIC-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-NhCys(Far)-OMe (39)



Die Synthese wurde im 0.25 mmolaren Maßstab an 4-Fmoc-Hydrazinoylharz (Beladung: 0.56 mmol/g) durchgeführt. Die Beladung mit Fmoc-NhCys(Far)-OH **16** wurde gemäß AAV 9 manuell durchgeführt und die Beladungsbestimmung nach AAV 3 ergab 0.45 mmol/g (80 %). Das Peptid wurde nach AAV 5 aufgebaut und gemäß der in AAV 10 angegebenen Bedingungen abgespalten. Nach Aufreinigung durch präparative HPLC-MS und Lyophilisierung wurde das Lipopeptid **39** in 9.5 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 31 mg (25 μ mol, 9.5 %);

Anfangsbeladung mit Fmoc-NhCys(Far)-OH (**16**): 80 %;

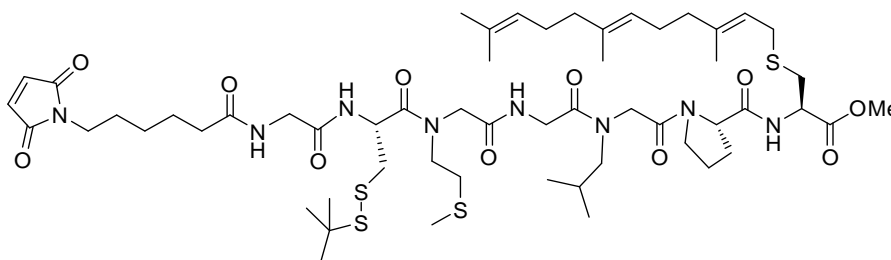
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.22 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.12 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH-Met), 8.07 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.97 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.90 (m, 1H, NH-Leu), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.25 (dd, $J = 14.3, 6.9$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (dd, $J = 14.4, 6.9$ Hz, 2H, CH-Far), 4.72 (dd, $J = 8.5, 4.3$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Pro}$), 4.56 (m, 2H, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(StBu)}$, $\text{C}_\alpha\text{H-Leu}$), 4.26 und 3.83 (m, 3H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-NhCys(Far)}$, $\text{C}_\alpha\text{H-Met}$), 3.73 (m, 7H, $\text{C}_\delta\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-Gly}$, N- CH_2 NhCys(Far)), 3.68 und 3.61 (2 s, 3H, CO_2Me), 3.47 (m, 1H, $\text{C}_\delta\text{H}_2\text{-Pro}$), 3.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 3.21 und 3.13 (2 d, $J = 7.9$ Hz, 2H, S- CH_2 Far), 3.08 und 2.95 (2 m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$), 2.74 (m, 2H, S- CH_2 NhCys(Far)), 2.50 (m, 2H, $\text{C}_\gamma\text{H}_2\text{-Met}$), 2.40 (m, 1H, $\text{C}_\gamma\text{H}_2\text{-Pro}$), 2.19 (m, 1H, $\text{C}_\gamma\text{H}_2\text{-Pro}$), 2.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Met}$), 1.99 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-Far}$, $\text{C}_\beta\text{H-Met}$, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Leu}$), 1.84 (m, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Pro}$), 1.73 (m, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Pro}$), 1.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.62 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.56 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.52 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.48 (td, $J = 15.2, 7.7$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 1.37 (m, 1H, $\text{C}_\gamma\text{H-Leu}$), 1.28 und 1.24 (2 s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{-Cys(StBu)}$), 1.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 0.86 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-Leu}$). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 11.02$ min, m/z berechnet für $\text{C}_{57}\text{H}_{93}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_4$: 1193.58411 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1193.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{57}H_{93}N_8O_{11}S_4$: 1193.58411 $[M+H]^+$; gefunden: 1193.58395 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -24.0$ ($CHCl_3$, $c = 0.47$).

Synthese von MIC-Gly-Cys(StBu)-NMet-Gly-NLeu-Pro-Cys(Far)-OMe (**41**)



Die Synthese wurde im 0.25 mmolaren Maßstab an 4-Fmoc-Hydrazinoylharz (Beladung: 0.56 mmol/g) durchgeführt. Die Beladung mit Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**) wurde gemäß AAV 8 manuell durchgeführt und die anschließende Beladungsbestimmung nach AAV 3 ergab 0.34 mmol/g (61 %). Das Peptid wurde nach AAV 5 aufgebaut und gemäß der in AAV 10 angegebenen Bedingungen abgespalten. Nach Aufreinigung durch präparative HPLC-MS und Lyophilisierung wurde das Lipopeptid **41** in 21 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 49 mg (41 μ mol, 21 %);

Anfangsbeladung mit Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**): 61 %;

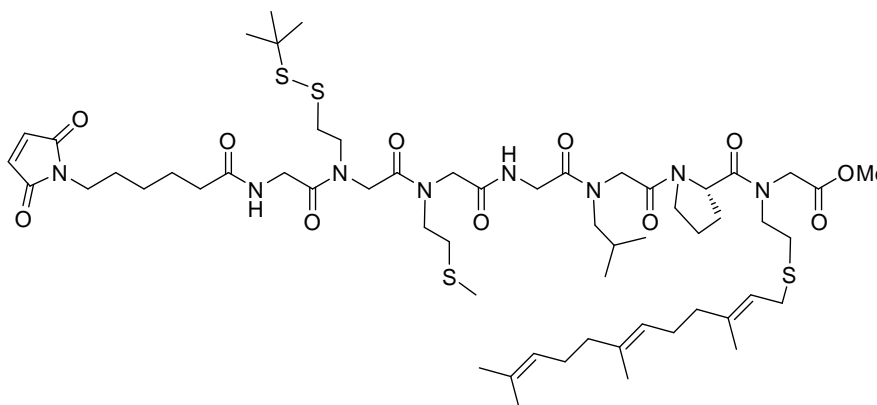
1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.61 und 8.22 (dd, m, $J = 13.0, 8.2$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.41 und 8.22 (d, m, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 7.94 (m, 1H, NH-Gly), 7.86 und 7.80 (2 m, 1H, NH-Gly), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.15 (m, 1H, CH-Far), 5.07 (dd, $J = 15.1, 7.5$ Hz, 2H, CH-Far), 5.00 und 4.81 (2 m, 1H, C_α H-Cys(StBu)), 4.49 und 4.37 (2 m, 3H, C_α H-Cys(Far), C_α H₂-NLeu/NMet), 4.37 (m, 1H, C_α H-Pro), 4.04 (m, 2H, C_β H₂-Pro), 4.04 und 3.66 (2 m, 4H, C_α H₂-Gly, C_α H₂-NLeu/NMet), 3.64, 3.61, 3.605 und 3.60 (4 s, 3H, CO₂Me), 3.66 und 3.49 (2 m, 2H, CH₂-NMet), 3.36 (m, 2H, CH₂-MIC), 3.10 (m, 5H, S-CH₂-Far, CH₂-NLeu, C_β H₂-Cys(StBu)), 2.79 (m, 3H, C_β H₂-Cys(StBu), C_β H₂-Cys(Far)), 2.79 und 2.54 (2 m, 2H, CH₂-NMet), 2.23 (m, 2H, C_β H₂-Pro), 2.15 und 2.05 (2 s, 3H, CH₃-NMet), 2.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 2.01 (m, 6H, CH₂-Far), 1.84 (m, 5H, CH-NLeu, C_γ H₂-Pro, CH₂-Far), 1.63 und 1.62 (2 s, 6H, CH₃-Far), 1.56 (s, 6H, CH₃-Far), 1.48 (dq, $J = 14.4, 7.0$ Hz, 4H, CH₂-MIC), 1.30, 1.261 und 1.256 (3 s, 9H, C(CH₃)₃-Cys(StBu)), 1.19 (dt, $J = 15.2, 7.7$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 0.87 und 0.80 (2 m, 6H, CH₃-NLeu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 10.88$ min, m/z berechnet für $C_{56}H_{91}N_8O_{11}S_4$: 1179.56846 $[M+H]^+$; gefunden: 1178.98 $[M+H]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{56}H_{91}N_8O_{11}S_4$: 1179.56846 $[M+H]^+$; gefunden: 1179.57029 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -34.5$ ($CHCl_3$, $c = 3.05$).

Synthese von MIC-Gly-NhCys(*St*Bu)-NMet-Gly-NLeu-Pro-NhCys(*Far*)-OMe (**43**)



Die Synthese wurde im 0.25 mmolaren Maßstab an 4-Fmoc-Hydrazinoylharz (Beladung: 0.56 mmol/g) durchgeführt. Die Beladung mit Fmoc-NhCys(*Far*)-OH (**16**) wurde gemäß AAV 9 manuell durchgeführt und die anschließende Beladungsbestimmung nach AAV 3 ergab 0.39 mmol/g (70 %). Das Peptid wurde nach AAV 5 aufgebaut und gemäß der in AAV 10 angegebenen Bedingungen abgespalten. Nach Aufreinigung durch präparative HPLC-MS und Lyophilisierung wurde das Lipopeptid **43** in 11 % (34 mg, 24 μ mol) Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 34 mg (24 μ mol, 11 %);

Anfangsbeladung mit Fmoc-NhCys(*Far*)-OH (**16**): 70 %;

1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.27 (m, 1H, NH-Gly), 7.86 (m, 1H, NH-Gly), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.19 (m, 1H, CH-*Far*), 5.06 (m, 2H, CH-*Far*), 4.69 (m, 1H, C_α H-Pro), 4.47 und 4.36 (2 m, 2H, C_α H₂-NMet/NhCys(*St*Bu)/NhCys(*Far*)/NLeu), 4.36 (m, 2H, C_α H₂-NMet/NhCys(*St*Bu)/NhCys(*Far*)/NLeu), 4.24 (m, 2H, C_α H₂-NMet/NhCys(*St*Bu)/NhCys(*Far*)/NLeu), 4.12 (m, 2H, C_α H₂-NMet/NhCys(*St*Bu)/NhCys(*Far*)/NLeu), 3.99 (m, 2H, C_α H₂-Gly), 3.72 (m, 8H, C_α H₂-Gly, CH₂-NhCys(*Far*), CH₂-NhCys(*St*Bu), CH₂-NMet), 3.63, 3.62, 3.60 und 3.598 (4 s, 3H, CO₂Me), 3.52 (m, 2H, C_δ H₂-Pro), 3.37 (t, $J = 7.11$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.12 (m, 4H, S-CH₂ *Far*, CH₂-NLeu), 2.90 (m, 2H, CH₂-NhCys(*St*Bu)), 2.72 (m, 2H, CH₂-NhCys(*Far*)), 2.56 (m,

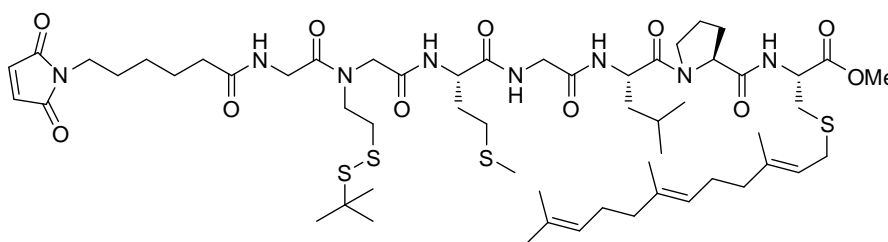
2H, CH₂-NMe₃), 2.01 (m, 16H, CH₂-MIC, CH₂-Far, CH₃-NMe₃, C_βH₂-Pro, C_γH₂-Pro), 1.76 (m, 2H, CH-NLeu, C_γH₂-Pro), 1.63 und 1.62 (2 s, 6H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.47 (dt, *J* = 14.6, 7.2 Hz, 4H, CH₂-MIC), 1.31, 1.30, 1.29 und 1.28 (4 s, 9H, C(CH₃)₃-NHCys(StBu)), 1.19 (m, 2H, CH₂-MIC), 0.83 (m, 6H, CH₃-NLeu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: *t_R* = 11.03 min, *m/z* berechnet für C₅₈H₉₅N₈O₁₁S₄: 1207.59976 [M+H]⁺; gefunden: 1207.10 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₅₈H₉₅N₈O₁₁S₄: 1207.59976 [M+H]⁺; gefunden: 1207.60272 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -19.8 (CHCl₃, *c* = 0.85).

Synthese von MIC-Gly-NHCys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (45)



Die Synthese wurde im 0.1 mmolaren Maßstab an 4-Fmoc-Hydrazinoylharz (Beladung: 0.56 mmol/g) durchgeführt. Die Synthese wurde vollständig, inklusive der Fmoc-Cys(Far)-OH (**2**)-Anfangsbeladung nach AAV 4 durchgeführt. Das Peptid wurde gemäß AAV 10 abgespalten. Nach Aufreinigung durch präparative HPLC-MS und Lyophilisierung wurde das Lipopeptid **45** in 10 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 12 mg (10 μmol, 10 %);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 und 8.20 (2 d, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 7.7 Hz, 1H, NH-Met), 8.16 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH-Gly), 8.06 (dd, *J* = 13.8, 7.1 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 7.99 (dd, *J* = 15.2, 8.2 Hz, 1H, NH-Leu), 7.91 und 7.85 (2 m, 1H, NH-Gly), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH-Far), 5.08 (m, 2H, CH-Far), 4.57 (dt, *J* = 7.0 Hz, 1H, C_αH-Leu), 4.35 (m, 3H, C_αH-Pro, C_αH-Met, C_αH-Cys(Far)), 4.07 und 3.96 (2 s, 2H, C_αH₂-NHCys(StBu)), 4.01 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.83 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.69 und 3.51 (2 m, 2H, CH₂-NHCys(StBu)), 3.69 (m, 3H, C_δH₂-Pro, C_αH₂-Gly), 3.62 (s, 3H, CO₂Me), 3.51 (m, 1H, C_δH₂-Pro), 3.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.12 (m, 2H, S-CH₂ Far), 2.93 und 2.80 (t, m, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂-NHCys(StBu)), 2.80 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.67 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.41 (m, 2H, C_γH₂-Met), 2.11 (m, 2H, CH₂-MIC), 2.03 (m, 11H, C_βH₂-Pro, C_γH₂-Pro, CH₂-Far, CH₃-Met), 1.86 (m, 6H, C_γH₂-Pro, CH₂-

Far, C_βH₂-Met), 1.63 (m, 7H, CH₃-Far, CH-Leu), 1.58 (s, 6H, CH₃-Far), 1.46 (m, 6H, C_βH₂-Leu, CH₂-MIC), 1.31 und 1.29 (2 s, 9H, C(CH₃)₃-NhCys(StBu)), 1.19 (m, 2H, CH₂-MIC), 0.86 (m, 6H, CH₃-Leu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

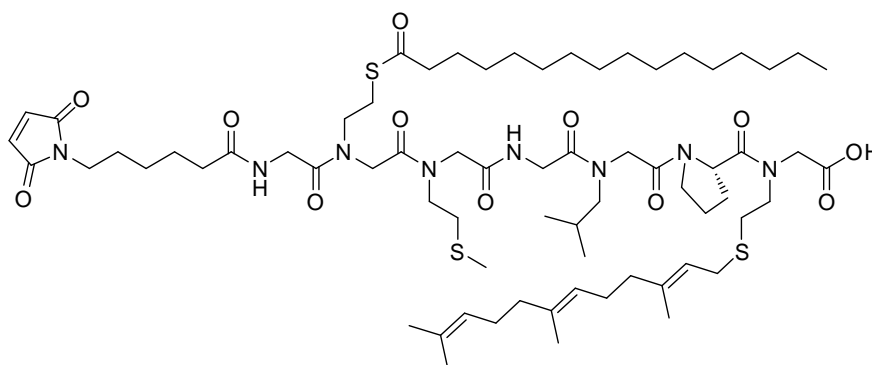
HPLC-MS: t_R = 11.06 min, m/z berechnet für C₅₇H₉₃N₈O₁₁S₄: 1193.58411 [M+H]⁺; gefunden: 1193.03 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₅₇H₉₃N₈O₁₁S₄: 1193.58411 [M+H]⁺; gefunden: 1193.58616 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -29.3 (CHCl₃, c = 0.45).

5.7 Versuche zu Kapitel 3.2.3

Synthese von MIC-Gly-NhCys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-NhCys(Far)-OH (50)



Die Beladung des 2-Chlorotriylchloridharzes (Beladung: 0.7 mmol/g) mit **16** erfolgte nach AAV 2 und nach AAV 3 wurde eine Beladung von 0.7 mmol/g (quantitativ) bestimmt. Gemäß AAV 4 erfolgte der Aufbau der Sequenz bis zum Einbau des palmitoylierten Homocystein-Peptoidbausteins **18** im 0.25 mmolaren Maßstab, wobei Fmoc-Pro-OH doppelt gekuppelt und HATU als Aktivator verwendet wurde. In einem Spritzenreaktor wurden Fmoc-Gly-OH und Maleimidocaprinsäure nach AAV 11 manuell gekuppelt. Durch Abspaltung gemäß AAV 7 wurden 322 mg Rohprodukt erhalten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 9:1) wurde das gewünschte Peptid **50** in 57 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 190 mg (0.14 mmol, 57 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (m, 1H, NH-Gly), 7.83 (m, 1H, NH-Gly), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.20 (m, 1H, CH-Far), 5.07 (m, 2H, CH-Far), 4.73 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.46 (m, 2H, C_αH₂-NMet/NLeu/NhCys(Far)/NhCys(Pal)), 4.25 (m, 6H, C_αH₂-NMet/NLeu/NhCys(Far)/NhCys(Pal)), 4.00 (m, 2H, C_αH₂-

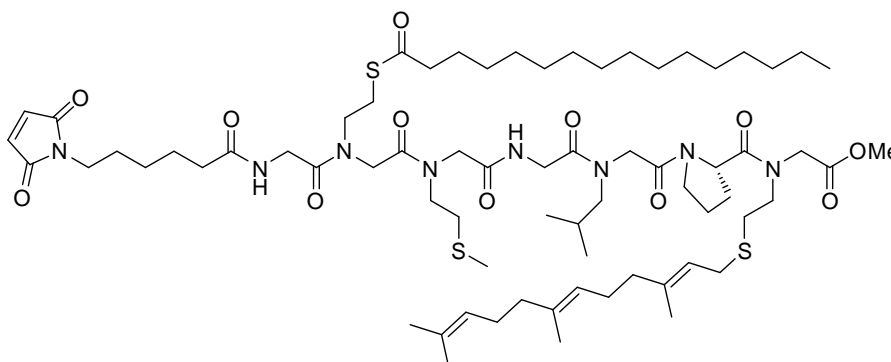
Gly), 3.77 (m, 2H, C_αH₂-Gly), 3.47 (m, 10H, CH₂-MIC, N-CH₂ NMet, C₆H₂-Pro, N-CH₂ NhCys(Far), N-CH₂ NhCys(Pal)), 3.22 (m, 2H, CH₂-S Far), 3.00 (m, 2H, CH₂-NLeu), 2.74 (m, 4H, CH₂-S NhCys(Far), CH₂-S NhCys(Pal)), 2.57 (m, 4H, (C=O)CH₂-Pal, CH₂-S NMet), 2.05 (m, 17H, CH₂-MIC, CH₃-NMet, CH₂-Far, C_βH₂-Pro, C_γH₂-Pro), 1.79 (m, 1H, CH-NLeu), 1.63 (s, 6H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.46 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.25 (m, 26H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 0.83 (m, 9H, CH₃-Pal, CH₃-NLeu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: t_R = 11.81 min; m/z berechnet für C₆₉H₁₁₅N₈O₁₂S₃: 1343.77911 [M+H]⁺, gefunden 1342.96 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₆₉H₁₁₅N₈O₁₂S₃: 1343.77911 [M+H]⁺; gefunden: 1343.78327 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -9.4 (CHCl₃, c = 2).

Synthese von MIC-Gly-NhCys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-NhCys(Far)-OMe (47)



Zu einer Lösung von **50** (15.37 mg, 11.44 μmol) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) wurde bei 0 °C TMSCHN₂ (0.9 Äq.) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) über 30 min langsam zugetropft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt. Der Methylester **47** wurde in 30 % iger Ausbeute (4.2 mg, 3.09 μmol) erhalten und es wurden 7.2 mg (5.36 μmol, 51 %) der Carbonsäure **50** re-isoliert.

Ausbeute: 4.2 mg (3.09 μmol, 30 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.86 (m, 2H, NH-Gly), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.18 (m, 1H, CH-Far), 5.06 (m, 2H, CH-Far), 4.73 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.60 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 4.41 (m, 8H, C_αH₂-NhCys(Pal), C_αH₂-NhCys(Far), C_αH₂-NMet, C_αH₂-NLeu), 4.22 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.97 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.72 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.61 (m, 4H, N-CH₂ NhCys(Far), N-CH₂ NhCys(Pal)), 3.61 und 3.51 (2 s, 3H, CO₂Me), 3.40 (m, 6H,

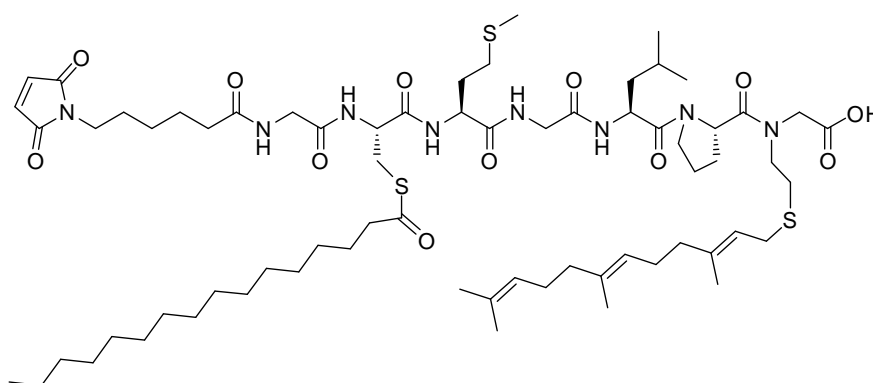
CH₂-MIC, C₆H₂-Pro, CH₂-NMet), 3.24 (m, 2H, CH₂-S Far), 3.08 (m, 2H, CH₂-NLeu), 2.73 (m, 2H, CH₂-NMet), 2.53 (m, 4H, (C=O)CH₂-Pal, S-CH₂ NhCys(Pal)), 2.36 (m, 2H, S-CH₂ NhCys(Far)), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-MIC), 2.03 (m, 11H, CH₂-Far, CH-NLeu, C_γH₂-Pro), 2.12 (s, 3H, CH₃-NMet), 1.77 (m, 2H, C_βH₂-Pro), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far), 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.45 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.25 (m, 26H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 0.80 (m, 9H, CH₃-NLeu, CH₃-Pal). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: *t_R* = 7.96 min (C-4 doppelt lipidiert); *m/z* berechnet für C₇₀H₁₁₇O₁₂N₈S₃: 1357.79476 [M+H]⁺, gefunden: 1357.30 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₇₀H₁₁₇O₁₂N₈S₃: 1357.79476 [M+H]⁺, gefunden: 1357.79953 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -5.9 (CHCl₃, *c* = 0.22).

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-NhCys(Far)-OH (51)



Die Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes (Beladung: 0.7 mmol/g) mit **16** erfolgte nach AAV 2 und mittels AAV 3 wurde eine Beladung von 0.7 mmol/g (quantitativ) bestimmt. Gemäß AAV 4 erfolgte der Aufbau der Sequenz bis zum Einbau des palmitoylierten Cysteins **15** im 0.25 mmolaren Maßstab, wobei Fmoc-Pro-OH doppelt gekuppelt wurde. In einem Spritzenreaktor wurde Fmoc-Gly-OH und Maleimidocaprinsäure nach AAV 11 manuell gekuppelt. Durch Abspaltung gemäß AAV 7 und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 9:1) wurde das gewünschte Peptid **51** in 47 %iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 156 mg (0.12 mmol, 47 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (m, 4H, NH-Cys(Pal), NH-Met, NH-Gly), 7.91 (m, 1H, NH-Leu), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.18 (dd, *J* = 17.0, 8.1 Hz, 1H, CH-Far), 5.06 (m, 2H, CH-Far), 4.71 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.58 (m, 1H, C_αH-Leu), 4.43 (m, 1H, C_αH-Cys(Pal)), 4.31 (m, 1H, C_αH-Met), 3.91 (m, 3H, C_αH₂-Gly),

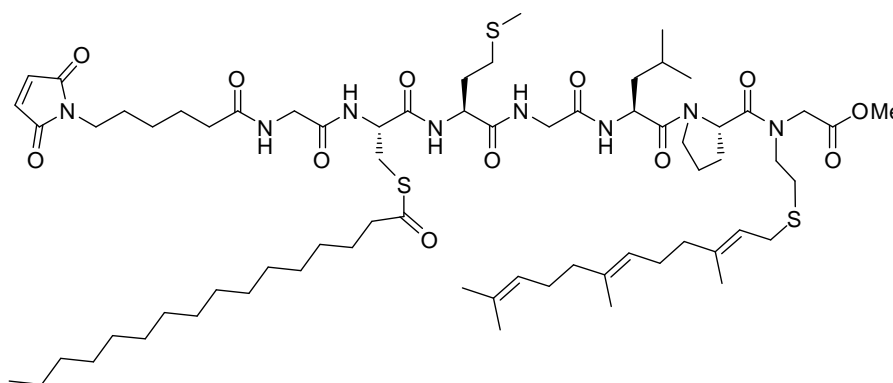
3.67 (m, 5H, C_αH₂-Gly, C₆H₂-Pro, C_αH₂-NHCys(Far)), 3.40 (m, 3H, CH₂-MIC, C_βH₂-Cys(Pal)), 3.21 (m, 1H, CH₂-S Far), 3.13 (m, 1H, CH₂-S Far), 3.13 und 3.01 (2 m, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 2.72 (m, 2H, C_γH₂-Met), 2.56 (m, 4H, CH₂-NHCys(Far), (C=O)CH₂-Pal), 2.18 (m, 1H, C_βH₂-Pro), 2.00 (m, 19H, C_βH₂-Met, C_γH₂-Pro, CH₂-Far, C_βH₂-Leu, CH₃-Met, CH₂-MIC), 1.67 (m, 1H, C_βH₂-Pro), 1.61 (s, 6H, CH₃-Far), 1.54 (s, 6H, CH₃-Far), 1.45 (m, 7H, C_γH-Leu, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.22 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.84 (m, 9H, CH₃-Leu, CH₃-Pal). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: t_R = 11.61 min; m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺, gefunden 1328.95 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺; gefunden: 1329.76652 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -4.3 (CHCl₃, c = 0.8).

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-NhCys(Far)-OMe (52)



Zu einer Lösung von **51** (25 mg, 18.8 μmol) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) wurde bei 0 °C TMSCHN₂ (0.9 Äq.) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) über 30 min langsam zugetropft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/ Methanol, 96:4) aufgereinigt. Der Methylester **52** wurde in 21 % iger Ausbeute (4.8 mg, 3.57 μmol) als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 4.8 mg (3.57 μmol, 21 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.13 (m, 2H, NH-Gly, NH-Met), 8.06 (dd, *J* = 18.8, 9.4 Hz, 1H, NH-Cys(Pal)), 7.90 (m, 2H, NH-Gly, NH-Leu), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.32 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, CH-Far), 5.19 (m, 1H, CH-Far), 5.06 (m, 1H, CH-Far), 4.71 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.57 (m, 1H, C_αH-Leu), 4.41 (m, 1H, C_αH-Cys(Pal)), 4.31 (m, 1H, C_αH-Met), 4.23 und 3.92 (2 m, 2H, C_αH₂-NHCys(Far)), 3.83 und 3.51 (2 m, 2H, N-CH₂ NHCys(Far)), 3.71 (m, 5H, C₆H₂-Pro, C_αH₂-Gly), 3.61 (m, 3H, CO₂Me), 3.51 (m, 1H, C₆H₂-Pro), 3.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.26 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 3.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.14 (m, 1H,

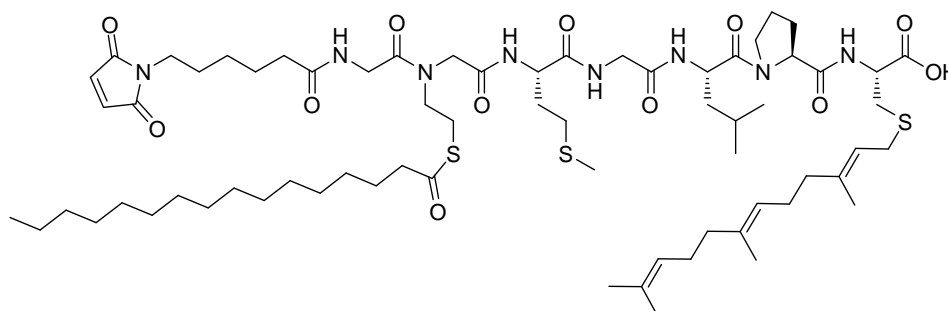
CH₂-S Far), 3.03 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 2.62 und 2.55 (2 m, 2H, S-CH₂ NhCys(Far)), 2.55 (m, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.44 (m, 2H, C_γH₂-Met), 2.27 (m, 1H, C_βH₂-Pro), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-MIC), 2.10 (m, 13H, CH₃-Met, CH₂-Far, C_γH₂-Pro), 1.77 (m, 4H, C_βH₂-Pro, C_βH₂-Met, C_γH-Leu), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far), 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.54 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.39 (m, 2H, C_βH₂-Leu), 1.20 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.83 (m, 9H, CH₃-Leu, CH₃-Pal). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: *t_R* = 8.41 min (C4-doppelt lipidiert); *m/z* berechnet für C₆₉H₁₁₅N₈O₁₂S₃: 1343.77911 [M+H]⁺, gefunden 1343.34 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₆₉H₁₁₅N₈O₁₂S₃: 1343.77911 [M+H]⁺; gefunden: 1343.78106 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -14.0 (CHCl₃, *c* = 0.32).

Synthese von MIC-Gly-NhCys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OH (53)



Die Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes (Beladung: 0.7 mmol/g) mit **2** erfolgte nach AAV 1 und nach AAV 3 wurde eine Beladung von 0.5 mmol/g (71 %) bestimmt. Gemäß AAV 4 erfolgte der Aufbau der Sequenz bis zum Einbau des palmitoylierten Homocystein-Peptoidbausteins **18** im 0.25 mmolaren Maßstab, wobei Fmoc-Pro-OH doppelt gekuppelt wurde. In einem Spritzenreaktor wurde Fmoc-Gly-OH und Maleimidocaprinsäure nach AAV 11 manuell gekuppelt. Nach Abspaltung gemäß AAV 7 und säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 9:1) wurde das gewünschte Peptid **54** in 96 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 315 mg (0.24 mmol, 96 %);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.43 und 8.35 (2 d, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 7.8 Hz, 1H, NH-Met), 8.22 (m, 1H, NH-Gly), 8.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 7.91 und 7.84 (2 t, *J* = 5.1 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH-Gly), 7.89 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH-Leu), 6.98 (s, 2H, CH₂-MIC), 5.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH-Far), 5.05 (m, 2H, CH-Far), 4.57 (m, 1H, C_αH-Leu), 4.35 (m, 3H, C_αH-Cys(Far), C_αH-Pro, C_αH-Met), 4.10 und 4.03 (2 m, 2H, C_αH₂-NhCys(Pal)), 4.03 (m, 2H, C_αH₂-Gly), 3.82 (m, 1H, C_αH₂-Gly), 3.70 (m, 2H, C_βH₂-Pro, C_αH₂-Gly),

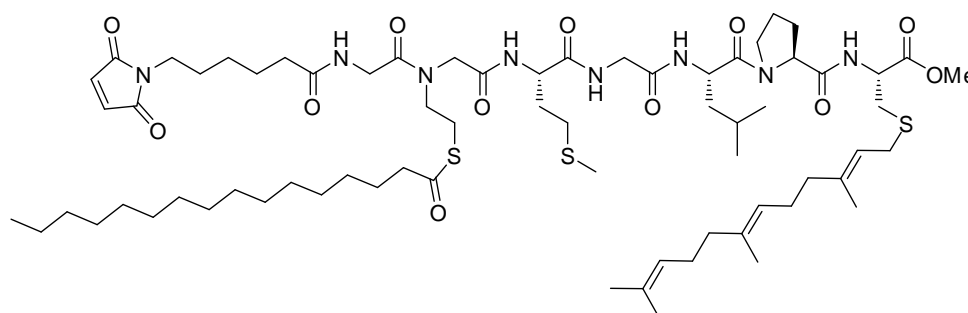
3.52 (m, 1H, C₆H₂-Pro), 3.35 (m, 4H, CH₂-MIC, N-CH₂ NhCys(Pal)), 3.17 (m, 2H, S-CH₂ Far), 3.04 und 2.94 (2 dd, $J_1 = 14.1, 7.2$ Hz, $J_2 = 15.5, 8.3$ Hz, 2H, S-CH₂ NhCys(Pal)), 2.81 (dd, $J = 13.7, 5.2$ Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.68 (dd, $J = 13.7, 7.6$ Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.44 (m, 2H, C_γH₂-Met), 2.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.12 (m, 2H, CH₂-MIC), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 2.01 (m, 14H, CH₂-Far, C_βH₂-Pro, C_γH₂-Pro, C_βH₂-Met), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far), 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.46 (m, 9H, CH₂-Pal, CH₂-MIC, C_γH-Leu, C_βH₂-Leu), 1.24 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.86 (m, 9H, CH₃-Pal, CH₃-Leu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 11.81$ min; m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺, gefunden 1328.94 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺; gefunden: 1329.76812 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20} = -24.0$ (CHCl₃, $c = 1.02$).

Synthese von MIC-Gly-NhCys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (**54**)



Zu einer Lösung von **53** (11.85 mg, 8.91 μmol) in Dichlormethan (0.2 mL) und Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) wurde bei 0 °C TMSCHN₂ (1 Äq.) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) über 30 min langsam zugetropft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt. Das Peptid **54** wurde in 66 % (7.19 mg, 5.35 μmol) Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 7.19 mg (5.35 μmol, 66 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.36 und 8.29 (d, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H, NH-Met), 8.21 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.09 (m, 1H, NH-Gly), 7.99 (dd, $J = 19.3, 8.1$ Hz, 1H, NH-Leu), 7.89 (m, 1H, NH-Gly), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (dd, $J = 14.9, 7.7$ Hz, 2H, CH-Far), 4.58 (m, 1H, C_αH-Leu), 4.34 (m, 3H, C_αH-Cys(Far), C_αH-Pro, C_αH-Met), 4.07 und 3.93 (2 m, 2H, CH₂ NhCys(Pal)), 3.81 (dd, $J = 10.3, 5.5$ Hz, 2H, C_αH₂-Gly), 3.71 (m, 3H, C_δH₂-Pro, C_αH₂-Gly), 3.62 (s, 3H, CO₂Me), 3.51 (m, 1H, C_δH₂-Pro), 3.42 (m, 2H, CH₂-N NhCys(Pal)), 3.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.16 (m, 2H, CH₂-S, Far), 3.04 und 2.95 (2 m, 2H, CH₂-S NhCys(Pal)), 2.78 (dd, $J = 13.9, 5.7$ Hz, 1H, C_βH₂-

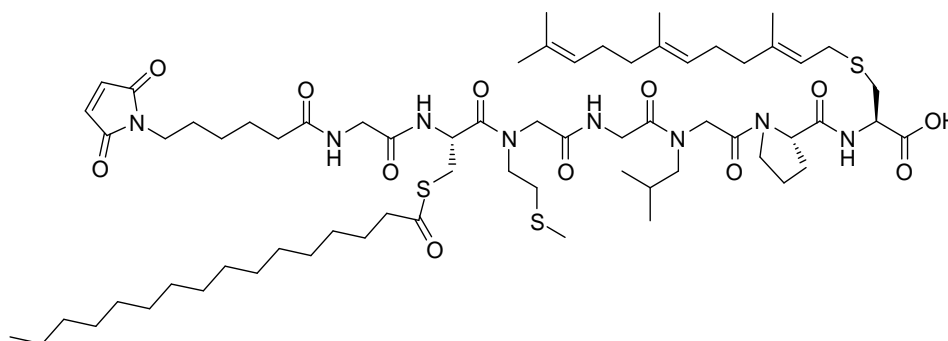
Cys(Far)), 2.69 (dd, $J = 13.8, 7.9$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(Far)), 2.58 (m, 4H, $C_{\gamma}H_2$ -Met, (C=O)CH₂-Pal), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 1.94 (m, 16H, CH₂-MIC, CH₂-Far, $C_{\beta}H_2$ -Pro, $C_{\gamma}H_2$ -Pro, $C_{\beta}H_2$ -Met), 1.60 (s, 3H, CH₃-Far), 1.59 (s, 3H, CH₃-Far), 1.53 (s, 3H, CH₃-Far), 1.52 (s, 3H, CH₃-Far), 1.57 (m, 3H, $C_{\gamma}H$ -Leu, $C_{\beta}H_2$ -Leu), 1.42 (m, 6H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 1.24 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.84 (m, 9H, CH₃-Pal, CH₃-Leu). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 8.48$ min (C4-doppelt lipidiert); m/z berechnet für $C_{69}H_{115}N_8O_{12}S_3$: 1343.77911 [M+H]⁺, gefunden 1343.20 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{69}H_{115}N_8O_{12}S_3$: 1343.77911 [M+H]⁺; gefunden: 1343.78297 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20} = -18.1$ (CHCl₃, $c = 0.47$).

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-Cys(Far)-OH (55)



Die Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes (Beladung: 0.7 mmol/g) mit **2** erfolgte nach AAV 1 und gemäß AAV 3 wurde eine Beladung von 0.48 mmol/g (71 %) bestimmt. Gemäß AAV 4 erfolgte der Aufbau der Sequenz bis zum Einbau des palmitoylierten Cysteins **15** im 0.25 mmolaren Maßstab, wobei Fmoc-Pro-OH und Fmoc-Cys(Pal)-OH doppelt gekuppelt wurden. In einem Spritzenreaktor wurde Fmoc-Gly-OH und Maleimidocaprinsäure nach AAV 11 manuell gekuppelt. Durch Abspaltung gemäß AAV 7 und säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 9:1) des Rohproduktes wurde das gewünschte Peptid **55** in 25 % (83.4 mg, 0.06 mmol) Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 83.4 mg (0.06 mmol, 25 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.46 und 8.19 (dd, m, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.19 (m, 1H, NH-Cys(Pal)), 8.19 und 7.93 (2 m, 1H, NH-Gly), 6.98 (s, 2H, CH-MIC), 5.14 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH-Far), 5.06 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH-Far), 4.87 und 4.76 (2 m, 1H, $C_{\alpha}H$ -Cys(Pal)), 4.51 (m, 1H, $C_{\alpha}H$ -Pro), 4.32 (m, 3H, $C_{\alpha}H$ -Cys(Far), $C_{\alpha}H_2$ -NMet/NLeu), 3.99 (m, 4H, $C_{\alpha}H_2$ -Gly, $C_{\alpha}H_2$ -NMet/NLeu), 3.74 (m, 1H, $C_{\alpha}H_2$ -Gly),

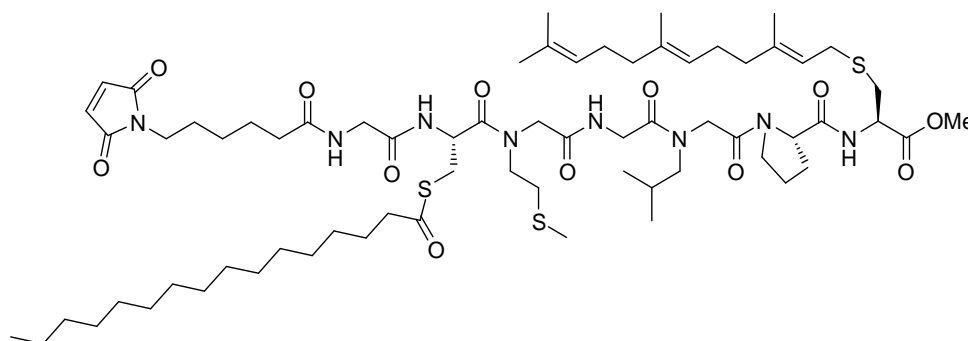
3.61 (m, 3H, C₆H₂-Pro, C_αH₂-Gly), 3.61 und 3.49 (m, 2H, CH₂-NMet), 3.37 (m, 2H, CH₂-MIC), 3.12 (m, 5H, C_βH₂-Cys(Pal), CH₂-S Far, CH₂-NLeu), 2.88 (m, 2H, C_βH₂-Cys(Pal), C_βH₂-Cys(Far)), 2.69 (m, 3H, C_βH₂-Cys(Far), CH₂-NMet), 2.54 (m, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.35 (m, 2H, C_βH₂-Pro), 1.94 (m, 16H, CH₃-NMet, CH₂-Far, CH₂-MIC, C_γH₂-Pro, CH-NLeu), 1.63 (s, 6H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.45 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.21 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.83 (m, 9H, CH₃-NLeu, CH₃-Pal). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: t_R = 11.90 min; m/z berechnet für C₆₇H₁₁₁N₈O₁₂S₃: 1315.74781 [M+H]⁺, gefunden 1314.96 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₆₇H₁₁₁N₈O₁₂S₃: 1315.74781 [M+H]⁺; gefunden: 1315.75139 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -34.9 (CHCl₃, c = 1.05).

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-NMet-Gly-NLeu-Pro-Cys(Far)-OMe (56)



Zu einer Lösung von **55** (28.1 mg, 21.36 μmol) in Dichlormethan (0.2 mL) und einem Toluol/Methanol-Gemisches (9:1) (0.5 mL) wurde bei 0 °C TMSCHN₂ (1.2 Äq.) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) über 30 min langsam zugetropft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 96.5:3.5) aufgereinigt. Verbindung **56** wurde in 32 % iger Ausbeute (9.05 mg, 6.81 μmol) erhalten und 52 % (5.19 mg, 4.61 μmol) des Eduktes wurden re-isoliert.

Ausbeute: 9.05 mg (6.81 μmol, 32 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60 und 8.20 (2 m, 1H, NH-Cys(Far)), 8.32 und 8.20 (2 m, 1H, NH-Cys(Pal)), 7.93 (m, 1H, NH-Gly), 7.84 (m, 1H, NH-Gly), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.15 (br, 1H, CH-Far), 5.07 (m, 2H, CH-Far), 4.84 und 4.74 (2 m, 1H, C_αH-Cys(Pal)), 4.49 (m, 1H, C_αH-Pro), 4.49 und 4.38 (2 m, 1H, C_αH-Cys(Far)), 4.11 (m, 2H, C_αH₂-NLeu/NMet), 3.91 (m, 4H, C_αH₂-Gly), 3.70 (m, 2H, C_αH₂-NLeu/NMet), 3.62 (m, 3H, CO₂Me), 3.62 und 3.47 (2 m, 2H, CH₂-NMet), 3.47 (m, 2H, C₆H₂-Pro), 3.37 (t, J = 7.1 Hz,

2H, CH₂-MIC), 3.18 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.12 (m, 3H, CH₂-S Far, CH₂-NLeu), 3.01 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 2.90 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 2.80 (m, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.69 (m, 3H, C_βH₂-Cys(Far), CH₂-NMet), 2.55 (m, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.23 (m, 2H, C_βH₂-Pro), 2.05 (m, 14H, CH₂-MIC, CH₃-NMet, CH₂-Far, C_γH₂-Pro), 1.85 (m, 2H, CH-NLeu, C_γH₂-Pro), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far), 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.57 (s, 3H, CH₃-Far), 1.56 (s, 3H, CH₃-Far), 1.50 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.22 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.83 (m, 9H, CH₃-NLeu, CH₃-Pal). Das Spektrum zeigt Signale für mehrere Rotamere.

HPLC-MS: $t_R = 8.37$ min (C4-doppelt lipidiert); m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺, gefunden 1329.13 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₆₈H₁₁₃N₈O₁₂S₃: 1329.76346 [M+H]⁺; gefunden: 1329.76564 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20} = -38.4$ (CHCl₃, $c = 0.79$).

5.8 Versuche zu Kapitel 3.3

Markierung des N-Ras (Δ1-181) Wildtyps mit Cy3-NHS Ester

Für die Reaktion mit dem Farbstoff wird das in Bakterien exprimierte, verkürzte N-Ras-Protein (Δ1-181) in 100 mM NaHCO₃ Puffer (pH 8.5) überführt und mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford werden das Protein (10 mg) in 100 mM NaHCO₃ Puffer (pH 8.5) und der Cy3-NHS Ester (GE Healthcare) (1 mg), unter Ausschluss von Licht und unter Argonatmosphäre bei 4 °C langsam gedreht. Nach 2 h wird das Protein über Größenausschlusschromatographie vom freien Farbstoff getrennt und in den Ligationspuffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) mit Microcons (0.5 mL, MWCO 10 kDa) umgepuffert. Sowohl die Protein- als auch die Farbstoffkonzentration wird durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bzw. 552 nm ($\epsilon = 150000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

Ligation der N-terminalen, farnesylierten Peptide mit N-terminaler Maleimidgruppe an verkürztes N-Ras-Protein (Wildtyp und G12V-Mutante) (Δ1-181)

Eine Lösung des Lipopeptids (2 Äq.) in Methanol (300 µL) wird mit Triton X-114 (11 %) (1 mL) und dem Cy3-markierten N-Ras-Protein (wt) (Δ1-181) bzw. dem nicht-markierten N-Ras-Protein (G12V) (Δ1-181) (1 Äq.) versetzt. Unter Ausschluss von Licht und unter Argonatmosphäre wird die Lösung über Nacht bei 4 °C gedreht. Dem Ligationspuffer wird DTE (1 mM) hinzugefügt. Nach Zugabe von Puffer (12 mL) zu dem Reaktionsansatz (in 15 mL Gefäß) wird bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (Temp.: 30 °C, $v = 4000$ rpm, 5 min) wird die Tritonphase von der Pufferphase abgetrennt. Man wiederholt die Extraktion nach Zugabe von je 1 mL Triton zweimal. Die vereinigte

Tritonphase wird mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt, um das Lipoprotein vom Triton abzutrennen. Nach Aufkonzentration in Microcons (10 mL, MWCO 10 kDa) wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Zu der Lipoproteinlösung wird eine 230 mM DTE-Lösung (ca. 1/3 des Proteinvolumens) gegeben und das Gemisch wird über Nacht unter Ausschluss von Licht und unter Argonatmosphäre bei 4 °C langsam gedreht. Nach Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Lipoproteine werden mittels SDS-Page (15 % iges Gel) und MALDI-TOF charakterisiert, aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung zusammengefasst.

Tabelle 9: Übersicht über die MALDI-TOF Charakterisierung der farnesylierten Ligationsprodukte.

Eintrag	Protein	N-Ras $\Delta 1-181$	Ligationsprodukt			
		m/z_{gefunden} [M+H] ⁺	$m/z_{\text{berechnet}}$ [M+H] ⁺	m/z_{gefunden} [M+H] ⁺	$\Delta_{\text{berechnet}}$	Δ_{gefunden}
1	57	20308	21397	21404	1089	1096
2	7	20600	21703	21715	1103	1115
3	9	20308	21411	21408	1103	1100
4	11	20308	21397	21395	1089	1087
5	13	20391	21508	21512	1117	1121
6	58	20334	21397	21439	1089	1105
7	59	20308	21411	21408	1103	1100
8	60	20308	21411	21417	1103	1109
9	61	20308	21397	21400	1089	1092
10	62	20308	21425	21430	1117	1122

Ligation der N-terminalen, farnesylierten und palmitoylierten Peptide mit N-terminaler Maleimidgruppe an verkürztes N-Ras-Protein (Wildtyp) ($\Delta 1-181$)

Eine Lösung des doppelt lipidierten Peptids (2 Äq.) in Methanol (300 μL) wird mit Triton X-114 (11 %) (1 mL) und dem Cy3-markierten N-Ras-Protein (wt) ($\Delta 1-181$) (1 Äq.) versetzt. Unter Ausschluss von Licht und unter Argonatmosphäre wird die Lösung über Nacht bei 4 °C gedreht. Nach Zugabe von Puffer (12 mL) zu dem Reaktionsansatz (in 15 mL Gefäß) wird bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (Temp.: 30 °C, $v = 4000 \text{ rpm}$, 5 min) wird die Tritonphase von der Pufferphase abgetrennt. Man wiederholt die Extraktion nach Zugabe von je 1 mL Triton zweimal. Die vereinigte Tritonphase wird mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt, um das Lipoprotein vom Triton abzutrennen. Nach Aufkonzentration in Microcons (10 mL, MWCO 10 kDa) wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon = 13660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die

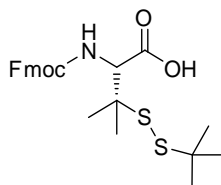
Lipoproteine werden mittels SDS-Page (15 % iges Gel) und MALDI-TOF charakterisiert, aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersicht über die MALDI-TOF Charakterisierung der doppelt lipidierten Ligationsprodukte.

Eintrag	Protein	N-Ras Δ 1-181		Ligationsprodukt		
		m/z_{gefunden} [M+H] ⁺	$m/z_{\text{berechnet}}$ [M+H] ⁺	m/z_{gefunden} [M+H] ⁺	$\Delta_{\text{berechnet}}$	Δ_{gefunden}
1	105	20283	21611	21620	1329	1337
2	8	20283	21625	21629	1343	1346
3	10	20374	21717	21723	1343	1349
4	12	20579	21908	21909	1329	1330
5	14	20365	21722	21736	1357	1371

5.9 Versuche zu Kapitel 3.4.1

Synthese von N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) (S-*tert*-butyldisulfanyl)-L-Penicillamin (65)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Pen(Trt)-OH (**66**) (435 mg, 0.71 mmol) in Gegenwart von 2-Methyl-2-propanthiol (0.8 mL, 7.13 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **65** (266 mg, 0.58 mmol, 81 %) erhalten.

Ausbeute: 266 mg (0.58 mmol, 81 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.90 (s, 1H, CO₂H), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.83 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 7.77 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.25 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, C_αH), 1.37 (s, 3H, C_β(CH₃)₂), 1.33 (s, 3H, C_β(CH₃)₂), 1.26 (s, 9H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.4 (C_q, CO₂H), 156.1 (C_q, C=O Fmoc), 143.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.7 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.5 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.4 (CH, C_{Ar}H-

Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 66.0 (CH₂, Fmoc CH₂), 61.3 (CH, C_αH), 50.5 (C_q, C_β(CH₃)₂), 46.6 (CH, Fmoc CH), 46.5 (C_q, C(CH₃)₃), 30.2 (CH₃, C(CH₃)₃), 25.9 (CH₃, C_β(CH₃)₂), 24.2 (CH₃, C_β(CH₃)₂);

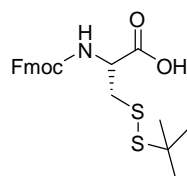
IR: $\tilde{\nu}$ = 2962, 2921, 2896, 2860, 1714;

HPLC-MS: t_R = 10.54 min; berechnet für C₂₄H₃₀NO₄S₂: 460.16108 [M+H]⁺, gefunden 459.67 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₂₄H₃₀NO₄S₂: 460.16108 [M+H]⁺; gefunden: 460.16073 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20}$ = + 0.3 (CHCl₃, c = 5).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) (*S*-*tert*-butyldisulfanyl)-L-Cystein (**68**)¹⁷⁵



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (510 mg, 0.87 mmol) in Gegenwart von 2-Methyl-2-propanthiol (0.49 mL, 4.13 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **68** (369 mg, 0.86 mmol, 98 %) erhalten.

Ausbeute: 369 mg (0.86 mmol, 98 %);

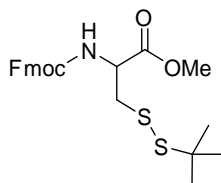
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.73 (d, J = 7.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.63 (m, 1H, NH), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.24 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, C_αH), 3.13 (dd, J = 13.1, 4.0 Hz, 1H, C_βH₂), 3.00 (dd, J = 13.0, 9.8 Hz, 1H, C_βH₂), 1.29 (s, 9H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4 (C_q, CO₂H), 155.9 (C_q, C=O Fmoc), 143.8 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.6 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 65.7 (CH₂, Fmoc), 53.7 (CH, C_αH), 47.7 (C_q, C(CH₃)₃), 46.6 (CH, Fmoc), 41.8 (CH₂, C_βH₂), 29.6 (CH₃, C(CH₃)₃);

HPLC-MS: t_R = 10.21 min; m/z berechnet für C₂₂H₂₆NO₄S₂: 432.13032 [M+H]⁺, gefunden 431.84 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20}$ = -7.4 (CHCl₃, c = 5).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) (*S*-*tert*-butyldisulfanyl) Cystein-methylester (69)

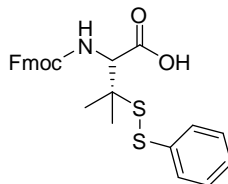


Verbindung **68** (44 mg, 0.1 mmol) wurde in Toluol/Methanol (9:1) (2 mL) gelöst und binnen 30 min wurde 1 Äq. TMSCHN₂ in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) langsam zugetropft. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.32 (tt, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 5.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.70 (dt, *J* = 8.6, 5.2 Hz, 1H, C_αH), 4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH-Fmoc), 3.80 (s, 3H, CO₂Me), 3.18 (m, 2H, C_βH₂), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 9H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.1 (C_q, CO₂Me), 155.7 (C_q, C=O Fmoc), 143.9 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 141.4 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.9 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 67.5 (CH₂, Fmoc), 53.8 (CH, C_αH), 52.8 (CH₃, CO₂Me), 48.4 (C_q, C(CH₃)₃), 47.3 (CH, Fmoc), 42.6 (CH₂, C_βH₂), 29.9 (CH₃, C(CH₃)₃).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S phenyldisulfanyl)-L-Penicillamin (71)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Pen(Trt)-OH (**66**) (500 mg, 0.82 mmol) in Gegenwart von Thiophenol (0.45 mL, 4.37 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **71** (330 mg, 0.70 mmol) in 85 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 330 mg (0.70 mmol, 85 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.90 (m, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$, NH), 7.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.33 (m, 4H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Ph}$), 7.22 (m, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Ph}$), 4.33 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, $\text{C}_{\alpha}\text{H}$), 4.24 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc- CH_2), 1.34 (s, 3H, $\text{C}_{\beta}(\text{CH}_3)_2$), 1.31 (s, 3H, $\text{C}_{\beta}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.1 (C_q , CO_2H), 157.0 (C_q , C=O Fmoc), 144.6 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 141.5 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 138.1 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 130.0 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Ph}$), 128.5 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Ph}$), 127.9 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Ph}$), 127.6 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 127.5 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 126.3 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 121.0 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 66.9 (CH_2 , Fmoc), 61.2 (CH, $\text{C}_{\alpha}\text{H}$), 54.5 (C_q , $\text{C}_{\beta}(\text{CH}_3)_2$), 47.4 (CH, Fmoc), 26.3 (CH_3 , $\text{C}_{\beta}(\text{CH}_3)_2$), 24.2 (CH_3 , $\text{C}_{\beta}(\text{CH}_3)_2$);

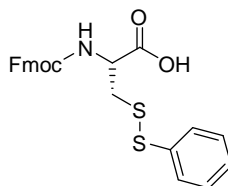
IR: $\tilde{\nu} = 3399, 3064, 2964, 2926, 2854, 1714$;

HPLC-MS: $t_{\text{R}} = 10.56$ min; m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{S}_2$: 480.12978 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 479.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{S}_2$: 480.12978 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 480.12937 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 4.3$ (CHCl_3 , $c = 5$).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S phenyldisulfanyl)-L-Cystein (**72**)¹⁴²



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (510 mg, 0.87 mmol) in Gegenwart von Thiophenol (0.45 mL, 4.37 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **72** (257 mg, 0.57 mmol, 65 %) erhalten.

Ausbeute: 257 mg (0.57 mmol, 65 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.06 (s, 1H, CO_2H), 7.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.54 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.35 (m, 7H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Phe}$), 4.28 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc- CH_2 , $\text{C}_{\alpha}\text{H}$), 3.14 (m, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$), 3.03 (m, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.0 (C_q , CO_2H), 155.9 (C_q , C=O Fmoc), 143.8 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 140.7 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 135.9 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 129.4 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 127.7 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 127.2 (CH, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$),

127.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 65.7 (CH₂, Fmoc), 52.9 (CH, C_αH), 46.6 (CH, Fmoc), 39.9 (CH₂, C_βH₂);

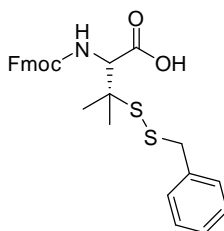
IR: $\tilde{\nu}$ = 3324, 3050, 3016, 2922, 2853, 1689;

HPLC-MS: t_R = 10.40 min; m/z berechnet für C₂₄H₂₂NO₄S₂: 452.09848 [M+H]⁺, gefunden 451.83 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₂₄H₂₂NO₄S₂: 452.09848 [M+H]⁺; gefunden: 452.09821 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20}$ = -0.8 (CHCl₃, c = 5).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S Benzylsulfanyl)-L-Penicillamin (**73**)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Pen(Trt)-OH (**66**) (500 mg, 0.82 mmol) in Gegenwart von Benzylmercaptan (1.5 mL, 13.46 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **73** (395 mg, 0.81 mmol) in 99 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 395 mg (0.81 mmol, 99 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (d, J = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.84 (br, 1H, NH), 7.77 (d, J = 7.1 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.28 (m, 7H, C_{Ar}H-Fmoc, C_{Ar}H-Bn), 4.23 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, C_αH), 3.96 (d, J = 2.6 Hz, 2H, CH₂-Bn), 1.42 (s, 3H, C_β(CH₃)₂), 1.36 (s, 3H, C_β(CH₃)₂);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.5 (C_q, CO₂H), 156.2 (C_q, C=O Fmoc), 143.8 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 137.4 (C_q, C_{Ar}-Bn), 129.2 (CH, C_{Ar}H-Bn), 128.5 (CH, C_{Ar}H-Bn), 127.7 (CH, Bn CH_{Ar}), 127.3 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.4 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 66.1 (CH₂, Fmoc), 60.4 (CH, C_αH), 52.1 (C_q, C_β(CH₃)₂), 46.6 (CH, Fmoc), 43.7 (CH₂, Bn), 25.8 (CH₃, C_β(CH₃)₂), 23.6 (CH₃, C_β(CH₃)₂);

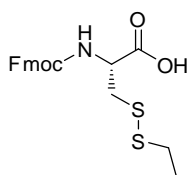
IR: $\tilde{\nu}$ = 3411, 3307, 3029, 2968, 2929, 1714;

HPLC-MS: $t_R = 10.53$ min; m/z berechnet für $C_{24}H_{30}NO_4S_2$: 494.14543 $[M+H]^+$, gefunden 493.84 $[M+H]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{24}H_{30}NO_4S_2$: 494.14543 $[M+H]^+$; gefunden: 494.14497 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = +3.9$ ($CHCl_3$, $c = 5$).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S ethyldisulfanyl)-L-Cystein (**74**)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (510 mg, 0.87 mmol) in Gegenwart von Ethylmercaptan (0.45 mL, 6.12 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **74** (325 mg, 0.80 mmol) in 92 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 325 mg (0.80 mmol, 92 %);

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 7.57 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, NH), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 4.23 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, $C_{\alpha}H$), 3.16 (dd, $J = 13.4, 3.9$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$), 2.94 (dd, $J = 13.3, 9.9$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$), 2.70 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂ S-Et), 1.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₃ S-Et);

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 172.6 (C_q , CO₂H), 155.9 (C_q , C=O Fmoc), 143.8 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 140.7 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 127.6 (CH, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 127.1 (CH, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 125.3 (CH, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 120.1 (CH, $C_{Ar}H$ -Fmoc), 65.6 (CH₂, Fmoc), 53.8 (CH, $C_{\alpha}H$), 46.6 (CH, Fmoc), 40.1 (CH₂, $C_{\beta}H_2$), 31.6 (CH₂, S-Et), 14.3 (CH₃, S-Et);

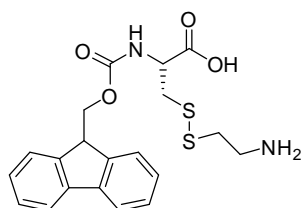
IR: $\tilde{\nu} = 3339, 3043, 3017, 2962, 2925, 2870, 1713, 1691$;

HPLC-MS: $t_R = 10.16$ min; m/z berechnet für $C_{20}H_{22}NO_4S_2$: 404.09848 $[M+H]^+$, gefunden 403.75 $[M+H]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{20}H_{22}NO_4S_2$: 404.09848 $[M+H]^+$; gefunden: 404.09832 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -25.2$ ($CHCl_3$, $c = 5$).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S (2-aminoethyl)disulfanyl)-L-Cystein (75)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (280 mg, 0.48 mmol) in Gegenwart von Cysteamin-Hydrochlorid **24** (463 mg, 4.08 mmol) durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Durch Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS und nach Lyophilisierung wurde Verbindung **75** (194 mg, 0.38 mmol, 80 %) erhalten.

Ausbeute: 194 mg (0.38 mmol, 80 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.01 (br, 2H, NH₂), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 4.28 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, C_αH), 3.13 (m, 3H, C_βH₂, CH₂-NH₂), 2.94 (m, 3H, C_βH₂, S-CH₂);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.1 (C_q, CO₂H), 156.1 (C_q, C=O Fmoc), 143.8 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.7 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 65.8 (CH₂, Fmoc), 53.0 (CH, C_αH), 46.6 (CH, Fmoc), 39.3 (CH₂, C_βH₂), 37.7 (CH₂, CH₂-NH₂), 33.9 (CH₂, S-CH₂);

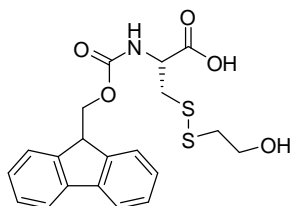
IR: $\tilde{\nu}$ = 3320, 3042, 2947, 1686, 1530;

HPLC-MS: *t*_R = 7.67 min; *m/z* berechnet für C₂₀H₂₃N₂O₄S₂: 419.10938 [M+H]⁺, gefunden 419.10 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₂₀H₂₃N₂O₄S₂: 419.10938 [M+H]⁺; gefunden: 419.10891 [M+H]⁺;

[α]_D²⁰ = -1.2 (MeOH, *c* = 2).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S (2-hydroxyethyl)disulfanyl)-L-Cystein (76)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (170 mg, 0.29 mmol) in Gegenwart von β -Mercaptoethanol (0.20 mL, 2.91 mmol) durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Durch Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde Verbindung **76** (92 mg, 0.22 mmol, 75 %) nach Lyophilisierung erhalten.

Ausbeute: 92 mg (0.22 mmol, 75 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 4.27 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc- CH_2 , $\text{C}_{\alpha}\text{H}$), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.14 (dd, $J = 13.7, 4.2$ Hz, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$), 2.94 (dd, $J = 13.5, 10.2$ Hz, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$), 2.81 (t, $J = 6.4, 2.4$ Hz, 2H, S- CH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.2 (C_{q} , CO_2H), 156.0 (C_{q} , C=O Fmoc), 143.7 (C_{q} , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 140.7 (C_{q} , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 127.6 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.0 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 125.2 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 120.1 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 65.7 (CH_2 , Fmoc), 59.5 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-OH}$), 53.0 (CH, $\text{C}_{\alpha}\text{H}$), 46.6 (CH, Fmoc), 40.9 (CH_2 , S- CH_2), 40.1 (CH_2 , $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$);

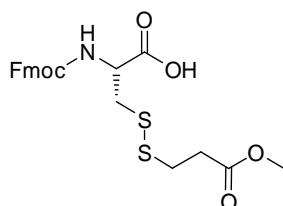
IR: $\tilde{\nu} = 3325, 3042, 2946, 1723, 1688$;

HPLC-MS: $t_{\text{R}} = 9.29$ min; m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{S}_2$: 420.09339 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 419.84 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{S}_2$: 420.09339 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 420.09318 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.2$ (MeOH, $c = 2$).

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(S (3-methoxypropyl)disulfanyl)-L-Cystein (77**)**



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (510 mg, 0.87 mmol) in Gegenwart von Methyl-3-mercaptopropionat (0.66 mL, 6.12 mmol) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 97:3) wurde Verbindung **77** (346 mg, 0.75 mmol) in 86 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 346 mg (0.75 mmol, 86 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.53 (br, 1H, NH), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 4.25 (m, 4H, Fmoc-CH, Fmoc- CH_2 , C_αH), 3.59 (s, 3H, CO_2Me), 3.18 (m, 1H, C_βH_2), 2.92 (m, 3H, C_βH_2 , S- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.68 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, S- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.5 (C_q , CO_2Me), 171.6 (C_q , CO_2H), 155.9 (C_q , C=O Fmoc), 143.8 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 140.7 (C_q , $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Fmoc}$), 127.6 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 127.1 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 125.3 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 120.1 (CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Fmoc}$), 65.7 (CH_2 , Fmoc), 53.9 (CH, C_αH), 51.5 (CH_3 , CO_2Me), 46.6 (CH, Fmoc), 40.7 (CH_2 , C_βH_2), 33.3 (CH_2 , S- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 32.6 (CH_2 , S- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$);

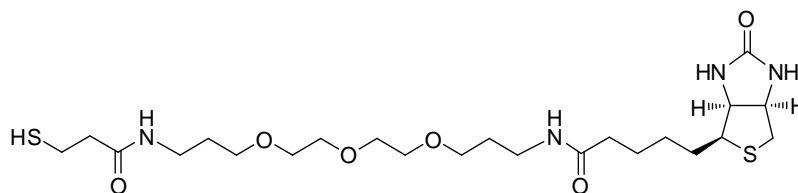
IR: $\tilde{\nu} = 3323, 2950, 2923, 2853, 1717$;

HPLC-MS: $t_{\text{R}} = 9.86$ min; m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{S}_2$: 462.10396 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 461.86 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{S}_2$: 462.10396 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 462.10362 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.3$ (CHCl_3 , $c = 5$).

Synthese von *N*-(17-Mercapto-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadecyl)-5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno [3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (78**).¹⁷⁶**



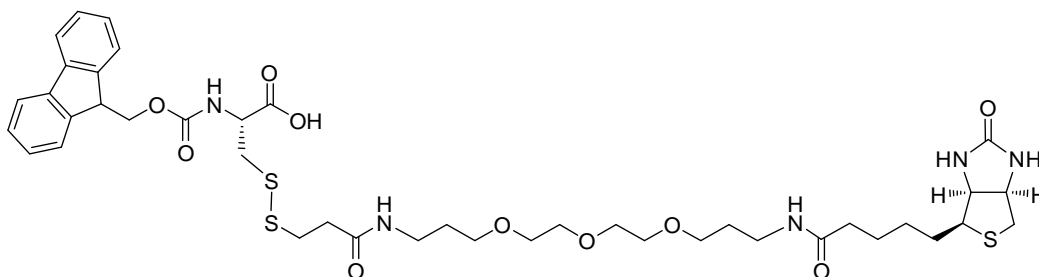
Eine Lösung von **80** (600 mg, 1.1 mmol) in Dichlormethan (10 mL) wurde mit Trifluoressigsäure (3 mL) versetzt und das Gemisch wurde 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Es wurde mit Toluol co-evaporiert. Zu dem entschützten Amin **81** wurde eine Lösung von *S*-Trityl-3-Mercaptopropionsäure (0.422 g, 1.21 mmol), EDC-Hydrochlorid (0.232 g, 1.21 mmol), HOBt (0.164 g, 1.21 mmol) und Triethylamin (0.32 mL, 2.42 mmol) in Dichlormethan (7 mL) hinzugegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand, gelöst in Ethylacetat, wurde mit 0.5 M HCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die erhaltene Verbindung **82** wurde mit einer Lösung von Dichlormethan (5 mL), Trifluoressigsäure (0.25 mL) und Triethylsilan (0.25 mL) versetzt und das Gemisch wurde 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Es wurde mehrfach mit Toluol co-evaporiert, das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol (97:3)) und Verbindung **78** wurde in 44 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 0.26 g (0.49 mmol, 44 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.90 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH(C=O)), 7.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH(C=O)), 6.15 (m, 3H, SH, NH-Biotin, NH-Biotin), 4.31 (dd, *J* = 7.7, 5.0 Hz, 1H, CH-Biotin), 4.13 (dd, *J* = 7.7, 4.4 Hz, 1H, CH-Biotin), 3.49 (m, 8H, CH₂-O PEG), 3.38 (m, *J* = 6.3, 2.6 Hz, 4H, CH₂-O PEG), 3.07 (m, 5H, S-CH Biotin, N-CH₂ PEG), 2.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, HS-CH₂), 2.82 (dd, *J* = 12.5, 5.1 Hz, 1H, S-CH₂ Biotin), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, S-CH₂ Biotin), 2.45 (t, *J* = 7.1 Hz, C(=O)CH₂), 2.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C(=O)CH₂ Biotin), 1.61 (m, 5H, CH₂-PEG, CH₂-Biotin), 1.46 (m, 3H, CH₂-Biotin), 1.28 (m, 2H, CH₂-Biotin);

HPLC-MS: *t*_R = 7.88 min; *m/z* berechnet für C₂₃H₄₃N₄O₆S₂: 534.25 [M+H]⁺, gefunden 534.49 [M+H]⁺.

Synthese von (L)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-8,24-dioxo-28-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-13,16,19-trioxa-4,5-dithia-9,23-diaza-octacosan-1-säure. (79)



Die Reaktion wurde unter den in AVV 12 beschriebenen Bedingungen mit Fmoc-Cys(Trt)-OH (**23**) (88 mg, 0.15 mmol) in Gegenwart des biotinylierten Thiols (**78**) (234 mg, 0.44 mmol) durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Durch Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde Verbindung **79** (56 mg, 0.07 mmol, 43 %) nach Lyophilisierung erhalten.

Ausbeute: 56 mg (0.07 mmol, 43 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 (m, 3H, NH(C=O), C_{Ar}H-Fmoc), 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH(C=O)), 7.73 (m, 3H, NH, C_{Ar}H-Fmoc), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 6.41 (br, 2H, NH-Biotin), 4.23 (m, 6H, Biotin-CH, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂, C_αH), 3.48 (m, 8H, CH₂-O PEG), 3.38 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, CH₂-O PEG), 3.10 (m, 5H, CH₂-O PEG, C_βH₂), 2.93 (m, 3H, CH₂-CH₂S-S, C_βH₂), 2.81 (dd, *J* = 12.4, 5.0 Hz, 1H, CH₂-Biotin), 2.57 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH₂-Biotin), 2.45 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₂S-S), 2.04 (t, *J* = 7.4 Hz, (C=O)CH₂-Biotin), 1.61 (m, 6H, CH₂-Biotin, CH₂-PEG), 1.47 (m, 2H, CH₂-Biotin), 1.29 (m, 2H, CH₂-Biotin);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2 (C_q, NH(C=O)), 171.9 (C_q, CO₂H), 169.8 (C_q, NH(C=O)), 162.7 (C_q, HN(C=O)NH), 156.0 (C_q, C=O Fmoc), 143.73 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.69 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.6 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.0 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.22 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.20 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 69.7 (CH₂, OCH₂-CH₂ (C5,6,8,9)), 69.5 (CH₂, CH₂-O PEG), 68.1 (CH₂, CH₂-O PEG), 68.0 (CH₂, CH₂-O PEG), 65.7 (CH₂, Fmoc), 61.0 (CH, Biotin-CH), 59.2 (CH, Biotin), 55.4 (CH, C_αH), 46.6 (CH, Fmoc), 39.5 (CH₂, C_βH₂), 38.9 (CH₂, Biotin), 35.8 (CH₂, CH₂-CH₂S-S), 35.7 (CH₂, CH₂-PEG), 35.2 (CH₂, CH₂-PEG), 35.0 (CH₂, (C=O)CH₂-Biotin), 33.8 (CH₂, CH₂S-S), 29.4 (CH₂, CH₂-PEG), 29.3 (CH₂, CH₂-PEG), 28.19 (CH₂, CH₂-Biotin), 28.0 (CH₂, CH₂-Biotin), 25.3 (CH₂, CH₂-Biotin);

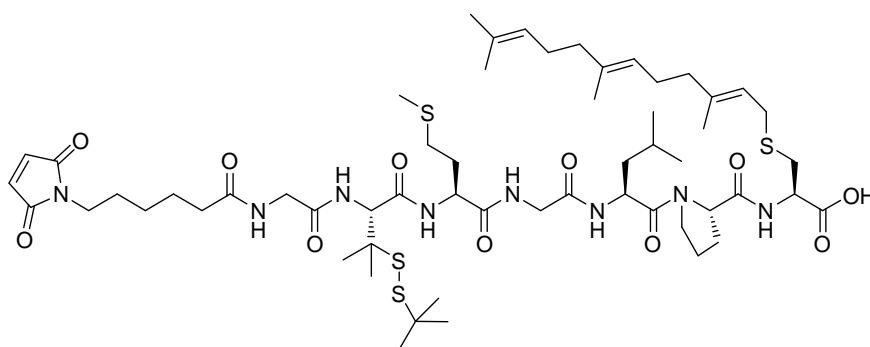
IR: $\tilde{\nu}$ = 3294, 2961, 2924, 2865, 1700, 1648, 1538, 1449;

HPLC-MS: *t*_R = 9.30 min; *m/z* berechnet für C₄₁H₅₈N₅O₁₀S₃: 876.33403 [M+H]⁺, gefunden 876.30 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{41}H_{58}N_5O_{10}S_3$: 876.33403 $[M+H]^+$; gefunden: 876.33439 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = +0.3$ (MeOH, c = 2).

Synthese von MIC-Gly-Pen(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OH (**83**)



Die Synthese wurde am 2-Chlortritylchloridharz (Beladung: 0.7 mmol/g) durchgeführt. Fmoc-Cys(Far)OH (**2**) wurde nach AAV 1 am polymeren Träger immobilisiert, nach AAV 3 wurde eine Beladung von 0.7 mmol/g (quantitativ) bestimmt. Die Sequenz wurde gemäß AAV 4 im 0.25 mmolaren Maßstab aufgebaut und unter den in AAV 7 angegebenen Bedingungen vom Harz abgespalten. Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS wurde Verbindung **83** in 37 % iger Ausbeute erhalten.

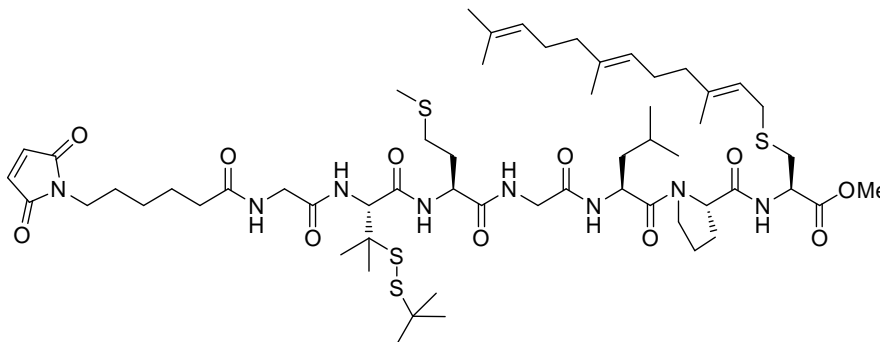
Ausbeute: 110 mg (0.09 mmol, 37 %);

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.75 (bs, 1H, CO₂H), 8.35 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH-Met), 8.06 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH-Gly), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH-Leu), 7.93 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH-Gly), 7.90 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH-Pen(StBu)), 7.00 (s, 2H, MIC), 5.16 (t, J = 7.3 Hz, 1H, CH Far), 5.07 (m, 2H, CH-Far), 4.57 (dd, J = 13.7, 8.9 Hz, 1H, C _{α} H-Leu), 4.46 (d, J = 8.9 Hz, 1H, C _{α} H-Pen(StBu)), 4.41 (m, 1H, C _{α} H-Pro), 4.33 (td, J = 7.7, 5.5 Hz, 1H, C _{α} H-Cys(Far)), 4.26 (dd, J = 12.9, 8.3 Hz, 1H, C _{α} H-Met), 3.72 (m, 5H, C _{α} H₂-Gly, C _{δ} H₂-Pro), 3.51 (s, 1H, C _{δ} H₂-Pro), 3.37 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.16 (m, 2H, S-CH₂ Far), 2.80 (dd, J = 13.7, 5.3 Hz, 1H, C _{β} H₂-Cys(Far)), 2.67 (dd, J = 13.7, 7.8 Hz, 1H, C _{β} H₂-Cys(Far)), 2.43 (m, 2H, C _{γ} H₂-Met), 2.10 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂-MIC), 1.98 (m, 14H, CH₂-Far, C _{β} H₂-Met, C _{γ} H₂-Pro, C _{β} H₂-Pro), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 1.62 (m, 7H, CH₃-Far, C _{γ} H-Leu), 1.56 (s, 6H, CH₃-Far), 1.47 (m, 6H, CH₂-MIC, C _{β} H₂-Leu), 1.33 (s, 3H, C _{β} CH₃-Pen(StBu)), 1.28 (s, 3H, C _{β} CH₃-Pen(StBu)), 1.24 (s, 9H, C(CH₃)₃-Pen(StBu)), 1.20 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂-MIC), 0.87 (dt, J = 15.9, 8.0 Hz, 6H, CH₃-Leu);

HPLC-MS: $t_R = 10.44$ min, m/z berechnet für $C_{57}H_{92}N_8O_{11}S_4$ 1192.58 $[M+H]^+$; gefunden: 1192.85 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -7.7$ ($CHCl_3$, $c = 0.82$).

Synthese von MIC-Gly-Pen(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (64)



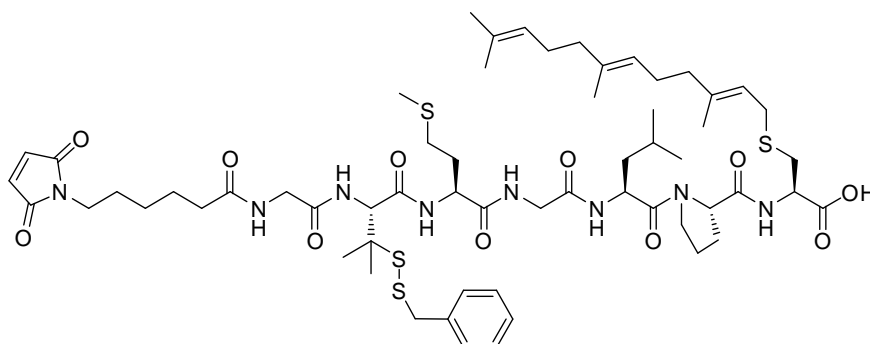
Zu Verbindung **83** (15 mg, 12.57 μ mol) wurden 0.9 Äq. Trimethylsilyldiazomethan in einem Toluol/ Methanol-Gemisch (9:1) (1 mL) langsam binnen 30 min hinzuge tropft. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt. Verbindung **64** wurde in 46 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 7 mg (5.8 μ mol, 46 %);

1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH-Met), 8.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.06 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH-Leu), 7.93 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH-Pen(StBu)), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (m, 2H, CH-Far), 4.57 (td, $J = 8.7, 5.3$ Hz, 1H, C_α H-Leu), 4.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, C_α H-Pen(StBu)), 4.39 (m, 2H, C_α H-Cys(Far), C_α H-Pro), 4.25 (td, $J = 8.3, 4.9$ Hz, 1H, C_α H-Met), 3.73 (m, 5H, C_α H₂-Gly, C_δ H₂-Pro), 3.62 (s, 3H, CO₂Me), 3.51 (m, 1H, C_δ H₂-Pro), 3.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.16 (m, 2H, S-CH₂ Far), 2.78 (dd, $J = 13.8, 5.7$ Hz, 1H, C_β H₂-Cys(Far)), 2.68 (dd, $J = 13.8, 8.0$ Hz, 1H, C_β H₂-Cys(Far)), 2.59 (m, 2H, C_γ H₂-Met), 2.09 (dd, $J = 14.7, 7.1$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 1.94 (m, 14H, CH₂-Far, C_β H₂-Met, C_γ H₂-Pro, C_β H₂-Pro), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 1.63 (m, 7H, CH₃-Far, C_γ H-Leu), 1.565 (s, 3H, CH₃-Far), 1.560 (s, 3H, CH₃-Far), 1.46 (m, 6H, CH₂-MIC, C_β H₂-Leu), 1.33 (s, 3H, C_β CH₃-Pen(StBu)), 1.28 (s, 3H, C_β CH₃-Pen(StBu)), 1.24 (s, 9H, C(CH₃)₃-Pen(StBu)), 1.19 (dd, $J = 15.3, 7.4$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 0.88 (dd, $J = 10.1, 6.6$ Hz, 6H, CH₃-Leu);

HPLC-MS: $t_R = 10.99$ min, m/z berechnet für $C_{58}H_{94}N_8O_{11}S_4$: 1206.59; gefunden: 1206.90;

Synthese von MIC-Gly-Pen(SBn)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OH (87)



Die Synthese wurde im 0.25 mmolaren Maßstab an 2-Chlortritylchloridharz (Beladung: 0.7 mmol/g) durchgeführt. Verbindung **2** wurde nach AAV 1 immobilisiert und die Beladung betrug nach AAV 3 0.7 mmol/g (quantitativ). Die Sequenz wurde gemäß AAV 4 aufgebaut und unter den in AAV 7 angegebenen Bedingungen vom polymeren Träger abgespalten. Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS und Lyophilisierung wurde **87** in 46 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 144 mg (0.12 mmol, 46 %);

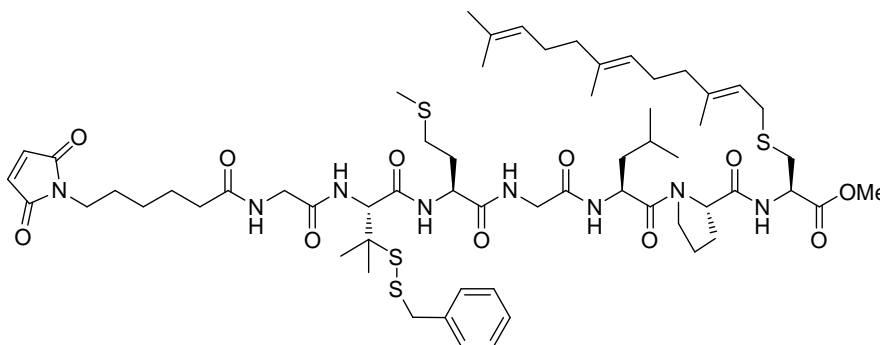
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.71 (bs, 1H, CO_2H), 8.42 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH-Met), 7.92 (m, 4H, NH-Leu, NH-Cys(Far), NH-Gly, NH-Pen(SBn)), 7.39 (m, 5H, $\text{C}_\alpha\text{H-Bn}$), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH-Far), 4.58 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Leu}$), 4.36 (m, 4H, $\text{C}_\alpha\text{H-Met}$, $\text{C}_\alpha\text{H-Pen(SBn)}$, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(Far)}$, $\text{C}_\alpha\text{H-Pro}$), 3.93 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.73 (m, 4H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.52 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Pro}$), 3.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 3.17 (m, 2H, S- CH_2 Far), 2.80 (dd, $J = 13.6, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.67 (dd, $J = 13.7, 7.7$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.44 (m, 2H, $\text{C}_\gamma\text{H}_2\text{-Met}$), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Met}$), 1.98 (m, 16H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$, $\text{CH}_2\text{-Far}$, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Met}$, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{C}_\gamma\text{H}_2\text{-Pro}$), 1.67 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Leu}$), 1.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.62 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.55 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.47 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$, $\text{C}_\gamma\text{H-Leu}$), 1.41 (s, 3H, $\text{C}_\beta\text{CH}_3\text{-Pen(SBn)}$), 1.31 (s, 3H, $\text{C}_\beta\text{CH}_3\text{-Pen(SBn)}$), 1.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{-Leu}$);

HPLC-MS: $t_R = 10.25$ min (C4), m/z berechnet für $\text{C}_{60}\text{H}_{91}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_4$: 1227.56846 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1227.18 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{60}\text{H}_{91}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_4$: 1227.56846 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1227.56897 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -25.0$ (CHCl_3 , $c = 4.59$).

Synthese von MIC-Gly-Pen(SBn)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (88)



Zu einer Lösung von **87** (20 mg, 16.3 μmol) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) wurden 0.9 Äq. Trimethylsilyldiazomethan in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) binnen 30 min bei Zimmertemperatur hinzuge tropft. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 97:3) aufgereinigt und Verbindung **88** wurde in einer 80 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 16.1 mg (13 μmol , 80 %);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 8.42 (m, 1H, NH-Met), 8.23 (m, 1H, NH-Cys(Far)), 8.04 (t, $J = 5.80$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.94 (m, 3H, NH-Gly, NH-Leu, NH-Pen(SBn)), 7.31 (m, 5H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H-Bn}$), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, $J = 7.78$ Hz, 1H, CH-Far), 5.05 (m, 2H, CH-Far), 4.59 (m, 2H, $\text{C}_{\alpha}\text{H-Pen(SBn)}$, $\text{C}_{\alpha}\text{H-Leu}$), 4.41 (m, 2H, $\text{C}_{\alpha}\text{H-Cys(Far)}$, $\text{C}_{\alpha}\text{H-Pro}$), 4.28 (m, 1H, $\text{C}_{\alpha}\text{H-Met}$), 3.93 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.76 (dd, $J = 11.7, 5.7$ Hz, 3H, $\text{C}_{\alpha}\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.65 (m, 2H, $\text{C}_{\delta}\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{C}_{\alpha}\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.62 (s, 3H, CO_2Me), 3.47 (m, 3H, $\text{C}_{\delta}\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 3.13 (m, 2H, S- CH_2 Far), 2.78 (dd, $J = 5.75, 13.67$ Hz, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.68 (dd, $J = 5.75, 13.67$ Hz, 1H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.39 (m, 2H, $\text{C}_{\gamma}\text{H}_2\text{-Met}$), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Met}$), 1.98 (m, 16H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2\text{-Met}$, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{C}_{\gamma}\text{H}_2\text{-Pro}$, $\text{CH}_2\text{-Far}$), 1.69 (m, 2H, $\text{C}_{\beta}\text{H}_2\text{-Leu}$), 1.630 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.625 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.56 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.47 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$, $\text{C}_{\gamma}\text{H-Leu}$), 1.41 (s, 3H, $\text{C}_{\beta}\text{CH}_3\text{-Pen(SBn)}$), 1.31 (s, 3H, $\text{C}_{\beta}\text{CH}_3\text{-Pen(SBn)}$), 1.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 0.85 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{-Leu}$);

HPLC-MS: $t_{\text{R}} = 11.30$; m/z berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{93}\text{O}_{11}\text{N}_8\text{S}_4$: 1241.58411 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 1241.21 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{93}\text{O}_{11}\text{N}_8\text{S}_4$: 1241.58411 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1241.58533 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24.4$ (CHCl_3 , $c = 0.2$).

Ligation von **88** an das Cy-3 markierte, verkürzte N-Ras-Wildtypprotein (Δ 1-181)

Die Ligation des lipidierten Peptids erfolgte in Analogie zu den in Kapitel 5.8 beschriebenen Ligationen. Die Disulfidschutzgruppe wurde durch Zugabe von 120 mM TCEP (bei pH 7.5) entfernt. Das zu entschützende Protein wurde dafür 6 h bei 4 °C unter Ausschluss von Licht und unter Argonatmosphäre vorsichtig gedreht und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Das Protein wurde nach Charakterisierung mittels SDS-Page und MALDI-TOF aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

Massenspektrometrische Charakterisierung von **63**:

m/z gefunden für N-Ras wt (Δ 1-181) $[M+H]^+$: 20308;

m/z berechnet (N-Ras wt + **88**) $[M+H]^+$: 21425;

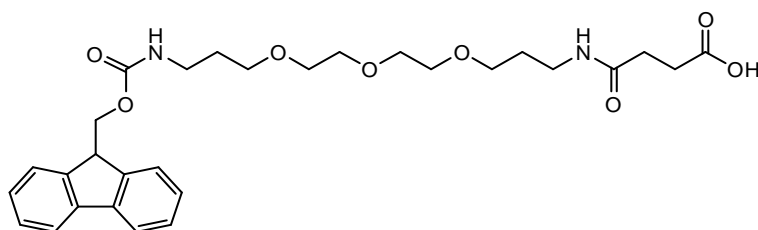
m/z gefunden (N-Ras wt + **88**) $[M+H]^+$: 21435;

Δ (**63** - N-Ras (Δ 1-181)) berechnet: 1117;

Δ (**63** - N-Ras (Δ 1-181)) gefunden: 1127.

5.10 Versuche zu Kapitel 3.4.2

Synthese von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-1-amino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaoc-tadecan-18-säure (**91**)



Verbindung **91** wurde entsprechend der Literaturangabe synthetisiert.¹⁶³ Eine Lösung von Succinsäureanhydrid (1 g, 10 mmol) in Acetonitril (50 mL) wurde langsam zu einer Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**92**) (2.19 mL, 10 mmol) in Acetonitril (100 mL) getropft. Das Gemisch wurde 3 h bei Zimmertemperatur gerührt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) (100 mL) wieder gelöst. Bei 0 °C wurde eine Lösung von Fmoc-OSu (4.38 g, 13 mmol) in Acetonitril (25 mL) hinzuge tropft und der pH-Wert wurde durch Zugabe von DIPEA auf pH 8 - 9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt, das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das

Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol/HCO₂H, 97:2:1) aufgereinigt, um Verbindung **91** in 60 % iger Ausbeute (3.26 g, 6 mmol) als gelbliches Öl zu erhalten.

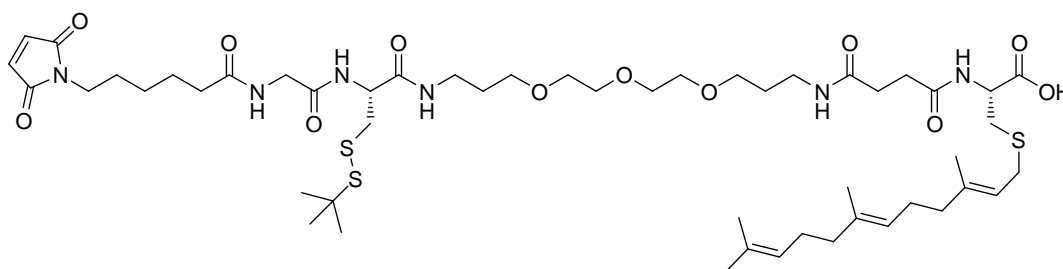
Ausbeute: 3.26 g (6 mmol, 60 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.79 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.24 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 4.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH-Fmoc), 3.48 (dd, *J* = 14.3, 3.2 Hz, 8H, O-CH₂ PEG), 3.38 (dd, *J* = 8.1, 4.2 Hz, 4H, O-CH₂ PEG), 3.06 (td, *J* = 13.2, 6.4 Hz, 4H, N-CH₂ PEG), 2.42 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CO₂H), 2.30 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-C(=O)), 1.71 – 1.52 (m, 4H, NH-CH₂CH₂);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.9 (C_q, CO₂H), 170.9 (C_q, C=O), 156.1 (C_q, C=O Fmoc), 143.9 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.7 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 127.6 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.0 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 125.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 69.8 (CH₂, O-CH₂ PEG), 69.54 (CH₂, O-CH₂ PEG), 69.51 (CH₂, O-CH₂ PEG), 68.1 (CH₂, O-CH₂ PEG), 67.9 (CH₂, O-CH₂ PEG), 65.2 (CH₂, Fmoc), 46.8 (CH, Fmoc), 37.6 (CH₂, N-CH₂ PEG), 35.8 (CH₂, N-CH₂ PEG), 30.1 (CH₂, CH₂-CO₂H), 29.6 (CH₂, CH₂-C(=O)), 29.4 (CH₂, NH-CH₂-CH₂);

HPLC-MS: t_R = 9.16 min (C4), m/z berechnet für C₂₉H₃₉N₂O₈: 543.27 [M+H]⁺; gefunden: 543.06 [M+H]⁺.

Synthese von MIC-Gly-Cys(*St*Bu)-NH-CH₂-(CH₂-CH₂-O)₃-(CH₂)₃-NH-C(=O)-(CH₂)₂-C(=O)-Cys(*Far*)-OH (**93**)



Die Synthese wurde an 2-Chlortritylchloridharz (Beladung 0.7 mmol/g) durchgeführt. Das Harz wurde nach AAV 1 mit Fmoc-Cys(*Far*)-OH (**2**) beladen, nach AAV 3 wurde eine Beladung von 0.7 mmol/g (quantitativ) bestimmt. Die Synthese erfolgte nach AAV 4 im 0.1 mmolaren Maßstab. Das Lipopeptid wurde, wie in AAV 7 beschrieben, vom Harz abgespalten. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC-MS aufgereinigt. Es wurde das gewünschte Peptid in 17 % iger Ausbeute (44.4 mg, 0.04 mmol) und die Abbruchsequenz **94** in 22 % iger Ausbeute (41.1 mg, 0.05 mmol) isoliert.

Ausbeute 44.4 mg (0.04 mmol, 17 %);

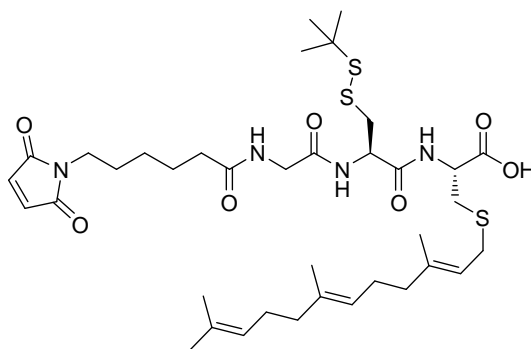
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.13 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.07 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.96 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH-PEG), 7.78 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, NH-PEG), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.15 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH-Far), 4.44 (td, $J = 8.2, 5.6$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(StBu)}$), 4.37 (td, $J = 8.3, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(Far)}$), 3.73 (dd, $J = 16.4, 5.7$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.65 (dd, $J = 16.4, 5.6$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.51 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O PEG}$), 3.46 (dd, $J = 5.0, 1.9$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-O PEG}$), 3.37 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$, $\text{CH}_2\text{-O PEG}$), 3.18 (dd, $J = 13.2, 8.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-S Far}$), 3.12 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-S Far}$, $\text{CH}_2\text{-NH PEG}$), 3.06 (m, 3H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$, $\text{CH}_2\text{-NH PEG}$), 2.92 (dd, $J = 13.0, 8.3$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$), 2.80 (dd, $J = 13.7, 5.1$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.62 (dd, $J = 13.7, 8.5$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(Far)}$), 2.37 (dd, $J = 8.4, 6.8$ Hz, 2H, $\text{C(=O)-CH}_2\text{ PEG}$), 2.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{C(=O)-CH}_2\text{ PEG}$), 2.11 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 2.02 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-Far}$), 1.92 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Far}$), 1.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.62 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.56 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.61 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-PEG}$), 1.48 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 1.28 (s, 9H, $\text{C(CH}_3)_3$), 1.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$);

HPLC-MS: $t_R = 10.75$ min; m/z berechnet für $\text{C}_{51}\text{H}_{85}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_3$: 1069.53821 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 1069.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{51}\text{H}_{85}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_3$: 1069.53821 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 1069.53974 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -17.1$ (CHCl_3 , $c = 1$).

MIC-Gly-Cys(StBu)-Cys(Far)-OH (94)



Ausbeute: 41.1 mg (0.05 mmol, 22 %);

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly), 6.99 (s, 2H, CH-MIC), 5.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (m, 2H, CH-Far), 4.59 (td, $J = 8.7, 4.5$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(StBu)}$), 4.33 (td, $J = 8.3, 5.2$ Hz, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H-Cys(Far)}$), 3.70 (m, 2H, $\text{C}_\alpha\text{H}_2\text{-Gly}$), 3.38 (dd, $J = 12.8, 5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 3.13 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-S, Far}$, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$), 2.93 (dd, $J = 13.0, 9.0$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$), 2.84 (dd, $J = 13.8, 5.1$ Hz, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{-Cys(StBu)}$),

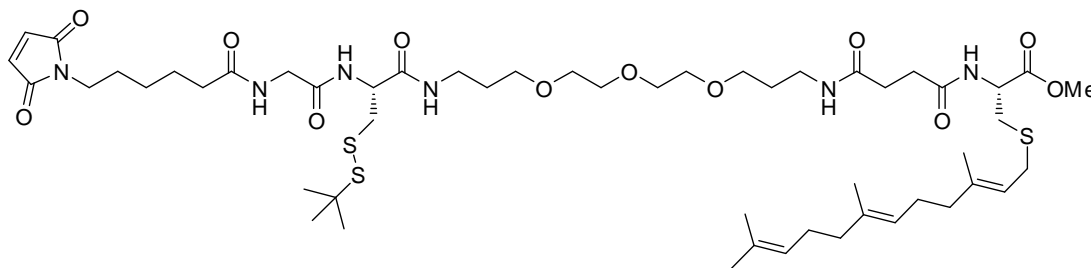
Cys(Far)), 2.69 (dd, $J = 13.8, 8.5$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(Far)), 2.01 (m, 10H, CH_2 -MIC, CH_2 -Far), 1.63 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.62 (s, 3H, CH_3 -Far), 1.54 (s, 6H, CH_3 -Far), 1.46 (m, 4H, CH_2 -MIC), 1.28 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.20 (td, $J = 15.1, 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -MIC);

HPLC-MS: $t_R = 10.86$ min; m/z berechnet für $C_{37}H_{59}N_4O_7S_3$: 767.35404 $[M+H]^+$, gefunden 766.98 $[M+H]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{37}H_{59}N_4O_7S_3$: 767.35404 $[M+H]^+$; gefunden: 767.35432 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -27.2$ ($CHCl_3$, $c = 1.5$).

Synthese von MIC-Gly-Cys(StBu)-NH-CH₂-(CH₂-CH₂-O)₃-(CH₂)₃-NH-C(=O)-(CH₂)₂-C(=O)-Cys(Far)-OMe (95)



Zu einer Lösung von **93** (10 mg, 8.42 μ mol) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei Zimmertemperatur 0.9 Äq. TMSCHN₂ (0.84 μ mol, 4.21 μ L, 2 M in Hexan) (0.5 mL) binnen 30 min langsam hinzugegossen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol, 96.5:3.5) aufgereinigt. Verbindung **95** wurde in 40 % iger Ausbeute (3.65 mg, 3.37 μ mol) erhalten.

Ausbeute: 3.65 mg (3.37 μ mol, 40 %);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH-Cys(StBu)), 8.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.95 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, NH-PEG), 7.77 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH-PEG), 7.00 (s, 2H, CH-MIC), 5.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH-Far), 5.07 (dd, $J = 12.5, 6.4$ Hz, 2H, CH-Far), 4.44 (m, 2H, $C_{\alpha}H$ -Cys(Far), $C_{\alpha}H$ -Cys(StBu)), 3.72 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, $C_{\alpha}H_2$ -Gly), 3.66 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, $C_{\alpha}H_2$ -Gly), 3.63 (s, 3H, CO₂Me), 3.51 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, CH₂-O PEG), 3.45 (m, 4H, CH₂-O PEG), 3.37 (m, 6H, CH₂-O PEG, CH₂-MIC), 3.12 (m, 7H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(StBu), CH₂-S Far, CH₂-NH PEG), 2.92 (dd, $J = 13.0, 8.3$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(StBu)), 2.78 (dd, $J = 13.8, 5.6$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(Far)), 2.64 (dt, $J = 9.7, 8.4$ Hz, 1H, $C_{\beta}H_2$ -Cys(Far)), 2.36 (dd, $J = 9.6, 4.6$ Hz, 2H, C(=O)CH₂-PEG), 2.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, C(=O)CH₂-PEG), 2.10 (dd, $J = 13.3, 5.8$ Hz, 2H, CH₂-MIC), 1.98 (m, 8H, CH₂-Far), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far) 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.61

(m, 4H, CH₂-PEG), 1.56 (s, 6H, CH₃-Far), 1.48 (td, $J = 14.9, 7.5$ Hz, 4H, CH₂-MIC), 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.16 (m, 2H, CH₂-MIC);

HPLC-MS: $t_R = 6.05$ min (C4-doppelt lipidiert); m/z berechnet für C₅₂H₈₇O₁₂N₆S₃: 1083.55386 [M+H]⁺, gefunden: 1083.20 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für C₅₂H₈₇O₁₂N₆S₃: 1083.55386 [M+H]⁺, gefunden: 1083.55434 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20} = -5.7$ (CHCl₃, $c = 0.37$).

Ligation von **95** an das Cy-3 markierte, verkürzte N-Ras Wildtypprotein ($\Delta 1-181$)

Die Ligation des Lipopeptids erfolgte in Analogie zu den in Kapitel 5.8 beschriebenen Ligationen. Die Entschützung der *tert*-Butylthiogruppe erfolgte ebenfalls durch Zugabe von DTE. Das Protein wurde nach Charakterisierung mittels SDS-Page und MALDI-TOF aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

Massenspektrometrische Charakterisierung von **89**:

m/z gefunden für N-Ras wt ($\Delta 1-181$) [M+H]⁺: 20407;

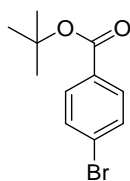
m/z berechnet (N-Ras wt + **95**) [M+H]⁺: 21400;

m/z gefunden (N-Ras wt + **95**) [M+H]⁺: 21393;

Δ (**89** - N-Ras ($\Delta 1-181$)) berechnet: 993;

Δ (**89** - N-Ras ($\Delta 1-181$)) gefunden: 986.

Synthese von Brombenzoesäure-*tert*-butylester (**101**)



Eine Lösung von 4-Brombenzoesäuremethylester (**100**) (1 g, 4.65 mmol) in 4 M Natronlauge (0.5 mL), Methanol (2.5 mL) und 1,4-Dioxan (7 mL) wurde 5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt, gelöst in Ethylacetat, wurde mit 10 % HCl-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Ethylacetat/Methanol/HCO₂H, 97:2:1) wurde die freie Säure in quantitativ erhalten.

Eine Lösung der Carbonsäure in trockenem DMF (5 mL) unter Argonatmosphäre wurde mit *N, N'*-Carbonyldiimidazol (0.8 g, 4.97 mmol) versetzt und das Gemisch wurde 1 h bei 40 °C gerührt.¹⁷⁷ Es wurde *tert*-Butanol (0.95 mL, 9.95 mmol) und DBU (0.742 mL, 4.97 mmol) hinzugefügt und das Gemisch wurde 3 Tage bei 40 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde Ethylacetat hinzugefügt und mit 10 % HCl-Lösung, Wasser und 20 % K₂CO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase über MgSO₄ filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **101** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat, 95:5) in 90 % iger Ausbeute (1.08 g, 4.2 mmol) erhalten.

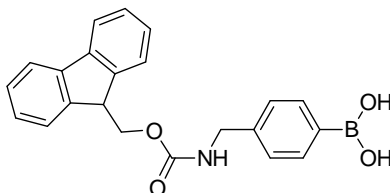
Ausbeute: 1.08 g (4.2 mmol, 90 %);

GC-MS: $t_R = 4.19$ min, 201 [-*t*Bu];

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C_{Ar}H), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C_{Ar}H), 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.1 (C_q, CO₂*t*Bu), 131.6 (CH, C_{Ar}H), 130.9 (CH, C_{Ar}H), 130.4 (C_q, C_{Ar}), 126.8 (C_q, C_{Ar}), 81.1 (C_q, C(CH₃)₃), 27.6 (CH₃, C(CH₃)₃).

Synthese von (4-*N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-aminomethylphenyl) boronsäure (**99**)



Eine Lösung von (4-Aminomethylphenyl)-Boronsäure-Hydrochlorid (**98**) (1.5 g, 8.0 mmol) in Methanol (150 mL) wurde bei 0 °C mit Triethylamin (2.64 mL, 19.03 mmol) und einer Lösung aus Fmoc-OSu (3.21 g, 9.51 mmol) in Acetonitril (45 mL) versetzt. Das Gemisch wurde 3 h bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/ Methanol, 99:1) aufgereinigt. Verbindung **99** wurde in 77 % iger Ausbeute als farbloser Schaum erhalten.

Ausbeute: 2.3 g (6.16 mmol, 77 %);

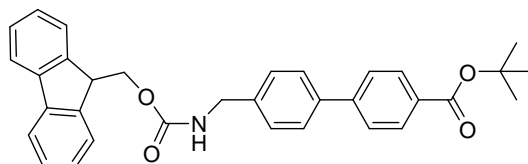
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.87 (s, 1H, NH), 7.78 (m, 4H, C_{Ar}H-Bn, C_{Ar}H-Fmoc), 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.28 (m, 6H, C_{Ar}H-Bn, C_{Ar}H-Fmoc), 4.35 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.15 (m, CH-Fmoc, NH-CH₂-Bn);

^{13}C -NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.5 (C_q , C=O Fmoc), 143.7 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 142.5 (C_q , C_{Ar} -Fmoc), 136.6 (C_q , C_{Ar} -Bn), 133.6 (CH, C_{Ar} -Bn), 127.7 (CH, C_{Ar} -Bn), 127.2 (CH, C_{Ar} H-Fmoc), 125.7 (CH, C_{Ar} H-Fmoc), 125.4 (CH, C_{Ar} H-Fmoc), 120.8 (CH, C_{Ar} H-Fmoc), 106.6 (C_q , C_{Ar} -Bn), 65.6 (CH_2 , Fmoc), 47.2 (CH, Fmoc), 44.4 (CH_2 , NH-Bn);

HPLC-MS: t_R = 8.42 min, m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{NB}$: 374.15582 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 373.74 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HR-MS: m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{NB}$: 374.15582 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 374.15609 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese von 4'-N-(Fluorenylmethyloxycarbonylamino)methyl)biphenyl-4-carboxylic acid *tert*-butyl ester (**102**)

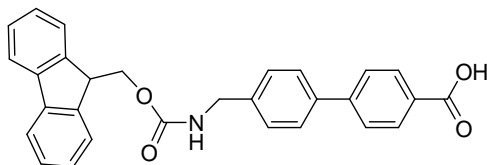


Zu einer Suspension von 4-(*N*-Fmoc-Aminomethylphenyl)-Boronsäure (**99**) (0.54 g, 1.44 mmol) und 4-Brombenzoesäure-*tert*-butylester (**101**) (0.45 g, 1.73 mmol) in Toluol/Ethanol (4:1) (3 mL) wurde unter Argonatmosphäre $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10 mg) und 2 M wässrige K_2CO_3 Lösung (450 μL) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde in einem Single-Mode Mikrowellengerät bestrahlt ($P=150$ W, $t=2$ min ramp, 15 min hold, $T_{\text{max}}=150$ °C). Es wurde Dichlormethan hinzugefügt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **102** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan) in 65 % iger Ausbeute (0.48 g, 0.94 mmol) erhalten.

Ausbeute: 0.48 g (0.94 mmol, 65 %);

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, C_{Ar} H-Fmoc), 7.75 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, C_{Ar} H-Fmoc), 7.58 (m, 6H, C_{Ar} H-Fmoc, C_{Ar} H-Biaryl), 7.34 (m, 6H, C_{Ar} H-Fmoc, C_{Ar} H-Biaryl), 5.08 (bs, 1H, NH), 4.47 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -Fmoc), 4.42 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, NH- CH_2 Bn), 4.22 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH-Fmoc), 1.60 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Synthese von 4'-N-(Fluorenylmethyloxycarbonylamino)methyl)biphenyl-4-carbonsäure (97)



Eine Lösung von *tert*-Butylester **102** (0.48 g, 0.94 mmol) in Dichlormethan (5 mL) wurde mit Trifluoressigsäure (5 mL) versetzt und das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (dünnschichtchromatographische Kontrolle) wurde das Lösungsmittel durch mehrfache Co-evaporation mit Toluol unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **97** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.43 g (0.94 mmol, quantitativ);

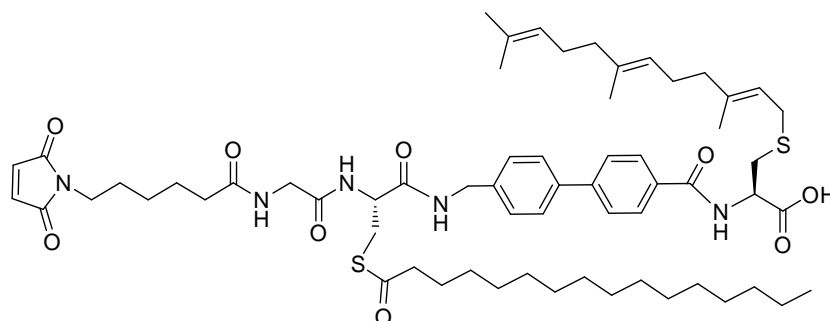
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.94 (s, 1H, CO₂H), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.90 (m, 3H, C_{Ar}H-Fmoc, NH), 7.79 (m, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.70 (t, *J* = 8.3 Hz, 4H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Fmoc), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, C_{Ar}H-Biaryl), 4.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-Fmoc), 4.25 (m, 3H, CH-Fmoc, NH-CH₂ Bn);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.1 (C_q, CO₂H), 152.7 (C_q, C=O Fmoc), 148.1 (C_q, C_{Ar}-Biaryl), 143.9 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 140.8 (C_q, C_{Ar}-Fmoc), 137.5 (C_q, C_{Ar}-Biaryl), 135.4 (C_q, C_{Ar}-Biaryl), 130.0 (C_q, C_{Ar}-Biaryl), 127.7 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 127.65 (CH, C_{Ar}H-Biaryl), 127.62 (CH, C_{Ar}H-Biaryl), 127.1 (CH, Fmoc), 126.9 (CH, C_{Ar}H-Biaryl), 126.7 (CH, C_{Ar}H-Biaryl), 125.2 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 120.1 (CH, C_{Ar}H-Fmoc), 65.9 (CH₂, Fmoc), 46.8 (CH, Fmoc), 43.4 (CH₂, NH-CH₂ Bn);

HPLC-MS: *t*_R = 9.07 min;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₂₉H₂₂NO₄: 448.15543 [M-H]⁻; gefunden: 448.15484 [M-H]⁻.

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-NH-CH₂-Phenyl-Phenyl-(C=O)-Cys(Far)-OH (103)



Die Beladung des 2-Chlortritylchloridharzes (Beladung 0.7 mmol/g) mit **2** erfolgte nach AAV 1 und gemäß AAV 3 wurde eine Beladung von 0.5 mmol/g (71 %) bestimmt. Gemäß AAV 4 erfolgte der Aufbau der Sequenz bis zum Einbau des palmitoylierten Cysteins **15**, das doppelt gekuppelt wurde, im 0.25 mmolaren Maßstab. In einem Spritzenreaktor wurde Fmoc-Gly-OH und Maleimidocaprinsäure nach AAV 11 manuell gekuppelt. Durch Abspaltung gemäß AAV 7 und säulenchromatographische Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol, 9:1) wurde das gewünschte Produkt **103** in 37 % iger Ausbeute erhalten.

Ausbeute: 104 mg (0.09 mmol, 37 %);

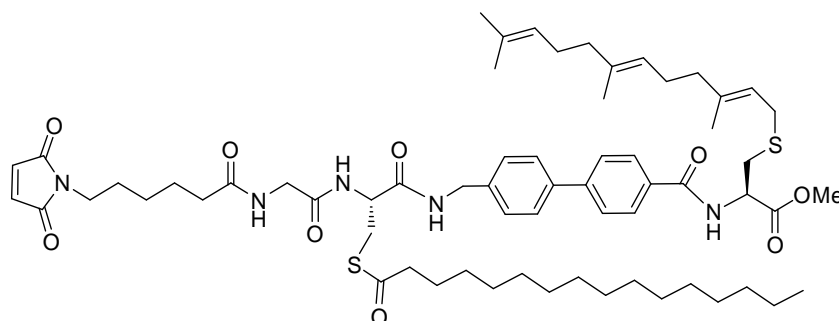
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.71 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.57 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH-Bn), 8.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH-Cys(Pal)), 8.07 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH-Gly), 7.97 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 6.98 (s, 2H, CH-MIC), 5.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH-Far), 5.06 (m, 2H, CH-Far), 4.60 (td, *J* = 9.6, 4.7 Hz, 1H, C_αH-Cys(Far)), 4.46 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H, C_αH-Cys(Pal)), 4.31 (m, 2H, CH₂-Bn), 3.75 (dd, *J* = 16.5, 5.7 Hz, 1H, C_αH₂-Gly), 3.66 (dd, *J* = 16.5, 5.7 Hz, 1H, C_αH₂-Gly), 3.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.31 (dd, *J* = 13.4, 5.6 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 3.24 (dd, *J* = 13.1, 8.3 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.15 (dd, *J* = 13.1, 7.3 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.09 (dd, *J* = 13.4, 8.1 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Pal)), 3.00 (dd, *J* = 13.8, 4.5 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.85 (dd, *J* = 13.7, 10.0 Hz, 1H, C_βH₂-Cys(Far)), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂-MIC), 1.96 (m, 8H, CH₂-Far), 1.63 (s, 3H, CH₃-Far), 1.62 (s, 3H, CH₃-Far), 1.55 (s, 6H, CH₃-Far), 1.44 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.21 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃-Pal);

HPLC-MS: *t*_R = 11.52 min; *m/z* berechnet für C₆₃H₉₂N₅O₉S₂: 1126.63310 [M+H]⁺, gefunden 1126.05 [M+H]⁺;

HR-MS: *m/z* berechnet für C₆₃H₉₂N₅O₉S₂: 1126.63310 [M+H]⁺; gefunden: 1126.63488 [M+H]⁺;

$[\alpha]_D^{20} = -38.8$ (CHCl₃, c = 0.5).

Synthese von MIC-Gly-Cys(Pal)-NH-CH₂-Phenyl-Phenyl-(C=O)-Cys(Far)-OMe (104)



Zu einer Lösung von **103** (10 mg, 8.8 μ mol) in Dichlormethan (0.1 mL) und Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) unter Argonatmosphäre wurden 1.2 Äq. TMSCHN₂ (9.05 μ mol, 4.53 μ L, 2M in Hexan) in Toluol/Methanol (9:1) (0.5 mL) langsam hinzuge tropft und das Gemisch wurde 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol, 97.5:2.5) aufgereinigt. Verbindung **104** wurde in 46 % iger Ausbeute (4.67 mg, 4.09 μ mol) erhalten, wobei 52 % (5.19 mg, 4.61 μ mol) des Eduktes re-isoliert wurden.

Ausbeute: 4.67 mg (4.09 μ mol, 46 %);

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH-Cys(Far)), 8.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH-Bn), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH-Cys(Pal)), 8.07 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH-Gly), 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 7.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, C_{Ar}H-Biaryl), 6.98 (s, 2H, CH-MIC), 5.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH-Far), 5.05 (m, 2H, CH-Far), 4.65 (ddd, *J* = 9.6, 7.9, 5.1 Hz, 1H, C α H-Cys(Far)), 4.46 (td, *J* = 8.1, 5.8 Hz, 1H, C α H-Cys(Pal)), 4.33 (ddd, *J* = 29.8, 15.5, 6.0 Hz, 2H, CH₂-Bn), 3.75 (dd, *J* = 16.5, 5.8 Hz, 1H, C α H₂-Gly), 3.66 (s, 3H, CO₂Me), 3.65 (m, 1H, C α H₂-Gly), 3.35 (dd, *J* = 12.9, 5.7 Hz, 2H, CH₂-MIC), 3.30 (m, 1H, C β H₂-Cys(Pal)), 3.24 (dd, *J* = 13.2, 8.2 Hz, 1H, CH₂-S Far), 3.15 (m, 1H, CH₂-S Far), 3.09 (dd, *J* = 13.4, 8.0 Hz, 1H, C β H₂-Cys(Pal)), 2.97 (dd, *J* = 13.8, 5.0 Hz, 1H, C β H₂-Cys(Far)), 2.87 (dd, *J* = 13.9, 9.7 Hz, 1H, C β H₂-Cys(Far)), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 2H, (C=O)CH₂-Pal), 2.10 (t, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 2H, CH₂-MIC), 1.97 (m, 8H, CH₂-Far) 1.64 (s, 3H, CH₃-Far), 1.625 (s, 3H, CH₃-Far), 1.620 (s, 3H, CH₃-Far), 1.54 (s, 3H, CH₃-Far), 1.45 (m, 6H, CH₂-MIC, CH₂-Pal), 1.21 (m, 26H, CH₂-Pal, CH₂-MIC), 0.85 (m, 3H, CH₃-Pal);

HPLC-MS: *t*_R = 8.30 min (C4-doppelt lipidiert); *m/z* berechnet für C₆₄H₉₄N₅O₉S₂: 1140.64875 [M+H]⁺; gefunden 1140.28 [M+H]⁺;

HR-MS: m/z berechnet für $C_{64}H_{94}N_5O_9S_2$: 1140.64875 $[M+H]^+$; gefunden: 1140.64875 $[M+H]^+$;

$[\alpha]_D^{20} = -23.3$ ($CHCl_3$, $c = 0.38$).

Ligation von **104** an das Cy-3 markierte, verkürzte N-Ras-Wildtypprotein ($\Delta 1-181$)

Die Ligation der lipidierten Sequenz erfolgte in Analogie zu den in Kapitel 5.8 beschriebenen Ligationen. Das Protein wurde nach Charakterisierung mittels SDS-Page und MALDI-TOF aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ schockgefroren.

Massenspektrometrische Charakterisierung von **90**:

m/z gefunden für N-Ras wt ($\Delta 1-181$) $[M+H]^+$: 20308;

m/z berechnet (N-Ras wt + **104**) $[M+H]^+$: 21448;

m/z gefunden (N-Ras wt + **104**) $[M+H]^+$: 21449;

Δ (**90** - N-Ras ($\Delta 1-181$)) berechnet: 1140;

Δ (**90** - N-Ras ($\Delta 1-181$)) gefunden: 1141.

5.11 ADIFAB Assay

Das ADIFAB Protein wurde von Molecular Probes bezogen und mit 1 mL Assaypuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) auf eine Konzentration von 13 μM verdünnt. Die Fluoreszenzspektren wurden an einem JASCO FP-6500 Fluorometer aufgenommen, wobei die Emission nach Anregung bei 386 nm zwischen 400 und 650 nm gemessen wurde. Es wurden Quarzküvetten (Weglänge 1 cm, Mindestvolumen 200 μL) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 400 μL nach Zugabe aller Reaktionspartner. Bei Zimmertemperatur wurde in 70 sec Intervallen jeweils über einen Zeitraum von 15 min ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

Messung der Depalmitoylierungsaktivität

Die Aktivitätsmessung wurde mit 200 nM ADIFAB, 2.5 μM **105** und 50 nM APT 1, bzw. APT 2 oder LYPLAL 1, in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Folgende Mengen wurden in die Küvette pipettiert.

- 1) Vorlage von 374.6 μL Buffer und Zugabe von 6.15 μL der ADIFAB Stammlösung (13 μM). Nach vorsichtigem Durchmischen wird diese Lösung gemessen und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten $\frac{F_{505}}{F_{432}}$ wird als R_0 -Wert verwendet.
- 2) Zugabe von 16.67 μL der N-Ras (**105**) Stammlösung (0.06 mM) und Aufnahme eines Kontrollspektrums.
- 3) Starten der Reaktion durch Zugabe von 2.6 μL der APT 1 (bzw. APT 2 oder LYPLAL 1) – Stammlösung (7.75 μM).
- 4) Messen in 70 sec Intervallen über einen Zeitraum von 15 min.

Über die von Kleinfeld *et al.* entwickelten Gleichung¹⁶⁷

$$n(\text{PalOH}) = K_D(\text{PalOH}) \cdot Q \cdot V \cdot \frac{R - R_0}{R_{\text{max}} - R}$$

mit $K_D(\text{PalOH}) = 0.32 \mu\text{M}$

$R =$ Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$

$R_0 =$ Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$, ungebundener Zustand

$R_{\text{max}} = 11.5$; Fluoreszenzintensitätsverhältnis $\frac{F_{505}}{F_{432}}$, maximal gebundener Zustand

$Q = 19.5$ Fluoreszenzintensität von $\frac{F_0}{F_{\text{max}}}$ bei 432 nm

$V = 400 \mu\text{L}$ Reaktionsvolumen

wurde die freigesetzte Menge Palmitinsäure berechnet.

Kinetikmessungen

Die semisynthetischen Proteine wurden in Endkonzentrationen von 0.5, 1, 2.5 und 5 μM in der Küvette gemessen, wobei die ADIFAB- (200 nM) und Enzymkonzentration (50 nM APT 1 bzw APT 2) konstant gehalten wurden. Die Messungen wurden in Analogie zu den Depalmitoylierungsaktivitätsuntersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Spektren wurden ebenfalls in 70 sec Intervallen über einen Zeitraum von 15 min aufgezeichnet und die Berechnung erfolgte wie zuvor über Kleinfelds Gleichung. Für das Fitten der kinetischen Parameter wurde XL Fit benutzt.

Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

ADIFAB-Stammlösung: 13 μM

APT 1 bzw. APT 2-Stammlösung: 7.75 μM

homogenisiert und aneinanderhaftende Zellen wurden getrennt. In der Regel wurden 2 mL in eine zuvor beschichtete Zellkulturflasche, die bereits Medium (12 mL) enthielt, gegeben. Durch erneutes Auf- und Abpipettieren wurde die Homogenisierung der Lösung und die Vereinzelung der Zellen erreicht.

5.12.3 Bestimmung der Zellzahl

Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Roth) wurde die Zellzahl der Zellsuspensionen bestimmt. Hierfür wurde das Deckglas durch Anhauchen befeuchtet und unter leichtem Druck auf die Stege der Zählkammer gelegt, sodass Newtonsche Ringe entstanden. Die homogenisierte Zellsuspension wurde mit einer 100 μ L Pipette in die von den Stegen gebildete Vertiefung pipettiert, bis aufgrund der Kapillarkräfte eine luftblasenfreie Befüllung des Raumes zwischen Zählkammer und Deckgläschen erfolgte. Unter dem Mikroskop wurden die sich in den äußeren 4 x 4 Quadranten befindenden Zellen gezählt. Diese Quadrate sind jeweils viermal auf einer Hälfte der Zählkammer eingraviert. Die so erhaltenen Werte wurden gemittelt und durch Multiplikation mit dem Faktor $1 \cdot 10^4$ wurde die Anzahl der Zellen pro mL bestimmt.

5.12.4 Kryokonservierung der PC12-Zellen

Auftauen der Zellen

Bevor die Zellen aufgetaut wurden, wurde eine Zellkulturflasche (75 cm²) 1 h mit Poly-L-Lysin (3 mL) behandelt, anschließend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und 30 min vor Auftauen der Zellen mit Medium (12 mL) unter sterilen Bedingungen befüllt. Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kryoröhrchen wurden auf Eis transportiert, in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und nach Desinfektion mit einer Pipette in die zuvor beschichtete Zellkulturflasche gegeben. Das Zellmedium wurde nach 12 h gewechselt.

Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in Zellkulturflaschen (75 cm²) angezogen. Nach Entfernung des Mediums und dreimaligem Waschen mit sterilem PBS Puffer (7 mL), wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA (2 mL) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (2 mL) bei 37 °C 2 - 5 min inkubiert, sodass sie sich von der Zellkulturflasche ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in Zellmedium (7.5 mL) aufgenommen und vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (800 rpm, 4 min). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in Zellmedium, das 10 % DMSO enthielt, aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL erreicht wurde. Je 200 μ L dieser

Lösung wurde in vorbereitete Kryoröhrchen überführt, die anschließend in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierhilfe (Nalgene) 24 h bei -80 °C gelagert wurden, um ein langsames Absinken der Temperatur von 1 °C/min zu gewährleisten. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.13 PC12 Differenzierungstest

5.13.1 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion der semisynthetischen Proteine in die PC12-Zellen wurde mithilfe des automatischen Injektionssystems AIS der Firma Zeiss durchgeführt. Der Injektionsdruck variierte in Abhängigkeit vom Durchmesser der Kapillare zwischen 70 und 150 hPa. Die Herstellung der Kapillaren erfolgte an einem Kapillarenziehgerät der Firma Narishige. Durch das inverse Mikroskop Axiovert 135TV der Firma Zeiss wurden die Zellen beobachtet.

5.13.2 Testdurchführung

Tag 1

Die PC12-Zellen werden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät, wobei das Volumen der Zellsuspension 2 mL beträgt. Nach zweistündiger Inkubation der Zellen bei 37 °C wird NGF (2 µL) aus einer Stammlösung von 100 µg/mL hinzugefügt und die Zellen werden weiter bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % gehalten.

Tag 4

Das alte Medium wird aus den Zellkulturschalen entfernt und man wäscht zweimal mit sterilem PBS Puffer (1 mL). Nach Zugabe von frischem Medium (2 mL) werden die Zellen 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut zweimal mit PBS Puffer (1 mL) gewaschen. Nach Wiederholung dieses Waschvorgangs wird neues Nährmedium in die Schale gegeben und die Zellen werden weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tag 6

Nach Wechsel des Nährmediums (2 mL) wird pro Schale ein Protein injiziert. Die Proteinlösungen werden mit Puffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt, wobei FITC-Dextran in einer Konzentration von 100 µM ebenfalls zugesetzt wird. Die Proteinlösungen werden vor der Injektion 2 min zentrifugiert. Nach Injektion von etwa 100 - 300 Zellen wird das Medium erneut gewechselt und die Zellen werden wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tag 8

Nachdem das Medium gewechselt wurde, werden die Zellen unter dem ZEISS Axiovert 200 M Mikroskop betrachtet und fotografiert. Mithilfe von IMAGE J und dem PLUGIN Cell Counter wird die Anzahl der Zellen ermittelt, die Ausläufer gebildet haben, die mindestens die Größe des Zellkörperdurchmessers haben.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Marshall, E. *Science* **2011**, 331, 1540.
- (2) Kersey, J. H. *Blood* **1997**, 90, 4243.
- (3) DeVita, V. T., Jr. *Nat Clin Pract Oncol* **2004**, 1, 55.
- (4) Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. *CA Cancer J Clin* **2010**, 60, 277.
- (5) Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. *CA Cancer J Clin* **2011**, 61, 69.
- (6) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, 459.
- (7) Harvey, J. J. *Nature* **1964**, 204, 1104.
- (8) Kirsten, W. H.; Mayer, L. A. *J Natl Cancer Inst* **1967**, 39, 311.
- (9) Konstantinopoulos, P. A.; Karamouzis, M. V.; Papavassiliou, A. G. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, 6, 540.
- (10) Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. *Science* **2001**, 294, 1299.
- (11) Lenzen, C.; Cool, R. H.; Prinz, H.; Kuhlmann, J.; Wittinghofer, A. *Biochemistry* **1998**, 37, 7420.
- (12) Bos, J. L. *Cancer Res.* **1989**, 49, 4682.
- (13) Repasky, G. A.; Chenette, E. J.; Der, C. J. *Trends Cell Biol* **2004**, 14, 639.
- (14) Kolch, W. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, 6, 827.
- (15) Wennerberg, K.; Rossman, K. L.; Der, C. J. *J Cell Sci* **2005**, 118, 843.
- (16) Yoon, S.; Seger, R. *Growth Factors* **2006**, 24, 21.
- (17) Weis, K. *Cell* **2003**, 112, 441.
- (18) Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 153.
- (19) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*.
- (20) Folch, J.; Ascoli, I.; Lees, M.; Meath, J. A.; Lebaron, F. N. *J. Biol. Chem.* **1951**, 191, 833.
- (21) Kamiya, Y.; Sakurai, A.; Tamura, S.; Takahashi, N.; Abe, K.; Tsuchiya, E.; Fukui, S.; Kitada, C.; Fujino, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 83, 1077.
- (22) Nosjean, O.; Briolay, A.; Roux, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 153.
- (23) Orlean, P.; Menon, A. K. J. *Lipid Res.* **2007**, 48, 993.
- (24) Mann, R. K.; Beachy, P. A. *Annu. Rev. Biochem* **2004**, 73, 891.
- (25) Zha, J. P.; Weiler, S.; Oh, K. J.; Wei, M. C.; Korsmeyer, S. J. *Science* **2000**, 290, 1761.
- (26) Farazi, T. A.; Waksman, G.; Gordon, J. I. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 39501.
- (27) Goldberg, J. *Cell* **1998**, 95, 237.
- (28) Moss, J.; Vaughan, M. *J Biol Chem* **1995**, 270, 12327.
- (29) Dunphy, J. T.; Linder, M. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1436, 245.
- (30) Zhang, F. L.; Casey, P. J. *Annu. Rev. Biochem* **1996**, 65, 241.
- (31) Farnsworth, C. C.; Wolda, S. L.; Gelb, M. H.; Glomset, J. A. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20422.
- (32) Lowy, D. R.; Willumsen, B. M. *Nature* **1989**, 341, 384.
- (33) Gelb, M. H.; Brunsveld, L.; Hrycyna, C. A.; Michaelis, S.; Tamanoi, F.; Van Voorhis, W. C.; Waldmann, H. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 518.
- (34) Gao, J.; Liao, J.; Yang, G. Y. *Am J Transl Res* **2009**, 1, 312.
- (35) Hancock, J. F.; Magee, A. I.; Childs, J. E.; Marshall, C. J. *Cell* **1989**, 57, 1167.
- (36) Schmidt, W. K.; Tam, A.; Fujimura-Kamada, K.; Michaelis, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, 11175.
- (37) Dai, Q.; Choy, E.; Chiu, V.; Romano, J.; Slivka, S. R.; Steitz, S. A.; Michaelis, S.; Philips, M. R. *J Biol Chem* **1998**, 273, 15030.
- (38) Stein, M. P.; Dong, J.; Wandinger-Ness, A. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, 55, 1421.
- (39) Leung, K. F.; Baron, R.; Seabra, M. C. *J Lipid Res* **2006**, 47, 467.
- (40) Zeidman, R.; Jackson, C. S.; Magee, A. I. *Mol. Membr. Biol.* **2009**, 26, 32.

- (41) Roth, A. F.; Wan, J. M.; Bailey, A. O.; Sun, B. M.; Kuchar, J. A.; Green, W. N.; Phinney, B. S.; Yates, J. R.; Davis, N. G. *Cell* **2006**, *125*, 1003.
- (42) Salaun, C.; Greaves, J.; Chamberlain, L. H. *J Cell Biol*, *191*, 1229.
- (43) Dunphy, J. T.; Greentree, W. K.; Linder, M. E. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43300.
- (44) Varner, A. S.; Ducker, C. E.; Xia, Z. P.; Zhuang, Y.; De Vos, M. L.; Smith, C. D. *Biochem. J* **2003**, *373*, 91.
- (45) Bano, M. C.; Jackson, C. S.; Magee, A. I. *Biochem. J* **1998**, *330*, 723.
- (46) Veit, M. *Biochem. J* **2000**, *345*, 145.
- (47) Lobo, S.; Greentree, W. K.; Linder, M. E.; Deschenes, R. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41268.
- (48) Roth, A. F.; Feng, Y.; Chen, L. Y.; Davis, N. G. *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 23.
- (49) Politis, E. G.; Roth, A. F.; Davis, N. G. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 10156.
- (50) Sugimoto, H.; Hayashi, H.; Yamashita, S. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 7705.
- (51) Duncan, J. A.; Gilman, A. G. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 15830.
- (52) Duncan, J. A.; Gilman, A. G. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 31740.
- (53) Yeh, D. C.; Duncan, J. A.; Yamashita, S.; Michel, T. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 33148.
- (54) Veit, M.; Schmidt, M. F. *Virology* **2001**, *288*, 89.
- (55) Devedjiev, Y.; Dauter, Z.; Kuznetsov, S. R.; Jones, T. L.; Derewenda, Z. S. *Structure* **2000**, *8*, 1137.
- (56) Camp, L. A.; Verkruyse, L. A.; Afendis, S. J.; Slaughter, C. A.; Hofmann, S. L. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 23212.
- (57) Greaves, J.; Prescott, G. R.; Gorleku, O. A.; Chamberlain, L. H. *Mol Membr Biol* **2009**, *26*, 67.
- (58) Lam, K. K.; Davey, M.; Sun, B.; Roth, A. F.; Davis, N. G.; Conibear, E. *J Cell Biol* **2006**, *174*, 19.
- (59) Valdez-Taubas, J.; Pelham, H. *EMBO J* **2005**, *24*, 2524.
- (60) Rocks, O.; Peyker, A.; Kahms, M.; Verveer, P. J.; Koerner, C.; Lumbierres, M.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I. H. *Science* **2005**, *307*, 1746.
- (61) Shahinian, S.; Silviu, J. R. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813.
- (62) Dekker, F. J.; Rocks, O.; Vartak, N.; Menninger, S.; Hedberg, C.; Balamurugan, R.; Wetzel, S.; Renner, S.; Gerauer, M.; Scholermann, B.; Rusch, M.; Kramer, J. W.; Rauh, D.; Coates, G. W.; Brunsveld, L.; Bastiaens, P. I. H.; Waldmann, H. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 449.
- (63) Rocks, O.; Gerauer, M.; Vartak, N.; Koch, S.; Huang, Z. P.; Pechlivanis, M.; Kuhlmann, J.; Brunsveld, L.; Chandra, A.; Ellinger, B.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I. H. *Cell* **2010**, *141*, 458.
- (64) Stober, P.; Schelhaas, M.; Nagele, E.; Hagenbuch, P.; Retey, J.; Waldmann, H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75.
- (65) Schelhaas, M.; Glomsda, S.; Hansler, M.; Jakubke, H. D.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 106.
- (66) Kuhn, K.; Owen, D. J.; Bader, B.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023.
- (67) Gottlieb, D.; Grunwald, C.; Nowak, C.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *Chem. Commun.* **2006**, 260.
- (68) Chen, Y. X.; Koch, S.; Uhlenbrock, K.; Weise, K.; Das, D.; Gremer, L.; Brunsveld, L.; Wittinghofer, A.; Winter, R.; Triola, G.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6090.
- (69) Cotte, A.; Bader, B.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *Chemistry-a European Journal* **1999**, *5*, 922.
- (70) Waldmann, H.; Heuser, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *6*, 477.

- (71) Machauer, R.; Waldmann, H. *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **2000**, *39*, 1449.
- (72) Zhu, Y.; van der Donk, W. A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1189.
- (73) Brunsveld, L.; Kuhlmann, K.; Alexandrov, K.; Wittinghofer, A.; Goody, R. G.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622.
- (74) Wieland, T.; Lewalter, J.; Birr, C. *Liebigs Ann Chem* **1970**, *740*, 31.
- (75) Semenov, A. N.; Gordeev, K. Y. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 303.
- (76) Han, Y. X.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307.
- (77) Lumbierres, M.; Palomo, J.; Kragol, G.; Roehrs, S.; Müller, O.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7405.
- (78) Chen, Y. X.; Triola, G.; Waldmann, H., *unpublished data*.
- (79) Kenner, G. W.; Mcdermot, Jr.; Sheppard, R. C. *J Chem Soc Chem Comm* **1971**, 636.
- (80) Backes, B. J.; Ellman, J. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322.
- (81) Palomo, J. M.; Lumbierres, M.; Waldmann, H. *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **2006**, *45*, 477.
- (82) Triola, G.; Gerauer, M.; Görmer, K.; Brunsveld, L.; Waldmann, H. *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 9585.
- (83) Ludolph, B.; Eisele, F.; Waldmann, H. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 901.
- (84) Page, M. J.; Hall, A.; Rhodes, S.; Skinner, R. H.; Murphy, V.; Sydenham, M.; Lowe, P. N. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 19147.
- (85) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776.
- (86) Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H. U.; Lau, H. *Liebigs Ann Chem* **1953**, *583*, 129.
- (87) Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 6705.
- (88) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635.
- (89) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007.
- (90) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org Lett* **2000**, *2*, 2141.
- (91) Kohn, M.; Breinbauer, R. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 3106.
- (92) He, Y.; Hinklin, R. J.; Chang, J.; Kiessling, L. L. *Org Lett* **2004**, *6*, 4479.
- (93) Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 5268.
- (94) Ghosh, S. S.; Kao, P. M.; McCue, A. W.; Chappelle, H. L. *Bioconjug Chem* **1990**, *1*, 71.
- (95) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press, 1996.
- (96) Bader, B.; Kuhn, K.; Owen, D. J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J. *Nature* **2000**, *403*, 223.
- (97) Smyth, D. G.; Konigsberg, W.; Blumenfeld, O. O. *Biochem. J* **1964**, *91*, 589.
- (98) Weise, K.; Triola, G.; Brunsveld, L.; Waldmann, H.; Winter, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1557.
- (99) Zuckermann, R. N. *Biopolymers* **2010**.
- (100) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R. Y.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 9367.
- (101) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. *Drug Dev. Res.* **1995**, *35*, 20.
- (102) Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2657.
- (103) Farmer, P. S.; Ariens, E. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1982**, *3*, 362.
- (104) Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moos, W. H. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678.

- (105) Gibbons, J. A.; Hancock, A. A.; Vitt, C. R.; Knepper, S.; Buckner, S. A.; Brune, M. E.; Milicic, I.; Kerwin, J. F.; Richter, L. S.; Taylor, E. W.; Spear, K. L.; Zuckermann, R. N.; Spellmeyer, D. C.; Braeckman, R. A.; Moos, W. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 885.
- (106) Hamy, F.; Felder, E. R.; Heizmann, G.; Lazdins, J.; AboulEla, F.; Varani, G.; Karn, J.; Klimkait, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 3548.
- (107) Nguyen, J. T.; Porter, M.; Amoui, M.; Miller, W. T.; Zuckermann, R. N.; Lim, W. A. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 463.
- (108) Nguyen, J. T.; Turck, C. W.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N.; Lim, W. A. *Science* **1998**, *282*, 2088.
- (109) Woody, R. W. *Journal of Polymer Science: Macromolecular Reviews* **1977**, *12*, 181.
- (110) Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6778.
- (111) Kruijtzter, J. A. W.; Nijenhuis, W. A. J.; Wanders, N.; Gispens, W. H.; Liskamp, R. M. J.; Adan, R. A. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4224.
- (112) Kruijtzter, J. A. W.; Hofmeyer, L. J. F.; Heerma, W.; Versluis, C.; Liskamp, R. M. J. *Chemistry-a European Journal* **1998**, *4*, 1570.
- (113) Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969.
- (114) Tesser, G. I.; Balvertgeers, I. C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1975**, *7*, 295.
- (115) Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646.
- (116) Robey, F. A.; Fields, R. L. *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 373.
- (117) Fischer, E. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1904**, *37*, 3062.
- (118) Murphy, J. E.; Uno, T.; Hamer, J. D.; Cohen, F. E.; Dwarki, V.; Zuckermann, R. N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 1517.
- (119) Culf, A. S.; Ouellette, R. J. *Molecules*, *15*, 5282.
- (120) Patch, J. A.; Kirshenbaum, K.; Seuryneck, S. L.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. In *Pseudo-peptides in Drug Discovery*; Nielsen, P. E., Ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2004, p 1.
- (121) Merrifield, R. B.; Stewart, J. M. *Nature* **1965**, *207*, 522.
- (122) Lebl, M.; Hachmann, J. *Methods Mol Biol* **2005**, *298*, 167.
- (123) Seyferth, D.; Dow, A. W.; Menzel, H.; Flood, T. C. *J. Organomet. Chem.* **1972**, *44*, 279.
- (124) Hashimoto, N.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, *29*, 1475.
- (125) Kuehnel, E.; Laffan, D. D. R.; Lloyd-Jones, G. C.; del Campo, T. M.; Shepperson, I. R.; Slaughter, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7075.
- (126) Rietman, B. H.; Peters, R. F. R.; Tesser, G. I. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 1323.
- (127) Corey, E. J.; Szekely, I.; Shiner, C. S. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 3529.
- (128) Pai, E. F.; Kabsch, W.; Krenzel, U.; Holmes, K. C.; John, J.; Wittinghofer, A. *Nature* **1989**, *341*, 209.
- (129) Bader, B. *Einfluß posttranslationaler Modifikationen von p21Ras auf Proteininteraktionen und Membranassoziation in biophysikalischen und zellulären Systemen*, 2000.
- (130) Bordier, C. *J Biol Chem* **1981**, *256*, 1604.
- (131) Halai, R.; Craik, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 526.
- (132) Lee, S. H. *Arch. Pharmacol Res.* **2009**, *32*, 299.
- (133) Wender, P. A.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H.; Rothbard, J. B.; Shinde, R.; Contag, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10340.
- (134) Vrudhula, V. M.; Kerr, D. E.; Siemers, N. O.; Dubowchik, G. M.; Senter, P. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 539.

- (135) Vrudhula, V. M.; MacMaster, J. F.; Li, Z.; Kerr, D. E.; Senter, P. D. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 3591.
- (136) Beekman, N. J. C. M.; Schaaper, W. M. M.; Tesser, G. I.; Dalsgaard, K.; Kamstrup, S.; Langeveld, J. P. M.; Boshuizen, R. S.; Meloen, R. H. J. *Pept. Res.* **1997**, *50*, 357.
- (137) Kragol, G.; Lumbierres, M.; Palomo, J. M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5839.
- (138) Alexander, M.; Gerauer, M.; Pechlivanis, M.; Popkirova, B.; Dvorsky, R.; Brunsveld, L.; Waldmann, H.; Kuhlmann, J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 98.
- (139) Witt, D. *Synthesis-Stuttgart* **2008**, 2491.
- (140) Hunter, R.; Stellenboom, N.; Caira, M. R. *Synlett* **2008**, 252.
- (141) Szymelfejnik, M.; Demkowicz, S.; Rachon, J.; Witt, D. *Synthesis-Stuttgart* **2007**, 3528.
- (142) Cros, E.; Planas, M.; Bardaji, E. *Let. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 1.
- (143) Parker, A. J.; Kharasch, N. J. *Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3071.
- (144) Hiskey, R. G.; Ward, B. F. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1118.
- (145) Brois, S. J.; Pilot, J. F.; Barnum, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 7629
- (146) Swan, J. M. *Nature* **1957**, *180*, 643.
- (147) Hiver, P. D., Amadou ; Paquer, Daniel *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9569.
- (148) Harpp, D. N.; Ash, D. K.; Back, T. G.; Gleason, J. G.; Orwig, B. A.; VanHorn, W. F. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3551.
- (149) Barton, D. H. R.; Hesse, R. H.; Osullivan, A. C.; Pechet, M. M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6697.
- (150) Galande, A. K.; Spatola, A. F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3431.
- (151) Galande, A. K.; Spatola, A. F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4525.
- (152) Simmonds, R. G.; Tupper, D. E.; Harris, J. R. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 363.
- (153) Hunter, R.; Caira, M.; Stellenboom, N. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8268.
- (154) Kornblum, N.; Powers, J. W.; Anderson, G. J.; Jones, W. J.; Larson, H. O.; Levand, O.; Weaver, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6562.
- (155) Epstein, W. W.; Sweat, F. W. *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 247.
- (156) Yiannios, C. N.; Karabinos, J. V. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3246.
- (157) Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657.
- (158) Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 899.
- (159) Kappe, C. O.; Dallinger, D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 51.
- (160) Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. *Clin Chem* **1991**, *37*, 625.
- (161) Rocks, O.; Peyker, A.; Bastiaens, P. I. H. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 351.
- (162) Roy, S.; Plowman, S.; Rotblat, B.; Prior, I. A.; Muncke, C.; Grainger, S.; Parton, R. G.; Henis, Y. I.; Kloog, Y.; Hancock, J. F. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 6722.
- (163) Song, A. M.; Wang, X. B.; Zhang, J. H.; Marik, J.; Lebrilla, C. B.; Lam, K. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 161.
- (164) Bürger, M. *Dissertation*, 2011.
- (165) Lindgren, C. M.; Heid, I. M.; Randall, J. C.; Lamina, C.; Steinhorsdottir, V.; Qi, L.; Speliotes, E. K.; Thorleifsson, G.; Willer, C. J.; Herrera, B. M.; Jackson, A. U.; Lim, N.; Scheet, P.; Soranzo, N.; Amin, N.; Aulchenko, Y. S.; Chambers, J. C.; Drong, A.; Luan, J.; Lyon, H. N.; Rivadeneira, F.; Sanna, S.; Timpson, N. J.; Zillikens, M. C.; Zhao, J. H.; Almgren, P.; Bandinelli, S.; Bennett, A. J.; Bergman, R. N.; Bonnycastle, L. L.; Bumpstead, S. J.; Chanock, S. J.; Cherkas, L.; Chines, P.; Coin, L.; Cooper, C.; Crawford, G.; Doering, A.; Dominiczak, A.; Doney, A. S.; Ebrahim, S.; Elliott, P.; Erdos, M. R.; Estrada, K.; Ferrucci, L.; Fischer, G.; Forouhi, N. G.; Gieger, C.; Grallert, H.; Groves, C. J.; Grundy, S.; Guiducci, C.; Hadley, D.; Hamsten, A.; Havulinna, A. S.; Hofman, A.; Holle, R.; Holloway, J. W.; Illig, T.; Isomaa, B.; Jacobs, L. C.; Jameson, K.; Jousilahti, P.; Karpe, F.; Kuusisto, J.; Laitinen, J.; Lathrop, G. M.; Lawlor, D. A.; Mangino, M.; McArdle, W. L.; Meitinger, T.; Morken, M. A.; Morris, A. P.; Munroe, P.; Narisu, N.;

- Nordstrom, A.; Nordstrom, P.; Oostra, B. A.; Palmer, C. N.; Payne, F.; Peden, J. F.; Prokopenko, I.; Renstrom, F.; Ruokonen, A.; Salomaa, V.; Sandhu, M. S.; Scott, L. J.; Scuteri, A.; Silander, K.; Song, K.; Yuan, X.; Stringham, H. M.; Swift, A. J.; Tuomi, T.; Uda, M.; Vollenweider, P.; Waeber, G.; Wallace, C.; Walters, G. B.; Weedon, M. N. *PLoS Genet* **2009**, *5*, e1000508.
- (166) Benjamin, A. M.; Suchindran, S.; Pearce, K.; Rowell, J.; Lien, L. F.; Guyton, J. R.; McCarthy, J. J. *J Obes* **2011**, *2011*, 329038.
- (167) Richieri, G. V.; Ogata, R. T.; Kleinfeld, A. M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23495.
- (168) Siegel, G.; Obernosterer, G.; Fiore, R.; Oehmen, M.; Bicker, S.; Christensen, M.; Khudayberdiev, S.; Leuschner, P. F.; Busch, C. J.; Kane, C.; Hubel, K.; Dekker, F.; Hedberg, C.; Rengarajan, B.; Drepper, C.; Waldmann, H.; Kauppinen, S.; Greenberg, M. E.; Draguhn, A.; Rehmsmeier, M.; Martinez, J.; Schratt, G. M. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 705.
- (169) Sunaga, H.; Sugimoto, H.; Nagamachi, Y.; Yamashita, S. *Biochem J* **1995**, *308 (Pt 2)*, 551.
- (170) Greene, L. A.; Tischler, A. S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73*, 2424.
- (171) Schmidt, G.; Wittinghofer, A. *FEBS Lett* **2000**, *474*, 184.
- (172) Vartak, N.; Dortmund, D. T., Ed. 2011.
- (173) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*; 5th ed.; Elsevier Science, 2003.
- (174) Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248.
- (175) Atherton, E.; Pinori, M.; Sheppard, R. C. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1985**, 2057.
- (176) Weinrich, D.; Kohn, M.; Jonkheijm, P.; Westerlind, U.; Dehmelt, L.; Engelkamp, H.; Christianen, P. C.; Kuhlmann, J.; Maan, J. C.; Nusse, D.; Schroder, H.; Wacker, R.; Voges, E.; Breinbauer, R.; Kunz, H.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *ChemBioChem* **2009**, *11*, 235.
- (177) Ohta, S.; Shimabayashi, A.; Aono, M.; Okamoto, M. *Synthesis-Stuttgart* **1982**, 833.

7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschriften
AcOH	Essigsäure
AcOZ	<i>p</i> -Acetoxybenzyloxycarbonyl-
Acrylodan	6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen
ADIFAB	Acrylodated intestinal fatty acid binding protein
ADP	Adenosindiphosphat
All	Allyl-
Aloc	Allyloxycarbonyl-
APT	Acylproteinthioesterase
aq	wässrig
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
Bn	Benzyl
bs	breites Singulett
Bu	Butyl-
ca	circa
CBD	Chintin-bindende Domäne
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazol
CFP	Cyan fluorescent protein
Chs	Chintinsynthase
cm	Zentimeter
C _q	quartärer Kohlenstoff
Cy	Cyanin dye
d	Dublett
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
dd	dupliziertes Dublett
DEAE	Diethylaminoethylsepharose, Ionenaustauscher
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin

Abkürzungsverzeichnis

DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPL	Expressed protein ligation
Äq	Äquivalent
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erf	Effect on Ras function
ERK	extracellular regulated kinase
ESI	Electro spray ionisation
Et	Ethyl-
F	Fluoreszenzintensität
Far	Farnesyl-
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPP	Farnesylpyrophosphat
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
Ftase	Farnesyltransferase
GalT	Galactosyltransferase
GAP	GTPase aktivierende Proteine
gCOSY	Gradient-selected correlation spectroscopy
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-nucleotide exchange factor; Nukleotidaustauschfaktoren
GFP	Green fluorescent protein
GGTase	Geranylgeranyltransferase
gHSQC	Gradient-selected heteronuclear single quantum correlation
Glc	Glukose
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
G-Proteine	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
HCTU	(2-(6-Chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium Hexafluorophosphat
HD	Hexadecyl-
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
H-ras	Harvey-ras
HR-MS	High resolution mass spectroscopy
Icmt	Isoprenylcysteinylcarboxymethyltransferase
I-FABP	Intestinal fatty acid binding protein
iPr	Isopropyl-
IR	Infrarot
k	Kilo-
K_d	Bindungsaffinität
K_M	Michaeliskonstante
K-ras	Kirsten-ras
L	Liter
LYPLAL1	Lysophospholipase-like 1
M	molar
m	Multipllett
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
Man	Mannose
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MARCKS	myristoylierte, Alanin-reiche Proteinkinase C Substrate
max	maximal
MDCK	Madin Darby canine kidney
Me	Methyl-
MEK	MAP/Erk Kinase
MeOH	Methanol
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MHz	Megahertz
MIC	Maleimidocapronsäure
min	Minute
mL	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometrie
N	Normal
n	Stoffmenge
NCL	Native chemische Ligation
NGF	nerve growth factor
NhCys	Peptoid-Homocystein
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLeu	Peptoidleucin
nm	Nanometer
NMet	Peptoidmethionin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear-Overhauser-Effekt-Spektroskopie
N-ras	Neuroblastoma-ras
o/n	über Nacht
Pal	Palmitoyl-
PAT	Palmitoyltransferase
PBS	Phosphate buffered saline
PC12	Pheochromocytoma cells
Pen	Penicillamin
ppm	Parts per million
PPT	Protein-Palmitoyl-Transferase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
PyBrop	Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat
q	Quartett
quant	quantitativ
Rab	Ras-like proteins in brain
RabGGTase	Rab-Geranylgeranyltransferase
Raf	rabid fibrosarcoma
Ran	Ras-like nuclear protein
Rap	Ras related proteins
ras	rat sarcoma
RBD	Ras binding domain
REP	Rab escort protein
Rheb	Ras homolog enriched in brain

Abkürzungsverzeichnis

Rho	Ras Homolog
RNA	ribonucleic acid
RT	Zimmertemperatur
s	Singulett
sec	Sekunden
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SG	Schutzgruppe
sog	sogenannt
SPPS	Solid phase peptide synthesis
Su	Succinimid
t	Triplett
T	Temperatur
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl-
TCEP	Tris(2-chloroethyl)phosphat
tert	Tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	time of flight
Trt	Trityl-, Triphenylmethyl
V	Volumen
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
W	Watt
wt	wild type
δ	chemische Verschiebung
ϵ	Extinktionskoeffizient
[Pd(PPh ₃) ₄]	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
μ w	Mikrowelle

Die Aminosäuren wurden in der üblichen Weise im Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525).

8 Anhang

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke herzlich ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Mathias Christmann möchte ich vielmals für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Besonderer Dank geht an Dr. Gemma Triola, die als Betreuerin mit ihrer Motivation, Unterstützung und steten Diskussionsbereitschaft in den vergangenen Jahren entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. ¡Muchas gracias!

I would like to thank Prof. Dr. Rob M. J. Liskamp and all of his co-workers for the enjoyable and inspiring research stay in Utrecht in 2008; especially Dr. Ir. John A. W. Kruijtzter was always helpful.

I thank Dr. Nachiket Vartak for finally performing the microinjection of the semi-synthetic proteins.

Dr. Petra Janning, Evelyne Merten, Chantale Sevenich und Andreas Brockmeyer möchte ich für die Gerätebetreuung & -instandhaltung sowie die rasche Messung aller HPLC-MS und HR-MS-Proben danken.

Herzlichen Dank an Dr. Karin Warburg und Dr. Yiu-Fung Ho für die Einführung in die Zellkultur, Handhabung von PC12-Zellen und die Mikroinjektion.

Besonderer Dank geht an Christine Nowak, für die Expression und Aufreinigung der Proteine, die Einführung in die Proteinbiochemie und Hilfe bei allen Ras-Protein-technischen Fragen. An dieser Stelle möchte ich auch Verena Pries und Dr. Slava Ziegler für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen biologischen Fragen danken.

Meinen Laborkollegen, Dr. Gemma Triola, Hanna Bruss, Dr. Heiko Dückert und Dr. Thilo Walter sei ebenfalls für die angenehme Atmosphäre in A 3.15 gedankt. Gleiches gilt für die „Stamm-Belegschaft“ von A 3.30 Dr. Dirk Weinrich, Dr. Gemma Triola, Dr. Heiko Dückert, Verena Pries, Dr. Slava Ziegler, Tuyen Tran und Dr. Claas Gerding-Reimers,

Besonders möchte ich der Lipopeptidgruppe, Dr. Gemma Triola, Dr. Yongxiang Chen (Linda), Gunther Zimmermann und Melanie Schwalfenberg für die stete Diskussionsbereitschaft, Motivation und

Aufmunterung danken, auch den ehemaligen Mitgliedern Dr. Sebastian Koch, Dr. Debapratim Das, Dr. Marc Gerauer und Prof. Dr. Luc Brunsveld sei an dieser Stelle gedankt.

Des Weiteren danke ich Melanie Schwalfenberg und Dr. Gemma Triola herzlich für das zügige Korrekturlesen der Arbeit.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Waldmann-Abteilung möchte ich für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, Hilfe und den Spaß in den letzten vier Jahren, egal ob während der Arbeit, in Kaffeepausen, beim Feierabendbierchen oder außerhalb des Institutes, danken.

Selbstverständlich danke ich meinen Eltern für die stete Unterstützung und das Interesse nicht nur während des Chemiestudiums, sondern auch während der Doktorarbeit.

Der größte Dank geht an Benjamin Klopsch, nicht nur für die Gestaltung der Freizeit und den Ausgleich zur Arbeit, sondern auch für seine Unterstützung, Geduld, sein Verständnis und die tollen Erlebnisse der vergangenen Jahre. Tausend Dank für alles!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Kristina Görmer
Geburtsdatum, -ort 04. Dezember 1981, Halle/Saale

Schulbildung

09/1988 - 07/1992 Grundschule, Halle/Saale und Rehau
09/1992 – 07/2001 Schiller-Gymnasium, Hof/Saale
07/2001 Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung

10/2001 – 08/2006 Studiengang Diplom-Chemie, Universität Bayreuth
04/2005 – 10/2005 Forschungsaufenthalt, Universidad de Granada, Spanien, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Santoyo-González: „Synthesis of Viny- and Polyvinylsulfones“
02/2006 – 08/2006 Diplomarbeit, Universität Bayreuth, Arbeitskreis Prof. Dr. C. Unverzagt: „Synthesen mit Glycosyltriazolen“
10/2006 – 03/2007 Forschungsaufenthalt, Institute for Glycomics, Gold Coast, Australien, Arbeitskreis Prof. Dr. M. von Itzstein: „Derivatization of sialic acids“
04/2007 – 05/2011 Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und TU Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: „Synthese und biologische Evaluierung von N-Ras Proteinen mit nicht-natürlichem C-Terminus“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 16. Juni.2011

Kristina Görmer