



Design und Synthese

Peptid-basierter Inhibitoren für

Protein–Protein Interaktionen

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

M. Sc. Philipp M. Cromm

geboren in Usingen, Hessen

Dortmund

2016

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund.

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2011 bis April 2016 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Dortmund.

Dekanin: Prof. Dr. Insa Melle

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Tom N. Großmann

Eingereicht am 23.05.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2016

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

- Cromm, P. M. Wallraven, K. Glas, A. Bier, D. Fürstner, A. Ottmann, C. & Grossmann, T. N. Constraining an Irregular Peptide Secondary Structure via Ring-Closing Alkyne Metathesis. *ChemBioChem*. DOI: 10.1002/cbic.201600362 (2016).
- Cromm, P. M. Spiegel, J. Küchler, P. Dietrich, L. Kriegesmann, J. Wendt, M. Googy, R. S. Waldmann, H. & Grossmann, T. N. Protease-Resistant and Cell-Permeable Double-Stapled Peptides Targeting the Rab8a GTPase. *ACS Chem. Biol.* DOI: 10.1021/acscchembio.6b00386 (2016).
- Cromm, P. M. Schaubach, S. Spiegel, J. Fürstner, A. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Orthogonal ring-closing alkyne and olefin metathesis for the synthesis of small GTPase-targeting bicyclic peptides. *Nat. Commun.* **7**, 11300 (2016).
- Cromm, P. M. Spiegel, J. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 13516–13537 (2015); *Angew. Chem.* **127**, 12718-13741 (2015).
- Cromm, P. M. Spiegel, J. & Grossmann, T. N. Hydrocarbon Stapled Peptides as Modulators of Biological Function. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1362–1375 (2015).
- Spiegel, J. Cromm, P. M. Zimmermann, G. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 613–622 (2014).
- Spiegel, J. Cromm, P. M. Itzen, A. Goody, R. S. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Direct Targeting of Rab-GTPase-Effector Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2498–2503 (2014); *Angew. Chem.* **126**, 2531-2536 (2014).

Die folgenden Konferenzbeiträge resultierten aus Teilen dieser Doktorarbeit

- Cromm, P. M. Schaubach, S. Spiegel, J. Fürstner, A. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Solid-Phase Synthesis of Bicyclic Peptides via Orthogonal Ring-Closing Alkyne and Olefin Metathesis" (Posterbeitrag), Dutch Peptide Symposium, Lelystad, The Netherlands, **2016**.
- Cromm, P. M. Schaubach, S. Spiegel, J. Fürstner, A. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Stabilization of α -Helical Peptides using Ring Closing Alkyne Metathesis" (Posterbeitrag), 4th Symposium of the RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, Kobe, Japan, **2015**.
- Spiegel, J. Cromm, P. M. Itzen, A. Goody, R. S. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Inhibition of Rab GTPase Protein-Protein Interactions via Hydrocarbon Stapled Peptides" (Posterbeitrag), EMBO Conference Series – Chemical Biology, Heidelberg, Germany, **2014**.
- Cromm, P. M. Spiegel, J. Itzen, A. Goody, R. S. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Direct Targeting of GTPase Effector Interactions" (Vortrag), Doktorandenforum Natur, Studienstiftung des deutschen Volkes, Berlin, Germany, **2014**
- Cromm, P. M. Spiegel, J. Itzen, A. Goody, R. S. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Hydrocarbon Stapled Peptides Targeting Rab GTPase-Protein-Protein Interactions" (Posterbeitrag), Gordon Research Conference, Ventura Beach, CA, USA, **2014**.
- Cromm, P. M. Spiegel, J. Itzen, A. Goody, R. S. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. "Hydrocarbon Stapled Peptides for the Targeting of Rab-Protein-Protein Interactions" (Posterbeitrag), Sci-X-Talks Amsterdam, Netherlands, **2013**.

Für Hanna & meine Familie

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. h.c. **Herbert Waldmann** danke ich herzlichst für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung während der letzten Jahre und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine motivierende Art, das entgegengebrachte Vertrauen und die großen, nicht-selbstverständlichen Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. **Tom Grossmann** danke ich ganz herzlich für seine Betreuung und fachlichen Ratschläge, zahlreiche wissenschaftliche und private Diskussionen, seine stete Hilfsbereitschaft und sein Engagement während der vergangenen Jahre. Außerdem bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Professor Dr. **Aymelt Itzen** und Professor Dr. **Roger Goody** möchte ich mich für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit während des Rab-Projektes bedanken. Herrn Professor Dr. **Alois Fürstner** danke ich für seine Unterstützung und hilfreichen Denkanstöße bei der Alkin-Makrozyklisierung.

Besonderer Dank gebührt meinem guten Freund und Projektpartner Dr. **Jochen Spiegel** für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und seine Unterstützung während der gesamten Promotion. Dazu gehören unzählige wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen, zahlreiche Denkanstöße und die hervorragende Labor- und WG-Atmosphäre.

Adrian Glas möchte ich für seine Freundschaft sowie seine große Hilfsbereitschaft und exzellente Zusammenarbeit während meiner Promotion danken. **Kerstin Wallraven** und **David Bier** danke ich für ihre Unterstützung bei der Proteinkristallisation von 14-3-3.

Bei meinen Bachelorstudenten **Julia Kriegesmann** und **Mathias Wendt** bedanke ich mich herzlich für ihre hervorragende Arbeit, die ausgezeichnete Laboratmosphäre und ihre große Motivation.

Frau **Nathalie Bleiming** und Frau **Christine Nowak** möchte ich für die Expression und Bereitstellung zahlreicher Proteine und ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bei biologischen Fragestellungen bedanken. Der **Dortmund Protein Facility** danke ich für die Klonierung und Expression zahlreicher kleiner GTPasen. Bei Frau Dr. **Petra Janning** und **Jens Warmers** bedanke ich mich für ihre Hilfe bei HPLC- und Massenspektrometrie sowie ihre Geduld und Unterstützung beim Instandsetzen der Geräte.

Philipp Küchler danke ich für die Durchführung zahlreicher zellbiologischer Experimente und seiner Hilfe bei biochemischen Fragestellungen und Problemen. Dr. **Kirsten Tschaplada** und **Melanie Schwalfenberg** bin ich dankbar für ihren Rat bei biologischen Fragestellungen und Problemen.

Bei Dr. **Gunther Zimmermann** möchte ich mich für seine Ideen und Anregungen bezüglich des UNC119-Projekts bedanken. Frau Dr. **Shobhna Kapoor** und Frau **Laura Dietrich** danke ich herzlich für die Durchführung zellbiologischer Experimente.

Sebastian Schaubach möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken sowie für die Bereitstellung zahlreicher Verbindungen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Waldmann & Grossmann für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Für zahlreiche außerwissenschaftliche Aktivitäten, Fußballabende, herausragende Barbecues und gemeinsame Unternehmungen möchte ich mich herzlichst bei **Jochen Spiegel, Adrian Glas, Guillaume Garivet, Vincent Eschenbrenner-Lux, Kirsten Tschapalda, Melanie Schwalfenberg, Janine Schulte-Zweckel, Philipp Kühler, Javier Ceballos, Tom Mejuch, Carolin Müller** und **Gunther Zimmermann** bedanken.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinen Freunden aus Usingen **Lukas Becker, Paul Becker, Aaron von der Heyden** und **Stefan Bleise** sowie meinen Mühener Kommilitonen **Thomas Klatt, Linus Stegbauer** und **Johannes Schlüter** für die gemeinsame Zeit.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. **Horst Kessler** danke ich herzlichst für seine Unterstützung während meines Chemiestudiums und die Ermöglichung meiner Masterarbeit in Australien. Herrn Professor Dr. **David Craik** bin ich zutiefst dankbar für meinen wunderbaren Aufenthalt in Brisbane und seine Unterstützung meiner wissenschaftlichen Karriere.

Bei Herrn **Günter Jost** und Herrn **Josef Hartmann** möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mein Interesse für Chemie geweckt haben.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke für ein Promotionsstipendium und der Max Planck-Gesellschaft für ihre finanzielle Unterstützung.

Meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder Matthias, danke ich besonders für ihre jahrelange Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion sowie für ihre Geduld und ihr Verständnis. Ohne Euch hätte ich es niemals bis hierher geschafft.

Der meiste Dank gebührt Hanna, für ihre liebevolle Unterstützung, ihr großes Verständnis und den Rückhalt, den ich von ihr bekommen habe. Danke, dass Du für mich da bist!

DANKE!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Protein–Protein Interaktionen und ihre Modulation	3
2.1	Strukturelle Merkmale von Protein–Protein Interaktionen	3
2.2	Peptid-basierte Ansätze zur Modulation von Protein–Protein Interaktionen	4
3	Die Ras–Superfamilie kleiner GTPasen	16
3.1	Die Rab–Familie	19
3.2	Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren	21
3.3	Uncoordinated (UNC) 119	23
3.4	Modulation der Aktivität kleiner GTPasen	25
4	Zielsetzung der Arbeit	31
5	Ergebnisse und Diskussion	33
5.1	Synthese hydrophob-verbrückter Peptide zur Inhibition von Rab–GTPasen	33
5.2	Verbesserung der biologischen Aktivität eines hydrophob-verbrückten Rab8 Inhibitors	45
5.3	Synthese zyklischer Peptide mittels Alkin-Ringschlussmetathese	58
5.4	Bizyklische Peptide mittels orthogonaler Olefin- & Alkin-Ringschlussmetathese	71
5.5	α -Helikal stabilisierte Peptide zur Inhibition von UNC119	81
6	Zusammenfassung	89
7	Experimenteller Teil	95
7.1	Materialien und Geräte chemischer Synthesen	95
7.2	Materialien und Geräte biologischer Experimente	98
7.3	Synthese unnatürlicher Aminosäuren	101
7.4	Festphasenpeptidsynthese	131
7.5	Biochemische und biophysikalische Experimente	144
8	Literatur	151
9	Abkürzungsverzeichnis	173
10	Anhang	177

Kurzzusammenfassung

Das Adressieren von Protein–Protein Interaktionen (PPIs), die über ausgedehnte und gering-profilierter Oberflächen wechselwirken, ist ein anspruchsvolles Problem der aktuellen Medizinforschung. Insbesondere kleine GTPasen der Ras–Superfamilie kontrollieren über PPIs zahlreiche essentielle zelluläre Funktionen und sind als molekulare Schalter attraktive Zielproteine für die Wirkstoffentwicklung. Rab–Proteine, die größte Familie kleiner GTPasen, sind Schlüsselregulatoren des zellulären Vesikeltransports, und ihre Fehlregulation wird in den letzten Jahren vermehrt mit diversen menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese von Peptid-basierten Rab–Inhibitoren untersucht. Darüber hinaus wurden die entwickelten Methoden zur Adressierung anderer komplexer PPIs angewendet.

Es wurden α -helikale Bindemotive auf Grundlage struktureller Daten von Rab–Protein-Komplexen ausgewählt und mittels chemischer Modifikationen stabilisiert. Mit Hilfe von α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückungen (*hydrocarbon peptide stapling*) konnten erstmals stabilisierte α -Helices zur Bindung an Rab–GTPasen identifiziert werden. Der höchstafine Binder ist in der Lage eine Rab–Effektor-Wechselwirkung *in vitro* zu inhibieren und konnte durch Sequenzoptimierung sowie Variation der Verbrückung in seiner biologischen Verfügbarkeit verbessert werden. Das optimierte Peptid zeigt größere Affinität gegenüber Rab8a als das Ausgangspeptid, ist besser zellgängig und verfügt über eine herausragende Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Alkin-Ringschlussmetathese (RCAM) für die Synthese von makrozyklischen Peptiden an fester Phase etabliert. Die Alkinverbrückung lässt sich in unterschiedlichen Architekturen in die Kohlenwasserstoffverbrückung von Peptiden einbauen und anschließend gezielt funktionalisieren. Der Einbau eines Alkin-Makrozyklus in das 14-3-3 Bindemotiv von *Exoenzym S* lieferte reversible Binder mit submikromolarer Affinität. Eine Analyse der Kristallstruktur des affinsten Binders im Komplex mit 14-3-3 zeigt, dass das Alkin-makrozyklisierte Peptid das Zielprotein unter Ausbildung einer irregulären Sekundärstruktur bindet. Zudem ermöglicht die Alkin-Makrozyklisierung die Synthese bizyklischer Peptide mittels orthogonaler RCAM/RCM (Olefin-Ringschlussmetathese) mit unterschiedlichen Verbrückungsgeometrien. Auf diese Weise konnte ein monozyklischer Binder von Rab8a zu einem bizyklischen Peptid mit erhöhter Bindungsaffinität weiterentwickelt werden.

Des Weiteren wurden in Rahmen dieser Arbeit die ersten Peptid-basierten Inhibitoren von UNC119 entwickelt. Das Lipid-bindende Protein UNC119 kontrolliert die zelluläre Lokalisation *N*-myristoylierter Proteine und transportiert sie zwischen den Membranen. Mittels α -methylierter, Kohlenwasserstoffverbrückung konnte ein nanomolarer UNC119a Binder identifiziert werden, der im Zellexperiment den vollständigen Ablauf der Zytokinese verhindert.

Abstract

Targeting of protein–protein interactions (PPIs) that engage in extensive and flat surface interactions is a highly demanding task in contemporary medicinal chemistry research. Especially, Ras–superfamily small GTPases represent attractive target proteins in drug discovery since they control a multitude of essential cellular functions via challenging PPIs. Rab–proteins, the biggest family of small GTPases, are key regulators of intracellular vesicle transport and are associated with a variety of different human diseases. In this thesis, peptide derived inhibitors of Rab–GTPases were identified. Furthermore, other complex PPIs were targeted using the developed methods.

α -Helical binding motives based on crystal structures of Rab–protein complexes were identified and constrained using chemical modifications. Stabilized α -helices obtained by hydrocarbon peptide stapling were developed as the first modulators of an activated Rab–GTPase. The best binder was able to inhibit a Rab–effector interaction *in vitro* and was further evolved by subsequent sequence optimization and variations of crosslink architecture. The final peptide shows enhanced bioavailability as compared to the starting peptide sequence and exhibits improved target affinity to Rab8a, increased cellular uptake and outstanding proteolytic stability.

Furthermore, ring-closing alkyne metathesis (RCAM) for the synthesis of macrocyclic peptides on solid phase was established within this thesis. The alkyne crosslink can be closed in different architectures and subsequently functionalized. Introduction of an alkyne macrocycle into the 14-3-3 binding motif of *exoenzyme S* results in reversible binders with submicromolar affinity. Crystallization of the most effective binder in complex with 14-3-3 reveals adaption of an irregular secondary structure which is not hampered by the alkyne crosslink. In addition, alkyne macrocyclization enables the synthesis of bicyclic peptides via orthogonal RCAM and ring-closing olefin metathesis (RCM) using different crosslink geometries. Using this strategy, a monocyclic peptide-based binder of Rab8a was successfully evolved into a bicyclic peptide with increased target affinity.

Additionally, the first peptide-based inhibitors of UNC119 were identified in the present thesis. The acyl-binding protein UNC119 controls the cellular localization of *N*-myristoylated proteins and modulates their intermembrane transport. Using the hydrocarbon peptide stapling approach nanomolar binders of UNC119a were identified, hampering the completion of cytokinesis in cell experiments.

1 Einleitung

Durch die Entwicklung zahlreicher neuer Synthesestrategien und Anwendungsmöglichkeiten nehmen Peptide in den letzten Jahren einen immer wichtigeren Platz innerhalb der Medizinalforschung ein. Während sie vor einigen Jahren aufgrund ihrer geringen Stabilität, schnellen Ausscheidung und schlechten zellulären Aufnahme nur eine untergeordnete Rolle in der Wirkstoffentwicklung spielten, so sind Peptide mittlerweile ein wichtiger Bestandteil im Portfolio der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Peptide überzeugen vor allem durch eine ausgezeichnete Selektivität, hohe Aktivität und eine niedrige Toxizität sowie einen vorhersehbaren Metabolismus.¹⁻³ Dies führte in den letzten Jahren zu zahlreichen Neuzulassungen und mehr als 140 Peptid-basierten Wirkstoffen in klinischen Studien.^{2,4} Eine entscheidende Rolle für den Aufschwung von Peptiden in der Medizinalforschung spielten die Fortschritte in der Peptidsynthese sowie die Entwicklung von chemischen Modifikationen, die zur Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit und Aktivität von Peptiden beitragen. Dabei ermöglicht die einfache und modulare Synthese von Peptiden den schnellen Zugang zu umfangreichen Bibliotheken mit großer struktureller Vielfalt, da neben den 20 proteinogenen Aminosäuren mittlerweile eine große Anzahl unterschiedlichster Bausteine für die Peptidsynthese zugänglich sind. In der Natur sind Peptide vor allem hoch selektive und effektive Binder von Rezeptoren oder Ionenkanälen und lösen als Hormone oder Neurotransmitter intrazelluläre Ereignisse aus. Aufgrund ihres flexiblen Rückgrats sind Peptide sehr anpassungsfähig und können auch großflächige Bindestellen abdecken. Nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bzw. dessen Weiterentwicklung dem *induced-fit*, bei dem beide Bindepartner konformationelle Änderungen während der Bindung eingehen, ist die biologisch aktive Konformation besonders entscheidend für eine hoch affine Bindung (Abbildung 1a).⁵⁻⁸ Die Vororganisation der Struktur durch Einschränkung des konformationellen Freiraums ist dabei in vielerlei Hinsicht von Vorteil. Durch Stabilisation der biologisch aktiven Konformation (*match*) wird die Affinität zum Zielprotein erhöht, indem die aufzuwendende entropische Energie während der Bindung reduziert wird (Abbildung 1b). Darüber hinaus bedingt eine stabile Konformation eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen und in manchen Fällen sogar die zelluläre Aufnahme von Peptiden.⁸⁻¹⁰ Die Stabilisation einer nicht-bindenden Konformation (*mismatch*) führt hingegen zum einem Verlust von Bindungsaffinität.

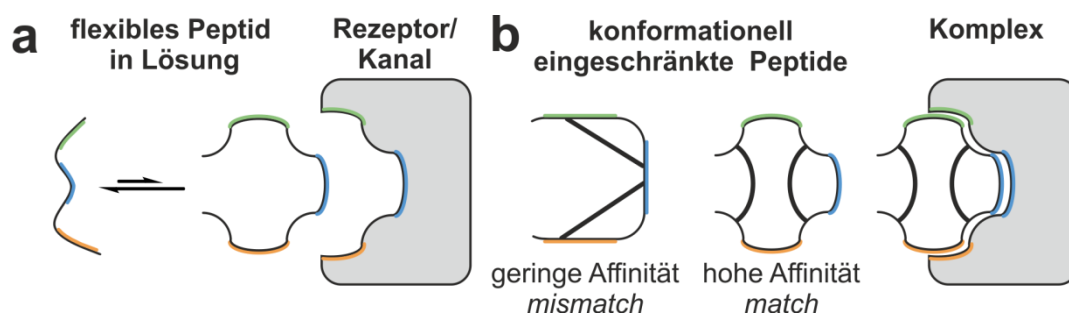


Abbildung 1. Bioaktive Konformation und Vororganisation von Peptidstrukturen. (a) flexibles Peptid in Lösung; (b) konformationell eingeschränkte Peptide.

Aufgrund des wiedererstickten Interesses an Peptiden existieren für viele der offensichtlichen und einfach zugänglichen Rezeptoren und Zielproteine bereits optimierte, Peptid-basierte Binder in fortgeschrittenen vorklinischen oder klinischen Studien.² Daher ist die aktuelle Herausforderung der Peptid-basierten Wirkstoffforschung die Entwicklung neuer Strategien und Methoden, die über das traditionelle Einsatzspektrum von Peptiden hinausgehen. Dazu zählen multifunktionale und zellgängige Peptide oder auch Peptid-Medikament-Konjugate.² Darüber hinaus werden Peptide vermehrt zur Adressierung von großflächigen und gering-profilierten Protein–Protein Interaktionen (PPIs) eingesetzt.^{3,11–15} Insbesondere durch das Nachahmen von Sekundärstrukturelementen konnten zahlreiche Peptid-basierte Modulatoren für anspruchsvolle PPIs identifiziert werden, die mit den klassischen Methoden der Medizinalchemie nicht zugänglich sind (*undruggable*).^{11,16–19}

PPIs stehen zunehmend im Fokus der Lebenswissenschaften und sind nur bedingt mit niedermolekularen Verbindungen zu modulieren, da sie kaum adressierbare Bindetaschen aufweisen.²⁰ Insbesondere die Proteine der Ras (*rat sarcoma*)–Superfamilie kleiner GTPasen zählen zu den interessanten Onkoproteinen, die sich seit langem dem Zugriff traditioneller medizinalchemischer Methoden entziehen.^{21,22} Die Fehlregulation von kleinen GTPasen der Ras–Superfamilie steht im Zusammenhang mit zahlreichen menschlichen Erkrankungen, insbesondere Krebs.²³ Kleine GTPasen verfügen über keine adressierbare enzymatische Aktivität und ihre Regulation und Funktion wird über schwer zu modulierende PPIs vermittelt. Trotz mehr als 30 Jahren intensiver Bemühungen konnten bisher jedoch keine geeigneten direkten Modulatoren für diese interessante Proteinfamilie entwickelt werden.^{23–25}

2 Protein–Protein Interaktionen und ihre Modulation

2.1 Strukturelle Merkmale von Protein–Protein Interaktionen

Die Kommunikation zwischen Proteinen ist die Grundlage nahezu aller biologischen Prozesse. Mit Hilfe von diesen sog. Protein–Protein Interaktionen (PPIs) werden zahlreiche essentielle zelluläre Funktionen kontrolliert. Große Multiproteinkomplexe regulieren über PPIs unter anderem das Zellwachstum, DNA Replikation, Transkription und Translation sowie die transmembrane Signalweiterleitung.²⁶ Eine PPI ist als eine nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Proteinen definiert, durch die die Funktion des Protein-Komplexes beeinflusst wird.²⁶ PPIs können dabei grundsätzlich anhand ihrer Wechselwirkung eingeteilt werden (Abbildung 2). Die an der Wechselwirkung beteiligten Partner können entweder eine vororganisierte definierte Struktur besitzen (Domäne) oder das bindende Strukturmotiv bildet sich erst während der Bindung aus und die Peptidsequenz liegt zuvor ungeordnet vor. Somit ergeben sich drei mögliche Szenarien bei denen sich die PPI entweder zwischen zwei Domänen, einer Domäne und einer ungeordneten Peptidsequenz oder zwei ungeordneten Peptidsequenzen ausbilden kann. Zusammengenommen bilden alle PPIs eines Organismus ein großes und äußerst komplexes Netzwerk, das als „Interaktom“ bezeichnet wird und das in die Regulation und Ausführung der Mehrheit aller biologischen Prozesse involviert ist. Schätzungen des menschlichen Interaktoms variieren zwischen 130 000 – 650 000 PPIs,^{27,28} von denen bisher jedoch nur weit weniger als 10% tatsächlich identifiziert wurden.²⁸ Anormale und fehlerhafte PPIs werden in letzter Zeit verstärkt mit menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht.²⁹ Diese Fehlregulation geht dabei hauptsächlich auf den Verlust einer essentiellen Wechselwirkung oder die Bildung und/oder Stabilisierung eines Protein-Komplexes zu einem unpassenden Zeitpunkt oder an falscher Stelle zurück. Folgerichtig stellt die Modulation von PPIs (Inhibition oder Stabilisierung) einen attraktiven Ansatzpunkt in der Wirkstoffentwicklung dar.

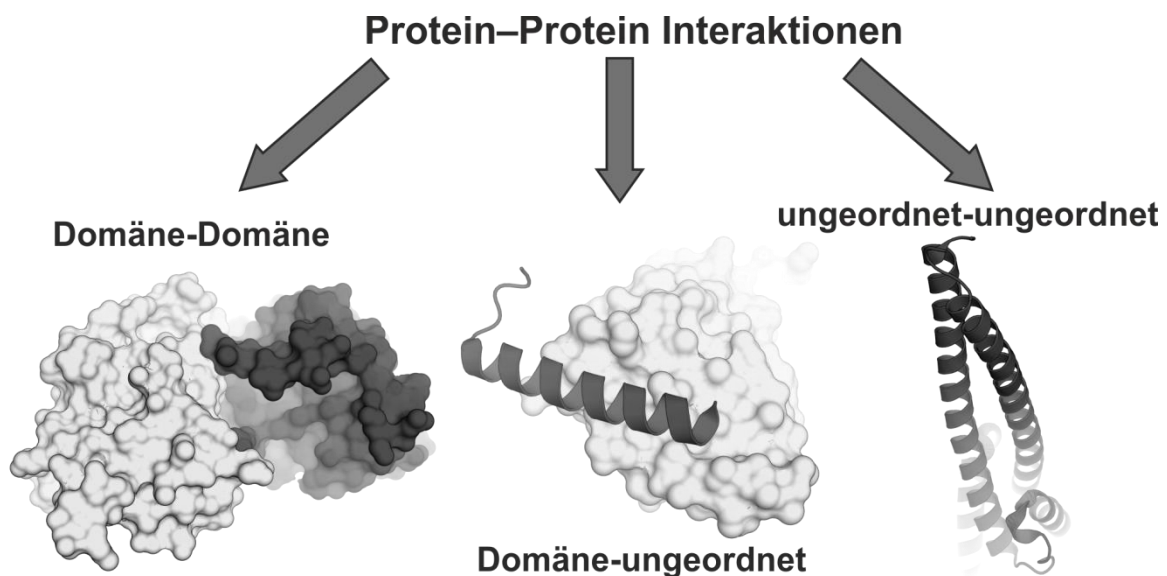


Abbildung 2. Protein–Protein Interaktionen können durch Domänen oder Peptide vermittelt werden.

PPIs werden vorwiegend über großflächige und nur gering-profilierter Proteinoberflächen vermittelt, die üblicherweise eine Fläche von $1\,500 - 3\,000 \text{ \AA}^2$ aufweisen.^{3,26} Im Gegensatz dazu binden die traditionellen niedermolekularen Wirkstoffe zumeist in wohldefinierte, hydrophobe Bindetaschen und besitzen im Regelfall eine Oberfläche von $300 - 500 \text{ \AA}^2$.³⁰ Dies ist meistens unzureichend um eine großflächige PPI zwischen zwei natürlichen Bindungspartnern effektiv zu modulieren.³¹ Aufgrund dessen wurden PPIs lange Zeit als pharmakologisch unzugänglich (*undruggable*) angesehen und insbesondere Wechselwirkungen bei denen beide Interaktionspartner zunächst ungeordnet vorliegen sind äußerst anspruchsvoll zu adressieren.³² Als entscheidender Schritt zur Modulation von PPIs zählt die Erkenntnis, dass die flachen Proteinoberflächen der Wechselwirkungsgrenzflächen sogenannte *hot-spots* aufweisen können, die obwohl sie flächenmäßig lediglich einen kleinen Teil der Gesamtwechselwirkung ausmachen (bis zu 600 \AA^2), dennoch einen entscheidenden Anteil der Gibbs-Energie liefern.³³ Durch die Identifikation von *hot-spots* und einem generell erweiterten Verständnis von PPIs aufgrund einer verbesserten biophysikalischen- und strukturellen Charakterisierung konnten einige vielversprechende PPI Inhibitoren entwickelt werden. Dabei wurden zum einen Binder entdeckt, die durch direkte Bindung der Interaktionsfläche die Wechselwirkung inhibieren. Zum anderen konnten allosterische Inhibitoren identifiziert werden, die durch Bindung an anderer Stelle eine konformationelle Änderung des Proteins bewirken und auf diese Weise die Interaktion verhindern.^{14,26,34} Vor allem struktur- und computergestützte Analysen und Fragment basierte *Screenings* lieferten einen großen Beitrag zur Entwicklung effizienter PPI–Inhibitoren.^{35–37} In den letzten zehn Jahren ist es auf diese Weise gelungen mehr als 40 verschiedene PPIs mit Hilfe synthetischer Moleküle zu adressieren.³⁸ Einige dieser Inhibitoren befinden sich bereits in der klinischen Testphase. Dennoch decken diese Moleküle nur einen geringen Teil der identifizierten PPIs ab, sodass ein großer Bedarf an alternativen Ansätzen zur PPI–Modulation besteht. Insbesondere Peptide erwiesen sich in diesem Zusammenhang als eine vielversprechende Substanzklasse.^{11,15}

2.2 Peptid-basierte Ansätze zur Modulation von Protein–Protein Interaktionen

Peptid-basierte Ansätze zur Adressierung von PPIs beruhen vor allem auf der Nachahmung der an der Interaktion von Proteinen beteiligten Bindungssequenzen. Zudem besitzen Peptide einige vorteilhafte Eigenschaften. Ihre Flexibilität ermöglicht eine sehr gute Anpassung an große Oberflächen und ihr einfacher, modularer Aufbau vergrößert ihre strukturelle Vielfalt durch den Einbau zahlreicher Aminosäuren und unnatürlicher Bausteine. Zudem besitzen Peptid-basierte Wirkstoffe zumeist eine hohe Wirksamkeit sowie ausgezeichnete Selektivitäten. Darüber hinaus sind Peptide und ihre Abbauprodukte biokompatibel und nicht giftig.³ Insbesondere durch die Nachahmung wichtiger Sekundärstrukturmotive konnten Peptide zunehmend erfolgreich zur Modulation von PPIs eingesetzt werden (Abbildung 3).^{11,14,17,19,39,40} Dabei ist jedoch die einfache Isolierung der Peptidsequenz des interagierenden Strukturelements nicht ausreichend, da kurze

Peptidsequenzen in freier Lösung ihre Ordnung verlieren und flexible und ungeordnete Konformationen einnehmen.^{41,42} Die entscheidende Triebkraft ist dabei die Minimierung der exponierten hydrophoben Oberfläche. Das Einnehmen der zur Bindung notwendigen biologisch aktiven Konformation ist mit großen entropischen Verlusten verbunden, welche sich in einer stark reduzierten Affinität widerspiegeln. Zudem zeigen solche flexiblen Peptide eine geringe Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen sowie geringe Zellgängigkeit.¹ Um diesen negativen Eigenschaften entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden entwickelt, die biologisch aktive Konformation von Peptiden durch gezielte chemische Modifikationen zu stabilisieren.

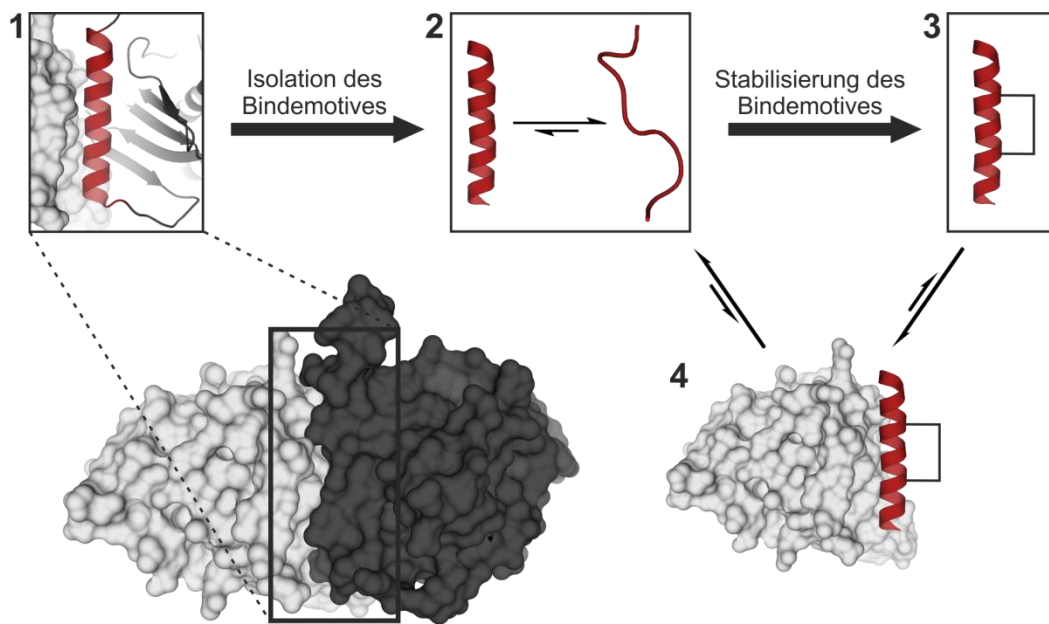


Abbildung 3. Stabilisierung von Bindemotiven zur Inhibition von PPIs. (1) Der Hauptteil der Bindungsenergie von PPIs wird durch diskrete Bindemotive vermittelt. (2) Ohne stabilisierende Tertiärstruktur verlieren die isolierten Peptidsequenzen ihre Ordnung und können nur mit verminderter Affinität an das Zielprotein binden. (3) Durch chemische Modifikationen werden die ungeordneten Peptidsequenzen in ihrer biologisch aktiven Konformation stabilisiert. (4) Damit ermöglicht die chemische Modifikation die Bindung der Peptidsequenz an das Zielprotein und die Inhibition der PPI.

Solche durch chemische Modifikation entstandene Peptidmimetika lassen sich basierend auf ihrer Ähnlichkeit mit dem nicht-modifizierten Ursprungspeptid in vier Klassen (A-D) einteilen.¹¹ Klasse-A-Peptidmimetika bestehen hauptsächlich aus α -Aminosäuren und enthalten nur eine geringe Anzahl an modifizierten Aminosäuren. Das Rückgrat und die Seitenketten entsprechen überwiegend denen des Ursprungspeptids. Zu den Peptidmimetika der Klasse B zählen Foldamere, bei denen insbesondere das Peptidrückgrat durch den Einbau von β -Aminosäuren oder den Einsatz von Peptoiden (*peptoids*) zusätzlich verändert wurde. Bei den Peptidmimetika der Klassen C und D ist das Peptidrückgrat hingegen vollständig ersetzt. Während Klasse-C-Mimetika ihre Seitenketten jedoch analog zur bioaktiven Konformation des Peptidvorläufers orientieren, ist der strukturelle Bezug zum Ursprungspeptid für Mimetika der Klasse D nicht mehr gegeben. Sie imitieren lediglich die biologische Wirkweise des bioaktiven Ursprungspeptids.

2.2.1 Makrozyklische Peptide

Auf der Suche nach Inhibitoren, die eine große Wechselwirkungsfläche abdecken können, erzielen Makrozyklen zunehmend Erfolge bei der Inhibition von PPIs. Insbesondere zyklische Peptide und Peptidmimetika repräsentieren eine äußerst vielversprechende Substanzklasse, die bisher in der Medikamentenentwicklung wenig Beachtung findet.^{43–46} Makrozyklische, peptidbasierte Naturstoffe wie z.B. Vancomycin oder Cyclosporin A überzeugen durch ihre einzigartigen Wirkmechanismen und sind auf dem Markt erfolgreiche und etablierte Medikamente. Darüber hinaus werden zahlreiche Makrozyklen durch die Zyklisierung linearer Peptidsequenzen generiert. Die Makrozyklisierung von linearen Peptiden schränkt ihren konformationellen Freiraum ein und führt so zu erhöhter proteolytischer Stabilität, reduzierter Polarität, erhöhter Affinität und Selektivität und verbessert insgesamt die Medikament-ähnlichen Eigenschaften.^{1,45–50} Allerdings stellt die Makrozyklisierung von Peptiden in vielen Fällen eine synthetische Herausforderung dar.^{45,51} Insbesondere die 3D Konformation von Peptiden stellt einen zentralen Bestimmungsfaktor der biologischen Aktivität und biologischen Verfügbarkeit von Peptiden dar.⁸ Nur ein Peptid, das in seiner optimalen 3D Struktur stabilisiert ist (*match*), ist in der Lage sein komplettes Potenzial auszuschöpfen (**Abbildung 1**).

Die Zyklisierung von Peptiden kann grundsätzlich in vier unterschiedlichen Geometrien erfolgen (Abbildung 4): (1) Kopf-zu-Schwanz (*C*-Terminus zu *N*-Terminus), (2) Kopf-zu-Seitenkette, (3) Seitenkette-zu-Schwanz, (4) Seitenkette-zu-Seitenkette. Dabei steht für die Ringschlussreaktion eine Fülle an unterschiedlichen chemischen Reaktionen zur Verfügung. Weit verbreitet sind Ringschlüsse, die durch die Bildung eines Lactams,⁵² Lactons,⁵³ oder einer Disulfidbrücke⁵⁴ zu Stande kommen. Mittlerweile finden aber auch zahlreiche andere Reaktionen wie die Ugi-Reaktion⁵⁵ oder Azid-Alkin-Click-Chemie⁵⁶ Anwendung bei der Synthese von makrozyklischen Peptiden. Auch die Pd-katalysierte *C-H* Aktivierung von Trp zur Kupplung mit *Iod*-Aryl Aminosäuren kann als Ringschlussreaktion eingesetzt werden.⁵⁷ Besonders die Olefin-Ringschlussmetathese (*ring-closing olefin metathesis*, RCM) rückt bei der Synthese von Peptidmakrozyklen immer mehr in den Vordergrund.⁵⁸ RCM wird vor allem bei der Synthese von α -helikalen makrozyklischen Peptiden eingesetzt.^{16,59} Auch die analoge Alkin-Ringschlussmetathese (*ring-closing alkyne metathesis*, RCAM)⁶⁰ wurde bereits erfolgreich zur Zyklisierung linearer Peptidsequenzen verwendet.^{61–63}

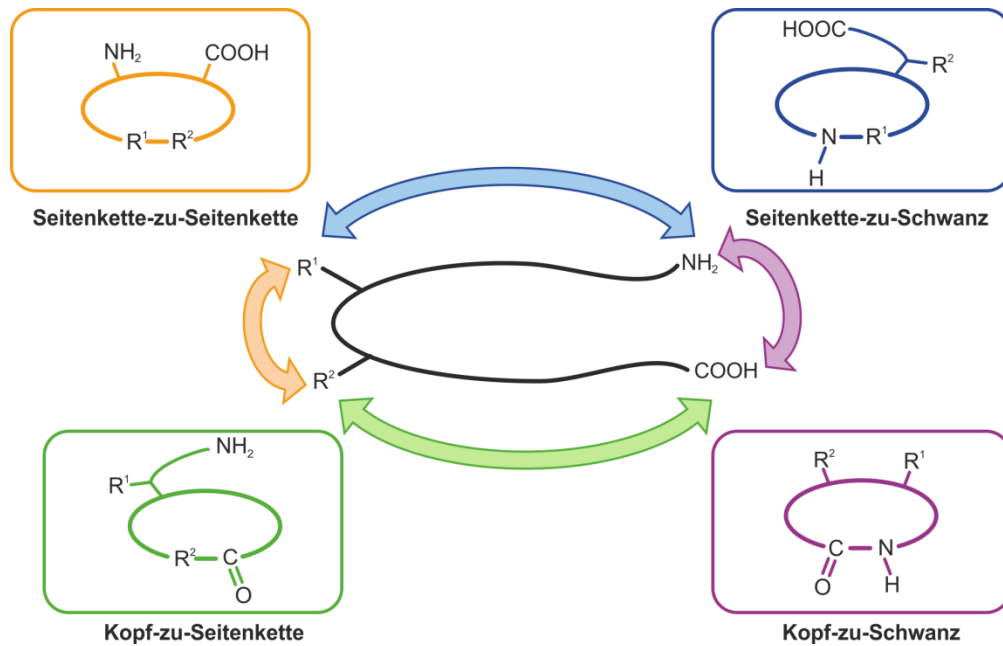


Abbildung 4. Schematische Darstellung der vier unterschiedlichen Zyklisierungsgeometrien von Peptidsequenzen in Anlehnung an White *et. al.*⁵¹

Neben den monozyklischen Peptiden rücken seit einiger Zeit auch polyzyklische Peptide mit zwei oder mehr Peptidringen in den Fokus der Forschung.⁶⁴ Diese polyzyklischen Peptide basieren zumeist auf in der Natur vorkommenden Gerüststrukturen. Diese Gerüststrukturen wie der *sunflower trypsin inhibitor 1* (SFTI-1)⁶⁵ oder das *Cyclotide* kalataB1^{66,67} haben zumeist ein Kopf-zu-Schwanz zyklisiertes Peptidrückgrat, welches zusätzlich durch Seitenkette zu Seitenkette verbrückte Disulfide stabilisiert wird. Polyzyklische Gerüststrukturen verfügen über ausgezeichnete biologische Aktivität, da sie zum einen sehr rigide und zum anderen äußerst resistent gegenüber proteolytischem Verdau sind. Polyzyklische Peptide, wie z.B. *Cyclotides*,⁶⁸ finden Anwendung beim sog. *epitope grafting*, bei dem eine kurze biologisch aktive Peptidsequenz in die stabile Gerüststruktur eingebaut wird (Abbildung 5a).⁶⁹⁻⁷¹ Darüber hinaus können polyzyklische Peptide auch *de novo* mit Hilfe von Phage-Display generiert werden.⁷² Dabei wird eine lineare Peptidsequenz, die drei Cysteinreste enthält, mit Hilfe von *Tris*-(brommethyl)benzol (TBMB) auf einer Phage zyklisiert und auf Bindung zum Zielprotein getestet (Abbildung 5b). Auf diese Weise konnten bityklische PPI Inhibitoren mit Wechselwirkungsflächen von über 700 Å² entwickelt werden.⁷³

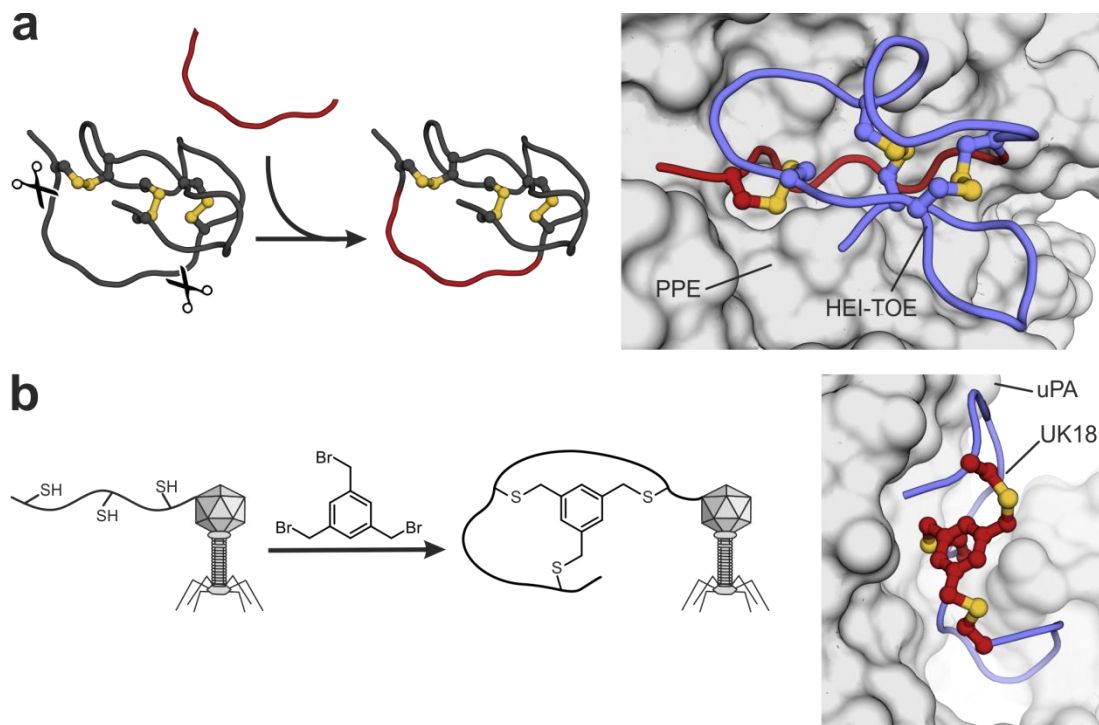


Abbildung 5. *Epitope grafting* und bityclische *de novo* Peptide. (a) Schematische Darstellung der Epitop *grafting* Strategie. Das Bindeepitop (rot) wird in die biologisch aktive Gerüststruktur (dunkelgrau) eingebaut (links). Kristallstruktur eines durch *epitope grafting* entstandenen PPI Inhibitors. Das eingebaute Epitop (rot) und die drei Disulfidbrücken (gelb) sind farblich gekennzeichnet (rechts). PDB: 1MCV (b) Schematische Darstellung des *de novo* Phage-Display Ansatzes. Die cysteininhaltige lineare Peptidsequenz wird mittels *Tris*-(brommethyl)benzol cyclisiert und auf Bindung zum Zielprotein untersucht (links). Kristallstruktur eines mittels Phage-Display identifizierten bityclischen Inhibitors. Das verbindende *Tris*-(brommethyl)benzol (rot) ist farblich hervorgehoben (rechts). PDB: 3QN7.

2.2.2 Stabilisierte α -Helices

Der Einsatz stabilisierter Sekundärstrukturelemente ist ein wichtiger Ansatz zur Modulation von PPIs und führte zur Identifikation einiger vielversprechender Peptidmimetika.^{11,14,15} Obwohl auf der Grundlage stabilisierter Kehrenmotive^{74,75} und β -Faltblättern^{76,77} einige vielversprechende PPI-Inhibitoren entwickelt wurden, befasst sich die Mehrzahl der durchgeführten Studien mit der Stabilisation von α -Helices.^{17,39} Helices machen über 30% der Sekundärstruktur von Proteinen aus¹⁷ und in über 60% der strukturell charakterisierten PPIs ist eine Helix an der Wechselwirkung beteiligt.⁷⁸ Daher stellt die Ausbildung und Stabilisierung α -helikaler Strukturen einen wichtigen Forschungszweig dar.⁷⁹ Der Einbau α -Helix induzierender Bausteine,⁸⁰ α -methylierter Aminosäuren^{81,82} oder auch die Koordination an Metallionen^{83,84} wurde schon seit langem für die Synthese α -helikaler Peptidmimetika der Klasse A verwendet. Neuere Methoden, wie der Einbau von β -Aminosäuren zur Synthese von α/β -Peptiden⁸⁵ oder der Einsatz von Peptoids^{86,87} (Klasse-B-Peptidmimetika), ermöglichen die Abbildung α -helikaler Bindungscharakteristika unter Veränderung des Peptidrückgrats. Eine weitere Entfremdung vom Ursprungspeptid stellen die Helixoberflächenmimetika wie Terphenyle⁸⁸ (Klasse-C-Peptidmimetika) dar. Sie orientieren ihre funktionellen Gruppen entlang einer gedachten Helixseitenfläche und weisen ansonsten kaum Ähnlichkeiten mit den zugrundeliegenden Peptiden auf. Die bisher am häufigsten angewendeten Methoden zur

Stabilisierung α -helikaler Sekundärstrukturmotive sind jedoch die Verwendung von *N*-terminalen Kappen oder die kovalente Seitenkette-zu-Seitenkette Verbrückung. Der bisher am weitesten fortgeschrittene Ansatz mit ersten Verbindungen in klinischen Studien ist die Verwendung α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückungen¹⁶ (*hydrocarbon stapled peptides*), die als Spezialfall der kovalenten Seitenkettenverbrückungen zählen. Da diese Technik einen essentiellen Bestandteil dieser Arbeit darstellt, wird sie in Abschnitt 2.2.3 im Detail diskutiert.

Eine strukturelle Analyse der α -helikal vermittelten PPIs zeigte, dass sich die für die Bindung essentiellen *hot-spots* entweder auf einer Seitenfläche der Helix (ca. 60%), auf zwei Seitenflächen (ca. 30%) oder in sehr seltenen Fällen auf allen drei Seitenflächen der Helix (10%) befinden können.⁷⁸ Daraus ergeben sich je nach Beschaffenheit der PPI unterschiedliche Möglichkeiten für den Einsatz von Helixmimetika (Abbildung 6). So sind Terphenyle lediglich in der Lage eine Helixseitenfläche nachzubilden. Seitenkettenverbrückte Helixmimetika können hingegen zwei Helixseitenflächen adressieren und in Ausnahmefällen noch zusätzliche Interaktionen mit ihrer Verbrückung eingehen. *N*-Terminal verkappte Peptide und β -Peptid-Foldamere sind am besten in der Lage α -Helices ohne großen sterischen Anspruch abzubilden. Damit können sie tief insertierte Helices, die mit allen drei Helixseitenflächen interagieren, nachbilden.⁸⁹

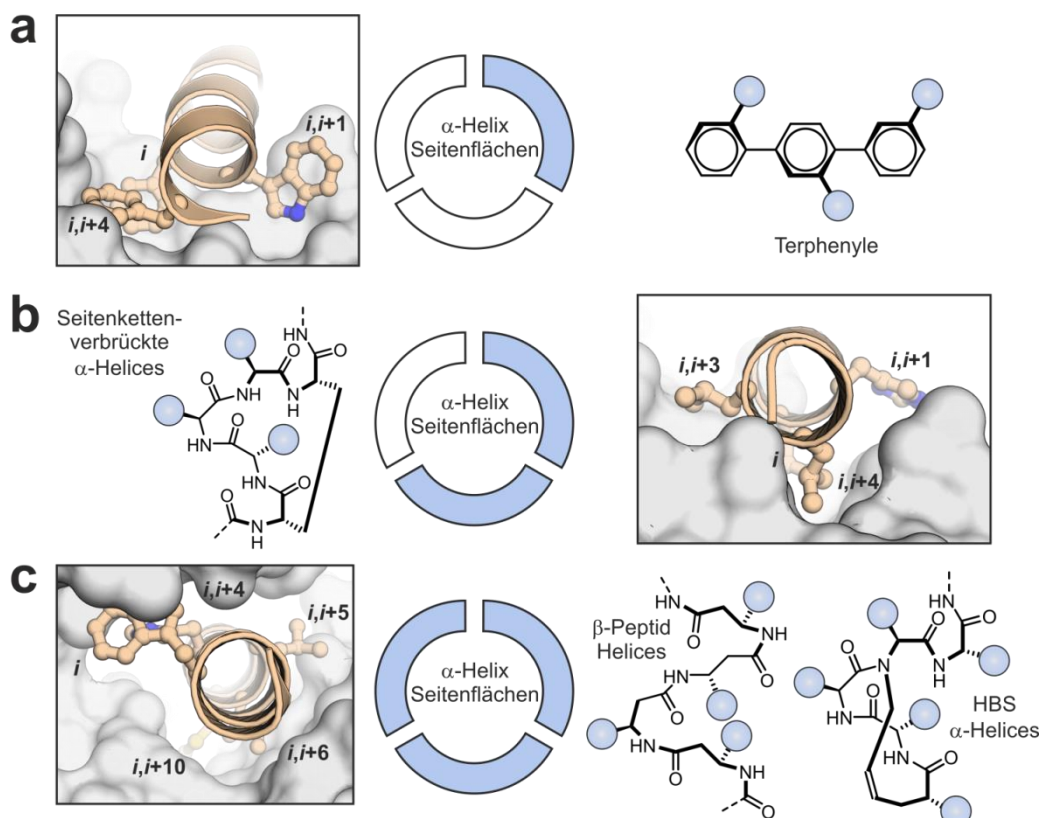


Abbildung 6. α -Helix Seitenflächen.⁷⁸ (a) Proteinkomplex mit *hot-spots* auf einer Seitenfläche der α -Helix und Terphenyle als potentielles Helixmimetikum zur Adressierung der entsprechenden Funktionalitäten. PDB: 1XL3 (b) Proteinkomplex mit Kontakten auf zwei Seitenflächen der α -Helix und Seitenketten verbrückte Peptide als potentielle Helixmimetika zur Adressierung der entsprechenden Funktionalitäten. PDB: 1XIU (c) Proteinkomplex mit Kontakten auf allen drei Seitenflächen der α -Helix sowie β -Peptide und HBS als potentielle Helixmimetika zur Adressierung der entsprechenden Funktionalitäten. PDB: 1OR7. Die interagierenden Aminosäureseitenketten sind explizit dargestellt und nummeriert.

Der Einsatz von *N*-terminalen Kappen dient dazu eine α -helikale Geometrie am *N*-Terminus zu induzieren, die sich dann selbständig in Richtung des *C*-Terminus ausbreitet und die Helix stabilisiert.⁹⁰ Die am erfolgreichsten angewendete Strategie beim Einsatz *N*-terminaler Kappen ersetzt die erste Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl der *N*-terminalen Aminosäure (*i*) und dem Amid der *i*+4ten Aminosäure durch eine kovalente Verknüpfung. Während in ersten Studien die kovalente Verknüpfung durch ein Hydrazon erreicht wurde,⁹¹ verwenden fortgeschrittenere Beispiele eine vollständig hydrophobe Kohlenwasserstoffverbrückung, die durch RCM zwischen zwei Olefinen geschlossen wird.^{92,93} Diese sog. HBS (*hydrogen bond surrogates*, **1**, Abbildung 7) wurden bereits erfolgreich zur Inhibition von PPIs verwendet.^{59,94,95}

Die kovalente Seitenkette-zu-Seitenkette Verknüpfung von Peptidsequenzen ist die am weitesten verbreitete Methode zur Stabilisierung helikaler Sekundärstrukturmotive. Es existiert eine Vielzahl diverser Verknüpfungsstrategien, die sich unterschiedliche chemische Funktionalitäten zu Nutze machen (Abbildung 7).⁹⁶ Aufgrund der Fülle an unterschiedlichen Strategien stellen die hier vorgestellten Methoden keine allumfassende Zusammenstellung dar. Im Folgenden wird lediglich eine Auswahl unterschiedlicher Methoden vorgestellt. Die für eine α -Helix charakteristischen Eigenschaften sind die sich wiederholenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren *i* und *i*+4 sowie die 3.6 Aminosäureseitenketten pro Windung. Daher befinden sich die Aminosäuren im Abstand *i*+3, *i*+4 und *i*+7 auf derselben Seitenfläche einer Helix und die kovalente Verknüpfung ihrer Seitenketten kann eine Stabilisierung der α -helikalen Konformation bewirken. Erreicht wurde dies in frühen Studien durch Disulfide (**2**)⁹⁷ oder Lactambrücken (**3**)⁹⁸, die durch ihre geringe Stabilität gegenüber reduktiven Bedingungen bzw. proteolytischer Spaltung schnell an ihre Grenzen stoßen. Weitere Strategien verwenden Azid-Alkin-Click Reaktionen, die entweder Cu-katalysiert (**4**)^{99,100} oder durch Ringspannung (**5**) induziert werden.¹⁰¹ Darüber hinaus werden Diaryle (**6**)¹⁰² für bessere zelluläre Aufnahme oder photosensitive Azobenzol-Derivate (**7**)^{103,104} eingebaut, mit denen sich die Konformation des Peptids mit Hilfe von Licht beeinflussen lässt. Kürzlich erschienene Methoden nutzen die Thiol-en Reaktion um zwei Cysteine mittels eines stabilen Thioethers mit unterschiedlich funktionalisierten Dienen zu verknüpfen (**8**)¹⁰⁵ oder Dichloraceton, um über das Keton einen weiter funktionalisierbaren orthogonalen Linker zu erhalten (**9**).¹⁰⁶

Die beschriebenen Methoden zur Stabilisierung α -helikaler Peptidsequenzen decken ein diverses Spektrum unterschiedlicher chemischer Reaktionen und Funktionalitäten ab, sodass sich die Eigenschaften der resultierenden Peptidmimetika mitunter stark unterscheiden. Dabei ist das generelle Ziel, die Wirkstoff-ähnlichen (*drug-like*) Eigenschaften von Peptiden durch Verbesserung ihrer Affinität, Erhöhung der Proteasestabilität und bessere Zellgängigkeit zu steigern. Die meisten Methoden überzeugen nur durch Fortschritte in einzelnen Bereichen, durch einfache Handhabung oder eine Hochdurchsatz-kompatible Synthesemethode. Ob jedoch einige dieser Techniken für einen generellen Ansatz zur Inhibition von PPIs in Frage kommen oder nur in einigen speziellen Fällen von Vorteil sind, bleibt abzuwarten. Vergleichende

Studien, die die Eigenschaften verschiedener Stabilisierungsmethoden untereinander vergleichen, sind kaum vorhanden oder schließen nur wenige Ansätze ein.^{89,107,108}

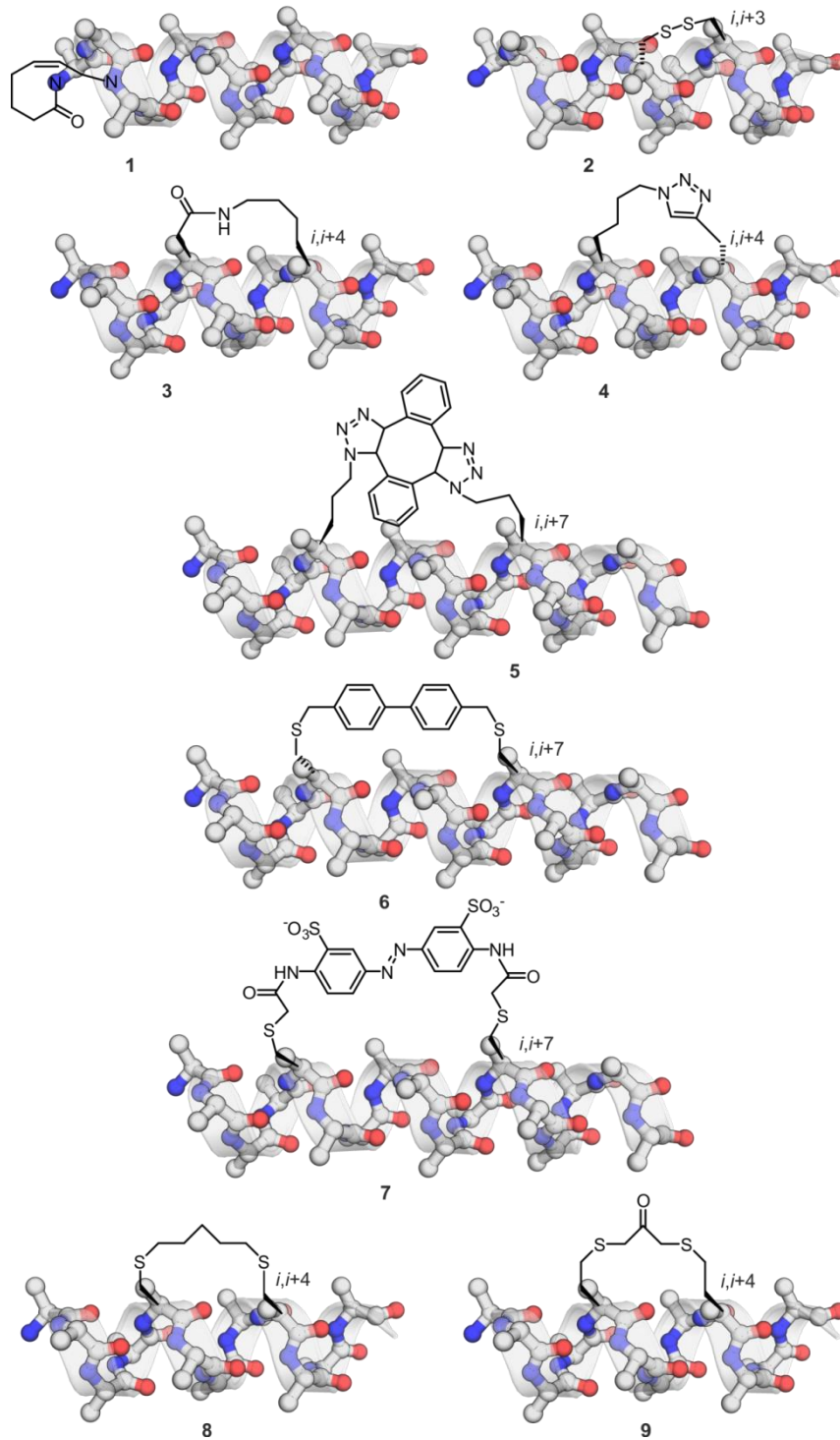


Abbildung 7. Seitenkettenverbrückungen zur Stabilisierung von α -helikalen Peptidstrukturen in Anlehnung an Pelay-Gimeno *et al.*¹¹

2.2.3 Kohlenwasserstoffverbrückte Peptide zur Stabilisierung von α -Helices

Unter allen Strategien zur Stabilisierung α -helikaler Struktur motive ist die Methode der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide (*hydrocarbon stapled peptides*) der am weitesten verbreitete Ansatz mit zahlreichen erfolgreichen Anwendungen und ersten Peptidmimetika in klinischen Studien.^{16,109} Die α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide stellen eine Kombination aus Seitenkette-zu-Seitenkette zyklisierten Peptiden und dem Einbau Helix induzierender, α -methylierter Aminosäuren dar. Ihre Entwicklung basiert auf einer Studie zur Ringschlussmetathese mit *O*-allylierten Homoserin Seitenketten im Abstand $i, i+4$ aus dem Jahr 1998.¹¹⁰ Diese wurde im Jahr 2000 durch den Einbau von α -methylierten Aminosäuren^{81,82} und den Austausch der *O*-allylierten Seitenketten durch eine Kohlenwasserstoffseitenkette erweitert.¹¹¹ Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine starke Zunahme der Helikalität sowie eine deutlich erhöhte metabolische Stabilität der modifizierten Peptide. Das Potential dieses Ansatzes wurde jedoch erst durch Entwicklung eines α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptides für die Inhibition einer intrazellulären PPI mit *in vivo* Aktivität deutlich.¹¹² Diese grundlegenden Studien inspirierten zahlreiche weitere Forschungsgruppen und ermöglichten die breite Anwendung von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden zur Modulation von extra- und intrazellulären PPIs.^{16,109}

Die Synthese und das Design der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide wurde kontinuierlich weiterentwickelt, sodass heutzutage eine Reihe unterschiedlicher Architekturen etabliert sind (Abbildung 8a).¹¹³ Dabei umspannen Peptide, die die Seitenkettenverbrückung an den Positionen $i, i+3$ ^{114,115} und $i, i+4$ ¹¹¹ tragen, jeweils eine Helixwindung, während $i, i+7$ ^{111,116} stabilisierte Peptide zwei Windungen einer Helix überspannen. Darüber hinaus existieren *stitched peptides*, die zwei benachbarte Kohlenwasserstoffbrücken im Abstand $i, i+4$ und $i+4+7$ tragen und damit drei Helix-Windungen ($1 + 2$) einschließen.¹¹⁷ Für die Synthese der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide werden α -methylierte- α -alkenylierte Aminosäuren mittels Festphasenpeptidsynthese in die lineare Peptidsequenz eingebaut (Abbildung 8b).¹¹⁸ Diese unnatürlichen Aminosäuren werden mit S_n bzw. R_n bezeichnet, je nach Konfiguration ihres Stereozentrums (*S* oder *R*) und der Anzahl der Kohlenstoffatome (n) ihrer Alkenyl-Seitenkette. Die kovalente Verknüpfung der Seitenketten erfolgt auf fester Phase mittels RCM und erlaubt die anschließende Modifikation des *N*-Terminus. Die Länge der Kohlenwasserstoffbrücke, wie auch die absolute Konfiguration der einzelnen Bausteine, wurde in Bezug auf maximale α -helikale Stabilisation optimiert. So erfordern die $i, i+3$ und $i, i+7$ Verbrückung den Einbau eines *R*-konfigurierten Bausteins an der Position i und eines *S*-konfigurierten an der Position $i+n$.^{111,114} Während für die $i, i+7$ Geometrie ein Linker mit einer Länge von elf Kohlenstoffatomen ($R_8 + S_5$) die beste Stabilisierung bietet, ergeben sich für die $i, i+3$ Architektur zwei verschiedene Linker längen mit sechs ($R_3 + S_5$) bzw. acht ($R_5 + S_5$) Kohlenstoffatomen.¹¹⁵ Die bisher häufigste Kohlenwasserstoffverbrückung umfasst einen Linker aus acht Kohlenstoffatomen und zwei *S*-konfigurierten Aminosäuren an den Positionen $i, i+4$ ($S_5 + S_5$).¹¹¹ Für L-Peptidsequenzen führt der

Einbau einer analogen Verbrückung mit zwei R_5 -Bausteinen ($R_5 + R_5$) zu Peptiden mit reduzierter Helizität und verringerter zellulärer Aufnahme.¹¹⁹ Für die Stabilisation langer Peptidsequenzen kann der Einbau von zwei einzelnen Kohlenwasserstoffverbrückungen sinnvoll sein.^{120,121} Die beiden Verbrückungen werden dabei zumeist in ausreichendem Abstand zueinander eingebracht um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Für die Synthese von spirozyklischen *stitched peptides* wird der *bis*-alkenylierte Baustein B_5 (Bis-pentenylglycin) an der Position $i, i+4$ eingebaut und ermöglicht die Synthese zweier benachbarter Makrozyklen.¹¹⁷

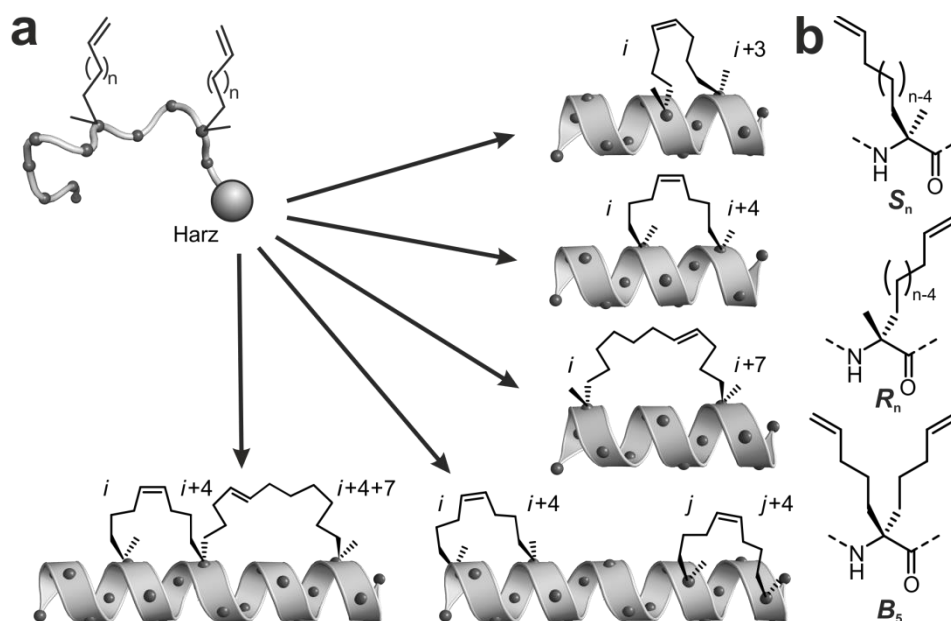


Abbildung 8. Architekturen und Bausteine α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide in Anlehnung an Cromm *et al.*¹⁶ (a) Schematische Darstellung etablierter Verbrückungsarchitekturen α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide. Die α, α -disubstituierten Bausteine (b) werden an unterschiedlichen Positionen in die Peptidsequenz eingebaut und anschließend mittels RCM miteinander verknüpft. Dabei verbinden sie eine oder mehrere Windungen einer α -Helix und stabilisieren deren Konformation.

Die Zielproteine der bislang entwickelten α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide decken ein weites Spektrum an interessanten biologischen Funktionen und schwer zugänglichen PPIs ab. So wurden unter anderem α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide für diverse Infektionskrankheiten,^{122–127} Rezeptoren,^{128–130} Proteine der Transkription und Translation¹³¹ sowie für wichtige Regulatoren des Zellüberlebens und der Apoptose^{112,132} entwickelt.¹⁶ Der in einigen Krebsformen fehlregulierte Wnt Signalweg kann zum einen durch die Interaktion von β -Catenin mit seinem Cofaktor BCL-9 inhibiert werden,¹³³ zum anderen durch die Interaktion von β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor TCF4. Das dafür entwickelte α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **StAx-35R (10)** basiert auf einer ebenfalls an β -Catenin bindenden Domäne von Axin und wurde in Bezug auf Bindungsaffinität und Zellgängigkeit sequenzoptimiert (Abbildung 9a).¹³⁴ Die am besten untersuchte PPI ist die Wechselwirkung des Tumor Suppressors p53 mit seinen negativen Regulatoren MDM2 und MDMX. Zahlreiche stabilisierte α -Helices wurden ausgehend von der p53-Wildtyp-Sequenz entwickelt und kontinuierlich optimiert.^{135–137} Das am

weitesten entwickelte α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **ATSP-7041 (11)** interagiert mit MDMX nicht nur über die Seitenketten der Aminosäuren sondern darüber hinaus auch über seine hydrophobe Kohlenwasserstoffverbrückung (Abbildung 9b). Zudem verfügt **11** über gute biologische Verfügbarkeit und zeigt hohe Effektivität in *in vivo* Studien.¹³⁸ Anders als niedermolekulare Verbindungen, die lediglich die p53-MDM2-Wechselwirkung blockieren,^{139,140} können die stabilisierten α -Helices die Interaktion von p53 mit MDM2 und MDMX inhibieren und sind weniger anfällig für Resistenzmutationen in MDM2. Erste α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Inhibitoren der p53-MDM2/MDMX Wechselwirkungen sind mittlerweile bis in die klinische Testphase vorgedrungen.^{16,138}

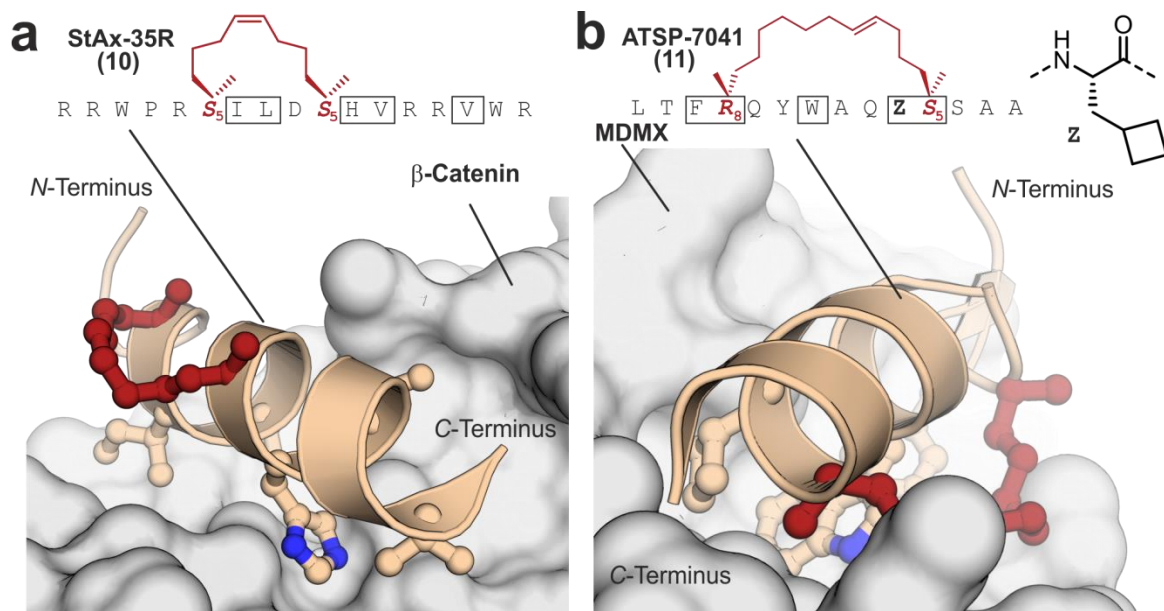


Abbildung 9. Kristallstrukturen α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide. (a) Struktur von **StAx-35R (10)** gebunden an β -Catenin. Die stabilisierende Kohlenwasserstoffverbrückung im Abstand $i,i+4$ (rot) und die interagierenden Reste sind hervorgehoben. PDB: 4DJS (b) Struktur von **ATSP-7041 (11)** im Komplex mit MDMX. Die interagierende Kohlenwasserstoffverbrückung ($i,i+7$; rot) sowie die Seitenketten der interagierenden Aminosäuren sind explizit gezeigt. PDB: 4N5T. *N*- bzw. *C*-Termini der Peptidsequenzen sind gekennzeichnet und die Struktur der unnatürlichen Aminosäure **Z** ist dargestellt.

Der Einbau α -methylierter Kohlenwasserstoffverbrückungen verbessert im Allgemeinen die biologische Verfügbarkeit der Peptidsequenzen.^{16,141} Durch die erhöhte Helizität der Peptidmimetika im Vergleich zum Ursurspeptid wird die Bindungsaffinität zum Zielprotein gesteigert, da durch die Vororganisation der Sekundärstruktur die bei der Bindung auftretenden entropischen Verluste minimiert werden. Darüber hinaus erhöht die Vororganisation der Peptidsequenz in vielen Fällen die Stabilität gegenüber Proteasen. Allerdings reicht bei langen Peptidsequenzen die stabilisierende Wirkung nur einer kovalenten Verknüpfung nicht immer aus um die gesamte Sequenz zu stabilisieren.¹⁴² In solchen Fällen kann das Einbringen einer weiteren Kohlenwasserstoffverbrückung hilfreich sein.^{120,121} Darüber hinaus kann die proteolytische Stabilität von Peptiden durch den Einbau unnatürlicher Aminosäuren vergrößert werden.¹⁰⁸ Insbesondere durch den Einsatz von β -Aminosäuren^{10,108,143}, D-Aminosäuren^{144,145} oder die *N*-Methylierung^{146,147} von Peptidbindungen konnte die Stabilität gegenüber Proteasen gesteigert werden. Die Modifikation des Ausgangs-peptids zu Gunsten

erhöhter Proteaseresistenz ist jedoch in vielen Fällen mit einer reduzierten Bindungsaffinität verbunden.^{10,143} Da die biologisch aktive Konformation von Peptiden essentiell für ihre Funktionalität ist,⁸ sollte der Einbau stabilisierender Modifikation unter Berücksichtigung der Konformation geschehen. Während die *N*-Methylierung von Peptidbindungen in kleinen zyklischen Peptiden die Population einer biologisch aktiven Konformation stark erhöhen kann,¹⁴⁸ führt sie bei der Nachahmung von Sekundärstrukturelementen durch den Verlust von essentiellen Wasserstoffbrücken teilweise zu reduzierter Affinität.

Zu der interessantesten, wenngleich auch am kontroversesten diskutierten Eigenschaft von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden zählt die erhöhte Zellgängigkeit.^{149–151} Die zelluläre Aufnahme von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden wurde in frühen Studien zumeist in ausgehungerten Zellen und unter Verwendung von Serum-freien Bedingungen untersucht.^{152–154} Diese Bedingungen scheinen die zelluläre Aufnahme zu begünstigen und führten teilweise zu falsch positiven Ergebnissen.^{153,154} Die geringe Zellgängigkeit Peptid-basierter Therapeutika ist seit langem bekannt und limitiert in vielen Fällen ihre Anwendung.¹⁵⁵ Ein ausreichend verstandenes Rational zur zellulären Aufnahme von Peptiden im Allgemeinen und α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide im Besonderen ist bisher noch nicht vorhanden. In vielen Fällen wird versucht die biologisch aktiven, nicht zellgängigen Peptidsequenzen mit zellgängigen Peptiden zu kombinieren oder die Zellgängigkeit durch Modifikation der Peptidsequenz zu erhöhen.^{9,156,157} Als Grundregel wird in vielen Beispielen die Minimierung einer negativen Gesamtladung durch den Einbau positiv geladener Aminosäuren propagiert.^{134,150,158} Dies zerstörte jedoch in einigen Fällen die Membranintegrität der untersuchten Zellen.¹⁵³ Zudem scheint die Architektur der Verbrückung und ihre Position ebenfalls einen großen Einfluss auf die Zellgängigkeit der Peptide zu haben.¹⁵⁰ Generell besitzen α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide zwar eine erhöhte Tendenz zur zellulären Aufnahme, der alleinige Einbau einer solchen Verbrückung führt jedoch nur in seltenen Fällen zum Erfolg. Parallel mit dem Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung sollte in jedem Fall eine Sequenzoptimierung einhergehen, um die gewünschten Eigenschaften des Peptids zu erreichen.¹⁶

3 Die Ras–Superfamilie kleiner GTPasen

Zur Ras–Superfamilie kleiner GTPasen gehören mehr als 150 Proteine, die als molekulare Schalter zahlreiche essentielle zelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose, die Organisation des Zytoskeletts sowie den Membran- und den vesikulären Transport kontrollieren.^{159,160} Kleine GTPasen sind monomere, globuläre Proteine mit einer konservierten GTP/GDP bindenden Domäne (G-Domäne) und einem Molekulargewicht von 20 – 30 kDa.¹⁵⁹ In ihrer Funktion als molekulare Schalter stimulieren oder inaktivieren kleine GTPasen zelluläre Signalwege und wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, die sich durch konformationelle Änderungen in den sog. *Switch-I*- und *Switch-II*-Regionen unterscheiden.^{161,162} Da kleine GTPasen ihr Nukleotid mit sehr hoher Affinität (picomolar) binden¹⁶³ und ihre intrinsische Hydrolyserate gering ist, sind sie bei ihrer Aktivierung und Deaktivierung auf die Hilfe von regulatorischen Proteinen angewiesen (Abbildung 10).^{164,165} Nukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) binden an die inaktive Form und katalysieren den Austausch von GDP zu GTP. Dabei ermöglichen sie die Freisetzung von GDP, indem sie einen stabilen, nukleotidfreien (NF) Komplex mit der GTPase bilden. Dieser intermediäre Komplex wird durch die Bindung von GTP, welches zellulär in ca. zehnfach höherer Konzentration vorliegt, aufgelöst und die aktivierte GTPase freigesetzt. In ihrer aktivierten Form interagieren kleine GTPasen mit einer Vielzahl an Effektoren und aktivieren auf diese Weise nachgeschaltete Signalwege. Die Deaktivierung erfolgt mit Hilfe GTPase-aktivierender Proteine (*GTPase activating proteins*, GAPs). Nach der Bindung an die aktivierte GTPase beschleunigen GAPs die intrinsische Hydrolyse von GTP indem sie eine essentielle katalytische Gruppe bereitstellen. Nahezu alle kleinen GTPasen sind mittels eines Lipidankers in der Membran verankert. Die Prenylierung erfolgt durch posttranslationale Modifikation der hypervariablen Region (HVR) des C-Terminus. Die Lipidierung der kleinen GTPasen erfolgt durch gezielte Ausbildung von Cysteinylthioethern (irreversibel) oder Cysteinylthioestern (reversibel) und ermöglicht eine kontrollierte Verteilung innerhalb der Zelle.^{166,167} Dazu binden Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs) die lipidierte GTPase unter Bildung eines löslichen Komplexes, welcher zum einen den Transport von GTPasen zwischen spezifischen Membranen ermöglicht und zum anderen die kleine GTPase in ihrem inaktiven Zustand im Zytosol zurückhält (Abbildung 10).^{164,165}

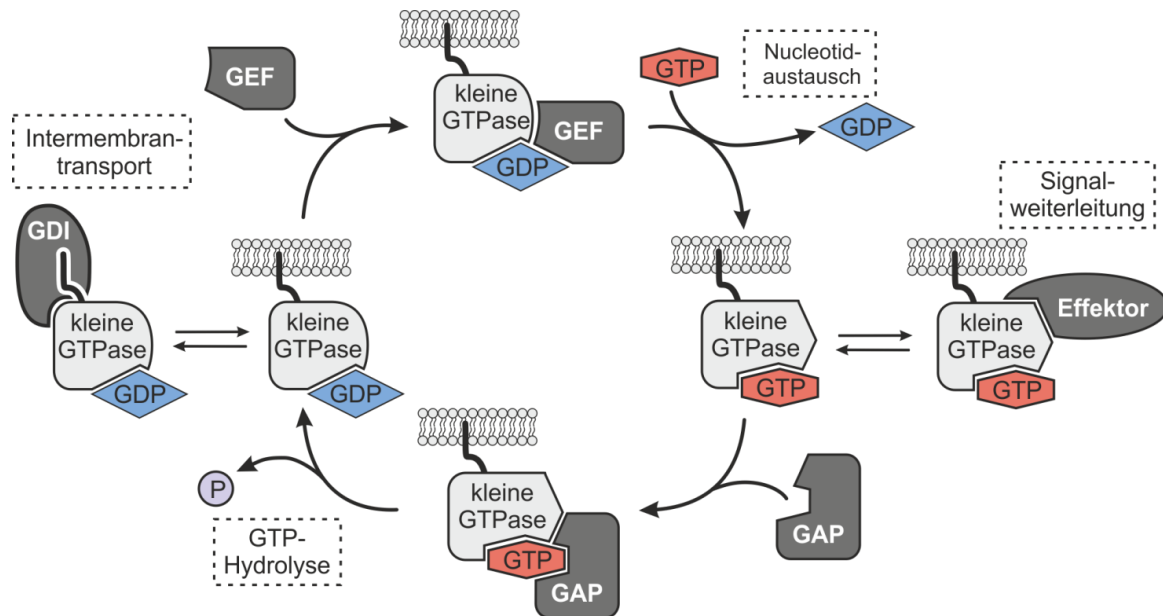


Abbildung 10. Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus kleiner GTPasen in Anlehnung an Cromm *et al.*²³ Inaktivierte, GDP-gebundene GTPasen werden durch GEF-vermittelten Nucleotidaustausch aktiviert. In ihrer aktivierten, GTP-gebundenen Form wechselwirken sie mit Effektorproteinen und leiten zelluläre Signale weiter. Die Bindung von GAPs steigert die intrinsische Hydrolyserate und deaktiviert die kleinen GTPasen unter Freisetzung eines Phosphats. Die Bindung von GDIs solubilisiert die membrangebundenen kleinen GTPasen und ermöglicht den intrazellulären Transport zwischen Membranen.

Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen verdankt ihren Namen den Ras Protoonkogenen, die bereits vor mehr als 30 Jahren entdeckt und mit der Entstehung von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wurden.¹⁶⁸ Die drei humanen Ras Proteine, *Harvey-Ras (H-Ras)*,¹⁶⁹ *Kirsten-Ras (K-Ras)*¹⁷⁰ und *Neuroblastoma-Ras (N-Ras)*¹⁷¹ sind die Mitbegründer dieser großen Superfamilie, die sich in fünf große Familien, sowie zahlreiche Unterfamilien unterteilen lässt (Abbildung 11). Die fünf Familien sind die Ras-, Rho-, Rab-, Arf- und Ran-Familie welche jeweils unterschiedliche biologische Funktionen ausüben.^{159,172,173} Zur Ras-Familie gehören insgesamt 39 Mitglieder in Säugetieren und sie beinhaltet neben den drei humanen Ras Isoformen *H-*, *K-* und *N-Ras* die Unterfamilien der Rap-, Ral- und RheB-Proteine.¹⁷⁴ Sie sind Schlüsselregulatoren der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und des Zellüberlebens. Die Rho-Familie (*Ras homologous*) umfasst 22 Mitglieder, die Aktinorganisation, Zellform und Zellpolarität, Zellbewegung, Genexpression sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen steuern.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Zur Rho-Familie gehören u.a. die drei Unterfamilien der Rho- und Rac-Proteine, sowie Cdc42. Als Hauptregulatoren des intrazellulären Transports fungieren die kleinen GTPasen der Rab- (*Ras related in brain*) und Arf- (*ADP Ribosylierungsfaktor*) Familie.^{178,179} Rab-GTPasen sind Schlüsselregulatoren des intrazellulären Vesikel- und Membrantransports und repräsentieren mit mehr als 60 identifizierten Proteinen im menschlichen Organismus die größte Familie der kleinen GTPasen.^{180,181} Ebenfalls für den Vesikeltransport sowie die Regulation der Endozytose und der Sekretionswege verantwortlich sind die kleinen GTPasen der Arf-Familie, die 30 Proteine zählt. Mit nur einem Vertreter ist die Ran- (*Ras-related nuclear protein*) Familie die kleinste Familie der kleinen GTPasen. Die Ran-GTPase liegt zudem nicht membrangebunden sondern frei im Zytosol vor. Sie steuert den Zellkerntransport durch den Kernporenkomplex und die Ausbildung der

mitotischen Spindel.^{182,183} Ran wird mit Hilfe eines räumlichen Gradienten zwischen nuklearen GEFs und zytosolischen GAPs reguliert.

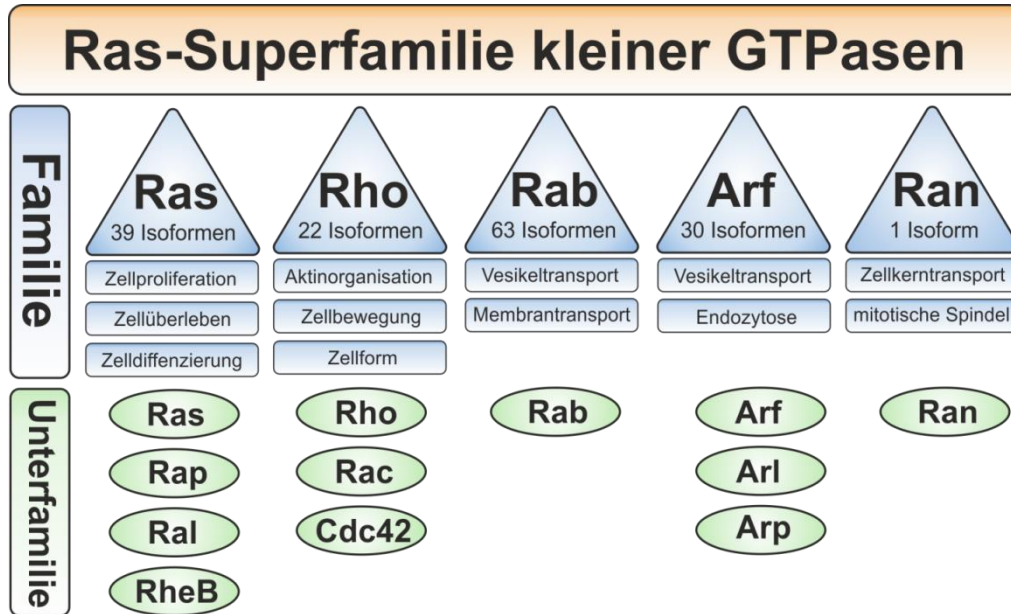


Abbildung 11. Ras-Superfamilie kleiner GTPasen. Die Ras-Superfamilie kleiner GTPasen (orange) beinhaltet die fünf Familien (blau) der Ras-, Rho-, Rab-, Arf-, Ran-GTPasen. Jede GTPase-Familie kontrolliert bestimmte zelluläre Funktionen. Die fünf GTPase-Familien sind ihrerseits in Unterfamilien aufgeteilt (grün). Zur Vereinfachung und besseren Übersicht sind nur die bekanntesten Unterfamilien aufgeführt.

Durch die Regulation vieler essentieller zellulärer Prozesse und Signalwege sind die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie unersetzbar für die korrekte Funktion der Zelle. Eine Fehlregulation dieser molekularen Schalter ist daher mit der Entstehung und Entwicklung zahlreicher Krankheiten assoziiert. Darunter befinden sich diverse Formen von Krebs, neurodegenerative Krankheiten, Entzündungen und Erbkrankheiten. Als Hauptursache wurde in diesem Zusammenhang eine verstärkte und unkontrollierte Aktivität kleiner GTPasen identifiziert, die zu einer übermäßigen und kontinuierlichen Aktivierung ihrer nachgeschalteten Signalwege führt. In den meisten Fällen lässt sich die permanente Aktivität der kleinen GTPasen auf drei unterschiedliche Ursachen zurückführen: 1) Eine übermäßige Aktivierung der vorangeschalteten Signalwege führt zu einer gesteigerten GEF-Aktivität und somit zu einem erhöhten Niveau an aktiver Wildtyp-GTPase; 2) Eine Mutation im Gen der kleinen GTPase erzeugt eine Hydrolyse inkompetente Variante, die einmal aktiviert kontinuierlich aktiv bleibt; 3) Die GAP-vermittelte Hydrolyse ist durch einen Verlust der GAP-Funktion stark beeinträchtigt, sodass nur ein geringer Anteil der aktivierten GTPasen inaktiviert wird.¹⁸⁴ Die Häufigkeit mit der diese Aktivierungsmuster in den einzelnen GTPase Familien auftreten variiert jedoch sehr stark. Während sich in der Mehrheit der Krebsformen, die auf konstitutiv aktiviertes Ras zurückzuführen sind, eine Mutation in den Ras-Genen finden lässt, sind die GTPasen der Rho-Familie nur in den seltenen Fällen direkt von einer Mutation betroffen. Sie werden bei Krebskrankheiten durch eine Überexpression oder Mutation von Wachstumsfaktorrezeptoren oder vorangeschalteter Signalwege verstärkt aktiviert.¹⁸⁵

3.1 Die Rab–Familie

Die Familie der Rab–GTPasen repräsentiert mit mehr als 60 identifizierten Proteinen im menschlichen Organismus den größten Zweig der Ras–Superfamilien kleiner GTPasen.^{178,180,186} Rab–GTPasen sind monomere, globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von 21–25 kDa. Ihr Aufbau entspricht dem der klassischen G-Domäne mit sechs β -Faltblättern (β_1 – β_6), umgeben von fünf α -Helices (α_1 – α_5), wie sie bei allen Mitgliedern der Ras–Superfamilie auftritt (Abbildung 12).¹⁸⁷ Ebenfalls dazu gehören die Phosphat bindende Schleife (*P-loop*) sowie die beiden flexiblen *Switch*-Regionen (*Switch-I* und *Switch-II*), die je nach Nukleotidbindezustand unterschiedliche Konformationen einnehmen (Abbildung 12a). Neben den in allen kleinen GTPasen konservierten Elementen der G-Domäne besitzen Rab–GTPasen zusätzliche Erkennungssequenzen. Der Vergleich von zahlreichen Rab–Sequenzen führte zur Identifikation konservierter Bereiche, der Rab–Familien Motive (RabF1–RabF5), die eine Abgrenzung von Rab–Proteinen gegenüber anderen Mitgliedern der Ras–Superfamilie erlauben (Abbildung 12b).¹⁸⁸ Die RabF–Motive befinden sich in der Umgebung der *Switch*-Regionen und sind innerhalb der Rab–Familie hoch konserviert. Die ebenfalls per Sequenzanalyse identifizierten Rab–Subfamilienmotive (RabSF1–RabSF4) erlauben zudem eine Einteilung der Rab–Familie in bis zu zehn Unterfamilien.¹⁸⁸ Zu den am stärksten abweichenden Regionen zählt die C-terminale HVR. Sie kontrolliert zusammen mit dem Prenylierungsmuster die zelluläre Lokalisation von Rab–GTPasen und dirigiert sie zu bestimmten Membranen und Kompartimenten.¹⁸⁰ Die meisten menschlichen Rab–GTPasen sind C-terminal über zwei Geranylgeranyl-Gruppen in der Membran verankert. Es sind aber auch Rab–GTPasen mit nur einer Geranylgeranyl-Gruppe bekannt.

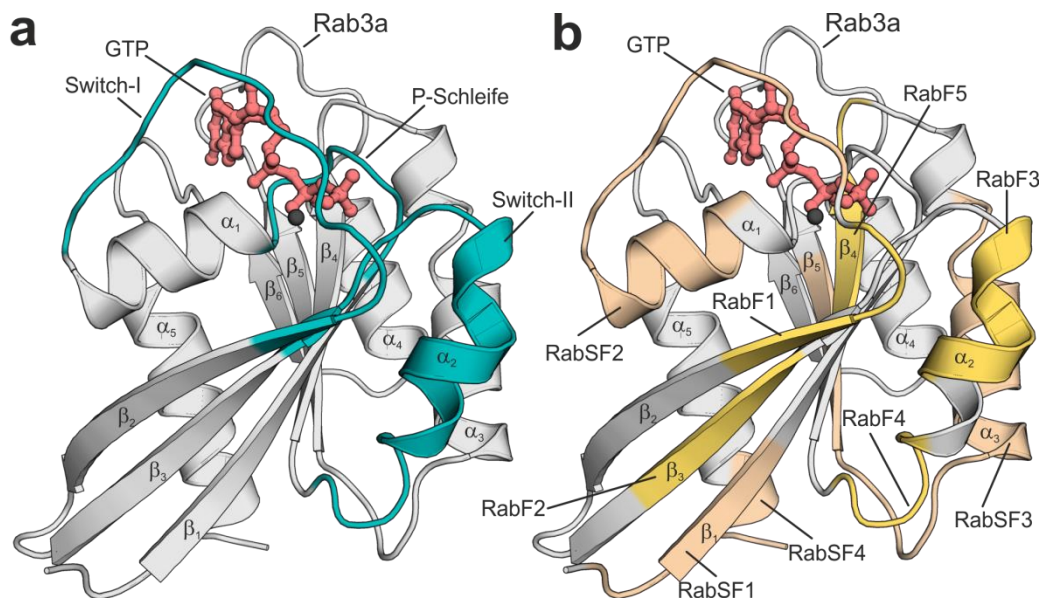


Abbildung 12. Kristallstruktur von Rab3a-GppNHp. Die sechs β -Faltblätter (β_1 – β_6) und fünf α -Helices (α_1 – α_5) der G-Domäne sind explizit gekennzeichnet. Das nicht hydrolysierbare GTP Analogon GppNHp (rot) und das Magnesium Ion (dunkelgrau) sind farblich hervorgehoben. (a) Die *Switch-I*- und *Switch-II*-Regionen sowie die *P*-Schleife sind türkis gekennzeichnet. (b) Die Rab–Familien Motive (RabF1–RabF5) sind in gelb, die Rab–Subfamilienmotive in orange dargestellt. PDB: 3RAB.

Nach ihrer Expression liegen Rab-GTPasen zunächst in ihrer GDP-gebundenen Form im Cytosol vor, wo sie vom Rab-Escort Protein (REP) gebunden werden. Dieser stabile Komplex dient als Substrat für die Rab-Geranylgeranyl-Transferase (Rab-GGT), die die Rab-Proteine geranylgeranyliert. Die prenylierten Rab-Proteine bleiben an REP gebunden, welches die GTPasen an ihrer Zielmembran freisetzt. Dort werden sie durch Rab-spezifische GEFs aktiviert. Trotz der großen Zahl an Rab-GTPasen wurden bisher nur vier unterschiedliche Typen von RabGEFs identifiziert.¹⁶⁵ Die Mehrheit der RabGEFs besitzt entweder eine DENN- (*differential expressed in normal and neoplastic cells*) Domäne (18 identifizierte Proteine)¹⁸⁹ oder eine Vsp9-Domäne (10 identifizierte Proteine)¹⁹⁰, die von anderen Domänen flankiert, Bestandteile großer Proteinkomplexe sind. Im Gegensatz dazu stehen die RabGEFs Rabin8¹⁹¹ und der TRAPP- (*Transport protein particle*) Komplex¹⁹², die als homodimere Komplexe mit hoher Substratspezifität auftreten. Da die intrinsische Hydrolyserate von Rab-Proteinen nicht ausreicht um sie effektiv zu inaktivieren, werden spezifische RabGAPs benötigt, die die Hydrolysegeschwindigkeit durch die Bildung eines Rab-RabGAP Komplexes erhöhen. Alle bisher identifizierten RabGAPs besitzen eine TBC-(Tre2/Bub2/Cdc16) Domäne und können trotz teils deutlicher struktureller Unterschiede mit mehreren Rab-Proteinen interagieren.¹⁹³ In ihrer aktivierten Form sind Rab-GTPasen in der Lage Effektor-Proteine zu rekrutieren und so das GTPase Signal an nachgeschaltete Signalwege/Proteine weiterzuleiten. Rab-Effektoren sind Proteine mit der Fähigkeit spezifische Rab-Proteine selektiv in ihrer GTP-gebundenen Form zu binden. Dabei können einzelne Rab-Proteine mit einer Vielzahl an Effektoren interagieren und auf diese Weise mehrere biochemische Prozesse an unterschiedlichen Orten kontrollieren. Für aktiviertes Rab5 wurden beispielsweise mehr als 20 verschiedene Effektor-Proteine identifiziert.¹⁹⁴ Ebenso wie ein Rab-Protein mit mehreren Effektoren wechselwirken kann, kann ein Effektor auch unterschiedliche Rab-GTPasen binden.^{195,196} Die exakte zelluläre Funktion der Rab-GTPasen und ihrer Effektoren ist somit wesentlich von ihrer jeweiligen subzellulären Lokalisation abhängig und ermöglicht es ihnen unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Organellen wahrzunehmen.¹⁷⁸ Sind die Rab-GTPasen durch das Ausüben ihrer Funktion in verschiedene Zellkompartimente oder andere Membranen gewandert, benötigen sie die Hilfe von Rab spezifischen GDIs. RabGDIs extrahieren die prenylierten Rab-GTPasen aus der Membran unter Bildung löslicher Komplexe. Sie ermöglichen den Rücktransport der Rab-Proteine zur Donormembran und sorgen für die korrekte subzelluläre Lokalisation der Rab-GTPasen.

Rab-GTPasen fungieren als Schlüsselregulatoren des Vesikulären- und Membrantransports. Sie kontrollieren zusammen mit den SNARE-Komplexen zahlreiche Prozesse wie die Vesikelbildung an der Donormembran, das Sortieren des Transportguts, den Transport der Vesikel entlang des Zytoskeletts sowie das Anheften und Verschmelzen der Vesikel mit der Akzeptormembran des Zielkompartiments. Dabei sitzen die Rab-GTPasen auf der Oberfläche der Vesikel und regulieren durch Kontakt mit ihren zahlreichen Effektoren den exo- und endozytotischen Transport, den Transport zwischen einzelnen Zellkompartimenten und Organellen, sowie das Recycling von Membranen.^{178,180} Dazu gehören essentielle Prozesse, wie die Freisetzung von Botenstoffen und die Regulation des Zellmetabolismus. Folglich wird eine Fehlregulation von Rab-GTPasen zunehmend mit zahlreichen menschlichen Krankheiten wie Diabetes, neurodegenerative

Krankheiten sowie verschiedene Formen von Krebs assoziiert.^{197,198} Die Fehlregulationen der Rab–GTPasen gehen zum einen auf direkte Mutationen der Rab Gene zurück, zum anderen kommen sie auch durch Ausfälle der regulatorischen Proteine wie GEFs, GAPs oder GDIs zustande. So führt ein Funktionsverlust von Alsln, einem GEF für Rab5, zu einer verminderten Rab5 Aktivität, die im Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, unter anderem dem ALS Syndrom, steht.^{197,199} Mutationen des Rab3–GAP Proteins stehen in direkter Verbindung mit dem *Warburg-Micro* Syndrom und dem *Martsof* Syndrom, die eine abnormale Entwicklung der Augen sowie des zentralen Nervensystems hervorrufen und mit starker geistiger Behinderung einhergehen.²⁰⁰ Eine eingeschränkte Funktionalität von RabGDI- α , das bevorzugt im Gehirn exprimiert wird, steht im Zusammenhang mit dem Fragilen-X-Syndrom (*X-linked mental retardation*), einer der häufigsten Ursachen erblich bedingter kognitiver Behinderung des Menschen.^{178,197} Matrix-Metalloproteinasen (MMP) spielen eine Schlüsselrolle bei der Invasion und der Metastasierung von Krebszellen indem sie gezielt Gewebebarrieren abbauen. Erhöhte Rab8 Level aufgrund konstitutiver Aktivierung von Rab8 konnten mit einer verstärkten Sekretion von MT1-MMP in Verbindung gebracht werden. Ein *knock-down* von Rab8a führte hingegen zu einer Blockierung des MT1-MMP bedingten Kollagenabbaus.²⁰¹ Rab8 kontrolliert den exozytotischen Transport vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran und beeinflusst damit die Sekretion von Enzymen oder Rezeptoren. Es ist an der Translokation des Glukosetransportes Glut4 beteiligt, dem eine wichtige Rolle bei Typ 2 Diabetes zukommt.²⁰² Da die Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetes u.a. mit einer verminderten Translokation von Glut4 an der Plasmamembran zusammenhängt, werden Rab–GTPasen in diesem Zusammenhang verstärkt untersucht.

3.2 Guaninnukleotiddissoziationsinhibitoren

Über posttranslationale Modifikation der C-terminalen HVR sind die meisten kleinen GTPasen fest mit der Plasmamembran verankert. Dabei werden ein oder mehrere Cysteinreste der HVR prenyliert (Farnesyl– oder Geranylgeranyl-Thioether) und anschließend carboxymethyliert. Um dennoch eine kontrollierte räumliche und zeitliche Verteilung sowie den Transport von kleinen GTPasen innerhalb der Zelle zu ermöglichen, binden GDIs die prenylierten GTPasen unter Bildung eines löslichen Komplexes, indem das unlösliche Lipid vom Lösemittel abgeschirmt wird. In Säugetieren wurden bisher nur wenige GDIs identifiziert, die sich in drei unterschiedliche Familien einteilen lassen: Rho–GDIs (3 Isoformen), Rab–GDIs (3 Isoformen) sowie PDE δ .¹⁶⁵ Während RhoGDIs^{203,204} und RabGDIs^{205,206} geranylgeranylierte Proteine der Rho– bzw. Rab–Familie binden, bevorzugt PDE δ ^{207,208} farnesylierte GTPasen (Abbildung 13). Die beiden Hauptaufgaben von GDIs sind einerseits der Intermembrantransport, darüber hinaus halten GDIs die GTPase in einem inaktiven, löslichen Komplex gefangen und verhindern so ihre Aktivierung durch GEFs.

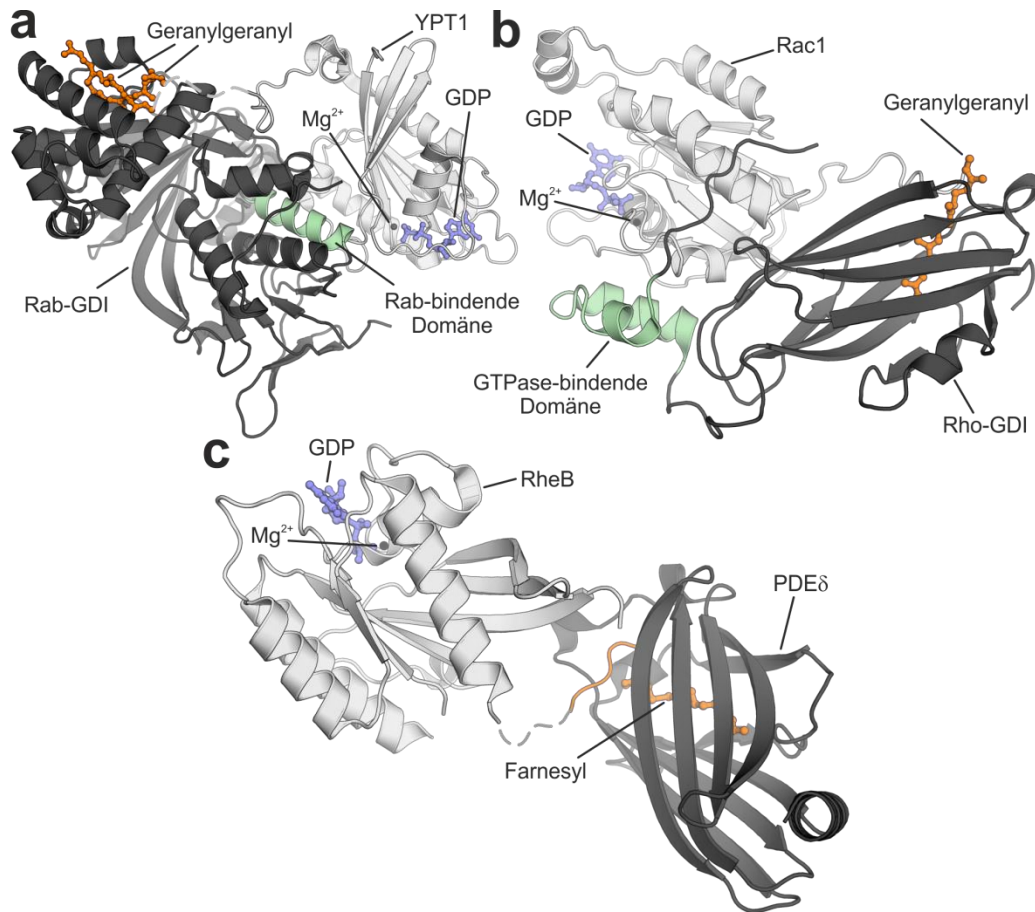


Abbildung 13. Kristallstrukturen von GDIs.¹⁶⁵ (a) Rab-GDI. Kristallstruktur des Komplexes zwischen dem Rab1 Analogon YPT1-GDP (hellgrau) und Rab-GDI (dunkelgrau). Die Rab-bindende α -helikale Domäne (hellgrün), die beiden Geranylgeranyl-Reste (orange), GDP (blau) und Magnesium (dunkelgrau) sind farblich hervorgehoben. PDB: 2BCG (b) Rho-GDI. Komplex zwischen Rac1-GDP (hellgrau) und Rho-GDI (dunkelgrau). Das GTPase bindende α -Helix Bündel (hellgrün), der Geranylgeranyl-Rest (orange), GDP (blau) und Magnesium (dunkelgrau) sind eingefärbt. PDB: 1HH4 (c) PDE- δ . Komplex zwischen RheB-GDP (hellgrau) und PDE δ (dunkelgrau). Die Farnesylgruppe (orange), GDP (blau) und Magnesium (dunkelgrau) sind farblich gekennzeichnet. PDB: 3T5G. Gestrichelte Linien deuten die nicht aufgelösten Verbindungen zwischen den GTPasen und den Prenylgruppen an.

Die drei GDI-Familien Rab-GDI, Rho-GDI und PDE δ unterscheiden sich in ihrer Struktur sowie dem Mechanismus der GTPase-Bindung. Rab-GDIs bestehen aus zwei Domänen, von denen eine den geranylgeranylierten C-Terminus bindet (α -helikale Domäne) und die andere den Nukleotidbindezustand der GTPase durch Bindung an die *Switch*-Regionen erkennt (Abbildung 13a).²⁰⁵ Da sowohl die RabF-Motive in der Nähe der *Switch*-Regionen, wie auch die interagierenden Reste der GDI Domäne hoch konserviert sind, ist es möglich, dass drei GDI Isoformen ausreichen, um die mehr als 60 humanen Rab-GTPasen selektiv zu binden. Wie Rab-GDIs bestehen Rho-GDIs strukturell aus zwei Domänen, einem N-terminalen α -Helix-Bündel, welches mit der *Switch*-Region der GTPase interagiert und einem C-terminalen Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich, das bei Kontakt mit der GTPase einen hydrophoben Hohlraum öffnet, der die Geranylgeranyl-Gruppe aufnimmt (Abbildung 13b).^{209–211} Im Gegensatz zu Rho-GEFs oder Rho-GAPs mit jeweils über 60 bekannten Vertretern¹⁸⁵ sind lediglich drei Rho-GDIs mit einer geringen Substratspezifität bekannt.²⁰³ Im Gegensatz zu Rab-GDIs und Rho-GDIs besteht PDE δ nur aus einer Lipid bindenden β -

Sandwich Domäne, die farnesylierte Proteine, insbesondere GTPasen der Ras–Familie, zwischen den Membranen transportiert und in Lösung hält (Abbildung 13c).²⁰⁷ Da PDE δ keine GTPase-bindende Domäne besitzt, erkennt es seine Substrate nur an ihrem farnesylierten C-Terminus, was die geringe Spezifität und die Bindung von weiteren Proteinen (keine kleinen GTPasen) erklärt.²¹²

3.3 Uncoordinated (UNC) 119

Neben den kleinen GTPasen der Ras–Superfamilie gibt es eine große Anzahl an Proteinen die kovalent mit einem Lipid verknüpft sind. Anhand ihrer Lipidmodifikation lassen sich diese Proteine grob in zwei Kategorien einteilen. Zum einen Proteine, die im Lumen des sekretorischen Weges bzw. der Zelloberfläche auftreten, zum anderen Proteine, die im Zytoplasma bzw. an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran zu finden sind. Während die Proteine der Zelloberfläche im Regelfall mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker verknüpft sind,²¹³ tragen die Proteine des Zytoplasmas zumeist eine von drei gängigen Lipidmodifikationen: S-Palmitoylierung, Prenylierung oder N-Myristoylierung. S-Palmitoylierung beschreibt die kovalente Verknüpfung einer Cystein-Seitenkette mit Palmitinsäure (C16) unter Bildung eines reversiblen Thioesters.^{214,215} Bei der Prenylierung von Proteinen wird ein Isoprenoid, entweder eine Farnesyl- (C15) oder eine Geranylgeranyl-Gruppe (C20), als Thioether irreversibel auf eine Cystein-Seitenkette übertragen.²¹⁶ Bei der N-Myristoylierung wird Myristinsäure (C14) durch Acylierung eines N-terminalen Glycinrestes übertragen.^{217,218} Als Erkennungssequenz dient ein N-terminales Met-Gly Motiv. Nach dem Abbau des Methionins durch die Methionin Aminopeptidase wird die Myristinsäure von der N-Myristoyl Transferase (NMT) auf Gly2 mittels einer Amid-Bindung übertragen.

Nahezu alle lipidierten Proteine müssen mit der Plasmamembran assoziieren um als Signalproteine effektiv funktionieren zu können. Dazu reicht eine einzelne Lipidmodifikation meist nicht aus. Daher tragen diese Proteine entweder eine zweite Lipidmodifikation oder ein polybasisches Motiv, das durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Plasmamembran eine zusätzliche Membranverankerung gewährleistet.²¹⁹ Um einen effektiven Transport dieser lipidierten Proteine zu gewährleisten sind sie auf die Hilfe von lipidbindenden Proteinen angewiesen. Zu diesen Transportproteinen zählen u.a. die bereits in Abschnitt 3.2 diskutierten GDIs, die für den Transport kleiner GTPasen essentiell sind. Für den Transport von myristoylierten Proteinen wurden die Lipid-bindenden Proteine UNC119a (*uncoordinated*), auch HRG4 (*human retina gene 4*) genannt, und UNC119b identifiziert.^{220,221}

UNC119a und UNC119b sind homologe Proteine zu PDE δ . Sie bestehen ebenfalls aus einem Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich und haben ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa.²²² Das Immunoglobulin-ähnliche β -Sandwich formt einen hydrophoben Hohlraum bestehend aus neun β -Faltblättern (Abbildung 14a), der in der Lage ist einen Lipidrest aufzunehmen. Die Co-Kristallstruktur mit einem lauroylierten (C12) N-terminalen Peptid der α -Untereinheit von Transducin, Gnat1, zeigt, wie der

Lipidrest sowie die ersten sechs Aminosäuren des Peptids tief in die hydrophobe Tasche von UNC119 hineinragen und die sechs *N*-terminalen Aminosäuren eine α -helikale Konformation einnehmen (Abbildung 14b).²²²

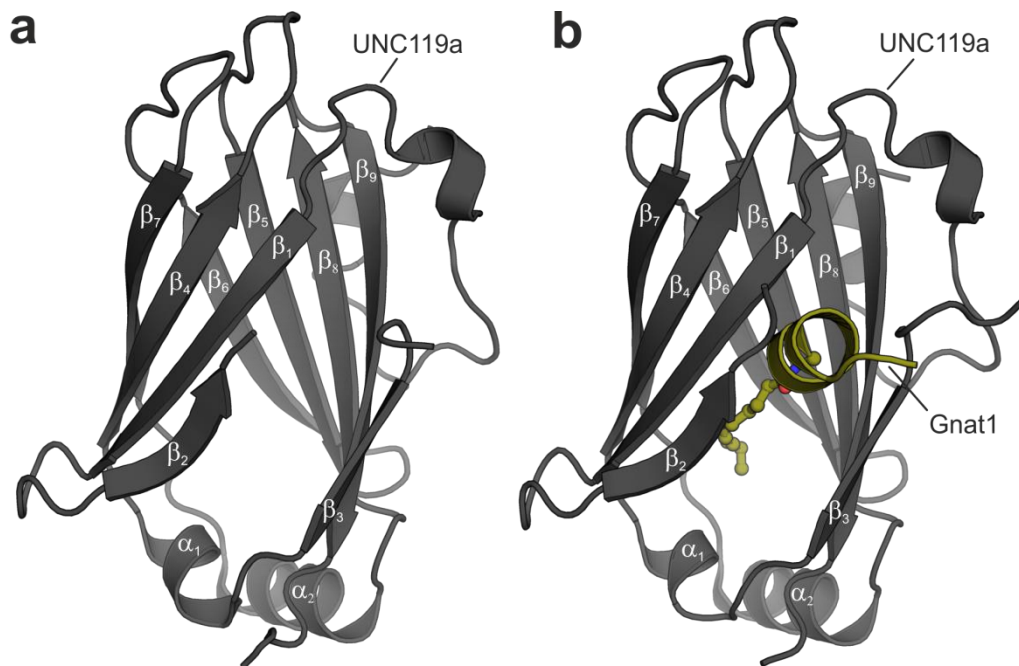


Abbildung 14. Kristallstruktur von UNC119a. (a) Kristallstruktur von UNC119a (dunkelgrau). Die neun β -Faltblätter des Immunoglobulin-ähnlichen β -sandwich bilden die Lipidbindetasche und sind explizit benannt. Die β -Faltblätter β_3 - β_4 und β_7 - β_8 sind durch die kurzen α -Helices α_1 und α_2 verknüpft. PDB: 3GQQ (b) Co-Kristallstruktur von UNC119a (dunkelgrau) mit dem laurylierten *N*-terminalen Peptid der α -Untereinheit von Transducin, Gnat1 (grün). PDB: 3RBQ.

UNC119a interagiert mit einer Vielzahl verschiedener Proteine wie beispielsweise die α -Untereinheiten von Transducin, Tyrosin-Kinasen des Src-Typs, Protein Kinasen, Arl-GTPasen sowie einigen anderen Proteinen.²²³ Insbesondere die Interaktion mit den α -Untereinheiten von Transducin ist durch *GST-Pulldown* und ITC (Isotherme Titrationskalorimetrie)-Experimente detailliert charakterisiert. Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion von UNC119 und den beiden myristoylierten Proteinen des Ciliums, Cystins und NPHP3, nachgewiesen werden.²²⁴ UNC119b ist für den Transport von myristoylierten Proteinen wie NPHP3 in das Cilium zuständig. Die Freisetzung der Proteine im Cilium erfolgt durch Bindung von Arl3.²²⁴ Die kleine GTPase Arl3 konnte in ihrer aktivierten Form im Komplex mit UNC119 Co-kristallisiert werden.²²⁵ Ferner ist UNC119 ein Aktivator und Regulator einiger Tyrosin-Kinasen des Src-Typs.²²⁶ UNC119a aktiviert diese Kinasen durch Interaktion mit seinen SH2- und SH3-Domänen (*Src* homology Domänen 2 und 3), die den Phosphorylierungszustand bestimmter Tyrosinreste der Kinase erkennen. Außerdem reguliert UNC119a den Transport einiger *N*-myristoylierter Tyrosin-Kinasen des Src-Typs wie z.B. Lyn, Lck oder Fyn. siRNA *knock-down* von UNC119a steht in direktem Zusammenhang mit einem nicht vollständigen Ablauf der Zytokinese.²²⁷ Eine vollständige Zellteilung schlägt fehl, da durch den Ausfall von UNC119a essentielle Proteine der Zellteilung, wie die Tyrosin-Kinase Fyn, nicht an die richtige Position in der Zelle transportiert werden können.

3.4 Modulation der Aktivität kleiner GTPasen

Durch die Kontrolle zahlreicher essentieller zellulärer Funktionen und Signalkaskaden und den damit verbundenen Erkrankungen sind die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie interessante Zielproteine für die Entwicklung von Medikamenten. Obwohl das Ras Protoonkogen bereits zu Beginn der 1980er Jahre mit Krebs in Verbindung gebracht wurde,¹⁶⁸ konnten trotz großer Anstrengungen in akademischer und industrieller Forschung keine effektiven Modulatoren kleiner GTPasen entwickelt werden.^{22–24,228} Das direkte Adressieren von kleinen GTPasen hat sich als äußerst anspruchsvoll erwiesen, da kleine GTPasen neben ihrer Nukleotidbindetasche keine weiteren Vertiefungen für das Binden kleiner Moleküle aufweisen. Zudem sind kleine GTPasen keine funktionellen Enzyme mit aktivem Zentrum, sondern interagieren ausschließlich über PPIs. Folglich entziehen sich die kleinen GTPasen den klassischen Strategien der Wirkstoffforschung und gelten daher als pharmakologisch unzugänglich (*undruggable*).^{23,24} Dennoch helfen neue Erkenntnisse wie die Aufklärung ihrer Signalwege sowie ihrer Funktion und Regulation bei der Entwicklung neuer Strategien für Modulatoren dieser interessanten Proteinklasse.²⁵ Vor allem mit Hilfe von computergestützten Methoden und neuen Kristallstrukturen beginnt sich die klassische „An/Aus“-Vorstellung von der starren kleinen GTPase zu verändern.^{229–232} Vielmehr ist davon auszugehen, dass auf der Oberfläche der kleinen GTPasen immer wieder kurzlebige Taschen entstehen, die durch kleine Moleküle adressiert werden können.

Im Wesentlichen lassen sich die Ansätze zur Modulation kleiner GTPasen in vier unterschiedliche Kategorien einteilen (Abbildung 15): 1) Störung der zellulären Lokalisation von kleinen GTPasen; 2) Beeinträchtigung der Aktivierung kleiner GTPasen; 3) Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen; 4) Inhibition von GTPase-Effektor-Interaktionen.

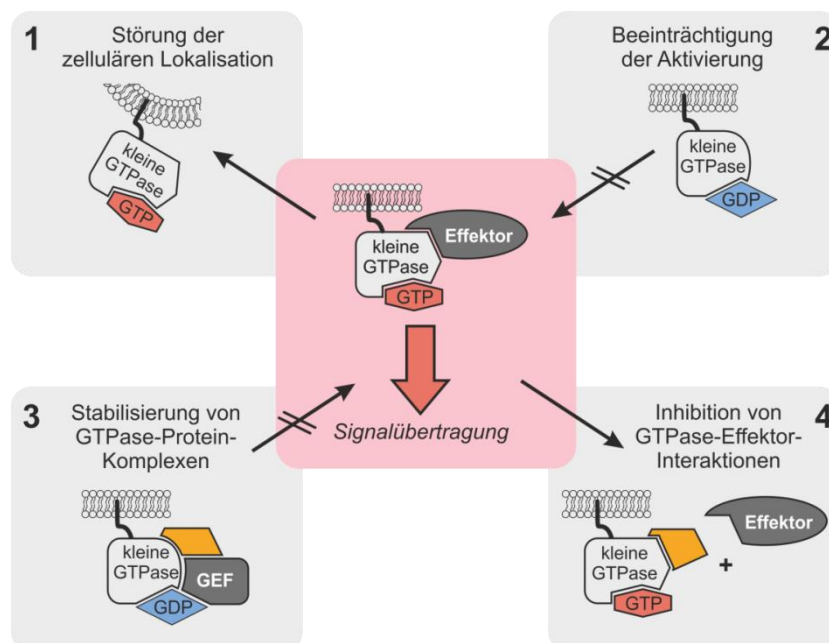


Abbildung 15. Strategien zur Modulation der Aktivität kleiner GTPasen.^{23,24} (1) Störung der zellulären Lokalisation kleiner GTPasen; (2) Beeinträchtigung der Aktivierung kleiner GTPasen; (3) Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen; (4) Inhibition von GTPase-Effektor-Interaktionen.

Störung der zellulären Lokalisation von kleinen GTPasen

Aufgrund ihrer herausragenden Rolle bei der Entstehung menschlicher Krebserkrankungen standen die Ras-Protoonkogene seit Beginn ihrer Entdeckung besonders im Fokus der Forschung.^{228,233} Da aber in den frühen Hochdurchsatzanalysen (HTS) keine effektiven Inhibitoren für Ras und andere kleine GTPasen gefunden werden konnten, konzentrierte sich insbesondere die industrielle Forschung zunächst darauf, die zeitliche und räumliche Organisation von Ras zu stören. Entscheidend für die korrekte Lokalisation von Ras-Proteinen ist die Farnesylierung der C-terminalen HVR durch die Farnesyltransferase (FT). Mit Hilfe des Membranankers werden die Ras-GTPasen in der Plasmamembran verankert und können dort ihre Aufgaben wahrnehmen. Durch die Entwicklung von Farnesyltransferase Inhibitoren (FTIs) gelang es Ras in der Zelle zu delokalisieren.²³⁴ Nach erfolgreichen vorklinischen Studien und guten Resultaten im Tiermodell, scheiterten diese Verbindungen jedoch in klinischen Studien aufgrund mangelnder Wirksamkeit im Menschen.²³⁵ Die fehlende Farnesylierung bewirkt zwar die Delokalisation von *H*-Ras, für die beiden deutlich häufiger mutierten Isoformen *K*-Ras und *N*-Ras wird die fehlende Farnesylierung jedoch durch eine Geranylgeranylierung mit Hilfe der Geranylgeranyl-Transferase I (GGT-I) kompensiert.²³⁶ Daraufhin wurden GGT-I Inhibitoren sowie duale Inhibitoren die sowohl die FT wie auch die GGT-I binden entwickelt. Einige dieser Verbindung erreichten klinische Studien, jedoch ist der Einsatz dieser Therapeutika aufgrund ausgeprägter Toxizität limitiert, sodass sie nur über ein sehr geringes therapeutisches Fenster verfügen.^{237–239} Obwohl die Lipidierung von Proteinen weiterhin von Pharmaforschung verfolgt wird,²⁴⁰ konzentriert sich die Pharmaindustrie zur Zeit vor allem auf die Inhibition von Proteinen nachgeschalteter Ras-Signalwege. Zahlreiche Kinase Inhibitoren des Raf-MEK-ERK- oder des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs sind bereits als Medikamente zugelassen. Aufgrund von Resistenzbildungen und dem Auftreten komplexer und bisher nicht vollständig verstandener Rückkopplungsmechanismen ist der Einsatz dieser Inhibitoren jedoch limitiert.^{241,242}

Das Scheitern der FTIs in späten klinischen Studien und die Ausbildung von Resistenzen führte zu einer Wiederbelebung der Ras-Forschung. Durch verbesserte Erkenntnisse der GTPase-Funktionen und Signalwege sowie zusätzliche Strukturen und neue Methoden des Inhibitor Designs erlebt das Feld der GTPase-Forschung aktuell eine Renaissance.²³ So wurde kürzlich gezielt der Rücktransport und das Recycling von Ras blockiert.²⁴ Dadurch verteilen sich die Ras-Proteine in der Zelle und es steht nur ein geringer Prozentsatz an aktiviertem Ras zur Verfügung. Die Modulation der Palmylierungs-/Depalmylierungs-Maschinerie verhindert die korrekte Lokalisation von *H*-Ras und *N*-Ras.^{243,244} Die beiden β -Lactone Palmostatin B (**12**) und M (**13**) sind durch kovalente Inhibition der Depalmylierenden Thioesterasen APT-1 und APT-2 in der Lage *H*-Ras und *N*-Ras an den Endomembranen festzusetzen (Abbildung 16).^{245–247} Die Inhibition von PDE δ ermöglicht hingegen die Störung der zeitlichen und räumlichen Orientierung von *K*-Ras.²⁴⁸ Der PDE δ Inhibitor Deltarasin (**14**), der mittels einer Fragment basierten rationalen Methode entwickelt wurde (Abbildung 16), besitzt eine niedrig nanomolare Dissoziationskonstante ($K_D = 38$ nM) und zeigt biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo*.²⁴⁸

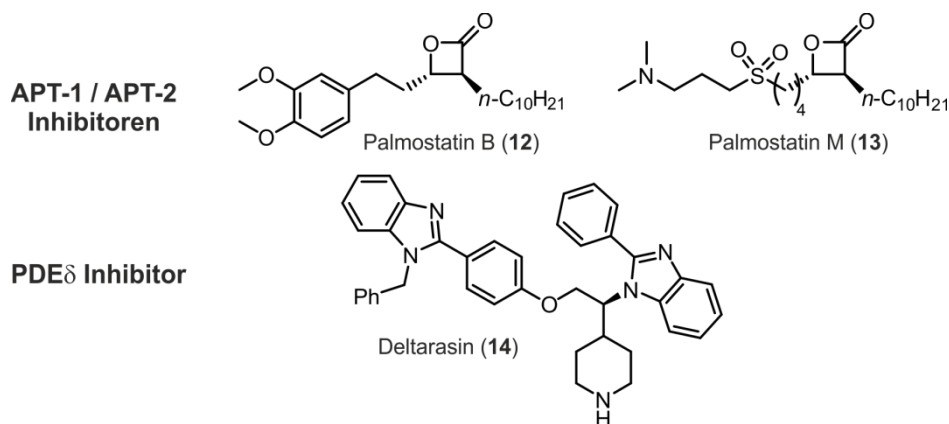


Abbildung 16. Modulatoren der GTPase Lokalisation.

Beeinträchtigung der Aktivierung kleiner GTPasen

Auf der Suche nach direkten Modulatoren von Ras und anderen kleinen GTPasen wurde zunächst nach Nucleotidanaloga gesucht, die mit GDP und GTP um die Nucleotidbindetasche konkurrieren. Dieser Ansatz wird sehr erfolgreich in der Entwicklung von Kinase Inhibitoren verfolgt,²⁴⁹ lieferte aber keine effektiven Modulatoren für kleine GTPasen. Während Kinasen üblicherweise mikromolare Affinitäten gegenüber ATP aufweisen²⁵⁰ und einen hohen Nucleotidumsatz haben, binden kleine GTPasen ihre Nucleotide mit pikomolarer Affinität.¹⁶³ Außerdem haben kleine GTPasen einen geringen Nucleotidumsatz und sehr langsame Dissoziationsgeschwindigkeiten (*off-rates*). Die bisher entwickelten Nucleotidanaloga^{251,252} oder per HTS gefundenen Nucleotid kompetitiven Binder²⁵³⁻²⁵⁵ besitzen nur eine geringe Wirksamkeit. In Anbetracht der extrem hohen Nucleotidaffinität kleiner GTPasen und den millimolaren intrazellulären Nucleotidkonzentrationen ist ein Erfolg Nucleotid-kompetitiver Modulatoren nahezu auszuschließen.²³

Ein interessanter Ansatz ist der Einsatz einer elektrophilen Gruppe, die den Inhibitor kovalent an die kleinen GTPase bindet. Die Adressierung der onkogenen Ras^{G12C}-Mutante mit Hilfe irreversibler kovalenter Inhibitoren ermöglichte erstmals eine selektive Inhibierung von mutiertem Ras.^{256,257} Da die onkogenen Mutationen von Ras-Proteinen zumeist nur eine Aminosäure betreffen, ist eine Unterscheidung zwischen der nicht mutierten Wildtyp-Form und einer Mutante mit Hilfe niedermolekularer Verbindungen äußerst anspruchsvoll. Die beiden irreversiblen Inhibitoren SML-8-73-1 (**15**) und VSA9 (**16**) sind somit nicht nur in der Lage die onkogene Ras^{G12C}-Variante zu inaktivieren, sondern ihnen gelingt zudem die Abgrenzung zu nicht mutiertem Wildtyp-Ras (Abbildung 17). Die beschriebenen Substanzen **15** und **16** zeigen jedoch nur die prinzipielle Machbarkeit des Ansatzes. Weiterführende Optimierung ist erforderlich die identifizierten Verbindungen in eine mehr Medikament-ähnliche Struktur zu überführen. Insbesondere die nucleotidkompetitiven SML-Verbindungen besitzen keine optimalen pharmakologischen Eigenschaften.

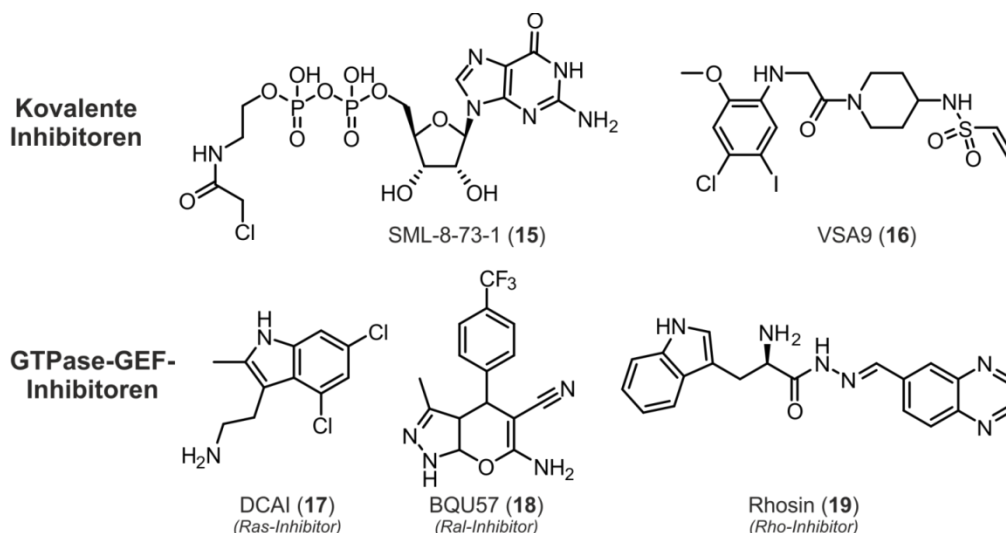


Abbildung 17. Inhibitoren der GTPase Aktivierung.

Der am weitesten verbreitete Ansatz die Aktivierung von kleinen GTPasen zu unterdrücken ist eine Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung. Zahlreiche Verbindungen wurden durch die Untersuchung von Fragmentbibliotheken und strukturbasierte Optimierung als Inhibitoren von GTPase-GEF-Interaktionen identifiziert.^{23,24} So blockiert DCAI (17) die Ras-Aktivierung durch das Ras-GEF *son of sevenless* (SOS) indem es in eine zuvor unbekannte Bindetasche auf der Ras-Oberfläche adressiert (Abbildung 17).²⁵⁸ Computergestützte Hochdurchsatzanalysen von Substanzbibliotheken lieferten zudem Inhibitoren der Ral-GEF- (BQU57, 18)²⁵⁹ oder Rho-GEF-Interaktion (Rhosin, 19)²⁶⁰. Zudem konnte durch eine HBS-stabilisierte Helix von SOS ein Peptid-basierter Inhibitor der Ras-SOS-Wechselwirkung mit zellulärer Aktivität entwickelt werden.⁹⁵ Es ist allerdings davon auszugehen, dass eine Inhibition der GTPase-GEF-Interaktion keinen generellen Ansatz zur Bekämpfung von Krebs liefert.^{23-25,233} Dieser Ansatz gilt jedoch als vielversprechend, wenn die Überaktivität der GTPase durch eine erhöhte GEF-Aktivität aufgrund von Mutationen vorgeschalteter Signalwege oder der GEFs selbst ausgelöst wird. Das trifft insbesondere auf die kleinen GTPasen der Rho-Familie oder der Ral-Unterfamilie zu, da diese nur selten direkt mutiert sind.^{185,261} Ras-Proteine sind jedoch in 20-30% aller Tumore direkt von einer Mutation betroffen, sodass die Inhibition der Ras-GEF-Wechselwirkung für Ras-GTPasen nur begrenzte Wirksamkeit haben dürfte.

Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen

Die Inhibition von PPIs kleiner GTPasen ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da diese PPIs zumeist über ausgedehnte und gering-profilierte Interaktionsoberflächen vermittelt werden. Zudem müssen solche Inhibitoren mit optimierten nativen Interaktionspartnern konkurrieren, die zum Teil nanomolare Bindungsaffinitäten besitzen. Eine Alternative bietet die Stabilisation von GTPase-Protein-Komplexen.^{262,263} Bei der Stabilisation von Protein-Komplexen müssen die Inhibitoren nicht mit den optimierten Bindungspartnern konkurrieren, sondern binden an den bereits vorhandenen Komplex. Außerdem bieten

Proteinkomplexe potentielle neue Bindetaschen die erst durch die Interaktion der Proteine entstehen oder sich an den Wechselwirkungsflächen bilden. Der Naturstoff Brefeldin A (BFA, **20**) stabilisiert die Interaktion von Arf–GDP mit seinem GEF ARNO und verhindert auf diese Weise eine Aktivierung von Arf (Abbildung 18).^{264,265} Die Suche nach Synthetischen PPI Stabilisatoren lieferte LM11 (**21**), einen weiteren Stabilisator des Arf–ARNO-Komplexes.²⁶⁶ Die Suche nach einem Stabilisator der Ras–SOS-Wechselwirkung brachte bisher keinen Erfolg.²⁶⁷

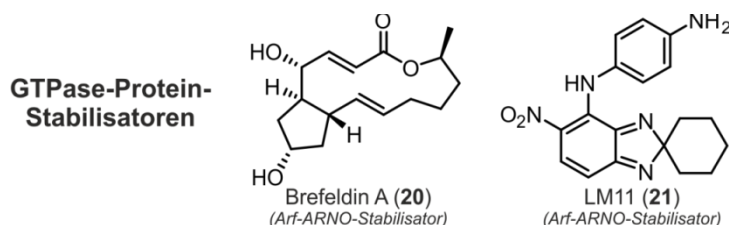


Abbildung 18. Stabilisatoren von GTPase-Protein-Komplexen.

Inhibition von GTPase-Effektor Interaktionen

Als universellster Ansatz in der Entwicklung von GTPase Inhibitoren gilt die Inhibition der GTPase–Effektor Interaktion. Unabhängig von der Ursache der Überaktivierung, unterbricht eine Inhibition der GTPase–Effektor Wechselwirkung das GTPase–Signal bevor es durch den Kontakt mit Effektor-Proteinen an die einzelnen Signalwege weitergegeben werden kann. Der potentielle Erfolg einer solchen Strategie konnte bereits durch das Blockieren der *H-Ras*–GTP Effektor-Bindestelle mit Hilfe von intrazellulär exprimierten Antikörper-Fragmenten gezeigt werden.^{268,269} Die Beschaffenheit der GTPase–Oberfläche sowie die große Konkurrenz mit nanomolaren Effektor-Proteinen erschwert jedoch die Entwicklung eines niedermolekularen Inhibitors. Orthosterische Inhibitoren der Ras–Raf–Wechselwirkung wie Kobe0065 (**22**) konnten in einigen Assay-Setups identifiziert werden,^{270–272} allerdings sind diese Verbindungen noch weit von einer potentiellen Anwendung entfernt (Abbildung 19). Ebenso ist die Entdeckung eines zweiten, GTP-gebunden Zustands mit reduzierter Effektor-Affinität für Ras–GTPasen ein potentiell interessanter Ansatzpunkt, aber die aktuellen allosterischen Ras–Inhibitoren wie der Metallkomplex Bis(2-picolyl)amin (BPA, **23**) sind lediglich geeignet, die prinzipielle Machbarkeit eines solchen Ansatzes zu untersuchen (Abbildung 19).^{273–275} Als aktuell vielversprechendster Ansatz zählt die Entwicklung von mono- und bizyklischen Peptiden, die in der Lage sind, submikromolare Affinitäten gegenüber Ras–GTPasen zu erreichen.^{276,277} Während die erste Generation dieser Inhibitoren nicht in ausreichendem Maße zellgängig ist, scheint die zweite Generation der Cyclorazine (z.B. Cyclorasin9A5, **24**) in dieser Hinsicht deutlich verbessert (Abbildung 19).¹⁵⁷

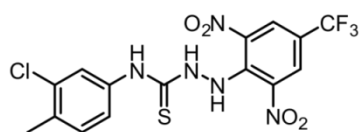
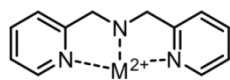
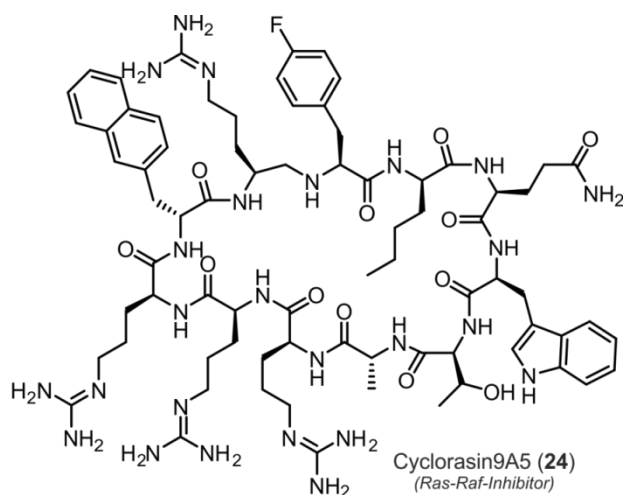
**GTPase-Effektor-
Inhibitoren**

 Kobe0065 (**22**)
(Ras-Raf-Inhibitor)

 M^{2+} -BPA (**23**)
($M = Zn^{2+}, Mg^{2+}$)
(allosterischer Ras-Inhibitor)

 Cyclorasin9A5 (**24**)
(Ras-Raf-Inhibitor)

Abbildung 19. Inhibitoren der GTPase-Effektor Interaktion.

Bei den bisher identifizierten Modulatoren der GTPase-Aktivität handelt es sich nahezu ausnahmslos um Verbindungen, die lediglich die prinzipielle Machbarkeit des gewählten Ansatzes zeigen.^{23,24} Sie vermögen es jedoch nicht die PPIs kleiner GTPasen effektiv zu modulieren. Da kleine GTPasen nicht über ein aktives Zentrum oder ausgeprägte hydrophobe Bindetaschen verfügen, stoßen die klassischen Strategien der Medikamentenentwicklung an ihre Grenzen. Die Forschung erlernt und entwickelt aktuell neue Strategien, die das effektive Adressieren anspruchsvoller PPIs ermöglichen. Allerdings ist davon auszugehen, dass die hier diskutierte Problematik nicht von einer Verbindung alleine gelöst werden kann. Aus heutiger Sicht erscheinen besonders makrozyklische PPI-Inhibitoren als eine besonders vielversprechende Substanzklasse, die dieser anspruchsvollen Aufgabe gewachsen sein könnte.

4 Zielsetzung der Arbeit

Die Modulation und Inhibition der Signalweiterleitung über kleine GTPasen steht aktuell im Fokus der Medikamentenentwicklung. Allerdings sind ihre gering-profilierten und ausgedehnten Proteinwechselwirkungsflächen mit klassischen niedermolekularen Verbindungen nur äußerst schwer zu adressieren. Die Inhibition von Kinasen nachgeschalteter Signalwege führte zu der Entwicklung einiger zugelassener Medikamente, brachte allerdings aufgrund von Resistenzen und ungenügender Wirksamkeit nicht den erhofften Durchbruch in der Krebstherapie. Die bisher beschriebenen Modulatoren kleiner GTPasen verfügen nicht über ausreichende Affinität oder zelluläre Wirksamkeit und sind noch weit von einer klinischen Anwendung entfernt. Sie zeigen jedoch die prinzipielle Adressierbarkeit von kleinen GTPasen und liefern neue Ansatzpunkte für die Modulation ihrer PPIs. Insbesondere die kleinen GTPasen der Rab-Familie werden zunehmend mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Rab-GTPasen repräsentieren die größte Familie der kleinen GTPasen und sind zentrale Schlüsselproteine bei der Regulation von vesikulären Transportprozessen in der Zelle. Peptid-basierte PPI Inhibitoren besitzen aufgrund ihrer großen Interaktionsflächen und flexiblen Oberflächenanpassung ausgezeichnete Voraussetzungen für die Adressierung von Rab-GTPasen und ihrer Wechselwirkungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Modulatoren von Rab-GTPasen mit Hilfe Peptid-basierter Sekundärstrukturmimetika entwickelt werden. Insbesondere der Einsatz α -helikaler Strukturmetika führte im Laufe des letzten Jahrzehnts zur Identifizierung zahlreicher Inhibitoren schwer adressierbarer PPIs. Diese Peptidmimetika besitzen im Vergleich zu niedermolekularen Verbindungen eine vergrößerte Wechselwirkungsfläche und sind in der Lage, die Bindungs epitope natürlicher Interaktionspartner nachzubilden. Eine Untersuchung der Strukturen von Rab-Protein-Komplexen identifizierte zahlreiche α -Helices als Bindungsdomänen zwischen Rab-GTPasen und ihren Interaktionspartnern. Daher sollte das Potential stabilisierter α -Helices für die Modulation von Rab-GTPasen untersucht werden. Mit Hilfe von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden (*hydrocarbon stapled peptides*), dem bisher erfolgreichsten Ansatz zur Synthese α -helikaler Peptidmimetika, sollten die identifizierten α -Helices für die Bindung an Rab-GTPasen optimiert werden (Abbildung 20). Die identifizierten Binder sollten anschließend durch systematische Verbesserung ihrer biologischen Verfügbarkeit weiterentwickelt und ihr Potential *in vitro* und *in cellulo* evaluiert werden.

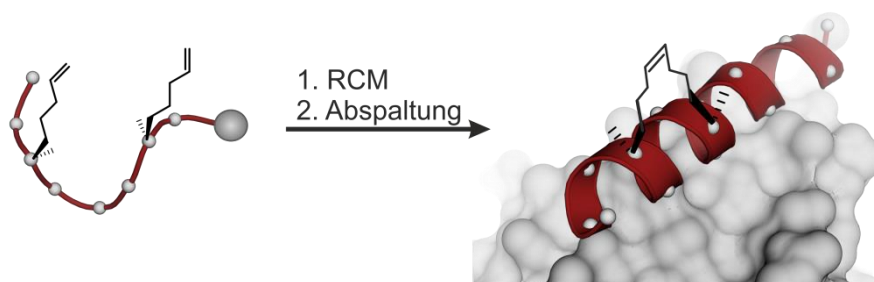


Abbildung 20. Schematische Darstellung der Adressierung von Rab-PPIs mit Hilfe von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden.

In einem unabhängigen Ansatz sollte eine neue Methode zur Synthese kohlenwasserstoffverbrückter Peptide entwickelt werden. Zwar existieren zahlreiche Methoden zur Synthese α -helikal stabilisierter Peptide, doch die unterschiedlichen Eigenschaften und Limitierungen der einzelnen Methoden fördern den Bedarf an zusätzlichen Strategien. Bei der Entwicklung einer neuen Methode sollten die besonderen Vorzüge der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide, nämlich ihre α -Methylierung und der hydrophobe Charakter der Verbrückung, beibehalten und durch neue chemische Funktionalitäten erweitert werden. Zudem sollte die neue Methode mit den Anforderungen der Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS) kompatibel sein, um einen überschaubaren synthetischen Aufwand zu gewährleisten und die strukturelle Diversität der zugänglichen Aminosäurebibliotheken auszunutzen. Die zur Olefin-Ringschlussmetathese (RCM) analoge Alkin-Ringschlussmetathese (RCAM) sollte dabei als Grundlage für die Entwicklung dieser neuen Verbrückung dienen (Abbildung 21). Da RCM und RCAM orthogonale Reaktionen darstellen, sollte die Synthese bityklischer Peptide mit Hilfe von Olefin- und Alkin-Verbrückungen untersucht werden.

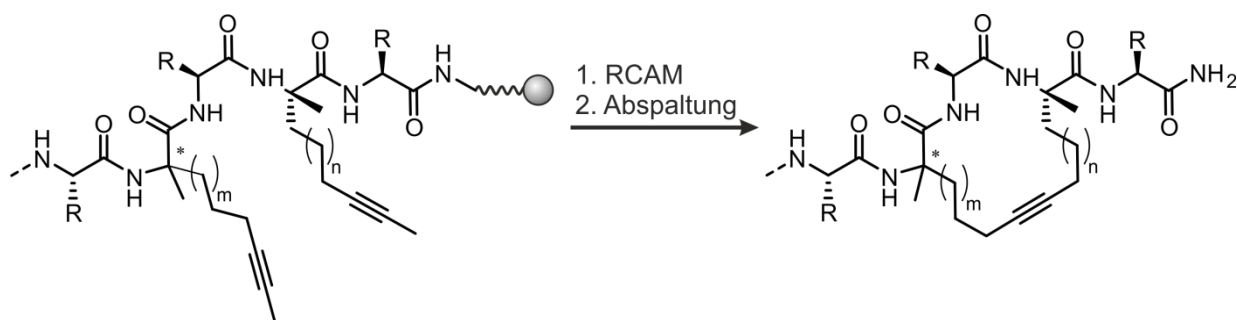


Abbildung 21. Schematische Darstellung der α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung mit Hilfe von Alkin-Ringschlussmetathese (RCAM) auf fester Phase.

Die Entwicklung direkter Modulatoren der PPIs kleiner GTPasen stellt eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Daher wurden in der Vergangenheit bereits indirekte Methoden zur Modulation der GTPase-Aktivität getestet. Die Inhibition der Farnesyltransferase (FT) und des Guaninnukleotiddissoziationsinhibitors (GDI) PDE δ bewirken beispielsweise die Delokalisation kleiner GTPasen innerhalb der Zelle. Eine Co-Kristallstruktur des Lipid-bindenden Proteins UNC119 mit einem myristoylierten Peptidfragment zeigt eine α -helikale Struktur des Peptid-N-Terminus während der Bindung. Ausgehend von diesem Sekundärstrukturelement sollten Peptid-basierte UNC119 Inhibitoren entwickelt werden. Da UNC119 für den Transport essentieller Proteine der Zellteilung verantwortlich ist, sollte die zelluläre Reaktion auf UNC119 Inhibitoren untersucht werden und UNC119 als potentielles Zielprotein für die Medikamentenentwicklung evaluiert werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese hydrophob-verbrückter Peptide zur Inhibition von Rab-GTPasen

(Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Spiegel durchgeführt und veröffentlicht.^{278–280} Die Proteinexpression und Aufreinigung erfolgte in Kooperation mit Frau Nathalie Bleimling und der Dortmund Protein Facility)

Wie bereits in Abschnitt 3 erörtert, wird eine Fehlregulation der kleinen GTPasen der Rab-Familie zunehmend mit menschlichen Krankheiten assoziiert.^{178,198} Daher gewinnen sie als Zielproteine in der Wirkstoffforschung vermehrt an Bedeutung. Wie alle kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie interagieren auch Rab-Proteine vor allem über großflächige und gering-profilierter PPIs, deren Adressierung und Modulation sich als äußerst anspruchsvoll darstellt. So wurde bisher lediglich eine niedermolekulare Verbindung identifiziert, die als nukleotidkompetitiver Inhibitor für Rab7 fungiert.²⁵³ Der Erfolg nukleotidkompetitiver Inhibitoren gilt jedoch aufgrund der hohen intrazellulären Nukleotidkonzentrationen und der hohen Nukleotidaffinitäten kleiner GTPasen als äußerst unwahrscheinlich (siehe Abschnitt 3.4). Darüber hinaus ist der beschriebene Inhibitor nicht selektiv für Rab-Proteine, sondern beeinflusst als *pan*-GTPase Inhibitor auch eine Reihe anderer kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie.²⁵⁴ Dies verstärkt das Bedürfnis nach einem selektiven und effektiven Modulator von Rab-Protein Wechselwirkungen. Eine solche Verbindung könnte als Hilfsmittel zur Untersuchung biologischer Zusammenhänge zu einem genaueren Verständnis von Rab-GTPasen beitragen oder sogar als Ausgangspunkt für die Entwicklung Rab-basierter Therapeutika dienen. Die Identifikation des ersten α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Binders für Rab8a (Peptid **42**) ist im Detail in der Arbeit von Dr. Jochen Spiegel diskutiert.²⁸⁰ Im Folgenden sind die wichtigsten Entwicklungsschritte zusammengefasst.

Rab-GTPasen, die größte Familie der Ras-Superfamilie mit mehr als 60 Proteinen, verfügen über eine große Anzahl an Interaktionspartnern. Durch die Kristallstruktur von einigen Interaktionspartnern oder deren Bindungsdomänen im Komplex mit Rab konnte die exakte Natur der Bindung entschlüsselt werden. Eine Durchsicht der frei zugänglichen Kristallstrukturen von Rab-Protein-Komplexen in der PDB (*protein data bank*)²⁸¹ identifizierte die α -Helix als dominierendes Sekundärstrukturelement der Rab-bindenden Domänen.^{282,283} Aufgrund dieser Beobachtungen wurde nach geeigneten Startstrukturen gesucht, um den Einsatz stabilisierter α -Helices als neuartige Inhibitoren für Rab-PPIs zu untersuchen.

5.1.1 Identifikation von α -helikalen Fragmenten als Inhibitoren von Rab Protein-Protein Interaktionen

Zur Selektion der Peptidsequenzen, wurden ihre Interaktionsflächen mit Rab mit Hilfe der Software MSMS (*maximal speed molecular surface*)²⁸⁴ quantifiziert und der Anteil der identifizierten Helix an der Gesamtinteraktionsfläche berechnet (Abbildung 22). Die Interaktionsfläche der α -Helix sollte dabei die Oberfläche klassischer niedermolekularer Verbindungen übersteigen ($>600 \text{ \AA}^2$) und sollte einen großen Anteil der gesamten Interaktionsfläche ausmachen. Peptidsequenzen, bei denen bereits durch Mutationsstudien oder durch die Verkürzung der Bindedomäne eine geringe Affinität zum Zielprotein prognostiziert wurde, wurden von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Dies lieferte neun Peptidsequenzen (**25** – **33**), deren Bindungsaffinität gegenüber Rab-GTPasen in einem direkten Fluoreszenz-polarisations-(FP) Experiment evaluiert wurde (Abbildung 22). Dazu wurden die Wildtyp-Sequenzen an Rink-Amid-MBHA-Harz mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) hergestellt. Die Synthese erfolgte mit Hilfe eines Mikrowellen-gestützten Syntheseroboters. Abschließend wurden alle Peptidsequenzen mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert und auf ihre Affinität zu einer Auswahl an Rab-GTPasen getestet. Da der Nukleotidbindezustand der Rab-GTPasen entscheidenden Einfluss auf die Affinität der Bindungspartner hat, wurden alle zugänglichen Rab-Proteine in allen möglichen Nukleotidbindezuständen (GTP, GDP und nukleotidfrei (NF)) hergestellt und getestet. Obwohl die intrinsische Hydrolyserate von Rab-GTPasen physiologisch nicht ausreicht um diese effektiv zu deaktivieren, ist sie für *in vitro* Experimente dennoch zu groß, sodass GTP durch das hydrolysestabile Derivat GppNHp ausgetauscht wurde. Die nukleotidfreie Form der Rab-Proteine kommt in der Natur nur in einem stabilisierenden Komplex mit den zugehörigen GEFs vor. Wenn dieser Zustand *in vitro* ohne den stabilisierenden Einfluss eines GEFs erzeugt wird, führt das zu geringer thermodynamischer Stabilität und erhöhter Aggregation.²⁸⁵ Die erreichten Maximalkonzentrationen für die nukleotidfreien Rab-GTPasen variieren daher deutlich und liegen weit unter denen der nukleotid-gebundenen Formen.

Für die beiden nukleotid-gebundenen Zustände (GDP, GppNHp) zeigten alle untersuchten Wildtyp-Peptide im FP-Experiment eine vernachlässigbare Affinität ($K_D > 300 \text{ \mu M}$). Da aufgrund der fehlenden stabilisierenden Tertiärstruktur die ursprüngliche Sekundärstruktur verloren geht, wird die Affinität der flexiblen Peptidsequenzen gegenüber dem Zielprotein stark geschwächt (Abbildung 3).^{41,42} Für die nukleotidfreien Rab-Proteine konnten allerdings vier Peptide (**25**, **27**, **32**, **33**) identifiziert werden, die Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich ($K_D < 20 \text{ \mu M}$) aufweisen (Abbildung 22). Durch die stark erhöhte Flexibilität der nukleotidfreien Rab-Proteine, insbesondere im Bereich der *Switch*-Regionen und der *P*-Schleife, besteht so die Möglichkeit, dass die Peptidsequenzen eine *induced fit*-Bindung mit den nukleotidfreien Rab-GTPasen eingehen. Eine wahrnehmbare Selektivität zwischen den unterschiedlichen Rab-Proteinen lässt sich bei den vier identifizierten Peptidsequenzen nicht erkennen. Da allerdings wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, zahlreiche Rab-Bindepartner an viele verschiedene Rab-

GTPasen binden und die untersuchten Peptidsequenzen nur einen Teil der Rab–bindenden Domänen darstellen, verwundert die fehlende Selektivität wenig. Nichtsdestotrotz ist die Identifikation von vier Rab–bindenden Wildtyp-Peptidsequenzen ein guter Startpunkt für die Stabilisation dieser α -Helices (Abbildung 22). Die vier ausgewählten Peptidsequenzen repräsentieren dabei alle möglichen Klassen an Rab–bindenden Proteinen. R6IP1 (25) und LidA (27) sind von Effektor-Proteinen abgeleitet, Rabin8 (32) von einem GEF und REP1 (33) von einem Eskortprotein.

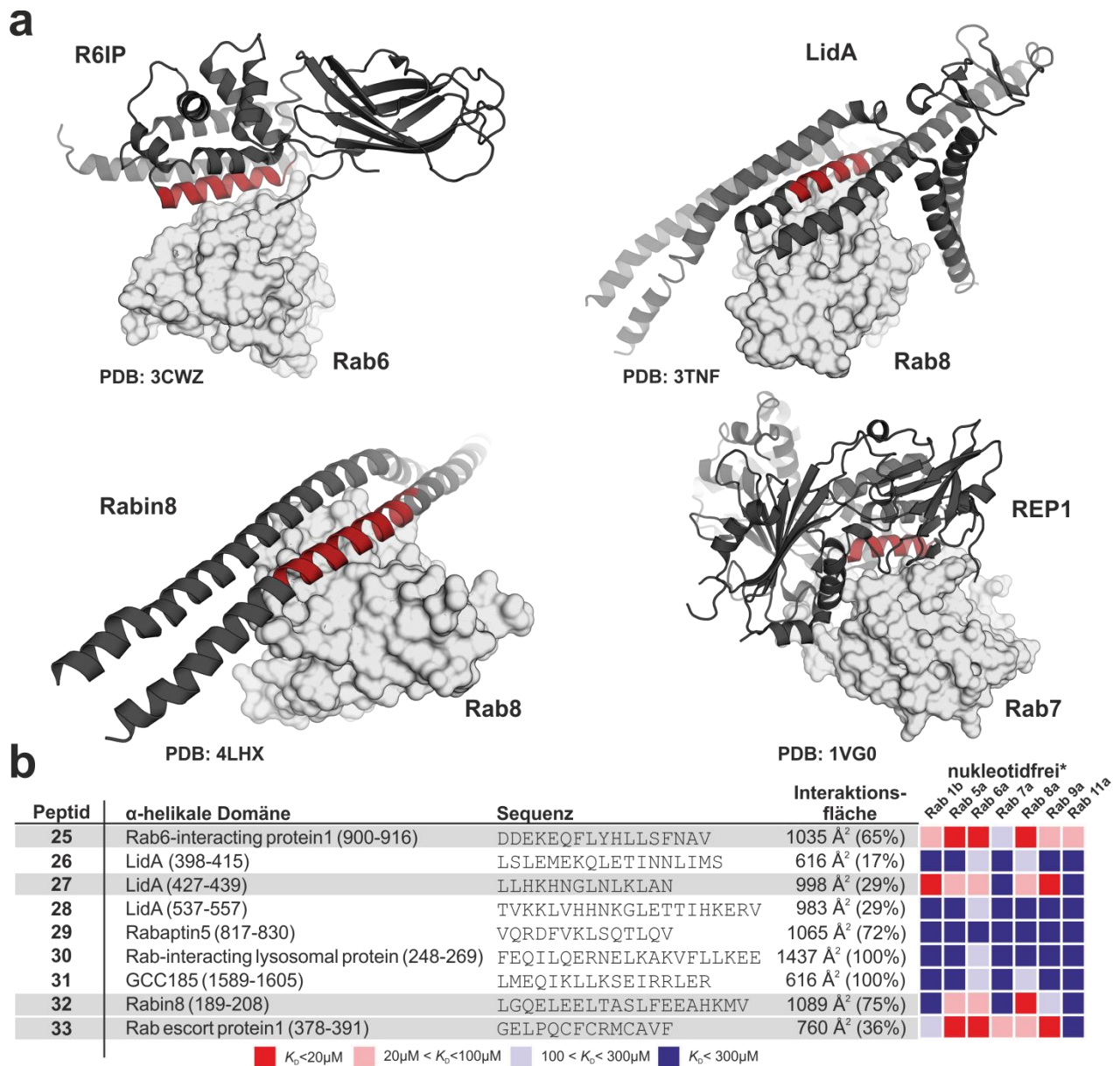


Abbildung 22. Helikale Bindemotive von Rab–Interaktionspartnern in Anlehnung an Spiegel *et al.*²⁷⁸ (a) Kristallstrukturen von Rab–GTPasen im Komplex mit natürlichen Bindepartnern. An der Bindung beteiligte Helices, sind rot hervorgehoben. (b) Wildtyp-Sequenzen mit ihrem Ausgangsprotein, der Aminosäure Sequenz, Wechselwirkungsfläche, sowie eine *Heatmap*-Darstellung der Dissoziationskonstanten mit den nukleotidfreien Rab–GTPasen. Die vier für weitere Studien ausgewählten Peptidsequenzen sind grau hinterlegt. Der Anteil der Interaktionsfläche an der Gesamtwechselwirkung ist in Klammern angegeben. * Nukleotidfreie Rab–Proteine zeigen geringe Stabilität. Daraus ergeben sich folgende maximale Konzentrationen im FP-Experiment: Rab1b(NF) = 105 μM , Rab5a(NF) = 4 μM , Rab6a(NF) = 140 μM , Rab7a(NF) = 57 μM , Rab8a(NF) = 34 μM , Rab9a(NF) = 5 μM , Rab11a(NF) = 171 μM . Bindungskurven, die kein Plateau erreichten, wurden extrapoliert um vergleichbare K_D -Werte zu erhalten. Eine Auflistung der Dissoziationskonstanten befindet sich im Anhang (Tabelle 15-17).

5.1.2 Synthese α -methylierter Bausteine für die Synthese kohlenwasserstoffverbrückter Peptide

Für die konformative Stabilisierung der α -helikalen Peptidsequenzen wurde die Methode der α -methylierten, Kohlenwasserstoffverbrückung (*hydrocarbon peptide stapling*)¹⁶ ausgewählt. Für die Synthese der verbrückten Peptide werden α -Methyl- α -alkenyl-aminosäurebausteine verwendet, die teilweise nicht kommerziell verfügbar waren oder in größeren Mengen benötigt wurden. Da für die Synthese von Aminosäuren zahlreiche Methoden bekannt sind,²⁸⁶ ließen sich die einzelnen Fmoc-geschützten Bausteine anhand etablierter Syntheseprotokolle herstellen.²⁸⁷ Einen universellen Ansatz für die Synthese von α -methylierten Aminosäuren bietet die Methode der Alkylierung von chiralen Ni(II)-Komplexen von Alanin-Schiffbasen,²⁸⁸⁻²⁹⁰ die bereits für die Synthese des α -methylierten, α -alkenylierten Bausteins Fmoc-*S*₅-OH (**39**) angewendet wurde (Abbildung 23).²⁹¹ Dafür wurde zunächst der chirale Ni(II)-Komplex (**36**) synthetisiert.^{292,293} Als erstes wurde L-Prolin mit Benzylchlorid im Basischen zu *N*-Benzylprolin (**34**) umgesetzt. Die Amidierung von **34** mit 2-Aminobenzophenon erfolgte anschließend mit Hilfe von Mesylchlorid und *N*-Methylimidazol. Das entstandene chirale Auxiliar (*S*)-2-[*N*-(*N*^c-Benzylprolyl)aminobenzophenon (**35**, BPB) wurde schließlich mit racemischen Alanin und Nickel(II)-nitrat unter basischen Bedingungen zum chiralen Ni(II)-Ala-(*S*)-BPB Komplex (**36**) umgesetzt. Deprotonierung der α -Alanylposition und Alkylierung mit 5-Iodpent-1-en (**37**), welches zuvor in einer Finkelsteinreaktion aus 5-Brompent-1-en dargestellt wurde, lieferte Komplex **38** mit exzellenter Diastereoselektivität. Die Zersetzung von **38** mit HCl setzte das chirale Auxiliar **35** und die ungeschützte α -Methyl- α -pentenyl-aminosäure frei, die mit *N*-Fmoc-Succinimid im Basischen zu Baustein Fmoc-**39**-OH umgesetzt wurde.

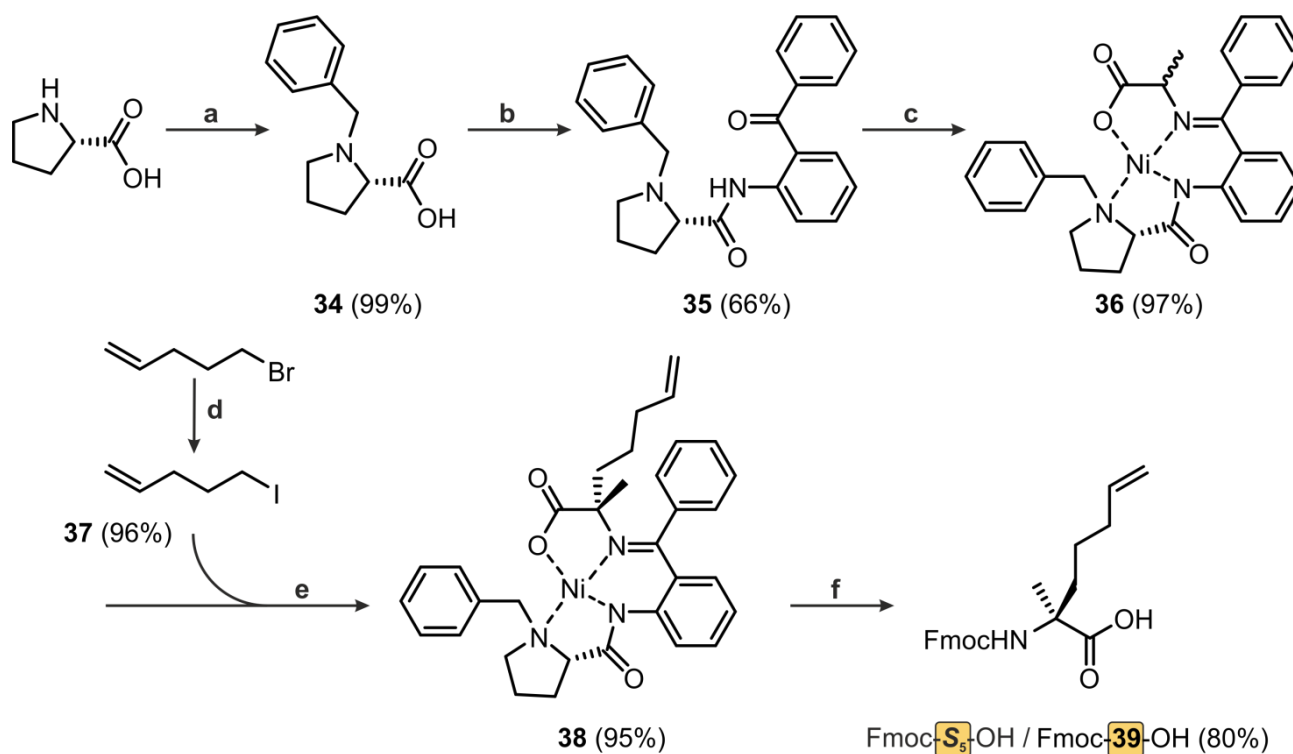


Abbildung 23. Synthese des α -Methyl- α -pentenyl-bausteins Fmoc-S₅-OH (**39**). **a**) NaOMe, BnCl, MeOH, 50° C, 16 h; **b**) 1. MsCl, *N*-Methylimidazol, DCM, 0° C, 1h; 2. 2-Aminobenzophenon, Reflux, 16 h; **c**) D/L-Alanin, KOH, Ni(NO₃)₂, MeOH, Reflux, 2 h; **d**) NaI, Aceton, Reflux, 2 h; **e**) **37**, KOH, DMF, 0° C bis Raumtemperatur, 2 h; **f**) 1. HCl_{aq.}, MeOH, Reflux, 2 h; 2. Fmoc-Osu, Na₂CO₃, Dioxan/Wasser, Raumtemperatur, 7d.

5.1.3 Synthese kohlenwasserstoffverbrückter α -helikaler Peptide zur Binding von Rab-GTPasen

Die Synthese der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide erfolgte mittels SPPS an TentaGel Rink-Amid-Harz nach Standard-Fmoc-Bedingungen (Abbildung 24). Dabei wurde für den Einbau von proteinogenen Aminosäuren HCTU als Kupplungsreagenz verwendet. Um bei sterisch anspruchsvolleren Kupplungen größtmögliche Effizienz zu erzielen, wurde für die Kupplung der α -methylierten Bausteine und der nachfolgenden Aminosäuren COMU als Kupplungsreagenz eingesetzt.²⁹⁴ RCM erfolgte quantitativ an fester Phase mit Grubbs-I-Katalysator und das freigesetzte Ethen wurde im Argon-Gegenstrom ausgetrieben. Abschließend wurden die Peptide *N*-terminal entweder mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat für FP-Messungen, einem Affinitätslabel oder einer Acetylgruppe funktionalisiert.

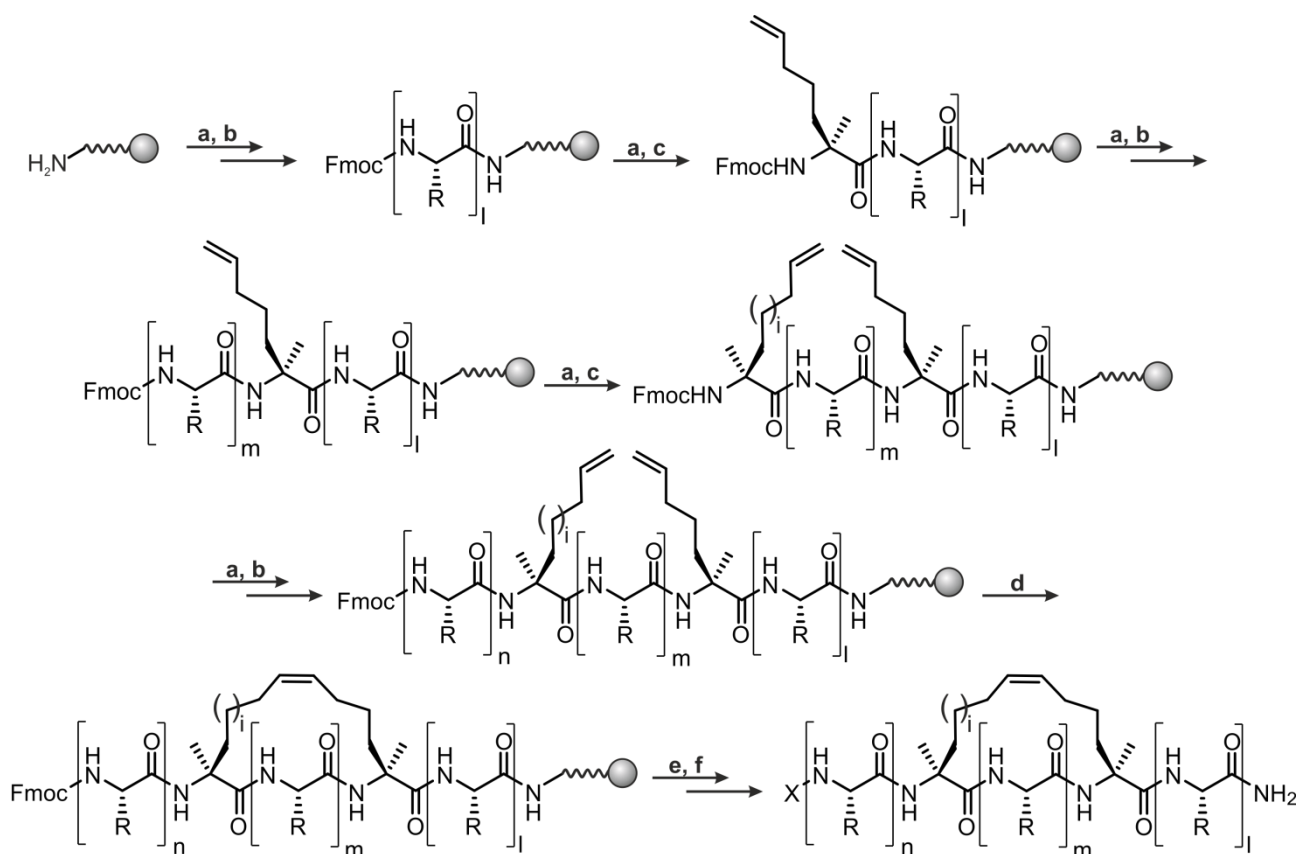


Abbildung 24. Schematische Darstellung der Synthese von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden. **a)** Fmoc-Entschützung: Piperidin/DMF (2/8, v/v); **b)** Kupplung AS: Fmoc-AS-OH, HCTU, DIPEA, DMF; **c)** Kupplung S₅: Fmoc-S₅-OH, COMU, Oxyma, DIPEA, DMF; **d)** RCM: Grubbs-I-Katalysator, DCE; **e)** Funktionalisierung; **f)** Abspaltung: TFA, TIPS, Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v); X = Acetyl, Fluorescein-PEG-Konjugat, Biotin-PEG-Konjugat.

Das Design der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide erfolgte auf Basis der jeweiligen Kristallstruktur. Dazu wurde die bisher am erfolgreichsten eingesetzte $i,i+4$ Architektur¹⁶ als einheitliche Geometrie für den Einbau der Seitenkettenverbrückung ausgewählt. Um die exakten Positionen für den Einbau der α -methylierten Bausteine zu lokalisieren, wurden in der jeweiligen Kristallstruktur nicht an der Bindung beteiligte Reste identifiziert um eine mögliche Beeinflussung der Bindungsmodalitäten zu reduzieren. Nach diesem Grundsatz wurden alle möglichen α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide synthetisiert und auf ihre Affinität getestet (Abbildung 25a). Innherhalb der R6IP1 Sequenz (25) konnten drei unterschiedliche Positionen für den Einbau der Kohlenwasserstoffverbrückung identifiziert werden (40 – 42). Zusätzlich wurde eine N-terminal verkürzte Sequenz synthetisiert (43). Für LidA (27) ergaben sich die stabilisierten Peptide 44 – 46. Aufgrund der größeren Länge der α -Helix von Rabin8 (32) wurden vier Peptide (47 – 50) entworfen. Für REP1 (33) waren nur zwei Sequenzen (51, 52) synthetisch zugänglich, was wahrscheinlich auf die Helix-brechenden Eigenschaften von Pro381 zurückzuführen ist. Die Untersuchung der Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zeigte einen erhöhten helikalen Charakter für nahezu alle α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide. Im Vergleich zu den nicht-modifizierten Wildtyppeptiden wiesen 40 (36%) und 47 (35%) die größte α -Helizität auf (Abbildung 25a).

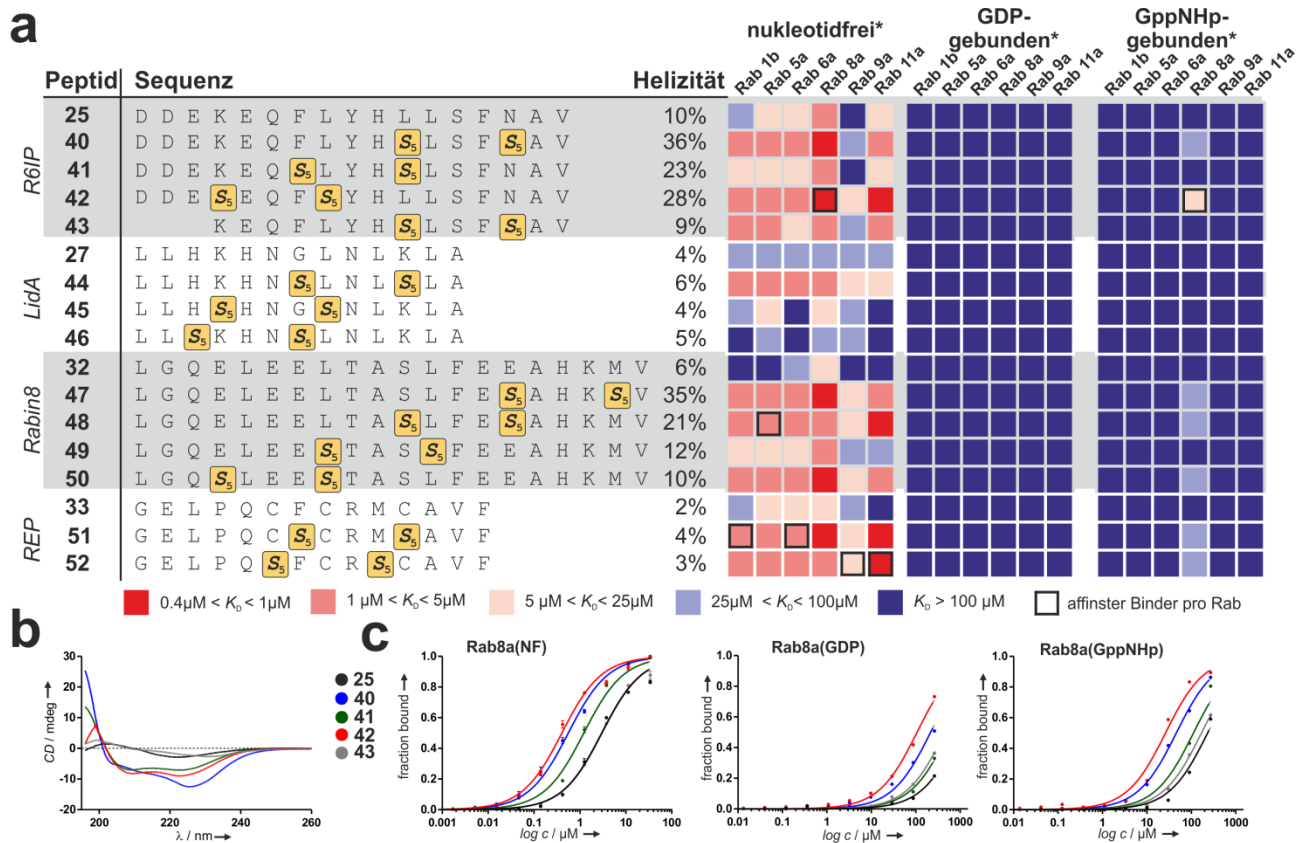


Abbildung 25. Sequenzen und Bindungsstudien der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide in Anlehnung an Spiegel *et al.*²⁷⁸ (a) Sequenzen der modifizierten Peptide, die entsprechende α -Helizität und eine *Heatmap*-Darstellung der mittels FP bestimmten Dissoziationskonstanten. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) sind farblich hervorgehoben. * Maximalkonzentrationen der Rab-GTPasen: Rab1b(NF) = 110 μM , Rab5a(NF) = 5 μM , Rab6a(NF) = 100 μM , Rab8a(NF) = 34 μM , Rab9a(NF) = 68 μM , Rab11a(NF) = 170 μM , Rab(GDP) = 300 μM , Rab(GppNHp) = 300 μM . (b) Repräsentatives CD-Spektrum der acetylierten Peptide 25, 40 – 43, sowie (c) Bindungsdaten der Fluorescein-markierten Peptide 25, 40 – 43 mit Rab8a. Eine Auflistung der exakten Dissoziationskonstanten befindet sich im Anhang (Tabelle 18).

Analog zu den nicht-modifizierten Wildtyp-Peptiden wurde die Affinität aller Fluorescein-markierten α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide in einem FP-Assay gegenüber einer Auswahl an Rab-GTPasen in allen drei Nukleotidbindungszuständen bestimmt (Abbildung 25a). Dabei zeigten nahezu alle stabilisierten Peptide eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber den nukleotidfreien Rab-Proteinen im Vergleich zu den nicht-modifizierten Wildtyp-Peptiden. Die Steigerungen der Affinitäten waren in einigen Fällen beträchtlich und erreichten das bis zu 200-fache. Für Rab8a(NF) und Rab11a(NF) konnten sogar Affinitäten im submikromolaren Bereich gemessen werden, dabei waren 52 ($K_D = 0.40 \pm 0.02 \mu\text{M}$ für Rab11a(NF)) und 42 ($K_D = 0.42 \pm 0.03 \mu\text{M}$ für Rab8a(NF)) die stärksten identifizierten Binder. Die höchsten Affinitäten für Rab1b(NF), Rab5a(NF) und Rab6a(NF) lagen zwischen 1.0 μM und 1.1 μM . Lediglich für Rab9a(NF) konnten keine Dissoziationskonstanten von weniger als 10 μM beobachtet werden. Überraschenderweise konnte für die Peptide 45 und 46 kein Affinitätsgewinn beobachtet werden. Außerdem führte eine Verkürzung der α -helikalen Peptidsequenz im Fall von 43 zu einer verringerten Affinität. Wie schon für die nicht-modifizierten Wildtyp-Peptide beobachtet, wiesen auch die stabilisierten Analoga nur

eine vernachlässigbare Selektivität zwischen den verschiedenen Rab-Proteinen auf. Darüber hinaus zeigten sie nur geringe Affinitäten ($>100 \mu\text{M}$) gegenüber der GDP-gebundenen und den meisten GppNHp-gebundenen Rab-GTPasen. Allerdings erreichten einige Peptide (**40**, **47**, **48**, **50**, **51**, **52**) moderate Affinitäten im Bereich von $50 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$ bei der Bindung an Rab8a(GppNHp). Bemerkenswerterweise konnte für das auf R6IP basierende α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **42** eine Affinität von $K_D = 22.2 \mu\text{M}$ gegenüber aktiviertem Rab8a(GppNHp) beobachtet werden. Darüber hinaus zeigt **42** eine mindestens 5-fache Selektivität gegenüber allen anderen untersuchten Rab-GTPasen und repräsentiert den ersten direkten Binder einer aktivierten Rab-GTPase.²⁷⁸

5.1.4 *In vitro* Evaluierung eines α -helikalen Rab8 Binders

Infolge der in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Identifikation von **42**, dem ersten Binder einer aktivierten Rab-GTPase, wurde das Potential von **42** weiter untersucht. Erst die Verknüpfung von Bindung mit funktionellen Eigenschaften macht die Entdeckung von **42** besonders interessant. Da bisher lediglich die Bindung von **42** an Rab8a(GppNHp) in einem direkten FP-Assay mit aufgereinigtem Protein nachgewiesen wurde, wurde nun die Bindung in einem komplexeren Kontext untersucht. Da Funktion und Regulation von Rab-Proteinen durch ein komplexes Netzwerk aus zahlreichen PPIs gesteuert werden, wurde zudem der Einfluss von **42** auf eine Rab8a vermittelte PPI analysiert. Außerdem handelt es sich bei Rab-GTPasen um Proteine des Zytoplasmas, sodass ebenfalls die zelluläre Aufnahme des Peptids untersucht wurde. Darüber hinaus wurde die Proteolysestabilität von **42** evaluiert.

Präzipitation des Zielproteins aus Zelllysat und Inhibition einer Rab8 Protein-Protein Interaktion

Für biologisch aktive Verbindungen ist es essentiell ihr Zielprotein auch in einer komplexen Proteinmischung zu binden. Daher wurde **42** auf seine Fähigkeit hin untersucht Rab8 in Zelllysat zu präzipitieren. Peptid **42** wurde dafür mit einem Biotin-PEG-Konjugat affinitätsmarkiert und auf mit Streptavidin beschichteten Kügelchen (*beads*) immobilisiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit Rab8a(GppNHp) angereichertem HCT116-Zelllysat inkubiert und die von der Kügelchenoberfläche eluierten Proteine mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Mit Hilfe eines für Rab8a spezifischen Antikörpers konnten die im FP-Experiment ermittelten Affinitätsverhältnisse des stabilisierten Peptids **42** und seines nicht-modifizierten Vorläufers **25** hinreichend reproduziert werden (Abbildung 26a). Während für das nicht-modifizierte Peptid **25** nur eine leicht intensivere Bindung im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO) festzustellen ist, erreichte das α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **42** eine deutliche Bindung von Rab8a.

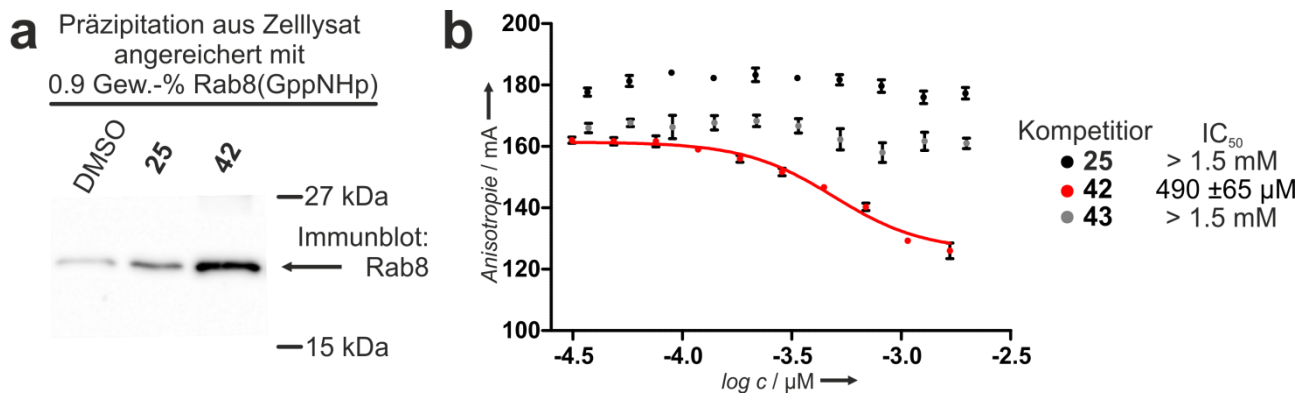


Abbildung 26. Präzipitation und Verdrängungsexperimente in Anlehnung an Spiegel *et al.*²⁷⁸ (a) Präzipitation von Rab8a(GppNHp) aus angereichertem HCT116-Zelllysat mit den biotinylierten Analoga von Peptid **25** und **42**. (b) Konkurrenz von Rab8a(GppNHp) (10 µM) gebundenem Fluorescein-markiertem OCRL₅₃₉₋₉₀₁ (50 nM) mit steigenden Konzentrationen an acetyliertem Peptid **25**, **42** und **43**. Dreifachmessungen, Fehler entsprechen 1 σ .

Da die Affinität von **42** im Bereich einiger natürlicher Effektoren von Rab-GTPasen liegt,^{295,296} wurde **42** verwendet um die PPI von Rab8a mit seinem Effektorprotein *Oculocerabrorenal Syndrom of Lowe Protein* (OCRL1) zu inhibieren. Das periphere Membranprotein OCRL1 ist hauptsächlich am Golgi Apparat lokalisiert und Mutation und Fehlregulation von OCRL1 stehen mit dem Ausbruch und Fortschreiten des Lowe Syndroms in Verbindung.²⁹⁷ Nach rekombinanter Expression der Rab8 Bindungsdomäne von OCRL1, OCRL₅₃₉₋₉₀₁, wurde diese mit *N*-Hydroxysuccinimid-Fluorescein unspezifisch markiert und ihre Bindung an Rab8a(GppNHp) in einem FP-Experiment überprüft. Die ermittelte Affinität von 1.7 µM (Anhang, Abbildung 55) korreliert dabei gut mit der mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmten Affinität von 0.9 µM.²⁹⁶ In einem FP-Verdrängungsexperiment konnte ein zuvor gebildeter Komplex aus Rab8a(GppNHp) und OCRL₅₃₉₋₉₀₁ mit zunehmender Konzentration von acetyliertem Peptid **42** aufgelöst werden (Abbildung 26b). Während **42** in der Lage ist die Bindung von OCRL₅₃₉₋₉₀₁ an Rab8a(GppNHp) zu inhibieren (IC₅₀ = 490 µM), gelingt dies mit den weniger affinen Peptiden **25** und **43** nicht.

Proteasestabilität und Zellgängigkeit

(Die Analyse der zellulären Aufnahme der Peptide wurde von Dipl. Biol. Philipp Küchler durchgeführt.)

Eine generelle Schwäche von Peptiden ist ihre geringe Stabilität gegenüber Proteasen. Kovalente Verbrückungen repräsentieren jedoch eine mögliche Strategie, um die Anfälligkeit gegenüber Proteasen zu reduzieren. Daher wurden einige Peptide auf ihre Proteasestabilität gegenüber Proteinase K getestet. Proteinase K ist eine aus dem Schlauchpilz *Engyodontium album* gewonnene Serinprotease mit sehr breiter Substratspezifität, die sowohl als *Exo*- wie auch als *Endo*-Peptidase fungiert. Im Vergleich mit anderen Proteasen lieferte eine Analyse der R6IP1 Peptidsequenz 11 potentielle Schnittstellen für Proteinase K (mit Hilfe von *Peptide Cutter* (ExPASy)).²⁹⁸ Zur Analyse wurden die Peptide bei Raumtemperatur mit Proteinase K (10 µg/mL) inkubiert und ihre Stabilität mittels analytischer HPLC beobachtet. Der rapide Abbau des nicht-modifizierten Peptids **25** konnte auf diese Weise mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von <5 s abgeschätzt werden (Abbildung 27a). Aufgrund der geringen proteolytischen Stabilität war eine exaktere

Bestimmung der Halbwertszeit nicht möglich. Wie erwartet, wies das α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **42** eine größere Resistenz gegenüber dem proteolytischen Verdau auf ($t_{1/2} = 18$ s). Die Halbwertszeit von unter 20 s ist jedoch nur eine geringe Steigerung im Vergleich zum Ursurspeptid und zu gering für biologische Anwendungen. Der Vergleich mit Peptid **53**, bei dem die Kohlenwasserstoffverbrückung nicht mittels RCM geschlossen wurde, zeigte mit einer proteolytischen Stabilität von $t_{1/2} \sim 6$ s das erwartete Ergebnis mit einer Halbwertszeit zwischen Wildtyp- und verbrücktem Peptid. Während die kovalente Verknüpfung der α -Methyl- α -alkenyl-bausteine nur geringen Einfluss auf die Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) hatte (Peptid **53** und **42**), reduzierte sich die proteolytische Stabilität um das 3-fache (Abbildung 27a). Eine genaue Analyse des proteolytischen Verdau von **42** identifizierte jedoch ein äußerst stabiles Peptidfragment (**54**) mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1330$ min. Die Charakterisierung von **54** mit Hilfe von HPLC-MS Analytik ergab, dass es sich bei diesem Fragment um eine C-terminal verkürzte Form von **42** handelt. In Gegenwart von Proteinase K verliert **42** innerhalb kürzester Zeit die fünf C-terminalen Aminosäuren S912 – V916. Ein Fragment (**54**) von 12 Aminosäuren (D900 – L911) in der Umgebung der Kohlenwasserstoffverbrückung zeigt jedoch hohe proteolytische Stabilität ($t_{1/2} = 1330$ min).

Da es sich bei Rab8a um ein intrazelluläres Protein handelt, muss eine Substanz in der Lage sein die Zellmembran zu überwinden, um im Zellexperiment eine Funktion ausüben zu können. Aus diesem Grund wurde die zelluläre Aufnahme des α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptids **42** in HeLa-Zellen untersucht. HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fluorescein-markiertem Peptid inkubiert und überschüssiges Peptid durch Waschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Fluoreszenzintensität im Konfokalmikroskop analysiert (Abbildung 27b). Diese Methode liefert zwar teilweise falsch-positive Ergebnisse,^{154,299,300} allerdings lassen sich dadurch schnell erste Trends ablesen. Während das nicht-modifizierte Peptid **25** auch bei hohen Konzentrationen (50 μ M) keine zelluläre Aufnahme zeigte, konnte das α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **42** bei Konzentrationen im Bereich von 10 μ M in geringen Mengen in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Das analoge Peptid **53**, bei dem die makrozyklische Kohlenwasserstoffverbrückung nicht geschlossen ist, zeigte ebenso wie das nicht-modifizierte Peptid **25** keine zelluläre Aufnahme bei 50 μ M.

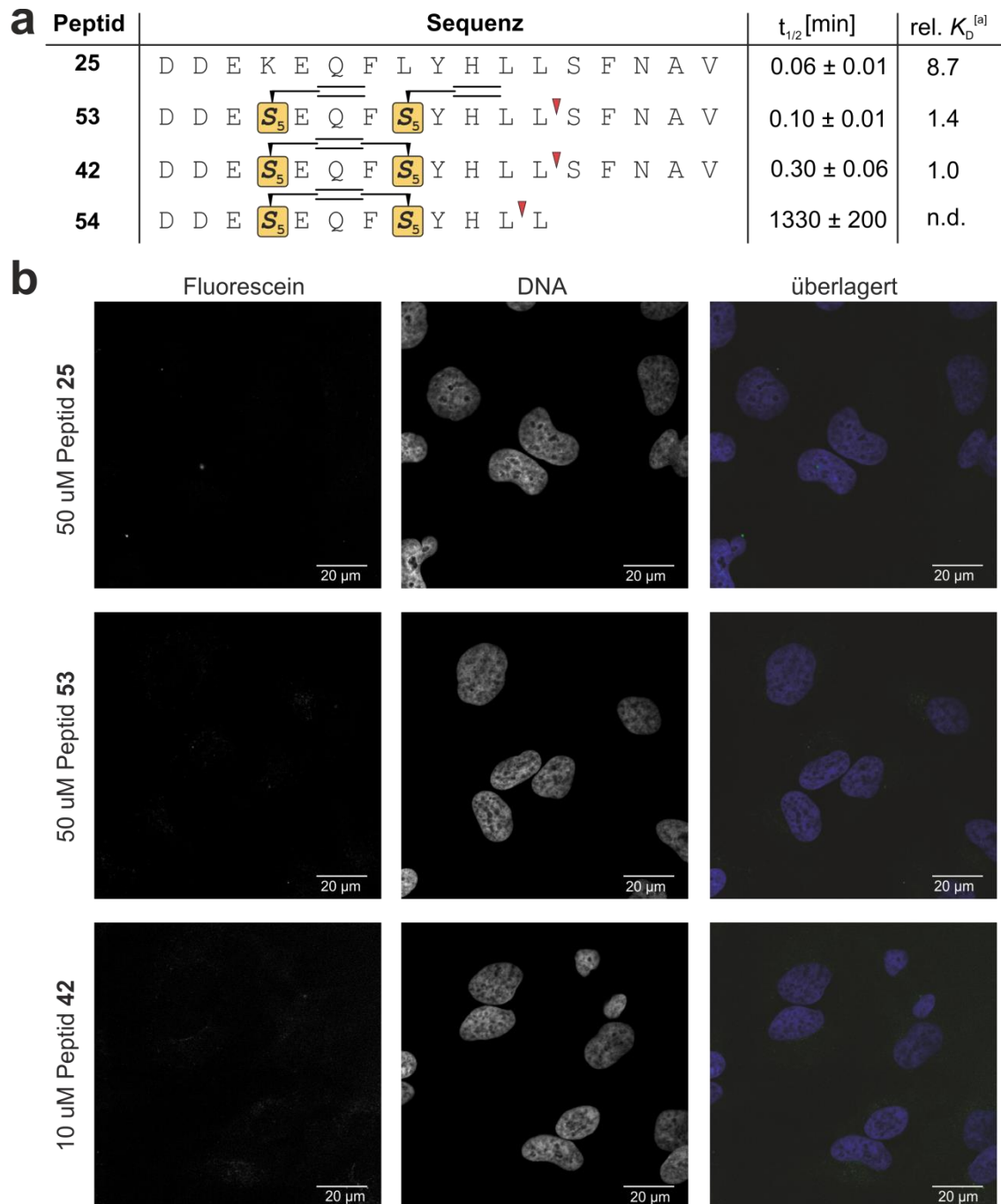


Abbildung 27. Proteasestabilität und Zellgängigkeit. (a) Sequenzen der getesteten Peptide, Halbwertszeit und relative Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp). Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) sind farblich hervorgehoben. Die primäre Proteaseschnittstelle ist rot markiert. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [42]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; [a] K_D [42] = 17.5 μ M. (b) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Fluorescein-markierten Peptiden **25**, **53** und **42**. Die DNA (blau) wurde zusätzlich angefärbt. Die einzelnen Kanäle der Fluorescein-markierten Peptide (links) und der DNA Färbung (mitte) sind explizit gezeigt. Die Überlagerung der Kanäle ist rechts zu sehen.

Der Einbau der α -Methyl- α -alkenyl-bausteine in die R6IP1 Peptidsequenz ist essentiell für eine effektive Bindung an Rab8a(GppNHp). Dabei macht es nur einen geringen Unterschied, ob der hydrophobe Makrozyklus offen (**53**) oder geschlossen (**42**) vorliegt (Abbildung 27a). Für die zelluläre Aufnahme der Peptide und auch für die Resistenz gegenüber Proteasen ist eine geschlossene hydrophobe Verbrückung

jedoch vorteilhaft (Abbildung 27a, b). Insbesondere die Aminosäuren unter der Kohlenwasserstoffverbrückung und in unmittelbarer Umgebung des Makrozyklus weisen eine hohe proteolytische Stabilität auf. Dennoch sind sowohl die Zellgängigkeit als auch die Proteasestabilität von **42** trotz des Einbaus einer α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung gering. Daher sollten im Folgenden die biologischen Eigenschaften von **42** verbessert werden.

5.2 Verbesserung der biologischen Aktivität eines hydrophob-verbrückten Rab8 Inhibitors

(Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Spiegel durchgeführt. Die Proteinexpression und Aufreinigung erfolgte in Kooperation mit Frau Nathalie Bleimling.)

Die Erhöhung der biologischen Verfügbarkeit des ersten Rab-GTPase Inhibitors, Peptid **42**, sollte in drei Bereichen erfolgen. Zum einen sollte die Bindungsaffinität von 22 μM bestmöglich gesteigert werden. Darüber hinaus sollten sowohl die zelluläre Aufnahme wie auch die proteolytische Stabilität erhöht werden. Bei der Optimierung von **42** sollte darauf geachtet werden, dass sich die eingeführten Modifikationen möglichst positiv auf alle drei Bereiche auswirken. Die Verbesserung nur einer Eigenschaft, die auf Kosten der anderen Bereiche erzielt wird, sollte nicht weiter verfolgt werden. Das Ziel sollte die Entwicklung des bestmöglichen Rab8(GppNHp) Binders mit der größten proteolytischen Stabilität und der effektivsten zellulären Aufnahme sein.

5.2.1 Alanin und Arginin Scan von Peptid 42

Da die Peptidsequenz des α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptids **42** auf einem Fragment des Rab6 bindenden R6IP beruht, ist davon auszugehen, dass der in der Rab6/R6IP-Kristallstruktur visualisierte Bindemodus die Bindung an Rab8 nur unzureichend beschreibt. Alle Versuche, das exakte Bindungsverhalten von **42** durch eine Kristallstruktur mit Rab8(GppNHp) zu erhalten, schlugen fehl.²⁸⁰ Daher wurde der Bindemodus von **42** mit Hilfe der Alanin-Scanning Technologie^{301,302} genauer untersucht. Durch den Austausch jeder einzelnen Aminosäure der Peptidsequenz durch Alanin wurde der Einfluss der ausgetauschten Seitenkette auf die Affinität des gesamten Peptids untersucht (Abbildung 28). Dazu wurden mit Hilfe von SPPS alle 14 möglichen Alanin Mutanten von **42** synthetisiert, mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert und auf ihre Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) getestet. Dabei wurden vier Aminosäuren (Phe906, His909, Leu910 und Leu911) in der Mitte der Peptidsequenz identifiziert, die besonders essentiell für die Bindung sind. Ein Austausch einer dieser Aminosäuren durch Alanin reduzierte die Bindungsaffinität zu Rab8a(GppNHp) um mehr als das 4-fache. Insgesamt zeigten alle Alanin-Mutanten eine verringerte Affinität. Lediglich für die Q905A Seitenkettenmutation wurde eine minimal erhöhte Affinität beobachtet.

Parallel zum Alanin-Scan wurde ein Arginin-Scan durchgeführt (Abbildung 28). Die zelluläre Aufnahme von Peptiden ist ein komplexer Prozess, der bisher nicht vollständig verstanden ist.¹⁵⁵ Peptide mit einer geringen Gesamtladung bzw. schwach positiv geladene Peptide scheinen jedoch eine größere Tendenz zur zellulären Aufnahme zu besitzen.^{150,158} Peptid **42** ist mit einer Gesamtladung von -3.9 bei pH 7 (berechnet mit Hilfe des *peptide property calculator* (Innovagen)) stark negativ geladen. Der systematische Einbau von

Arginin sollte Positionen identifizieren, die den Einbau einer positiven Ladung tolerieren. Auf diese Weise sollte die negative Gesamtladung unter Erhalt der Bindungsaffinität reduziert werden. Die Peptidsequenz von **42** scheint jedoch sehr sensitiv gegenüber dem Einbringen positiver Ladungen zu sein. Außer der Q905R Mutation, die erneut eine vernachlässigbare Verbesserung der Affinität aufweist, führt der Einbau von Arginin zu einem deutlichen Bindungsverlust. Insgesamt neun Positionen (Asp900, Glu904, Phe906, Tyr908, His909, Leu910, Leu911, Phe913 und Asn914) konnten identifiziert werden, bei denen eine Arginin-Mutation zu einem mehr als 4-fachen Verlust der Affinität führt. Zusammen mit dem Alanin-Scan konnten insbesondere die Aminosäuren in der Mitte der Peptidsequenz als äußerst sensibel für Mutationen identifiziert werden. Die Reduzierung der negativen Gesamtladung durch den Einbau von positiv geladenen Aminosäuren erscheint auf Grundlage des Arginin-Scans äußerst anspruchsvoll. Lediglich die Position Gln905 scheint eine Mutation der Seitenkette ohne großen Affinitätsverlust zu tolerieren.

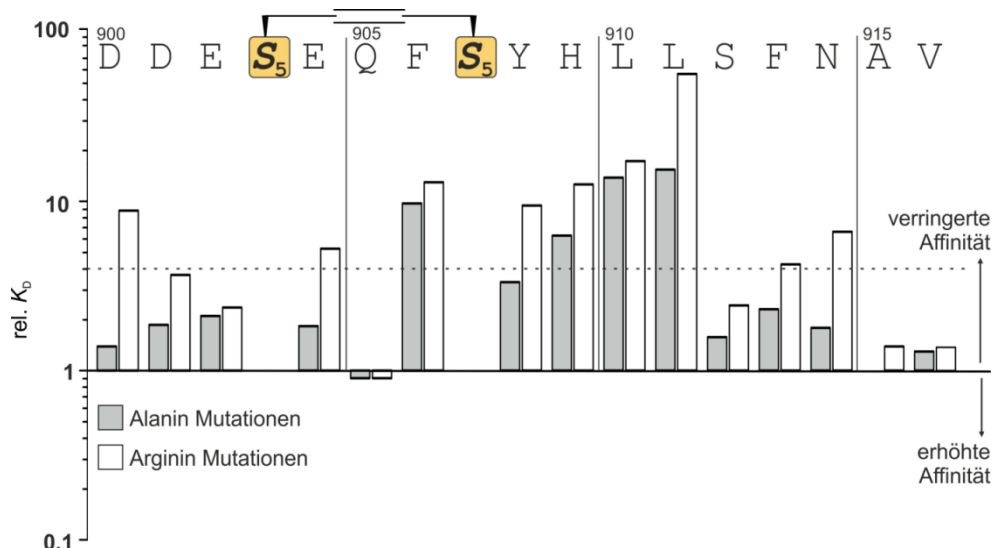


Abbildung 28. Alanin- und Arginin-Scan von Peptid **42**. Sequentielle Substitution der einzelnen Aminosäuren durch Alanin (grau) oder Arginin (weiß). Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) sind farblich hervorgehoben. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [**42**]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; K_D [**42**_{Ala}] = 12.7 μ M; K_D [**42**_{Arg}] = 12.2 μ M. Eine Auflistung der relativen und absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 19).

5.2.2 Einbau α -methylierter Aminosäuren zur Stabilisierung des C-Terminus

Wie die Analyse der proteolytischen Stabilität von **42** in Abschnitt 5.1.4 bereits gezeigt hat, ist der C-Terminus der Peptidsequenz besonders anfällig. Die fünf C-terminalen Aminosäuren von **42** werden sehr schnell abgebaut. Das entstandene Fragment **54** in der Umgebung der Kohlenwasserstoffverbrückung bleibt anschließend über einen langen Zeitraum stabil. Folglich zielten die ersten Überlegungen darauf ab, den C-Terminus von **42** gegenüber proteolytischem Verdau zu stabilisieren. Dazu wurde zunächst der unnatürliche Baustein α -Aminoisobutylsäure (Aib (**60**), Abbildung 29b) in die Peptidsequenz eingebaut. Aib ist ein Helix induzierender Baustein und vergrößert die Halbwertszeit von Peptiden durch sterische

Hinderung.³⁰³ Aib wurde an den zuvor identifizierten Schnittstellen von Proteinase K (Abbildung 27) mittels SPPS in die Peptidsequenz eingebaut (**55**, **56**, Tabelle 1). Die mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisierten Peptide wurden im FP-Experiment auf ihre Affinität zu Rab8a(GppNHp) getestet, die acetylierten Peptide wurden auf ihre Halbwertszeit gegenüber Proteinase K untersucht.

Tabelle 1. Sequenzen und Bindungsdaten der Aib stabilisierten Peptide. Die Halbwertszeiten wurden als Dreifachmessungen mit 10 µg/mL Proteinase K durchgeführt (Fehler entspricht 1σ). Die Affinitäten gegenüber Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp) wurden mittels FP bestimmt. Die α-methylierten Olefinbausteine (gelb) und α-methylierten Aminosäuren (rot) sind farblich hervorgehoben. Die primäre Proteaseschnittstelle ist rot markiert. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [**42**]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; [a] K_D [**42**] = 11.9 µM. Eine Auflistung der absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 20).

Peptid	Sequenz	$t_{1/2}$ [min]	rel. K_D [a]
	900 905 910 915		
42	D D E S₅ E Q F S₅ Y H L L ▼ S F N A V	0.30 ± 0.06	1.0
55	D D E S₅ E Q F S₅ Y H L L Aib ▼ F N A V	3.4 ± 0.5	0.8
56	D D E S₅ E Q F S₅ Y H L Aib S ▼ F N A V	4.1 ± 0.6	2.7
57	D D E S₅ E Q F S₅ Y H L Aib S ▼ F N Aib V	322 ± 17	5.4

Der Einbau von Aib an den Positionen 911 (**56**) und 912 (**55**) führte zu einer geringfügig verlängerten Halbwertszeit von $t_{1/2}$ [**56**] = 4.1 min bzw. $t_{1/2}$ [**55**] = 3.4 min und verschiebt die primäre Schnittstelle von Proteinase K in Richtung des C-Terminus (Tabelle 1). Daraufhin wurde ein zweiter Aib Baustein an Position 915 in die Peptidsequenz eingebaut (**57**). Wie erwartet erhöhte der Einbau eines weiteren Aib Bausteins die proteolytische Stabilität des Peptids. Peptid **57** zeigte mit $t_{1/2} \sim 320$ min eine vielfach höhere proteolytische Stabilität im Vergleich zu **42**. Allerdings zeigte **57** eine mehr als 5-fach geringere Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) als das Ausgangspeptid **42**. Die reduzierte Affinität kann dabei durch den Verlust der Leucin-Seitenkette an Position 911 erklärt werden. Diese Position wurde bereits im Alanin-Scan als essentiell identifiziert (Abschnitt 5.2.1) und bestätigte sich auch für **56** (~3-facher Verlust an Affinität). Lediglich die S912Aib Mutation scheint keine negativen Auswirkungen auf die Affinität von **55** zu haben. Allerdings ist die minimale Steigerung der Halbwertszeit auf $t_{1/2}$ [**55**] = 3.5 min nicht ausreichend. Eine Steigerung der proteolytischen Stabilität ist zwar auch in anderen Studien mit einem Verlust an Bindungsaffinität verbunden,^{10,143} allerdings ist das bei der ohnehin schon mittelmäßigen Startaffinität von **42** für dieses System nicht hinnehmbar. Daher wurde nach alternativen Methoden gesucht, die proteolytische Stabilität unter Erhalt der Affinität zu erhöhen.

5.2.3 Synthese α -methylierter Bausteine für die Peptidsynthese

Der Einbau des α -methylierten Bausteins Aib erhöhte die proteolytische Stabilität, führte jedoch aufgrund der fehlenden Seitenkette in Bezug auf die Bindungsaffinität zu deutlichen Verlusten. Um die Bindungsaffinität bei gleichzeitiger Erhöhung der proteolytischen Stabilität zu erhalten, war der Einbau von α -methylierten Aminosäuren die logische Konsequenz. Vor allem Leu910 ist essentiell für die Bindung an Rab8a(GppNHp) und sollte durch sein α -methyliertes Analogon α -Methyl-Leu (α L, **59**) ersetzt werden. Darüber hinaus wurde in Punktmutationsstudien eine L910F Mutation als vielversprechend in Bezug auf die Bindungsaffinität gefunden.²⁷⁸ Daher wurde neben α L auch α -Methyl-Phe (α F, **58**) in die Sequenz von **42** eingebaut.

Die Synthese der α -methylierten Aminosäuren α F (**58**) und α L (**59**) erfolgte mit Hilfe des bereits in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen chiralen Ni(II)-Komplexes **36** (Abbildung 29a). Dazu wurde Komplex **36** deprotoniert und in einer nukleophilen Substitution mit Benzylbromid bzw. 1-Brom-2-methylpropan umgesetzt. Anschließend wurde der Komplex im Säuren gespalten, das chirale Auxiliar **35** abgetrennt und die freie Aminosäure mit Fmoc geschützt. Auf diese Weise ließen sich die bei beiden α -methylierten Aminosäuren α F (**58**) und α L (**59**) in guten Ausbeuten darstellen.

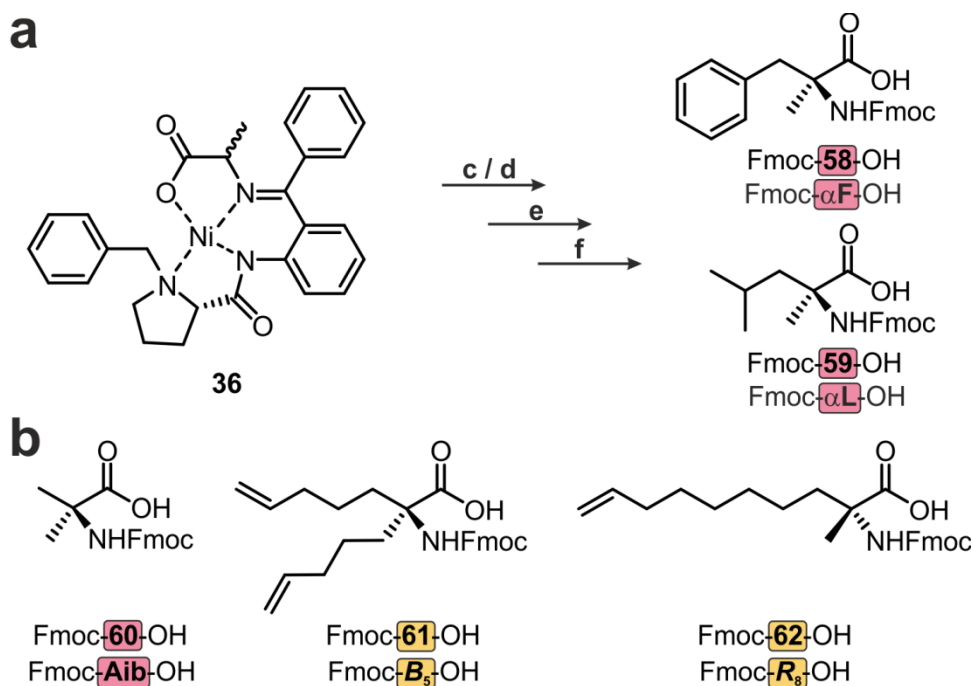


Abbildung 29. Synthese α -methylierter Aminosäuren. (a) Synthese der α -methylierten Aminosäuren α F (**58**) und α L (**59**). **c**) Benzylbromid, KOH, DMF, 0° C bis Raumtemperatur 2 h; **d**) 1-Brom-2-methylpropan, KOH, DMF, 0° C bis Raumtemperatur 2 h; **e**) HCl_{aq.}, MeOH, Reflux, 2 h; **f**) Fmoc-Osu, Na₂CO₃, Dioxan/Wasser, Raumtemperatur, 7d. (b) Bausteine für die Synthese verbesserter Rab8a Binder: Fmoc-Aib-OH (**60**), Fmoc- B_5 -OH (**61**) und Fmoc- R_8 -OH (**62**).

5.2.4 Optimierung der Bindungsaffinität

Da der erste Versuch die proteolytische Stabilität durch den Einbau von Aib zu erhöhen eine verringerte Affinität zur Folge hatte, sollte zunächst die Affinität von **42** optimiert werden. Dies sollte allerdings mit Rücksicht auf die proteolytische Stabilität erfolgen. Daher wurden, wie in Abschnitt 5.2.3 erwähnt, die α -methylierten Aminosäuren α L und α F in die Peptidsequenz eingebaut, um die Affinität gegenüber Rab8a zu konservieren und zugleich für eine erhöhte Proteaseresistenz zu sorgen. Da für eine effektive Verbesserung der Stabilität der Einbau von zwei α -methylierten Bausteinen notwendig ist (Tabelle 1), wurde zusätzlich zur α -methylierten Aminosäure an Position 911 eine A915Aib Mutation eingeführt. Die resultierenden Peptide **63** und **66** wurden an fester Phase synthetisiert, mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert und im FP-Experiment auf ihre Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) getestet (Tabelle 2). Zusätzlich wurden die Peptide **64** und **67** hergestellt, die die α -methylierten Aminosäuren α L und α F jeweils an den Positionen 911 und 915 tragen. Damit sollte untersucht werden, ob eine weitere hydrophobe Seitenkette an Position 915 für einen zusätzlichen Affinitätsgewinn sorgt. Zudem wurden die Peptide **65** und **68** synthetisiert, die α L und α F an den Positionen 911 und 915 tragen.

Da die Peptidsequenz im Bereich der Verbrückung äußerst stabil gegenüber proteolytischem Abbau ist, sollten zusätzliche Verbrückungsarchitekturen untersucht werden (Tabelle 2). Dabei wurde darauf geachtet einen möglichst großen Bereich der Peptidsequenz mit Hilfe der Verbrückungen abzudecken. Peptid **69** besitzt eine α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung im Abstand von $i, i+7$ und sollte so einen größeren Bereich des C-Terminus schützen als die kürzere $i, i+4$ Verbrückung. Durch den Einbau einer *stitched* Verbrückung in **70** wird fast die gesamte Peptidsequenz durch einen Makrozyklus geschützt. Darüber hinaus wurde **71** mit zwei einzelnen $i, i+4$ Verbrückungen synthetisiert. Die erste entspricht der von Peptid **42** an den Positionen 903 und 907, die zweite Verbrückung befindet sich an den Positionen 911 und 915, die zuvor für den Einbau von Aib verwendet wurden. Insgesamt befinden sich somit nicht-natürliche Aminosäuren im Abstand $i, i+4$, $i+8$, und $i+12$ und bilden eine Kohlenwasserstoffverbrückung im C-terminalen und eine Verbrückung im N-terminalen Bereich des Peptids. Der hydrophobe Makrozyklus sollte auf diese Weise den Verlust der Leu911 Seitenkette kompensieren. Alle Peptide wurden mit Hilfe von SPPS hergestellt und für FP-Experimente mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert.

Tabelle 2. Sequenzen und Bindungsdaten unterschiedlich stabilisierter Peptide. Die Affinitäten gegenüber Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp) wurden mittels FP bestimmt. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb), die α -methylierten Aminosäuren (rot) und Affinitätsmutationen (blau) sind farblich hervorgehoben. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [42]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; [a] K_D [42] = 11.9 μ M; [b] K_D [42] = 43.9 μ M. Eine Auflistung der absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 20).

Peptid	Sequenz										rel. K_D ^[a]							
	900	905	910	915														
42	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	L	S	F	N	A	V	1.0
57	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	Aib	S	F	N	Aib	V	5.4
63	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α L	S	F	N	Aib	V	1.1
64	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α L	S	F	N	α L	V	1.4
65	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α L	S	F	N	α F	V	1.3
66	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α F	S	F	N	Aib	V	0.8
67	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α F	S	F	N	α F	V	1.4
68	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	α F	S	F	N	α L	V	0.9
69	D	D	E	R ₈	E	Q	F	L	Y	H	S ₅	L	S	F	N	A	V	0.7
70	D	D	E	S ₅	E	Q	F	B ₅	Y	H	L	L	S	F	S ₈	A	V	0.7
71	D	D	E	S ₅	E	Q	F	S ₅	Y	H	L	S ₅	S	F	N	S ₅	V	0.6
72	D	D	E	S ₅	E	W	F	S ₅	Y	H	L	S ₅	S	F	N	S ₅	V	0.4 ^[b]
73	D	D	E	S ₅	E	W	F	S ₅	Y	H	L	S ₅	F	F	N	S ₅	V	0.3 ^[b]

Wie erwartet wirkt sich die Kombination aus einer α -methylierten Aminosäure an Position 911 und dem Austausch von Ala915 durch Aib (Peptide **63**, **66**) positiv auf die Affinität der Peptide aus (Tabelle 2). Durch den Erhalt der hydrophoben Seitenkette an Position 911 binden beide Peptide mit ähnlicher Affinität wie das Ausgangspeptid **42** an Rab8a(GppNHp). Der Einbau von α F (rel. K_D [**66**] = 0.8) ist dabei im Vergleich zu α L (rel. K_D [**63**] = 1.1) minimal von Vorteil. Das Hinzufügen einer hydrophoben Seitenkette an Position 915 ist hingegen nicht vorteilhaft. Die Peptide **64**, **65** und **67** zeigen mit relativen K_D -Werten von 1.3 bzw. 1.4 eine verringerte Affinität. Zwar hat **68** mit einem relativen K_D -Wert von 0.9 eine minimal höhere Affinität, liegt aber dennoch unter der von Peptid **66**. Somit zeigen die Ergebnisse die prinzipielle Einsetzbarkeit der α -methylierten Aminosäuren. Die deutlichen Affinitätsverluste durch das Entfernen der Leu911 Seitenkette in **57** konnten durch diesen Ansatz ausgeglichen werden.

Der Einbau zusätzlicher Verbrückungsarchitekturen übertrifft allerdings den Erfolg der α -methylierten Aminosäuren. Sowohl das *i,i+7* kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **69**, wie auch das *stitched* Peptid **70** zeigen eine höhere Bindungsaffinität (rel. K_D [**69**, **70**] = 0.7). Während bei dem *i,i+7* stabilisierten Peptid **69**

unklar ist, ob die verlängerte Verbrückung ausreicht den gesamten C-Terminus vor proteolytischem Abbau zu schützen, so dürfte dies bei dem *stitched* Peptid **70**, das nahezu die komplette Sequenz überspannt, gewährleistet sein. Eine noch größere Verbesserung der Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) wurde jedoch für das zweifach verbrückte Peptid **71** beobachtet. Der Einbau von zwei einzelnen $i,i+4$ Verbrückungen an den Positionen 903/907 bzw. 911/915 lieferte Peptid **71** mit einem relativen K_D -Wert von 0.6.

Die Veränderung der Verbrückungsarchitektur kompensierte nicht nur den Affinitätsverlust durch das Entfernen der L911 Seitenkette, sie lieferte mit **71** einen deutlich affineren Binder für Rab8a. Da das Grundgerüst aus zwei kovalenten Verbrückungen in ausreichendem Maße resistent gegenüber proteolytischem Verdau sein sollte, wurde die Peptidsequenz weiter affinitätsoptimiert. Die im Alanin- und Arginin-Scan (Abschnitt 5.2.1) identifizierte Position 905 toleriert eine Mutation der Glutamin-Seitenkette und lieferte Peptide mit leicht erhöhter Affinität. Daher wurde versucht durch den Einbau hydrophober Seitenketten an Position 905 die Affinität der Peptide weiter zu steigern. Dabei erwies sich die Q905W Mutation als besonders förderlich (Anhang, Tabelle 20). Sie lieferte **72** mit einem relativen K_D -Wert von 0.4. Das durch die S912Aib Mutation entstandene Peptid **55** (Tabelle 1) zeigte ebenfalls eine leicht erhöhte Affinität gegenüber Rab8a. Obwohl diese Position im Alanin-Scan keine besonderen Verbesserungen zeigte, wurden aufgrund von **55** einige Analoga mit einer Ser912 Mutation synthetisiert (Anhang, Tabelle 20). Dies resultierte in Peptid **73** als besten Binder von Rab8a mit einem relativen K_D -Wert von 0.3. Peptid **73** basiert auf demselben zweifach verbrückten Grundgerüst wie **71** und weist zudem zwei zusätzliche Affinitätsmutationen Q905W und S912F auf.

5.2.4.1 Synthese doppelt verbrückter Peptide

Peptid **73** besitzt mit zwei $i,i+4$ Verbrückungen im Abstand $i,i+4$ eine zuvor noch nicht verwendete Geometrie. Um die Bildung von Regioisomeren bei der Ringschlussreaktion zu vermeiden, wurden die Makrozyklen *bis dato* entweder in größerer^{120,121} oder geringerer Entfernung³⁰⁴ voneinander angeordnet. In dem für **73** gewählten Grundgerüst, sind mehrere Verbrückungsgeometrien denkbar was in anderen Systemen zu der Entstehung unterschiedlicher Isomere führte.³⁰⁵ Die mehrfache Behandlung des offenkettigen Edukts mit Grubbs-I- Katalysator lieferte jedoch ein einziges Regioisomer, bei dem es sich um das gewünschte Produkt **73** mit zwei individuell geschlossenen Verbrückungen handelte. Die korrekte Anordnung der Makrozyklen konnte durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bestätigt werden (Abbildung 30).

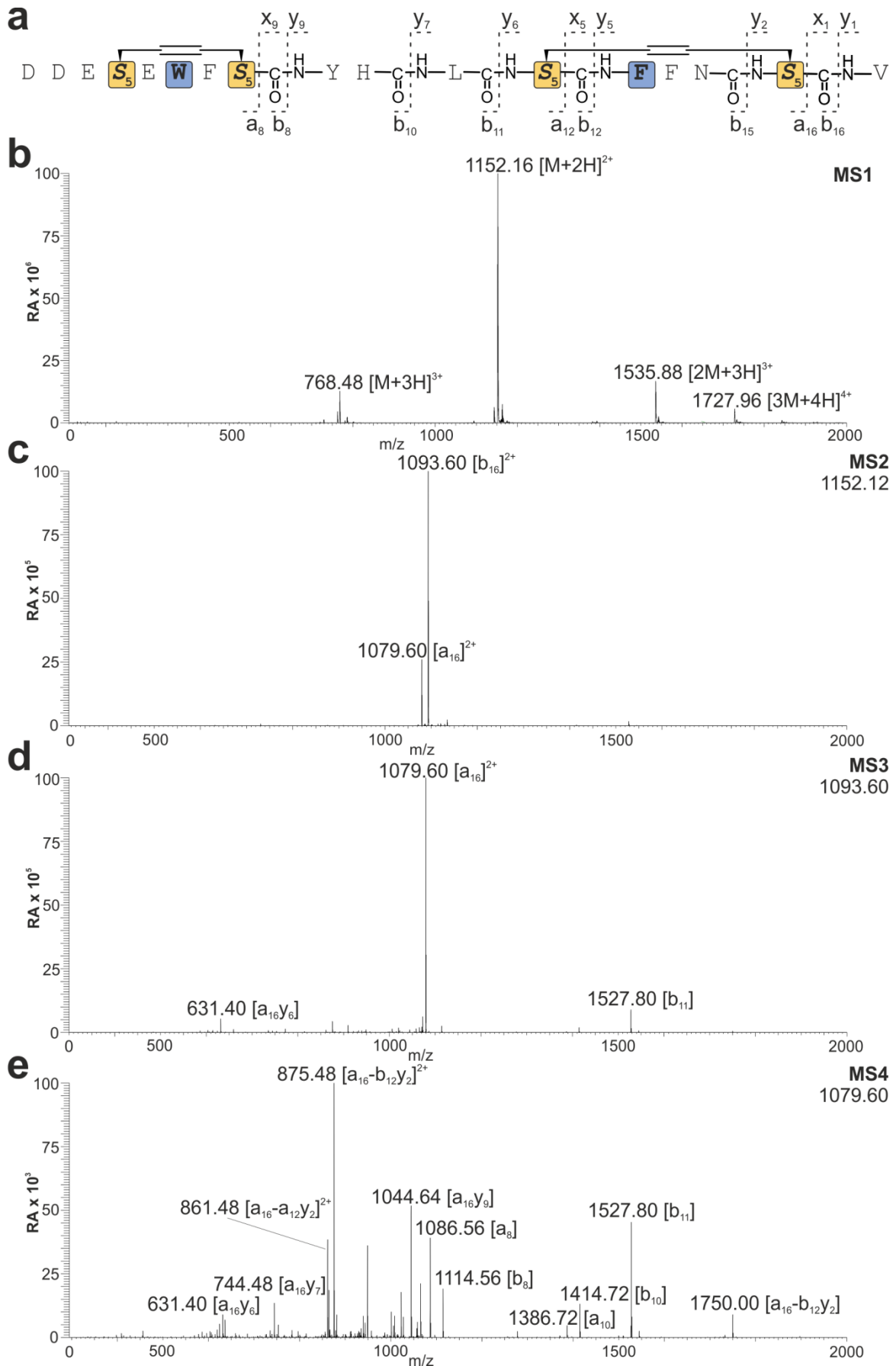


Abbildung 30. Tandem-Massenspektrometrie von **73**. (a) Sequenz und Fragmentierungsmuster des doppelt verbrückten Peptids **73**. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und Affinitätsmutationen (blau) sind farblich hervorgehoben. (b) MS1 Spektrum von **73**. (c) MS2 Spektrum von **73**. (d) MS3 Spektrum von **73**. (e) MS4 Spektrum von **73**.

Die mehrfache Isolierung einzelner Ionen und anschließende Fragmentierung bis in MS4 ermöglicht die Identifikation einzelner Fragmente, die eindeutig die korrekte Verknüpfung von **73** belegen. In einem ersten Schritt (MS2) verliert die Peptidsequenz das C-terminale Valin durch einen b_{16} Bruch (Abbildung 30c). In geringem Maße ist zudem bereits der a_{16} Bruch durch zusätzliche Abspaltung von CO zu erkennen, der in MS3 deutlich hervortritt. In MS3 deutet sich bereits eine weitere Fragmentierung nach b_{11} und $a_{16}y_6$ an (Abbildung 30d). Intensive Fragmentierung von **73** kann schließlich in MS4 erreicht werden (Abbildung 30e). Dabei entstehen zahlreiche Brüche, die eindeutig diskreten Fragmenten zugewiesen werden können. Das intensivste Signal ($875.48 [M+2H]^{2+}$ bzw. $1750.00 [M+H]^+$) entsteht durch doppelten Bruch des Peptidrückgrats unterhalb der C-terminalen Verbrückung. Der erste Bruch passiert zunächst vermutlich in MS3, bleibt allerdings unentdeckt, da durch die Verbrückung kein Fragment abgespalten wird und somit das m/z Verhältnis unverändert ist. Erst der zweite Bruch in MS4 führt zur Abspaltung eines Fragments und verändert das m/z Verhältnis, sodass eine Masse von $875.48 [M+2H]^{2+}$ ($a_{16}-b_{12}y_2^{2+}$) bzw. $1750.00 [M+H]^+$ ($a_{16}-b_{12}y_2$) detektiert werden kann. Dadurch lässt sich die korrekte Verknüpfung des doppelt verbrückten Peptidgerüsts für **73** eindeutig belegen.

5.2.5 Steigerung der Zellgängigkeit

Das affinitätsoptimierte Peptid **73** trägt zwar einige Mutationen im Vergleich zum Ausgangspeptid **42**, besitzt aber noch eine Gesamtladung von -3.9. Zwar sollte die zweite α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung die Hydrophobizität des Peptids erhöhen und sich dadurch theoretisch positiv auf die Zellgängigkeit auswirken, dennoch sollte die Gesamtladung für eine bessere Zellgängigkeit so weit wie möglich reduziert werden. Der Einbau von positiven Ladungen führte, wie durch den Arginin-Scan (Abschnitt 5.2.1) bereits gezeigt, zu einem deutlichen Verlust der Affinität und die einzig mögliche Position 905 ist in Peptid **73** bereits durch eine Affinitätsmutation belegt. Daher wurde die Gesamtladung durch den Austausch der negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu durch ihre ungeladenen Analoga Asn und Gln reduziert. Insgesamt befinden sich vier negativ geladene Aminosäuren am N-Terminus von **42/73** (Asp900, Asp901, Glu902 und Glu904). Daraus ergeben sich 16 mögliche Kombinationen, bei denen einzelne oder alle negativ geladenen Aminosäuren durch ungeladene ersetzt werden können. Die Synthese der 16 Peptide (**73** – **88**) erfolgte mit Hilfe von SPPS und alle Peptide wurden mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert (Tabelle 3). Die Bestimmung der relativen Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) erfolgte mit Hilfe von FP. Insgesamt ist dabei festzustellen, dass mit steigender Anzahl an zusätzlich eingeführten Mutationen die Affinität der Peptide abnimmt. Während das Peptid **73** mit einem relativen K_D von 0.3 an Rab8a bindet, reduziert sich die Affinität der weiteren Analoga bis die identische Affinität des Ursprungspeptids **42** erreicht ist (rel. K_D [**80**] = 1.0). Tendenziell scheinen die Affinitätsverluste der Peptide mit einer E904Q Mutation (Peptide **81** – **88**) etwas geringer auszufallen. Insgesamt steht, wie bereits erwähnt, bei der Steigerung der biologischen Aktivität von Peptid **42** die Synergie aus Affinität, Zellgängigkeit und proteolytischer Stabilität im Vordergrund. Daher wurden neben dem affinitätsoptimierten

Peptid **73** drei Peptide mit potentiell höherer Zellgängigkeit und akzeptabler Affinität für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Es handelte sich dabei um die Peptide **81**, **83** und **84**, die eine Gesamtladung von -2.9 bzw. -1.9 besitzen. Die Affinität dieser Peptide sollte in einer Dreifachmessung verifiziert werden und sie sollten in abschließenden Untersuchungen auf ihre Zellgängigkeit und proteolytische Stabilität getestet werden.

Tabelle 3. Sequenzen und Bindungsdaten doppelt verbrückter Peptide. Die Affinitäten gegenüber Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp) wurden mittels FP bestimmt. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb), Affinitätsmutationen (blau) und Ladungsmutationen (grün) sind farblich hervorgehoben. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [**42**]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; [a] K_D [**42**] = 53.0 μ M. Eine Auflistung der absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 20)

Peptid	Sequenz				rel. K_D ^[a]
	900	905	910	915	
42	D D E	S ₅ E Q F S ₅	Y H L L S F N A V		1.0
73	D D E	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.3
74	D D Q	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.6
75	D N E	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.6
76	N D E	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.6
77	D N Q	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.7
78	N D Q	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
79	N N E	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
80	N N Q	S ₅ E W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		1.0
81	D D E	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.4
82	D D Q	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
83	D N E	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.5
84	N D E	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.7
85	D N Q	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
86	N D Q	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
87	N N E	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.8
88	N N Q	S ₅ Q W F S ₅	Y H L S ₅ F F N S ₅ V		0.9

5.2.6 Abschließende Evaluierung der optimierten Rab8 Binder

(Die Durchflusszytometrieanalyse der zellulären Aufnahme der Peptide wurde von M.Sc. Laura Dietrich und die Co-Lokalisationsexperimente von Dipl. Biol. Philipp Küchler durchgeführt.)

Die bisherigen Untersuchungen zur Steigerung der biologischen Verfügbarkeit von **42** lieferten die vier Peptide **73**, **81**, **83** und **84**, die abschließend in allen drei berücksichtigten Bereichen, Affinität, Zellgängigkeit und proteolytische Stabilität, evaluiert werden sollten. Die Bestimmung absoluter K_D -Werte erfolgte in Dreifachmessungen mit Hilfe von FP. Für alle Peptide konnte eine deutlich höhere Affinität gegenüber Rab8a(GppNHp) festgestellt werden (Abbildung 31a, b). Insbesondere das affinitätsoptimierte Peptid **73** zeigte mit einem K_D -Wert von 7.8 μM eine mehr als 3.8-fach höhere Affinität im Vergleich zu **42**. Wie bereits erwähnt, führte der Austausch negativ geladener Aminosäuren durch ihre nicht geladenen Analoga zu einem Affinitätsverlust (Tabelle 3). Dennoch zeigten die ladungsoptimierten Peptide **81**, **83** und **84** Dissoziationskonstanten von $K_D[\mathbf{81}] = 10.3 \mu\text{M}$, $K_D[\mathbf{83}] = 12.7 \mu\text{M}$ und $K_D[\mathbf{84}] = 13.5 \mu\text{M}$ die ebenfalls unter der von Peptid **42** lagen (Abbildung 31a). Die Analyse der proteolytischen Stabilität zeigte hingegen eine gewaltige Steigerung der Proteaseresistenz. Der Einbau der zweiten Verbrückung stabilisiert die Peptide **73**, **81**, **83** und **84** um das mehr als 10 000-fache im Vergleich zu **42**, sodass selbst nach 48 h Inkubation mit Proteinase K (10 $\mu\text{g/mL}$) noch mehr als 95% des intakten Peptids nachgewiesen werden konnten (Abbildung 31a, c).

Eine Messung des helikalen Anteils mit Hilfe von CD-Spektroskopie lieferte Helizitäten im Bereich von **42** (Abbildung 31a). Der Einbau einer zusätzlichen α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung führte demnach nicht zu einer Erhöhung des helikalen Anteils in Lösung. Da, wie bereits in Abschnitt 5.1.4 erwähnt, eine Abschätzung der zellulären Aufnahme von Peptiden durch den Einsatz fixierter Zellen beeinflusst werden kann, wurde die Zellgängigkeit der optimierten Peptide **73**, **81**, **83** und **84** mit Hilfe von Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen für 90 min mit einer 5 μM Lösung des Fluorescein-markierten Peptids inkubiert und nach anschließendem Waschen mittels Durchflusszytometrie bei 530 nm quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe der Positivkontrolle, dem zellgängigen Peptid Tat₄₉₋₅₇,³⁰⁶⁻³⁰⁸ dessen zelluläre Aufnahme gleich eins gesetzt wurde, normiert (Abbildung 31 d). Im Vergleich zur Positivkontrolle Tat₄₉₋₅₇ erreichte das Ausgangspeptid **42** bei einer Konzentration von 5 μM eine zelluläre Aufnahme von 76%. Überraschenderweise zeigte das doppelt verbrückte, affinitätsoptimierte Peptid **73** bei gleicher Gesamtladung eine deutlich reduzierte relative Zellgängigkeit von 0.54 im Vergleich zu **42**. Der Austausch einer negativen Ladung in **81** und die Reduktion der Gesamtladung auf -2.9 führte zu einer leicht erhöhten zellulären Aufnahme von 0.64 verglichen mit **42**. Erstaunlicherweise resultierte der Austausch einer zweiten negativen Ladung an Position 901 (D901N) in einem Anstieg der Zellgängigkeit für Peptid **83** (Gesamtladung -1.9). Im Vergleich zum Ausgangspeptid **42** zeigte Peptid **83** eine 1.5-fach höhere Zellgängigkeit und liegt damit im Bereich des zellgängigen Peptides Tat₄₉₋₅₇. Eine Verschiebung der nicht-geladenen Aminosäure an Position 900 (D900N) in **84** bewirkte eine leichte Abnahme der Zellgängigkeit. In Bezug auf Peptid **42** zeigte **84** eine relative zelluläre Aufnahme von 1.15, erreichte aber verglichen mit

Tat₄₉₋₅₇ nur eine Aufnahme von 87%. Unter Berücksichtigung aller getesteten Parameter wurde **83** als geeignetstes Peptid für *in vivo* Untersuchungen ausgewählt. Im Vergleich zum Ausgangs-peptid **42** weist **83** in drei Bereichen deutlich verbesserte Eigenschaften auf.

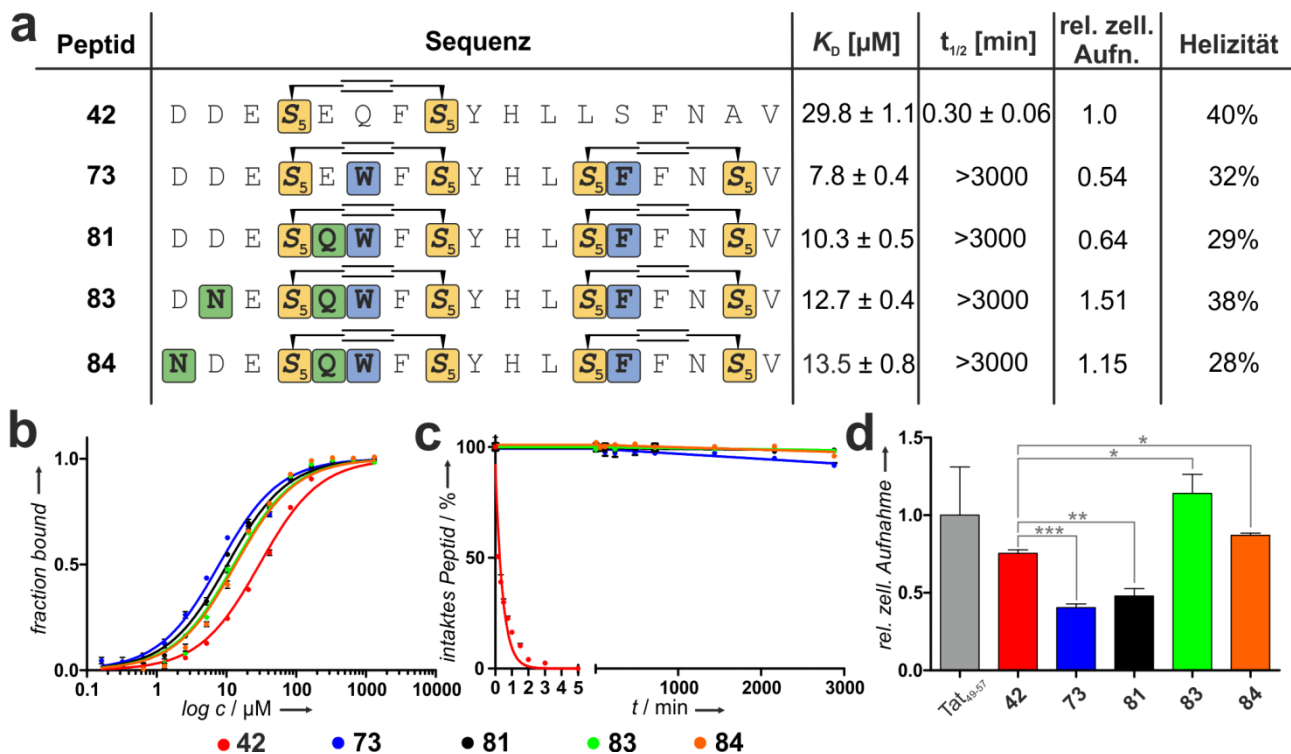


Abbildung 31. Evaluierung der besten Binder. (a) Sequenz, proteolytische Stabilität, Affinität, relative zelluläre Aufnahme (rel. zell. Aufnahme = zell. Aufnahme [Peptid] / zell. Aufnahme [42]) und Helizität von **42** und den vielversprechendsten Analoga **73**, **81**, **83** und **84**. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb), Affinitätsmutationen (blau) und Ladungsmutationen (grün) sind farblich hervorgehoben. Die angegebenen K_D -Werte, Halbwertszeiten und zelluläre Aufnahme entsprechen Dreifachmessungen. (Fehler entspricht 1σ). (b) FP-Graph der Dreifachmessung mit Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp). (c) Proteolytischer Stabilitätsassay; Dreifachmessung. (d) Relative zelluläre Aufnahme mit Hilfe von Durchflusszytometrie Messungen im Vergleich zur Positivkontrolle Tat₄₉₋₅₇; Dreifachmessung. Signifikanz p gegenüber **42**: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In einem abschließenden Experiment wurde die zelluläre Lokalisation von **83** und Rab8a untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen für 18 h mit Fluorescein-funktionalisiertem Peptid inkubiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung mit Triton X-100 wurde Rab8a mit einem Antikörper markiert und mit einem Alexa594-Konjugat angefärbt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (Abbildung 32). Da die Peptide aufgrund ihrer geringen Größe nur unzureichend fixiert wurden, wurden sie teilweise während der nachfolgenden Arbeitsschritte wieder ausgewaschen, was zu einer reduzierten Signalintensität führte. Trotzdem war ein eindeutiger Unterschied zwischen **83** und Tat₄₉₋₅₇ zu erkennen. Peptid **83** lokalisierte am Endomembransystem der Zelle (Abbildung 32a). Aufgrund seiner Lipidmodifikation ist Rab8a ebenfalls am Endomembransystem lokalisiert. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (Peptid **83**: grün, Rab8a: rot) zeigte, dass sich Peptid **83** im selben zellulären Kompartiment und in unmittelbarer Nähe von Rab8a befindet (Abbildung 32b). Dies deutet auf eine

zumindest vorübergehende Komplexbildung hin. Im Gegensatz dazu war Tat₄₉₋₅₇ diffus in der Zelle verteilt und zeigte keinerlei Co-Lokalisation mit Rab8a.

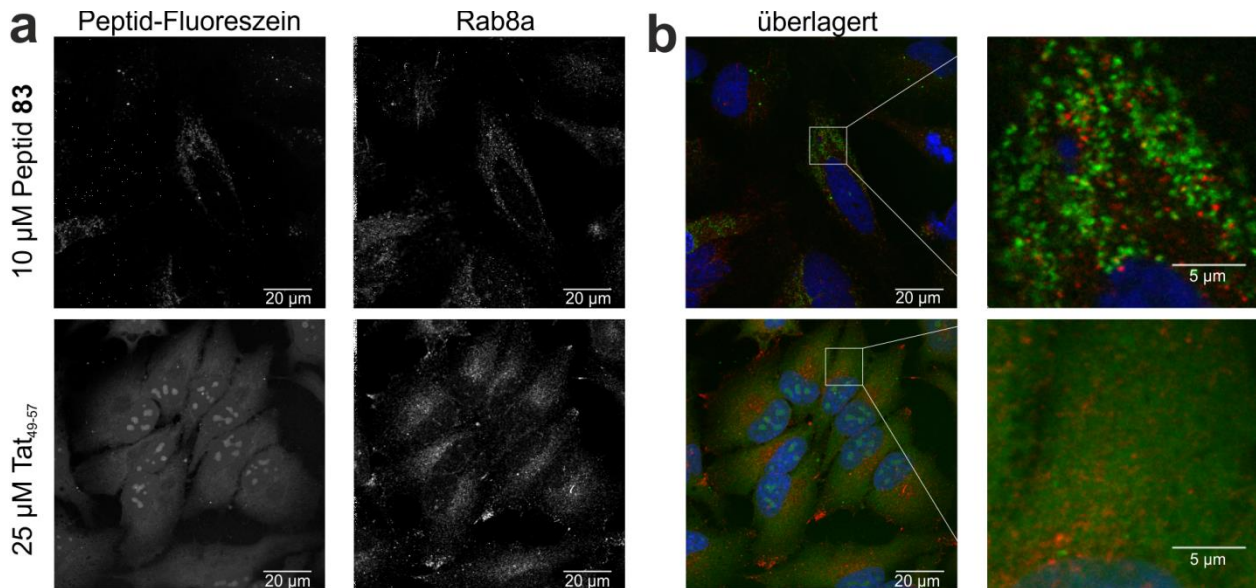


Abbildung 32. Zelluläre Lokalisation von **83** und Rab8a. (a) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit fluoreszein-markiertem Peptid **83** bzw. Tat₄₉₋₅₇ (links). Rab8a (rechts) wurde mit einem spezifischen Antikörper (Alexa594) markiert. (b) Überlagerung der Fluoreszenzbilder der markierten Peptide (grün), Rab8 (rot) und DNA (blau). Vergrößerung des Endomembransystems (rechts).

Unter allen getesteten Peptiden zur Optimierung der biologischen Verfügbarkeit von **42** zeigte **83** die wesentlichsten Verbesserungen über alle drei Bereiche. Peptid **83** bindet an Rab8a(GppNHp) mit einer um das 2.3-fache erhöhten Affinität, hat eine um das 1.5-fache höhere zelluläre Aufnahme und ist mehr als 10 000-fach stabiler gegenüber proteolytischem Verdau. Dies sind in Bezug auf kleine GTPasen beeindruckende Steigerungen, die das Potential α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide für die Adressierung pharmakologisch schwer zugänglicher Proteine unterstreichen. Peptid **83** ist insgesamt im Vergleich zum Ausgangspeptid **42** an sechs Positionen verändert. Neben der α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung an den Positionen 903 und 907 trägt es eine weitere an den Positionen 911 und 915. Zudem besitzt **83** zwei Affinitätsmutationen, Q905W und S912F, sowie zwei Zellgängigkeitsmutationen D901N und E904Q. Obwohl **83** eine negative Gesamtladung von -1.9 besitzt, übertrifft es das zellgängige Peptid Tat₄₉₋₅₇ in Bezug auf zelluläre Aufnahme. Darüber hinaus lokalisiert **83** im selben zellulären Kompartiment wie Rab8a und erscheint damit brauchbar für weiterführende zelluläre Studien.

5.3 Synthese zyklischer Peptide mittels Alkin-Ringschlussmetathese

Wie bereits in Abschnitt 2 beschrieben, wurde eine Vielzahl von makrozyklischen Peptiden bereits erfolgreich für die Modulation von PPIs eingesetzt. Dabei wurden unterschiedliche Zyklisierungsgeometrien (Abbildung 4) und zahlreiche chemische Funktionalitäten (Abbildung 7) untersucht. Jede verwendete Methode verfügt über gewisse Vorzüge und Alleinstellungsmerkmale, bringt jedoch auch gewisse Nachteile mit sich. Ein großer Vorteil der bisher erfolgreichsten Methode, die α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung von Peptidseitenketten¹⁶ (Abschnitt 2.2.3), besteht u.a. darin, dass sie mehrere Methoden vereint. Sie verbindet den Einbau α -Helix induzierender α -methylierter Aminosäuren mit dem Einbau einer inerten, hydrophoben und kovalenten Verbrückung von Aminosäureseitenketten und ist zudem mit überschaubarem synthetischen Aufwand verbunden,¹¹⁸ sofern die Bausteine kommerziell verfügbar sind. Wie in Abschnitt 5.1.4 für die Peptide **42** und **53** gezeigt, erhöht der geschlossene Makrozyklus vor allem die proteolytische Stabilität und Zellgängigkeit. Die für die Bindung essentielle Ausbildung der korrekten Konformation kann auch ohne die Knüpfung der kovalenten Verbrückung erreicht werden (Abbildung 27). Darüber hinaus bewirkt der inerte und hydrophobe Charakter der Kohlenwasserstoffverknüpfung eine Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit der entsprechenden Peptide. Die meisten anderen Methoden zur Stabilisation von α -Helices verwenden entweder polare Verbrückungen oder verzichten auf den Einsatz α -methylierter Aminosäuren, um den synthetischen Aufwand zu minimieren.

Auf Grundlage dieser Überlegungen wurde nach neuen chemischen Ansätzen gesucht die α -Methylierung mit einer hydrophoben Seitenkettenverbrückung zu kombinieren. Das ermöglicht einen zusätzlichen chemischen Zugang zu Peptidmakrozyklen sowie die Ausbildung neuer Verbrückungsgeometrien. Die Molybdän-katalysierte Alkin-Ringschlussmetathese (RCAM)⁶⁰, eine analoge Reaktion zur Olefin-vermittelten RCM, wurde als vielversprechendste Methode zur Umsetzung dieser Überlegung ausgewählt. RCAM ist in der organischen Synthese weit verbreitet, findet bisher jedoch kaum Beachtung bei der Synthese von Peptiden. Bisher wurde RCAM lediglich in Lösung für die Makrozyklisierung von Kopf zu Schwanz verknüpften Peptiden eingesetzt.⁶¹⁻⁶³ Da die Zyklisierung von Peptiden an der festen Phase einige synthetische Vorteile mit sich bringt, wurde die RCAM für die Anwendung mit harzgebundenen Peptiden optimiert.³⁰⁹

5.3.1 Synthese α -methylierter Alkin-Bausteine für die Peptidsynthese

Für die Synthese von α -methylierten, seitenkettenverbrückten Peptiden mit Hilfe von RCAM werden α -Methyl- α -alkinyl-bausteine für die SPPS benötigt. Analog zu den alkenylierten Bausteinen in Abschnitt 5.1.2 lassen sie sich mit Hilfe von chiralen Ni(II)-Komplexen darstellen (Abbildung 33). Für die Synthese unterschiedlicher Verbrückungsarchitekturen werden Bausteine in *S*- und *R*-Konfiguration sowie unterschiedlicher Seitenkettenlänge benötigt. *S*-Konfigurierte Bausteine lassen sich durch stereoselektive nukleophile Substitution mit Ni(II)-Ala(*S*)-BPB (**36**) darstellen, *R*-konfigurierte Bausteine mit Ni(II)-Ala(*R*)-BPB (**89**). Der chirale Ni(II)-Komplex **89** wurde ausgehend von D-Prolin analog zu Komplex **36** synthetisiert (Abbildung 23). Nukleophile Substitution mit Iod-alkinen unterschiedlicher Kettenlängen und anschließender Zersetzung des Komplexes lieferte nach Fmoc-Schützung die α -methylierten- α -alkinylierten-Bausteine **90** – **95** in guten Ausbeuten. Die Iod-alkine (**98a-d**) lassen durch Iodierung der Alkinole (**97a-d**) darstellen. Die Alkinole (**97a-d**) sind durch Methylierung der DHP-geschützten Alkinole **96a-b** zugänglich.

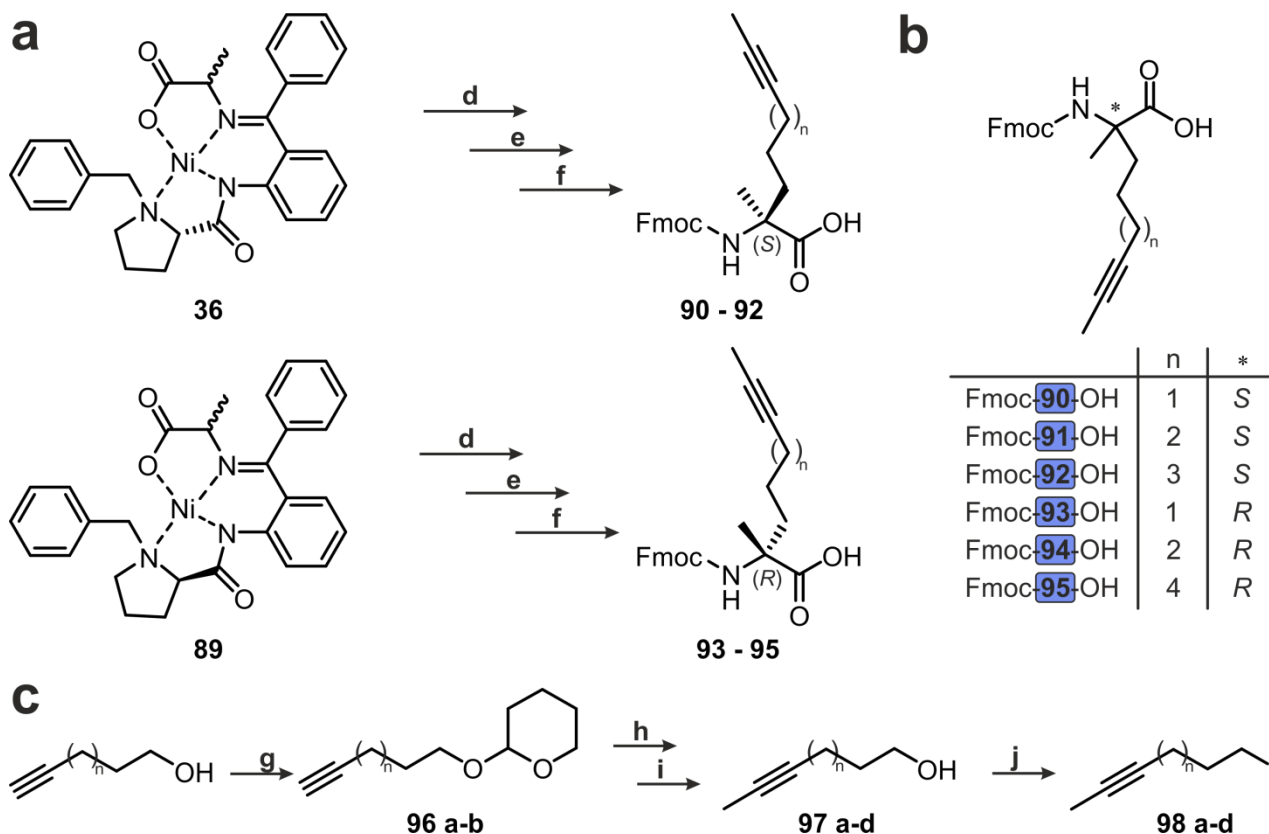


Abbildung 33. Synthese der α -Methyl- α -alkinyl-bausteine **90** – **95**. (a) Schematische Darstellung der *S*- und *R*-konfigurierten α -Methyl- α -alkinyl-bausteine **90** – **95**. **d**) **98a-d**, KOH, DMF 0° C bis Raumtemperatur 2 h; **e**) 1. HCl_{aq.}, MeOH, Reflux, 2 h; **f**) Fmoc-Osu, Na₂CO₃, Dioxan/Wasser, Raumtemperatur, 7d. (b) Konfiguration und Seitenkettenlänge der α -Methyl- α -alkinyl-bausteine **90** – **95**. (c) Synthese der Iodalkine **98a-d** **g**) DHP, PPTS, DCM, 0° C bis Raumtemperatur; 2 h **h**) CH₃I, *n*-BuLi, TMEDA, THF, -78° C bis 0° C; 24 h **i**) PTS-OH, MeOH, Raumtemperatur, 16 h; **j**) I₂, PPh₃, Imidazol, THF, Raumtemperatur, 1 h.

5.3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

(Die Optimierung der Alkin-Ringschlussmetathesereaktion auf fester Phase wurde in Zusammenarbeit mit M.Sc. Sebastian Schaubach durchgeführt.)

Um die RCAM vermittelte Makrozyklisierung von Peptiden auf fester Phase zu untersuchen, wurden die in Abschnitt 5.3.1 synthetisierten Bausteine mittels Fmoc-basierter SPPS in verschiedene Modellpeptidsequenzen eingebaut (Abbildung 34a). Die Architekturen ($i,i+3$, $i,i+4$ und $i,i+7$) sowie der relative Abstand und die Konfiguration der nicht natürlichen Aminosäuren wurden dabei analog zu den bereits etablierten Makrozyklisierungen der α -methylierten, olefinverbrückten Peptiden gewählt (Abschnitt 2.2.3).¹¹⁸ Um das gesamte Potential und die universelle Anwendbarkeit der Alkin-Makrozyklisierung abschätzen zu können, wurden Modellpeptidsequenzen entworfen, die alle Funktionalitäten der 20 proteinogenen Aminosäuren enthalten. Nach erfolgreicher Makrozyklisierung mit Hilfe von RCAM ergeben sich die Peptide **99** – **102**, die ein Alkin in ihrer Kohlenwasserstoffverbrückung tragen (Abbildung 34b). Für die Durchführung der Alkin-Ringschlussmetathese wurde die neueste Generation an Molybdän-Komplexen verwendet (Abbildung 34c).^{310,311} Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden verschiedene Rink-Amid-Harze, unterschiedliche Trocknungsbedingungen und Lösemittel sowie die beiden Molybdän Komplexe **103** und **104** getestet (Tabelle 4). Die komplette Umsetzung des Startmaterials wurde für TentaGel Rink-Amid-Harz in trockenem Toluol mit 1.5 Äquivalenten Komplex **103** nach 3 h bei 40° C erreicht. Für eine einfachere und schnellere Durchführung der Reaktion wurden die Trocknungsbedingungen vereinfacht und eine größere Menge Komplex eingesetzt (siehe 7.4 Festphasenpeptidsynthese). Unter diesen Bedingungen ließ sich der Alkin Makrozyklus in allen drei getesteten Architekturen quantitativ schließen (Anhang, Abbildung 56 – 57). Die besten Ergebnisse wurden dabei für die $i,i+4$ Geometrie und einer Gesamtlänge der Kohlenwasserstoffverbrückung von neun Kohlenstoffatomen (**100**) erzielt. Im Vergleich zu den α -methylierten, olefinverbrückten Peptiden, musste die Länge der Verbrückung um ein Kohlenstoffatom verlängert werden, was vermutlich auf die lineare Geometrie des Alkins und die damit verbundene höhere Ringspannung zurückzuführen ist. Für das Modellpeptid **102** lässt sich der Alkin-Makrozyklus mit einer Verbrückung von acht Kohlenstoffatomen zwar schließen, jedoch mit deutlich geringerer Ausbeute.

Tabelle 4. Optimierung der Metathesereaktion für **100**. Das Harz wurde unter täglicher Erneuerung des Lösemittels für vier Tage über Molsieb (5 Å) in trockenem Toluol getrocknet. Die Reaktion wurde in 0.15 mL trockenem Toluol und Molsieb (5 Å) in einem ausgeheizten Schlenkrohr unter Argon für 3 h bei 40° C durchgeführt. k.U. = kein Umsatz

Rink-Amid-Harz	Mo-Komplex (1.5 eq.)	Umsatz [%]
TentaGel	103	Quant.
MBHA	103	19
ChemMatrix	103	36
TentaGel	104	12
MBHA	104	k.U.
ChemMatrix	104	k.U.

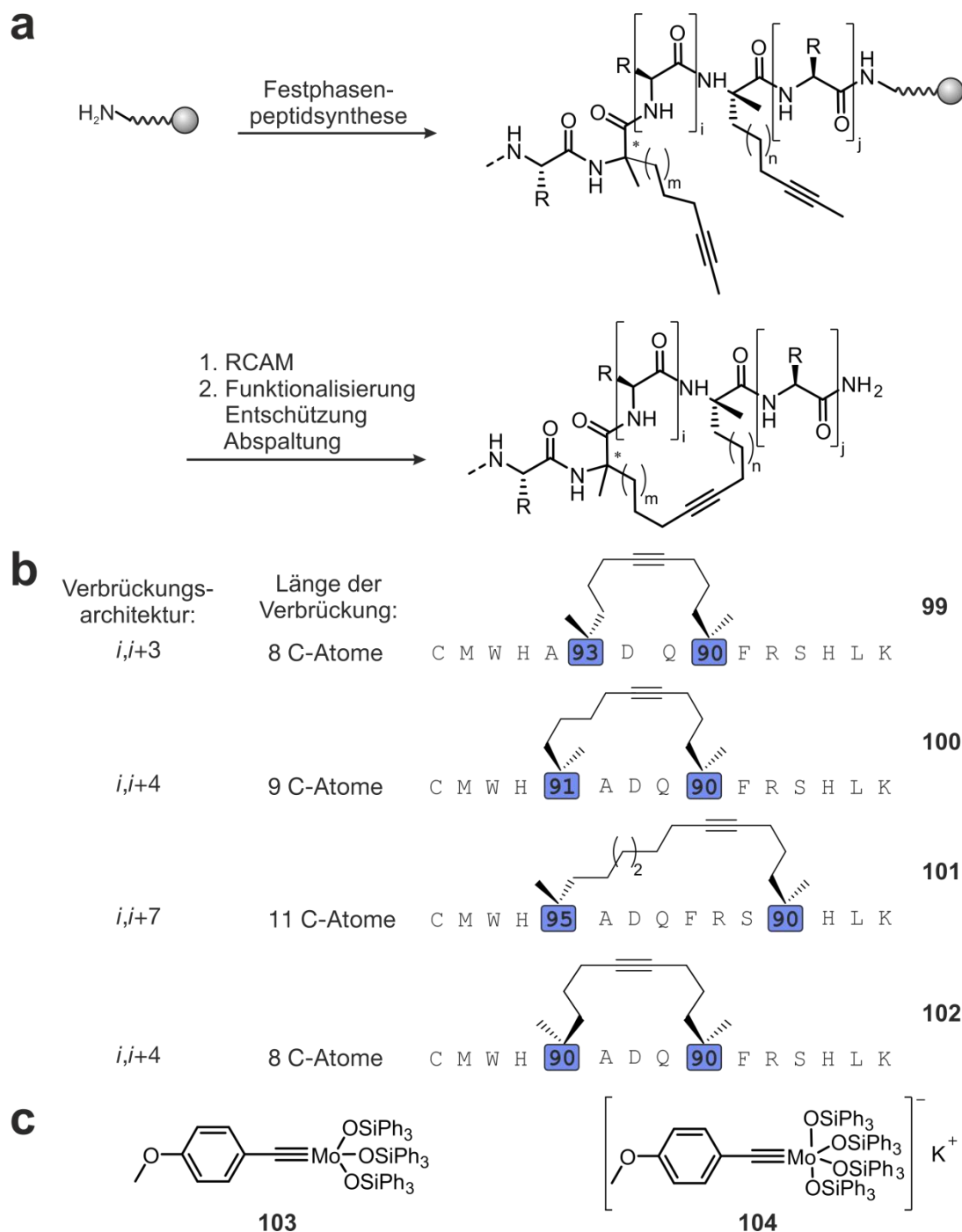


Abbildung 34. Alkin-Makrozyklisierung auf fester Phase. **(a)** Der Aufbau der linearen Peptidsequenz mittels SPPS erfolgt unter Einbau der α -methylierten- α -alkinylierten-Bausteine **90**, **91**, **93** und **95**. Die anschließende RCAM sowie weitere Funktionalisierung, Entschützung und Abspaltung vom Harz liefern das finale, Alkin-makrozyklisierte Produkt. **(b)** Sequenzen der Modellpeptide **99** – **102**. Die α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben. **(c)** Die zur RCAM verwendeten Molybdän-Komplexe **103** und **104**. $i = 2, 3, 6$; $j = 3, 6$; $m = 1, 2, 4$; $n = 1, 2$; R = seitenkettengeschützte proteinogene Aminosäure.

5.3.3 Funktionalisierung des Alkin-Makrozyklus

Eine attraktive Eigenschaft von Alkin-Makrozyklen besteht in einer möglichen Funktionalisierung der linearen Dreifachbindung. Auf diese Weise sind α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide mit einer substituierten Doppelbindung zugänglich. Insbesondere in Fällen, in denen die Kohlenwasserstoffverbrückung aktiv an der Interaktion mit dem Zielprotein beteiligt ist, bietet das Screening von Substituenten einen interessanten Ansatz, um die Affinität und Selektivität des α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptids weiter zu erhöhen.³¹² Über diesen Ansatz wären zweidimensionale Bibliotheken denkbar, bei denen zum einen die Peptidsequenz, zum anderen zusätzlich auch die Substituenten an der Doppelbindung für die Bindung optimiert werden könnten.

Als Funktionalisierungsreaktion wurde die Dibromierung des Alkins untersucht. Mit Hilfe von CuBr_2 in trockenem Acetonitril konnte eine selektive Dibromierung des Alkins innerhalb des geschlossenen Makrozyklus erreicht werden. Auf diese Weise konnte das Modellpeptid **105** schrittweise in das Alkinmakrozyklisierte Peptid **106** und schließlich in das dibromierte, makrozyklisierte Peptid **107** überführt werden (Abbildung 35). Die Reaktion erfolgte an fester Phase und ließ sich sehr bequem in einem Spritzenreaktor mit Peptiden in allen drei Architekturen ($i,i+3$, $i,i+4$ und $i,i+7$; Anhang, Abbildung 60 – 60) durchführen. Quantitativer Umsatz des Startmaterials erfolgte jedoch nur nach mehrmaliger Behandlung mit CuBr_2 und konnte nur für ein vereinfachtes Modellpeptid erzielt werden. Die Dibromierungsreaktion führte in Gegenwart von Cystein-Seitenketten zu einem Verlust des Startmaterials und in Gegenwart von Methionin-Seitenketten zu Nebenreaktionen, bei denen das gewünschte Produkt nur in geringen Mengen und in einer komplexen Mischung in den HPLC-MS Spektren detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde für die Dibromierung das vereinfachte Modellpeptid **105** verwendet, das um die beiden *N*-terminalen Aminosäuren Cystein und Methionin verkürzt wurde. Die übrigen Funktionalitäten der 18 verbliebenen proteinogenen Aminosäuren sind hingegen mit der Dibromierungsreaktion kompatibel und ermöglichen die selektive Synthese von **107**.

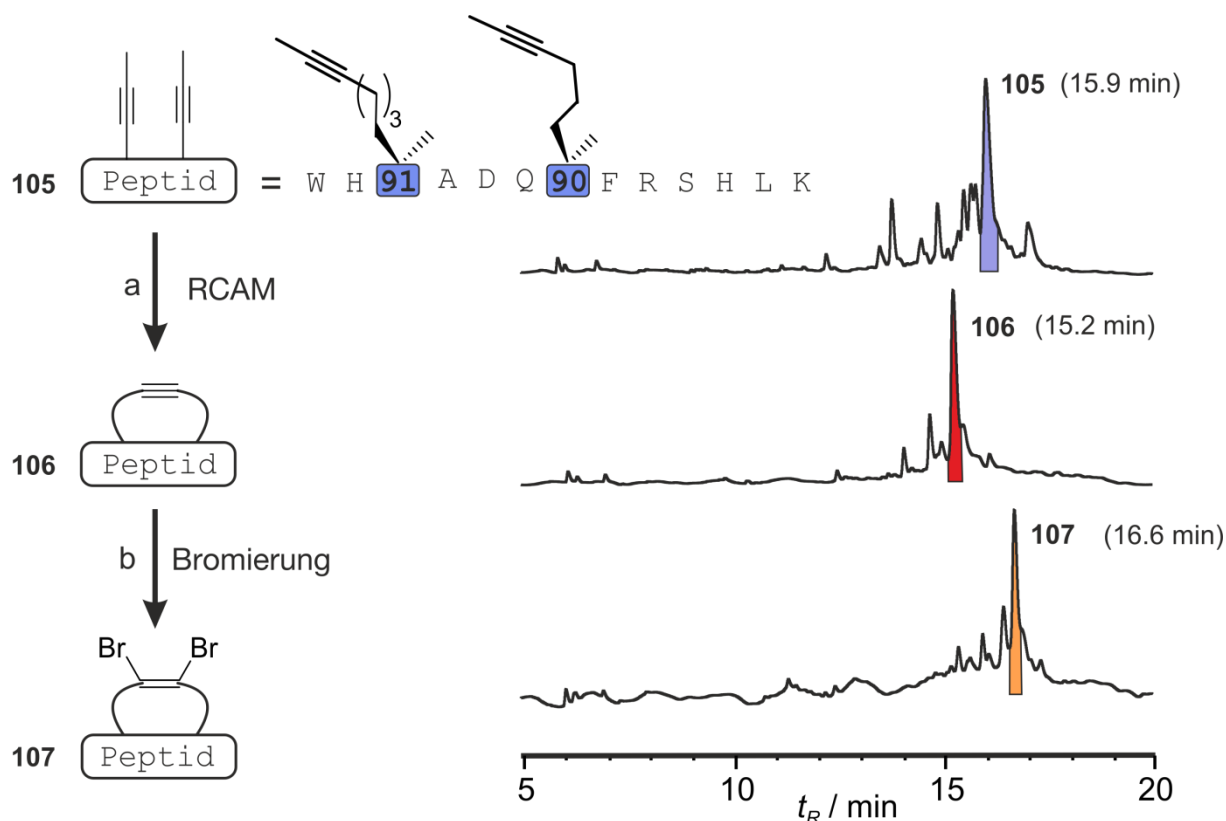


Abbildung 35. Funktionalisierung des Alkin-Makrozyklus.³⁰⁹ Das vereinfachte Modellpeptid **105** kann selektiv in das makrozyklisierte Peptid **106** sowie das dibromierte Peptid **107** überführt werden. Die entsprechenden Chromatogramme der nicht aufgereinigten Reaktionsmischungen vor (**105**, oben) und nach der Ringschlussmetathese (**106**, mitte) sowie nach der Dibromierung (**107**, unten) sind gezeigt. Die entsprechenden Produktpeaks sind farblich hervorgehoben: **105** = blau; **106** = rot; **107** = orange. Die α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich gekennzeichnet. a) Komplex **103**, trockenes Toluol, 40° C, 2 x 1.5 h; b) CuBr₂, MeCN, Zimertemperatur, 3 x 1 h.

Die Dibromierung des Alkin-Makrozyklus eröffnet die Möglichkeit einer weiteren Funktionalisierung des Olefins mit Hilfe von Kreuzkupplungsreaktionen. Kreuzkupplungen decken ein breites Substratspektrum ab und würden ein breites Screening unterschiedlich substituierter Verbrückungen ermöglichen. Zahlreiche Versuche, das dibromierte Olefin in einer *Suzuki*-Kupplung mit unterschiedlichen Boronsäuren zur Reaktion zu bringen, waren jedoch nicht erfolgreich. Auch die Synthese eines stark vereinfachten kurzen Modellpeptids ohne funktionelle Gruppen an den Aminosäureseitenketten konnte keine Abhilfe schaffen. In allen Fällen wurde entweder eine Eliminierung der Bromide unter Zurückgewinnung des nicht modifizierten Alkins oder der Verlust des Startmaterials beobachtet.

5.3.4 Evaluierung der Alkin-Makrozyklen durch den Einbau in etablierte Systeme

Um das gesamte Potential der neu entwickelten Harz-gebundenen Makrozyklisierung mittels RCAM zu evaluieren, wurde der Alkin-Makrozyklus in verschiedene etablierte Systeme eingebaut. Dabei wurden bekannte makrozyklische Binder mittels RCAM stabilisiert und auf Affinität gegenüber ihren Zielproteinen getestet. Da sich die Alkin-Makrozyklisierung als sehr robuste Methode darstellt, die alle gängigen Aminosäurefunktionalitäten toleriert, lässt sich die Methode prinzipiell auf jedes bekannte System anwenden. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Rab8/R6IP Interaktion gelegt. Zusätzlich wurde die 14-3-3/ExoS Wechselwirkung untersucht.

5.3.4.1 Rab8/R6IP1

Peptid **42** wurde als erster makrozyklische Binder einer aktivierten Rab-GTPase identifiziert (Abschnitt 5.1).²⁷⁸ Die α -helikale Struktur von Peptid **42** wird dabei durch eine α -methylierte Olefinverbrückung stabilisiert. Um das Potential der Alkin-Makrozyklisierung von Peptidsequenzen auf fester Phase zu evaluieren, wurde die Olefin-Verbrückung von **42** durch einen Alkin-Makrozyklus ersetzt. Dabei ergeben sich drei unterschiedliche Verbrückungsgeometrien (**108** – **110**, Tabelle 5). Die Kohlenwasserstoffverbrückung des Alkin-Makrozyklus kann entweder mit einer Länge von neun oder zehn Kohlenstoffatomen geschlossen werden. Aufgrund der hohen Ringspannung war die Synthese einer Verbrückung mit acht Kohlenstoffatomen nicht erfolgreich. Eine Verbrückung von zehn Kohlenstoffatomen lieferte **108** und bedingte den zweimaligen Einbau von Baustein **91**. Für die Synthese eines Linkers mit neun Kohlenstoffatomen wurden die beiden Bausteine **90** und **91** benötigt, die in unterschiedlicher Reihenfolge in die Peptidsequenz eingebracht wurden und die Peptide **109** und **110** bildeten. Wie in Abschnitt 5.3.3 beschrieben lässt sich der Alkin-Makrozyklus mit Hilfe von CuBr_2 in das dibromierte Olefin überführen. Um den Einfluss der Dibromierung auf das Bindungsverhalten von makrozyklischen Peptiden zu analysieren, wurden die drei Alkin-zyklisierten Peptide **108** – **110** mit CuBr_2 behandelt und in ihre dibromierten Analoga **111** – **112** überführt (Tabelle 5). Alle Peptide wurden an fester Phase synthetisiert und mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert. Anschließend wurde ihre Affinität gegenüber Rab8(GppNHp) in einem FP-Experiment bestimmt. Für eine initiale Abschätzung der Dissoziationskonstanten wurden relative K_D -Werte ermittelt und die besten Binder in einem zusätzlichen FP-Experiment verifiziert. Die Alkin-Verbrückten Peptide **108** – **110** binden mit nahezu identischer Affinität an Rab8a(GppNHp) wie das α -methylierte, olefinverbrückte Ausgangspeptid **42** (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu zeigen die dibromierten Olefine **111** – **113** eine verbesserte Affinität im Vergleich zu **42**. Der beste dibromierte Binder **111** besitzt eine Verbrückung mit zehn Kohlenstoffatomen und bindet Rab8a(GppNHp) mit einer Affinität von $10.7 \mu\text{M}$. Damit hat **111** eine ca. 2-fach höhere Affinität zu Rab8a(GppNHp) als das olefin-verbrückte Peptid **42** und eine mehr als 10-fach höhere Affinität als das nicht-modifizierte Ursprungspeptid **25**.

Tabelle 5. Sequenzen und Bindungsdaten der monozyklischen Alkin-zyklisierten Rab-Binder. Ursprungssequenz von R6IP und eine Tabelle der monozyklischen Rab-Binder. Die Peptide wurden mittels SPPS synthetisiert, zyklisiert und mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert. In einem FP-Experiment wurden die Affinitäten gegenüber Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp) ermittelt. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben. rel. $K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [42]; rel. K_D -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; Angegebene K_D -Werte stammen aus Dreifachmessungen. (Fehler entspricht 1σ).[a] K_D [42] = 29.5 μ M; [b] Dibromiertes Olefin; n.b. = nicht bestimmt. Eine Auflistung der absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 21).

⁹⁰⁰ D D E K E ⁹⁰⁵ Q F L Y H ⁹¹⁰ L L S F N ⁹¹⁵ A V **R6IP**

Eintrag	Peptid	AS 903	AS 907	AS 911	AS 915	rel. K_D [a]	K_D [μ M]
1	25	K	L	L	A	n.d.	>100
2	42	S₅	S₅	L	A	1.00	20.7 \pm 0.7
3	108	91	91	L	A	0.92	n.b.
4	109	90	91	L	A	0.99	n.b.
5	110	91	90	L	A	0.89	n.b.
6	111 [b]	91	91	L	A	0.40	10.7 \pm 0.5
7	112 [b]	90	91	L	A	0.46	n.b.
8	113 [b]	91	90	L	A	0.52	n.b.

Wie die Bindungsstudien mit Rab8a(GppNHp) zeigen führt die Alkin-Makrozyklisierung im Vergleich zur Olefin-Verbrückung zu einem Erhalt der Affinität und vermutlich auch der Konformation. Der Einbau einer im Vergleich zum Olefin rigideren, linearen Struktur wie dem Alkin hat somit keinen negativen Einfluss auf die stabilisierte Sekundärstruktur. Der durch Dibromierung des Alkins erzielte Affinitätsgewinn zeigt welches Potential mit einer Funktionalisierung der Verbrückung verbunden ist. Die Darstellung von disubstituierten Olefinen bietet daher neue Möglichkeiten die biologischen Eigenschaften von α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptiden weiter zu verbessern.

5.3.4.2 14-3-3/ExoS

(Die Kristallisation mit 14-3-3 und Lösung der Kristallstruktur wurde von M.Sc. Kerstin Wallraven und M.Sc. David Bier durchgeführt.)

Die humanen 14-3-3 Proteine bilden eine Familie von regulatorischen Proteinen, die durch die Wechselwirkungen mit zahlreichen strukturell und funktionell unterschiedlichen Proteinen in eine Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse involviert sind.³¹³ 14-3-3 Proteine sind u.a. an der Regulation von Raf-Kinasen, direkten Effektoren von Ras-GTPasen, beteiligt.³¹⁴ Darüber hinaus dienen sie als Kofaktoren des Zytotoxins *Exoenzym S* (ExoS), das von *pseudomonas aeruginosa* freigesetzt wird. Die Aktivierung von ExoS durch Interaktion mit 14-3-3 führt zur ADP-Ribosylierung zahlreicher kleiner GTPasen und verursacht massiven zellulären Schaden.^{315,316} Die Inhibition der 14-3-3/ExoS Wechselwirkung reduziert die Virulenz und eine Analyse der Kristallstruktur von 14-3-3 mit ExoS identifizierte eine elf Aminosäuren große

Peptidsequenz (**114**, Abbildung 36a) als essentielles Fragment der PPI.³¹⁷ Ausgehend von dieser Peptidsequenz wurden die kohlenwasserstoffverbrückten Peptide **115** und **116** entwickelt, die eine irreguläre Peptidstruktur stabilisieren und 14-3-3 mit submikromolarer Affinität binden ($K_D[\mathbf{115}] = 0.41 \mu\text{M}$; $K_D[\mathbf{116}] = 0.10 \mu\text{M}$, Abbildung 36a, b).⁷⁴ Die Peptide **115** und **116** besitzen eine *i,i+3* Verbrückungsarchitektur und eine acht (**115**) bzw. zwölf Kohlenstoffatom (**116**) lange, komplett gesättigte Alkan-Verbrückung. Die Bindung von **115** und **116** an 14-3-3 erfolgt zu großen Teilen über den hydrophoben Linker, der das Peptidrückgrat verformt und die irreguläre Sekundärstruktur des Peptids in Lösung vororganisiert.⁷⁴ Peptid **116** kann dabei als Weiterentwicklung von **115** betrachtet werden. Da durch die komplette Sättigung der hydrophoben Verbrückung die Flexibilität des Linkers stark erhöht ist, sollten durch den Einbau eines Alkin-Makrozyklus die Freiheitsgrade der Verbrückung eingeschränkt werden. Auf Grundlage der zuvor optimierten Peptide **115** und **116**, die die unnatürlichen Bausteine an den Positionen 422 und 425 trugen, wurden acht Alkin-makrozyklisierte Peptide (**117** – **124**) mit unterschiedlichen Linkerlängen und Verbrückungsgeometrien synthetisiert.

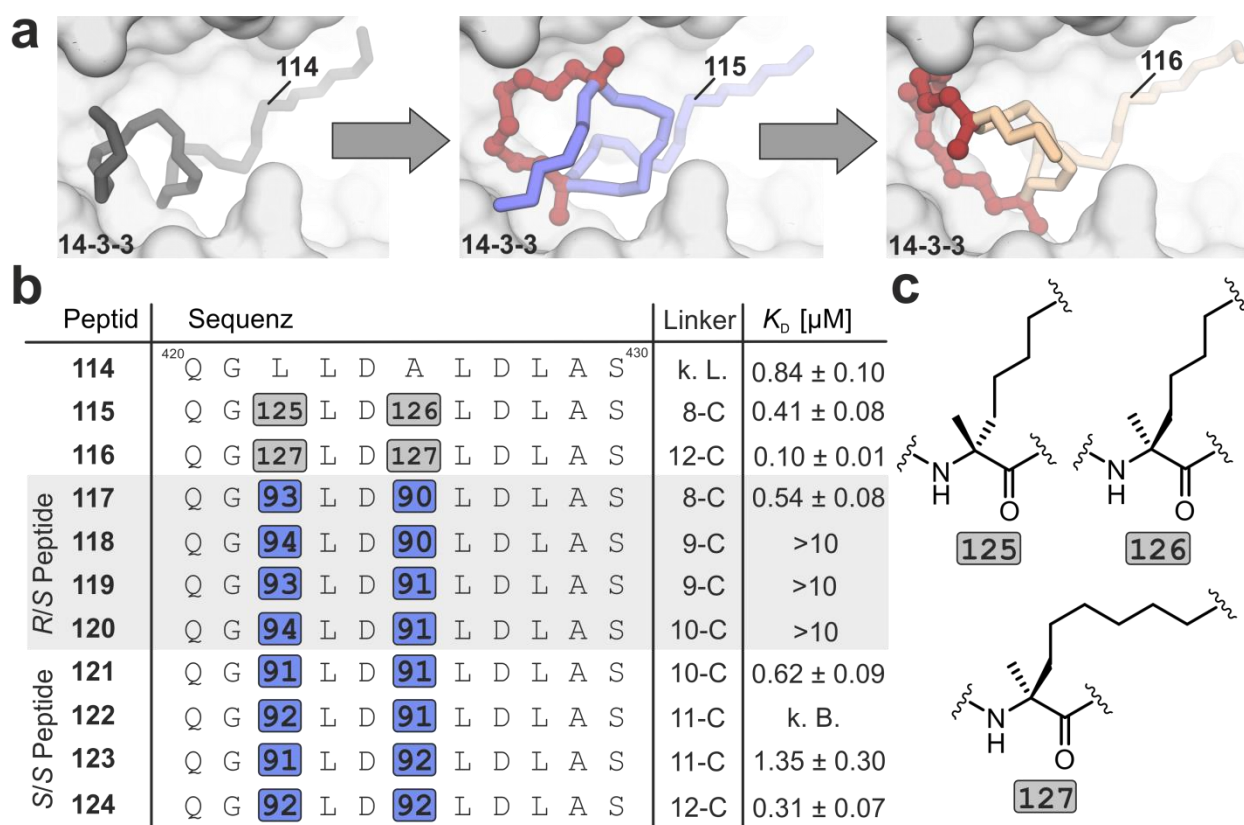


Abbildung 36. 14-3-3/ExoS Wechselwirkung und Bindungsdaten. **(a)** Schrittweise Optimierung der Bindung an 14-3-3. Ausgehend vom nicht modifizierten Peptid **114** (grau) wurden durch Kohlenwasserstoffverbrückung die affineren Peptide **115** (blau) und **116** (gelb) entwickelt. Die Kohlenwasserstoffverbrückung (rot) hat großen Anteil an der Bindung und orientiert das Peptidrückgrat. PDB: 4N7G, 4N7Y, 4N84. **(b)** Sequenzen und Bindungsdaten aller makrozyklischen Peptide für die Bindung an 14-3-3. Angegebene K_D -Werte stammen aus Dreifachmessungen. (Fehler entspricht 1σ). Die α -methylierten Bausteine (grau) und α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben. k.B. = keine Bindung **(c)** Unnatürliche Bausteine zur Synthese von **115** und **116**.

Die synthetisierten Peptide **117** – **124** variieren in der Länge ihrer Kohlenwasserstoffverbrückung zwischen acht und zwölf Kohlenstoffatomen. Die Peptide mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Verbrückung wurden als einzelne Regioisomere synthetisiert (**117**, **120**, **121** und **124**) und tragen die Dreifachbindung in der Mitte des Linkers. Für Peptide mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Verbrückung (**118**, **119**, **122** und **123**) wurden jeweils beide Regioisomere mit der längeren Kohlenstoffkette am *N*- bzw. am *C*-Terminus hergestellt. Prinzipiell lassen sich die Peptide in zwei Klassen einteilen: Zum einen Peptide die einen *R*- und einen *S*-konfigurierten Baustein tragen (**117** – **120**), zum anderen Peptide mit zwei *S*-konfigurierten Bausteinen (**121** – **124**). Alle Peptide wurden mittels SPPS synthetisiert, für FP-Experimente mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert und ihre Affinität zu 14-3-3 ζ bestimmt. Von den Peptiden der *R/S*-konfigurierten Familie zeigte nur Peptid **117** eine Bindung zu 14-3-3. Für Alle anderen Peptide dieser Klasse wurden stark reduzierte Affinitäten ($> 10 \mu\text{M}$) beobachtet. Die Dissoziationskonstante von **117** liegt mit $K_D = 0.54 \mu\text{M}$ um das 1.6-fache unter der des nicht-modifizierten Peptids **114**. Peptid **117** trägt den *R*-konfigurierten Baustein **93** an Position 422 und den *S*-konfigurierten Baustein **90** an Position 425. Insgesamt ergibt sich somit eine Verbrückungslänge von acht Kohlenstoffatomen, wobei sich die Dreifachbindung zwischen C4 und C5 befindet. Die Peptide **121** – **124** mit zwei *S*-konfigurierten Bausteinen zeigten eine generell höhere Affinität als ihre *R/S*-konfigurierten Analoga. Für die beiden Peptide **121** und **124** wurden submikromolare Affinitäten bestimmt. Das Regioisomer **123** zeigte gegenüber 14-3-3 ζ eine niedrig mikromolare Affinität $K_D[\mathbf{123}] = 1.35 \mu\text{M}$, während für das andere Regioisomer **122** keinerlei Bindung beobachtet wurde. Peptid **124** ist mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 0.31 \mu\text{M}$ der beste Alkin-makrozyklisierte Binder von 14-3-3 ζ . Peptid **124** bindet zwar im Vergleich mit seinem komplett reduzierten Analogon **116** (12-C) etwas schlechter an 14-3-3 ζ , zeigt jedoch eine 2.7-fach größere Affinität als das nicht-modifizierte Peptid **114**. Außerdem hat **124** eine höhere Affinität als das komplett reduzierte Peptid **115** (8-C) aus der ersten Generation der hydrophob-verbrückten 14-3-3 Binder. Peptid **124** besitzt eine Verbrückung aus zwölf Kohlenstoffatomen die durch zwei *S*-konfigurierte Bausteine **93** an den Positionen 422 und 425 gebildet wird (Abbildung 37a). Die Dreifachbindung befindet sich zwischen C6 und C7. Die beobachteten Trends der Bindungsaffinitäten entsprechen dem Bindungsverhalten der komplett gesättigten Analoga.⁷⁴

Die gute Bindungsaffinität von **124** konnte in einem orthogonalen Bindungsexperiment mit Hilfe von *microscale thermophoresis* Messungen (MST) bestätigt werden. In zwei Durchgängen konnte eine Affinität von $K_D = 0.44 \mu\text{M}$ bestimmt werden (Anhang, Abbildung 63, 64), die in guter Näherung zu den erhaltenen FP-Bindungswerten liegt. Darüber hinaus konnten die im FP bestimmten Bindungstrends in einem Verdrängungsexperiment verifiziert werden. Ein Komplex aus Fluorescein-markiertem **114** und 14-3-3 ζ ließ sich durch die Zugabe von acetyliertem Peptid **124** mit einem $\text{IC}_{50} = 1.19 \mu\text{M}$ auflösen (Abbildung 37b). Die Zugabe von acetyliertem Peptid des schlechteren Binders **114** lieferte hingegen einen IC_{50} von $4.65 \mu\text{M}$. Das bestätigte die reversible und kompetitive Bindung der beiden Peptide an 14-3-3 ζ .

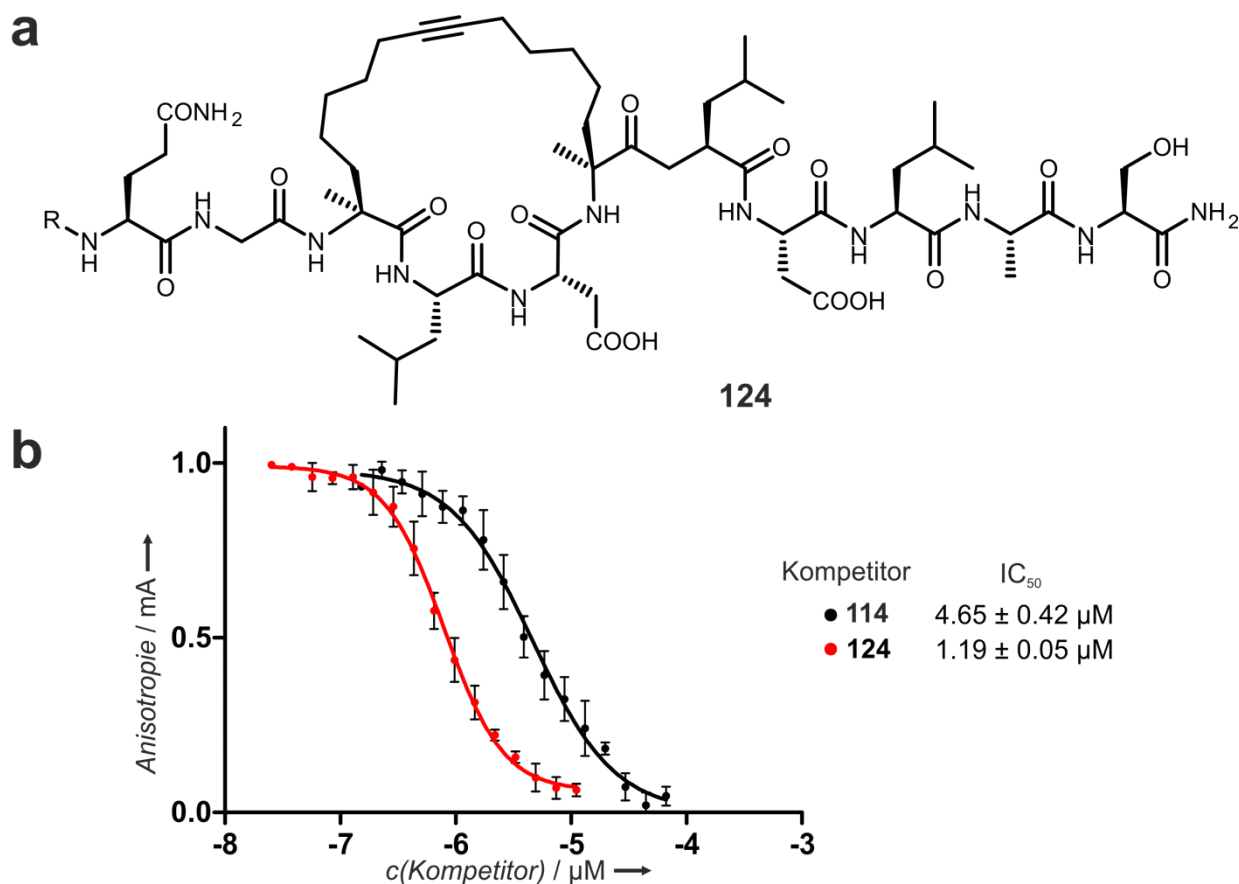


Abbildung 37. Sequenz und FP-Verdrängungsexperimente. **(a)** Sequenz des besten Alkin-makrozyklisierten 14-3-3 Binders **124**. Der Makrozyklus wird durch die Verknüpfung von zwei *S*-konfigurierten Bausteinen **93** aufgebaut. R = Fluorescein-PEG, Acetyl. **(b)** Verdrängung von 14-3-3ζ (2 μM) gebundenem, Fluorescein-markiertem Peptid **114** (10 nM) mit steigenden Konzentrationen von acetyliertem Peptid **124** und **114**. Dreifachmessungen, Fehler entsprechen 1 σ.

Die Ergebnisse des FP-Verdrängungsexperiments (Abbildung 37b) legen nahe, dass das Alkin verbrückte Peptid **124** an dieselbe Stelle auf 14-3-3 bindet, wie das nicht-modifizierte Ausgangspeptid **114**. Diese Vermutung wird durch die Co-Kristallisation von **124** (türkis) mit 14-3-3 bestätigt (Abbildung 38). Die Kristalle erlaubten eine Bestimmung der Struktur von **124** im Komplex mit 14-3-3ζΔC (Aminosäuren 1-230) bei 2.4 Å (Anhang, Tabelle 23). Die dabei erhaltene Elektronendichte ermöglichte die Identifikation des Alkin-Makrozyklus, sowie der gesamten Peptidsequenz von **124** bis auf das *N*-terminale Gln420. Die *C*-terminalen Aminosäuren 426 – 430 von **124** (türkis) überlagern dabei nahezu komplett mit denen des nicht modifizierten Ausgangspeptids **114** (dunkelgrau, Abbildung 38a). Dadurch werden die essentiellen hydrophoben Kontakte von Leu426 und Leu428 sowie die elektrostatische Anziehung von D427 aufrechterhalten. Insgesamt beruht die Wechselwirkung von **124** und 14-3-3 vor allem auf den hydrophoben Kontakten des Alkin-Makrozyklus und den Seitenketten von Leu423, Leu426 und Leu428 mit der hydrophoben Furche von 14-3-3. Der Austausch der Aminosäuren Leu422 und Ala425 des nicht modifizierten Ausgangspeptids **114** durch den zwölf Kohlenstoffatom langen Alkin-Makrozyklus von **124** vergrößert die hydrophobe Kontaktfläche des Peptids mit 14-3-3 und ermöglicht die Ausbildung einer irregulären Sekundärstruktur (Abbildung 38b). In dieser vororganisierten Konformation ist die Bindung an

14-3-3 ζ im Vergleich zum nicht-modifizierten Peptid **114** begünstigt. Aus der Kristallstruktur wird ersichtlich, dass die Alkin-Verbrückung eine Verschiebung des Peptidrückgrats der Aminosäuren 421 – 425 bewirkt, wodurch sich die geringe Abweichung des *N*-Terminus ergibt. Eine Überlagerung von **124** (türkis) mit dem Alkan-makrozyklisierten Peptid **116** (orange) im Komplex mit 14-3-3 zeigt eine exzellente Überlagerung des Peptidrückgrats und der Seitenketten sowohl des *N*- wie auch des *C*-Terminus (Abbildung 38c, d). Aufgrund der größeren Flexibilität des Alkan-Makrozyklus im Vergleich zum rigideren Alkin-Makrozyklus, ergeben sich minimale Abweichungen in der Konformation der Kohlenwasserstoffverbrückung für die Peptide **116** (orange) und **124** (türkis), die Ursache der leicht unterschiedlichen Affinitäten sein könnte. Insgesamt konserviert **124** die essentielle Orientierung der *C*-terminalen Seitenketten des nicht-modifizierten Ausgangspeptids **114** und vergrößert zudem die *N*-terminale Interaktionsfläche mit 14-3-3 durch zusätzliche hydrophobe Kontakte des Alkin-Makrozyklus. Dabei liegt die Vermutung nahe, dass die Alkin-Verbrückung von Peptid **124** die Bindung an 14-3-3 durch die Stabilisation einer irregulären Peptidstruktur unterstützt, wie es bereits für Peptid **116** gezeigt werden konnte.⁷⁴

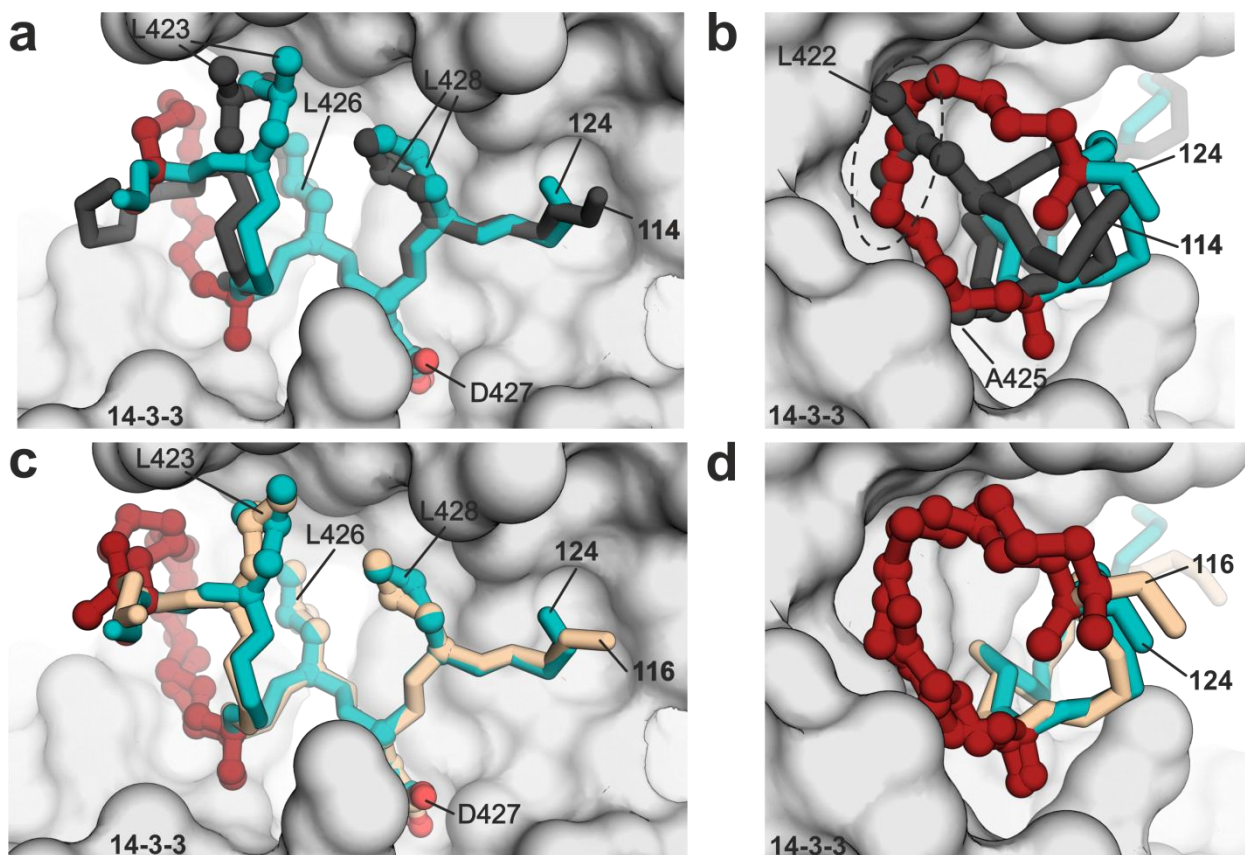


Abbildung 38. Kristallstruktur von **124** im Komplex mit 14-3-3 bei 2.4 Å. (a) Seitenansicht von **124** im Komplex mit 14-3-3. Die Struktur von **124** (türkis) ist mit der des nicht-modifizierten Binders **114** (dunkelgrau) überlagert. Die für die Bindung an 14-3-3 wichtigen Aminosäuren L423, L426, D427 und L428 sowie die Alkin-Verbrückung (rot) sind explizit dargestellt. (b) Frontalansicht des Alkin-makrozyklisierten Peptids **124** im Komplex mit 14-3-3, überlagert mit **114**. Die Dreifachbindung innerhalb des geschlossenen Makrozyklus ist hervorgehoben, ebenso die Aminosäuren L422 und A425 von Peptid **114**. (c) Seitenansicht von **124** im Komplex mit 14-3-3. Die Struktur von **124** (türkis) ist mit der des Alkan-verbrückten Binders **116** (orange) überlagert. Die für die Bindung an 14-3-3 wichtigen Aminosäuren L423, L426, D427 und L428 sowie die Verbrückungen (rot) sind explizit dargestellt. (d) Frontalansicht des Alkin-makrozyklisierten Peptids **124** im Komplex mit 14-3-3, überlagert mit **116**. PDB: 5J31, 4N7G, 4N84.

Durch den Einbau eines Alkin-Makrozyklus in die Peptidsequenz von ExoS ließ sich im Vergleich zum nicht-modifizierten Ausgangspeptid **114** ein verbesserter Binder (**124**) entwickeln, der 14-3-3 an der gleichen Stelle und in identischer Orientierung bindet. Wie schon für die Alkan-makrozyklisierten Peptide **115** und **116** beobachtet, scheint eine Kohlenwasserstoffverbrückung mit einer Länge von zwölf Kohlenstoffatomen am besten für die Bindung an 14-3-3 geeignet zu sein. Dabei bindet das Peptid unter Ausbildung einer irregulären Sekundärstruktur. Es zeigt sich, dass der Einsatz eines Alkin-Makrozyklus nicht nur für die Stabilisierung einer α -Helix (Abschnitt 5.3.4.1) geeignet ist, sondern auch weitere Konformationen stabilisieren kann.

5.4 Bizyklische Peptide mittels orthogonaler Olefin- & Alkin-Ringschlussmetathese

Neben monozyklischen Peptiden repräsentieren polyzyklische Peptide eine äußerst interessante Substanzklasse für die Inhibition von PPIs (Abschnitt 2.2.1). Die Synthesestrategien für bi- und polyzyklische Peptide beruhen hauptsächlich auf zwei Ansätzen, dem Einbau eines biologisch aktiven Epitops in eine disulfidreiche Gerüststruktur^{70,71} oder der Zyklisierung mit TBMB in Phage-Display Studien.^{64,72} Anhand der in Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Strategien zur Synthese stabilisierter α -Helices sind zwar andere Ansätze zur Synthese polyzyklischer Peptide denkbar, diese wurden bisher allerdings nicht intensiv verfolgt. Zudem würde eine Kombination der unterschiedlichen Strategien jeweils Verbrückungen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften innerhalb eines Peptids hervorbringen. Für die Synthese von polyzyklischen Peptiden mit ausschließlich hydrophoben Kohlenwasserstoffverbrückungen ist der Einbau mehrerer Olefine notwendig, was zu Problemen während der Zyklisierung führen kann.^{305,318} Unerwünschte Nebenreaktionen können dabei durch die Wahl geeigneter Ring-Größen und Architekturen minimiert werden.¹²⁰ Zudem kann durch die Transformation funktioneller Gruppen oder durch aufwendige Feinabstimmung der Olefin-Reaktivitäten Einfluss auf die Selektivität genommen werden.³¹⁹ Daraus ergibt sich ein Bedarf für Strategien, die es erlauben zwei konsekutive, orthogonale Metathesereaktionen chemo- und regioselektiv ablaufen zu lassen um somit den Aufbau bizyklischer Peptide zu ermöglichen.

Die bereits in Abschnitt 5.3 für die feste Phase etablierte Molybdän-katalysierte Alkin-Ringschlussmetathese ist eine orthogonale Reaktion zur Ruthenium vermittelten Olefin-Ringschlussmetathese. Sie könnte daher die Synthese bizyklischer Peptide ermöglichen. Bisherige Versuche bizyklische Peptide mittels orthogonaler Olefin- und Alkin-Ringschlussmetathese in Lösung zu synthetisieren schlugen fehl.⁶³ Lediglich einzelne Bausteine konnten in Lösung in Anwesenheit orthogonaler funktioneller Gruppen verknüpft werden.³²⁰ Im Folgenden sollte die Synthese bizyklischer Peptide mit Hilfe orthogonaler RCM/RCAM Ringschlussreaktionen untersucht werden.

5.4.1 Synthese orthogonal zyklisierter Peptide

Um zu untersuchen, ob sich RCM und RCAM orthogonal innerhalb eines Peptids anwenden lassen, wurde das Modellpeptid **128** synthetisiert (Abbildung 39). Peptid **128** enthält zwei Alkin-funktionalisierte Bausteine (**90** und **91**) im Abstand $i,i+4$ und zwei Olefin-Bausteine (S_5) ebenfalls im Abstand $i,i+4$. Der C-terminale Alkin-Makrozyklus und der N-terminale Olefin-Makrozyklus sind ebenfalls im Abstand $i,i+4$ eingebaut. Auf diese Weise kann ein Olefin-Makrozyklus unmittelbar neben einem Alkin-Makrozyklus geschlossen werden.

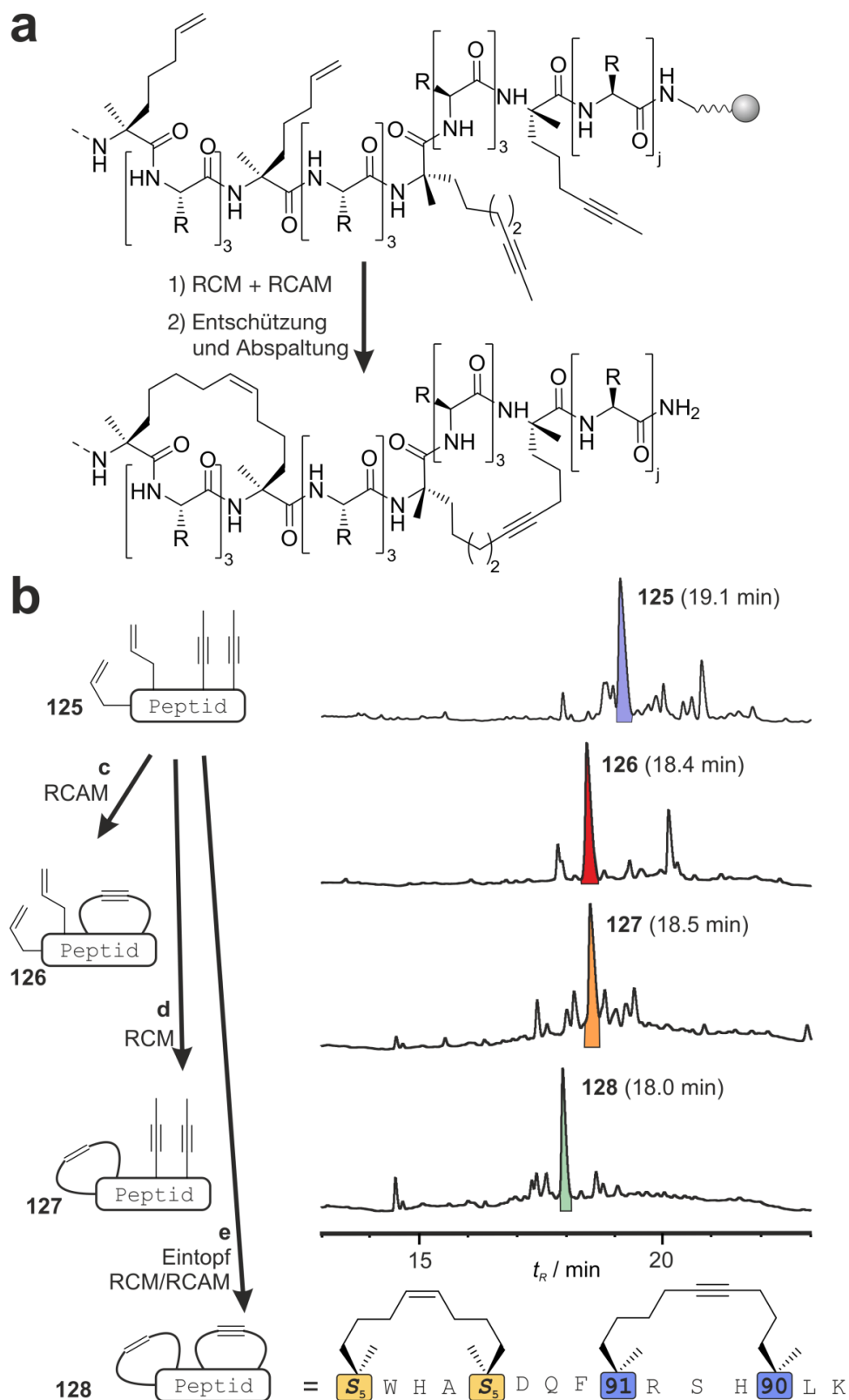


Abbildung 39. Synthese bicyklischer Peptide mittels RCM/RCAM in Anlehnung an Cromm *et al.*³⁰⁹ (a) Schematische Darstellung der Synthese von bicyklischen Peptiden ausgehend von linearen Vorläuferpeptiden mit Hilfe von RCM und RCAM. ($j = 2$; R = Seitenkette proteinogener Aminosäuren außer Cys und Met). (b) Sequenz des bicyklischen Peptids **128**. Chromatogramme der nicht aufgereinigten Peptide, vor der Zyklisierung (**125**, blau), nach RCAM (**126**, rot), nach RCM (**127**, orange) und nach simultaner Eintopfreaktion (RCM und RCAM; **128**, grün). Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben. c) Komplex **103**, trockenes Toluol, 40° C, 2 x 1.5 h; d) Grubbs-I-Katalysator, DCE, Raumtemperatur, 3 x 2 h; e) Komplex **103**, Grubbs-I-Katalysator, trockenes Toluol, 40° C, 2 x 1.5 h.

Die Behandlung des offenen Vorläufer-Peptids **125** (blauer Peak) entweder mit Komplex **103** oder mit Grubbs-I-Katalysator führte zur selektiven Schließung des Alkin- (**126**, roter Peak) bzw. Olefin-Makrozyklus (**127**, oranger Peak) (Abbildung 39). HPLC-MS Analyse der monozyklisierten Intermediate **126** und **127** bestätigte die selektive Ringschlussreaktion der gewünschten Alkin- bzw. Olefin-Makrozyklen, ohne Formation des alternativen Zyklisierungsprodukts (Abbildung 40b, c). Beide monozyklischen Intermediate **126** und **127** lassen sich problemlos in das bizyklische Produkt **128** durch Anwendung der entsprechenden komplementären Metathesereaktion überführen (Abbildung 40d, e). Darüber hinaus ist es möglich, beide Makrozyklen simultan in einer Eintopfreaktion zu schließen (Abbildung 39, Abbildung 40f). Die Behandlung des offenkettigen Vorläufer-Peptids **125** mit einer Mischung aus Komplex **103** und Grubbs-I-Katalysator lieferte selektiv das bizyklische Produkt **128** (grüner Peak).

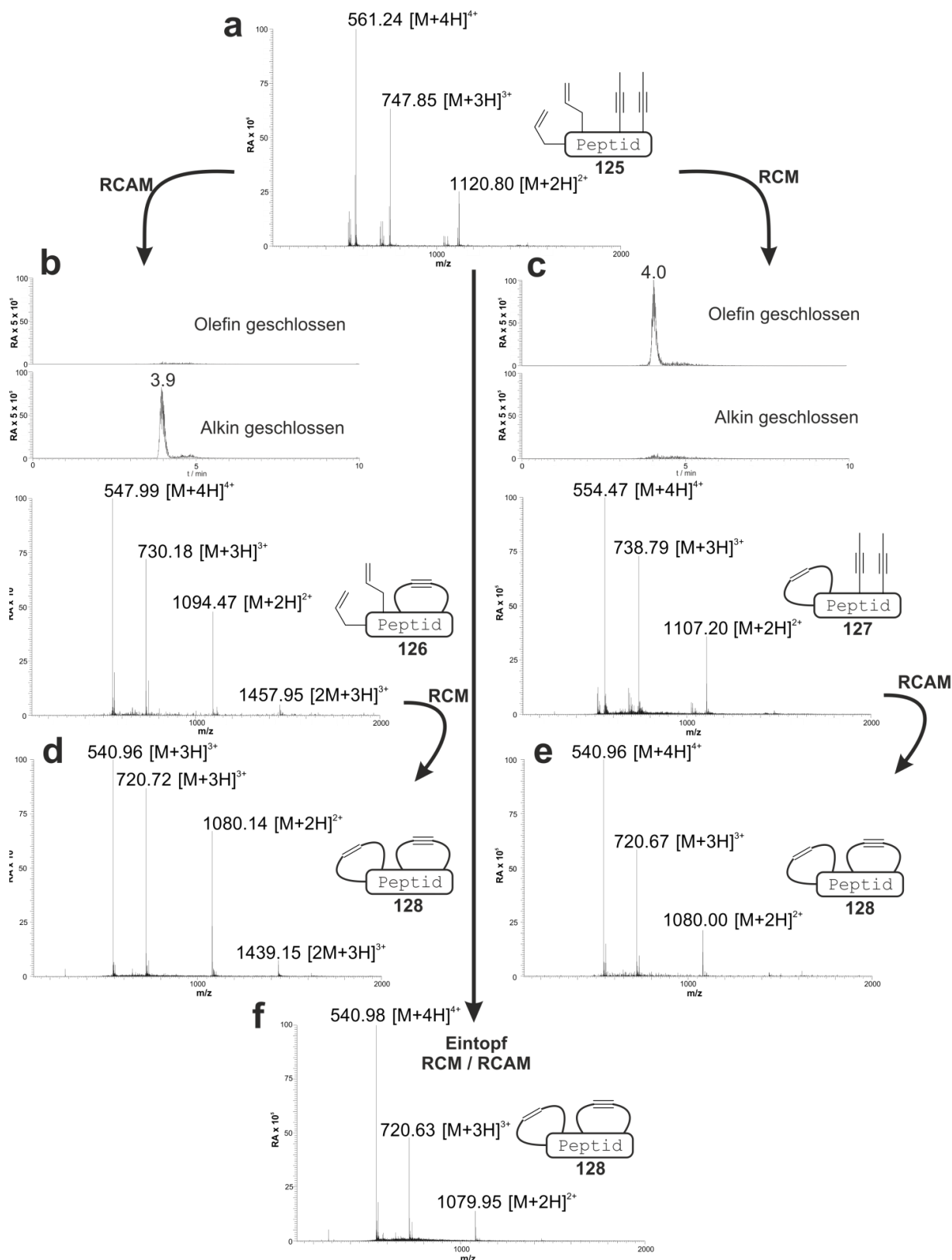


Abbildung 40. Massenspektren des bicyclischen Peptids **128**. (a) Massenverteilung des linearen Vorläuferpeptids **125**. (b) HPLC-MS Analyse des Alkin-makrozyklisierten Intermediats **126** (oben). Lediglich das Alkin-zyklisierte Produkt und kein Olefin-zyklisiertes Produkt ist zu erkennen. Massenverteilung des Alkin-zyklisierten Intermediats **126** (unten). (c) HPLC-MS Analyse des Olefin-makrozyklisierten Intermediats **127** (oben). Lediglich das Olefin-zyklisierte Produkt und kein Alkin-zyklisiertes Produkt ist zu erkennen. Massenverteilung des Olefin-zyklisierten Intermediats **127** (unten). (d) Massenverteilung des bicyclischen Alkin/Olefin Produkts **128**. (e) Massenverteilung des bicyclischen n Olefin/Alkin Produkts **128**. (f) Massenverteilung des bicyclischen Eintopf Produkts **128**.

Während bei Peptid **128** die beiden Makrozyklen wie Perlen an einer Kette aneinandergereiht sind, wurde zusätzlich das sterisch anspruchsvollere Peptid **129** synthetisiert (Abbildung 41). In Peptid **129** greifen beide Makrozyklen ineinander und ergeben eine rigidere, verschränkte Gerüststruktur. Wie schon für Peptid **128** gezeigt, lassen sich die monozyklischen Intermediate **131** und **132**, sowie das bizyklische Produkt **129** selektiv mittels sequenzieller- oder Eintopf-Synthese darstellen (Abbildung 41b, Abbildung 42). So ist auch die Synthese komplexer bizyklischer Peptide mittels orthogonaler Alkin- und Olefin-Ringschlussmetathese in ausgezeichneten Selektivitäten, mit quantitativen Umsätzen und als Eintopfreaktion möglich.

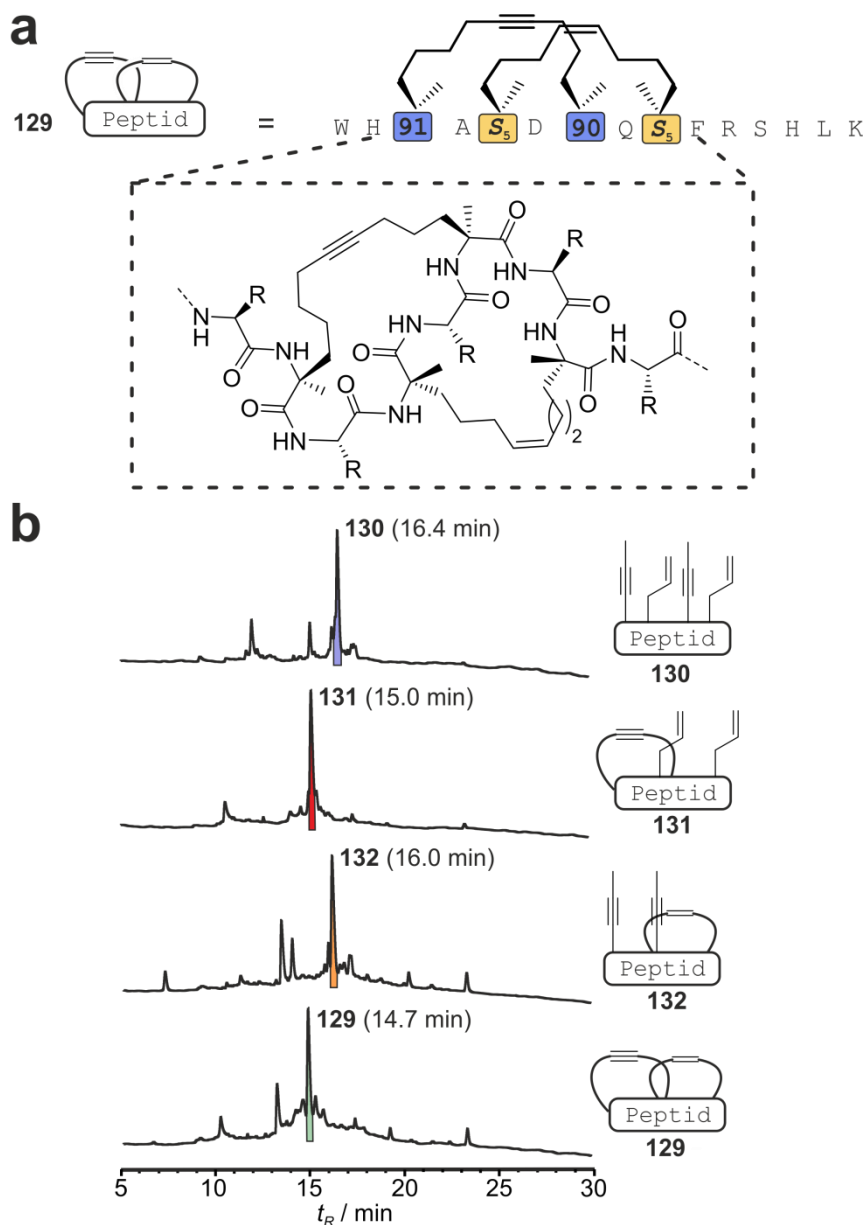


Abbildung 41. Sequenz und HPLC-Spektren des Bizyklus **129**. (a) Sequenz und Struktur des verschränkten bizyklischen Peptids **129**. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben. (R = Seitenkette proteinogener Aminosäuren außer Cys und Met) (b) Chromatogramme der nicht aufgereinigten Peptide, vor der Zyklisierung (**130**, blau), nach RCAM (**131**, rot), nach RCM (**132**, orange) und nach simultaner Eintopfreaktion (RCM und RCAM; **133**, grün).

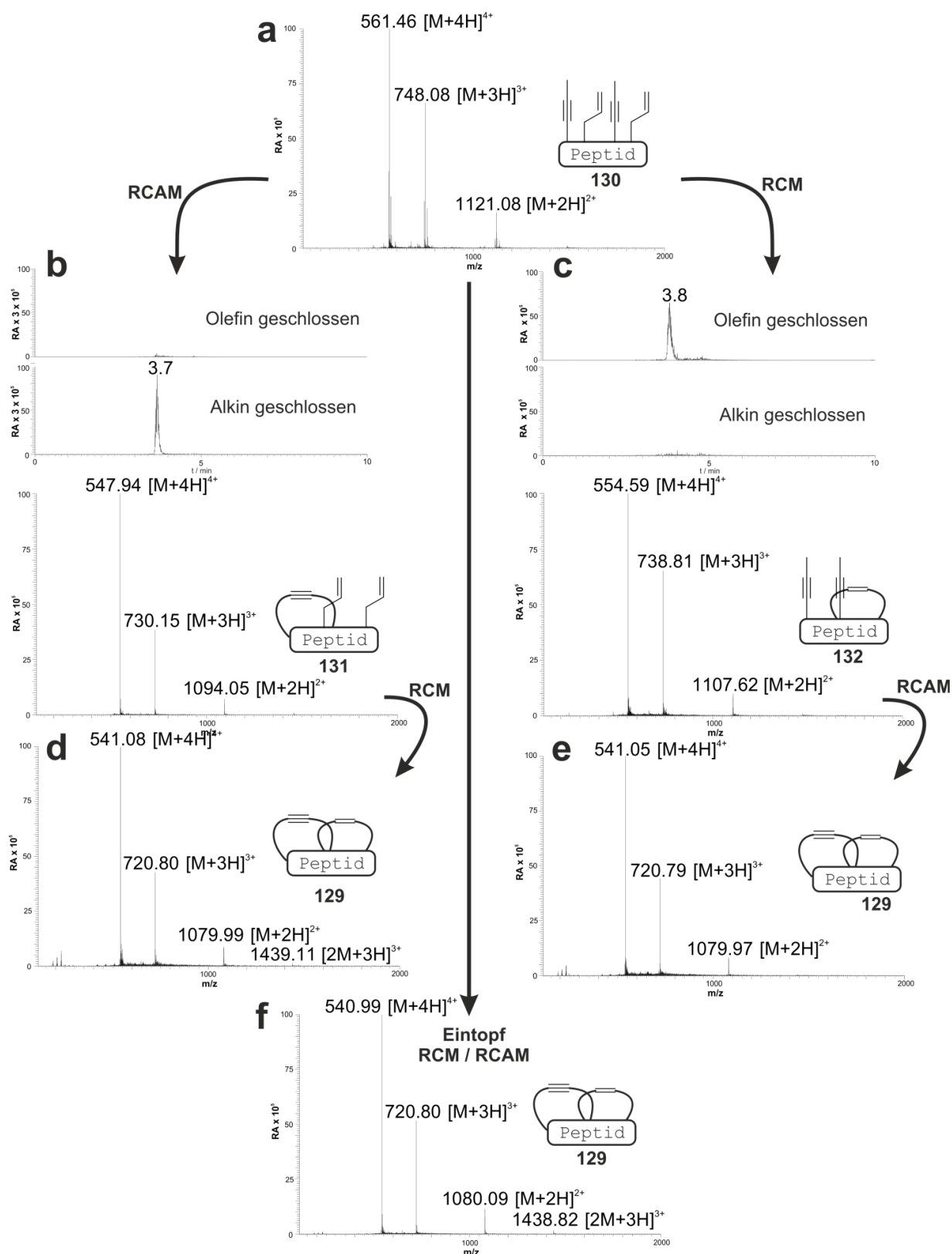


Abbildung 42. Massenspektren des bicyclischen verschränkten Peptids **129**. **(a)** Massenverteilung des linearen Vorläuferpeptids **130**. **(b)** HPLC-MS Analyse des Alkin-makrozyklisierten Intermediats **131** (oben). Lediglich das Alkin-zyklisierte Produkt und kein Olefin-zyklisiertes Produkt ist zu erkennen. Massenverteilung des Alkin-zyklisierten Intermediats **131** (unten). **(c)** HPLC-MS Analyse des Olefin-makrozyklisierten Intermediats **132** (oben). Lediglich das Olefin-zyklisierte Produkt und kein Alkin-zyklisiertes Produkt ist zu erkennen. Massenverteilung des Olefin-zyklisierten Intermediats **132** (unten). **(d)** Massenverteilung des bicyclischen Alkin/Olefin Produkts **129**. **(e)** Massenverteilung des bicyclischen Olefin/Alkin Produkts **129**. **(f)** Massenverteilung des bicyclischen Eintopf Produkts **129**.

5.4.2 Synthese bizyklischer Peptide zur Inhibition von Rab8

Um das Potential der bizyklischen Olefin/Alkin-Peptide zu untersuchen, sollten sie ein biologisch aktives Peptid eingebaut und getestet werden. Da die Rab8/R6IP-Wechselwirkung ein etabliertes System für modifizierte Peptide darstellt, wurden entsprechende Peptide mittels orthogonaler RCM/RCAM synthetisiert (**133** – **138**, Abbildung 43a). Als Grundlage diente die in Abschnitt 5.2 etablierte Architektur von zwei *i,i+4* verknüpften Makrozyklen an den Positionen K903/L907 und L911/A915. Da die Alkin-Makrozyklisierung am effektivsten mit einer Linkerlänge von neun bzw. zehn Kohlenstoffatomen funktioniert, wurden pro Alkin-Makrozyklus drei Analoga synthetisiert (siehe Abschnitt 5.3.4). Für die Synthese einer Verbrückung mit zehn Kohlenstoffatomen werden zwei Bausteine des Typs **91** benötigt. Die Synthese einer Verbrückung mit neun Kohlenstoffatomen erfordert den Einbau von zwei unterschiedlichen Bausteinen (**90** und **91**), wodurch sich zwei Regioisomere ergeben. Wie bereits erwähnt, war die Synthese eines Linkers mit acht Kohlenstoffatomen (zweimal **90**) aufgrund einer zu großen Ringspannung nicht erfolgreich. Insgesamt ergaben sich somit die sechs bizyklischen Peptide **133** – **138**. Die orthogonal makrozyklisierten Peptide **133** – **135** tragen die Olefin-Verbrückung am *N*-Terminus und die Alkin-Verbrückung am *C*-Terminus, während für die Peptide **136** – **138** die Positionen der Makrozyklen vertauscht sind. Alle Peptide wurden an fester Phase synthetisiert und für FP-Experimente mit einem Fluorescein-PEG-Konjugat funktionalisiert. Anschließend wurde ihre Affinität zu Rab8a(GppNHp) mittels FP bestimmt. Für eine erste Abschätzung der Affinität wurden relative K_D -Werte in einer Einfachmessung bestimmt, bevor die Affinität der besten Binder in einem weiteren FP-Experiment in einer Dreifachmessung verifiziert wurde.

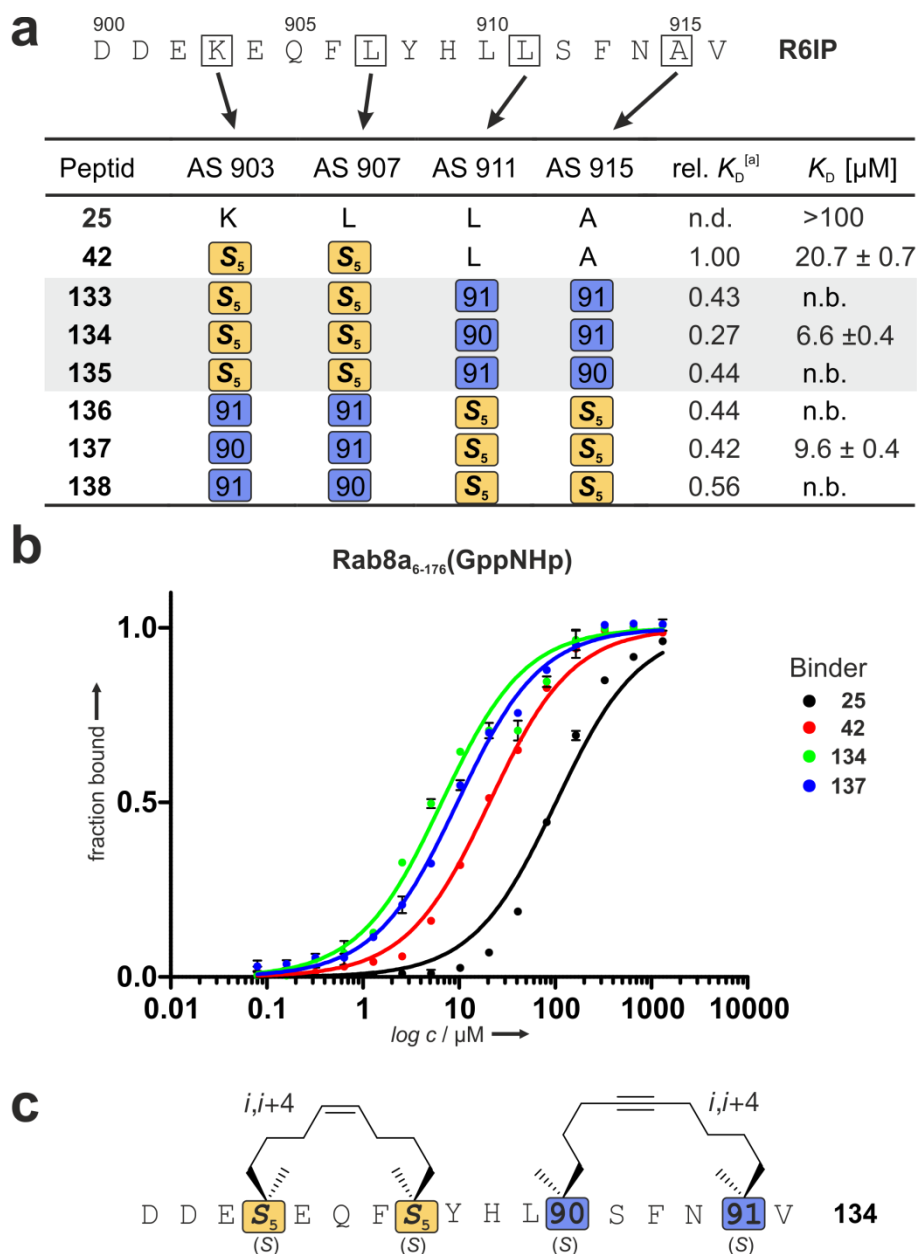


Abbildung 43. Bicyklische Peptide zur Bindung von Rab8a. **(a)** Tabelle mit bicyklischen Olefin/Alkin-Analoga von Peptid **25**. Die Dissoziationskonstanten gegenüber Rab8a(GppNHp) wurden mit Hilfe von FP-Experimenten bestimmt. $rel. K_D = K_D$ [Peptid] / K_D [**42**]; $rel. K_D$ -Werte beziehen sich auf eine Singulettmessung; Angegebene K_D -Werte stammen aus Dreifachmessungen. (Fehler entspricht 1σ). n.b. = nicht bestimmt; [a] K_D [**42**] = 29.5 μ M. Eine Auflistung der absoluten K_D -Werte befindet sich im Anhang (Tabelle 21). **(b)** FP-Graph der Dreifachmessungen der besten Binder. **(c)** Sequenz des besten bicyklischen Binders von Rab8a(GppNHp), Peptid **134**. Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und α -methylierten Alkinbausteine (blau) sind farblich hervorgehoben.

Im Gegensatz zu den monozyklischen Alkin-Makrozyklen (Abschnitt 5.3.4) zeigten alle bicyklischen Peptide eine deutliche Steigerung der Affinität im Vergleich zum Ausgangspeptid **42** (Abbildung 43a). Insbesondere die Peptide **134** und **137** zeigten die größten Verbesserungen und binden an aktiviertes Rab8a(GppNHp) im einstelligen mikromolaren Bereich (K_D [**134**] = 6.6 μ M; K_D [**137**] = 9.6 μ M). Für beide unterschiedlichen Architekturen brachte jeweils eine neun Kohlenstoffatome umfassende Verbrückung mit Baustein **91** an der C-terminalen Position und **90** an der N-terminalen Position den größten Affinitätsgewinn.

Im Gegensatz dazu, waren die Peptide **135** und **138** mit Baustein **91** *N*-terminal und **90** *C*-terminal die bityklischen Peptide mit der geringsten Bindungsaffinität. Das bityklische Peptid **134** bindet mit einer Dissoziationskonstante von 6.6 μM mehr als 3-mal besser an Rab8a(GppNHp) als das monozyklische Ausgangspeptid **42** und mehr als 15-mal besser als das nicht-modifizierte Peptid **25**. Darüber hinaus zeigt **134** eine nahezu identische Affinität, wie das bindungsoptimierte bityklische Peptid **73** (Abschnitt 5.2). Um die einstellig mikromolare Affinität von **73** zu erreichen, bedurfte es allerdings zwei zusätzlicher Variationen, wo hingegen die niedrige mikromolare Affinität von **134** ohne Sequenzoptimierung nur durch den Alkin-Makrozyklus bedingt ist. Die Bindung von **134** an Rab8a(GppNHp) konnte mit Hilfe von MST bestätigt werden. Eine Analyse der Fluoreszenzintensität der MST Messungen ergab einen K_D von 11 μM für **134** (Anhang, Abbildung 65, 66). Zudem konnte in einem FP-Verdrängungsexperiment ein Komplex von Rab8a(GppNHp) (15 μM) und **134** (60 nM) durch die Zugabe von acetyliertem Peptid **42** aufgelöst werden (Abbildung 44a). Die vollständige Verdrängung von **134** mit **42** zeigte die reversible Bindung beider Peptide an die gleiche Position und erfolgte mit einem IC_{50} von 33 μM . Wie erwartet ließ sich der Komplex aus Rab8a(GppNHp) und **134** nicht durch die Zugabe des weniger affinen Binders **25** auflösen. Darüber hinaus konnte Peptid **42** (60 nM) ebenfalls durch die Zugabe von acetyliertem Peptid **134** von Rab8a(GppNHp) (100 μM) verdrängt werden (Abbildung 44b). Dabei wurde ein IC_{50} von 23 μM beobachtet.

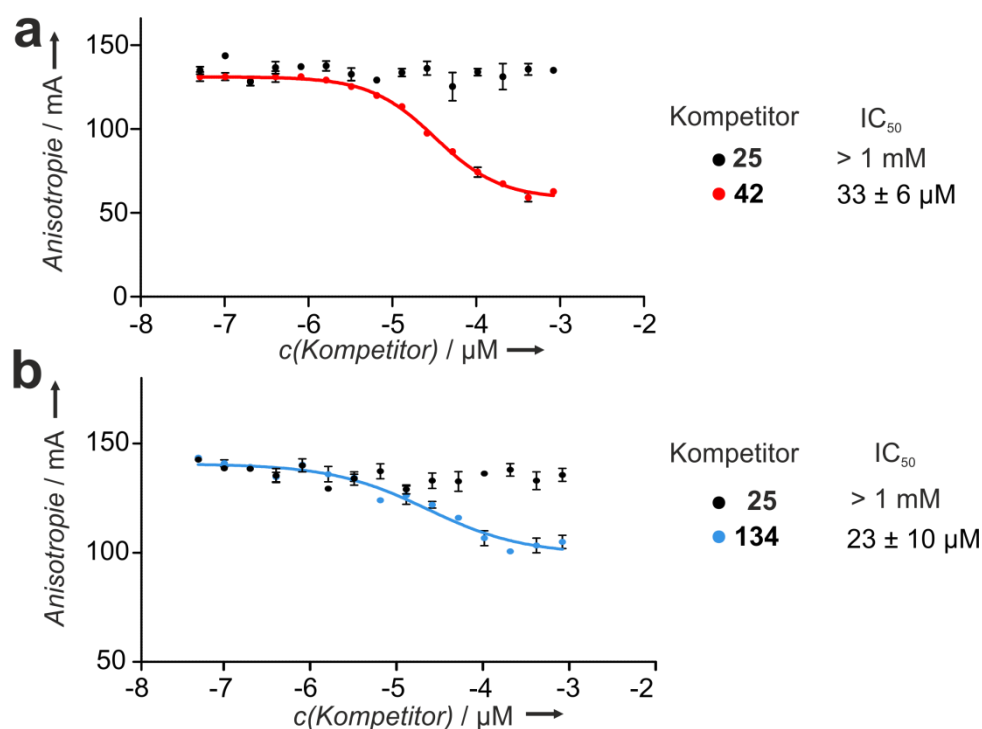


Abbildung 44. FP-Verdrängungsexperimente mit bityklischen Olefin/Alkin Peptiden. (a) Verdrängung von Rab8a(GppNHp) (15 μM) gebundenem, Fluorescein-markiertem Peptid **134** (60 nM) mit steigenden Konzentrationen von acetyliertem Peptid **42** und **25**. (b) Verdrängung von Rab8a(GppNHp) (40 μM) gebundenem, Fluorescein-markiertem Peptid **42** (60 nM) mit steigenden Konzentrationen von acetyliertem Peptid **134** und **25**. Dreifachmessungen, Fehler entsprechen 1 σ .

Die Synthese bizyklischer Peptide mittels orthogonaler RCAM/RCM ermöglichte die Weiterentwicklung des monozyklischen Rab8a Binders **42** in das bizyklische Peptid **134** mit einer mehr als 3-fach höheren Affinität. Der zusätzliche Einbau eines Alkin-Makrozyklus mit einer Länge von neun Kohlenstoffatomen an den Positionen 911 und 915 brachte die größte Verbesserung im Vergleich zu **42**. Das belegt das Potential des entwickelten Ansatzes zur Synthese von bizyklischen Peptiden. Eine vergleichbare Affinität mit zwei Olefin-Makrozyklen konnte nur mittels zusätzlicher Sequenzoptimierung erreicht werden (**73**). Damit ist die Synthese von Alkin-Makrozyklen und insbesondere von bizyklischen RCAM/RCM Peptiden ein interessanter Ansatz zur Weiterentwicklung von bereits identifizierten makrozyklischen Peptiden.

5.5 α -Helikal stabilisierte Peptide zur Inhibition von UNC119

(Die Proteinexpression und Aufreinigung erfolgte in Kooperation mit Dr. Mamta Jaiswal.)

Die Lipid-bindenden Proteine UNC119a und UNC119b wurden als Transportproteine von myristoylierten Untereinheiten von G-Proteinen und Tyrosin-Kinasen des Scr-Typs identifiziert (Abschnitt 3.3).²²³ Ein *knock-down* von UNC119a steht in direktem Zusammenhang mit unvollständiger Zytokinese, da wichtige Proteine der Zellteilung nicht an ihren Bestimmungsort gelangen.²²⁷ Die bisherigen Ansätze, die darauf abzielten die zeitliche und räumliche Organisation essentieller Proteine zu stören, adressierten vor allem die Synthesemaschinerie zur Herstellung lipidierter Proteine, wie z.B. Farnesyltransferase-Inhibitoren oder Plamitoylierungs-Inhibitoren.²⁴⁰ Nur in wenigen Beispielen, wie der Entwicklung des PDE δ Inhibitors Deltarasin (**14**),²⁴⁸ wurden die Transportmechanismen der lipidierten Proteine adressiert. In diesem Zusammenhang stellt das Transportprotein UNC119 ein potentiell interessantes Zielprotein dar. Die unvollständig ablaufende Zellteilung nach UNC119 *knock-down* könnte UNC119-Inhibitoren als neuen Ansatz gegen sich schnell teilende Zellen identifizieren. Daher sollte im Folgenden der Einsatz lipidierter, stabilisierter Peptide zur Inhibition von UNC119 untersucht werden.

5.5.1 Evaluierung UNC bindender Peptidfragmente

Wie in vorangegangenen Studien bereits gezeigt wurde, interagiert UNC119 mit einer Vielzahl von *N*-terminal myristoylierten Proteinen.²²³ Darüber hinaus binden auch kurze, *N*-terminal myristoylierte Peptidfragmente mit nanomolarer Affinität an UNC119.^{222,321} UNC119 bindet dabei selektiv einfach *N*-terminal myristoylierte Peptidsequenzen und zeigt keinerlei Affinität gegenüber mehrfach lipidierter oder prenylierten Peptiden.³²¹ Die Entwicklung Peptid-basierter Inhibitoren für UNC119 erfolgte auf Basis der Kristallstruktur mit dem *N*-terminal lauroylierten Peptid der α -Untereinheit von Transducin, Gnat1 (Abbildung 45a, b).²²² Dieses Peptid bindet sowohl in seiner lauroylierten, wie auch myristoylierten Form mit submikromolaren Dissoziationskonstanten an UNC119.²²² Die Kristallstruktur zeigt, dass der Lipidrest und der erste Abschnitt der Peptidsequenz tief in das Protein hineinragen. Dabei bilden die ersten sechs *N*-terminalen Aminosäuren des Peptids eine einfache α -Helix-Windung, die vollständig in die Bindetasche von UNC119 hineinragt. Die weiteren Aminosäuren zeigen keinen Kontakt mit UNC119 und sind teilweise nicht aufgelöst. Aufgrund der helikalen Sekundärstruktur wurde die Gnat1 Peptidsequenz als Grundlage für die Entwicklung Peptid-basierter Inhibitoren ausgewählt.

Um die Dissoziationskonstante der nicht modifizierten Sequenz zu bestimmen, wurde das *N*-terminal myristoylierte Peptid **139** mittels SPPS hergestellt. Da der *N*-Terminus des Peptids lipidiert ist, musste die für FP-Experimente essentielle Fluoreszenzmarkierung *C*-terminal erfolgen. Dazu wurde ein Mtt-seitenkettengeschütztes *C*-terminales Lysin in die Peptidsequenz eingebaut. Die Mtt-Schutzgruppe kann nach

erfolgreicher Synthese selektiv mit 1%-iger TFA in DCM abgespalten werden. Anschließend wird das freie Amin der Lysin-Seitenkette mit Fluorescein funktionalisiert und das Peptid vom Harz abgespalten. Im FP-Experiment ergaben sich für das nicht-modifizierte Peptid **139** Affinitäten von $K_D = 7.5$ nM gegenüber UNC119a und $K_D = 11.2$ nM gegenüber UNC119b (Abbildung 45c). Die Dissoziationskonstanten für **139** lagen sowohl für UNC119a wie auch für UNC119b im niedrigen nanomolaren Bereich und bestätigten die hohe Affinität des Peptids aus früheren Studien.²²² Peptid **139** zeigte allerdings nur geringe Selektivität in Bezug auf die beiden UNC119 Homologen. Auf Grundlage der FP-Bindungsdaten wurde die Peptidsequenz von **139** als Startpunkt für die Synthese α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Derivate ausgewählt.

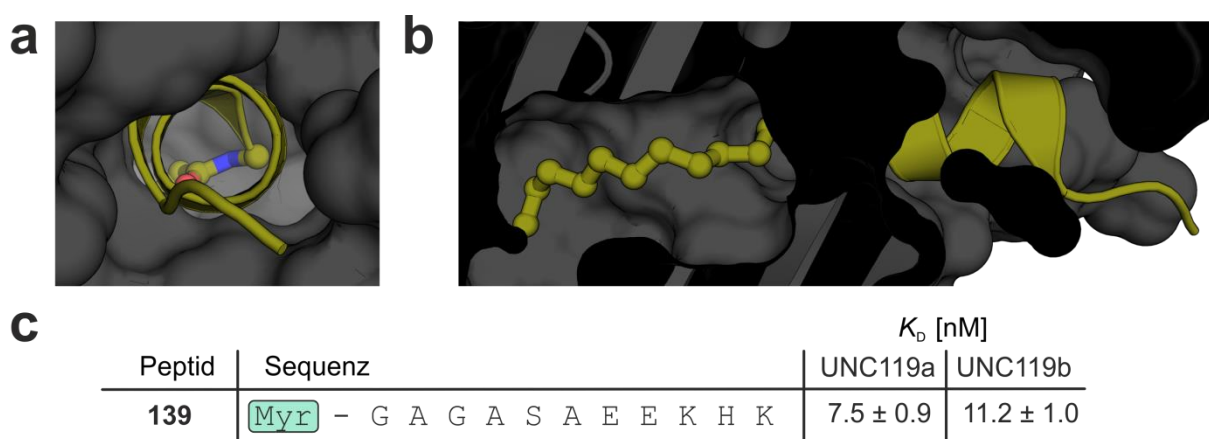


Abbildung 45. Kristallstruktur von Gnat1 und Bindungsdaten. Frontalansicht (a) und Seitenansicht (b) der UNC119 bindenden lauroylierten Gnat1 Peptidsequenz. Das Peptid ist nahezu vollständig in das Lipid-bindende Protein UNC119 inseriert. PDB = 3RBQ (c) Sequenz des nicht-modifizierten Peptids **139** und Affinitäten zu UNC119a und UNC119b. Dreifachmessungen, Fehler entsprechen 1σ . Die *N*-terminale Fettsäure ist farblich hervorgehoben.

5.5.2 Stabilisierung des lipidierten Peptidfragments

Die Kristallstruktur von Gnat1 mit UNC119 zeigt einen kurzen α -helikalen Abschnitt, der die letzten sechs Aminosäuren des *N*-Terminus des Peptids umfasst (Abbildung 46a). Ausgehend von den vielversprechenden Bindungsdaten des nicht modifizierten Peptids **139** (5.5.1) wurden α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide entworfen, um die kurze α -Helix von Gnat1 zu stabilisieren. Dazu wurden zunächst die beiden Peptide **140** und **141** mit einer *i,i+3* Verbrückung, welche sich besonders zur Stabilisierung kurzer helikaler Bereiche eignet, synthetisiert (Abbildung 46b). Beide Peptide wurden an ihrem *N*-Terminus myristoyliert und *C*-terminal über ein Lysin mit Fluorescein funktionalisiert. Die Affinität zu UNC119a und UNC119b wurde in einem FP-Experiment bestimmt. Beide Peptide (**140** und **141**) zeigten deutlich geringere Affinitäten für UNC119 als das nicht-modifizierte Peptid **139** (Abbildung 46b). Während **140** jedoch keine Selektivität zwischen den UNC Homologen aufwies (K_D [UNC119a] = 98.3 nM, K_D [UNC119b] = 80.7 nM) zeigte **141** eine mehr als 7-fach höhere Affinität zu UNC119a im Vergleich zu UNC119b (K_D [UNC119a] = 78.4 nM, K_D [UNC119b] = 594 nM). Insgesamt liegen die Dissoziationskonstanten von **140** und **141** aber um das mindestens 10-fache über denen von **139**. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Kohlenwasserstoffverbrückung im α -helikalen Bereich von

Gnat1 zu einer sterischen Hinderung führt. Da der *N*-Terminus von Gnat1 komplett von UNC119 umschlossen ist, scheint an diesen Positionen nicht ausreichend Platz für das Einbringen einer sterisch anspruchsvollen Verbrückung zu sein. Die Ergebnisse decken sich mit den in Abschnitt 2.2.2 diskutierten Adressierungsmöglichkeiten von seitenkettenverbrückten Peptiden. Verbrückte Peptide sind nur in Ausnahmefällen in der Lage eine Helix, die über drei Seitenflächen interagiert, zu stabilisieren. In diesen Fällen sind HBS-Helices besser geeignet. Die *N*-terminale Myristoylierung schließt jedoch den Einsatz einer HBS-Helix aus, sodass nach Alternativen gesucht wurde.

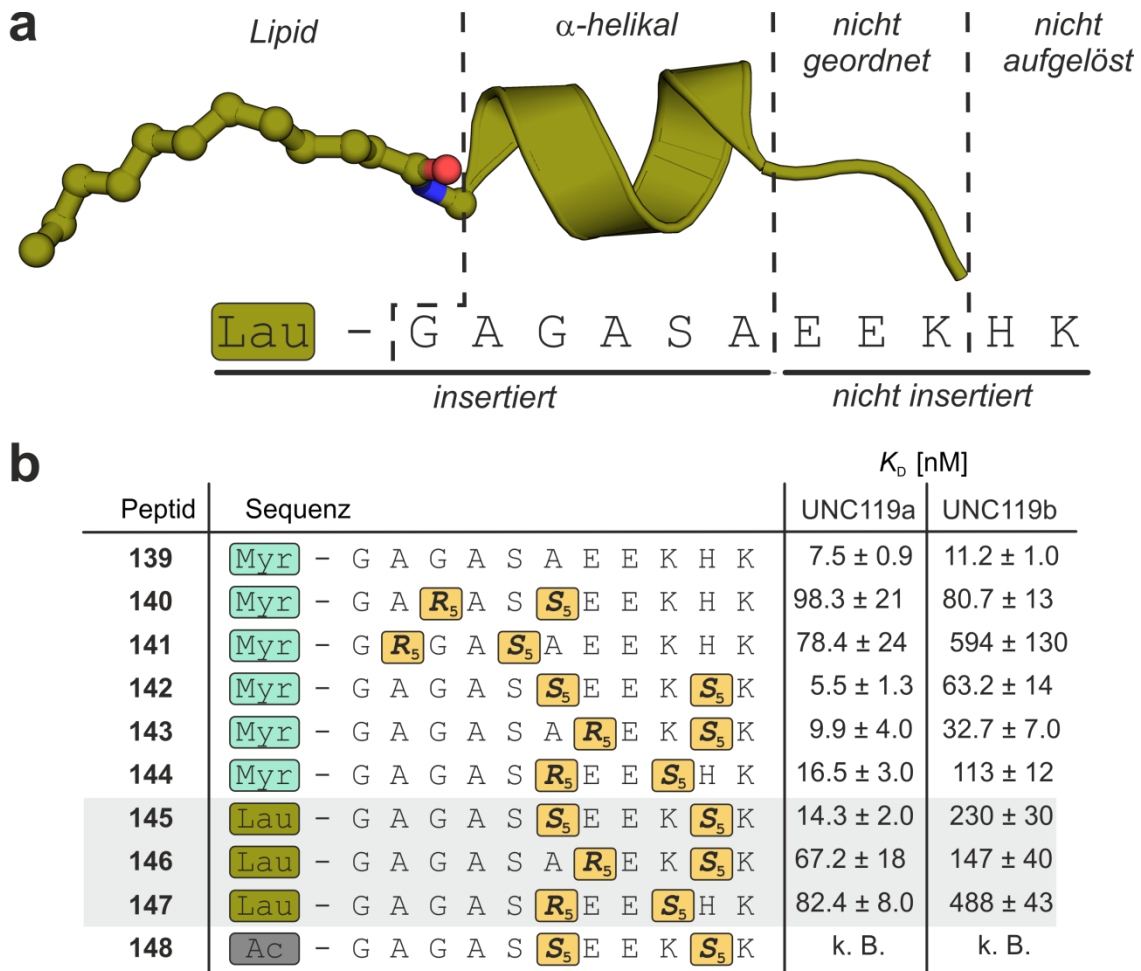


Abbildung 46. α -Methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide zur Inhibition von UNC119. (a) Struktur und Sequenz des laurylierten Gnat1 Peptidfragments. Zur besseren Übersicht ist die Peptidsequenz in Bereiche unterteilt. PDB = 3RBQ (b) Sequenzen und Affinitäten der UNC119 bindenden Peptide. Dreifachmessungen, Fehler entsprechen 1σ . Die α -methylierten Olefinbausteine (gelb) und die *N*-terminale Fettsäure sind farblich hervorgehoben. Myr = Myristinsäure (türkis), Lau = Laurinsäure (dunkelgrün), Ac = Acetyl (grau), k. B. = keine Bindung.

Da der Einbau einer Verbrückung die Ausbildung einer α -helikalen Konformation induziert und nicht nur lokal wirkt, wurde die α -helikale Kohlenwasserstoffverbrückung in Richtung des *C*-Terminus verschoben. So sollte der zuvor ungeordnete und teilweise in der Kristallstruktur nicht aufgelöste *C*-Terminus, der nicht im Zielprotein verborgen ist, in eine α -helikale Form gezwungen werden. Dafür wurden drei unterschiedlich stabilisierte Peptide getestet, zwei mit einer $i,i+3$ -Architektur und eins mit einer $i,i+4$ -Architektur. Inspiriert

durch die Kristallstruktur, in der Gnat1 lauroyliert an UNC119 bindet, wurden die drei unterschiedlich stabilisierten Peptide sowohl in ihrer myristoylierten Form (**142** – **144**) als auch in ihrer lauroylierten Form (**145** – **147**) synthetisiert und im FP-Experiment getestet (Abbildung 46b). Dabei ist festzustellen, dass die myristoylierten Peptide **142** – **144** niedrigere Dissoziationskonstanten aufweisen als ihre lauroylierten Analoga **145** – **147**. Darüber hinaus ist die Affinität aller C-terminal stabilisierten Peptide (**142** – **147**) generell um ein Vielfaches höher als die der N-terminal stabilisierten Peptide **140** und **141**. Für UNC119a liegen die Affinitäten der myristoylierten Peptide **142** – **144** im Bereich des nicht modifizierten Peptids **139**, wobei Peptid **142** mit einer Dissoziationskonstante von $K_D[\text{UNC119a}] = 5.5 \text{ nM}$ eine leicht erhöhte Affinität im Vergleich zu **139** aufweist. Zudem zeigt **142** eine mehr als 11-fach höhere Affinität gegenüber UNC119a verglichen mit UNC119b ($K_D[\text{UNC119b}] = 63.2 \text{ nM}$). Der beste identifizierte Binder für UNC119b ist **143** mit einem K_D von 32.7 nM für UNC119b. Damit bindet **143** nahezu dreimal schlechter als das nicht-modifizierte Peptid **139**. Außerdem bindet **143** mit ca. 10 nM Affinität an UNC119a. Um den Einfluss der N-terminalen Lipidierung zu untersuchen, wurde **148** synthetisiert, welches anstelle der N-terminalen Fettsäure lediglich eine Acetyl-Gruppe trägt (Abbildung 46b). Ohne den Lipidanker ist **148** nicht in der Lage an UNC119a oder UNC119b zu binden und dient in weiteren Experimenten als Negativkontrolle.

Prinzipiell bleibt festzuhalten, dass die Strategie, die α -methylierte Kohlenwasserstoffverbrückung für die Peptide **142** – **144** in Richtung des C-Terminus zu verschieben und somit den sterischen Anspruch innerhalb der komplett umschlossenen α -helikalen Binderegion zu reduzieren, Binder mit erhöhter Affinität lieferte. Bei diesen Bindern wurde eine zuvor nicht strukturierte Peptidsequenz in eine α -helikale Konformation gezwungen und somit eine α -Helizität des N-Terminus induziert. Durch Variation der Verbrückungsarchitekturen und Positionen entstand Peptid **142**, das UNC119a mit niedrig nanomolarer Affinität bindet und eine mehr als 10-fache Selektivität gegenüber UNC119b aufweist.

5.5.3 Biophysikalische Evaluierung

Auf Grundlage der vielversprechenden Bindungsdaten aus den FP-Experimenten sollte für den besten Binder **142** die Interaktion mit UNC119a zusätzlich in einem orthogonalen Bindungsassay verifiziert werden. Dazu wurden ITC-Messungen mit UNC119a und **142** durchgeführt (Abbildung 47). Myristoyliertes, α -methyliertes, kohlenwasserstoffverbrücktes Peptid **142** wurde im ITC-Experiment zu einer Lösung aus UNC119a in Messpuffer titriert. Die ermittelte Dissoziationskonstante von $K_D = 115 \text{ nM}$ liegt zwar eine Größenordnung über dem im FP-Experiment ermittelten Wert, validiert jedoch die relativ hohe Affinität von **142** zu UNC119a.

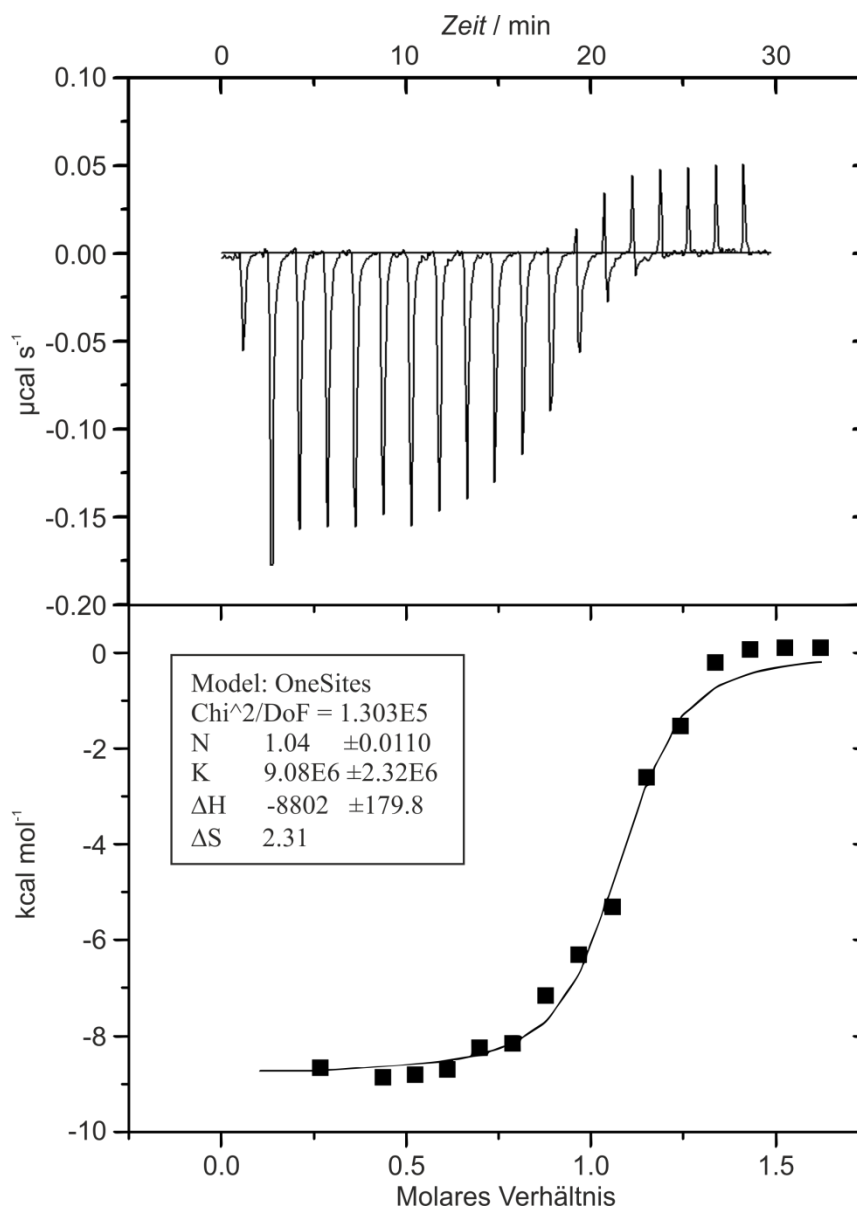


Abbildung 47. ITC-Experiment von **142**. Repräsentatives ITC Spektrum von **142** (150 μM) titriert zu UNC119a (17.9 μM). Zur Auswertung wurden Referenzspektren von **142** titriert zu Messpuffer und Messpuffer titriert zu UNC119a abgezogen, $K_D = 110$ nM. Es wurden drei einzelne Messungen durchgeführt (Anhang, Abbildung 67, 68): $K_D = 115 \pm 7$ nM, Fehler entspricht 1σ .

5.5.4 Zellbasierte Evaluierung der UNC bindenden Peptide

(Die Zellteilungsexperimente wurden von Dr. Shobhna Kapoor durchgeführt.)

Die vorstehend beschriebenen Experimente weisen die direkte Interaktion von UNC119 und einigen lipidierten Peptiden nach. Sie beantworten nicht die Frage, ob diese Peptide in der Lage sind die zelluläre Funktion von UNC119 zu beeinflussen. Wie bereits beschrieben bewirkt ein siRNA *knock-down* von UNC119a ein nicht vollständiges Ablaufen der Zytokinese, was eine erhöhte Anzahl binuklearer Zellen zur Folge hat.²²⁷ Da die Quantifizierung solcher Zellen im Mikroskop äußerst aufwendig ist, wurde der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt, was einen Rückschluss auf den Ablauf der Zytokinese erlaubt. Ein gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikanter Anstieg des DNA-Gehalts wäre auf eine durch die

Inhibition von UNC119a bedingte Störung des Zellzyklus zurückzuführen. Dafür sollten in einem zellbasierten Experiment die Effekte von **142**, dem nicht-modifizierten Peptid **139** und der acetylierten Negativkontrolle **148** auf HeLa-Zellen und L-Zellen (Maus Fibroblasten) untersucht werden. Dazu wurden die Zellen für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen **142**, dem nicht-modifizierten Peptid **139** (50 μM) und der acetylierten Negativkontrolle **148** (50 μM) inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 48). Als Positivkontrolle diente die niedermolekulare Verbindung *Nocodazol*. *Nocodazol* stoppt den Zellzyklus in der M-Phase durch Inhibition der Tubulin-Polymerisation. Ohne Mikrotubuli kann sich die Metaphasen-Spindel nicht ausbilden und die Zellen sich nicht teilen. Zum Zeitpunkt der Spindelformation hat die Zelle bereits ihre DNA verdoppelt, sodass der DNA-Gehalt bei 4N liegt (N entspricht der Anzahl Chromosomensätze). Säugetierzellen sind diploid ($N = 2$), sodass Zellen, bei denen die Zellteilung nicht vollständig ablaufen kann, einen DNA-Gehalt von $>2N$ besitzen.

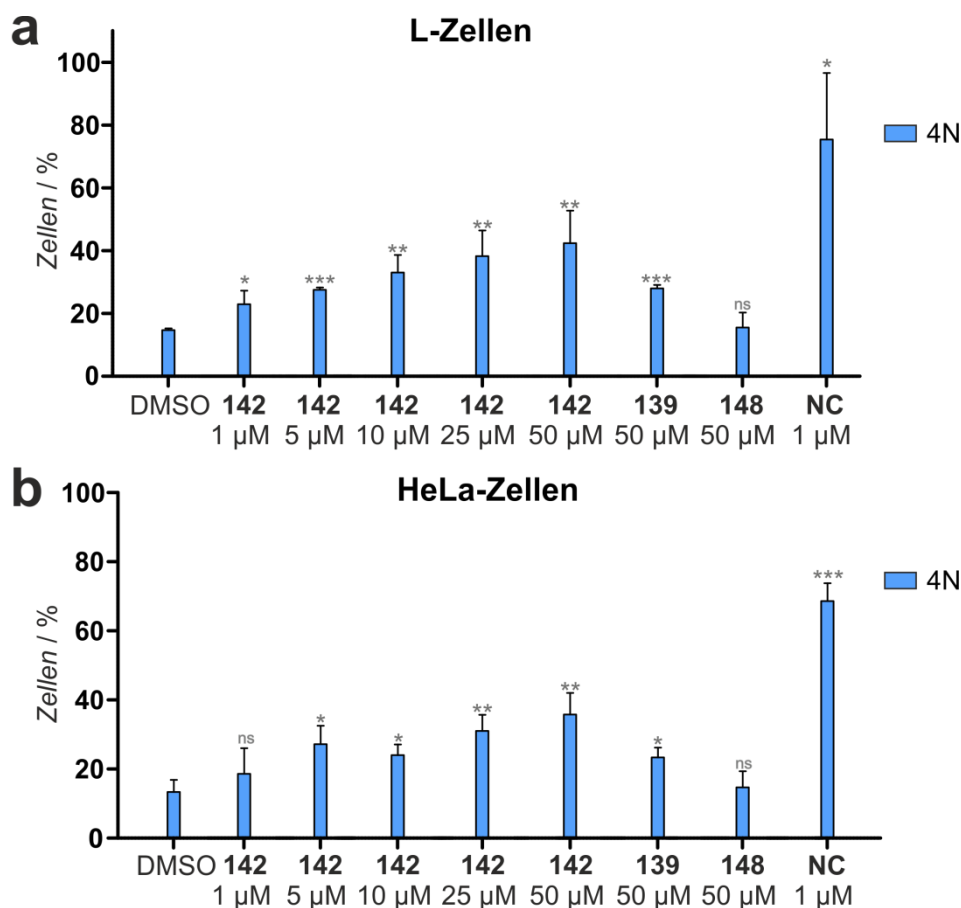


Abbildung 48. Durchflusszytometrieexperimente der UNC119 bindenden Peptide. (a) L-Zellen und (b) HeLa-Zellen wurden 72 h mit nicht-markierten Peptid inkubiert und ihr DNA-Gehalt anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. NC = *Nocodazol*. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis von Dreifachbestimmungen. Fehler entspricht 1σ . Signifikanz p gegenüber DMSO: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N = DNA-Gehalt. Angaben in % befinden sich im Anhang (Tabelle 25), eine vollständige Übersicht befindet sich in Abbildung 69.

Die Ergebnisse der DNA-Quantifizierung stehen im Einklang mit den zuvor bestimmten Bindungsdaten. Werden L-Zellen über 72 h mit steigenden Konzentrationen des α -methylierten,

kohlenwasserstoffverbrückten Peptids **142** inkubiert, so erhöht sich die Anzahl an L-Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N (Abbildung 48a). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stieg der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N von $14.7\% \pm 0.4$ (DMSO) auf $42.4\% \pm 8.5$ ($50 \mu\text{M}$ **142**, Anhang Tabelle 25). Für das nicht bindende Peptid **148** wurde bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ dagegen nur eine nicht signifikante Abweichung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet ($15.5\% \pm 3.9$). Das nicht-modifizierte Peptid **139** zeigte mit $28.0\% \pm 0.9$ dagegen einen Effekt, der in etwa dem von **142** bei $5 \mu\text{M}$ ($27.5\% \pm 0.6$) entspricht. Zwar zeigte das Peptid **139** eine ähnliche Affinität gegenüber UNC119a wie das α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **142** (siehe Abschnitt 5.5.2), jedoch scheint die biologische Verfügbarkeit des verbrückten Peptids deutlich größer zu sein. Dies ist vermutlich sowohl auf eine erhöhte proteolytische Stabilität wie auch auf eine verbesserte Zellgängigkeit von **142** zurückzuführen. Peptid **142** kann in ca. 10-fach niedrigerer Konzentration eingesetzt werden um die gleichen Effekte zu erzielen wie das nicht-modifizierte Peptid **139**. Die Experimente in HeLa-Zellen bestätigten die in L-Zellen beobachteten Ergebnisse (Abbildung 48b, Anhang Tabelle 25). Die Effekte in HeLa-Zellen fielen unwesentlich geringer aus, bestätigten jedoch die konzentrationsabhängigen Effekte von **142**. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stieg der Prozentsatz von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt von $13.3\% \pm 2.9$ (DMSO) auf $35.8\% \pm 5.1$ ($50 \mu\text{M}$ **142**) an. Die Negativkontrolle zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt ($14.7\% \pm 3.8$ bei $50 \mu\text{M}$). Der Wert für das nicht-modifizierte Peptid **139** lag mit $23.4\% \pm 2.3$ zwischen den Werten von $1 \mu\text{M}$ ($18.6\% \pm 6.0$) bzw. $5 \mu\text{M}$ ($27.2\% \pm 4.3$) von **142**. Auch hier kann das α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptid **142** in ca. 10-fach niedrigerer Konzentration als das nicht-modifizierte Peptid **139** eingesetzt werden und erzielt dennoch ähnliche Effekte. Der Einfluss von *Nocodazol* auf die Zellteilung war für beide Zelllinien bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ($75.4\% \pm 15.0$ [L-Zellen], $68.6\% \pm 4.2$ [HeLa-Zellen]) ca. doppelt so groß wie der von **142** bei $50 \mu\text{M}$ ($42.4\% \pm 8.5$ [L-Zellen], $35.8\% \pm 5.1$ [HeLa-Zellen]). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass *Nocodazol* als Mikrotubuli-Inhibitor einen orthogonalen Wirkmechanismus im Vergleich mit dem UNC119a Inhibitor **142** aufweist. Die Auswirkungen auf den DNA-Gehalt von L- bzw. HeLa-Zellen infolge der Behandlung mit Peptid **142** sind die ersten beobachteten *in vivo* Effekte eines UNC119a Inhibitors.

Eine konfokalmikroskopische Analyse des Phänotyps von HeLa-Zellen nach Inkubation mit **142** bestätigte die unterschiedlichen Wirkmechanismen des Peptid-basierten Inhibitors und *Nocodazol* (Abbildung 49). Die Behandlung von HeLa-Zellen mit **142** führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einem Anstieg an binuklearen Zellen. Diese Zellen besitzen zwei Zellkerne, wobei das Mikrotubuli-Netzwerk unverändert ist. Es scheint, dass nach Ablauf der Mitose die Zytokinese nicht abgeschlossen werden kann und sich Zellen mit zwei Zellkernen bilden. Das erklärt das vermehrte Auftreten von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N und bestätigt die Ergebnisse der Durchflusszytometriemessungen. Diese Ergebnisse entsprechen den mittels siRNA *knock-down* gemachten Beobachtungen in HeLa-Zellen.²²⁷ Im Gegensatz dazu verhinderte die Inkubation mit *Nocodazol* die Polymerisation von Tubulin und die Ausbildung des Mikrotubuli Netzwerks. Dadurch wird die Bildung der mitotischen Spindel und damit die Mitose inhibiert.

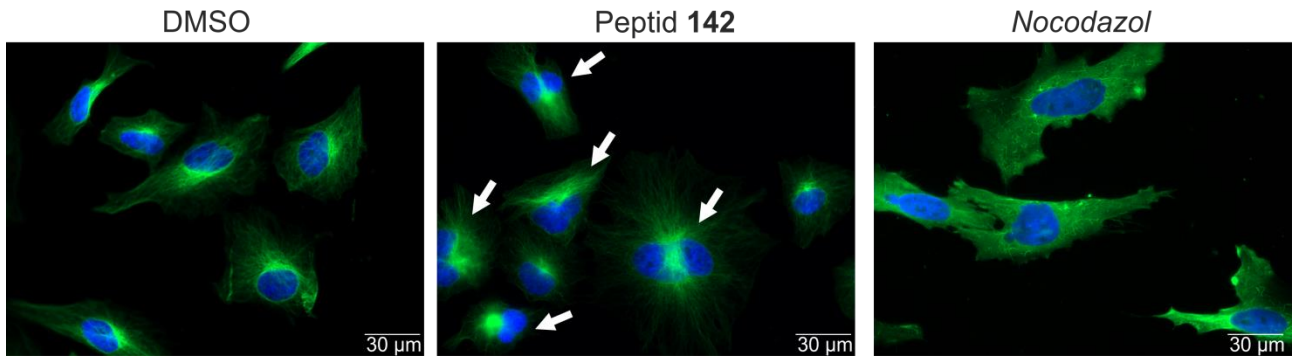


Abbildung 49. Konfokalmikroskopische Zellbilder von HeLa-Zellen nach Inkubation mit DMSO (72 h), Peptid **142** (25 μM , 72 h) bzw. *Nocodazol* (1 μM , 24 h). Pfeile zeigen binukleare Zellen.

Mit Hilfe von stabilisierten α -Helices konnten Peptid-basierte Inhibitoren mit *in vivo* Aktivität für das Lipid-bindende Protein UNC119 identifiziert und weiter entwickelt werden. UNC119 kontrolliert den Transport und die Aktivität von *N*-myristoylierten Proteinen, die u.a. während der Zytokinese eine wichtige Rolle spielen. Durch den Einbau einer α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung in lipidierte Peptidsequenzen konnten niedrig nanomolare Binder vor UNC119a identifiziert werden. Inkubation von L- und HeLa-Zellen mit dem besten Binder (**142**), führte zu einer erhöhten Anzahl Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt und entspricht den zuvor gemachten Beobachtungen mittels siRNA *knock-down*. Die Analyse des Phänotyps von HeLa-Zellen zeigte das Auftreten von binuklearen Zellen, die im Gegensatz zur Inkubation mit dem Tubulin Inhibitor *Nocodazol* über ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk verfügen. Die identifizierten Peptide bestätigen *in cellulo* die durch *knock-down* beobachteten Effekte. Damit konnte UNC119 als potentielles Zielprotein für die Medizinalchemie identifiziert werden.

6 Zusammenfassung

Die Modulation intrazellulärer Protein–Protein Interaktionen stellt aktuell eine der größten Herausforderungen der Wirkstoffforschung dar und führte unter Verwendung der traditionellen niedermolekularen Verbindungen bisher nur zu geringen Erfolgen. Fortschritte bei der Entwicklung neuartiger Methoden zur Adressierung schwer zugänglicher PPIs lieferten erfolgversprechende Ansätze, die bereits bis in klinische Studien vorangetrieben wurden. Insbesondere der Einsatz Peptid-basierter Sekundärstrukturmimetika wurde erfolgreich zur Adressierung anspruchsvoller PPIs eingesetzt. Mittlerweile wurden zahlreiche verschiedene Methoden zur Synthese peptidischer Sekundärstrukturmimetika entwickelt, von denen die α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide (*hydrocarbon stapled peptides*) bisher die größten Erfolge erzielten.

Die kleinen GTPasen der Ras–Superfamilie kontrollieren als molekulare Schalterproteine zahlreiche essentielle zelluläre Funktionen und Prozesse. Über eine Vielzahl von großflächigen und gering-profilieren PPIs empfangen und leiten sie Signale weiter und regulieren nachgeschaltete Signalkaskaden. Kleine GTPasen gelten seit langem als pharmakologisch unzugänglich, da ihre PPIs mit den klassischen medizinalchemischen Methoden nicht adressierbar sind. Als Schlüsselregulatoren des zellulären Membrantransports kontrollieren die kleinen GTPasen der Rab–Familie die Bildung, den Transport und die Fusion von Vesikeln. Auf diese Weise regeln sie den exo- und endozytotischen Transport, den Transport zwischen einzelnen Zellkompartimenten sowie das Recycling von Membranen. Durch ein genaueres Verständnis der Regulation und Funktion einzelner Rab–Proteine in den letzten Jahren konnte ihre Fehlregulation vermehrt mit der Entstehung zahlreicher humaner Erkrankungen assoziiert werden. Dadurch rücken Rab–GTPasen zunehmend in den Fokus der Wirkstoffforschung und repräsentieren attraktive Zielproteine für die Entwicklung neuer Therapeutika. Trotz großer Anstrengungen konnten bisher keine effektiven Modulatoren für kleine GTPasen gefunden werden.

Mit Hilfe α -methylierter, kohlenwasserstoffverbrückter Peptide konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Peptid-basierte Modulatoren für Rab–GTPasen entwickelt werden. Durch eine Analyse der Kristallstrukturen von Rab–Protein-Komplexen wurden potentielle α -Helices identifiziert, die für eine Bindung an Rab in Frage kommen. Nach Bestimmung der Affinität der Wildtyp-Peptide gegenüber einer Auswahl an nukleotidfreien Rab–GTPasen wurden vier der untersuchten Sequenzen mit Hilfe von α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückungen stabilisiert, da sie Affinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich ($<20 \mu\text{M}$) aufwiesen. Durch den Einbau der α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückungen konnte die Bindung an die nukleotidfreien Rab–Proteine stark erhöht werden. Zudem wurde Peptid **42** identifiziert, welches an Rab8a in seiner aktivierten, GppNHp-gebundenen Form mit einem K_D -Wert von $22.2 \mu\text{M}$ bindet und *in vitro* eine Rab–Effektor–Interaktion inhibiert (Abbildung 50a). Peptid **42** ist damit der erste direkte Binder einer aktivierten Rab–GTPase.

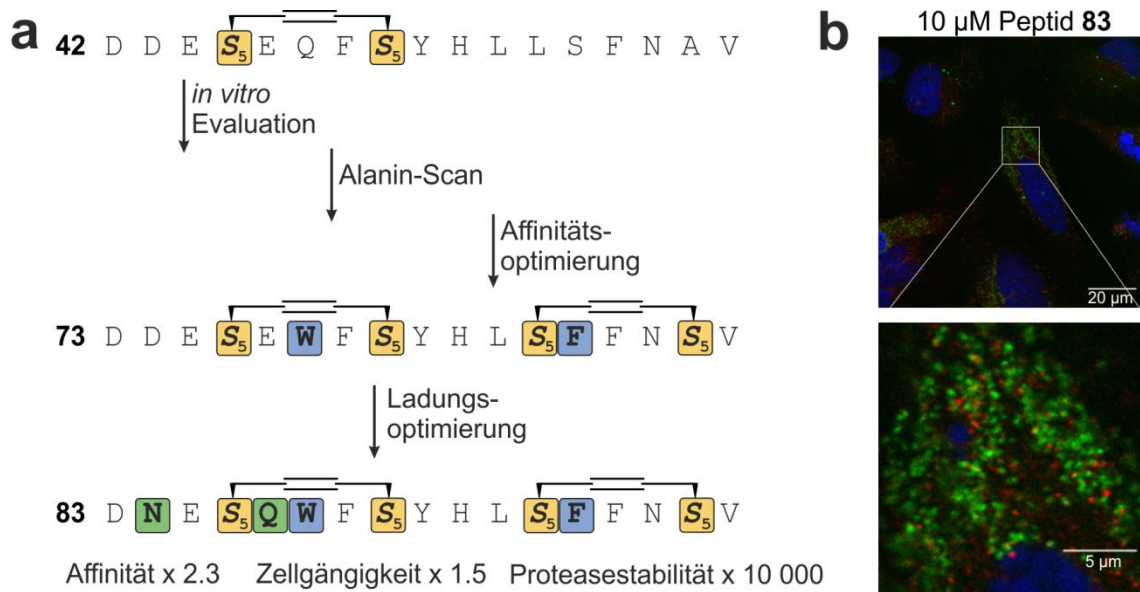


Abbildung 50. Systematische Optimierung des ersten Rab-Inhibitors Peptid **42**. (a) Das affinitätsoptimierte Peptid **73** wurde durch Ladungsoptimierung zu Peptid **83** weiterentwickelt, welches das Ausgangspeptid **42** in allen getesteten Eigenschaften übertrifft. (b) Konfokalmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Peptid **83**. Das Fluorescein-markierte Peptid (grün) und Rab8 (rot) sind farblich gekennzeichnet.

Weiterführende Untersuchungen von Peptid **42** zeigten jedoch, dass es nur in geringem Maße zellgängig ist und durch Proteinase K rapide abgebaut wird ($t_{1/2}[\mathbf{42}] = 18\text{s}$). Infolgedessen wurde versucht die biologische Verfügbarkeit von Peptid **42** zu erhöhen. Mit Hilfe eines Alanin-Scans wurde der Einfluss der einzelnen Seitenketten auf die Bindung des gesamten Peptids untersucht und eine Analyse der Proteaseschnittstellen offenbarte die Instabilität des C-Terminus. Durch den Einbau verschiedener α -methylierter Aminosäuren und unterschiedlicher Verbrückungsarchitekturen sowie einer Sequenzoptimierung konnte Peptid **73** als verbesserter Binder mit herausragender proteolytischer Stabilität identifiziert werden. Da Peptid **73** jedoch nur unzureichend zellgängig ist und eine negative Gesamtladung von -3.9 aufweist, wurde es in Bezug auf zelluläre Aufnahme optimiert. Dies führte zu Derivat **83**, das in Bezug auf Bindungsaffinität ($K_D[\mathbf{83}] = 12.7 \mu\text{M}$), Zellgängigkeit (1.5-fach) und proteolytische Stabilität ($t_{1/2}[\mathbf{83}] > 3000 \text{ min}$) das Ausgangspeptid **42** deutlich übertrifft (Abbildung 50a). Peptid **83** besitzt neben der ursprünglichen α -methylierten Kohlenwasserstoffverbrückung (Positionen 903 und 907) eine weitere Verbrückung (Positionen 911 und 915) und trägt zudem zwei Affinitätsmutationen (Q905W, S912F) sowie zwei Zellgängigkeitsmutationen (D901N und E904Q). Eine Analyse der zellulären Lokalisation von **83** zeigte zudem, dass es im gleichen Zellkompartiment in unmittelbarer Nähe von Rab8a zu finden ist (Abbildung 50b).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einsatz der Alkin-Ringschlussmetathese (RCAM) für die Synthese makrozyklischer Peptide untersucht. Die RCAM-Reaktion konnte für die Anwendung in der Festphasenpeptidsynthese optimiert werden und ist kompatibel mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren in ihrer geschützten Form (Abbildung 51a, b). Eine anschließende Überführung des Alkins in ein dibromiertes Olefin mit Hilfe von CuBr_2 ist für alle Peptidsequenzen möglich, die kein Cystein oder Methionin in ihrer

Sequenz tragen (Abbildung 51c). Der Einbau einer Alkin-Verbrückung in die biologisch aktive Sequenz von Peptid **42** lieferte Peptide (**108 – 110**) mit identischer Affinität zu Rab8a(GppNHp). Dibromierung der Dreifachbindung ergab dagegen Peptide (**111 – 113**) mit gesteigerter Affinität.

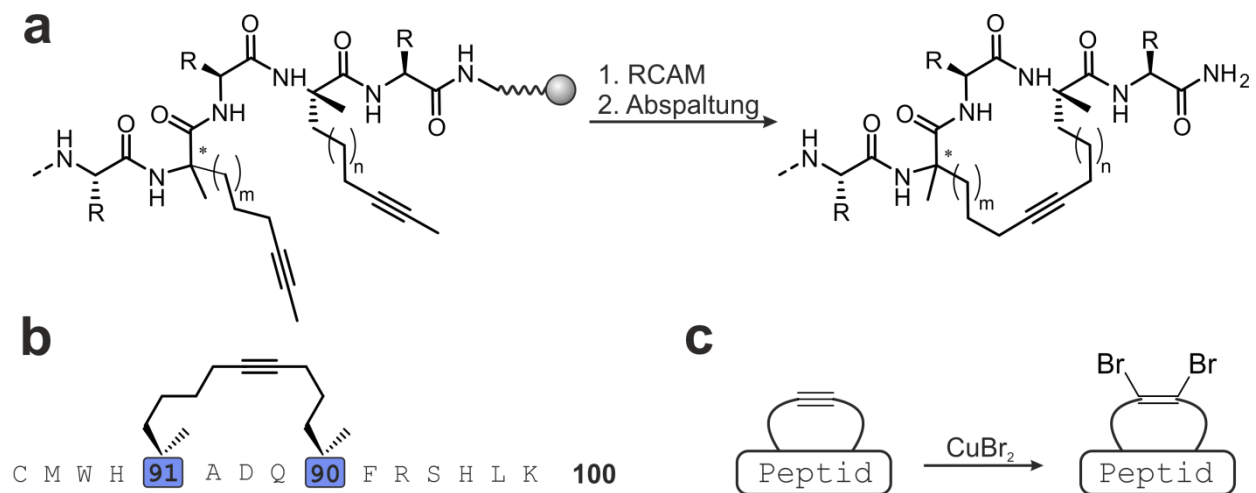


Abbildung 51. Alkin-makrozyklisierte Peptide mittels RCAM. (a) Schematische Darstellung der Synthese Alkin-makrozyklisierter Peptide mittels RCAM auf fester Phase. (b) Sequenz des Testpeptids **100**. (c) Schematische Darstellung der Dibromierung der Alkin-Makrozyklen.

Der Einbau eines Alkin-Makrozyklus in das Bindemotiv des 14-3-3 Binders *Exoenzym S* (**114**) führte zu Peptiden mit höherer Affinität und einem ähnlichen Bindungsmodus. Peptid **124** bindet 14-3-3 unter Ausbildung einer irregulären Sekundärstruktur (Abbildung 52a). Zwar erfolgte die Bindung mit leicht reduzierter Affinität im Vergleich zum optimierten Binder **116**, dennoch zeigte Peptid **124** eine höhere Affinität gegenüber dem nicht-modifizierten Ausgangspeptid **114** und war in der Lage, dieses in einem kompetitiven Bindungsexperiment aus der Bindetasche zu verdrängen (Abbildung 52b). Eine Kristallstrukturanalyse von **124** mit 14-3-3 bestätigte einen zum Ausgangspeptid analogen Bindemodus und die Ausbildung einer irregulären Sekundärstruktur (Abbildung 52c). Der Alkin-Makrozyklus interagiert dabei direkt mit der 14-3-3 Bindetasche und ermöglicht zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Zielprotein.

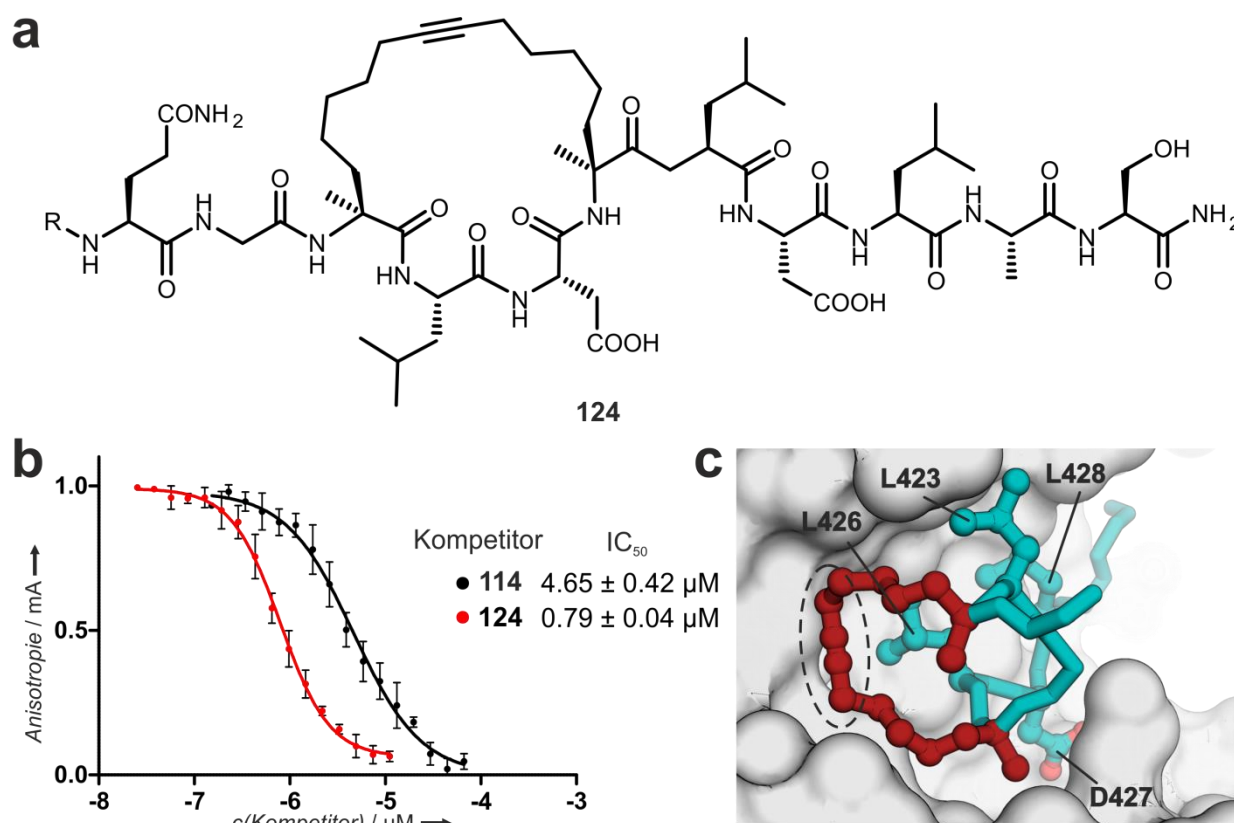


Abbildung 52. Alkin-Makrozyklus für die Bindung an 14-3-3. **(a)** Struktur des besten Alkin-verbrückten 14-3-3 Binders, **124**. R = Acetyl, Fluorescein-PEG **(b)** FP-Verdrängungsexperiment mit 14-3-3ζ und den acetylierten Peptiden **114** und **124**. **(c)** Kristallstruktur von **124** (türkis) im Komplex mit 14-3-3ζ. Die hydrophobe Verbrückung (rot), die Dreifachbindung und die interagierenden Aminosäuren sind explizit gezeigt.

Da die Olefin-Ringschlussmetathese (RCM) und die RCAM zwei orthogonale Reaktionen sind, wurde die Synthese von bizyklischen Peptiden mit einem Olefin- und einem Alkin-Makrozyklus untersucht (Abbildung 53a). Der jeweilige Ringschluss (RCM bzw. RCAM) verläuft dabei äußerst selektiv, ohne die jeweils andere Funktionalität zu beeinflussen. Die monozyklischen Intermediate lassen sich anschließend vollständig in das bizyklische Produkt überführen. Außerdem können beide Makrozyklen gleichzeitig in einer Eintopfreaktion geschlossen werden. Neben einer linearen Anordnung der beiden Makrozyklen (**128**) ist ebenfalls eine ineinandergreifende Architektur (**129**) zugänglich. Der Einbau eines Alkin-Makrozyklus zusätzlich zur Olefin-Verbrückung in Peptid **42** lieferte einen bizyklischen Rab8a Binder mit höherer Affinität (**134**, Abbildung 53b). Peptid **134** zeigte reversible Bindung an Rab8a(GppNHp) mit einer Affinität von $K_D[\mathbf{134}] = 6.6 \mu\text{M}$ (Abbildung 53c).

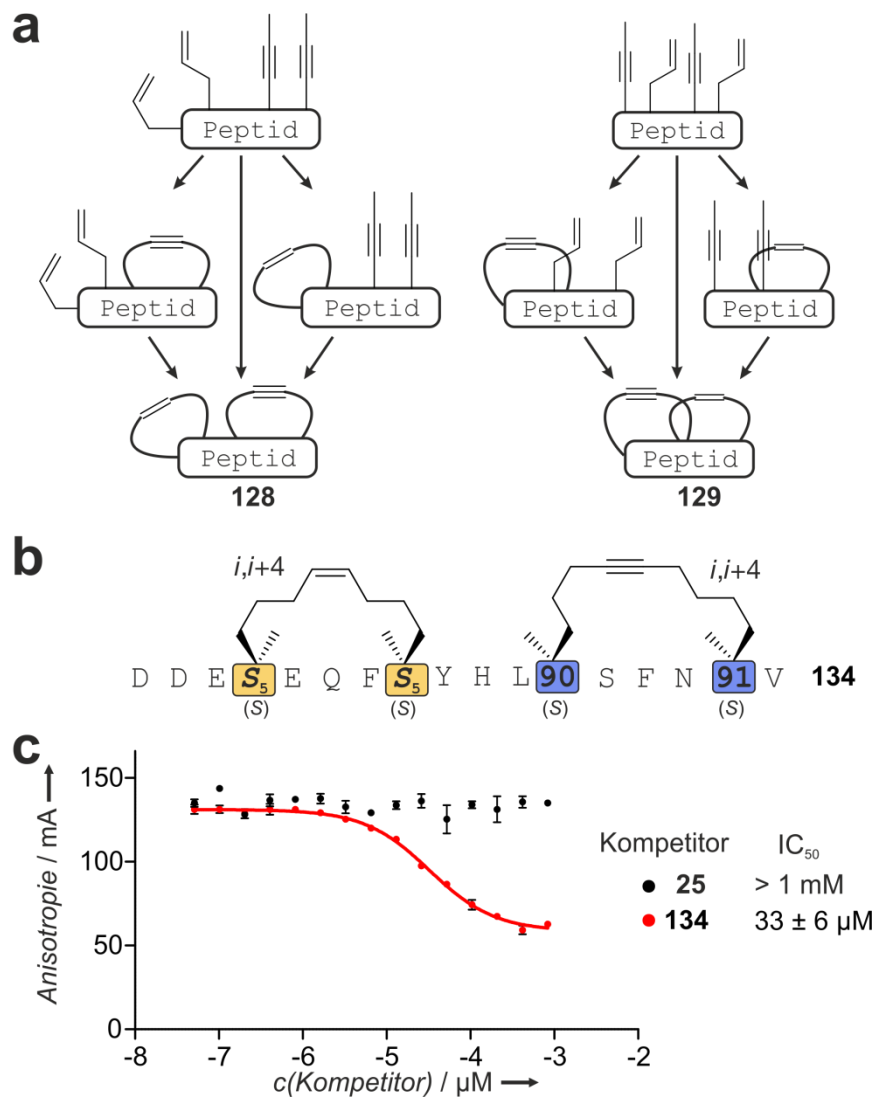


Abbildung 53. Synthese bityklischer Peptide mittels RCM und RCAM. (a) Schematische Darstellung der Synthese bityklischer Peptide mittels orthogonaler RCM und RCAM. Die bityklischen Peptide **128** und **129** lassen sich entweder schrittweise oder direkt aus den offenkettigen Peptiden herstellen. (b) Struktur des besten bityklischen Binders für Rab8a, Peptid **134**. (c) FP-Verdrängungsexperiment mit Rab8a und den acetylierten Peptiden **25** und **134**.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit Peptid-basierte Inhibitoren für UNC119 entwickelt. Ausgehend von der Kristallstruktur eines *N*-terminal myristoylierten Peptidfragments wurden myristoylierte, α -methylierte, kohlenwasserstoffverbrückte Peptide synthetisiert, die UNC119 mit niedriger nanomolarer Affinität binden ($K_D[\mathbf{142}] = 5.5 \text{ nM}$, Abbildung 54a). Die Bindung an UNC119 konnte mit Hilfe von isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt werden. Die Behandlung von HeLa- und L-Zellen mit **142** zeigte einen signifikanten Anstieg von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N (Abbildung 54b). Das entspricht Zellen, bei denen die Zellteilung nicht vollständig ablaufen kann und wurde bereits durch siRNA *knock-down* von UNC119 beobachtet. Die Aktivität des α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptids **142** entspricht der des in *knock-down* Experimenten beobachteten zellulären Effekts. Damit wird UNC119 zu einem potentiellen Zielprotein für die Entwicklung neuer Therapeutika.

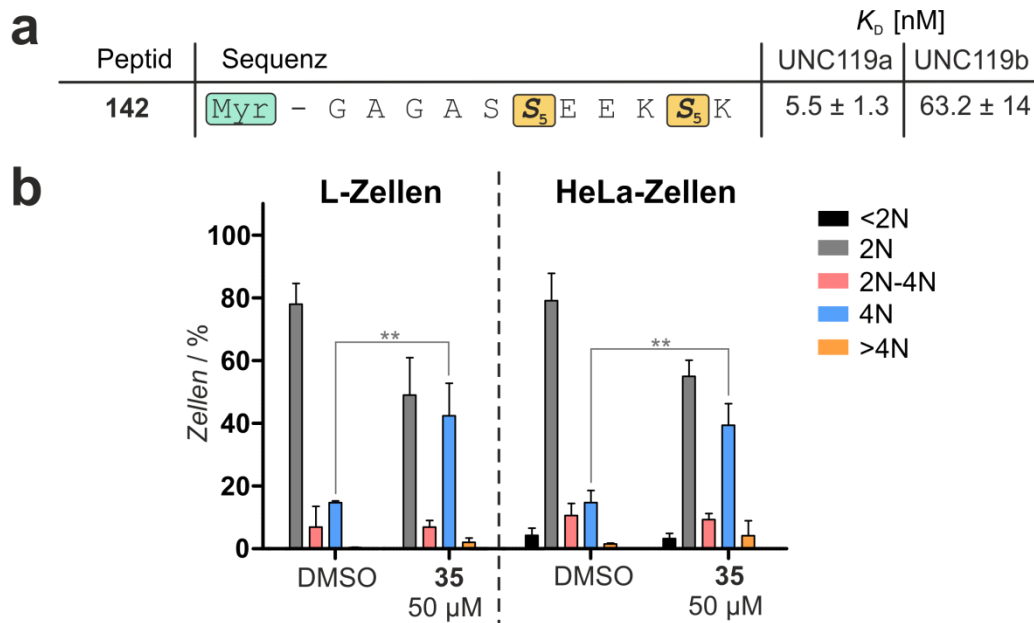


Abbildung 54. Peptid-basierter Inhibitor für UNC119. (a) Sequenz und Affinität des besten α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten UNC119 Inhibitors **142**. (b) Durchflusszytometrie-Messungen nach Inkubation mit **142**. ** $p < 0.01$ in Bezug auf DMSO. N = DNA-Gehalt

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse untermauern das Potential Peptid-basierter Sekundärstrukturmetika zur Adressierung anspruchsvoller Protein-Protein Interaktionen. Kleine GTPasen der Rab-Familie konnten erstmals direkt adressiert und ihre Interaktion mit einem Effektorprotein inhibiert werden. Das weckt die Hoffnung, dass die bisher als pharmakologisch unzugänglich (*undruggable*) klassifizierten kleinen GTPasen durch den Einsatz nicht traditioneller Adressierungsmethoden in Zukunft effektiv moduliert werden können. Die Entwicklung einer zusätzlichen Zyklisierungsmethode mittels Alkin-Ringschlussmetathese ermöglicht darüber hinaus den Zugang zu neuartigen Konformationen und Verbrückungsgeometrien, die auch in anderen Systemen Anwendung finden können. Durch den stetigen Fortschritt bezüglich des Verständnisses der biologischen Funktionen und Zusammenhänge potentieller Zielproteine sowie ihre strukturelle Aufklärung ergeben sich im Zusammenspiel mit solchen neuen Adressierungstechniken innovative Ansätze für die Entwicklung effektiver Therapeutika.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Geräte chemischer Synthesen

Die eingesetzten **Lösemittel** und **Reagenzien** wurden von *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Merck* oder *Sigma Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Zur Peptidsynthese wurde DMF und DCM der Firma *Biosolve* verwendet. Die kommerziell erhältlichen, **geschützten Aminosäuren** und **Kupplungsreagenzien** wurden von *Carl Roth GmbH*, *Iris Biochtech* oder *Novabiochem* bezogen. Die **α -methylierten Olefinbausteine** wurden von *Okeanos Tech. Co.* erworben.

Für die Festphasenpeptidsynthese wurde Rink-Amid **Harz** der Firmen *Novabiochem* (NovaSyn TGR-Harz bzw. Rink-Amid MBHA (mesh 100-200)) oder *Sigma Aldrich* (ChemMatrix (mesh 35-100)) verwendet.

Für die **Festphasenpeptidsynthesen** wurden Polypropylen-Spritzenreaktoren (2, 5, 10 und 20 mL) mit Polyethylen-Fritten der Firma *Multisyntech* verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie** wurden mit Kieselgel60 F₂₅₄ beschichtete Aluminium-DC-Folien der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder mittels Kaliumpermanganat-basierter Färbelösung (1.6 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 2.5 mL 5%-ige NaOH, 200 mL Wasser) und anschließendem Erhitzen.

Für die **säulenchromatographische Reinigungen** (*Flash*-Chromatographie) wurde Kieselgel der Firma *Acros Organics* (40 – 65 μ m, 230 – 400 mesh) als stationäre Phase eingesetzt. Die Trennung erfolgte bei einem Überdruck von 0.2 – 0.5 bar.

NMR-Spektren wurden an folgenden Spektrometern in deuterierten Lösemitteln aufgenommen: *Varian Mercury-VX 400*, *Bruker Avance DRX 400* oder *500*, *Varian Unity Inova 600*. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm (bezogen auf TMS) angegeben und auf das jeweilige Restsignal des Lösungsmittels kalibriert. Die Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale erfolgte, falls notwendig, mit Hilfe von 2D-Experimenten (gCOSY, gHSQC, gHMBC). Die durch Spin-Spin-Kopplungen auftretenden Multiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, b = breites Signal, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz Hz angegeben.

Olefin-Ringschlussmetathese erfolgte in Spritzenreaktoren auf einem VacMan-Manifold (*Promega*) im Argon Gegenstrom.

Für die **analytische Umkehrphasen-HPLC (analyt. HPLC)** wurde ein System der Firma *Agilent* der Serie 1100/LC/MSD VL mit einer *Nucleodur CC125/3 C18-Säule (Macherey Nagel)* verwendet. Die Trennung erfolgte unter Verwendung linearer Gradientenprofile von Laufmittel A (0.1% Trifluoressigsäure) und Laufmittel B (Acetonitril + 1% Trifluoressigsäure) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min über 30 min. Die UV-Detektion erfolgte bei 210 nm, 254 nm und 280 nm.

Analytische Umkehrphasen-HPLC-Massenspektren (analyt. HPLC-MS) wurden an einem System der Firma *Agilent* der Serie 1100 mit Säulen der Firma *Macherey & Nagel* (*Nucleodur CC 125/4 C18-Säule* und *CC 125/4 C4-Säule*) aufgenommen. Für die Massendetektion wurde ein Gerät der Firma *Thermo Fisher* (LCQ Advantage MAX) verwendet. Die Ionisierung der Proben erfolgte durch ESI (*electro spray ionisation*). Zusätzlich erfolgte die UV-Detektion bei 210 nm, 254 nm und 280 nm sowie eine Corona-Detektion. Es wurden lineare Gradientenprofile von Laufmittel A (0.1% Ameisensäure) und Laufmittel B (Acetonitril + 1% Ameisensäure) mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Reaktionskontrolle mittels **U-HPLC**-Messungen erfolgte an einem *Agilent 1290 Infinity LC-System (Agilent)* mit einer *Acquity UPLC BEH C18-Säule (Waters)*.

Für die Aufreinigung mittels **präparativer Umkehrphasen-HPLC (präp. HPLC)** wurde ein System der Firma *Agilent* der Serie 1100/LC/MSD VL mit einer *Nucleodur CC 125/10 C18-Säule* von *Macherey & Nagel* verwendet. Die Massendetektion mittels ESI erfolgte mit einem LCQ Advantage MAX (*Thermo Fisher*) bei paralleler UV-Detektion bei 210 nm, 254 nm und 280 nm. Die Trennung erfolgte unter Verwendung linearer Gradientenprofile von Laufmittel A (0.1% Trifluoressigsäure) und Laufmittel B (Acetonitril + 1% Trifluoressigsäure) bei unterschiedlichen Flussraten und über varrierende Zeiträume.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden an einem LTQ Orbitrap Spektrometer der Firma *Thermo Scientific*, das mit einem HPLC-System der Firma *Accela* gekoppelt ist mittels ESI aufgenommen. Zur Trennung wurde eine HPLC Säule *Hypersil GOLD* (50 mm, Innendurchmesser 1 mm, 1.9 µm Partikelgröße) mit einer Flussrate von 250 µL/min verwendet. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Ameisensäure (0.1%) und Acetonitril + 0.1% Ameisensäure eingesetzt.

Mikrowellen-unterstützte Peptidsynthese erfolgte an einem Synthesizer der Firma *CEM* (*Liberty-12 Channel Automated Peptide*). Der Mikrowellenreaktor des Typs *Discovery* wurde in Single-Mode Technik betrieben, wobei die Temperaturkontrolle durch einen faseroptischen Sensor erfolgte.

Die Aufnahme von **Circulardichroismus (CD)-Spektren** erfolgte an einem *Jasco J815 CD-Spektrometer* in einer Quarzküvette der Weglänge 0.1 cm bei 25 °C.

Die Konzentrationsbestimmung fluoreszenz-markierter Peptide wurde mittels **Absorptionsmessung** an einem Infinite M200 (*Tecan*) oder einem Nanodrop 2000c (*Thermo Scientific*) durchgeführt.

Fluoreszenzpolarisations (FP)-Spektren wurden an einem Safire² (*Tecan*) bei einer Anregung von $\lambda(\text{ex}) = 485 \text{ nm}$ und einer Absorption von $\lambda(\text{ab}) = 525 \text{ nm}$ gemessen.

Microscale Thermophorese (MST) Messungen wurden mit einem Monolith NT.115 (*NanoTemper Technologies*) durchgeführt.

Reaktionen unter Verwendung von hydrolyse- oder oxidationsempfindliche Reagenzien wurden unter Argonatmosphäre in ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt. Für die Reaktionen wurden kommerziell erhältliche wasserfreie Lösungsmittel der Firmen *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Fluka* oder *Sigma-Aldrich* ohne weitere Reinigung verwendet. DCM wurde über CaH_2 getrocknet und vor Gebrauch destilliert.

7.2 Materialien und Geräte biologischer Experimente

7.2.1 Laborgeräte

pH-Meter	<i>Schott, CG840</i>
Pipetten	<i>Eppendorf</i>
Reinstwassersystem	<i>Millipore, Milli-Q Advantage A-10</i>
Vortexer	<i>Carl Roth, Vortex Genie 1</i>
Zentrifugen	<i>Eppendorf, Minispin Centrifuge</i> <i>Eppendorf, 5415R</i>
Plattenleser	<i>Tecan, Safire 2</i>
CD-Spektrometer	<i>Jasco GmbH, J-815</i>
ITC	<i>Malvern, MicroCal iTC200</i>
Gelelektrophorese System	<i>BioRad, Miniprotean 3</i>
Fluoreszenz-Imaging System	<i>LI-COR Biosciences, Odyssey</i>
Durchflusszytometer	<i>BD Biosciences, LSRII</i>
Blot Transferkammer	<i>BioRad, Trans-Blot</i>

7.2.2 Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2.0 mL)	<i>Eppendorf</i>
Reaktionsgefäße (15, 50 mL)	<i>Sarstedt</i>
Entsalzungssäule PD-10	<i>GE Healthcare</i>
Entsalzungssäule NAP-5	<i>GE Healthcare</i>
Zentrifugen Filtereinheiten (0.5 und 15 mL)	<i>Merck Millipore, Amicon Ultra</i>
Coomassie Brilliant Blau G-250	<i>Serva</i>
Alkalische Phosphatase	<i>Roche</i>
GDP, GppNHp	<i>Sigma</i>
NHS-Fluorescein	<i>Sigma</i>
Streptavidin Magnetic Beads (Dynabeads® Magnetic Beads M280)	<i>Invitrogen</i>
Bradford-Reagenz	<i>BioRad</i>
NP40	<i>Sigma</i>
Protease Inhibitor Cocktail	<i>Sigma</i>
Küvetten	<i>Sarstedt</i>
PVDF-Transfermembran	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

Whatmann 3MM Papier	<i>Schleicher & Schüll</i>
384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding)	<i>Greiner</i>

7.2.3 Antikörper

Anti-Rab8	<i>Cell signaling</i> (Rab8(D22D8) XP™ Rabbit mAb; #6975)
Anti-Rabbit	<i>Thermo Fisher</i> (Alexa 594 conjugate, A-21207)
Anti-Kaninchen IgG	<i>Thermo Scientific</i> ((H+L) HRP-Konjugat)

7.2.4 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 11 mM Na ₂ HPO ₄ 1.8 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7.4
TBS	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH = 7.4
TBST	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.01% tween (v/v) pH = 7.4
FP-Messpuffer (GDP/GppNHp)	25 mM Hepes 150µM NaCl 1mM MgCl ₂ 1mM TCEP 1µM GDP/GppNHp 0.01% tween (v/v) pH = 7.5
FP-Messpuffer (nukleotidfrei)	20 mM Hepes 50 mM NaCl

	1 mM TCEP
	0.01% tween(v/v)
	pH = 7.5
Dialysepuffer	30 mM Tris
	100 mM NaCl
	1 mM TCEP
	pH = 7.5
5× SDS-PAGE Probenpuffer	250 mM Tris-Hcl pH = 6.8
	50% Glycerin (v/v)
	350 mM SDS
	360 µM Bromphenol Blau
	250 mM DTT
SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Glycin
	250 mM Tris
	35 mM SDS
Coomassie-Lösung	0.25% Coomassie Brilliant Blau G-250 (w/v)
	45% Methanol
	10% Essigsäure (v/v)
Entfärber-Lösung	30% Methanol (v/v)
	10% Essigsäure (v/v)
Transferpuffer	25 MM Tris-HCl
	0.2 M Glycin
	MeOH/H ₂ O, 1/4, v/v
Lysepuffer	150 mM NaCl
	20 mM Tris pH 7.6
	0.5% NP40 Alternative
	Protease Inhibitor Cocktail

7.3 Synthese unnatürlicher Aminosäuren

7.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: DHP-Schätzung von Alkinolen

Zu einer Lösung des terminalen Alkinols (1.0 Äq) in CH_2Cl_2 (2 mL/mmol) wurde bei 0 °C Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS, 0.15 Äq) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde 3,4-Dihydro-2H-pyran (1.3 Äq) zugetropft und für 30 min bei 0 °C gerührt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung für 16 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung (2 mL/mmol) wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert (3×40 mL), die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (Petrolether/ Et_2O 9:1) lieferte das DHP-geschützte Alkinol.

AAV 2: Methylierung von DHP-geschützten Alkinolen

In einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Argon wurde eine Lösung des DHP-geschützten Alkinols (1.0 Äq) in trockenem THF (3 mL/mmol) auf -78° abgekühlt und unter Rühren portionsweise mit *n*-BuLi (1.2 Äq) versetzt. Nach 10 min wurde *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA, 1.1 Äq) zugetropft und die Reaktionsmischung auf 0 °C erwärmt. Anschließend wurde CH_3I (1.2 Äq) portionsweise zugegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt bevor die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 14 h gerührt wurde. Nach der Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert (3×40 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (Petrolether/Ethylacetat 50:1) lieferte das methylierte Produkt.

AAV 3: DHP-Entschätzung des methylierten Alkinols

Zu einer Lösung des DHP-geschützten, methylierten Alkinols (1.0 Äq) in MeOH (4 mL/mmol) wurde *p*-Toluolsulfonsäure (PTS, 0.1 Äq) zugegeben und für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ 9:1) aufgereinigt.

AAV 4: Iodierung von Alkinolen

Zu einer Suspension aus Triphenylphosphan (1.2 Äq), Imidazol (1.2 Äq) und Iod (1.5 Äq) in trockenem THF (4 mL/mmol) wurde das Alkinol (1.0 Äq) langsam bei Raumtemperatur zugetropft. Die Reaktion wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt, der weiße Niederschlag abfiltriert und mit THF gewaschen. Die organische Phase wurde unter vermindertem Druck eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/ Et_2O 10:1).

AAV 5: Alkylierung von Ala-Ni(II)-BPB Komplexen

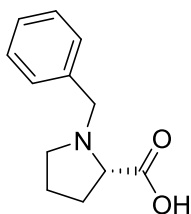
In einem ausgeheizten Schlenkcolben unter Argon wurde eine Lösung des Ala-Ni(II)-BPB Komplexes (1.0 Äq) in trockenem DMF (5 mL/mmol) auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde mit frisch gemahlenem KOH (10 Äq) versetzt und für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Alkylierungsmittel (1.1 Äq) in DMF (1 mL/mmol) zugegeben und für 20 min bei 0 °C gerührt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung für 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 100 mL kalte Essigsäure (5% v/v) gegossen und mit CH₂Cl₂ (100 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 60 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Koevaporation mit Toluol (3 × 40 mL) wurde das Produkt säulenchromatographisch (1% MeOH in CH₂Cl₂) gereinigt.

AAV 6: Zersetzung von alkylierten Ala-Ni(II)-BPB Komplexen und Fmoc-Schützung

Zu einer Lösung des alkylierten Ala-Ni(II)-BPB Komplexes (1.0 Äq) in MeOH (4 mL/mmol) wurde konzentrierte HCl (10 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung für 1 h refluxiert. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (1 mL/mmol) aufgenommen und mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene BPB (**35/150**) wurde ohne weitere Reinigung wiederverwendet. Die wässrige Phase wurde mit Na₂CO₃ neutralisiert und Dioxan zugegeben um eine Mischung aus Dioxan/Wasser (1:1 v/v) zu erhalten. Anschließend wurde Na₂CO₃ (3 Äq) und Fmoc-OSu (1.3 Äq) zugegeben und für 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 d und 5 d wurde erneut Fmoc-OSu (0.5 Äq) zugegeben (Reaktionskontrolle mittels **U-HPLC**). Anschließend wurde Wasser (100 mL) hinzugefügt, mit konzentrierter HCl angesäuert und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Petrolether/Ethylacetat 5:1 + 0.1% Essigsäure) wurde die geschützte Aminosäure erhalten.

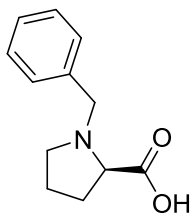
7.3.2 Synthese der Verbindungen

Synthese von L-N-Benzylprolin (34)



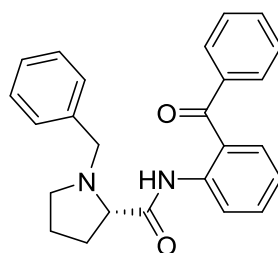
Zu einer Lösung aus L -Prolin (20.0 g, 174 mmol) und KOH (37.0 g, 660 mmol, 3.8 Äq) in 250 mL *iso*-Propanol wurde Benzylbromid (30.9 mL, 261 mmol, 1.5 Äq) über 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h bei 40 °C gerührt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit konzentrierter HCl neutralisiert (pH 5). Anschließend wurden 150 mL CHCl₃ zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit 3 × 50 mL CHCl₃ gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck eingeeengt und das Produkt in kaltem Aceton ausgefällt. Das Produkt (30.5 g, 149 mmol, 86%) wurde als weißer Feststoff abfiltriert und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.5 – 7.3 (m, 5H), 4.3 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.9 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.5 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.2 – 3.1 (m, 1H), 2.8 (dd, J = 17.7, 8.6 Hz, 1H), 2.2 (dq, J = 13.0, 8.6 Hz, 1H), 2.0 – 1.8 (m, 2H), 1.8 – 1.6 (m, 1H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.4, 135.5, 130.3, 129.1, 128.8, 66.6, 57.9, 53.8, 29.1, 23.3. **HRMS**: berechnet für C₁₂H₁₅NO₂: 206.11756 [M+H]⁺; gefunden 206.11767 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.13 min.

Synthese von D-N-Benzylprolin (149)

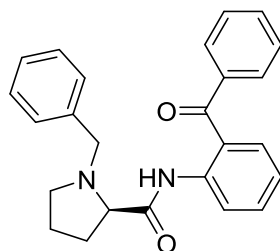
Zu einer Lösung aus D-Prolin (20.0 g, 174 mmol) und KOH (37.0 g, 660 mmol, 3.8 Äq) in 250 mL *iso*-Propanol wurde Benzylbromid (30.9 mL, 261 mmol, 1.5 Äq) über 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h bei 40 °C gerührt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit konzentrierter HCl neutralisiert (pH 5). Anschließend wurden 150 mL CHCl₃ zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit 3 × 50 mL CHCl₃ gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck eingengt und das Produkt in kaltem Aceton ausgefällt. Das Produkt (31.5 g, 154 mmol, 88%) wurde als weißer Feststoff abfiltriert und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.36 – 7.32 (m, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 4.09 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.35 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 3.13 – 3.03 (m, 1H), 2.61 (dd, J = 17.3, 8.7 Hz, 1H), 2.17 – 2.04 (m, 1H), 1.94 – 1.83 (m, 1H), 1.83 – 1.74 (m, 1H), 1.74 – 1.63 (m, 1H).
¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 172.3, 136.1, 129.3, 128.3, 127.7, 65.9, 57.2, 52.8, 28.5, 22.8.
HRMS: berechnet für C₁₂H₁₅NO₂: 206.11756 [M+H]⁺; gefunden 206.11783 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.22 min.

Synthese von (S)-[N-(N'-Benzylpropyl)amino]benzophenonhydrochlorid (35)

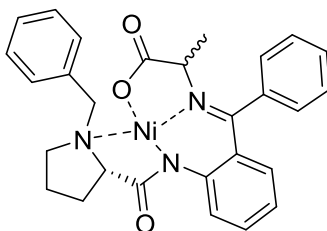
Eine Suspension aus **34** (10.0 g, 48.7 mmol) und *N*-Methylimidazol (11.65 mL, 146 mmol, 3.0 Äq) in 100 mL CH₂Cl₂ wurde portionsweise mit Mesylchlorid (4.5 mL, 58.5 mmol, 1.2 Äq) bei 0 °C versetzt. Anschließend wurde 2-Aminobenzophenon (8.5 g, 43.9 mmol, 0.9 Äq) in 30 mL CH₂Cl₂ zugetropft und die Reaktionsmischung für 20 h refluxiert. Nach der Zugabe von gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung (150 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 40 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in 400 mL Aceton gelöst und das Produkt als Hydrochlorid durch portionsweise Zugabe von konzentrierter HCl (8.9 mL, 97,4 mmol, 2 Äq) ausgefällt, abfiltriert und mit 5% HCl in Aceton gewaschen. Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff erhalten, im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet (12.3 g, 32 mmol, 66%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.0 (s, 1H), 8.3 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.8 – 7.7 (m, 2H), 7.7 – 7.6 (m, 1H), 7.6 – 7.5 (m, 3H), 7.5 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.4 – 7.3 (m, 2H), 7.2 – 7.1 (m, 1H), 7.1 – 7.0 (m, 3H), 3.7 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3.5 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3.2 (dd, J = 9.9, 4.3 Hz, 1H), 3.0 (m, 1H), 2.3 (m, 1H), 2.2 – 2.1 (m, 1H), 1.8 – 1.5 (m, 3H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 196.8, 173.2, 138.2, 137.9, 137.6, 132.9, 132.8, 131.6, 129.8, 128.9, 128.5, 127.9, 126.9, 126.2, 122.8, 121.1, 67.3, 58.9, 53.4, 30.1, 23.6. **HRMS**: berechnet für C₂₅H₂₄N₂O₂: 385.19105 [M+H]⁺; gefunden 385.19245 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.16 min.

Synthese von (*R*)-[*N*-(*N*'- Benzylpropyl)amino]benzophenonhydrochlorid (150**)**

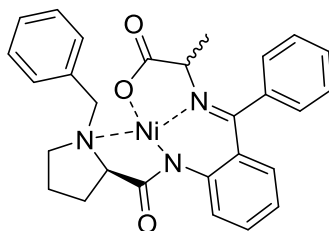
Eine Suspension aus **149** (10.0 g, 48.7 mmol) und *N*-Methylimidazol (11.65 mL, 146 mmol, 3.0 Äq) in 100 mL CH₂Cl₂ wurde portionsweise mit Mesylchlorid (4.5 mL, 58.5 mmol, 1.2 Äq) bei 0 °C versetzt. Anschließend wurde 2-Aminobenzophenon (8.5 g, 43.9 mmol, 0.9 Äq) in 30 mL CH₂Cl₂ zugetropft und die Reaktionsmischung für 20 h refluxiert. Nach der Zugabe von gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung (150 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert (3 × 40 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in 400 mL Aceton gelöst und das Produkt als Hydrochlorid durch portionsweise Zugabe von konzentrierter HCl (8.9 mL, 97,4 mmol, 2 Äq) ausgefällt, abfiltriert und mit 5% HCl in Aceton gewaschen. Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff erhalten, im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet (10.0 g, 26 mmol, 54%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 11.1 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.71 – 7.66 (m, 2H), 7.65 – 7.57 (m, 2H), 7.54 – 7.48 (m, 2H), 7.45 – 7.40 (m, 2H), 7.40 – 7.33 (m, 4H), 7.29 – 7.17 (m, 1H), 4.35 – 4.11 (m, 3H), 3.41 (s, 1H), 3.29 – 3.14 (m, 1H), 2.27 – 2.12 (m, 1H), 2.02 – 1.88 (m, 1H), 1.72 – 1.53 (m, 1H), 1.39 – 1.16 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 194.3, 165.7, 136.6, 134.0, 133.0, 132.2, 131.5, 131.0, 129.6, 129.5, 129.4, 128.6, 128.4, 128.2, 125.6, 124.4, 65.7, 56.7, 54.1, 27.9, 22.2. HRMS: berechnet für C₂₅H₂₄N₂O₂: 385.19105 [M+H]⁺; gefunden 385.19297 [M+H]⁺. HPLC: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.28 min.

Synthese von Ala-Ni(II)-(S)-BPB (36)

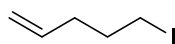
Eine Lösung aus **35** (8.8 g, 22.8 mmol), D/L-Alanin (4.1 g, 45.6 mmol, 2 Äq) und Nickel(II)-nitrat Hexahydrat (12.2 g, 42.0 mmol, 1.8 Äq) in 300 mL MeOH wurde auf 60 °C erhitzt und für 10 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus KOH (9.0 g, 159.7 mmol, 7 Äq) in 200 mL MeOH portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Essigsäure (9.1 mL, 159.7 mmol, 7 Äq) zugegeben und das Produkt durch Zugabe von 500 mL Wasser ausgefällt. Das Produkt wurde als roter Feststoff (10.9 g, 21.1 mmol, 93%) abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.4 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.0 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.6 – 7.5 (m, 4H), 7.4 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.2 – 7.1 (m, 2H), 7.1 – 7.0 (m, 1H), 6.7 – 6.6 (m, 1H), 6.5 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 4.1 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.7 – 3.4 (m, 4H), 3.4 – 3.3 (m, 1H), 2.5 – 2.4 (m, 2H), 2.3 – 2.1 (m, 2H), 1.4 (d, J = 7.0 Hz, 3H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.9, 179.0, 142.9, 135.5, 134.2, 133.2, 132.1, 131.9, 130.2, 129.6, 129.5, 129.2, 129.0, 128.3, 128.0, 126.4, 124.0, 120.7, 70.3, 66.6, 63.2, 58.2, 31.1, 24.4, 22.0. Rf: 0.32 (EtOAc/Pentan, 1/5, v/v). **HRMS**: berechnet für C₂₈H₂₇N₃NiO₃: 512.14787 [M+H]⁺; gefunden 512.14789 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 7.93 min.

Synthese von Ala-Ni(II)-(R)-BPB (89)

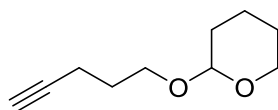
Eine Lösung aus **150** (10.0 g, 26.0 mmol), D/L-Alanin (4.6 g, 52.0 mmol, 2 Äq) und Nickel(II)-nitrat Hexahydrat (13.9 g, 47.8 mmol, 1.8 Äq) in 300 mL MeOH wurde auf 60 °C erhitzt und für 10 min gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus KOH (10.2 g, 182.1 mmol, 7 Äq) in 200 mL MeOH portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Essigsäure (10.4 mL, 182.1 mmol, 7 Äq) zugegeben und das Produkt durch Zugabe von 500 mL Wasser ausgefällt. Das Produkt wurde als roter Feststoff (11.5 g, 22.3 mmol, 86%) abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.35 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.96 (dd, J = 8.7, 0.8 Hz, 1H), 7.63 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 7.37 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.19 – 7.12 (m, 2H), 7.11 – 7.03 (m, 1H), 6.69 – 6.63 (m, 1H), 6.52 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.64 – 3.45 (m, 4H), 3.38 – 3.32 (m, 1H), 2.49 – 2.37 (m, 2H), 2.25 – 2.12 (m, 2H), 1.44 (d, J = 7.1 Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.2, 178.3, 169.4, 142.2, 134.7, 133.4, 132.5, 131.4, 131.1, 129.5, 128.8, 128.8, 128.5, 128.3, 127.6, 127.3, 125.7, 123.3, 120.0, 69.6, 65.9, 62.5, 57.5, 30.4, 23.7, 21.3. Rf: 0.32 (EtOAc/Pentan, 1/5, v/v). **HRMS**: berechnet für C₂₈H₂₇N₃NiO₃: 512.14787 [M+H]⁺; gefunden 512.14976 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 8.12 min.

Synthese von 5-Iod-1-penten (37)

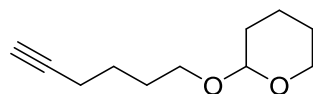
Zu einer Lösung aus NaI (4.0 g, 26.8 mmol, 2 Äq) in trockenem Aceton (25 mL) wurde 5-Brom-1-penten (2.0 g, 13.6 mmol, 1 Äq) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h refluxiert. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Präzipitat abfiltriert und die Lösung mit *iso*-Hexan (50 mL) und Wasser (50 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit *iso*-Hexan extrahiert (3 × 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt (2.5 g, 12.8 mmol, 96%) wurde als leicht pinkes Öl erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.8 (ddt, J = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.1 – 5.0 (m, 2H), 3.2 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.3 – 2.1 (m, 2H), 2.0 – 1.8 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 136.7, 116.1, 34.4, 32.6, 6.4. HRMS: berechnet für C₅H₉I: 195.97434 [M]⁺; gefunden 195.97497 [M]⁺.

Synthese von 2-(Pent-4-inyloxy)tetrahydro-2H-pyran (96a)

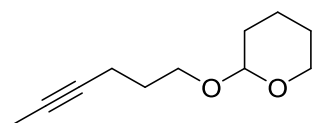
Das Alkinol 4-Pentin-1-ol (3.2 mL, 33.4 mmol) wurde gemäß AAV 1 zu dem DHP-geschützten Alkinol **96a** (5.5 g, 33.1 mmol, 99%) umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.60 – 4.53 (m, 1H), 3.87 – 3.75 (m, 2H), 3.51 – 3.41 (m, 2H), 2.36 – 2.22 (m, 2H), 1.92 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.83 – 1.73 (m, 3H), 1.72 – 1.63 (m, 1H), 1.60 – 1.44 (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 98.9, 84.0, 68.5, 65.9, 62.3, 30.8, 28.8, 25.6, 19.6, 15.4. HRMS: berechnet für C₁₀H₁₆O₂: 169.12231 [M+H]⁺; gefunden 169.12231 [M+H]⁺.

Synthese von 2-(Hex-5-inyloxy)tetrahydro-2-*H*-pyran (96b)

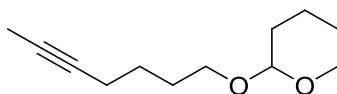
Das Alkinol 5-Hexin-1-ol (2.5 mL, 22.7 mmol) wurde gemäß **AAV 1** zu dem DHP-geschützten Alkinol **96b** (4.1 g, 22.5 mmol, 99%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.61 – 4.54 (m, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 1H), 3.79 – 3.71 (m, 1H), 3.53 – 3.46 (m, 1H), 3.45 – 3.35 (m, 1H), 2.26 – 2.18 (m, 2H), 1.98 – 1.91 (m, 1H), 1.87 – 1.77 (m, 1H), 1.74 – 1.47 (m, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 99.0, 84.5, 68.5, 67.1, 62.4, 30.9, 29.0, 25.6, 25.5, 19.8, 18.4. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 183.13796 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 183.13788 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese von 2-(Hex-4-inyloxy)tetrahydro-2-*H*-pyran (151)

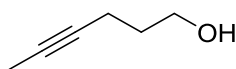
Das DHP-geschützte Alkinol **96a** (5.8 g, 34.6 mmol) wurde gemäß **AAV 2** zu dem methylierten, DHP-geschützten Alkinol **151** (4.9 g, 27.1 mmol, 78%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.63 – 4.55 (m, 1H), 3.90 – 3.74 (m, 2H), 3.55 – 3.42 (m, 2H), 2.27 – 2.19 (m, 2H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.77 (t, $J = 2.6$ Hz, 3H), 1.75 – 1.67 (m, 2H), 1.60 – 1.49 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 98.9, 78.7, 75.8, 66.3, 62.3, 30.8, 29.4, 25.7, 19.7, 15.8, 3.6. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 183.13796 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 183.13787 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese von 2-(Hept-5-inyloxy)tetrahydro2-*H*-pyran (152)

Das DHP-geschützte Alkinol **96b** (2.5 g, 13.7 mmol) wurde gemäß **AAV 2** zu dem methylierten, DHP-geschützten Alkinol **152** (2.3 g, 11.9 mmol, 87%) umgesetzt.

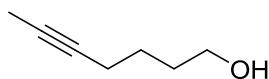
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.60 – 4.55 (m, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 1H), 3.74 (dt, J = 9.7, 6.6 Hz, 1H), 3.54 – 3.45 (m, 1H), 3.40 (dt, J = 9.7, 6.4 Hz, 1H), 2.20 – 2.12 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 1H), 1.78 – 1.75 (m, 3H), 1.72 – 1.65 (m, 3H), 1.60 – 1.50 (m, 6H). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 99.0, 79.2, 75.8, 67.2, 62.4, 30.9, 29.1, 26.0, 25.7, 19.8, 18.7, 3.6. **HRMS**: berechnet für C₁₂H₂₀O₂: 197.15361 [M+H]⁺; gefunden 167.15352 [M+H]⁺.

Synthese von 4-Hexin-1ol (97a)

Das DHP-geschützte Alkinol **151** (0.5 g, 2.6 mmol) wurde gemäß **AAV 3** zu dem methylierten Alkinol **97a** (0.2 g, 2.2 mmol, 85%) umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.77 – 3.71 (m, 2H), 2.28 – 2.20 (m, 2H), 1.77 (t, J = 2.6 Hz, 3H), 1.75 – 1.68 (m, 2H). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 78.6, 76.4, 62.2, 31.6, 15.5, 3.6. **HRMS**: berechnet für C₆H₁₀O: 99.08044 [M+H]⁺; gefunden 99.07993 [M+H]⁺.

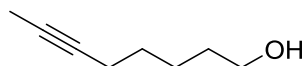
Synthese von 5-Heptin-1ol (97b)



Das DHP-geschützte Alkinol **152** (2.1 g, 10.7 mmol) wurde gemäß **AAV 3** zu dem methylierten Alkinol **97b** (1.1 g, 9.1 mmol, 85%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.67 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.20 – 2.13 (m, 2H), 1.79 – 1.75 (m, 3H), 1.68 – 1.65 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 79.0, 76.0, 62.7, 32.0, 25.4, 18.6, 3.6. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}$: 113.09609 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 113.09557 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

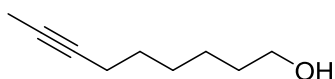
Synthese von 6-Octin-1ol (97c)



Die Synthese von **97c** wurde von M.Sc. Sebastian Schaubach durchgeführt und erfolgte nach etablierten Protokollen.³²²

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.65 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.18 – 2.10 (m, 2H), 1.77 (t, $J = 2.6$ Hz, 3H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.53 – 1.49 (m, 2H), 1.48 – 1.40 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 79.2, 75.7, 63.0, 32.5, 29.0, 25.2, 18.9, 3.6. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$: 127.11174 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 127.11141 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthese von 7-Nonin-1ol (97d)

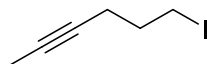


Die Synthese von **97d** wurde von M.Sc. Sebastian Schaubach durchgeführt und erfolgte nach etablierten Protokollen.³²²

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 2H), 1.77 (s, $J = 10.4$ Hz, 3H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.48 (dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 2H), 1.43 – 1.37 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 79.4, 75.6, 63.1, 32.8, 29.1, 28.8, 25.4, 18.8, 3.6. **HRMS**: berechnet für $C_9H_{16}O$: 141.12739 $[M+H]^+$; gefunden 141.12745 $[M+H]^+$.

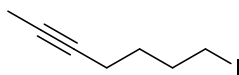
Synthese von 6-Iodhex-2-in (98a)



Das Alkinol **97a** (0.8 g, 8.4 mmol) wurde gemäß **AAV 4** zu dem Iodalkin **98a** (1.5 g, 7.2 mmol, 86%) umgesetzt.

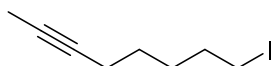
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 3.34 – 3.26 (m, 2H), 2.31 – 2.22 (m, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 2H), 1.79 – 1.75 (m, 3H). **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 77.1, 76.9, 32.7, 19.9, 5.8, 3.6. **HRMS**: berechnet für C_6H_9I : 207.97434 $[M]^+$; gefunden 207.97535 $[M]^+$.

Synthese von 7-Iodhept-2-in (98b)



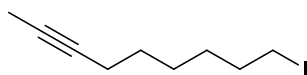
Das Alkinol **97b** (1.1 g, 9.1 mmol) wurde gemäß **AAV 4** zu dem Iodalkin **98b** (1.8 g, 8.0 mmol, 88%) umgesetzt.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 3.24 – 3.16 (m, 2H), 2.19 – 2.12 (m, 2H), 1.97 – 1.88 (m, 2H), 1.79 – 1.75 (m, 3H), 1.62 – 1.52 (m, 2H). **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 78.5, 76.3, 32.7, 29.7, 17.7, 6.5, 3.6. **HRMS**: berechnet für $C_7H_{11}I$: 221.98999 $[M]^+$; gefunden 221.98989 $[M]^+$.

Synthese von 8-Iodoct-2-in (98c)

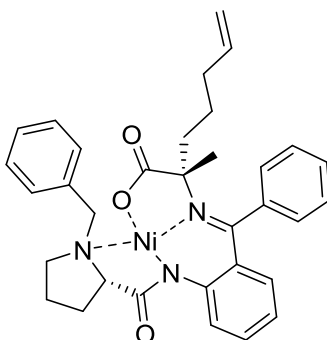
Das Alkinol **97c** (0.5 g, 4.0 mmol) wurde gemäß **AAV 4** zu dem Iodalkin **98c** (0.9 g, 3.7 mmol, 93%) umgesetzt.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.19 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.16 – 2.11 (m, 2H), 1.87 – 1.81 (m, 2H), 1.78 (t, J = 2.6 Hz, 3H), 1.52 – 1.45 (m, 4H). **¹³C NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 78.9, 75.9, 33.3, 29.9, 28.1, 18.7, 6.9, 3.6. **HRMS**: berechnet für C₈H₁₃I: 236.00565 [M]⁺; gefunden 236.00531 [M]⁺.

Synthese von 9-Iodnon-2-in (98d)

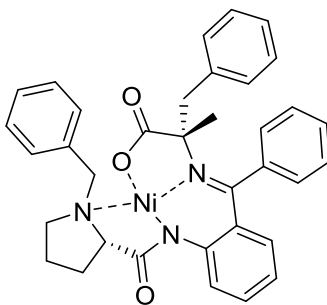
Das Alkinol **97d** (1.0 g, 7.1 mmol) wurde gemäß **AAV 4** zu dem Iodalkin **98d** (1.8 g, 7.0 mmol, 98%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.16 – 2.08 (m, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.77 (t, J = 2.5 Hz, 3H), 1.51 – 1.44 (m, 2H), 1.43 – 1.36 (m, 4H). **¹³C NMR** (126.1 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 79.2, 75.7, 33.6, 30.2, 28.9, 27.9, 18.8, 7.2, 3.6. **HRMS**: berechnet für C₉H₁₅I: 250.12 [M]⁺; gefunden 250.00 [M]⁺.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2-methylhept-6-enoat (38)

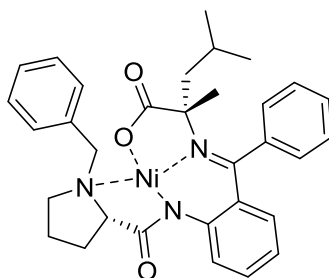
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (2.0 g, 3.9 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Ioldalken **37** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **38** (2.2 g, 3.7 mmol, 95%) umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.36 – 8.29 (m, 2H), 7.87 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 3H), 7.48 – 7.37 (m, 3H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 7.15 – 7.05 (m, 2H), 6.67 – 6.60 (m, 1H), 6.57 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 5.89 (ddt, J = 17.0, 10.3, 6.7 Hz, 1H), 5.13 – 4.96 (m, 2H), 4.07 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.51 (dd, J = 10.0, 6.6 Hz, 1H), 3.40 – 3.34 (m, 1H), 3.10 – 2.94 (m, 1H), 2.47 – 2.35 (m, 3H), 2.18 – 2.00 (m, 4H), 1.97 – 1.83 (m, 1H), 1.59 – 1.42 (m, 2H), 1.04 (s, 3H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO): δ [ppm] = 181.2, 180.7, 172.4, 169.2, 142.4, 138.9, 137.0, 135.4, 133.5, 132.2, 131.5, 131.2, 130.0, 129.2, 129.2, 128.6, 128.5, 127.9, 127.6, 124.2, 120.7, 115.9, 77.4, 70.3, 63.6, 57.7, 33.9, 30.9, 29.6, 25.3, 23.5. **HRMS**: berechnet für $C_{33}H_{35}N_3NiO_3$: 580.21047 $[M+H]^+$; gefunden 580.21190 $[M+H]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.33 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2-methyl-3-phenylpropanoat (153)

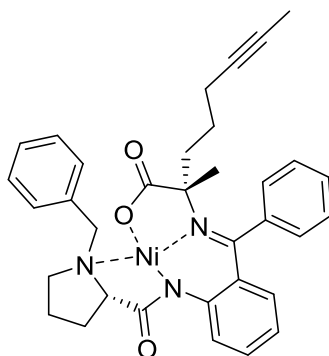
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (5.0 g, 9.7 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit Benzylbromid zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **153** (5.8 g, 9.5 mmol, 98%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.98 (dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 3H), 7.47 – 7.40 (m, 4H), 7.35 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 6.65 – 6.60 (m, 1H), 6.54 (dd, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.55 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.37 – 3.34 (m, 1H), 3.10 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 2.87 – 2.81 (m, 1H), 2.26 – 2.15 (m, 1H), 2.07 – 1.89 (m, 3H), 1.70 – 1.58 (m, 1H), 0.98 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 179.7, 179.0, 171.4, 142.3, 136.6, 136.5, 134.6, 133.3, 131.4, 131.1, 131.0, 130.5, 129.3, 128.4, 128.3, 128.0, 127.3, 127.2, 127.2, 127.1, 123.0, 119.7, 77.7, 69.5, 63.1, 56.9, 46.2, 29.9, 28.7, 22.5. **HRMS**: berechnet für $C_{35}H_{33}N_3NiO_3$: 602.19482 $[M+H]^+$; gefunden 602.19653 $[M+H]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 6.30 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2,4-dimethylpentanoat (154)

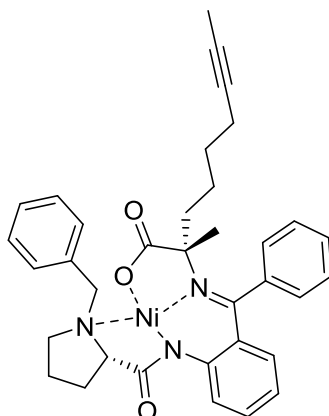
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (11.4 g, 8.0 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit 1-Brom-2-methylpropan zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **154** (4.23 g, 7.4 mmol, 92%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.08 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 3H), 7.38 (dd, $J = 15.9, 8.2$ Hz, 3H), 7.26 – 7.21 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 1H), 7.14 – 7.08 (m, 1H), 7.08 – 7.00 (m, 1H), 6.66 – 6.53 (m, 2H), 4.47 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H), 3.45 (dd, $J = 10.6, 6.1$ Hz, 1H), 3.26 – 3.10 (m, 1H), 2.52 – 2.37 (m, 2H), 2.10 – 2.01 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 2H), 1.27 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.14 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 183.0, 180.7, 172.5, 141.9, 136.9, 133.7, 133.6, 131.8, 131.7, 130.6, 130.2, 129.5, 129.1, 129.0, 128.5, 127.9, 127.9, 127.03, 123.9, 120.7, 70.4, 63.8, 57.3, 48.7, 30.8, 30.8, 25.7, 24.6, 23.4, 23.4. **MS**: berechnet für $C_{32}H_{35}N_3NiO_3$: 568.20 $[M+H]^+$; gefunden 568.14 $[M+H]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.38 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2-methyloct-6-inoat (155)

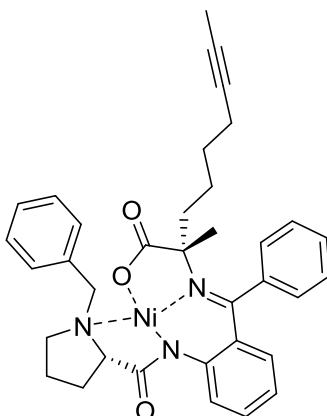
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (2.6 g, 5.0 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98a** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **155** (2.9 g, 4.9 mmol, 98%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.33 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.92 – 7.86 (m, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 3H), 7.46 – 7.38 (m, 3H), 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.11 – 7.04 (m, 1H), 6.68 – 6.61 (m, 1H), 6.57 (dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 1H), 4.10 – 4.06 (m, 1H), 3.68 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.52 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.42 – 3.35 (m, 1H), 3.09 – 2.98 (m, 1H), 2.64 – 2.54 (m, 1H), 2.48 – 2.41 (m, 2H), 2.26 – 2.19 (m, 2H), 2.18 – 2.06 (m, 2H), 2.05 – 1.95 (m, 1H), 1.79 – 1.74 (m, 3H), 1.75 – 1.68 (m, 1H), 1.64 – 1.52 (m, 1H), 0.99 (s, $J = 5.1$ Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.1, 180.0, 171.6, 141.8, 136.2, 134.7, 132.9, 131.5, 130.8, 130.6, 129.3, 128.5, 128.4, 127.8, 127.7, 127.2, 126.9, 123.4, 119.9, 78.8, 76.6, 76.3, 69.6, 63.0, 57.0, 39.9, 30.1, 28.7, 25.1, 22.7, 18.1, 3.1. **HRMS**: berechnet für $C_{34}H_{35}N_3NiO_3$: 592.21047 $[M+H]^+$; gefunden 592.21126 $[M+H]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.43 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2-methylnon-7-inoat (156)

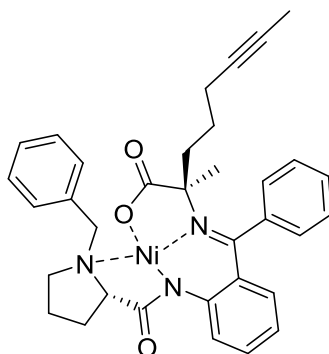
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (3.5 g, 6.8 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98b** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **156** (4.1 g, 6.7 mmol, 98%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.92 – 7.83 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 3H), 7.47 – 7.39 (m, 3H), 7.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.09 – 7.04 (m, 1H), 6.67 – 6.54 (m, 2H), 4.06 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.54 – 3.45 (m, 1H), 3.37 (dd, $J = 18.7, 9.7$ Hz, 1H), 3.12 – 2.99 (m, 1H), 2.55 – 2.50 (m, 2H), 2.48 – 2.41 (m, 1H), 2.26 – 2.20 (m, 2H), 2.17 – 2.06 (m, 2H), 1.99 – 1.92 (m, 1H), 1.65 – 1.58 (m, 3H), 1.50 – 1.37 (m, 4H), 1.06 (s, $J = 8.9$ Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.5, 179.9, 171.7, 141.7, 136.3, 134.7, 132.7, 131.5, 131.3, 130.7, 130.4, 129.3, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.1, 126.9, 123.5, 119.9, 79.1, 76.7, 76.1, 69.7, 62.9, 56.9, 40.0, 30.2, 29.0, 28.4, 24.4, 22.7, 18.1, 2.9. **HRMS**: berechnet für $C_{35}H_{37}N_3NiO_3$: 606.22613 [M+H]⁺; gefunden 606.22693 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.61 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(S)-2-methyldec-8-inoat (157)

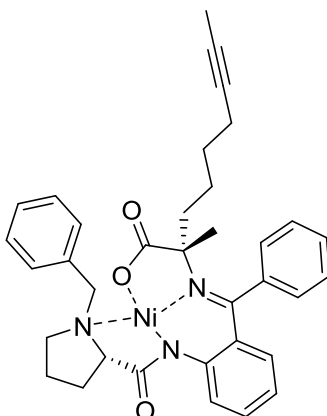
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **36** (1.3 g, 2.5 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98c** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **157** (1.3 g, 2.1 mmol, 84%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.33 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.88 – 7.84 (m, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 3H), 7.44 – 7.39 (m, 3H), 7.28 – 7.23 (m, 1H), 7.15 – 7.11 (m, 1H), 7.11 – 7.06 (m, 1H), 6.66 – 6.61 (m, 1H), 6.61 – 6.55 (m, 1H), 4.07 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.68 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.41 – 3.35 (m, 1H), 3.15 – 2.97 (m, 1H), 2.49 – 2.38 (m, 2H), 2.37 – 2.28 (m, 1H), 2.18 – 2.09 (m, 4H), 1.85 – 1.75 (m, 1H), 1.71 (t, $J = 2.5$ Hz, 3H), 1.57 – 1.49 (m, 2H), 1.49 – 1.42 (m, 2H), 1.36 – 1.23 (m, 2H), 1.07 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.6, 180.0, 171.7, 141.7, 136.3, 134.7, 132.7, 131.5, 131.3, 130.7, 130.4, 129.3, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.1, 127.0, 123.6, 120.0, 79.1, 76.8, 75.8, 69.6, 62.9, 57.0, 39.9, 30.2, 29.0, 28.3, 28.2, 24.7, 22.8, 17.9, 3.1. **HRMS**: berechnet für $C_{36}H_{39}N_3NiO_3$: 620.24177 [M+H]⁺; gefunden 620.24325 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.87 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(R)-2-methyloct-6-inoat (158)

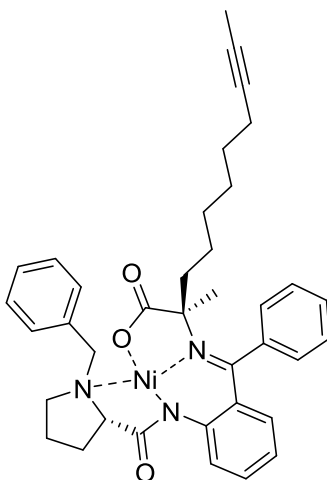
Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **89** (3.2 g, 6.2 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98a** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **158** (3.7 g, 6.1 mmol, 98%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.33 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.90 – 7.86 (m, 1H), 7.56 – 7.48 (m, 3H), 7.46 – 7.39 (m, 3H), 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.11 – 7.06 (m, 1H), 6.67 – 6.61 (m, 1H), 6.61 – 6.55 (m, 1H), 4.07 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.68 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.57 – 3.49 (m, 1H), 3.41 – 3.33 (m, 1H), 3.10 – 2.97 (m, 1H), 2.67 – 2.53 (m, 1H), 2.49 – 2.40 (m, 2H), 2.21 (s, $J = 2.1$ Hz, 2H), 2.18 – 2.05 (m, 2H), 2.02 – 1.95 (m, 1H), 1.76 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H), 1.74 – 1.68 (m, 1H), 1.63 – 1.52 (m, 1H), 0.99 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.1, 180.0, 171.6, 141.8, 136.2, 134.7, 132.9, 131.5, 130.8, 130.6, 129.3, 128.5, 128.4, 127.8, 127.7, 127.2, 126.9, 123.4, 119.9, 78.8, 76.6, 76.3, 69.6, 63.0, 57.0, 39.9, 30.1, 28.7, 25.1, 22.7, 18.1, 3.1. **HRMS**: berechnet für $C_{34}H_{35}N_3NiO_3$: 592.21047 [M+H]⁺; gefunden 592.21180 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.16 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(R)-2-methylnon-7-inoat (159)

Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **89** (3.5 g, 6.8 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98b** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **159** (4.1 g, 6.7 mmol, 98%) umgesetzt.

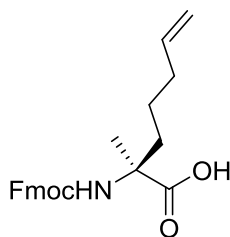
¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.33 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.88 (dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, 1H), 7.55 – 7.49 (m, 3H), 7.45 – 7.40 (m, 3H), 7.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 7.11 – 7.06 (m, 1H), 6.67 – 6.61 (m, 1H), 6.61 – 6.55 (m, 1H), 4.06 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.52 – 3.47 (m, 1H), 3.40 – 3.34 (m, 1H), 3.13 – 2.99 (m, 1H), 2.57 – 2.51 (m, 1H), 2.50 – 2.41 (m, 1H), 2.27 – 2.20 (m, 2H), 2.17 – 2.07 (m, 2H), 2.01 – 1.91 (m, 1H), 1.63 (t, $J = 2.5$ Hz, 3H), 1.49 – 1.38 (m, 4H), 1.06 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.5, 180.0, 171.7, 141.7, 136.4, 134.7, 132.8, 131.5, 131.3, 130.7, 130.5, 129.3, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.1, 126.9, 123.5, 120.0, 79.1, 76.7, 76.1, 69.7, 62.9, 56.9, 40.0, 30.2, 29.0, 28.4, 24.5, 22.7, 18.1, 3.0. **HRMS**: berechnet für $C_{35}H_{37}N_3NiO_3$: 606.22613 [M+H]⁺; gefunden 606.22720 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.34 min.

Synthese von BPB-Ni(II)-(R)-2-methylundec-9-inoat (160)

Der Ala-Ni(II)-(S)-BPB **89** (3.0 g, 5.8 mmol) wurde gemäß **AAV 5** mit dem Iodalkin **98b** zu dem alkylierten Ni(II)-Komplex **160** (2.8 g, 4.3 mmol, 75%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 8.32 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.51 (s, 3H), 7.42 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 7.25 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.14 – 7.05 (m, 2H), 6.64 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.51 (dd, J = 9.7, 6.8 Hz, 1H), 3.40 – 3.34 (m, 1H), 3.04 (dd, J = 19.0, 9.0 Hz, 1H), 2.48 – 2.42 (m, 2H), 2.40 – 2.32 (m, 1H), 2.18 – 2.08 (m, 4H), 1.88 – 1.76 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.45 (m, 4H), 1.43 – 1.19 (m, 4H), 1.05 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO): δ [ppm] = 180.6, 180.0, 171.6, 141.7, 136.3, 134.7, 132.8, 131.5, 130.7, 130.5, 129.3, 128.5, 128.5, 127.9, 127.8, 127.1, 126.9, 123.6, 120.0, 79.3, 76.8, 75.7, 69.6, 62.9, 57.0, 39.8, 30.2, 29.0, 28.6, 28.4, 28.3, 25.3, 22.8, 18.0, 3.1. **HRMS**: berechnet für C₃₇H₄₁N₃NiO₃: 634.25742 [M+H]⁺; gefunden 634.25868 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 11 min) = 6.96 min.

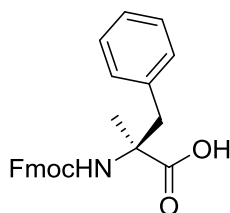
Synthese von (S)-2{[(9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}-2-methylhept-6-ensäure [Fmoc-S₅-OH] (39)



Der alkylierte Ni(II)-Komplex **38** (2.2 g, 3.7 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **39** (**Fmoc-S₅-OH**) (0.9 g, 2.3 mmol, 62%) umgesetzt.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.35 (s, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 5.88 – 5.65 (m, 1H), 5.08 – 4.87 (m, 2H), 4.35 – 4.11 (m, 3H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.86 – 1.72 (m, 1H), 1.72 – 1.58 (m, 1H), 1.38 – 1.23 (m, 5H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO) δ [ppm] = 176.0, 155.4, 144.5, 141.4, 139.2, 128.3, 127.7, 125.9, 120.7, 115.6, 65.9, 58.9, 47.4, 36.9, 33.9, 23.2, 23.1. **HRMS**: berechnet für C₂₃H₂₅NO₄ = 380.18563 [M+H]⁺; gefunden 380.18624 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.72 min.

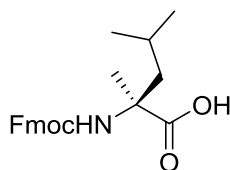
Synthese von (S)-2{[(9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}-2-methyl-3-phenylsäure [Fmoc- α F-OH] (58)



Der alkylierte Ni(II)-Komplex **153** (5.8 g, 9.5 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **58** (**Fmoc- α F-OH**) (3.7 g, 9.2 mmol, 97%) umgesetzt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.35 (s, 1H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 5.88 – 5.65 (m, 1H), 5.08 – 4.87 (m, 2H), 4.35 – 4.11 (m, 3H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.86 – 1.72 (m, 1H), 1.72 – 1.58 (m, 1H), 1.38 – 1.23 (m, 5H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 176.0, 155.4, 144.5, 141.4, 139.2, 128.3, 127.7, 125.9, 120.7, 115.6, 65.9, 58.9, 47.4, 36.9, 33.9, 23.2, 23.1. **HRMS**: berechnet für C₂₅H₂₃NO₄ = 402.16998 [M+H]⁺; gefunden 402.17025 [M+H]⁺. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 11 min) = 6.48 min.

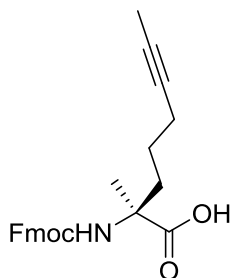
Synthese von (S)-2-[[*(9H-Fluoren-9-yl)methoxy*]carbonylamino]-2,4-dimethylpentansäure [Fmoc- α L-OH] (**59**)



Der alkylierte Ni(II)-Komplex **154** (3.7 g, 6.5 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **59** (**Fmoc- α L-OH**) (2.4 g, 4.5 mmol, 69%) umgesetzt.

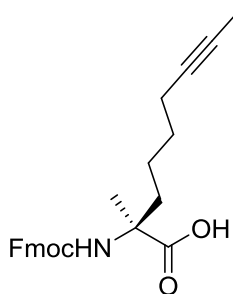
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.52 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 4.30 – 4.23 (m, 2H), 4.23 – 4.16 (m, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.73 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.68 – 1.55 (m, 1H), 1.36 (s, 3H), 0.85 (q, $J = 6.5$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.6, 154.4, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 65.2, 58.2, 46.7, 44.4, 24.1, 23.7, 23.6, 23.2. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_4 = 368.1856$ [M+H] $^+$; gefunden 368.1862 [M+H] $^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 30 min) = 24.2 min.

Synthese von (S)-2-[[*(9H-Fluoren-9-yl)methoxy*]carbonylamino]-2-methyloct-6-ensäure (**90**)



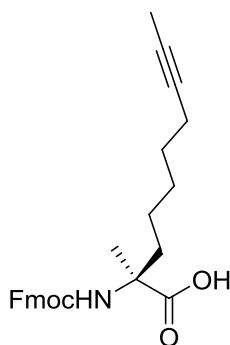
Der alkylierte Ni(II)-Komplex **155** (1.5 g, 2.5 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **90** (**Fmoc-90-OH**) (1.0 g, 2.5 mmol, 98%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.38 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.31 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.16 (m, 1H), 2.14 – 2.01 (m, 2H), 1.88 – 1.79 (m, 1H), 1.79 – 1.73 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.45 – 1.33 (m, 2H), 1.32 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.2, 154.6, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 79.1, 75.8, 65.2, 58.1, 46.7, 36.0, 23.3, 22.5, 18.3, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_4 = 392.18563$ [M+H] $^+$; gefunden 392.18459 [M+H] $^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.73 min.

Synthese von (S)-2-[[*(9H-Fluoren-9-yl)*methoxy]carbonylamino]-2-methylnon-7-ensäure (91)

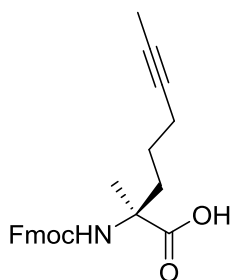
Der alkylierte Ni(II)-Komplex **156** (1.5 g, 2.4 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **91** (**Fmoc-91-OH**) (1.0 g, 2.3 mmol, 96%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.37 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.34 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.18 (m, 1H), 2.17 – 2.03 (m, 2H), 1.76 (s, 1H), 1.69 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H), 1.68 – 1.59 (m, 1H), 1.45 – 1.35 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.30 – 1.19 (m, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.3, 154.7, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 79.1, 75.7, 65.2, 58.2, 46.7, 36.2, 28.7, 22.6, 22.4, 18.0, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_4 = 406.20128$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 406.20119 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 10.12 min.

Synthese von (S)-2-[[*(9H-Fluoren-9-yl)*methoxy]carbonylamino]-2-methyldec-8-insäure (93)

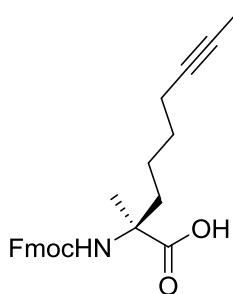
Der alkylierte Ni(II)-Komplex **157** (1.3 g, 2.1 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **93 (Fmoc-93-OH)** (0.8 g, 1.8 mmol, 86%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.35 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.37 (s, 1H) 7.36 – 7.30 (m, 2H), 4.34 – 4.14 (m, 3H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 1.83 – 1.73 (m, 1H), 1.71 (t, $J = 2.5$ Hz, 3H), 1.69 – 1.61 (m, 1H), 1.43 – 1.35 (m, 2H), 1.32 (s, 3H), 1.29 (m, 2H), 1.24 – 1.13 (m, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.3, 154.7, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 79.2, 75.7, 65.2, 58.3, 46.7, 36.6, 28.4, 28.4, 22.7, 22.3, 18.0, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_4 = 420.21693$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 420.21736 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 10.20 min.

Synthese von (*R*)-2-[[*(9H*-Fluoren-*9-yl*)methoxy]carbonylamino]-2-methyloct-6-insäure (94**)**

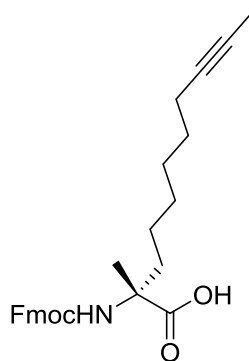
Der alkylierte Ni(II)-Komplex **158** (1.5 g, 2.5 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **94 (Fmoc-94-OH)** (0.8 g, 2.2 mmol, 86%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.37 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.29 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.17 (m, 1H), 2.14 – 2.01 (m, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 1H), 1.76 (s, $J = 11.9$ Hz, 1H), 1.72 (s, 3H), 1.43 – 1.34 (m, 2H), 1.32 (s, 3H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.2, 154.7, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.3, 120.0, 79.0, 75.9, 65.2, 58.1, 46.7, 36.0, 23.2, 22.4, 18.3, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_4 = 392.18563$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 392.18504 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.60 min.

Synthese von (*R*)-2-[[*(9H*-Fluoren-*9-yl*)methoxy]carbonylamino]-2-methylnon-7-insäure (94**)**

Der alkylierte Ni(II)-Komplex **159** (1.5 g, 2.5 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **94** (**Fmoc-94-OH**) (0.8 g, 1.9 mmol, 76%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.36 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.71 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.33 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.17 (m, 1H), 2.14 – 2.04 (m, 2H), 1.82 – 1.71 (m, 1H), 1.69 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H), 1.69 – 1.60 (m, 1H), 1.43 – 1.34 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.30 – 1.17 (m, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.3, 154.7, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 79.1, 75.7, 65.2, 58.2, 46.7, 36.2, 28.7, 22.6, 22.3, 18.0, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ = 406.20128 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 406.20170 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 13 min) = 9.89 min.

Synthese von (R)-2-[[9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}-2-methylundec-9-insäure (95)

Der alkylierte Ni(II)-Komplex **160** (2.8 g, 4.3 mmol) wurde gemäß **AAV 6** zersetzt und zu dem Fmoc-geschützten α -methylierten Baustein **95 (Fmoc-95-OH)** (1.7 g, 3.9 mmol, 91%) umgesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 12.32 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 4.32 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.17 (m, 1H), 2.11 – 2.03 (m, 2H), 1.75 (s, 1H), 1.71 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H), 1.69 – 1.61 (m, 1H), 1.43 – 1.35 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.25 (s, 2H), 1.23 (m, 4H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 175.4, 154.7, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 79.3, 75.6, 65.2, 58.3, 46.7, 36.6, 28.7, 28.4, 28.1, 23.1, 22.3, 18.0, 3.1. **HRMS**: berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{NO}_4 = 434.23258$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden 434.23458 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **HPLC**: (Flussrate 1 mL/min, 10-90%, MeCN (0.1% TFA), 11 min) = 7.18 min.

7.4 Festphasenpeptidsynthese

Die Peptidsequenzen wurden mittels **Festphasensynthesen** in Spritzenreaktoren (2, 5, 20 mL) mit PE-Fritten oder Rosenbaum-Reaktoren synthetisiert. Die Harz-Suspensionen wurden durch Schütteln der Spritzen bzw. Reaktoren auf einem automatischen Schüttler KS125basic (*IKA Labortechnik*) durchmischt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Testabspaltung gemäß **AAV 22** durch U-HPLC Analyse. Für die Synthese anspruchsvoller Peptidsequenzen wurde der Reaktionsverlauf durch die Bestimmung der Harzbeladung nach **AAV 9** überwacht.

7.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 7: Beladung von TentaGel Rink-Amid-Harz bzw. ChemMatrix Rink-Amid-Harz

TentaGel-Rink-Amid-Harz (0.24 mmol/g) bzw. ChemMatrix Rink-Amid-Harz (0.48 mmol/g) wurden in einen Spritzenreaktor eingewogen und für 10 min in DMF (1 mL/100 mg) gequollen. Anschließend wurde die erste Aminosäure nach **AAV 12/13** auf den freien *N*-Terminus gekuppelt und die Harzbeladung anhand **AAV 9** bestimmt.

AAV 8: Beladung von MBHA Rink-Amid-Harz

MBHA Rink-Amid-Harz (0.65 mmol/g) wurde in einen Spritzenreaktor eingewogen und für 10 min in DMF (1 mL/100 mg) gequollen. Anschließend wurde Fmoc nach **AAV 11** entfernt und die erste Aminosäure entsprechend **AAV 12/13** auf den freien *N*-Terminus gekuppelt und die Harzbeladung anhand **AAV 9** bestimmt.

AAV 9: Bestimmung der Harzbeladung anhand Fmoc-Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie

Eine definierte Menge des getrockneten Harzes (1-2 mg) wurde mit 1 mL Piperidin/DMF (1/4, v/v) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Harz wurde abzentrifugiert und der Überstand in Piperidin/DMF (1/4, v/v) verdünnt (1:10). Anschließend wurde die Absorption des Fluorenyl-Adduktes ($\epsilon = 7800 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 301 nm bestimmt und die Harzbeladung mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet.

AAV 10: Automatische, Mikrowellen gestützte Synthese von Wildtyp-Sequenzen

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit einer Lösung aus Piperidin/DMF (1/4, v/v) für 1 min bei 30 °C (Intensität = 40 W) und 5 min bei 70 °C (Intensität = 40 W). Zur Unterdrückung von Aspartamid-Bildung wurde der Entschützungslösung gegebenenfalls HOBt (0.5 M) zugesetzt. Die Aminosäurekupplungen erfolgten in Form von Doppelkupplungen unter Verwendung von Aminosäure (4 Äq., 0.2 M in DMF), HCTU (3.9 Äq., 0.2 M in DMF) und DIPEA (8 Äq., 0.2 M in NMP) für jeweils 10 min bei 80 °C (Intensität = 20 W). Im Falle von His- oder Cys-Resten wurde die Reaktionszeit auf 15 min verlängert und die Temperatur auf 60 °C (Intensität = 20 W) reduziert.

AAV 11: Fmoc-Entschützung an der Festphase

Das in DMF gequollene (10 min) und gewaschene Harz wurde mit einer Lösung aus Piperidin in DMF (1/4, v/v) zweimal für 5 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 12: Aminosäurekupplung mit COMU/Oxyma

Das nach AAV 11 Fmoc-entschützte und gewaschene Harz wurde mit einer Reaktionsmischung aus Aminosäure (4.0 Äq.), COMU (3.9 Äq.), Oxyma (3.9 Äq.) und DIPEA (8.0 Äq., bezogen auf die vom Hersteller angegebene theoretische Harzbeladung) in DMF (0.5 M) versetzt und für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 × 1 min) gewaschen. Im Falle unvollständigen Umsatzes (UHPLC-Kontrolle) wurde die Kupplung wiederholt.

AAV 13: Aminosäurekupplung mit HCTU

Das nach AAV 11 Fmoc-entschützte und gewaschene Harz wurde mit einer Reaktionsmischung aus Aminosäure (4.0 Äq.), HCTU (3.9 Äq.) und DIEA (8.0 Äq., bezogen auf die vom Hersteller angegebene theoretische Harzbeladung) in DMF (0.5 M) versetzt und zweimal für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 × 1 min) gewaschen. Im Falle unvollständigen Umsatzes (UHPLC-Kontrolle) wurde die Kupplung wiederholt.

AAV 14: Olefin-Ringschlussmetathese an der Festphase

Das getrocknete Harz wurde mit DCM (3 ×) und DCE (3 ×) gewaschen und in DCE gequollen (10 min). Anschließend wurde eine Lösung aus Grubbs-I-Katalysator in DCE (2 mg/mL, 1 mL/100 mg Harz) zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Während der Reaktion wurde entstehendes Ethen durch stetes Durchleiten von Argon entfernt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Harz abschließend mit DCM (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), Methanol (3 × 1 min) und DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 15: Alkin-Ringschlussmetathese an der Festphase

Das getrocknete Harz wurde unter Argon in ein ausgeheiztes Schlenkrohr überführt und zur Trocknung abwechselnd mit trockenem Diethylether und trockenem Toluol gewaschen (jeweils 3 ×). Anschließend wurde das Harz in trockenem Toluol gequollen (10 min) und mit einer Lösung von Mo-Komplex **103** in trockenem Toluol (2 mg/mL, 1 mL/100 mg Harz) für 1.5 h bei 40 °C unter Rühren inkubiert. Während der Reaktion wurde das entstehende 2-Butin durch stetes Durchleiten von Argon ausgetrieben. Nach der Zugabe von frischem Mo-Komplex **103** in trockenem Toluol (2 mg/mL, 1 mL/100 mg Harz) wurde für weitere 1.5 h bei 40 °C gerührt und die Reaktionslösung durch Filtrieren entfernt. Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor überführt und mit Toluol (3 × 1 min) und DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 16: Eintopf Ringschluss Alkin- und Olefin-Ringschlussmetathese an der Festphase

Das getrocknete Harz wurde unter Argon in ein ausgeheiztes Schlenkrohr überführt und zur Trocknung abwechselnd mit trockenem Diethylether und trockenem Toluol gewaschen (jeweils 3 ×). Anschließend wurde das Harz in trockenem Toluol gequollen (10 min) und mit einer Lösung von Mo-Komplex **103** und Grubbs-I-Katalysator in trockenem Toluol (2 mg/mL, 1 mL/100 mg Harz) für 1.5 h bei 40 °C unter Rühren inkubiert. Während der Reaktion wurde das entstehende 2-Butin und Ethen durch stetes Durchleiten von Argon ausgetrieben. Nach der Zugabe von frischem Mo-Komplex **103** und Grubbs-I-Katalysator in trockenem Toluol (2 mg/mL, 1 mL/100 mg Harz) wurde für weitere 1.5 h bei 40 °C gerührt und die Reaktionslösung durch Filtrieren entfernt. Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor überführt und mit Toluol (3 × 1 min) und DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 17: Dibromierung von Alkin-Makrozyklen an der Festphase

Das getrocknete Harz wurde in einem Spritzenreaktor mit trockenem MeCN gewaschen und in trockenem MeCN gequollen (10 min). Anschließend wurde das Harz mit einer Lösung aus CuBr₂ in trockenem MeCN (2 mg/mL) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Harz mit MeCN (3 × 1 min), DCM (3 × 1 min) und DMF (3 × 1 min) gewaschen. Im Falle unvollständigen Umsatzes (UHPLC-Kontrolle) wurde die Reaktion wiederholt.

AAV 18: Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe an der Festphase

Das getrocknete Harz wurde in DCM gequollen (10 min), mit einer Lösung aus DCM/TFA/TIPS (97/1/2, v/v/v) gewaschen (2 × 1 min) und für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit DCM (3 × 1 min) gewaschen.

AAV 19: Funktionalisierung des N-Terminus mit Fluorescein an der Festphase

Das nach **AAV 11** Fmoc-entschützte und gewaschene Harz wurde nach **AAV 13** mit dem PEG-Spacer Fmoc-O₂OC-OH gekuppelt. Nach anschließender Fmoc-Entschützung gemäß **AAV 11** wurde das gewaschene Harz mit einer Lösung aus FITC (5.0 Äq.) und DIEA (10.0 Äq., bezogen auf die vom Hersteller

angegebene theoretische Harzbeladung) in DMF (0.5 M) unter Lichtausschluss für 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde das Harz mit DMF (5×1 min) und DCM (5×1 min) gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet.

AAV 20: Acetylierung des N-Terminus an der Festphase

Das nach AAV 11 Fmoc-entschützte und gewaschene Harz wurde mit einer Lösung (1 mL/100 mg) aus Ac₂O/DIEA/DMF (1/1/8, v/v/v) zweimal für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (5×1 min) und DCM (5×1 min) gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet.

AAV 21: Funktionalisierung des N-Terminus mit Biotin an der Festphase

Das nach AAV 11 Fmoc-entschützte und gewaschene Harz wurde nach AAV 13 mit dem PEG-Spacer Fmoc-O₂OC-OH gekuppelt. Nach anschließender Fmoc-Entschützung gemäß AAV 11 wurde das gewaschene Harz mit einer Lösung aus Biotin (5.0 Äq.), HCTU (5.0 Äq.) und DIEA (10 Äq., bezogen auf die vom Hersteller angegebene theoretische Harzbeladung) in DMF (0.5 M) unter Lichtausschluss für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde das Harz mit DMF (5×1 min) und DCM (5×1 min) gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet.

AAV 22: Testabspaltung eines Peptids vom Harz

Zur Reaktionskontrolle des immobilisierten Peptids wurde ca. 1 mg des beladenen Harzes mit 100 µL einer Lösung aus TFA/TES/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung im Argonstrom evaporiert und das Peptid mit kaltem Diethylether präzipitiert. Nach Zentrifugation (5 min, 16.7 rpm) wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat in einem Gemisch aus MeCN/H₂O (1/1, v/v) gelöst und mittels U-HPLC untersucht.

AAV 23: Abspaltung vom Harz

Das getrocknete Harz wurde mit DCM gewaschen (3×1 min) und mit einer Abspalllösung aus TFA/TES/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) bzw. im Fall oxidationsempfindlicher Peptide mit TFA/TES/H₂O/DODT (94/2.5/2.5/1, v/v/v/v) versetzt (150 µL/100 mg) und für 3×1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde das Harz mit Abspalllösung gewaschen ($2 \times$) und die vereinigten Lösungen im Argonstrom eingengt. Das Peptid wurde mit kaltem Diethylether präzipitiert, abzentrifugiert (10 min, 16.7 rpm) und mit kaltem Diethylether resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 16.7 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Präzipitat getrocknet und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

AAV 24: Peptid Quantifizierung

Die Konzentration der Fluorescein-funktionalisierten Peptide ($\epsilon = 77\,000 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde mittels UV-Absorption bei 496 nm in 20 mM Phosphatpuffer (pH 8.5) bestimmt und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Die Konzentration der acetylierten Peptide wurde gravimetrisch oder durch UV-

Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Peptide wurden anschließend aliquotiert, lyophilisiert und in getrockneter Form bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

7.4.2 Bestimmung des Sekundärstrukturanteils mittels CD-Spektroskopie

Der α -helikale Anteil der synthetisierten Peptide wurde mittels CD-Spektroskopie bestimmt. Um die Löslichkeit der Peptide zu gewährleisten, wurden sie in einer Lösung aus Wasser und 2,2,2-Trifluorethanol (7/3, v/v) mit einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ gelöst. Die CD-Spektren wurden bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Quartzküvette mit einer Weglänge von 0.1 cm zwischen 190 nm und 260 nm (50 nm/min Aufnahmegeschwindigkeit, Datenpunkte alle 0.1 nm) aufgenommen. Der helikale Anteil f_{helix} wurde nach bereits etablierten Methoden^{107,323} anhand der beobachteten Elliptizität $[\theta]_{obs}$ bei 222 nm mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnet:

$$f_{helix} = \frac{[\theta]_{222} - [\theta]_0}{[\theta]_{max} - [\theta]_0},$$

$$[\theta]_{max} = [\theta]_{\infty} \frac{n - x}{n}$$

$$[\theta]_{\infty} = -44000 + 250 T$$

$$[\theta]_0 = 2220 - 53 T$$

$$[\theta]_{222} = \frac{1}{n} \frac{[\theta]_{obs}}{10 \cdot l \cdot c}$$

$[\theta]_{max}$ ist der maximale theoretische Wert der Elliptizität für eine Helix mit n Aminosäuren und $[\theta]_{\infty}$ der maximale theoretische Wert für eine unendliche Helix. Die empirische Konstante x steht für die Anzahl an fehlenden Amidgruppen und wurde auf 3 gesetzt (normalerweise zwischen 2,4 – 4). T ist die Temperatur der Peptidlösung in $^{\circ}\text{C}$. $[\theta]_0$ die mittlere Elliptizität der Peptide in ungeordneter Konformation und $[\theta]_{222}$ die gemessene Elliptizität bei 222 nm.

7.4.3 Übersicht synthetisierter Peptide

Alle Peptide wurden anhand der allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV 7 – AAV 24, Abschnitt 7.4.1) synthetisiert und aufgereinigt. Die analytischen Daten aller Peptide sind in den Tabelle 6 – 13 zusammengefasst.

Tabelle 6. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.1.1.

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. ^[a]	Sequenz	Reinheit [%] ^[b]	HPLC (t _R , [min]) ^[c]	Ausbeute [%] ^[d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1a		F		83.4	16.58	4	2600.1206	1301.06883 [M+2H] ²⁺
1b	25	Ac	DDEKEQFLYHLLSFN AV	>99	13.95	17	2108.0215	1055.01900 [M+2H] ²⁺
1c		B		94	15.84	12	2594.2727	1298.1443 [M+2H] ²⁺
2	26	F	LSLEMEKQLETINNLIMS	97	19.01	3	2638.2005	1320.10957 [M+2H] ²⁺
3a		F		91	14.60	17	2003.0087	1002.50872 [M+2H] ²⁺
3b	27	Ac	LLHKHGNLNLKLA	>99	12.31	12	1510.9096	756.46241 [M+2H] ²⁺
3c		B		>99	12.85	23	1997.1608	999.58684 [M+2H] ²⁺
4	28	F	TVKKLVHHNKGLETTIHKERV	>99	12.51	6	2999.5440	1000.85100 [M+3H] ³⁺
5	29	F	VQRDFVKLSQTLQV	>99	15.43	3	2193.0565	732.02826 [M+3H] ³⁺
6	30	F	FEQILQERNELKAKVFLLEE	95	15.11	3	3136.5580	1046.52712 [M+3H] ³⁺
7	31	F	LMEQIKLLKSEIRLER	98	15.28	3	2687.3928	896.80503 [M+3H] ³⁺
8a		F	LGQEELELTASLFEAAHKMV	90	20.55	2	2806.2506	1404.13342 [M+2H] ²⁺
8b	32	Ac		>99	18.62	4	2314.1515	1158.08866 [M+2H] ²⁺
10a		F		95	19.50	3	2135.8072	1068.90816 [M+2H] ²⁺
10b	33	Ac	GELPQCFCRMCVAF	98	17.96	8	1643.7081	822.35697 [M+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-, Ac= Acetylierung, B = Biotin-PEG-

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 7. Übersicht der synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.1.3.

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. [a]	Sequenz	Reinheit [%] [b]	HPLC (t _R , [min]) [c]	Ausbeute [%] [d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1a	40	F	DDEKEQFLYH <u>S₅LSF</u> <u>S₅AV</u>	>99	19.06	16	2623.1617	1312.58838 [m+2H] ²⁺
1b	40	Ac	DDEKEQFLYH <u>S₅LSF</u> <u>S₅AV</u>	>99	17.56		2131.0626	1066.53951 [m+2H] ²⁺
2a	41	F	DDEKEQ <u>S₅LLYH</u> <u>S₅LSFN</u> <u>AV</u>	>99	16.66	29	2590.1362	1296.07814 [m+2H] ²⁺
2b	41	Ac	DDEKEQ <u>S₅LLYH</u> <u>S₅LSFN</u> <u>AV</u>	98	15.26	9	2098.0371	1050.02674 [m+2H] ²⁺
3a	42	F	DDE <u>S₅EEQF</u> <u>S₅YHLL</u> <u>SFN</u> <u>AV</u>	>99	20.61	6	2609.1097	1305.56853 [M+2H] ²⁺
3b	42	Ac	DDE <u>S₅EEQF</u> <u>S₅YHLL</u> <u>SFN</u> <u>AV</u>	98	19.46	11	2117.0106	1059.51703 [M+2H] ²⁺
3c	42	B	DDE <u>S₅EEQF</u> <u>S₅YHLL</u> <u>SFN</u> <u>AV</u>	92	19.12	13	2603.2618	1303.14208 [m+2H] ²⁺
4a	43	F	KEQFLYH <u>S₅LSF</u> <u>S₅AV</u>	>99	18.78	5	2264.0653	1133.04064 [m+2H] ²⁺
4b	43	Ac	KEQFLYH <u>S₅LSF</u> <u>S₅AV</u>	99	18.12	18	1771.9661	886.99016 [m+2H] ²⁺
5a	44	F	LLHKHN <u>S₅LNL</u> <u>S₅LA</u>	>99	19.97	4	2068.0604	1035.03836 [m+2H] ²⁺
5b	44	Ac	LLHKHN <u>S₅LNL</u> <u>S₅LA</u>	98	11.45	15	1575.9613	788.98732 [m+2H] ²⁺
6a	45	F	LLH <u>S₅HNG</u> <u>S₅NL</u> <u>KLA</u>	>99	17.99	1	2011.9978	1007.00629 [m+2H] ²⁺
6b	45	Ac	LLH <u>S₅HNG</u> <u>S₅NL</u> <u>KLA</u>	>99	8.96	9	1519.8987	760.95663 [m+2H] ²⁺
7a	46	F	LL <u>S₅KHN</u> <u>S₅LNL</u> <u>KLA</u>	94	20.01	2	2059.0965	1030.55458 [m+2H] ²⁺
7b	46	Ac	LL <u>S₅KHN</u> <u>S₅LNL</u> <u>KLA</u>	93	9.87	11	1566.9974	784.50593 [m+2H] ²⁺
8a	47	F	LGQLEELTASLFE <u>S₅AHK</u> <u>S₅V</u>	97	25.71	1*	2304.2366	1153.13063 [m+2H] ²⁺
8b	47	Ac	LGQLEELTASLFE <u>S₅AHK</u> <u>S₅V</u>	>99	22.86	4	2840.3441	1421.18111 [m+2H] ²⁺
9a	48	F	LGQLEELTA <u>S₅LFE</u> <u>S₅AHK</u> <u>MV</u>	>99	23.99	1	2348.2450	1175.13491 [m+2H] ²⁺
9b	48	Ac	LGQLEELTA <u>S₅LFE</u> <u>S₅AHK</u> <u>MV</u>	92	16.55	6#	2830.2506	1416.13287 [m+2H] ²⁺
10a	49	F	LGQLEEE <u>S₅TAS</u> <u>S₅FEE</u> <u>AHK</u> <u>MV</u>	93	20.03	1*	2338.1515	1170.08579 [m+2H] ²⁺
10b	49	Ac	LGQLEEE <u>S₅TAS</u> <u>S₅FEE</u> <u>AHK</u> <u>MV</u>	99	20.01	14	2814.2921	1408.15361 [m+2H] ²⁺
11a	50	F	LGQ <u>S₅LEE</u> <u>S₅TAS</u> <u>LFE</u> <u>E</u> <u>AHK</u> <u>MV</u>	91	21.64	1	2322.1930	1162.10358 [m+2H] ²⁺
11b	50	Ac	LGQ <u>S₅LEE</u> <u>S₅TAS</u> <u>LFE</u> <u>E</u> <u>AHK</u> <u>MV</u>	98	21.88	8	2638.2005	1320.10957 [m+2H] ²⁺
12a	51	F	GELPQC <u>S₅CRM</u> <u>S₅AV</u> <u>F</u>	>99	21.91	4*	2135.8977	1067.94917 [m+2H] ²⁺
12b	51	Ac	GELPQC <u>S₅CRM</u> <u>S₅AV</u> <u>F</u>	95	15.51	1	1643.7986	822.90404 [m+2H] ²⁺
13a	52	F	GELPQ <u>S₅F</u> <u>CR</u> <u>S₅CA</u> <u>V</u> <u>F</u>	>99	21.86	7	2151.9257	1076.96994 [m+2H] ²⁺
13b	52	Ac	GELPQ <u>S₅F</u> <u>CR</u> <u>S₅CA</u> <u>V</u> <u>F</u>	96	15.31	4#	1659.8265	830.92059 [m+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-, Ac= Acetylierung, B = Biotin-PEG-

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 8. Übersicht der synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.2.1.

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. [a]	Sequenz	Reinheit [%] [b]	HPLC (t _R , [min]) [c]	Ausbeute [%] [d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1	V916A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNA	99	23.16	9	1291.54647	1291.54959 [M+2H] ²⁺
2	N914A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFAAV	99	26.58	4	1284.05922	1284.06224 [M+2H] ²⁺
3	F913A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSANAV	90	22.76	40	1267.54647	1267.55044 [M+2H] ²⁺
4	S912A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLAFNAV	99	23.93	6	1297.56467	1297.56864 [M+2H] ²⁺
5	L911A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLASFNAV	97	22.17	21	1284.53865	1284.54371 [M+2H] ²⁺
6	L910A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHALSFNAV	91	22.27	7	1284.53865	1284.54394 [M+2H] ²⁺
7	H909A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YALLSFNAV	92	25.27	3	1272.55122	1272.55300 [M+2H] ²⁺
8	Y908A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ AHLLSFNAV	98	23.91	10	1259.54902	1259.54551 [M+2H] ²⁺
9	F906A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	99	22.79	11	1267.54647	1267.55229 [M+2H] ²⁺
10	Q905A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	98	23.97	10	1277.05139	1277.05510 [M+2H] ²⁺
11	E904A	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	99	24.57	6	1276.55938	1276.56337 [M+2H] ²⁺
12	E902A	F	DDA S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	99	24.52	7	1276.55938	1276.56340 [M+2H] ²⁺
13	D901A	F	DAE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	97	24.01	17	1283.56721	1283.57147 [M+2H] ²⁺
14	D900A	F	ADE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	95	24.92	19	1283.56721	1283.57113 [M+2H] ²⁺
15	V916R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAR	98	22.79	9	1334.07847	1334.07942 [M+2H] ²⁺
16	A915R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNRV	98	23.01	8	1348.09412	1348.09452 [M+2H] ²⁺
17	N914R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFRV	90	23.28	2	1326.59121	1326.59104 [M+2H] ²⁺
18	F913R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSRNAV	95	21.93	10	1310.07848	1310.08222 [M+2H] ²⁺
19	S912R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLRFNAV	87	23.24	26	1340.09668	1340.09777 [M+2H] ²⁺
20	L911R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLRSFNAV	98	20.52	20	1327.07065	1327.07098 [M+2H] ²⁺
21	L910R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHRLSFNAV	96	19.54	18	1327.07065	1327.07084 [M+2H] ²⁺
22	H909R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YRLLSFNAV	95	24.41	15	1315.08322	1315.08585 [M+2H] ²⁺
23	Y908R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ RHLLSFNAV	96	23.26	13	1302.08101	1302.08201 [M+2H] ²⁺
24	F906R	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	96	20.39	17	873.72141	873.72398 [M+3H] ³⁺
25	Q905R	F	DDE S ₅ ERFS ₅ YHLLSFNAV	97	23.58	8	1319.58339	1319.58257 [M+2H] ²⁺
26	E904R	F	DDE S ₅ RQFS ₅ YHLLSFNAV	95	23.06	11	1319.09138	1319.09368 [M+2H] ²⁺
27	E902R	F	DDR S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	98	23.22	11	1319.09138	1319.09410 [M+2H] ²⁺
28	D901R	F	DRE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	95	23.49	18	1326.09921	1326.10126 [M+2H] ²⁺
29	D900R	F	RDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	94	23.57	9	1326.09921	1326.10216 [M+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 9. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.2.2 & 5.2.4

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. [a]	Sequenz	Reinheit [%] [b]	HPLC (tr, [min]) [c]	Ausbeute [%] [d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1a		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLSFNAV	96	25.50	5	1319.57777	1319.58045 [M+2H] ²⁺
1b	53	Ac		91	24.54	13	1073.52821	1073.53014 [M+2H] ²⁺
2a		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLAibFNAV	94	24.08	2	1304.57249	1304.56909 [M+2H] ²⁺
2b	55	Ac		97	22.99	2	1058.52293	1058.52637 [M+2H] ²⁺
3a		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLAibSFNAV	95	22.88	5	1291.54647	1291.54181 [M+2H] ²⁺
3b	56	Ac		95	21.72	25	1045.49691	1045.49999 [M+2H] ²⁺
4a		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLLAibSFNAV	99	23.40	2	1298.55430	1298.55738 [M+2H] ²⁺
4b	57	Ac		99	22.21	15	1052.50474	1052.50953 [M+2H] ²⁺
5		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α LSFN AibV	99	19.74	6	1319.57777	1319.57838 [M+2H] ²⁺
6		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α LSFN _α LV	99	21.20	6	1340.60125	1340.60437 [M+2H] ²⁺
7		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α LSFN _α FV	99	22.28	7	1357.59342	1357.59342 [M+2H] ²⁺
8		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α FSFN AibV	99	19.71	6	1336.56995	1336.57095 [M+2H] ²⁺
9		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α FSFN _α FV	93	22.00	2	1374.58558	1374.58560 [M+2H] ²⁺
10		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL _α FSFN _α LV	97	21.97	8	1357.59342	1357.59442 [M+2H] ²⁺
11		F	DDE R ₈ EQFLYH S ₅ LSFN AV	99	19.58	4	1326.58560	1326.58514 [M+2H] ²⁺
12		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL S F S ₈ AV	99	21.97	2	1352.12182	1352.12220 [M+2H] ²⁺
13		F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLL S ₅ SFN S ₅ V	96	19.67	1	1338.58450	1338.58450 [M+2H] ²⁺
14		F	DDE S ₅ EWFS ₅ YHLL S ₅ SFN S ₅ V	97	20.34	4	1367.59597	1367.59947 [M+2H] ²⁺
15	Q905F	F	DDE S ₅ EFFFS ₅ YHLL SFNAV	99	20.68	20	1315.06704	1315.06760 [M+2H] ²⁺
16	Q905L	F	DDE S ₅ ELFS ₅ YHLL SFNAV	99	20.55	17	1298.07487	1298.07485 [M+2H] ²⁺
17	Q905W	F	DDE S ₅ EWFS ₅ YHLL SFNAV	99	20.94	18	1334.57249	1334.57303 [M+2H] ²⁺
18	L911F S912F	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLF FFNAV	98	20.89	13	921.39100	921.39523[M+3H] ³⁺
19	L911F S912W	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLF WFNAV	99	20.59	12	934.39463	934.39873 [M+2H] ²⁺
20	L911F S912Y	F	DDE S ₅ EQFS ₅ YHLF YFNAV	99	19.98	12	926.72264	926.72701 [M+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-, Ac= Acetylierung,

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 10. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.2.5

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. [a]	Sequenz	Reinheit [%] [b]	HPLC (t _R , [min]) [c]	Ausbeute [%] [d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1a	73	F	DDE <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	99	18.84	7	1397.61416	1397.61878 [M+2H] ²⁺
1b		Ac		99	18.34	11	1151.56460	1151.56870 [M+2H] ²⁺
2	74	F	DDQ <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	98	18.58	5	1397.12215	1397.12705 [M+2H] ²⁺
3	75	F	DNE <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	98	18.72	4	1397.12215	1397.12548 [M+2H] ²⁺
4	76	F	NDE <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	96	18.56	7	1397.12215	1397.12598 [M+2H] ²⁺
5	77	F	DNQ <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	97	18.44	5	1396.63014	1396.63433 [M+2H] ²⁺
6	78	F	NDQ <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	95	18.30	5	1396.63014	1396.63375 [M+2H] ²⁺
7	79	F	NNE <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	95	18.53	4	1396.63014	1396.63343 [M+2H] ²⁺
8	80	F	NNQ <u>S₅</u> EWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	99	18.23	4	1396.13813	1396.14235 [M+2H] ²⁺
9a	81	F	DDE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	99	18.61	5	1397.12215	1397.12535 [M+2H] ²⁺
9b		Ac		99	18.11	13	1151.07259	1151.07747 [M+2H] ²⁺
10	82	F	DDQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	98	18.39	7	1396.63014	1396.63433 [M+2H] ²⁺
11a	83	F	DNE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	96	18.53	7	1396.63014	1396.63462 [M+2H] ²⁺
11b		Ac		99	18.06	13	1150.58058	1150.58563 [M+2H] ²⁺
12a	84	F	NDE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	98	18.45	4	1396.63014	1396.63475 [M+2H] ²⁺
12b		Ac		96	18.02	15	1150.58058	1150.58467 [M+2H] ²⁺
13	85	F	DNQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	95	18.22	4	1396.13813	1396.14375 [M+2H] ²⁺
14	86	F	NDQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	96	28.17	4	1396.13813	1396.14287 [M+2H] ²⁺
15	87	F	NNE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	99	18.32	10	1396.13813	1396.14248 [M+2H] ²⁺
16	88	F	NNQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFFN <u>S₅</u> V	95	18.03	8	1395.64613	1395.65132 [M+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-, Ac= Acetylierung,

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10–90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

Tabelle 11. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.3.2 & 5.3.3 & 5.4.1

Eintrag	Peptid	Architektur	Kohlenstoffatome Verbrückung	N-Terminale mod.	Sequenz	HPLC (t_R , [min]) ^[a]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1	99	$i, i+3$	8	Fmoc	C M W H A <u>93</u> D Q <u>90</u> F R S H L K	15.52	1064.50584	1064.51051 [M+2H] ²⁺
2	102	$i, i+4$	8	Fmoc	C M W H <u>90</u> A D Q <u>90</u> F R S H L K	14.94	1064.50584	1064.50663 [M+2H] ²⁺
3	100	$i, i+4$	9	Fmoc	C M W H <u>91</u> A D Q <u>90</u> F R S H L K	15.54	1071.51366	1071.51565 [M+2H] ²⁺
4	101	$i, i+7$	11	Fmoc	C M W H <u>95</u> A D Q F R S <u>90</u> H L K	15.58	1085.52931	1085.53116 [M+2H] ²⁺
5	^[b]	$i, i+3$	8	Fmoc	W H A <u>93</u> D Q <u>90</u> F R S H L K	16.39	1026.39934	1026.40084 [M+2H] ²⁺
6	107 ^[b]	$i, i+4$	9	Fmoc	W H <u>91</u> A D Q <u>90</u> F R S H L K	16.61	1033.40717	1033.40909 [M+2H] ²⁺
7	^[b]	$i, i+7$	11	Fmoc	W H <u>95</u> A D Q F R S <u>90</u> H L K	15.60	1047.42282	1047.42485 [M+2H] ²⁺
8	128	$i, i+4; i, i+4$	8,9	Fmoc	_{s,5} W H A _{s,5} D Q F <u>91</u> R S H <u>90</u> L K	18.03	720.05102	720.05153 [M+3H] ³⁺
9	129	$i, i+4; i, i+4$	8,9	Fmoc	W H <u>91</u> A _{s,5} D <u>90</u> Q _{s,5} F R S H L K	14.75	720.05102	720.05057 [M+3H] ³⁺

[a] Retentionszeit der nicht aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[b] Dibromiertes Olefin

Tabelle 12. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.3.4 & 5.4.2.

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. [a]	Sequenz	Reinheit [%] [b]	HPLC (t _R , [min]) [c]	Ausbeute [%] [d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1	108	F	DDE91EQF91YHLLSFNAV	98	20.04	16	1318.56995	1318.56862 [M+2H] ²⁺
2	109	F	DDE90EQF91YHLLSFNAV	95	19.83	12	1311.56212	1311.56061 [M+2H] ²⁺
3	110	F	DDE91EQF90YHLLSFNAV	97	19.34	23	1311.56212	1311.56163 [M+2H] ²⁺
4	111 [e]	F	DDE91EQF91YHLLSFNAV	96	19.04	15	1397.48829	1397.49138 [M+2H] ²⁺
5	112 [e]	F	DDE90EQF91YHLLSFNAV	88	18.01	13	1390.48046	1390.48384 [M+2H] ²⁺
6	113 [e]	F	DDE91EQF90YHLLSFNAV	97	17.52	21	1390.48046	1390.48449 [M+2H] ²⁺
7a	114	F	QGLLDALDLDAS		14.8		824.8642	824.8624 [M+2H] ²⁺
7b	115	Ac	QG125LD126LDDLDAS		11.3		1156.6214	1156.6215 [M+2H] ²⁺
8	115	F	QG125LD126LDDLDAS		9.4		858.8955	858.8945 [M+2H] ²⁺
9	116	F	QG127LD127LDDLDAS		12.2		886.9268	886.9263 [M+2H] ²⁺
10	117	F	QG93LD90LDDLDAS	95	9.7	10	870.89491	870.89535 [M+2H] ²⁺
11	118	F	QG94LD90LDDLDAS	98	9.4	7	863.88709	863.88827 [M+2H] ²⁺
12	119	F	QG93LD91LDDLDAS	98	9.4	32	863.88709	863.88784 [M+2H] ²⁺
13	120	F	QG94LD91LDDLDAS	96	8.9	40	856.87926	856.88036 [M+2H] ²⁺
14	121	F	QG91LD91LDDLDAS	97	9.7	15	870.89491	870.89502 [M+2H] ²⁺
15	122	F	QG92LD91LDDLDAS	98	9.8	6	1754.79820	1754.79757 [M+H] ⁺
16	123	F	QG91LD92LDDLDAS	97	10.2	8	877.90274	877.90332 [M+2H] ²⁺
17a	124	F	QG91LD92LDDLDAS	98	10.9	25	884.91056	884.91153 [M+2H] ²⁺
17b	124	Ac	QG92LD92LDDLDAS	98	8.3	41	1276.71473	1276.71837 [M+H] ⁺
18	133	F	DDE S ₅ EQF S ₅ YHL91SFN91V	95	19.82	15	901.39804	901.39757 [M+2H] ³⁺
19a	134	F	DDE S ₅ EQF S ₅ YHL90SFN91V	98	20.98	13	1344.58560	1344.58642 [M+2H] ²⁺
19b	134	Ac	DDE S ₅ EQF S ₅ YHL90SFN91V	98	16.70	20	1098.03212	1098.02466 [M+2H] ²⁺
20	135	F	DDE S ₅ EQF S ₅ YHL91SFN90V	98	20.21	25	1344.58560	1344.58476 [M+2H] ²⁺
21	136	F	DDE91EQF91YHL S ₅ SFN S ₅ V	97	19.88	30	901.39804	901.39818 [M+2H] ³⁺
22	137	F	DDE90EQF91YHL S ₅ SFN S ₅ V	93	18.62	12	1344.58560	1344.58396 [M+2H] ²⁺
23	138	F	DDE91EQF90YHL S ₅ SFN S ₅ V	98	18.96	54	1344.58560	1344.58768 [M+2H] ²⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-, Ac= Acetylierung,

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10–90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

[e] Dibromiertes Olefin

Tabelle 13. Übersicht aller synthetisierten Peptide aus Abschnitt 5.5.

Eintrag	Peptid	N-Terminale mod. ^[a]	Sequenz	Reinheit [%] ^[b]	HPLC (t _R , [min]) ^[c]	Ausbeute [%] ^[d]	MS (berechnet)	MS (gefunden)
1a	139	F	Myr – G A G A S A E E K H K	99	18.96	9	841.89779	841.89816 [M+2H] ²⁺
1b	140	k.M.	Myr – G A <u>R₅</u> A S E E K H K	98	14.37	10	1293.75251	1293.75635 [M+H] ⁺
2	141	F	Myr – G A <u>R₅</u> A S E E K H K	99	21.32	8	1804.89786	1804.89759 [M+H] ⁺
3	141	F	Myr – G <u>R₅</u> G A <u>S₅</u> A E E K H K	99	21.30	11	1774.88729	1774.88848 [M+H] ⁺
4a	142	F	Myr – G A G A S <u>S₅</u> E E K <u>S₅</u> K	98	24.00	10	862.93384	862.93349 [M+2H] ²⁺
4b	142	k.M.	Myr – G A G A S <u>S₅</u> E E K <u>S₅</u> K	99	15.78	14	1335.82461	1335.82915 [M+H] ⁺
5	143	F	Myr – G A G A S A <u>R₅</u> E E K <u>S₅</u> K	97	23.05	8	833.93110	833.93099 [M+2H] ²⁺
6	144	F	Myr – G A G A S <u>R₅</u> E E <u>S₅</u> H K	98	22.13	9	867.41582	867.41581 [M+2H] ²⁺
7	145	F	Lau – G A G A S <u>S₅</u> E E K <u>S₅</u> K	99	19.20	9	848.91819	848.91835 [M+2H] ²⁺
8	146	F	Lau – G A G A S A <u>R₅</u> E E K <u>S₅</u> K	98	19.86	7	819.91545	819.91577 [M+2H] ²⁺
9	147	F	Lau – G A G A S <u>R₅</u> E E <u>S₅</u> H K	98	19.22	8	853.40017	853.40034 [M+2H] ²⁺
10a	148	F	Ac – G A G A S <u>S₅</u> E E K <u>S₅</u> K	98	10.86	11	1556.67261	1556.67615 [M+H] ⁺
10b	148	k.M.	Ac – G A G A S <u>S₅</u> E E K <u>S₅</u> K	98	7.16	12	1167.63681	1167.64016 [M+H] ⁺

[a] F = Fluoreszein-PEG-k.M. = keine Modifikation, Ac= Acetylierung

[b] Bestimmt anhand der UV-Absorption bei 210 nm

[c] Retentionszeit der aufgereinigten Peptide mittels analytischer HPLC (10-90% MeCN (0.1% TFA), 30 min)

[d] Die Ausbeute der Peptide wurde auf die vom Hersteller angegebene initiale Beladungsdichte bezogen und die Peptidmenge anhand der Fluoreszein-Absorption bei 496 nm bestimmt. Die Ausbeute von Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung wurde gravimetrisch bestimmt.

7.5 Biochemische und biophysikalische Experimente

7.5.1 Präparativer Nukleotid austausch zu GppNHp

Rab-GTPasen liegen nach Expression und Aufreinigung aufgrund ihrer intrinsischen Hydrolyseaktivität im GDP-gebundenen Zustand vor. Um einen Nukleotid austausch *in vitro* zu ermöglichen wurde zuerst das Mg^{2+} entfernt um die Affinität gegenüber dem gebundenen Nukleotid zu reduzieren. Dazu wurde die jeweilige Rab-GTPase mit einem fünffachen Überschuss von EDTA für 1 h bei Zimmerpermpemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf 4 °C abgekühlt und durch Filtration über eine Entsalzungssäule mit einem Elutionspuffer (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP) entsalzt. Um Präzipitation zu vermeiden wurde eine Proteinkonzentration von <100 µM eingestellt. Nach der Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ (200 mM), $ZnCl_2$ (500 µM), alkalische Phosphatase (5 U/mg GTPase) sowie einem vierfachen Überschuss GppNHp wurde die Proteinmischung für 16 h bei 4 °C am Rotator inkubiert. Abschließend wurde die Rab-GTPase mittels Filtration über eine Entsalzungssäule umgepuffert (Puffer: 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 1mM $MgCl_2$, 1 µM Nukleotid), durch Zentrifugation aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der Erfolg des Nukleotid austauschs wurde mit Hilfe von analytischer Umkehrphasen-HPLC überprüft.

7.5.2 Herstellung nukleotidfreier GTPasen

Zur Herstellunf nukleotidfreier GTPasen wurde die Rab-GTPase zur Entfernung des Mg^{2+} zunächst mit einem fünffachen Überschuss an EDTA für 1 h bei Zimmerpermpemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf 4 °C abgekühlt und durch Filtration über eine Entsalzungssäule mit einem Elutionspuffer (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP) entsalzt. Um Präzipitation zu vermeiden wurde eine Proteinkonzentration von <100 µM eingestellt und die Proteinmischung nach der Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ (200 mM), $ZnCl_2$ (500 µM) und alkalischer Phosphatase (5 U/mg GTPase) für 16 h bei 4 °C am Rotator inkubiert. Das Protein wurde durch Zentrifugation aufkonzentriert und direkt eingesetzt. Der Erfolg des Nukleotid austauschs wurde mit Hilfe von analytischer Umkehrphasen-HPLC überprüft.

7.5.3 Analytische Umkehrphasen-HPLC von GTPasen

Der Erfolg des Nuleotid austauschs lässt sich mit Hilfe von analytischer Umkehrphasen-HPLC verfolgen. Mittels isokratischer Elution (Puffer: 50 mM Kaliumphosphat pH 8.0, 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 8 % (v/v) Acetonitril, Flussrate 0.5 mL/min über 12 min) auf einer C_{18} -Säule wurden die Guaninnukleotide GDP, GTP, GppNHp aufgetrennt. Die GTPase wird auf der Vorsläule denaturiert und gibt das Nukleotid frei. Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von 256 nm.

7.5.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung und Analyse von Proteingemischen wurde denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli eingesetzt.³²⁴ Die Proteine wurden zunächst in einem Sammelgel konzentriert und in einem 10 – 15%-igen Trenngel nach Molekulargewicht und Ladung aufgetrennt. Sammel- und Trenngel wurden anhand der in Tabelle 14 aufgeführten Mischungsverhältnisse in einer BioRad Mini-Protean-II System Kassette gegossen.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit SDS-PAGE Probenpuffer(5×) versetzt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Die aufgetrennten Proteine wurden durch kurzes Aufkochen in Coomassie-Lösung eingefärbt und ihre Größe anhand eines Molekulargewichtsstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, *Fermentas*) eingeordnet. Zur Analyse mittels Western-Blot wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und nicht mit Coomassie-Lösung behandelt.

Tabelle 14. Mischverhältnisse eines 15%-igen Polyacrylamidgels. Gele mit abweichendem Polyacrylamidgehalt wurden mit entsprechenden Mengen Acrylamid/Bisacrylamid hergestellt.

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	0.35 mL	-
Trenngelpuffer	-	1.1 mL
10% SDS (w/v)	27 µL	45 µL
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (37.5/1) (w/v)	0.45 mL	2.2 mL
10% APS (w/v)	27 µL	45 µL
TMEDA	3 µL	2 µL
Wasser	1 mL	1 mL

7.5.5 Proteinexpression und -reinigung

7.5.5.1 Rab-Proteine

Rab9a₁₋₂₀₃ und Rab11a₁₋₂₁₈ wurden von der Dortmund Protein Facility (<http://www.mpi-dortmund.mpg.de/misc/dpf>) in pOPINF Vektoren (*N*-terminal His₆-tag gefolgt von einer Schnittstelle für PreScission Protease) mittels der *infusion cloning method*³²⁵ kloniert und in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Induktion erfolgte mit 0.3 mM Isopropyl-β-dithiogalactopyranosid (IPTG) bei 25 °C für 24 h. Die Reinigung von Rab9a und Rab11a erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie in 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 1 µM GDP. Der His₆-Tag wurde mit PreScission Protease abgespalten.

Die Expression von Rab1b₃₋₁₇₄, Rab5a₂₋₂₁₆, Rab6a₂₋₂₁₁, Rab7a₂₋₂₀₇, Rab8a_{fl}, Rab8a₆₋₁₇₆, OCRL1₅₃₉₋₉₀₁ und Rabin8 wurde von Frau Nathalie Bleimling gemäß etablierter Protokolle in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

durchgeführt und die Rab-GTPasen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.^{326–329}

7.5.5.2 14-3-3

Die Expression von 14-3-3 wurde von M. Sc. David Bier durchgeführt und erfolgte in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) anhand etablierter Protokolle.⁷⁴ Die Induktion erfolgte mit 0.5 mM IPTG bei 20 °C für 14 h und das Zielprotein wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der His₆-Tag wurde mit Tobacco Etch Virus (TEV) Protease abgespalten und durch Größenausschlusschromatographie in 25 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol abgetrennt.

7.5.5.3 UNC119

Die Expression von UNC119a wurde von Frau Christine Novak in *Escherichia coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0.1 mM IPTG bei 18 °C für 16 h. Das Zielprotein wurde mittels Glutathion-S-Transferasen Affinitätschromatographie aufgereinigt und der Tag auf einer GSH-Säule bei 4 °C für 16 h mit Thrombin abgespalten. UNC119b wurde anhand etablierter Protokolle exprimiert und aufgereinigt.²²⁵

7.5.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm oder mittels der Methode nach Bradford.

7.5.6.1 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch UV-Detektion bei 280 nm und anschließender Berechnung gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

7.5.6.2 Bradford

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde photometrisch mit Hilfe von Bradford-Reagenz (Bio-Rad) bestimmt. Ein Gemisch aus 1 µL Protein-Lösung wurde mit 999 µL Bradford-Lösung für 5 min inkubiert und die Absorption des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 bei 595 nm gemessen. Die Konzentration wurde anschließend anhand einer für BSA erstellten Eichgerade berechnet.

7.5.7 Unspezifische Funktionalisierung von Proteinen mit NHS-Fluorescein

Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 2 – 4 mg/mL in einem Puffer aus 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP und 1 mM MgCl₂ für 16 h bei 4 °C mit NHS-Fluorescein (15 Äq, 21 mM in DMSO) inkubiert. Das überschüssige NHS-Fluorescein wurde anschließend durch Filtration über eine NAP-5 Säule (Sephadex G-25, DNA Grade, GE Healthcare) abgetrennt.

7.5.8 Herstellung von Zelllysaten

HCT116-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 - 100% mit TBS gewaschen und nach dem Abkühlen auf 4 °C mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Anschließend wurde die Zellen in wenig Lysepuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF und 0.5% NP40) suspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall (3× 15 s bei 40%) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 16,900 × g) abgetrennt und der Überstand als Zelllysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

7.5.9 Präzipitationsexperiment (Pull-Down)

Eine Lösung aus biotinylierten Peptiden (100 µL, 10 µM) wurde mit Streptavidin beschichteten, magnetischen Kunststoffkügelchen (Dynabeads M280, Invitrogen) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS + 0.01% Tween-20 wurden die Kügelchen mit Lysat von HCT116 Zellen (100 µL, 5.4 g/L) angereichert und mit Rab8a (0.9 Gew.-%, 1µM) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Zelllysate wurde entfernt und die Kügelchen dreimal mit TBS + 0.01% Tween-20 gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden durch Erhitzen in SDS-Gel-Beladungspuffer (95°C, 10 min) eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot detektiert.

7.5.10 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Für den Elektrotransfer von Polyacrylamid-Gelen wurde eine Halbtrockenzelle verwendet, bei der das Gel und die PVDF-Membran zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren und zwei Plattenelektroden eingeklemmt wurden. Der Elektrotransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V für 60 min.

7.5.11 Detektion mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern

Die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran wurden in einem ersten Schritt durch Inkubation in Blockierpuffer (5% Milchpulver in TBST) für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 12 h bei 4 °C mit einer Lösung aus Rab8a spezifischen Primärantikörper in Blockierpuffer (1: 1000) inkubiert. Nach 3×10 min Waschen mit TBS + 0.01% Tween-20 wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (HRP-rabbit, 1:10 000 in TBST mit 5% Milchpulver) behandelt und nach erneutem Waschen das Fluoreszenzsignal an einem Odyssey Fc Imager (LI-COR *Biosciences*) detektiert.

7.5.12 Fluoreszenzpolarisations Assay zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Fluoreszenzpolarisations (FP) Messungen erfolgten in 384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding, *Greiner*) an einem Safarier² Plattenleser (*Tecan*). Dafür wurden die Proteine seriell in Messpuffer für nukleotid gebundene bzw. nukleotid-freie GTPasen verdünnt und mit 66 nM des Fluorescein-markierten Peptids für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Fluoreszenzpolarisation bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm.

Die initiale Affinitätsbestimmungen erfolgten als Einzelmessungen und die Dissoziationskonstanten (K_d) wurden mittels nicht-linearer Regression in der Software Prism 5.0 (*Graphpad*) berechnet.³³⁰ Die finalen Bestimmungen der Dissoziationskonstanten der wichtigsten Peptide erfolgten in Dreifachmessungen. Die gemessene Fluoreszenzanisotropie wurde entsprechend der Änderung der Fluoreszenzintensität nach Bindung korrigiert und der gebundene Anteil nach **(Gleichung 1)** bestimmt. Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes wurde anschließend unter Annahme einer einzigen Bindungsstelle die Dissoziationskonstante K_D durch nicht-lineare Regression in Prism 5.0 (*Graphpad*) berechnet

(Gleichung 2).³³¹ In Fällen bei denen aufgrund zu geringer Stabilität der nukleotid-freien Rab-GTPasen kein Plateau erreicht werden konnte wurde das Plateau anhand vergleichbarer Daten abgeschätzt und die Kurve extrapoliert.

$$\text{gebundener Anteil} = \frac{A - A_{\text{frei}}}{A - A_{\text{frei}} + Q(A_{\text{gebunden}} - A)} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

A: beobachtete Anisotropie; A_{frei} : Anisotropie des freien Fluorophors; A_{gebunden} Anisotropie des gebundenen Fluorophors; Q: Verhältnis der Fluoreszenzintensität im freien und gebundenen Zustand

$$\text{gebundener Anteil} = \frac{K_d + L_T + c_{\text{Protein}} - \sqrt{(K_d + L_T + c_{\text{Protein}})^2 - 4L_T c_{\text{Protein}}}}{2L_T} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

K_d : Dissoziationskonstante; L_T : Konzentration des markierten Peptids; c_{Protein} : Proteinkonzentration

7.5.13 FP-Kompetitionsexperimente

Die nicht-markierten Peptide wurden seriell in Messpuffer in 384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding, *Greiner*) verdünnt und mit einem Gemisch aus Fluorescein-markiertem Peptid und Protein für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenzpolarisation wurde an einem Safarier² Plattenleser (*Tecan*) gemessen und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) mittels nicht-linearer Regression in der Software Prism 5.0 (*Graphpad*) berechnet.³³⁰

7.5.14 Microscale Thermophorese Messungen

Die Proteine wurden seriell in 384-Loch-Platten (small volume, black, flat-bottom, non-binding, *Greiner*) verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur mit 60 nM Fluorescein-markiertem Peptid inkubiert. Anschließend wurde die Protein-Lösung in Kapillaren aufgezogen und die MST Messungen mit einem Monolith NT.115 (*NanoTemper Technologies*) durchgeführt. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte mit der Software Monolith Affinity Analysis (*NanoTemper Technologies*).

7.5.15 Co-Kristallisation

Die Co-Kristallisation von Peptid **124** und 14-3-3 ζ wurde von M. Sc. David Bier durchgeführt. Dazu wurden Peptid und Protein in einem molaren Verhältnis von 1:1.5 mit einer finalen Konzentration von 22 mg/mL in 25 mM HEPES/NaOH pH 7.2, 2 mM $MgCl_2$, 1.0 mM β -Mercaptoethanol für 16 h bei 0 °C vorinkubiert. Die Kristallisation erfolgte innerhalb von drei Wochen nach der *hanging drop* Methode in EasyXtal (*Qiagen*) Platten und in einer Lösung aus 1.26 M Trinatriumcitrat, 0.09 M HEPES pH 7.5, 10% Glycerol und Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen Glycerol (6 to 12 %). Die Streuungsdaten wurden am Paul Scherrer Institut (PSI) in Villingen, Schweiz, bei einer Streuung von 2.4 Å mit einer PXII - X10SA Beamline für Protein Kristallisation aufgenommen. Die kristallographische Analyse wurde von M. Sc. Kerstin Wallraven mit der Software XDS15 durchgeführt. Der molekulare Ersatz erfolgte mit der Software CCP4 und das Model wurde mit der Software COOT erstellt.

7.5.16 Isotherme Titrationskalorimetrie Messungen

Eine Lösung aus UNC119a in 150 μ L Dialysepuffer wurde in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer, *ThermoFischer*, 10 000 MWCO) überführt und für 16 h bei 4 °C langsam in 2 L Dialysepuffer gerührt. Anschließend wurde das Protein in einem MicroCal iTC200 (*Malvern*) vorgelegt und gegen Peptid **142** titriert. Als Kontrolle wurde ebenfalls Puffer gegen Puffer, Puffer gegen Peptid und Protein gegen Puffer titriert. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software Origin 7.0.

7.5.17 Zellkultur

HeLa-Zellen wurden einschichtig in 10 cm Gewebekulturschalen in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 10 % fötalem Kälberserum und nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei 5% CO₂ gelagert. Zur Herstellung von Subkulturen wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst. Eine Subkultur wurde alle 3-4 Tage erstellt.

7.5.18 Durchflusszytometrie Messungen

HeLa-Zellen wurden nach 24 h in 24-Loch-Platten mit einer 5 µM Peptidlösung in Medium bei einer finalen DMSO Konzentration von 0.5% für 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, geerntet und in PBS resuspendiert. Die zelluläre Aufnahme der Peptide wurde bei einer Wellenlänge von 530 nm mit einem Durchflusszytometer (*BD Biosciences, LSRII*) bestimmt.

7.5.19 Immunofluoreszenz Bilder

HeLa-Zellen wurden in DMEM inkubiert und für 18 h mit fluoreszenz-markiertem Peptid inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit 0.1% Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde Rab8 mit einem primären anti-Rab8 Antikörper (*Cell Signaling, Rab8 (D22D8) XP, #6975*) und einem donkey anti-rabbit Alexa594-Konjugat (*Thermo Fisher, A-21207*) markiert sowie die DNA mit *Hoechst33342* (1 µg/ml). Die Proben wurden mit einer *Leica TCS SP5* und einem HCX PL APO Objektiv aufgenommen.

7.5.20 Proteasestabilität

Aus 10 mM DMSO Vorratslösungen wurden Peptidlösungen mit 55.5 µM Peptid in Assay Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) erstellt sowie eine Vorratslösung Proteinase K (100 µg/mL) in Assay Puffer. Die Proteolysereaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µL bei einer finalen Konzentration von 50 µM Peptid und 10 µg/mL Proteinase K bei Raumtemperatur in Dreifachmessungen durchgeführt. Bei jedem Messpunkt wurden 50 µL Reaktionslösung mit 100 µL einer MeCN/Wasser (1:1) + 1% TFA Lösung versetzt und mittels analytischer HPLC untersucht. Die Menge intakten Peptids wurde mittels Absorption bei 210 nm quantifiziert und die Halbwertszeit mittels exponentiellem Zerfall in der Software Prism 5.0 (*Graphpad*) berechnet.³³⁰

8 Literatur

1. Craik, D. J. Fairlie, D. P. Liras, S. & Price, D. The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug. Des.* **81**, 136–147 (2013).
2. Fosgerau, K. & Hoffmann, T. Peptide therapeutics. Current status and future directions. *Drug Discov. Today* **20**, 122–128 (2015).
3. Nevola, L. & Giralt, E. Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides. *Chem. Commun.* **51**, 3302–3315 (2015).
4. Kaspar, A. A. & Reichert, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today* **18**, 807–817 (2013).
5. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27**, 2985–2993 (1894).
6. Koshland, D. E. Correlation of Structure and Function in Enzyme Action. *Science* **142**, 1533–1541 (1963).
7. Gilon, C. Halle, D. Chorev, M. Selincer, Z. & Byk, G. Backbone cyclization. A new method for conferring conformational constraint on peptides. *Biopolymers* **31**, 745–750 (1991).
8. Bock, J. E. Gavenonis, J. & Kritzer, J. A. Getting in Shape: Controlling Peptide Bioactivity and Bioavailability Using Conformational Constraints. *ACS Chem. Biol.* **8**, 488–499 (2013).
9. Fominaya, J. Bravo, J. & Rebollo, A. Strategies to stabilize cell penetrating peptides for in vivo applications. *Ther. Deliv.* **6**, 1171–1194 (2015).
10. Peterson-Kaufman, K. J. *et al.* Residue-Based Preorganization of BH3-Derived α/β -Peptides: Modulating Affinity, Selectivity and Proteolytic Susceptibility in α -Helix Mimics. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1667–1675 (2015).
11. Pelay-Gimeno, M. Glas, A. Koch, O. & Grossmann, T. N. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 8896–8927 (2015).
12. Raj, M. Bullock, B. N. & Arora, P. S. Plucking the high hanging fruit: A systematic approach for targeting protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4051–4057 (2013).
13. Watkins, A. M. & Arora, P. S. Structure-based inhibition of protein-protein interactions. *Eur. J. Med. Chem.* **94**, 480–488 (2015).
14. Milroy, L.-G. Grossmann, T. N. Hennig, S. Brunsveld, L. & Ottmann, C. Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chem. Rev.* **114**, 4695–4748 (2014).

15. Hill, T. A. Shepherd, N. E. Diness, F. & Fairlie, D. P. Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 13020–13041 (2014).
16. Cromm, P. M. Spiegel, J. & Grossmann, T. N. Hydrocarbon Stapled Peptides as Modulators of Biological Function. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1362–1375 (2015).
17. Azzarito, V. Long, K. Murphy, N. S. & Wilson, A. J. Inhibition of α -helix-mediated protein–protein interactions using designed molecules. *Nature Chem.* **5**, 161–173 (2013).
18. Patgiri, A. Jochim, A. L. & Arora, P. S. A Hydrogen Bond Surrogate Approach for Stabilization of Short Peptide Sequences in α -Helical Conformation. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1289–1300 (2008).
19. Jayatunga, M. K. P. Thompson, S. & Hamilton, A. D. α -Helix mimetics: outwards and upwards. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 717–724 (2014).
20. Jubb, H. Higuieruelo, A. P. Winter, A. & Blundell, T. L. Structural biology and drug discovery for protein–protein interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 241–248 (2012).
21. Baker, N. M. & Der, C. J. Cancer: Drug for an 'undruggable' protein. *Nature* **497**, 577–578 (2013).
22. Cox, A. D. Fesik, S. W. Kimmelman, A. C. Luo, J. & Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug. Discov.* **13**, 828–851 (2014).
23. Cromm, P. M. Spiegel, J. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 13516–13537 (2015).
24. Spiegel, J. Cromm, P. M. Zimmermann, G. Grossmann, T. N. & Waldmann, H. Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 613–622 (2014).
25. Stephen, A. G. Esposito, D. Bagni, R. K. & McCormick, F. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell* **25**, 272–281 (2014).
26. Zinzalla, G. & Thurston, D. E. Targeting protein–protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future. *Fut. Med. Chem.* **1**, 65–93 (2009).
27. Stumpf, M. P. H. *et al.* Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 6959–6964 (2008).
28. Venkatesan, K. *et al.* An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**, 83–90 (2009).
29. Ryan, D. P. & Matthews, J. M. Protein–protein interactions in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 441–446 (2005).
30. Fuller, J. C. Burgoyne, N. J. & Jackson, R. M. Predicting druggable binding sites at the protein–protein interface. *Drug Discov. Today* **14**, 155–161 (2009).

31. Surade, S. & Blundell, T. L. Structural biology and drug discovery of difficult targets: the limits of ligandability. *Chem. Biol.* **19**, 42–50 (2012).
32. Wells, J. A. & McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**, 1001–1009 (2007).
33. Moreira, I. S. Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* **68**, 803–812 (2007).
34. Aeluri, M. *et al.* Small molecule modulators of protein-protein interactions: selected case studies. *Chem. Rev.* **114**, 4640–4694 (2014).
35. Mueller, R. *et al.* Iterative experimental and virtual high-throughput screening identifies metabotropic glutamate receptor subtype 4 positive allosteric modulators. *J. Mol. Model.* **18**, 4437–4446 (2012).
36. Hajduk, P. J. & Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 211–219 (2007).
37. Murray, C. W. & Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* **1**, 187–192 (2009).
38. Arkin, M. R. Tang, Y. & Wells, J. A. Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality. *Chem. Biol.* **21**, 1102–1114 (2014).
39. Guarracino, D. A. Bullock, B. N. & Arora, P. S. Protein-protein interactions in transcription: A fertile ground for helix mimetics. *Biopolymers* **95**, 1–7 (2011).
40. Wójcik, P. & Berlicki, Ł. Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 707–713 (2016).
41. Houk, K. N. Leach, A. G. Kim, S. P. & Zhang, X. Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4872–4897 (2003).
42. J. Martin Scholtz & and Robert L. Baldwin. The Mechanism of alpha-Helix Formation by Peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 95–118 (1992).
43. Driggers, E. M. Hale, S. P. Lee, J. & Terrett, N. K. The exploration of macrocycles for drug discovery--an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 608–624 (2008).
44. Mallinson, J. & Collins, I. Macrocycles in new drug discovery. *Future Med. Chem.* **4**, 1409–1438 (2012).
45. Marsault, E. & Peterson, M. L. Macrocycles are great cycles: applications, opportunities, and challenges of synthetic macrocycles in drug discovery. *J. Med. Chem.* **54**, 1961–2004 (2011).
46. Dharanipragada, R. New modalities in conformationally constrained peptides for potency, selectivity and cell permeation. *Future Med. Chem.* **5**, 831–849 (2013).
47. Katsara, M. *et al.* Round and Round we Go. Cyclic Peptides in Disease. *CMC* **13**, 2221–2232 (2006).

48. Clark, R. J. Akcan, M. Kaas, Q. Daly, N. L. & Craik, D. J. Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon* **59**, 446–455 (2012).
49. Bhat, A. Roberts, L. R. & Dwyer, J. J. Lead discovery and optimization strategies for peptide macrocycles. *Eur. J. Med. Chem.* (2014).
50. Hruby, V. J. Peptide science: exploring the use of chemical principles and interdisciplinary collaboration for understanding life processes. *J. Med. Chem.* **46**, 4215–4231 (2003).
51. White, C. J. & Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.* **3**, 509–524 (2011).
52. Montalbetti, C. A. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
53. Parenty, A. Moreau, X. Niel, G. & Campagne, J.-M. Update 1 of: macrolactonizations in the total synthesis of natural products. *Chem. Rev.* **113**, PR1-40 (2013).
54. Góngora-Benítez, M. Tulla-Puche, J. & Albericio, F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chem. Rev.* **114**, 901–926 (2014).
55. Vasco, A. V. *et al.* Macrocyclization of Peptide Side Chains by the Ugi Reaction: Achieving Peptide Folding and Exocyclic N-Functionalization in One Shot. *J. Org. Chem.* **80**, 6697–6707 (2015).
56. Turner, R. A. Oliver, A. G. & Lokey, R. S. Click chemistry as a macrocyclization tool in the solid-phase synthesis of small cyclic peptides. *Org. Lett.* **9**, 5011–5014 (2007).
57. Mendive-Tapia, L. *et al.* New peptide architectures through C-H activation stapling between tryptophan-phenylalanine/tyrosine residues. *Nat. Commun.* **6**, 7160 (2015).
58. Pérez de Vega, María Jesús, García-Aranda, M. I. & González-Muñiz, R. A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry: Mimicking secondary architectures in bioactive peptides. *Med. Res. Rev.* **31**, 677–715 (2011).
59. Wang, D. Chen, K. Kulp Iii, John L & Arora, P. S. Evaluation of biologically relevant short alpha-helices stabilized by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9248–9256 (2006).
60. Fürstner, A. Alkyne metathesis on the rise. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2794–2819 (2013).
61. Aguilera, B. *et al.* Synthesis of Diaminosuberic Acid Derivatives via Ring-Closing Alkyne Metathesis. *J. Org. Chem.* **66**, 3584–3589 (2001).
62. IJsselstijn, M. *et al.* Ring-closing alkyne metathesis mediated synthesis of cyclic β -turn mimetics. *Tetrahedron Letters* **45**, 4379–4382 (2004).
63. Ghalit, N. Poot, A. J. Fürstner, A. Rijkers, D. T. S. & Liskamp, R. M. J. Ring-closing alkyne metathesis approach toward the synthesis of alkyne mimics of thioether A-, B-, C-, and DE-ring systems of the lantibiotic nisin Z. *Org. Lett.* **7**, 2961–2964 (2005).

64. Baeriswyl, V. & Heinis, C. Polycyclic Peptide Therapeutics. *Chem. Med. Chem.* **8**, 377–384 (2013).
65. Korsinczyk, M. Schirra, H. & Craik, D. Sunflower Trypsin Inhibitor-1. *CPPS* **5**, 351–364 (2004).
66. Saether, O. *et al.* Elucidation of the Primary and Three-Dimensional Structure of the Uterotonic Polypeptide Kalata B1. *Biochemistry* **34**, 4147–4158 (1995).
67. Daly, N. L. Rosengren, K. J. & Craik, D. J. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 918–930 (2009).
68. Craik, D. J. Daly, N. L. Bond, T. & Waite, C. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* **294**, 1327–1336 (1999).
69. Henriques, S. T. & Craik, D. J. Cyclotides as templates in drug design. *Drug Discov. Today* **15**, 57–64 (2010).
70. Northfield, S. E. *et al.* Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. *Eur. J. Med. Chem.* **77**, 248–257 (2014).
71. Poth, A. G. Chan, L. Y. & Craik, D. J. Cyclotides as grafting frameworks for protein engineering and drug design applications. *Biopolymers* **100**, 480–491 (2013).
72. Heinis, C. Rutherford, T. Freund, S. & Winter, G. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 502–507 (2009).
73. Angelini, A. *et al.* Bicyclic peptide inhibitor reveals large contact interface with a protease target. *ACS Chem. Biol.* **7**, 817–821 (2012).
74. Glas, A. *et al.* Constrained Peptides with Target-Adapted Cross-Links as Inhibitors of a Pathogenic Protein-Protein Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2489–2493 (2014).
75. Karle, I. L. Awasthi, S. K. & Balaram, P. A designed beta-hairpin peptide in crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8189–8193 (1996).
76. Nowick, J. S. Smith, E. M. & Pairish, M. Artificial small beta-sheets. *Chem. Soc. Rev.* **25**, 401–415 (1996).
77. Venkatraman, J. Shankaramma, S. C. & Balaram, P. Design of Folded Peptides. *Chem. Rev.* **101**, 3131–3152 (2001).
78. Bullock, B. N. Jochim, A. L. & Arora, P. S. Assessing Helical Protein Interfaces for Inhibitor Design. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14220–14223 (2011).
79. Andrews, M. J. & Tabor, A. B. Forming stable helical peptides using natural and artificial amino acids. *Tetrahedron* **55**, 11711–11743 (1999).
80. Barazza, A. *et al.* Bioactive N-terminal undecapeptides derived from parathyroid hormone: the role of alpha-helicity. *J. Pept. Res.* **65**, 23–35 (2005).

81. Toniolo, C. *et al.* Structures of peptides from alpha-amino acids methylated at the alpha-carbon. *Biopolymers* **33**, 1061–1072 (1993).
82. Dehner, A. *et al.* Solution Structure, Dimerization, and Dynamics of a Lipophilic α /310-Helical, C α -Methylated Peptide. Implications for Folding of Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society. J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6678–6686 (2001).
83. Kundu, R. *et al.* Hybrid organic-inorganic inhibitors of a PDZ interaction that regulates the endocytic fate of CFTR. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 7217–7220 (2012).
84. Zaykov, A. N. & Ball, Z. T. A general synthesis of dirhodium metalloptides as MDM2 ligands. *Chem. Commun.* **47**, 10927–10929 (2011).
85. Pilsl, L. A. & Reiser, O. α/β -Peptide foldamers: state of the art. *Amino Acids. Amino Acids* **41**, 709–718 (2011).
86. Chongsiriwatana, N. P. *et al.* Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2794–2799 (2008).
87. Sun, J. & Zuckermann, R. N. Peptoid polymers: a highly designable bioinspired material. *ACS Nano* **7**, 4715–4732 (2013).
88. Yin, H. *et al.* Terphenyl-Based Bak BH3 alpha-helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of Bcl-xL. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10191–10196 (2005).
89. Douse, C. H. *et al.* Crystal structures of stapled and hydrogen bond surrogate peptides targeting a fully buried protein-helix interaction. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2204–2209 (2014).
90. Mimna, R. Tuchscherer, G. & Mutter, M. Toward the Design of Highly Efficient, Readily Accessible Peptide N-caps for the Induction of Helical Conformations. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **13**, 237–244 (2007).
91. Cabezas, E. & Satterthwait, A. C. The Hydrogen Bond Mimic Approach. Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3862–3875 (1999).
92. Jochim, A. L. & Arora, P. S. Assessment of helical interfaces in protein-protein interactions. *Mol. Biosyst.* **5**, 924–926 (2009).
93. Chapman, R. N. Dimartino, G. & Arora, P. S. A highly stable short alpha-helix constrained by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12252–12253 (2004).
94. Henchey, L. K. *et al.* Inhibition of hypoxia inducible factor 1-transcription coactivator interaction by a hydrogen bond surrogate alpha-helix. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 941–943 (2010).
95. Patgiri, A. Yadav, K. K. Arora, P. S. & Bar-Sagi, D. An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 585–587 (2011).
96. He, Y. Chen, D. & Zheng, W. An enhanced functional interrogation/manipulation of intracellular signaling pathways with the peptide 'stapling' technology. *Oncogene* **34**, 5685–5698 (2015).

97. Jackson, D. Y. King, D. S. Chmielewski, J. Singh, S. & Schultz, P. G. General approach to the synthesis of short α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9391–9392 (1991).
98. Bracken, C. Gulyas, J. Taylor, J. W. & Baum, J. Synthesis and Nuclear Magnetic Resonance Structure Determination of an α -Helical, Bicyclic, Lactam-Bridged Hexapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6431–6432 (1994).
99. Kawamoto, S. A. *et al.* Design of triazole-stapled BCL9 α -helical peptides to target the β -catenin/B-cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) protein-protein interaction. *J. Med. Chem.* **55**, 1137–1146 (2012).
100. Lau, Y. H. *et al.* Functionalised staple linkages for modulating the cellular activity of stapled peptides. *Chem. Sci.* **5**, 1804 (2014).
101. Lau, Y. H. *et al.* Double Strain-Promoted Macrocyclization for the Rapid Selection of Cell-Active Stapled Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 15410–15413 (2015).
102. Muppidi, A. Wang, Z. Li, X. Chen, J. & Lin, Q. Achieving cell penetration with distance-matching cysteine cross-linkers: a facile route to cell-permeable peptide dual inhibitors of Mdm2/Mdmx. *Chem. Commun.* **47**, 9396–9398 (2011).
103. Zhang, F. Timm, K. A. Arndt, K. M. & Woolley, G. A. Photocontrol of coiled-coil proteins in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3943–3946 (2010).
104. Nevola, L. *et al.* Light-regulated stapled peptides to inhibit protein-protein interactions involved in clathrin-mediated endocytosis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 7704–7708 (2013).
105. Wang, Y. & Chou, D. H.-C. A Thiol-Ene Coupling Approach to Native Peptide Stapling and Macrocyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 10931–10934 (2015).
106. Assem, N. Ferreira, D. J. Wolan, D. W. & Dawson, P. E. Acetone-Linked Peptides: A Convergent Approach for Peptide Macrocyclization and Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 8665–8668 (2015).
107. de Araujo, Aline D. *et al.* Comparative α -Helicity of Cyclic Pentapeptides in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6965–6969 (2014).
108. Werner, H. M. Cabalteja, C. C. & Horne, W. S. Peptide Backbone Composition and Protease Susceptibility: Impact of Modification Type, Position, and Tandem Substitution. *Chembiochem* **17**, 712–718 (2016).
109. Sawyer, T. K. Guerlavais, V. Darlak, K. & Feyfant, E. in *Levin (Ed.) 2015 – Macrocycles in Drug Discovery*, pp. 339–366.
110. Blackwell, H. E. & Grubbs, R. H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 3281–3284 (1998).
111. Schafmeister, C. E. Po, J. & Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5891–5892 (2000).

112. Walensky, L. D. *et al.* Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science* **305**, 1466–1470 (2004).
113. Walensky, L. D. & Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *J. Med. Chem.* **57**, 6275–6288 (2014).
114. Kim, Y.-W. Kutchukian, P. S. & Verdine, G. L. Introduction of All-Hydrocarbon $i, i+3$ Staples into α -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis. *Org. Lett.* **12**, 3046–3049 (2010).
115. Shim, S. Y. Kim, Y.-W. & Verdine, G. L. A new $i, i+3$ peptide stapling system for α -helix stabilization. *Chem. Biol. Drug. Des.* **82**, 635–642 (2013).
116. Kutchukian, P. S. Yang, J. S. Verdine, G. L. & Shakhnovich, E. I. All-atom model for stabilization of alpha-helical structure in peptides by hydrocarbon staples. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4622–4627 (2009).
117. Hilinski, G. J. *et al.* Stitched α -Helical Peptides via Bis Ring-Closing Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12322 (2014).
118. Kim, Y.-W. Grossmann, T. N. & Verdine, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nat. Protoc.* **6**, 761–771 (2011).
119. Kim, Y.-W. & Verdine, G. L. Stereochemical effects of all-hydrocarbon tethers in $i, i+4$ stapled peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2533–2536 (2009).
120. Bird, G. H. *et al.* Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14093–14098 (2010).
121. Bird, G. H. *et al.* Mucosal delivery of a double-stapled RSV peptide prevents nasopulmonary infection. *J. Clin. Invest.* (2014).
122. Zhang, H. *et al.* Antiviral activity of α -helical stapled peptides designed from the HIV-1 capsid dimerization domain. *Retrovirology* **8**, 28 (2011).
123. Zhang, H. *et al.* A Cell-penetrating Helical Peptide as a Potential HIV-1 Inhibitor. *J. Mol. Biol.* **378**, 565–580 (2008).
124. Long, Y.-Q. *et al.* Design of cell-permeable stapled peptides as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 5601–5612 (2013).
125. Nomura, W. *et al.* Cell-permeable stapled peptides based on HIV-1 integrase inhibitors derived from HIV-1 gene products. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2235–2244 (2013).
126. Bellmann-Sickert, K. Stone, T. A. Poulsen, B. E. & Deber, C. M. Efflux by Small Multidrug Resistance Proteins is Inhibited by Membrane-Interactive Helix-Stapled Peptides. *J. Biol. Chem.* **290**, 1752–1759 (2014).
127. Chapuis, H. *et al.* Effect of hydrocarbon stapling on the properties of α -helical antimicrobial peptides isolated from the venom of hymenoptera. *Amino Acids* **43**, 2047–2058 (2012).

128. Green, B. R. *et al.* Cyclic analogs of galanin and neuropeptide Y by hydrocarbon stapling. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 303–310 (2013).
129. Platt, R. J. *et al.* Stapling mimics noncovalent interactions of γ -carboxyglutamates in conantokins, peptidic antagonists of N-methyl-D-aspartic acid receptors. *J. Biol. Chem.* **287**, 20727–20736 (2012).
130. Phillips, C. *et al.* Design and structure of stapled peptides binding to estrogen receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9696–9699 (2011).
131. Moellering, R. E. *et al.* Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* **462**, 182–188 (2009).
132. Gavathiotis, E. *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**, 1076–1081 (2008).
133. Takada, K. *et al.* Targeted disruption of the BCL9/ β -catenin complex inhibits oncogenic Wnt signaling. *Sci. Transl. Med.* **4**, 148 (2012).
134. Grossmann, T. N. *et al.* Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of β -catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 17942–17947 (2012).
135. Bernal, F. Tyler, A. F. Korsmeyer, S. J. Walensky, L. D. & Verdine, G. L. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2456–2457 (2007).
136. Bernal, F. *et al.* A Stapled p53 Helix Overcomes HDMX-Mediated Suppression of p53. *Cancer Cell* **18**, 411–422 (2010).
137. Brown, C. J. *et al.* Stapled peptides with improved potency and specificity that activate p53. *ACS Chem. Biol.* **8**, 506–512 (2013).
138. Chang, Y. S. *et al.* Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 54 (2013).
139. Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848 (2004).
140. Vu, B. *et al.* Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 466–469 (2013).
141. Verdine, G. L. & Hilinski, G. J. All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins. *Drug Discov. Today Technol.* **9**, e41-e47 (2012).
142. Giordanetto, F. *et al.* Stapled Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Derivatives Improve VPAC2 Agonism and Glucose-Dependent Insulin Secretion. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 1163–1168 (2013).
143. Checco, J. W. *et al.* α/β -Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein-Protein Interactions with Activity in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 11365–11375 (2015).

144. Tugyi, R. *et al.* Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 413–418 (2005).
145. Chen, S. *et al.* Improving binding affinity and stability of peptide ligands by substituting glycines with D-amino acids. *Chembiochem* **14**, 1316–1322 (2013).
146. Dong, Q.-G. *et al.* Improvement of enzymatic stability and intestinal permeability of deuterohemin-peptide conjugates by specific multi-site N-methylation. *Amino Acids* **43**, 2431–2441 (2012).
147. Biron, E. *et al.* Improving oral bioavailability of peptides by multiple N-methylation: somatostatin analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2595–2599 (2008).
148. Doedens, L. *et al.* Multiple N -Methylation of MT-II Backbone Amide Bonds Leads to Melanocortin Receptor Subtype hMC1R Selectivity. Pharmacological and Conformational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8115–8128 (2010).
149. Sun, T.-L. Sun, Y. Lee, C.-C. & Huang, H. W. Membrane permeability of hydrocarbon-cross-linked peptides. *Biophys. J.* **104**, 1923–1932 (2013).
150. Chu, Q. *et al.* Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *Med. Chem. Commun.* **6**, 111–119 (2015).
151. Bird, G. H. Gavathiotis, E. LaBelle, J. L. Katz, S. G. & Walensky, L. D. Distinct BimBH3 (BimSAHB) Stapled Peptides for Structural and Cellular Studies. *ACS Chem. Biol.* 831–837 (2014).
152. Okamoto, T. *et al.* Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. *ACS Chem. Biol.* **8**, 297–302 (2013).
153. Li, Y.-C. *et al.* A Versatile Platform to Analyze Low-Affinity and Transient Protein-Protein Interactions in Living Cells in Real Time. *Cell Rep.* **9**, 1946–1958 (2014).
154. Xiong Tan, B. *et al.* Assessing the Efficacy of Mdm2/Mdm4-Inhibiting Stapled Peptides Using Cellular Thermal Shift Assays. *Sci Rep* **5**, 12116 (2015).
155. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
156. Kristensen, M. Birch, D. & Mørck Nielsen, H. Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2016).
157. Upadhyaya, P. *et al.* Inhibition of Ras Signaling by Blocking Ras-Effector Interactions with Cyclic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7602–7606 (2015).
158. Kauffman, W. B. Fuselier, T. He, J. & Wimley, W. C. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 749–764 (2015).
159. Wennerberg, K. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* **118**, 843–846 (2005).

-
160. Colicelli, J. Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases. *Sci. STKE* **2004**, re13 (2004).
161. Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 943–971 (2011).
162. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
163. John, J. *et al.* Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J. Biol. Chem.* **268**, 923–929 (1993).
164. Bos, J. L. Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* **129**, 865–877 (2007).
165. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).
166. Ahearn, I. M. Haigis, K. Bar-Sagi, D. & Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 39–51 (2012).
167. Gorfe, A. Mechanisms of Allostery and Membrane Attachment in Ras GTPases: Implications for Anti-Cancer Drug Discovery. *CMC* **17**, 1–9 (2010).
168. Cooper, G. Cellular transforming genes. *Science* **217**, 801–806 (1982).
169. Harvey, J. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **204**, 1104–1105 (1964).
170. Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 311–335 (1967).
171. Shimizu, K. Goldfarb, M. Perucho, M. & Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 383–387 (1983).
172. Vigil, D. Cherfils, J. Rossman, K. L. & Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* **10**, 842–857 (2010).
173. Rojas, A. M. Fuentes, G. Rausell, A. & Valencia, A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* **196**, 189–201 (2012).
174. Reuther, G. W. & Der, C. J. The Ras branch of small Gtpases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 157–165 (2000).
175. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1378–1382 (2012).
176. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).

177. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biol.* **16**, 522–529 (2006).
178. Bhui, T. & Roy, J. K. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp. Cell Res.* **328**, 1–19 (2014).
179. Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362–375 (2011).
180. Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol. Rev.* **91**, 119–149 (2011).
181. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
182. Stewart, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 195–208 (2007).
183. Clarke, P. R. & Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 464–477 (2008).
184. Mattingly, R. R. Activated Ras as a Therapeutic Target: Constraints on Directly Targeting Ras Isoforms and Wild-Type versus Mutated Proteins. *ISRN Oncology* **2013**, 1–14 (2013).
185. Vega, F. M. & Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* **582**, 2093–2101 (2008).
186. Schwartz, S. L. Cao, C. Pylypenko, O. Rak, A. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases at a glance. *J. Cell. Sci.* **120**, 3905–3910 (2007).
187. Pai, E. F. *et al.* Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209–214 (1989).
188. Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* **301**, 1077–1087 (2000).
189. Marat, A. L. Dokainish, H. & McPherson, P. S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J. Biol. Chem.* **286**, 13791–13800 (2011).
190. Carney, D. S. Davies, B. A. & Horazdovsky, B. F. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends in Cell Biol.* **16**, 27–35 (2006).
191. Guo, Z. Hou, X. Goody, R. S. & Itzen, A. Intermediates in the Guanine Nucleotide Exchange Reaction of Rab8 Protein Catalyzed by Guanine Nucleotide Exchange Factors Rabin8 and GRAB. *J. Biol. Chem.* **288**, 32466–32474 (2013).
192. Barrowman, J. Bhandari, D. Reinisch, K. & Ferro-Novick, S. TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 759–763 (2010).

193. Frasa, Marieke A. M. Koessmeier, K. T. Ahmadian, M. R. & Braga, Vania M. M. Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2012).
194. Christoforidis, S. McBride, H. M. Burgoyne, R. D. & Zerial, M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621–625 (1999).
195. Fukuda, M. Kanno, E. Ishibashi, K. & Itoh, T. Large Scale Screening for Novel Rab Effectors Reveals Unexpected Broad Rab Binding Specificity. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 1031–1042 (2008).
196. Kanno, E. *et al.* Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* **11**, 491–507 (2010).
197. Mitra, S. Cheng, K. W. & Mills, G. B. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 57–68 (2011).
198. Agola, J. O. Jim, P. A. Ward, H. H. Basuray, S. & Wandinger-Ness, A. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin. Genet.* **80**, 305–318 (2011).
199. Topp, J. D. Alsln Is a Rab5 and Rac1 Guanine Nucleotide Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 24612–24623 (2004).
200. Aligianis, I. A. *et al.* Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat. Genet.* **37**, 221–223 (2005).
201. Bravo-Cordero, J. J. *et al.* MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J.* **26**, 1499–1510 (2007).
202. Kaddai, V. Le Marchand-Brustel, Y. & Cormont, M. Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. *Acta Physiol. (Oxf)* **192**, 75–88 (2008).
203. DerMardirossian, C. & Bokoch, G. M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biol.* **15**, 356–363 (2005).
204. Dransart, E. Olofsson, B. & Cherfils, J. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* **6**, 957–966 (2005).
205. Pfeffer, S. & Aivazian, D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 886–896 (2004).
206. Pfeffer, S. R. Rab GTPase localization and Rab cascades in Golgi transport. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1373–1377 (2012).
207. Chandra, A. *et al.* The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat. Cell Biol.* **14**, 148–158 (2012).
208. Ismail, S. A. *et al.* Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 942–949 (2011).

209. Keep, N. H. *et al.* A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* **5**, 623–633 (1997).
210. Hoffman, G. R. Nassar, N. & Cerione, R. A. Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345–356 (2000).
211. Scheffzek, K. Stephan, I. Jensen, O. N. Illenberger, D. & Gierschik, P. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122–126 (2000).
212. Zhang, H. *et al.* Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDEdelta) functions as a prenyl-binding protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 407–413 (2004).
213. Paulick, M. G. & Bertozzi, C. R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* **47**, 6991–7000 (2008).
214. Nadolski, M. J. & Linder, M. E. Protein lipidation. *FEBS J* **274**, 5202–5210 (2007).
215. Resh, M. D. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE* **2006**, re14 (2006).
216. Zhang, F. L. & Casey, P. J. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241–269 (1996).
217. Resh, M. D. Fatty acylation of proteins. New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1451**, 1–16 (1999).
218. Martin, D. D. O. Beauchamp, E. & Berthiaume, L. G. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie* **93**, 18–31 (2011).
219. Resh, M. D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 584–590 (2006).
220. Maduro, M. & Pilgrim, D. Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics* **141**, 977–988 (1995).
221. Higashide, T. Murakami, A. McLaren, M. J. & Inana, G. Cloning of the cDNA for a Novel Photoreceptor Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 1797–1804 (1996).
222. Zhang, H. *et al.* UNC119 is required for G protein trafficking in sensory neurons. *Nat. Neurosci.* **14**, 874–880 (2011).
223. Constantine, R. Zhang, H. Gerstner, C. D. Frederick, J. M. & Baehr, W. Uncoordinated (UNC)119: coordinating the trafficking of myristoylated proteins. *Vision Res.* **75**, 26–32 (2012).
224. Wright, K. J. *et al.* An ARL3-UNC119-RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium. *Genes Dev.* **25**, 2347–2360 (2011).

225. Ismail, S. A. *et al.* Structural basis for Arl3-specific release of myristoylated ciliary cargo from UNC119. *EMBO J.* **31**, 4085–4094 (2012).
226. Cen, O. Gorska, M. M. Stafford, S. J. Sur, S. & Alam, R. Identification of UNC119 as a novel activator of SRC-type tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 8837–8845 (2003).
227. Lee, Y. *et al.* UNC119a bridges the transmission of Fyn signals to Rab11, leading to the completion of cytokinesis. *Cell Cycle* **12**, 1303–1315 (2013).
228. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
229. Ford, B. Hornak, V. Kleinman, H. & Nassar, N. Structure of a transient intermediate for GTP hydrolysis by ras. *Structure* **14**, 427–436 (2006).
230. Kalbitzer, H. R. Spoerner, M. Ganser, P. Hozsa, C. & Kremer, W. Fundamental link between folding states and functional states of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16714–16719 (2009).
231. Gorfe, A. A. Grant, B. J. & McCammon, J. Andrew. Mapping the Nucleotide and Isoform-Dependent Structural and Dynamical Features of Ras Proteins. *Structure* **16**, 885–896 (2008).
232. Prakash, P. & Gorfe, A. A. Lessons from computer simulations of Ras proteins in solution and in membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 5211–5218 (2013).
233. Wang, W. Fang, G. & Rudolph, J. Ras inhibition via direct Ras binding—is there a path forward? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5766–5776 (2012).
234. Sebti, S. M. & Hamilton, A. D. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: Lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene* **19**, 6584–6593 (2000).
235. Berndt, N. Hamilton, A. D. & Sebti, S. M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 775–791 (2011).
236. Whyte, D. B. *et al.* K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **272**, 14459–14464 (1997).
237. Cox, A. D. Der, C. J. & Philips, M. R. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin. Cancer Res.* **21**, 1819–1827 (2015).
238. deSolms, S. J. *et al.* Dual Protein Farnesyltransferase–Geranylgeranyltransferase-I Inhibitors as Potential Cancer Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Chem.* **46**, 2973–2984 (2003).
239. Lobell, R. B. *et al.* Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. *Cancer Res.* **61**, 8758–8768 (2001).
240. Resh, M. D. Targeting protein lipidation in disease. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 206–214 (2012).

241. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483**, 100–103 (2012).
242. Turke, A. B. *et al.* MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res.* **72**, 3228–3237 (2012).
243. Rocks, O. Peyker, A. & Bastiaens, Philippe I H. Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 351–357 (2006).
244. Rocks, O. *et al.* An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**, 1746–1752 (2005).
245. Dekker, F. J. *et al.* Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 449–456 (2010).
246. Rusch, M. *et al.* Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9838–9842 (2011).
247. Hedberg, C. *et al.* Development of highly potent inhibitors of the Ras-targeting human acyl protein thioesterases based on substrate similarity design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9832–9837 (2011).
248. Zimmermann, G. *et al.* Small molecule inhibition of the KRAS–PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **497**, 638–642 (2013).
249. Zhang, J. Yang, P. L. & Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 28–39 (2009).
250. Becher, I. *et al.* Affinity profiling of the cellular kinome for the nucleotide cofactors ATP, ADP, and GTP. *ACS Chem. Biol.* **8**, 599–607 (2013).
251. Hoffenberg, S. *et al.* Specific and effective interaction of a guanine nucleotide analogue with small G proteins. *Mol. Pharmacol.* **49**, 156–164 (1996).
252. Wolin, R. *et al.* Synthesis and evaluation of pyrazolo[3,4-b]quinoline ribofuranosides and their derivatives as inhibitors of oncogenic Ras. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 195–200 (1996).
253. Agola, J. O. *et al.* A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1095–1108 (2012).
254. Hong, L. *et al.* A Pan-GTPase Inhibitor as a Molecular Probe. *PLoS ONE* **10**, e0134317 (2015).
255. Surviladze, Z. *et al.* Identification of a small GTPase inhibitor using a high-throughput flow cytometry bead-based multiplex assay. *J. Biomol. Screen.* **15**, 10–20 (2010).
256. Ostrem, J. M. Peters, U. Sos, M. L. Wells, J. A. & Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **503**, 548–551 (2013).

-
257. Lim, S. M. *et al.* Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 199–204 (2014).
258. Maurer, T. *et al.* Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5299–5304 (2012).
259. Yan, C. *et al.* Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral. *Nature* (2014).
260. Shang, X. *et al.* Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* **19**, 699–710 (2012).
261. Bodemann, B. O. & White, M. A. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 133–140 (2008).
262. Thiel, P. Kaiser, M. & Ottmann, C. Small-molecule stabilization of protein-protein interactions: an underestimated concept in drug discovery? *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 2012–2018 (2012).
263. Milroy, L.-G. Brunsveld, L. & Ottmann, C. Stabilization and inhibition of protein-protein interactions: the 14-3-3 case study. *ACS Chem. Biol.* **8**, 27–35 (2013).
264. Renault, L. Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525–530 (2003).
265. Mossessova, E. Corpina, R. A. & Goldberg, J. Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism. *Mol. Cell* **12**, 1403–1411 (2003).
266. Viaud, J. *et al.* Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 10370–10375 (2007).
267. Winter, J. *et al.* Small molecule binding sites on the Ras:SOS complex can be exploited for inhibition of Ras activation. *J. Med. Chem.* **58**, 2265–2274 (2015).
268. Tanaka, T. Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* **26**, 3250–3259 (2007).
269. Tanaka, T. & Rabbitts, T. H. Interfering with RAS–effector protein interactions prevent RAS-dependent tumour initiation and causes stop–start control of cancer growth. *Oncogene* **29**, 6064–6070 (2010).
270. Shima, F. *et al.* In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 8182–8187 (2013).
271. Lu, Y. *et al.* Solution phase parallel synthesis and evaluation of MAPK inhibitory activities of close structural analogues of a Ras pathway modulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3957–3962 (2004).

272. Waldmann, H. *et al.* Sulindac-Derived Ras Pathway Inhibitors Target the Ras–Raf Interaction and Downstream Effectors in the Ras Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 454–458 (2004).
273. Rosnizeck, I. C. *et al.* Stabilizing a Weak Binding State for Effectors in the Human Ras Protein by Cyclen Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3830–3833 (2010).
274. Rosnizeck, I. C. *et al.* Metal–Bis(2-picoyl)amine Complexes as State 1(T) Inhibitors of Activated Ras Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 10647–10651 (2012).
275. Spoerner, M. Graf, T. König, B. & Kalbitzer, H. R. A novel mechanism for the modulation of the Ras-effector interaction by small molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 709–713 (2005).
276. Wu, X. Upadhyaya, P. Villalona-Calero, M. A. Briesewitz, R. & Pei, D. Inhibition of Ras–effector interactions by cyclic peptides. *Med. Chem. Commun.* **4**, 378 (2013).
277. Upadhyaya, P. Qian, Z. Habir, Nurlaila A A & Pei, D. Direct Ras Inhibitors Identified from a Structurally Rigidified Bicyclic Peptide Library. *Tetrahedron* **70**, 7714–7720 (2014).
278. Spiegel, J. *et al.* Direct Targeting of Rab-GTPase-Effector Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2498–2503 (2014).
279. Spiegel, J. *et al.* Direkte Modulation von Rab-GTPase-Effektor-Wechselwirkungen. *Angew. Chem.* **126**, 2531–2536 (2014).
280. Spiegel, J. Synthese und Evaluierung stabilisierter Bindungsepitope zur Adressierung kleiner GTPasen. Technische Universität Dortmund, 2016.
281. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
282. Mott, H. R. & Owen, D. Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50**, 85–133 (2015).
283. Itzen, A. & Goody, R. S. GTPases involved in vesicular trafficking: Structures and mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 48–56 (2011).
284. Sanner, M. F. Olson, A. J. & Spehner, J.-C. Reduced surface: An efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* **38**, 305–320 (1996).
285. Zhang, J. & Matthews, C. R. Ligand binding is the principal determinant of stability for the p21(H)-ras protein. *Biochemistry* **37**, 14881–14890 (1998).
286. Nájera, C. & Sansano, J. M. Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids. *Chemical Reviews.* *Chem. Rev.* **107**, 4584–4671 (2007).
287. Bird, G. H. Crannell, W. C. & Walensky, L. D. Chemical synthesis of hydrocarbon-stapled peptides for protein interaction research and therapeutic targeting. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **3**, 99–117 (2011).

288. Aceña, J. L. Sorochinsky, A. E. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases. Part 3: Michael addition reactions and miscellaneous transformations. *Amino Acids* **46**, 2047–2073 (2014).
289. Sorochinsky, A. Aceña, J. Moriwaki, H. Sato, T. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases. Part 2: Aldol, Mannich addition reactions, deracemization and (S) to (R) interconversion of α -amino acids. *Amino Acids. Amino Acids* **45**, 1017–1033 (2013).
290. Sorochinsky, A. Aceña, J. Moriwaki, H. Sato, T. & Soloshonok, V. Asymmetric synthesis of α -amino acids via homologation of Ni(II) complexes of glycine Schiff bases; Part 1: alkyl halide alkylations. *Amino Acids. Amino Acids* **45**, 691–718 (2013).
291. Bird, G. H. Christian Crannell, W. & Walensky, L. D. in *Current Protocols in Chemical Biology*, edited by A. P. Arkin, *et al.* (John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2009).
292. Belokon', Y. N. Tararov, V. I. Maleev, V. I. Savel'eva, T. F. & Ryzhov, M. G. Improved procedures for the synthesis of (S)-2-[N-(N'-benzylpropyl)amino]benzophenone (BPB) and Ni(II) complexes of Schiff's bases derived from BPB and amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 4249–4252 (1998).
293. Ueki, H. *et al.* Improved Synthesis of Proline-Derived Ni(II) Complexes of Glycine: Versatile Chiral Equivalents of Nucleophilic Glycine for General Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids. *J. Org. Chem.* **68**, 7104–7107 (2003).
294. El-Faham, A. Subirós Funosas, R. Prohens, R. & Albericio, F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry* **15**, 9404–9416 (2009).
295. Burguete, A. S. Fenn, T. D. Brunger, A. T. & Pfeffer, S. R. Rab and Arl GTPase Family Members Cooperate in the Localization of the Golgin GCC185. *Cell* **132**, 286–298 (2008).
296. Hou, X. *et al.* A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1. *EMBO J.* **30**, 1659–1670 (2011).
297. Attree, O. *et al.* The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* **358**, 239–242 (1992).
298. Gasteiger, E. *et al.* in *The proteomics protocols handbook*, edited by J. M. Walker (Humana Press, Totowa, N.J. 2005), pp. 571–607.
299. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590 (2003).
300. Lundberg, M. & Johansson, M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol.* **19**, 713–714 (2001).

301. Cunningham, B. C. & Wells, J. A. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**, 1081–1085 (1989).
302. Morrison, K. L. & Weiss, G. A. Combinatorial alanine-scanning. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 302–307 (2001).
303. Yamaguchi, H. *et al.* Effect of alpha,alpha-dialkyl amino acids on the protease resistance of peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2269–2272 (2003).
304. Dinh, T. T. T. Kim, D.-H. Luong, H. X. Lee, B.-J. & Kim, Y.-W. Antimicrobial activity of doubly-stapled alanine/lysine-based peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 4016–4019 (2015).
305. Ghalit, N. Rijkers, D. T. S. Kemmink, J. Versluis, C. & Liskamp, R. M. J. Pre-organization induced synthesis of a crossed alkene-bridged nisin Z DE-ring mimic by ring-closing metathesis. *Chem. Commun.* 192–194 (2005).
306. Vives, E. Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J. Mol. Recognit.* **16**, 265–271 (2003).
307. Richard, J. P. *et al.* Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15300–15306 (2005).
308. Console, S. Marty, C. García-Echeverría, C. Schwendener, R. & Ballmer-Hofer, K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **278**, 35109–35114 (2003).
309. Cromm, P. M. *et al.* Orthogonal ring-closing alkyne and olefin metathesis for the synthesis of small GTPase-targeting bicyclic peptides. *Nat. Commun.* **7**, 11300 (2016).
310. Heppekausen, J. Stade, R. Goddard, R. & Fürstner, A. Practical new silyloxy-based alkyne metathesis catalysts with optimized activity and selectivity profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11045–11057 (2010).
311. Heppekausen, J. *et al.* Optimized synthesis, structural investigations, ligand tuning and synthetic evaluation of silyloxy-based alkyne metathesis catalysts. *Chemistry* **18**, 10281–10299 (2012).
312. Speltz, T. E. *et al.* Stapled Peptides with γ -Methylated Hydrocarbon Chains for the Estrogen Receptor/Coactivator Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 4252–4255 (2016).
313. Obsil, T. & Obsilova, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 663–672 (2011).
314. Freeman, A. K. & Morrison, D. K. 14-3-3 Proteins. Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 681–687 (2011).

315. Masters, S. C. Pederson, K. J. Zhang, L. Barbieri, J. T. & Fu, H. Interaction of 14-3-3 with a Nonphosphorylated Protein Ligand, Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*†. *Biochemistry* **38**, 5216–5221 (1999).
316. Henriksson, M. L. *et al.* Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem. J.* **367**, 617–628 (2002).
317. Ottmann, C. *et al.* Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S. From structure to pathogenesis. *EMBO J.* **26**, 902–913 (2007).
318. Slootweg, J. C. Kemmink, J. Liskamp, Rob M J & Rijkers, Dirk T S. Synthesis and structural characterization of the individual diastereoisomers of a cross-stapled alkene-bridged nisin DE-ring mimic. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7486–7496 (2013).
319. Robinson, A. J. *et al.* Regioselective formation of interlocked dicarba bridges in naturally occurring cyclic peptide toxins using olefin metathesis. *Chem. Commun.* 4293 (2009).
320. Burnley, J. Jackson, W. R. & Robinson, A. J. One-Pot Selective Homodimerization/Hydrogenation Strategy for Sequential Dicarba Bridge Formation. *J. Org. Chem.* **80**, 9057–9063 (2015).
321. Mejuch, T. van Hattum, H. Triola, G. Jaiswal, M. & Waldmann, H. Specificity of Lipoprotein Chaperones for the Characteristic Lipidated Structural Motifs of their Cognate Lipoproteins. *Chembiochem* (2015).
322. Fürstner, A. Guth, O. Rumbo, A. & Seidel, G. Ring Closing Alkyne Metathesis. Comparative Investigation of Two Different Catalyst Systems and Application to the Stereoselective Synthesis of Olfactory Lactones, Azamacrolides, and the Macrocyclic Perimeter of the Marine Alkaloid Nakadomarin A. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11108–11113 (1999).
323. Wallimann, P. Kennedy, R. J. & Kemp, D. S. Large Circular Dichroism Ellipticities for N-Templated Helical Polypeptides Are Inconsistent with Currently Accepted Helicity Algorithms. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1290–1292 (1999).
324. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
325. Berrow, N. S. *et al.* A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* **35**, e45 (2007).
326. Schoebel, S. Oesterlin, L. K. Blankenfeldt, W. Goody, R. S. & Itzen, A. RabGDI Displacement by DrrA from *Legionella* Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 1060–1072 (2009).
327. Blumer, J. *et al.* RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J. Cell. Biol.* **200**, 287–300 (2013).

328. Bergbrede, T. *et al.* Biophysical Analysis of the Interaction of Rab6a GTPase with Its Effector Domains. *J. Biol. Chem.* **284**, 2628–2635 (2008).
329. Simon, I. Zerial, M. & Goody, R. S. Kinetics of Interaction of Rab5 and Rab7 with Nucleotides and Magnesium Ions. *J. Biol. Chem.* **271**, 20470–20478 (1996).
330. Motulsky, H. & Christopoulos, A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting* (Oxford University Press, Oxford, New York, 2004).
331. Huang, X. & Aulabaugh, A. Application of fluorescence polarization in HTS assays. *Methods Mol. Biol.* **565**, 127–143 (2009).
332. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *Biochem. J.* **113**, 1–4 (1969).

9 Abkürzungsverzeichnis

3D	3 dimensional
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetat
Aib	α -Aminoisobutyric acid
Akt	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
Alsin	<i>Amyotrophic lateral sclerosis protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APT	<i>Acyl-protein thioesterase</i>
Äq.	Äquivalent
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Arl	<i>Arf-like protein</i>
ARNO	<i>ARF nucleotide-binding site opener</i>
Arp	<i>Arf-related protein</i>
BPB	[N-(N ^c - Benzyl)propyl]amino]benzophenonhydrochlorid
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	Circulardichroismus
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminooxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
CSL	<i>CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1</i>
DENN	<i>Differential expressed in normal and neoplastic cells</i>
DHP	3,4-Dihydro-2H-pyran
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid
FP	Floureszenzpolarisation
FT	<i>Farnesyltransferase</i>
FTI	Farnesyltransferase Inhibitor
Fyn	<i>FYN Proto-Oncogene</i>
GAP	<i>GTPase aktivierendes Protein</i>

GCC185	<i>GRIP and coiled-coil domain-containing protein</i>
GDI	<i>Guaninnukleotiddissociationsinhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guaninnukleotidaustauschfaktor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GppNHp	5'-Guanylylimidodiphosphat
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanintriphosphat
HBS	Wasserstoffbrückenersatz (<i>hydrogen bond surrogate</i>)
HCTU	2-(6-Chloro-1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate
HEI-TOE	Hybrid squash inhibitor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor 1α</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRG4	<i>Human retina gene 4</i>
HRMS	High-resolution mass spectrometry
HTS	High-throughput screening
HVR	Hypervariable Region
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICN	<i>Intracellular notch domain</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K _D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Lyn	<i>Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase</i>
MAML	<i>Mastermind-like</i>
MAP	<i>Mitogen-aktivierendes Protein</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MDMX	<i>Mouse double minute X homolog</i>
Me	Methyl
MEK	<i>MAPK/ERK-Kinase</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteinase</i>
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
Mtt	4-Methyltrityl

NF	Nukleotidfrei
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NMT	<i>N</i> -Myristoyl transferase
NPHP3	<i>Nephronophthisis-3</i>
O2Oc	8-Amino-3,6-dioxooctansäure
ORCL	<i>Oculocerebrorenal syndrome protein</i>
Oxyma	Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPE	<i>Porcine pancreatic elastase</i>
PPh3	Triphenylphosphin
PPI	Protein–Protein-Interaktion
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PTS-OH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R6IP1	<i>Rab6-interacting protein 1</i>
Rab	<i>Ras-like proteins in brain</i>
Rab-GGT	<i>Rab-geranylgeranyltransferase</i>
Raf	<i>Rabid fibrosarcoma</i>
Ral	<i>Ras-related protein Ral</i>
Ran	<i>Ras-like nuclear protein</i>
Rap	<i>Ras-related protein</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RCAM	Ring closing alkyne metathesis
RCM	Ring closing olefin metathesis
REP	<i>Rab-escort protein</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rho	<i>Ras homolog</i>
RILP	<i>Rab interacting lysosomal protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-Domäne	<i>Src</i> homology domäne
SNARE	Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

SOS	<i>Son of sevenless</i>
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TBMB	Tris-bromomethylbenzene
TBS	Tris buffered saline
TECEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEV-Protease	<i>Tabacco Etch Virus Nla-Protease</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TMEDA	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TMS	Trimethylsilan
TRAPP	<i>Transport protein particle</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UNC119	<i>Uncoordinated 119</i>
Vsp9	<i>Voltage sensitive phosphatases</i>
wt	Wildtyp
YPT1	<i>Yeast protein transcript 1</i>
μw	Mikrowelle

Aminosäuren wurden anhand der Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry* (IUB) im Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt.³³²

10 Anhang

Tabelle 15. Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Peptide mit GDP gebundenen RabGTPasen. (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (GDP)	Rab5a (GDP)	Rab6a (GDP)	Rab7a (GDP)	Rab8a (GDP)	Rab9a (GDP)	Rab11a (GDP)
25	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
26	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
27	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
28	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
29	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
30	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
31	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
32	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
33	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabelle 16. Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Peptide mit GppNHp gebundenen RabGTPasen. (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (GppNHp)	Rab5a (GppNHp)	Rab6a (GppNHp)	Rab7a (GppNHp)	Rab8a (GppNHp)	Rab9a (GppNHp)	Rab11a (GppNHp)
25	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
26	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
27	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
28	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
29	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
30	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
31	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
32	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
33	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabelle 17. Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Peptide mit nukleotid-freien RabGTPasen. (N = 1). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein						
	Rab1b (NF)	Rab5a (NF)	Rab6a (NF)	Rab7a (NF)	Rab8a (NF)	Rab9a (NF)	Rab11a (NF)
25	40	10	20	120	5	30	40
26	>300	>300	110	>300	160	>300	>300
27	38	40	60	>300	30	20	>300
28	>300	>300	110	>300	>300	>300	>300
29	>300	150	>300	>300	>300	>300	>300
30	>300	>300	120	>300	>300	>300	>300
31	>300	>300	120	>300	170	>300	>300
32	>300	40	60	>300	20	210	>300
33	170	10	8	50	50	20	>300

Tabelle 18. Dissoziationskonstanten der α -methylierten, kohlenwasserstoffverbrückten Peptide mit RabGTPasen in allen drei Nukleotidbindungszuständen. (N = 3; Fehler repräsentieren 1σ). K_D -Werte sind in μM angegeben.

Peptid	Protein																	
	Rab1b			Rab5a			Rab6a			Rab8a			Rab9a			Rab11a		
	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF	GDP	GppNHp	NF
25	>100	>100	25	>100	>100	19.2±0.4	>100	>100	3.0±0.2	>100	>100	35	>100	>100	7.3±6.7	>100	>100	>100
40	>100	>100	1.5±0.1	>100	>100	2.6±0.1	>100	>100	0.5±0.03	>100	>100	47	>100	>100	1.5±0.1	>100	>100	>100
41	>100	>100	16.9±0.5	>100	>100	5.4±0.2	>100	>100	1.2±0.1	>100	>100	21	>100	>100	5.5±0.4	>100	>100	>100
42	>100	>100	33	>100	>100	1.8±0.1	>100	>100	0.40±0.02	>100	>100	22.2±1.2	>100	>100	0.81±0.05	>100	>100	>100
43	>100	>100	4.2±0.2	>100	>100	9.6±0.3	>100	>100	3.0±0.1	>100	>100	42	>100	>100	3.4±0.2	>100	>100	>100
27	>100	>100	90	>100	>100	90	>100	>100	40	>100	>100	95	>100	>100	>100	>100	>100	>100
44	>100	>100	3.8±0.3	>100	>100	1.6±0.1	>100	>100	2.0±0.1	>100	>100	12.3±0.4	>100	>100	28.1±2.6	>100	>100	>100
45	>100	>100	50	>100	>100	65±5	>100	>100	20	>100	>100	90	>100	>100	>100	>100	>100	>100
46	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
32	>100	>100	>100	>100	>100	50	>100	>100	6.4±0.4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
47	>100	>100	2.1±0.8	>100	>100	3.0±0.2	>100	>100	0.7±0.03	>100	>100	78	>100	>100	16.2±1.7	>100	>100	>100
48	>100	>100	2.3±0.1	>100	>100	2.2±0.1	>100	>100	0.7±0.03	>100	>100	56	>100	>100	1.4±0.1	>100	>100	>100
49	>100	>100	9.2±0.2	>100	>100	8.3±0.3	>100	>100	1.5±0.1	>100	>100	68	>100	>100	0.52±0.06	>100	>100	>100
50	>100	>100	1.9±0.1	>100	>100	2.2±0.1	>100	>100	0.75±0.03	>100	>100	75	>100	>100	57	>100	>100	>100
33	>100	>100	45	>100	>100	7.3±0.8	>100	>100	8.6±0.7	>100	>100	98	>100	>100	1.1±0.1	>100	>100	>100
51	>100	>100	1.1±0.1	>100	>100	1.0±0.1	>100	>100	0.9±0.05	>100	>100	91	>100	>100	0.51±0.04	>100	>100	>100
52	>100	>100	1.6±0.1	>100	>100	1.6±0.1	>100	>100	1.2±0.1	>100	>100	83	>100	>100	0.42±0.03	>100	>100	>100

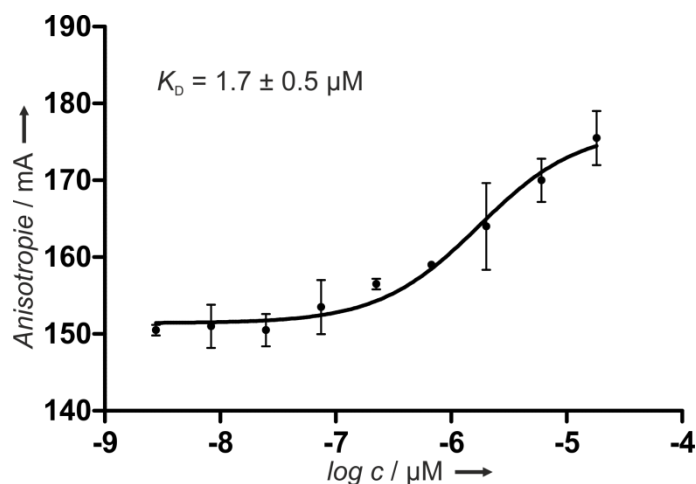


Abbildung 55. FP-Bindungskurve von Fluorescein-markiertem ORCL₅₃₉₋₉₀₁ mit Rab8a(GppNHp). Dreifachmessung, Fehler entspricht 1σ .

Tabelle 19. K_D -Werte und relative K_D -Werte der Peptide des Alanin- und Arginin-Scans. Einfachmessungen. [a] c_{\max} [$\text{Rab8a6-176}(\text{GppNHp})$] = 300 μM , $K_D[42]$ = 12.7 μM

Peptid	Sequenz	K_D	rel. K_D [a]
V916A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA A	17.2	1.4
N914A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFAA V	23.8	1.9
F913A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSANAV	30.6	2.4
S912A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLAFNA V	20.9	1.6
L911A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLASFNA V	204	16
L910A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHALSFNA V	183	14
H909A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YALLSFNA V	83	6.5
Y908A	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ AHLLSFNA V	44.1	3.5
F906A	DDE <u>S</u> ₅ EQA <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	129	10
Q905A	DDE <u>S</u> ₅ EAF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	11.1	0.9
E904A	DDE <u>S</u> ₅ AQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	24.3	1.9
E902A	DDA <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	27.8	2.2
D901A	DAE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	24.6	1.9
D900A	ADE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	18.4	1.4
V916R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA R	17.5	1.4
A915R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA R V	17.7	1.5
N914R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFRA V	84	6.9
F913R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSRNA V	54	4.4
S912R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLRFNA V	31	2.5
L911R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLRSFNA V	720	>50
L910R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHRLSFNA V	220	18
H909R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YRLLSFNA V	160	13
Y908R	DDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ RHLLSFNA V	120	9.8
F906R	DDE <u>S</u> ₅ EQR <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	165	13
Q905R	DDE <u>S</u> ₅ ERF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	10.6	0.9
E904R	DDE <u>S</u> ₅ RQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	67	5.5
E902R	DDR <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	30	2.5
D901R	DRE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	46.7	3.8
D900R	RDE <u>S</u> ₅ EQF <u>S</u> ₅ YHLLSFNA V	112	9.2

Tabelle 20. K_D -Werte der Peptid **42** Derivate. Einfachmessungen. [a] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 300 μ M, K_D (StRIP3) = 17.5 μ M; [b] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 300 μ M, K_D (StRIP3) = 11.9 μ M; [c] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 500 μ M, K_D (StRIP3) = 17.5 μ M; [d] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 700 μ M, K_D (StRIP3) = 147 μ M; [e] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 570 μ M, K_D (StRIP3) = 53.0 μ M; [f] c_{\max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 570 μ M, K_D (StRIP3) = 65.2 μ M

Peptid	Sequenz	K_D
53	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHLL SFNAV	24.3 ^[a]
55	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHLL Aib FNAV	8.9 ^[b]
56	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL Aib SFNAV	32.5 ^[b]
57	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL Aib SFNAib V	64 ^[b]
63	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □LSFN Aib V	12.4 ^[b]
64	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □LSFN □LV	16.1 ^[b]
65	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □LSFN □FV	15.2 ^[b]
66	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □FSFN Aib V	9.2 ^[b]
67	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □FSFN □FV	16.7 ^[b]
68	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL □FSFN □LV	10.9 ^[b]
69	DDE <u>R₈</u> EQFLYH <u>S₅</u> LSFN AV	8.5 ^[b]
70	DDE <u>S₅</u> EQF <u>B₅</u> YHLL SF <u>S₈</u> AV	7.9 ^[b]
71	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> SFN <u>S₅</u> V	7.5 ^[b]
72	DDE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> SFN <u>S₅</u> V	19.5 ^[c]
Q905F	DDE <u>S₅</u> EFF <u>S₅</u> YHLL SFNAV	5.9 ^[a]
Q905L	DDE <u>S₅</u> ELF <u>S₅</u> YHLL SFNAV	7.0 ^[a]
Q905W	DDE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHLL SFNAV	4.5 ^[a]
L911F S912F	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL FFFNAV	20.6 ^[d]
L911F S912W	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL FWFNAV	35.3 ^[d]
L911F S912Y	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL F YFNAV	41.2 ^[d]
73	DDE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	11.7 ^[c]
74	DDQ <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	31.0 ^[e]
75	DNE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	30.5 ^[e]
76	NDE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	31.8 ^[e]
77	DNQ <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	38.5 ^[e]
78	NDQ <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	40.7 ^[e]
79	NNE <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	41.0 ^[e]
80	NNQ <u>S₅</u> EW F <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	51.3 ^[e]
81	DDE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	23.8 ^[f]
82	DDQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	50.8 ^[f]
83	DNE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	32.0 ^[f]
84	NDE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	46.2 ^[f]
85	DNQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	53.9 ^[f]
86	NDQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	51.9 ^[f]
87	NNE <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	52.0 ^[f]
88	NNQ <u>S₅</u> QWF <u>S₅</u> YHL <u>S₅</u> FFN <u>S₅</u> V	57.7 ^[f]

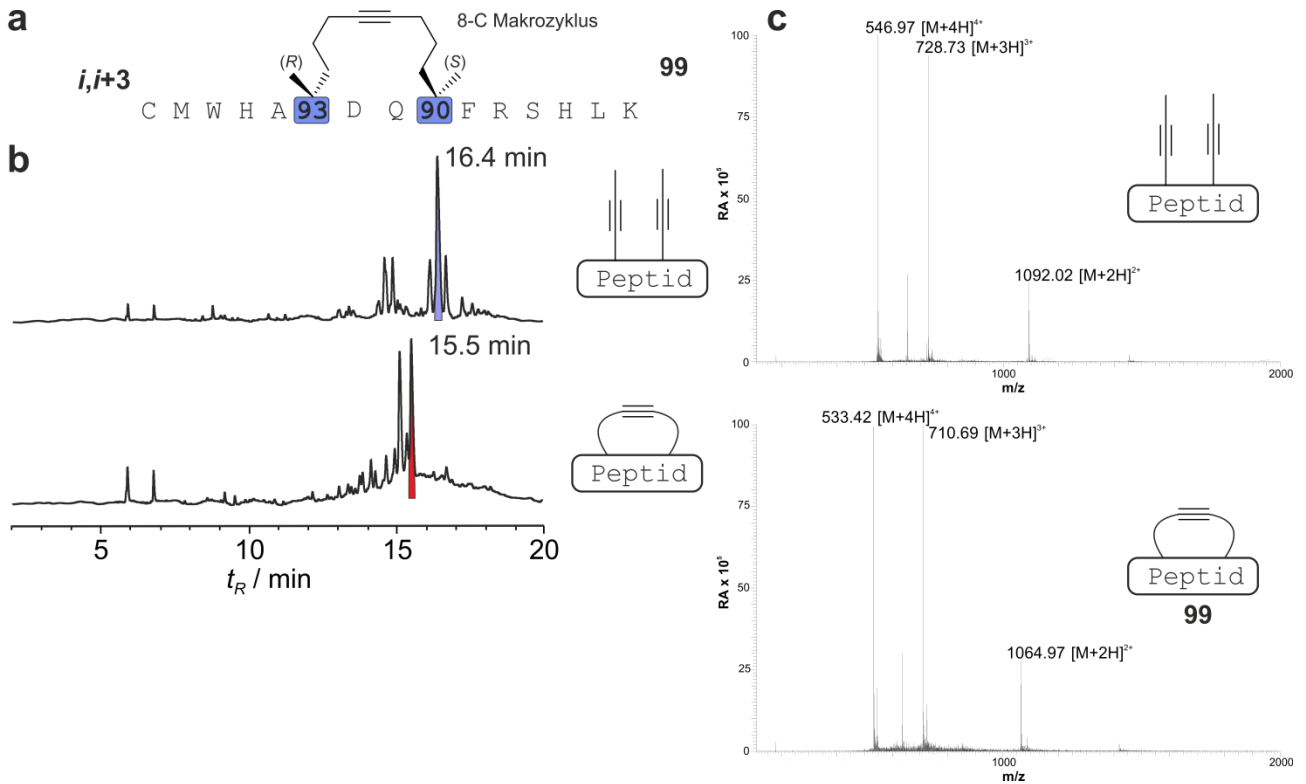


Abbildung 56. (a) Sequenz des *i,i+3* makrozyklisierten Testpeptids **99** mit *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Form von **99**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Alkin-Makrozyklus.

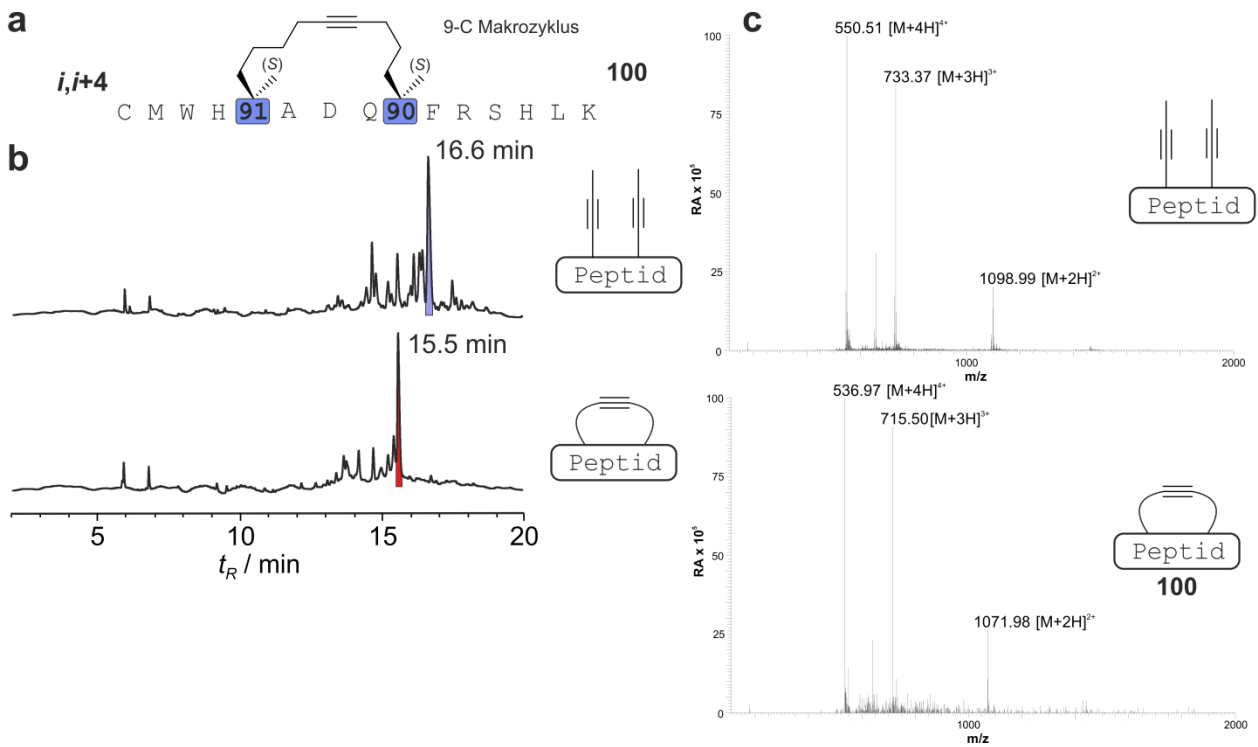


Abbildung 57. (a) Sequenz des *i,i+4* makrozyklisierten Testpeptids **100** mit *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Form von **100**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Alkin-Makrozyklus.

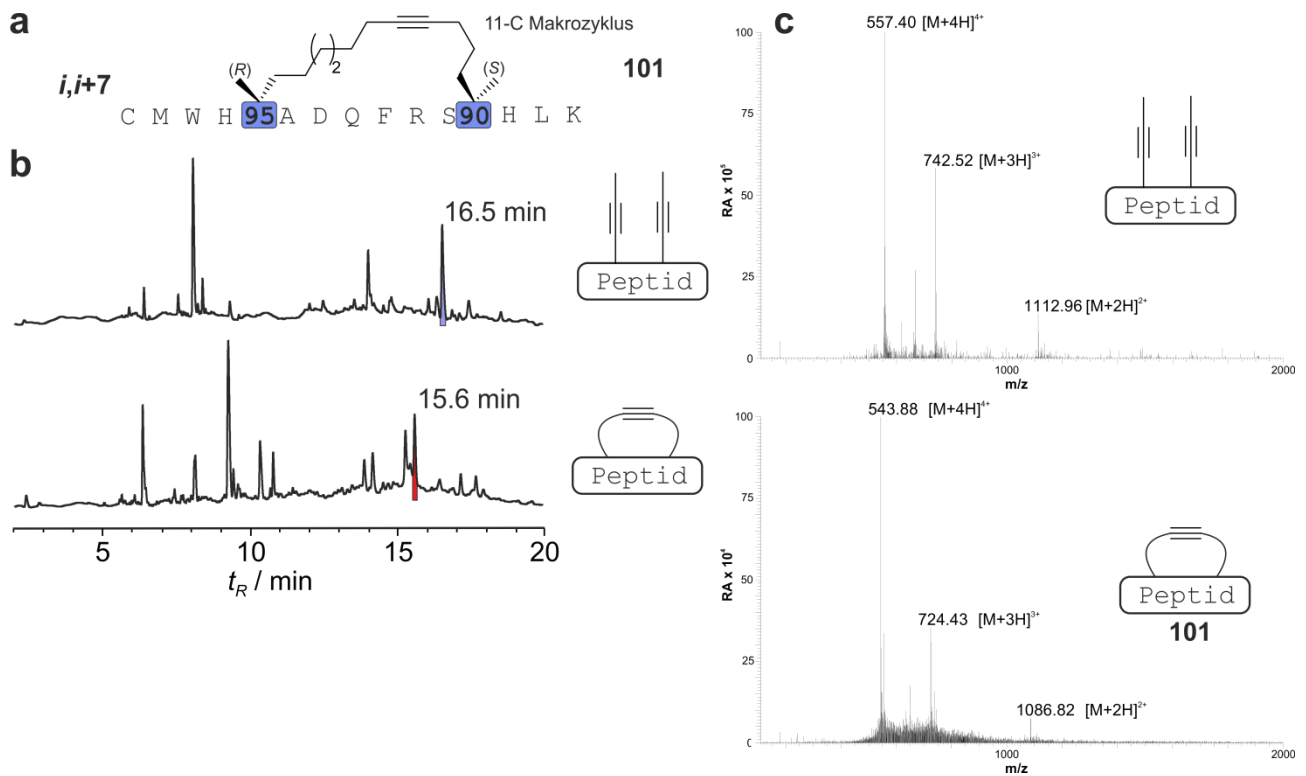


Abbildung 58. (a) Sequenz des *i,i+7* makrozyklisierten Testpeptids **101** mit *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Form von **101**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Alkin-Makrozyklus.

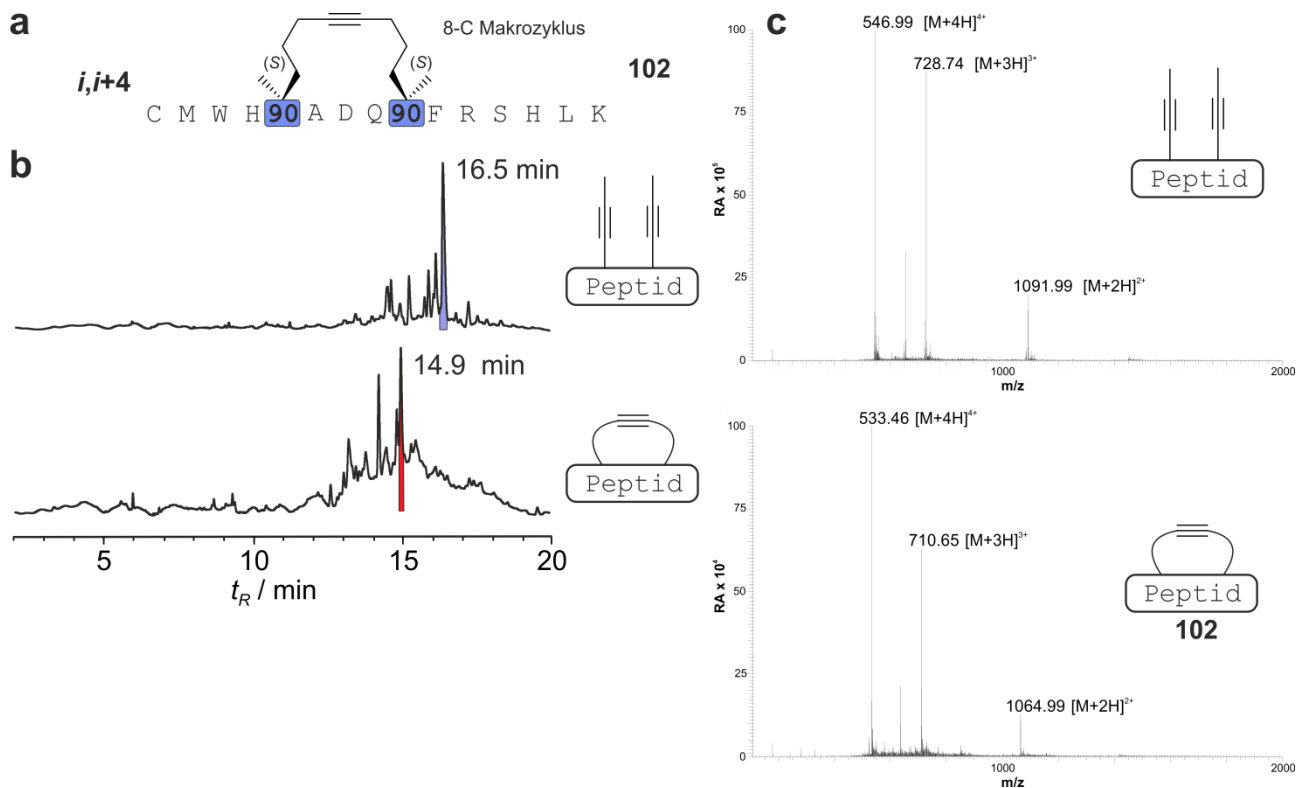


Abbildung 59. (a) Sequenz des *i,i+4* makrozyklisierten Testpeptids **102** mit *N*-terminales Cys und Met sowie 8 Kohlenstoffatomen in der Verbrückung. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Form von **102**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (unten) Alkin-Makrozyklus.

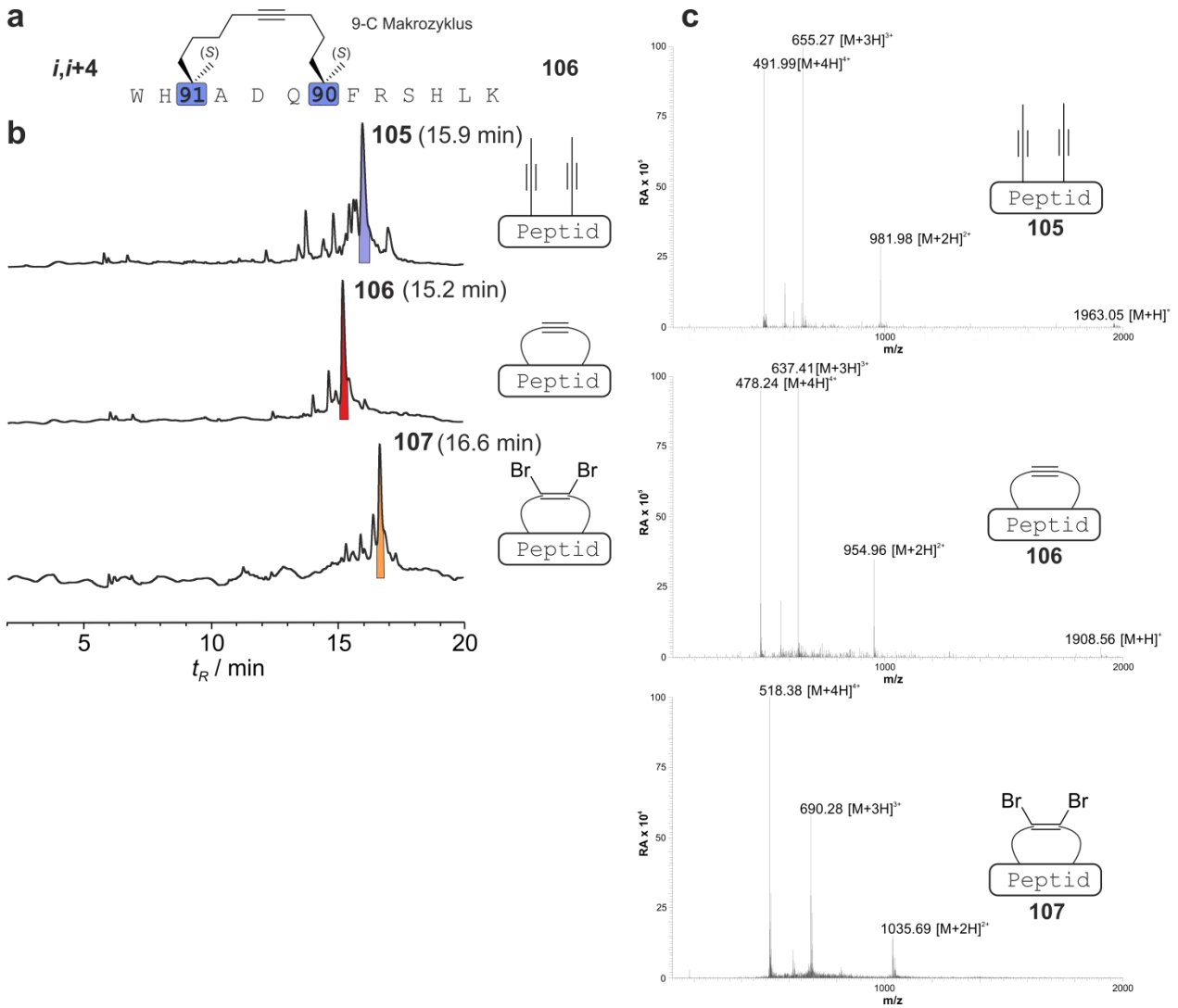


Abbildung 60. (a) Sequenz des *i,i+4* makrozyklisierten Testpeptids **106** ohne *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben), geschlossenen (mitte) und dibromierten (unten) Form von **106**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (mitte) Alkin-Makrozyklus und des dibromierten Olefins **107** (unten).

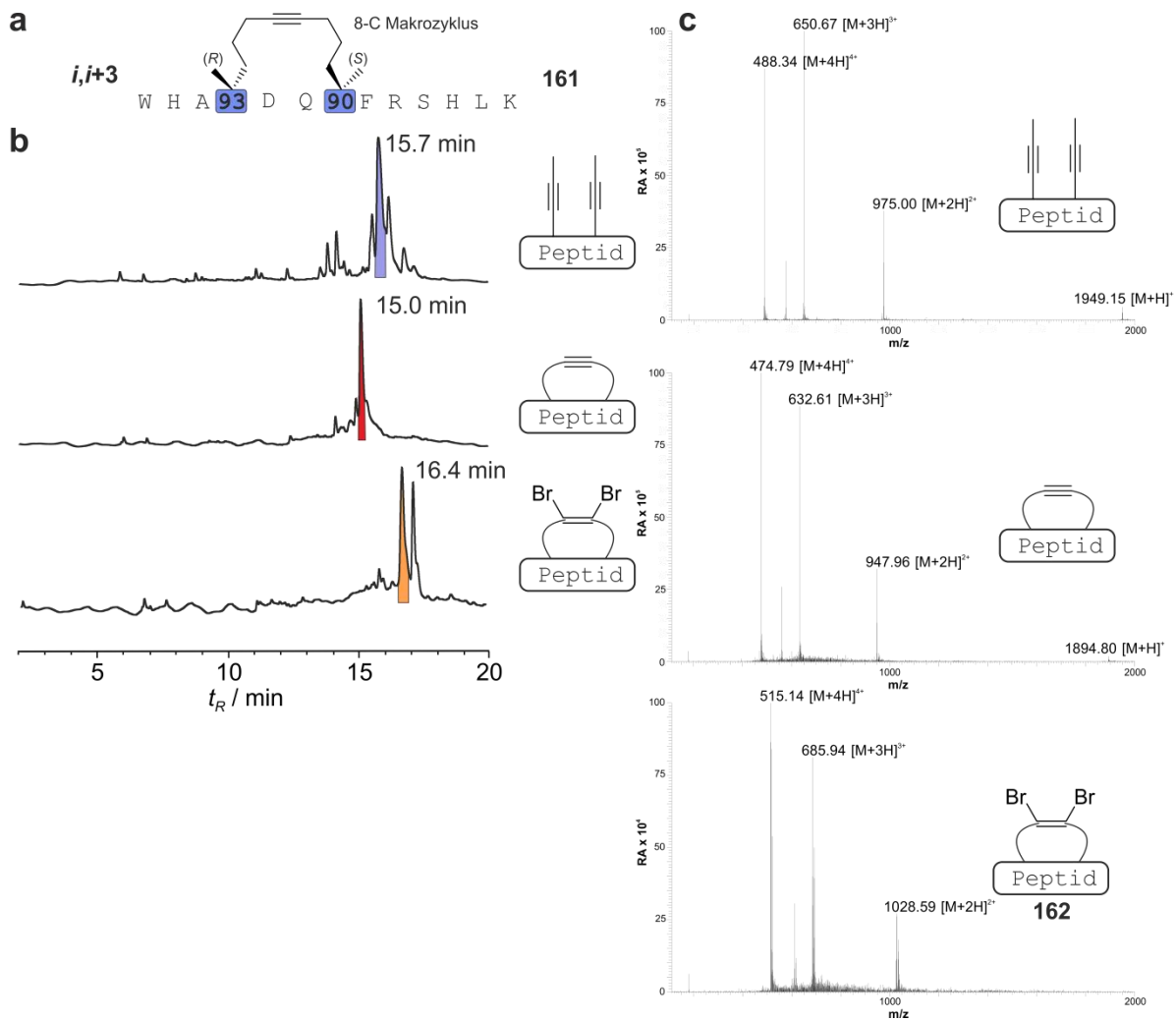


Abbildung 61. (a) Sequenz des *i,i+3* makrozyklisierten Testpeptids **161** ohne *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben), geschlossenen (mitte) und dibromierten (unten) Form von **161**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (mitte) Alkin-Makrozyklus und des dibromierten Olefins **162** (unten).

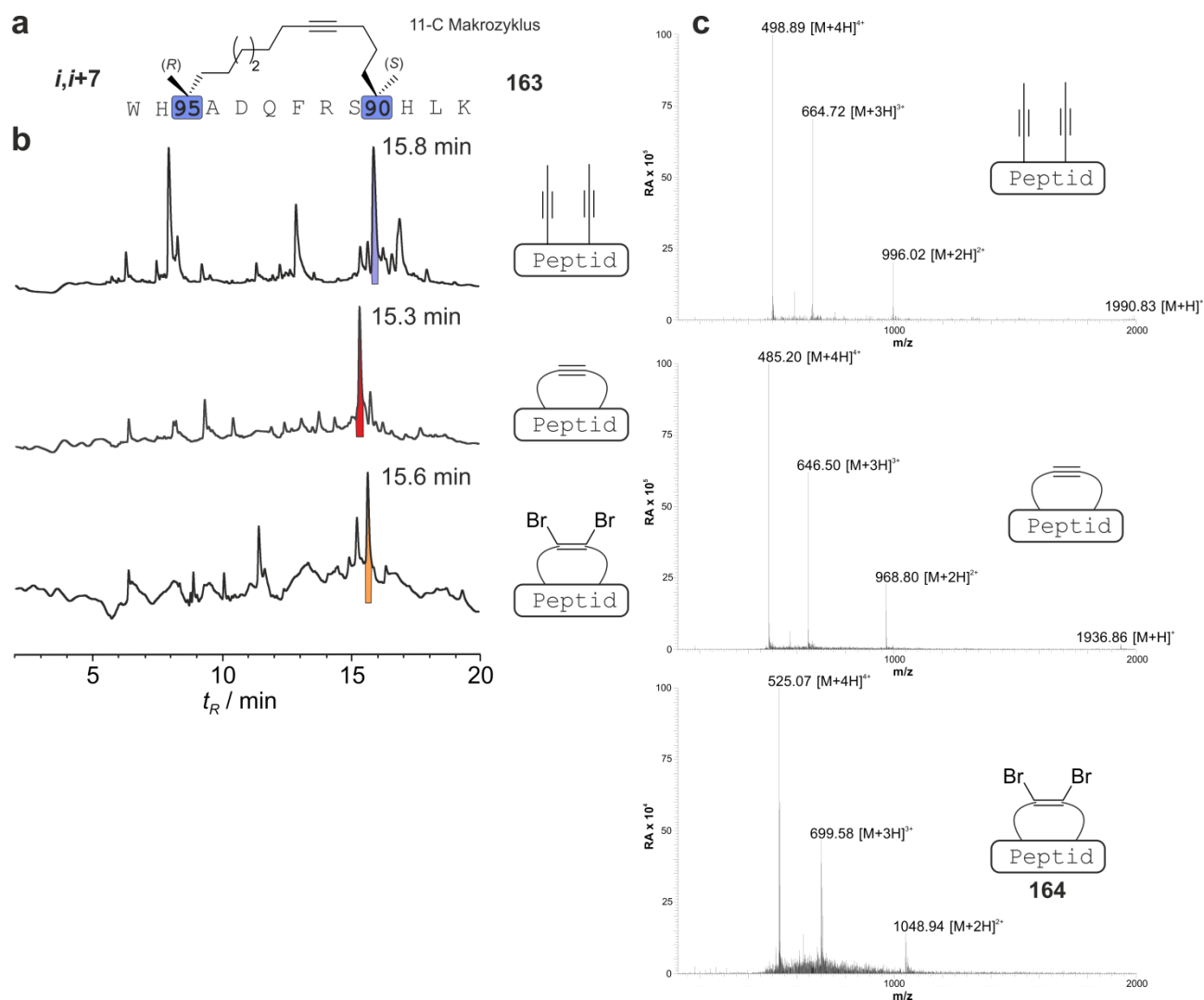


Abbildung 62. (a) Sequenz des *i,i+7* makrozyklisierten Testpeptids **163** ohne *N*-terminales Cys und Met. (b) HPLC Spektren der offenkettigen (oben), geschlossenen (mitte) und dibromierten (unten) Form von **163**. (c) Massenspektren des offenkettigen (oben) und geschlossenen (mitte) Alkin-Makrozyklus und des dibromierten Olefins **164** (unten).

Tabelle 21. K_D -Werte der Alkin-makrozyklisierten Peptid **42** Derivate. Einfachmessungen. [a] c_{max} [Rab8a₆₋₁₇₆(GppNHp)] = 800 μM , K_D (StRIP3) = 29.5 μM ; [b] dibromiertes Olefin

Peptid	Sequenz	K_D [a]
108	DDE <u>91</u> EQF <u>91</u> YHLLSFNAV	27.2
109	DDE <u>90</u> EQF <u>91</u> YHLLSFNAV	29.2
110	DDE <u>91</u> EQF <u>90</u> YHLLSFNAV	26.2
111 ^[b]	DDE <u>91</u> EQF <u>91</u> YHLLSFNAV	11.8
112 ^[b]	DDE <u>90</u> EQF <u>91</u> YHLLSFNAV	13.6
113 ^[b]	DDE <u>91</u> EQF <u>90</u> YHLLSFNAV	15.4
133	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL <u>91</u> SFN <u>91</u> V	12.6
134	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL <u>90</u> SFN <u>91</u> V	8.1
135	DDE <u>S₅</u> EQF <u>S₅</u> YHL <u>91</u> SFN <u>90</u> V	12.9
136	DDE <u>91</u> EQF <u>91</u> YHL <u>S₅</u> SFN <u>S₅</u> V	13.1
137	DDE <u>90</u> EQF <u>91</u> YHL <u>S₅</u> SFN <u>S₅</u> V	12.3
138	DDE <u>91</u> EQF <u>90</u> YHL <u>S₅</u> SFN <u>S₅</u> V	16.7

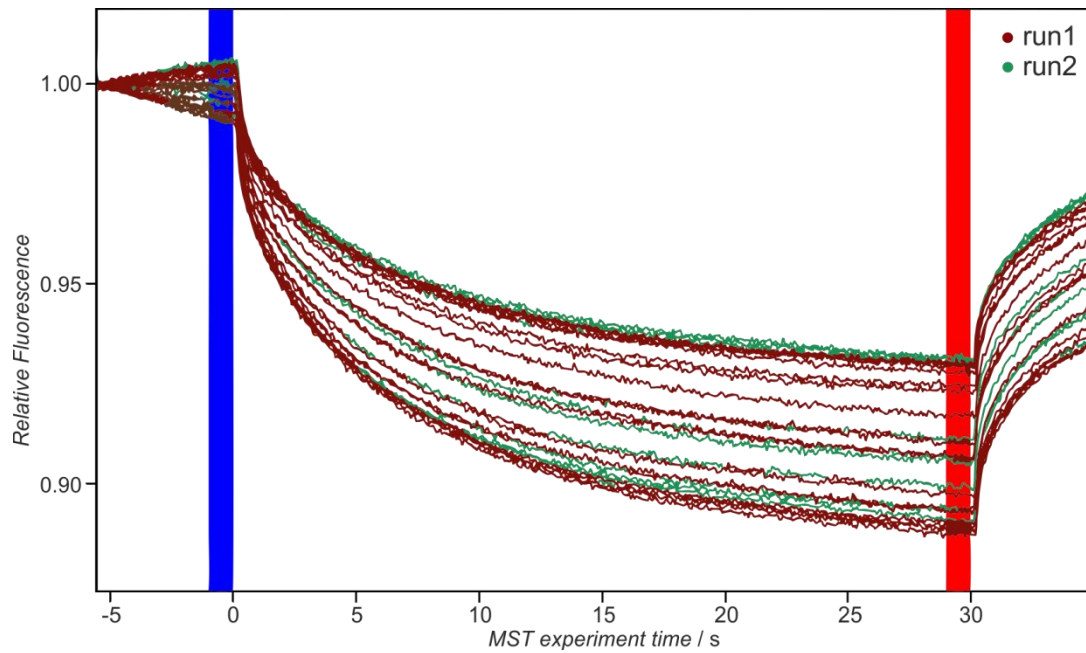


Abbildung 63. MST-Bindungskurven des Alkin-makrozyklisierten Peptids 124.

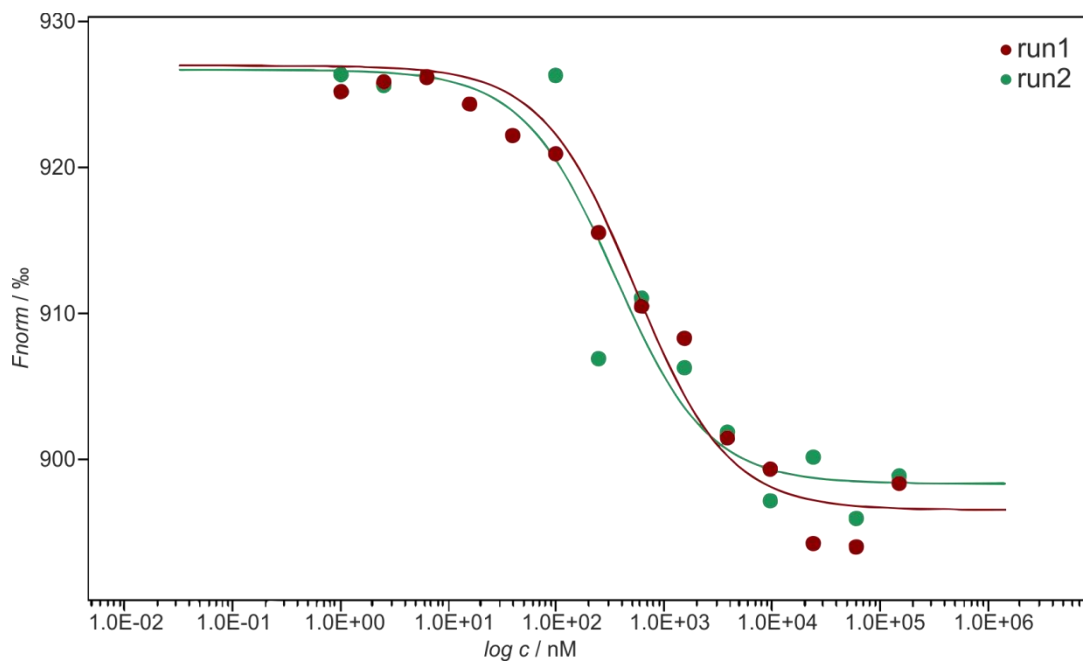


Abbildung 64. MST-Auswertung für das Alkin-makrozyklisierte Peptid 124.

Tabelle 22. Ergebnisse der MST-Messung für Peptid 124. $K_D = 0.44 \pm 0.09 \mu\text{M}$. $N = 2$.

Peptid 124	K_D
Run1	$0.53 \pm 0.10 \mu\text{M}$
Run2	$0.35 \pm 0.15 \mu\text{M}$

Tabelle 23. Datensatz und Refinement Statistik des 2.4 Å Komplex von 14-3-3 und Peptid **124** (PDB: 5J31). Angaben in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung.

Peptid 124 /14-3-3 ζ	
Data collection	
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	83.40, 104.09, 113.80
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	47.63-2.4(2.50-2.40)
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{meas}	5.2(64.4)
<i>I</i> / σ	19.37(3.06)
Completeness (%)	100(100)
Redundancy	13.28(13.79)
Refinement	
Resolution (Å)	47.94-2.4(2.60-2.40)
No. reflections	38425
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.163/0.219(0.183/0.230)
No. atoms	
Protein	3675
Ligand/ion	154
Water	358
<i>B</i> -factors	
Protein	A:65.44; B: 65.51
Ligand/ion	C:67.72; E: 68.46
Water	70.08
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.0206/0.0199
Bond angles (°)	2.8437/3.3327

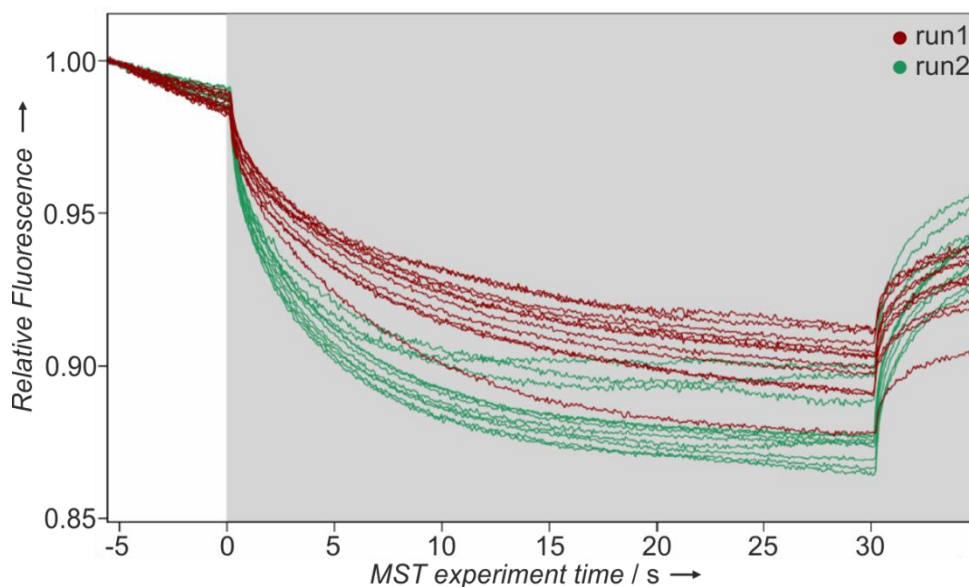


Abbildung 65. MST-Bindingskurven des bizyklischen Peptids **134**.

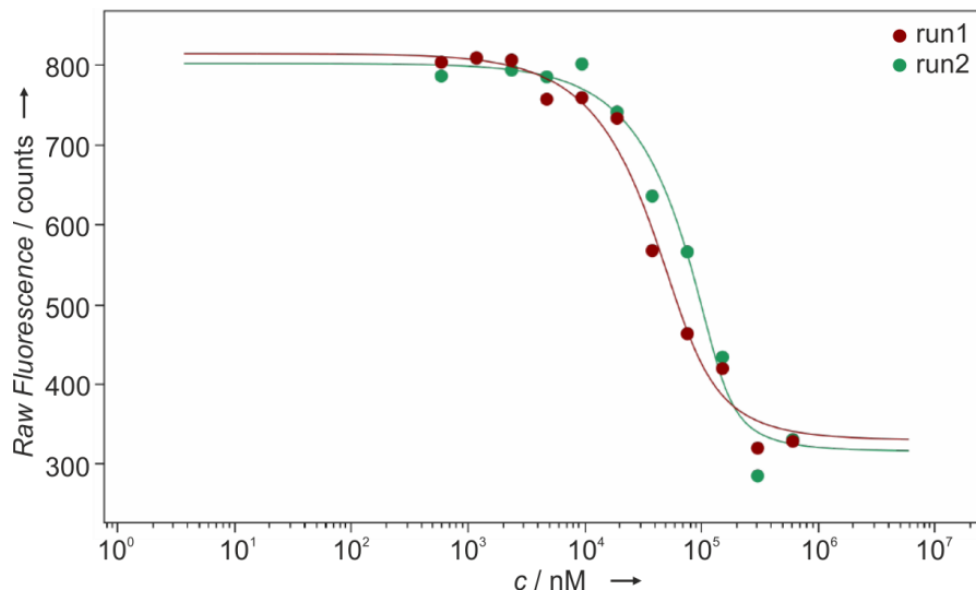


Abbildung 66. Fluoreszenz-Auswertung des bizyklischen Peptids **134**.

Tabelle 24. Ergebnisse der MST-Messung für Peptid **134**. $K_D = 11 \pm 2 \mu\text{M}$. $N = 2$.

Peptid 134	K_D
Run1	$9 \pm 8 \mu\text{M}$
Run2	$13 \pm 6 \mu\text{M}$

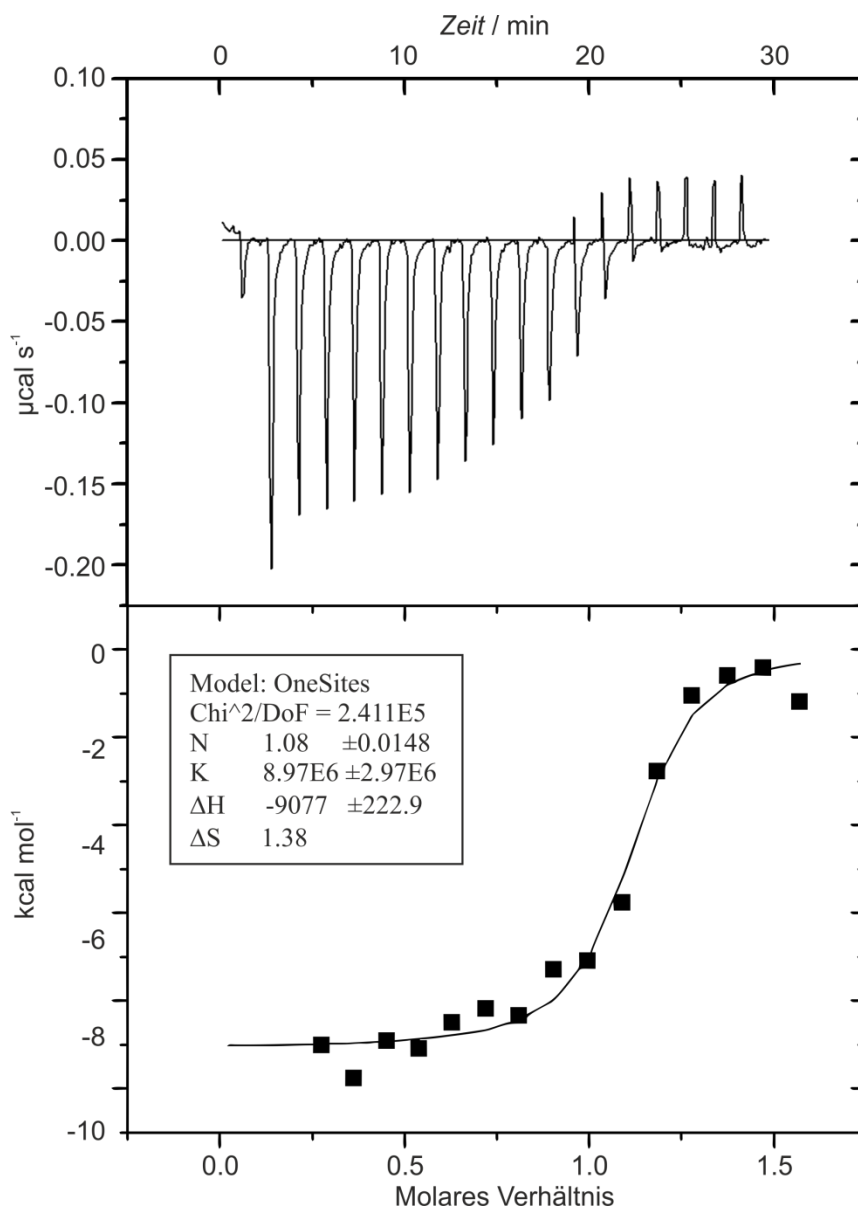


Abbildung 67. ITC-Experiment von **142**. Repräsentative ITC Spektrum von **142** ($150 \mu\text{M}$) titriert zu UNC119a ($17.4 \mu\text{M}$). Zur Auswertung wurden Referenzspektren von **142** titriert zu Messpuffer und Messpuffer titriert zu UNC119a abgezogen. $K_D = 111 \text{ nM}$.

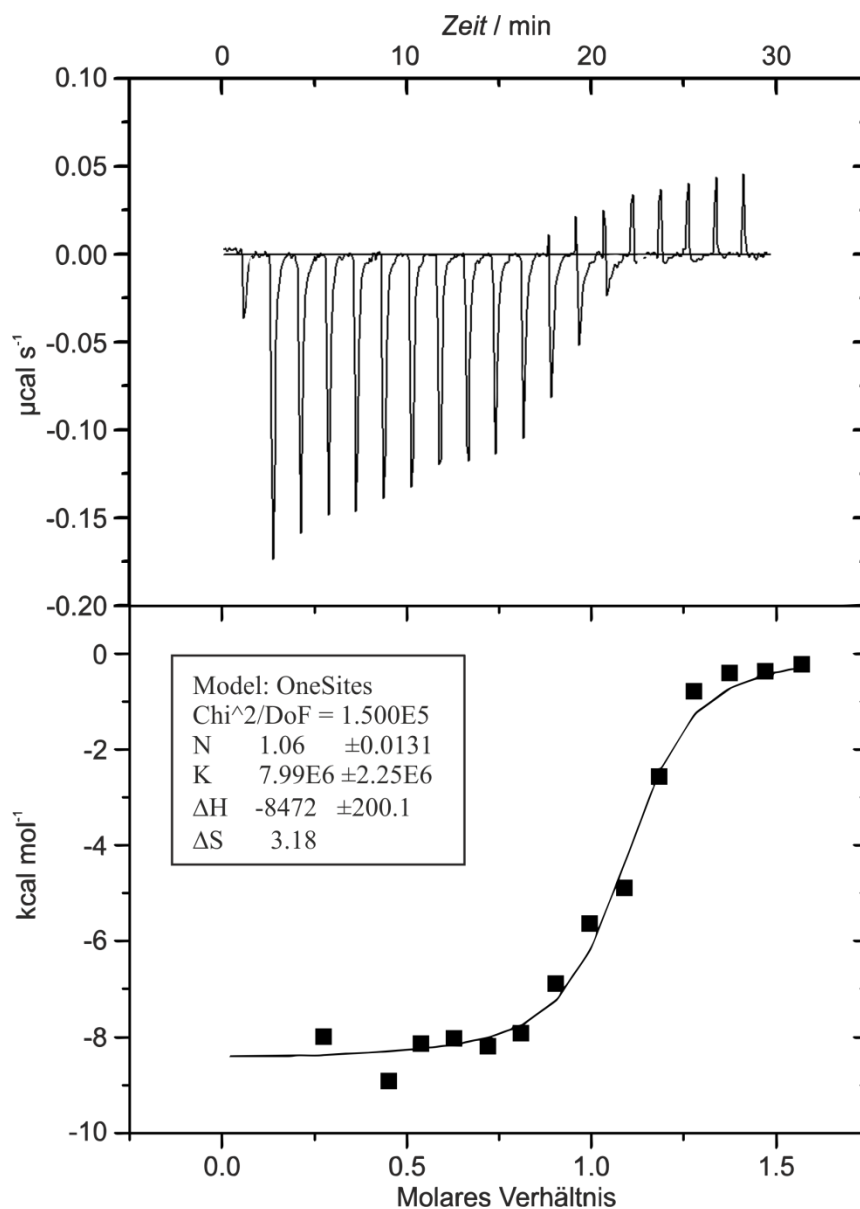


Abbildung 68. ITC-Experiment von **142**. Repräsentative ITC Spektrum von **142** ($150 \mu\text{M}$) titriert zu UNC119a ($17.4 \mu\text{M}$). Zur Auswertung wurden Referenzspektren von **142** titriert zu Messpuffer und Messpuffer titriert zu UNC119a abgezogen. $K_D = 125 \text{ nM}$.

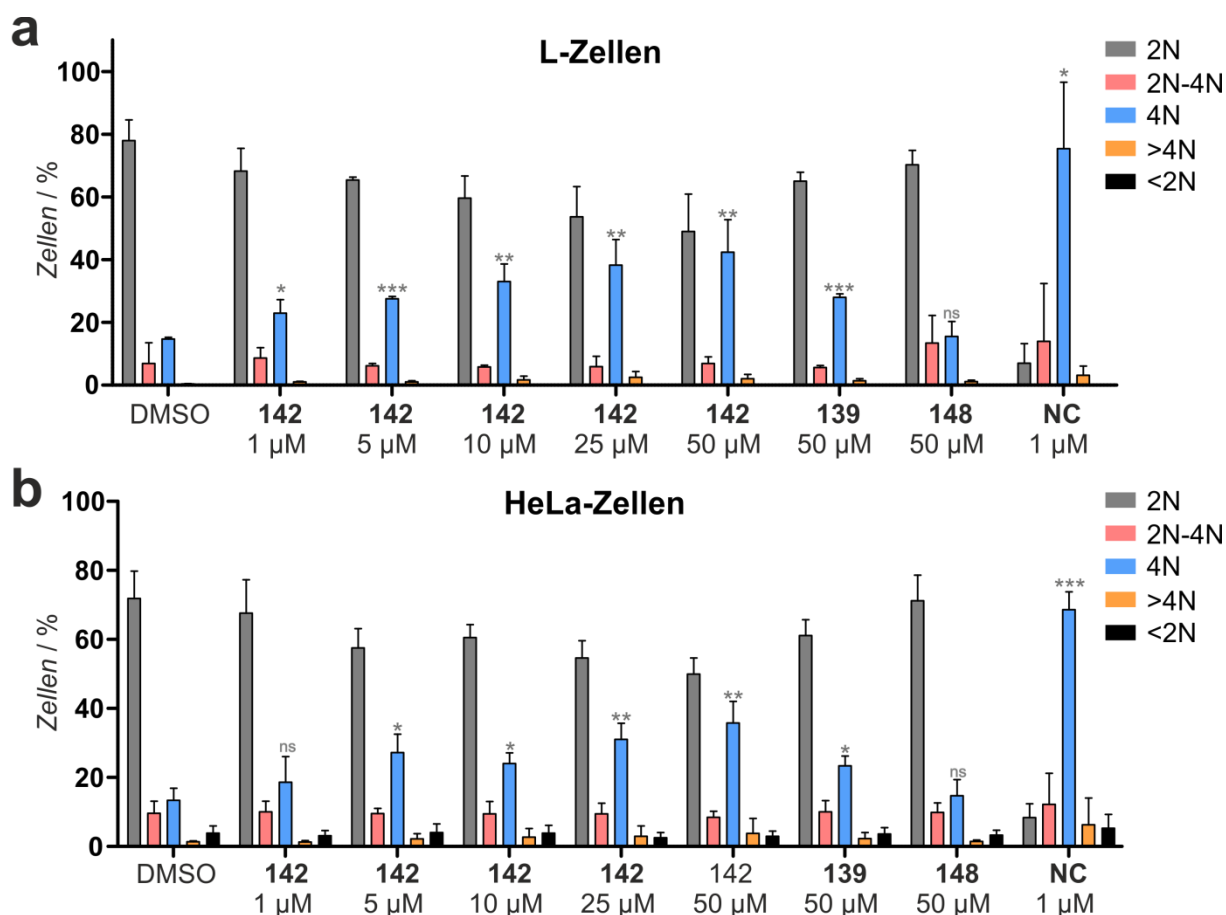


Abbildung 69. Vollständige Übersicht der Durchflusszytometrieergebnisse. (a) L-Zellen und (b) HeLa-Zellen wurden 72 h mit nicht-markiertem Peptid inkubiert und ihr DNA-Gehalt anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. NC = Nocodazol. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis von Dreifachbestimmungen. Fehler entspricht 1σ . Signifikanz p gegenüber DMSO: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N = DNA-Gehalt.

Tabelle 25. Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Messungen von L- und HeLa-Zellen. N = 3. Fehler entsprechen 1σ .

Verbindung	Konzentration	DNA-Gehalt 4N	
		L-Zellen	HeLa-Zellen
DMSO	1%	14.7 ± 0.4	13.3 ± 2.9
	1 µM	23.0 ± 3.5	18.6 ± 6.0
	5 µM	27.5 ± 0.6	27.2 ± 4.3
142	10 µM	33.0 ± 4.6	24.0 ± 2.5
	25 µM	38.3 ± 6.7	31.0 ± 3.8
	50 µM	42.4 ± 8.5	35.8 ± 5.1
139	50 µM	28.0 ± 0.9	24.4 ± 2.3
148	50 µM	15.5 ± 3.9	14.7 ± 3.8
Nocodazol	1 µM	75.4 ± 15.0	68.6 ± 4.2