

# **Synthese biologisch interessanter Glyco- und Phosphopeptide**

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

## **Dissertation**

Von

Diplom-Chemiker  
**Norman Kuder**  
aus Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. B. Ralle

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 09. 2001

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. H. Waldmann am Institut für Organische Chemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe in der Zeit vom Oktober 1997 bis zum April 2000 und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund und am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund in der Zeit vom Mai 2000 bis zum September 2001 angefertigt.

*In memoriam Clara Drodofsky*

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1.</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>2.</u></b>	<b><u>Allgemeiner Teil</u></b> .....	<b>2</b>
<b><u>2.1</u></b>	<b><u>Das Tau(<math>\tau</math>)-Protein</u></b> .....	<b>2</b>
<b><u>2.2</u></b>	<b><u>Kernimport</u></b> .....	<b>7</b>
<b><u>2.3</u></b>	<b><u>Das Jun-Protein</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>2.4</u></b>	<b><u>Synthese von Gluco- und Phosphopeptiden</u></b> .....	<b>14</b>
	2.4.1 Synthese von Peptiden in Lösung und an fester Phase .....	14
	2.4.2 Schutzgruppen in der Peptidsynthese .....	17
	2.4.3 Glycosylierung und Phosphorylierung von Peptiden .....	19
<b><u>3.</u></b>	<b><u>Ziel der Arbeit</u></b> .....	<b>23</b>
<b><u>4.</u></b>	<b><u>Spezieller Teil</u></b> .....	<b>25</b>
<b><u>4.1</u></b>	<b><u>Synthese des dreifach phosphorylierten Pentapeptids <math>^{198}\text{Ser}</math>-<math>^{202}\text{Ser}</math> des menschlichen <math>\tau</math>-Proteins</u></b> .....	<b>25</b>
	4.1.1 Retrosynthetische Überlegungen .....	25
	4.1.2 Synthese .....	27
<b><u>4.2</u></b>	<b><u>Synthese der fluoreszenzmarkierten NLS des vJun-Proteins</u></b> .....	<b>32</b>
	4.2.1 Retrosynthetische Überlegungen .....	32
	4.2.2 Synthese des glycosylierten und phosphorylierten Serinbausteins .....	35
	4.2.3 Darstellung des C-terminalen Tripeptids 39 und dessen Verankerung an der festen Phase .....	43
	4.2.4 Darstellung der Dekapeptide an fester Phase .....	46
<b><u>5.</u></b>	<b><u>Zusammenfassung und Ausblick</u></b> .....	<b>53</b>

<b><u>6.</u></b>	<b><u>Experimenteller Teil</u></b> .....	<b>58</b>
<b><u>6.1</u></b>	<b><u>Meßgeräte und Hilfsmittel</u></b> .....	<b>58</b>
<b><u>6.2</u></b>	<b><u>Versuche zu Kapitel 4.1</u></b> .....	<b>60</b>
<b><u>6.3</u></b>	<b><u>Versuche zu Kapitel 4.2</u></b> .....	<b>71</b>
	6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.2 .....	71
	6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.3 .....	84
	6.3.3 Versuche zu Kapitel 4.2.4 .....	91
<b><u>7.</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	<b>96</b>
<b><u>8.</u></b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b> .....	<b>105</b>

# 1. Einleitung

Für die Funktionsweise lebender Zellen ist die inter- und intrazelluläre Kommunikation von zentraler Bedeutung. Störungen der Signaltransduktion und damit der zellulären Regulationsprozesse können zu schweren Krankheiten wie Krebs führen. Es ist deshalb von großem Interesse, die molekularen Grundlagen der Signalweiterleitung zu verstehen, um die Ursachen dieser Krankheiten zu erkennen und gegebenenfalls therapieren zu können.<sup>[1]</sup>

Bei der JNK-Signaltransduktionskaskade wird ein extrazelluläres Signal (z. B. UV-Licht), welches die Zellmembran erreicht, zuerst über membranverankerte, lipidmodifizierte Proteine weitergeleitet, die eine Proteinphosphorylierungskaskade im Cytoplasma auslösen.<sup>[2]</sup> Am Ende dieser Kaskade wird das Jun-Protein aktiviert und über einen erst teilweise verstandenen Mechanismus in den Zellkern importiert. Dort bildet es einen Aktivator-Protein-1 (AP1) genannten Transkriptionsfaktor, welcher schließlich die Transkription bestimmter Gene auslöst.<sup>[3]</sup>

Für die Untersuchung solcher Signaltransduktionsprozesse stellen Peptide, welche charakteristische Teilsequenzen des Proteins mit definierten Seitenkettenmodifikationen enthalten, wertvolle Werkzeuge dar. Sie helfen, die molekularen Ursachen von Prozessen wie beispielsweise den Import von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern zu verstehen.

Neben der Funktion als molekularer Schalter im Rahmen verschiedener Signaltransduktionskaskaden hat die Phosphorylierung zahlreiche weitere biologische Funktionen in der Zelle. Der Zustand der potentiellen Phosphorylierungsstelle wird dabei über ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Kinasen und Phosphatasen reguliert. Bei Fehlfunktionen eines der beteiligten Enzyme können schwere Krankheiten entstehen. So ist bei Alzheimerpatienten das  $\tau$ -Protein in einer unnatürlichen Weise hyperphosphoryliert. Die Gründe für die Hyperphosphorylierung sind unklar. Auch hier können synthetisch dargestellte Partialsequenzen zum Verständnis der Krankheit beitragen.<sup>[4]</sup>

Die Synthese glycosylierter und phosphorylierter Partialstrukturen, die in den Kernimport involviert sind, einer viralen Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP1, sowie die Darstellung einer mehrfach phosphorylierten Teilsequenz des menschlichen  $\tau$ -Proteins sind Gegenstand dieser Arbeit.

## 2. Allgemeiner Teil

### 2.1 Das Tau( $\tau$ )-Protein

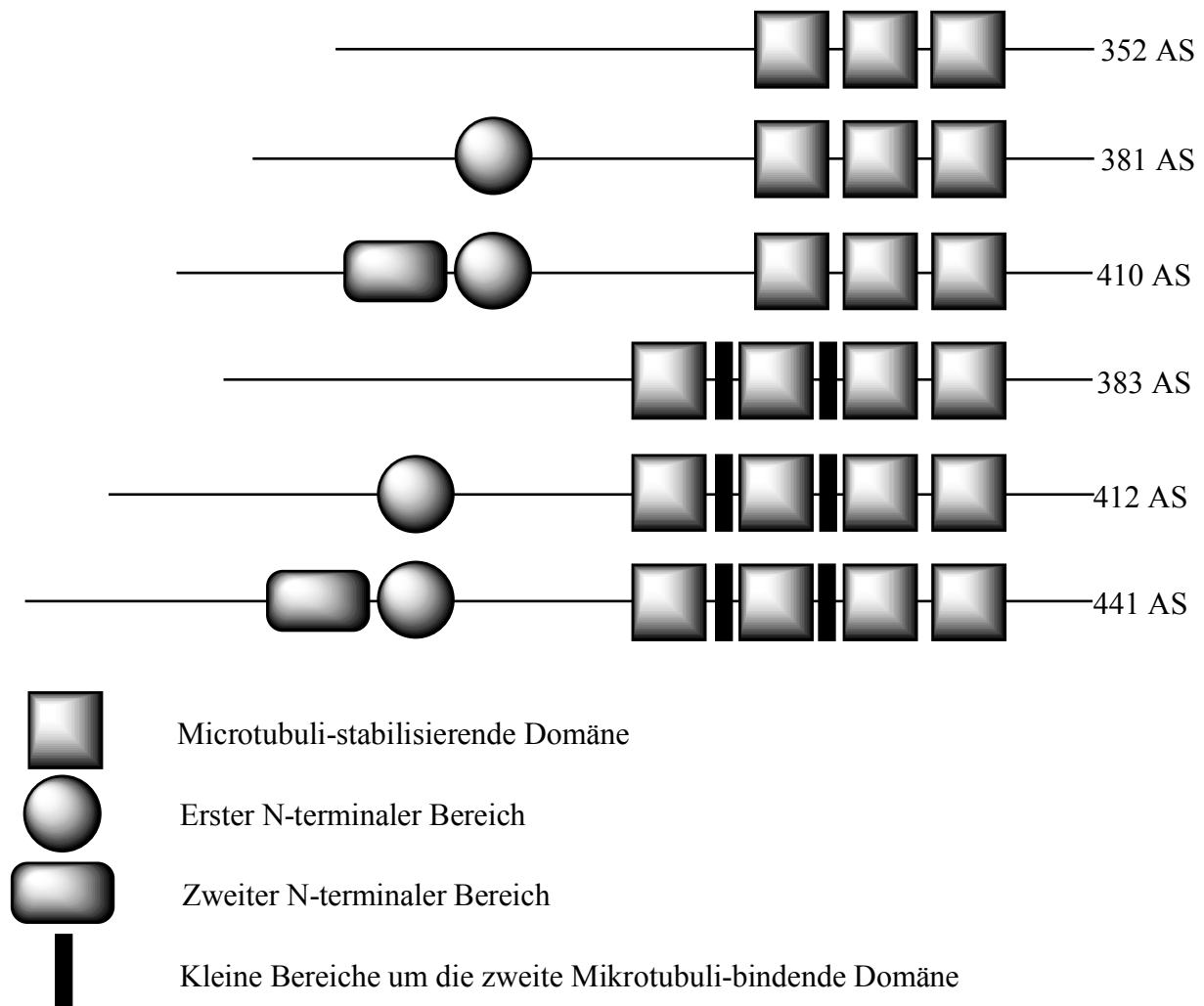
Die Familie der  $\tau$ -Proteine stabilisiert die Bildung von Mikrotubuli, langgestreckter fibrillärer Proteinstrukturen des Cytoskletts, aus Tubulin und wurde erstmals 1977 gemeinsam mit Tubulin isoliert.<sup>[5]</sup> Die  $\tau$ -Proteine werden sowohl im Zellkern als auch in der Zellmembran und dem Cytosol von Zellen des zentralen Nervensystem gefunden, wo sie mit Mikrotubuli-stabilisierenden Domänen die Stabilität der Microtubuli unterstützen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß die  $\tau$ -Proteine mit den Organellen im Cytoplasma wechselwirken können. Wechselwirkungen mit der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) deuten auf eine Rolle des  $\tau$ -Proteins im Phosphatidylinositol-Signaltransduktionsweg hin.<sup>[4]</sup>

Obwohl die  $\tau$ -Proteine von einem einzigen Gen codiert werden, führt unterschiedliches Spleißen der mRNA zu sechs Isoformen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der Mikrotubuli-stabilisierenden Domänen und der im N-terminalen Bereich zusätzlich vorhandenen Bereiche (Schema 1).<sup>[6,7,8]</sup>

Während man ursprünglich vermutete, daß die sich 3-4 mal wiederholenden Domänen für die Bindung des  $\tau$ -Proteins an die Mikrotubuli verantwortlich sind, zeigen neuere Untersuchungen, daß diese Regionen nur mit geringer Affinität an die Mikrotubuli binden. Vielmehr weisen die Prolin-reichen flankierenden Bereiche eine hohe Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli auf, die 3-4 mal vorhandenen Domänen hingegen fördern die Stabilität und das Wachstum der Mikrotubuli. Außerdem scheinen nur die jeweils ersten zwei Domänen effektiv mit den Mikrotubuli zu wechselwirken.<sup>[9]</sup> Sowohl die flankierenden als auch die sich wiederholenden Regionen sind für die Wirksamkeit des  $\tau$ -Proteins von essentieller Bedeutung. Zuerst bindet das  $\tau$ -Protein über die flankierenden Domänen an die Mikrotubuli, danach unterstützen die sich wiederholenden Domänen die Stabilität und den Wachstum der Microtubuli.<sup>[10]</sup>

Die Bindung des  $\tau$ -Proteins an die Mikrotubuli wird über die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Seitenketten reguliert. Ein phosphoryliertes  $\tau$ -Protein bindet nicht oder deutlich schlechter an die Mikrotubuli. Hierbei scheint vor allem die Phosphorylierung von Ser<sup>262</sup> und Ser<sup>356</sup> in den Mikrotubuli-stabilisierenden Domänen durch die Mikrotubuli Affinität regulierende Kinase (microtubule affinity-regulating kinase, MARK) und die

Phosphorylierung des  $^{214}\text{Ser}$  durch die Protein Kinase A (protein kinase A, PKA) von entscheidender Bedeutung zu sein (jeweils bezogen auf die längste menschliche Isoform).<sup>[11,12]</sup> Diese Phosphorylierungen sollen zu einer Konformationsänderung des Proteins führen, weshalb eine Bindung des  $\tau$ -Proteins an die Mikrotubuli erschwert wird.<sup>[13]</sup>



**Schema 1:** Unterschiedliche Strukturen der  $\tau$ -Isoformen.

Das Interesse an  $\tau$ -Proteinen intensivierte sich, als in Gehirnen von Alzheimerpatienten zwei aus unnatürlichen Proteinen gebildete Ablagerungen gefunden wurden: die Amyloid Plaque (amyloid plaques, AP) im extrazellulären Raum und die neurofibrillären Knoten (neurofibrillary tangles, NFT) im Cytosol. Beide bestehen aus zu Fasern zusammengelagerten Proteinen. Während die APs aus Amyloid- $\beta$ -Peptiden zusammengesetzt sind, welche durch proteolytische Spaltung aus dem membrangebundenen Amyloid  $\beta$  Vorgängerprotein, (amyloid  $\beta$ -precursor protein, APP) entstehen, ergaben Untersuchungen, daß die NFT's hauptsächlich aus gepaarten helikalen Fasern (paired helical filaments (PHF) bestehen,



welche wiederum größtenteils aus dimeren hyperphosphorylierten  $\tau$ -Proteinen aufgebaut sind.<sup>[14]</sup> Dabei korreliert die Anzahl der Ablagerungen von NFTs mit dem fortschreitenden Verlauf der Krankheit.<sup>[15]</sup>

Die Gründe, welche zur Hyperphosphorylierung führen, sind noch nicht im Detail geklärt. Es wurden bisher im PHF- $\tau$ -Protein mindestens 30 Phosphorylierungsstellen gefunden, die jedoch häufig auch im natürlichen  $\tau$ -Protein phosphoryliert sein können.<sup>[6,16,17]</sup> Im Vergleich zum normalen Protein kann das PHF- $\tau$ -Protein nicht durch Phosphatasen dephosphoryliert werden, es sei denn, es wird durch den Einsatz von denaturierenden Reagenzien wieder in Lösung gebracht.<sup>[18]</sup> Interessanterweise ist fötales  $\tau$ -Protein, welches nur aus der kürzesten Isoform gebildet wird, ebenfalls hyperphosphoryliert. Es reagiert mit den Antikörpern, die auch auf PHF ansprechen, bildet jedoch selbst keine PHFs aus.<sup>[19]</sup>

Die Behandlung von verschiedenen Zellkulturen mit Amyloid- $\beta$ -Peptiden ergab, daß hierdurch das  $\tau$ -Protein hyperphosphoryliert werden kann.<sup>[20]</sup> Der Mechanismus, durch welchen die Amyloid- $\beta$ -Peptide die Hyperphosphorylierung auslösen, ist noch nicht endgültig verstanden, es scheint sich aber um eine gesteigerte Aktivität der Proteinkinasen zu handeln.<sup>[21]</sup>

Auch im Verlauf der Apoptose, dem programmierten Zelltod, wird das  $\tau$ -Protein durch eine gesteigerte Aktivität der Kinasen cdc2 und cdk5 hyperphosphoryliert.<sup>[22]</sup> Dabei kann das genaue Ausmaß der Hyperphosphorylierung nicht exakt festgestellt werden, da die ATP-abhängigen Kinasen nach dem Zelltod aufgrund der fehlenden Zellatmung nicht mehr phosphorylieren können, die Phosphatasen jedoch auch nach dem Zelltod noch aktiv sind.<sup>[23]</sup>

Der Grad der Phosphorylierung des natürlichen  $\tau$ -Proteins hängt von einem komplizierten Gleichgewicht zwischen verschiedenen Kinasen (MARK, MAPK, PKA, PKC, GSK3,...) und den entsprechenden Phosphatasen (PP1, PP2A, PP2B, PP2C,...) ab. Die Ursache der Hyperphosphorylierung liegt deshalb wahrscheinlich nicht in der Fehlfunktion eines einzigen Enzyms begründet.<sup>[10,24,25]</sup>

Wenn Zellen osmotischem Streß ausgesetzt werden, phosphoryliert die Familie der Stress-aktivierte Protein Kinase (stress-activated protein kinases, SAPKs) Serin-/Threoninseitenketten. Da jedoch nicht nur Ser/Thr-Pro Motive, welche die Substrate der SAPKs sind, phosphoryliert werden, müssen auch andere Kinasen beteiligt sein.<sup>[26]</sup> Bei der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) wurde festgestellt, daß unter osmotischem Stress die regulierende Untereinheit p35 durch einen proteolytisch gespaltenen Teil von p35, p25, ersetzt wird. Dies ist verbunden mit einer erhöhten Aktivität dieser Kinase, welche *in vivo* das  $\tau$ -Protein phosphoryliert. Tatsächlich wurden in den Gehirnen von

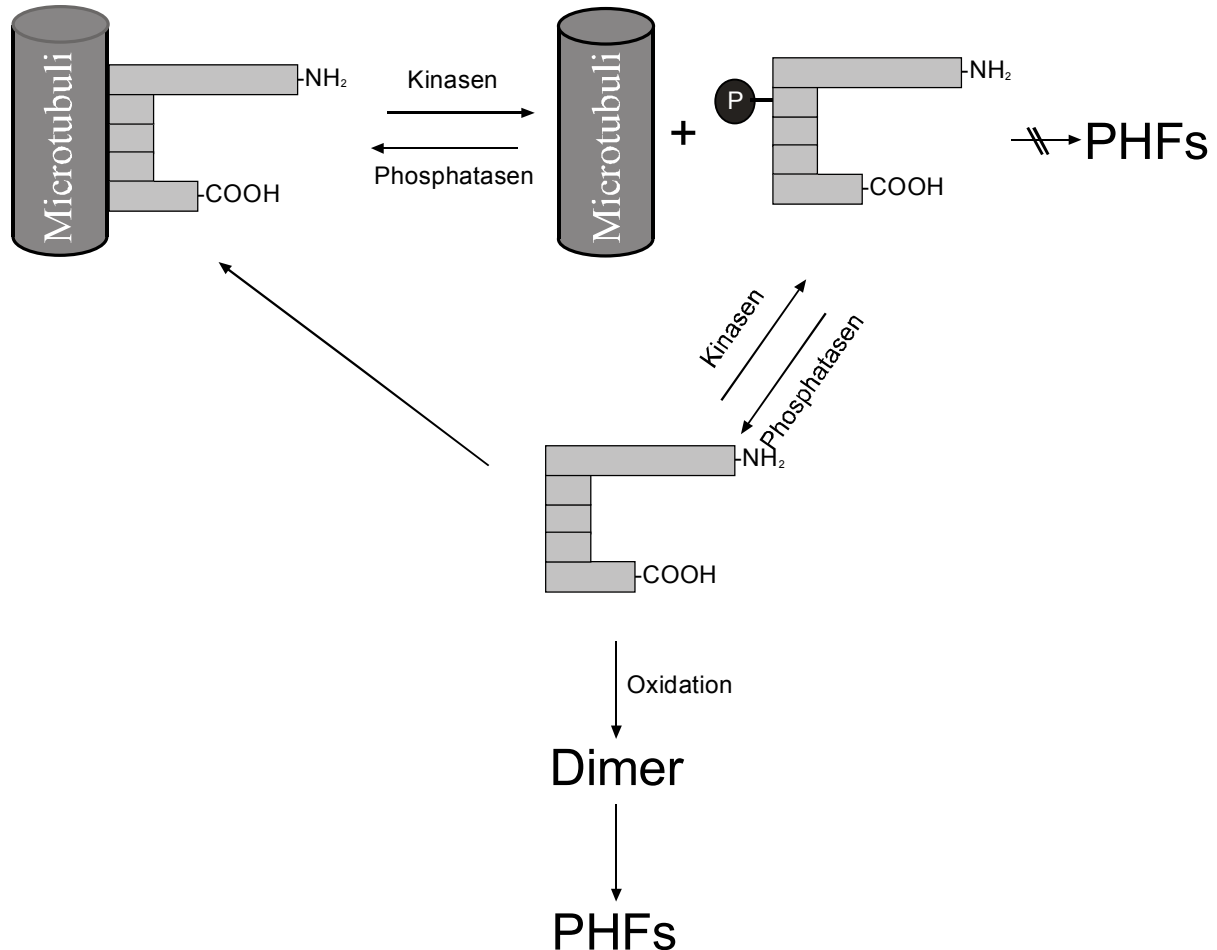
Alzheimerpatienten erhöhte p25-Werte festgestellt.<sup>[27]</sup> Das Dimer aus Cdk5 und p25 wird auch neuronale Cdc2-ähnliche Proteinkinase (neuronal Cdc2-like protein kinase, NCLK; oder auch:  $\tau$ -Kinase II) genannt. *In vitro* konnte festgestellt werden, daß die Cdk5-Untereinheit der NCLK über das  $\tau$ -Protein an Mikrotubuli bindet. Diese führt zu einer effektiven Phosphorylierung des  $\tau$ -Protein durch die NCLK, obwohl es im Gehirn mehrere Proteinsubstrate für die NCLK gibt. Die Phosphorylierung des  $\tau$ -Proteins führt letztendlich zur PHF-Bildung und zur Apoptose.<sup>[28]</sup>

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, daß die Hyperphosphorylierung der  $\tau$ -Proteine zur Dimerisierung und weiter zur PHF-Bildung führt,<sup>[29]</sup> ergaben neuere Ergebnisse, daß insbesondere die Phosphorylierungen von KXGS-Motiven (z. B. <sup>214</sup>Ser <sup>262</sup>Ser, u. a.) durch die Kinasen MARK oder PKA, welche eine Dissoziation von den Mikrotubuli bewirken, eine Bildung von PHFs wirkungsvoll inhibieren.<sup>[10]</sup> Phosphorylierungen von Prolin-abhängigen Kinasen (z. B. GSK-3 $\beta$  und MAPK) hingegen, die nur Ser-Pro oder Thr-Pro als Substrate akzeptieren, haben sowohl auf die Dissoziation von den Mikrotubuli als auch auf die Bildung von PHFs einen geringen Einfluß; es sind jedoch diese Motive, die von den Antikörpern, welche auf das hyperphosphorylierte  $\tau$ -Protein reagieren, erkannt werden. Auch die Phosphorylierung aller dieser Motive, insgesamt 14, hat einen geringeren inhibitorischen Effekt auf die Bildung von PHFs als die Phosphorylierung eines KXGS-Motivs.

Das Entstehen von PHFs ist stark von der Bildung des über eine Disulfidbrücke des <sup>322</sup>Cys verbrückten  $\tau$ -Dimers abhängig.<sup>[30]</sup> Die Ausbildung dieser Disulfidbrücke wird durch die Phosphorylierung von <sup>262</sup>Ser wirkungsvoll unterdrückt. Da jedoch ein an <sup>214</sup>Ser phosphoryliertes  $\tau$ -Protein durchaus in der Lage ist, Dimere zu bilden, beruht die Inhibierung der PHF-Bildung nicht ausschließlich auf der Unterdrückung der Dimerbildung.<sup>[10]</sup> Interessant ist hierbei, daß Phosphorylierungen in der Nähe von <sup>214</sup>Ser z. B. von <sup>217</sup>Ser die PHF-Bildung nicht inhibieren. Durch Überladung von Mikrotubuli mit  $\tau$ -Proteinen konnte allerdings bewiesen werden, daß die Dimerbildung und damit der erste Schritt zur PHF-Bildung bereits am Mikrotubulus stattfinden kann, vermutlich unterstützt durch den polyanionischen C-Terminus des Tubulins.<sup>[31]</sup> Jedoch zeigten auch Mutanten, bei denen alle Cysteine zu Alaninen mutiert waren, die Tendenz zur Ausbildung der Fasern, wenn die Polymerisation durch Fettsäuren gefördert wurde.<sup>[32]</sup>

Zusammenfassend läßt sich vermuten, daß das  $\tau$ -Protein nach der Phosphorylierung von KXGS-Motiven von den Mikrotubuli dissoziiert, von Phosphatasen wieder dephosphoryliert wird und sich durch Oxidation des <sup>322</sup>Cys Dimere bilden, welche sich dann weiter zu PHFs

zusammenlagern. Erst danach können die KXGS-Motive phosphoryliert werden. Wenn die Phosphorylierung durch die Prolin-abhängigen Kinasen stattfindet ist irrelevant, da sie nur einen geringen Effekt auf die Assoziation an die Microtubuli und die Bildung der PHF's zu haben scheint (Schema 2).



**Schema 2:** Mechanismus zu Bildung von PHFs

Das  $\tau$ -Protein liegt in der Zelle als zufälliges Knäuel ohne größere Abschnitte mit Sekundärstruktur vor.<sup>[28d,33]</sup> In den PHFs dagegen kann ein Bereich mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur nachgewiesen werden. Diese wird durch ein Hexapeptid vom <sup>306</sup>Val bis zum <sup>311</sup>Lys gebildet. Untersuchungen *in vitro* ergaben, daß diese Sequenz wichtig für die Ausbildung der PHF's ist. Durch die räumliche Nähe zum <sup>322</sup>Cys, welches Disulfidbrücken ausbilden kann, ist die Bildung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur mit dem Hexapeptid des anderen  $\tau$ -Proteins erleichtert.<sup>[34]</sup>

## 2.2 Kernimport

In eukaryotischen Zellen befindet sich das Genom im Zellkern wo es auch repliziert und in RNA transkribiert wird, die anschließend zur Translation ins Cytoplasma transportiert wird. Der Nukleus wird durch die doppelwandige Kernhülle vom Cytosol abgetrennt. Proteine, die ihre Funktion im Zellkern wahrnehmen, müssen nach ihrer Synthese an den Ribosomen im Cytoplasma gezielt durch die Kernhülle in den Nukleus transportiert werden. Ebenso muß RNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert werden. Dieser Austausch von Makromolekülen, Proteinen und RNA, erfolgt durch den Kernporenkomplex (nuclear pore complex, NPC), einem großen, in der Kernhülle lokalisierten, Proteinkomplex, welcher aus 100 – 200 einzelnen Proteinen aufgebaut ist und eine molekulare Masse von 125 MDa aufweist.<sup>[35]</sup>

Durch den NPC können Ionen und Metaboliten bis zu einem Gewicht von ca. 50 kDa unselektiv entlang eines Konzentrationsgradienten diffundieren. Größere Moleküle können auch entgegen dem Konzentrationsgradienten aktiv unter Verbrauch von Energie transportiert werden. Bereits 1984 konnte erstmals einer der Faktoren, welche für einen Kernimport notwendig sind, identifiziert werden. Es handelt sich um eine Sequenz von nur wenigen Aminosäuren mit überwiegend basischen Seitenketten (Arginin und Lysin).<sup>[36]</sup> Diese Sequenz, auch Kernlokalisierungssequenz (nuclear localization signal, NLS) genannt, verursacht, wenn sie an Proteine, welche sonst nur im Cytosol vorkommen, anligiert wird, deren Kernimport.<sup>[37]</sup>

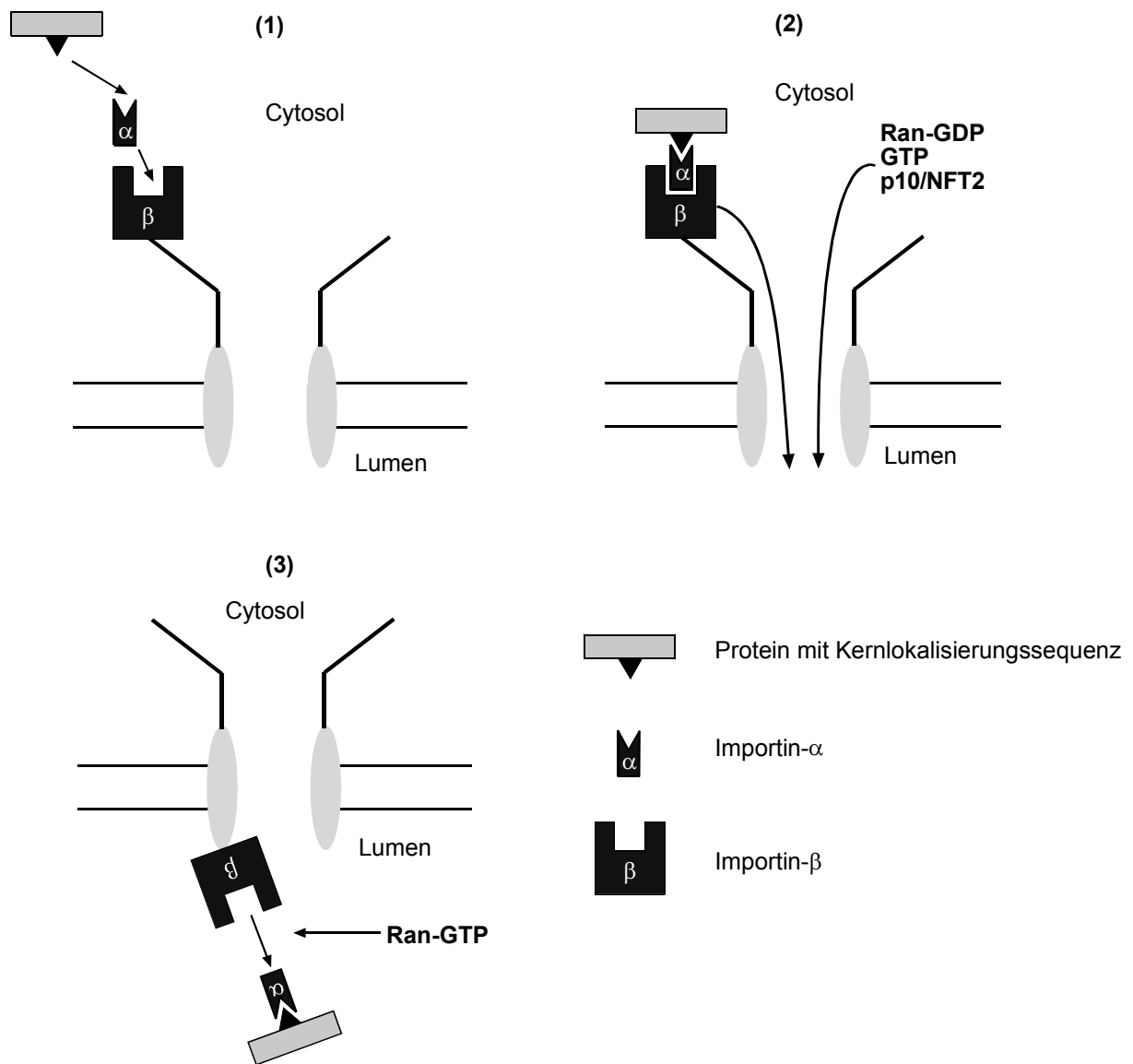
Inzwischen unterscheidet man 3 verschiedene NLS:

- Sequenzen, die der zuerst gefunden NLS ähneln. Sie bestehen aus einem kurzen Abschnitt mit basischen Aminosäuren.<sup>[36,37a,38]</sup>
- Zwei durch einen kurzen Bereich anderer Aminosäuren getrennte basische Abschnitte.<sup>[39]</sup>
- Neuere Untersuchungen ergaben, daß in seltenen Fällen NLS ohne die klassischen basischen Abschnitte auftreten.<sup>[40]</sup>

Der eigentliche Kernimport läuft in zwei Schritten ab. Zuerst erfolgt im Cytosol die Bildung eines Proteinkomplexes aus dem NLS-Rezeptor, dem Importin- $\alpha$ , welches ein Motiv aus acht Wiederholungen hydrophober Aminosäuren enthält, und dem zu importierenden Protein.<sup>[41,42]</sup>

An dieses Importin- $\alpha$  bindet ein zweites Protein, das Importin- $\beta$ . Importin- $\alpha$  scheint lediglich die Funktion eines Brückenproteins zwischen dem zu importierenden Protein und Importin- $\beta$  wahrzunehmen, ohne weiter in den Kernimport involviert zu sein. Dieser Komplex wird

Kernporengerichteter Komplex (nuclear pore-targeting complex) genannt und lagert sich über das Importin- $\beta$  an der cytosolischen Seite des NPC an.<sup>[43]</sup> Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß eventuell Importin- $\beta$  nie vollständig vom NPC dissoziiert (Schema 2).<sup>[44]</sup>



**Schema 3:** Mechanismus des Kernimports.

Der Transport des Proteinkomplexes durch den NPC in den Zellkern wird durch eine kleine GTPase, Ran, und dem mit ihr assoziierten Faktor p10/NFT2 vermittelt.<sup>[45,46]</sup> Es ist unsicher, ob noch weitere Proteine in den Kernimport involviert sind. Während der erste Schritt ohne Energieverbrauch abläuft, wird jetzt durch die Hydrolyse von GTP durch Ran Energie verbraucht (Schema 3). Ob die Hydrolyse eines GTP-Moleküls den gesamten Energiebedarf

des Transportes deckt oder ob mehrere Hydrolysezyklen durchlaufen werden, ist unklar.<sup>[47]</sup> Der Verlauf des Kernimports ist von der Hefe bis zum Mensch hochgradig konserviert.<sup>[48]</sup>

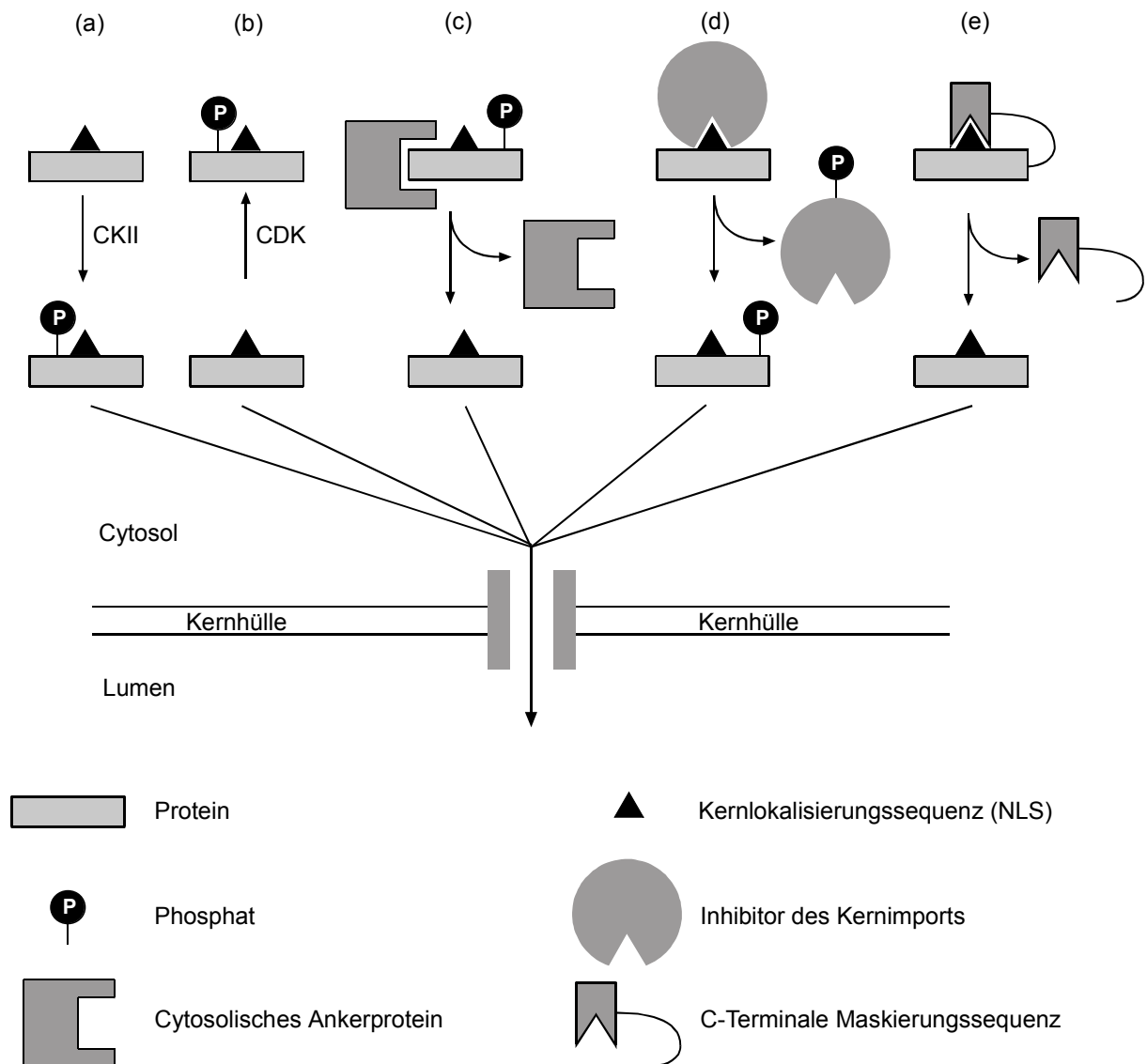
Im Kern angekommen dissoziiert der Transportkomplex, das importierte Protein wird freigesetzt. Dabei sollte der Austausch von GDP gegen GTP an Ran das Importin- $\alpha$  und das importierte Protein aus dem Importin  $\beta$  verdrängen.<sup>[49]</sup> Eine Importin- $\beta$ -Mutante, welcher die Ran-Bindungsstelle fehlt, kann das transportierte Protein nicht abspalten. Nach seiner Freisetzung wird das Importin- $\beta$  nach einem unbekanntem Mechanismus ins Cytosol reexportiert, ohne offensichtlich den NPC je verlassen zu haben.<sup>[50]</sup> Das NLS-tragende Protein und Importin- $\alpha$  dagegen werden in den Kern entlassen. Was zur Trennung des Importin- $\alpha$  vom importierten Protein führt, ist unklar, jedoch sollen Phosphorylierungen eine Rolle spielen.<sup>[51]</sup> Der Mechanismus, nach dem das Importin- $\alpha$  wieder ins Cytosol gelangt, ist unbekannt. Jedoch scheint der Reexport Importin- $\beta$ -abhängig zu sein.<sup>[52]</sup>

Der Kernimport im Falle der nicht basischen Kernlokalisierungssequenz läuft nach einem anderen Mechanismus ab. Die NLS bindet an ein Transportin genanntes Protein, welches die Funktion des Importin  $\alpha$  und  $\beta$  wahrnimmt. Danach wird es mit Unterstützung des Ran-Proteins in den Kern geschleust.<sup>[53]</sup>

Die Regulierung des Kernimports ist noch nicht vollständig verstanden und scheint zudem nicht einheitlich zu sein.<sup>[54]</sup> Phosphorylierungen können sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf den Kernimport haben. So soll eine Phosphorylierung in einer die NLS-flankierenden Region durch die Casein-Kinase II (CKII) einen verstärkenden Einfluss auf den Kernimport zu besitzen,<sup>[55]</sup> während eine Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) diesen inhibiert.<sup>[56]</sup> Weitere Regulationsmöglichkeiten sind die Verbindung mit einem cytosolischem Ankerprotein oder die Maskierung der NLS durch einen Inhibitor des Kernimports oder durch eine C-terminale Domäne des Proteins, welche durch Proteolyse entfernt werden kann. Auch im Falle des Ankerproteins und der Maskierung erfolgt die Regulation über Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen (Schema 4a-e).

Neben der Phosphorylierung ist die Glycosylierung eine weitere häufig vorkommende posttranslationale Modifikation. Bei Vorgängen des Kernimports spielt die Anknüpfung von *N*-Acetylglucosamin-Resten eine entscheidende Rolle. Welche Auswirkung die Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin-Resten an Proteine mit einer NLS hat, ist nicht endgültig geklärt. Proteine mit *N*-Acetylglucosamin-Resten werden sowohl im Cytosol als auch im Kern gefunden, ihre Konzentration ist jedoch im Zellkern signifikant höher. Am häufigsten finden sich diese Proteine jedoch in der Kernhülle, so sind auch Proteine des NPC mehrfach glycosyliert.<sup>[57]</sup> Die *N*-Acetylglucosamin-Reste blockieren dabei fast ausschließlich potentielle Ziele von

Kinasen. Jedoch sollte diese regulatorische Aufgabe nicht der einzige Zweck der *N*-Acetylglycosamin-Modifikation sein.<sup>[55a,58]</sup> Vielmehr scheint die Glycosylierung ein direktes Kernlokalisierungssignal darzustellen. So konnte gezeigt werden, daß die Anknüpfung bestimmter Zucker an ein cytosolisches Protein zu dessen Kernimport führen kann,<sup>[59]</sup> und daß dieser Kernimport nicht über den klassischen NLS-Weg abläuft.<sup>[60]</sup> Insbesondere  $\beta$ -Di-*N*-acetylchitobiosid(GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc)-Modifikationen können zum Kernimport von Proteinen führen, selbst wenn diese keine NLS besitzen.<sup>[61]</sup>



**Schema 4:** Regulationsmöglichkeiten des Kernimports.

## 2.3 Das Jun-Protein

Bei der Regulation der Genexpression nach dem Empfang extrazellulärer Signale (Cytokine, Wachstumsfaktoren, Phorbolster, Hormone u. a.) spielen Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Sie binden an die DNA und promovieren die Gentranskription. Sie bilden damit den Endpunkt der Signaltransduktionskaskaden.<sup>[4]</sup> Einer der bedeutendsten und bestuntersuchtesten Transkriptionsfaktoren ist das Aktivator-Protein-1 (activator protein 1, AP-1). AP-1 ist ein aus zwei Komponenten bestehender Proteinkomplex. Die Komponenten des AP-1-Proteinkomplexes gehören zur Jun- und Fos-Familie.<sup>[62]</sup> Das zelluläre Jun (cJun) konnte auf Grund der Sequenzhomologie zum viralen Jun (vJun) kloniert werden.<sup>[63]</sup> cJun und vJun zeigen nach ihrer Expression in Bakterien bei DNA-Bindungsexperimenten identische Eigenschaften wie AP-1.<sup>[64]</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Jun die Expression eines AP-1-abhängigen Indikatorplasmids induzieren kann.<sup>[64,65]</sup>

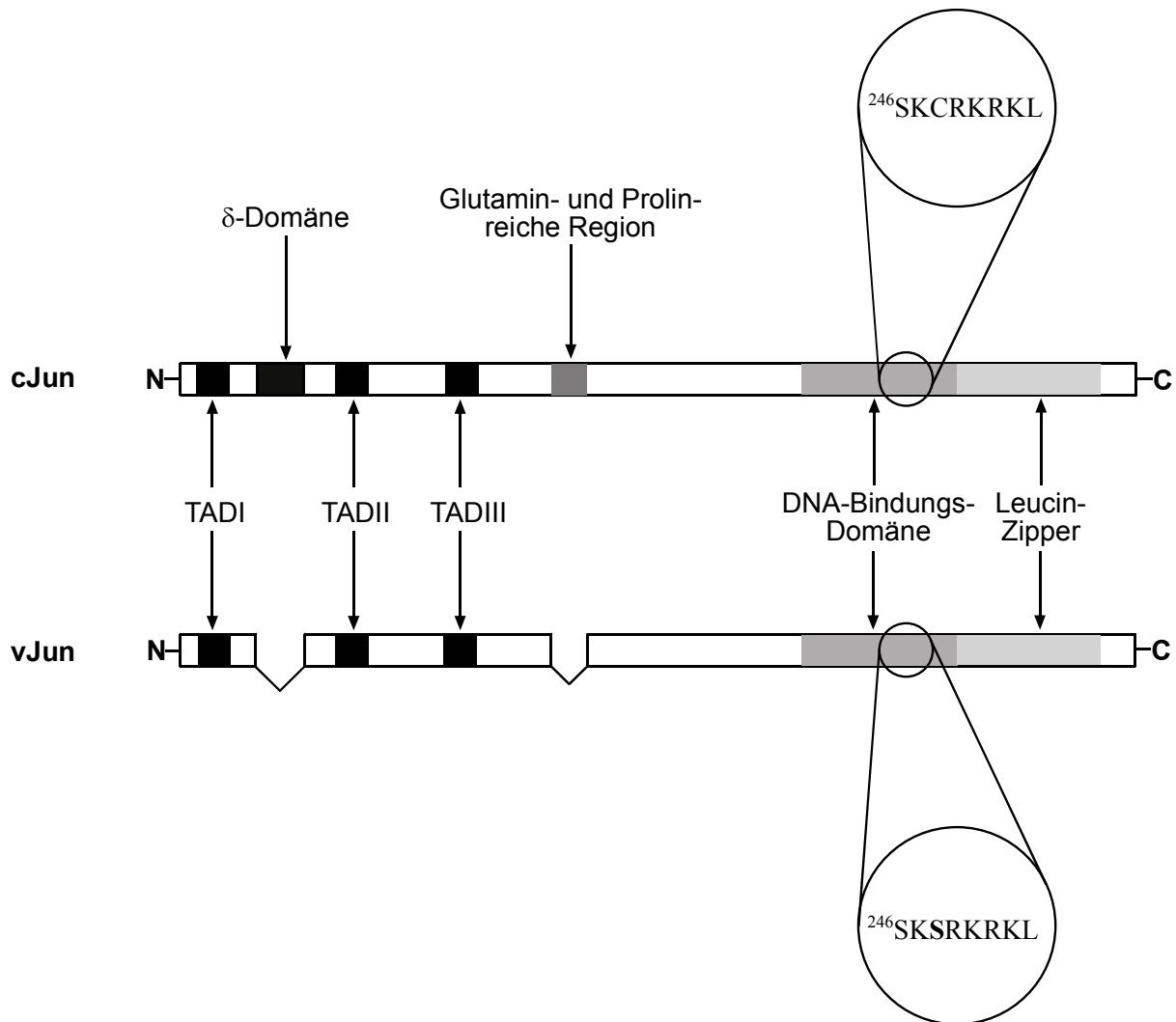
Um an die DNA binden zu können, ist eine Homodimerisierung oder eine Heterodimerisierung innerhalb der Jun-Familie oder eine Heterodimerisierung mit einem Mitglied der Fos-Familie notwendig.<sup>[66]</sup> Die Dimerisierung erfolgt dabei über einen Leucin-Zipper im C-terminalen Bereich des Jun-Proteins.<sup>[67]</sup>

Der Aufbau von cJun und vJun ist in Schema 5 skizziert. Im N-terminalen Bereich befinden sich drei bzw. vier Transaktivierungsdomänen (TAD), welche *in vivo* für die transkriptionelle Aktivierung Jun-abhängiger Zielgene verantwortlich sind. TAD sind durch eine Anhäufung negativ geladener Aminosäuren charakterisiert.<sup>[68]</sup> Im Gegensatz dazu kommen in der DNA-Bindungsdomäne häufig positiv geladene Aminosäuren vor,<sup>[69]</sup> die ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA ausbilden können. In der DNA-Bindungsdomäne ist auch die NLS lokalisiert.<sup>[70]</sup> Der oben erwähnte Leucin-Zipper schließt sich direkt C-terminal an.

Neben einigen Punktmutationen unterscheiden sich das virale und das zelluläre Jun in der unterschiedlichen Anzahl der TAD und in der Abwesenheit eines Glutamin- und Prolinreichen Abschnitts zwischen den TAD und der DNA-Bindungsdomäne beim vJun.<sup>[71]</sup> Während cJun vier TAD besitzt, fehlt beim vJun eine TAD, die sogenannte  $\delta$ -Domäne. Diese besitzt einen negativen regulatorischen Effekt.<sup>[72]</sup> Durch die Punktmutationen im vJun ist die Regulation der DNA-Bindungsaktivität nicht mehr gewährleistet. cJun wird durch mehrere Phosphorylierungen in der DNA-Bindungsdomäne reguliert.<sup>[73]</sup> Die Substitution von <sup>222</sup>Ser, der ersten Phosphorylierungsstelle, durch Phe verhindert, daß die Phosphorylierungskaskade



anläuft. Ein zweiter postulierter Regulationsmechanismus über die Oxidation/Reduktion des  $^{248}\text{Cys}$  wird ebenfalls durch eine Punktmutation (Cys zu Ser) unterlaufen.<sup>[74]</sup>

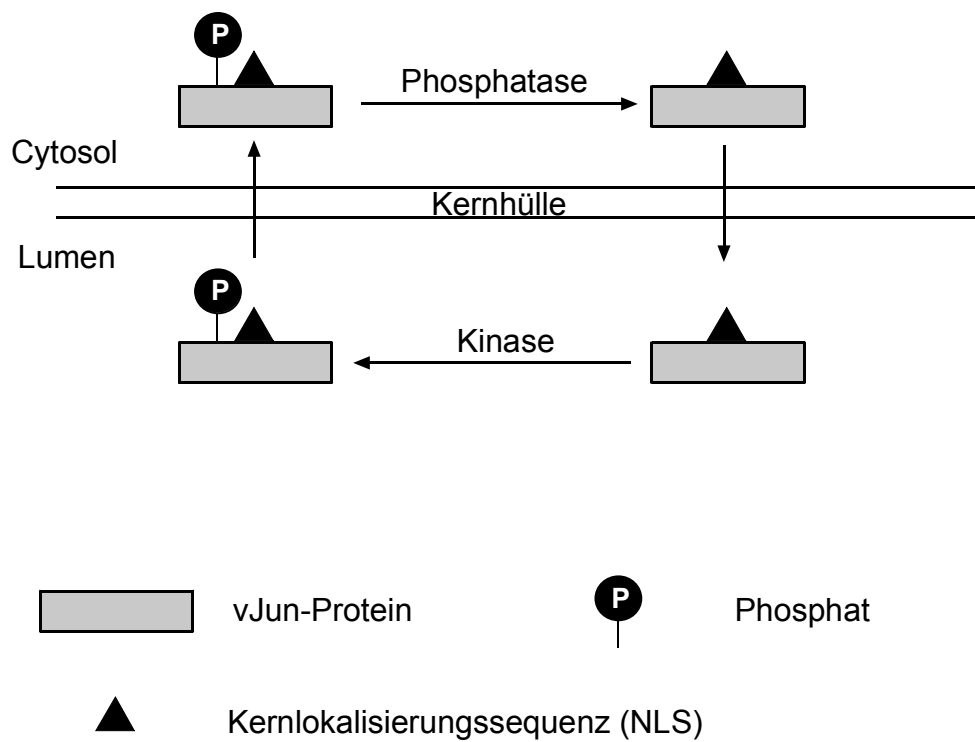


**Schema 5:** Aufbau des Zellulären und des viralen Jun-Proteins.

cJun wird während des gesamten Zellzyklus in den Zellkern transportiert und auch überwiegend nur dort angetroffen, dagegen ist der Import des vJun abhängig vom Zellzyklus. So wird das vJun beinahe ausschließlich in der G2-Phase in den Zellkern importiert und bleibt während der anderen Phasen im Cytoplasma.<sup>[70]</sup> Verursacht wird dieses Phänomen durch eine reversible Phosphorylierung des  $^{248}\text{Ser}$ , welches der NLS direkt benachbart ist. Damit gehört vJun zu den Proteinen, deren Zellkernimport durch eine Phosphorylierung negativ reguliert wird.<sup>[75]</sup> (Siehe oben)

Die Phosphorylierung inhibiert einen Kernimport des vJun-Proteins bzw. sorgt für dessen Kernexport. Wird der Phosphatrest in der G2-Phase von Phosphatasen abgespalten, ist ein

Kernimport des vJun-Proteins möglich. Über eine erneute Phosphorylierung durch eine Kinase im Zellkern wird wiederum sein Kernexport eingeleitet (Schema 6).

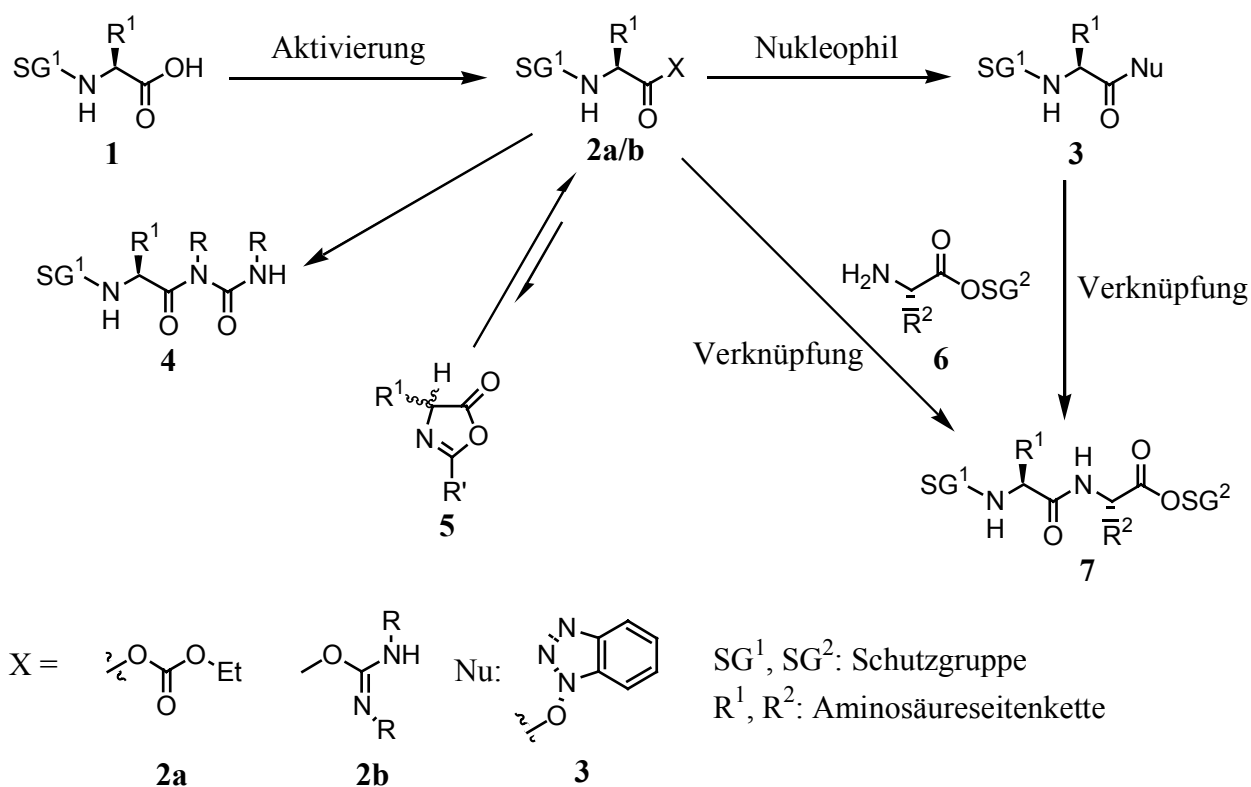


Schema 6: Aufenthaltsort des vJuns in Abhängigkeit der Seitenkettenmodifikation.

## 2.4 Synthese von Gluco- und Phosphopeptiden

### 2.4.1 Synthese von Peptiden in Lösung und an fester Phase

Zur Darstellung unmodifizierter Peptide wird heute ein weites Spektrum unterschiedlicher Methoden angewandt.<sup>[76]</sup> Die Synthese kann dabei entweder in Lösung oder, basierend auf den Arbeiten von Merrifield,<sup>[77]</sup> an fester Phase durchgeführt werden. Unabhängig von der Wahl der Kupplungsreagenzien wird dabei zuerst die Carboxygruppe aktiviert und der gebildete Aktivester mit der Aminokomponente zur Amidbindung umgesetzt. Um definierte Produkte zu erhalten, müssen alle nicht an der Reaktion beteiligten Gruppen maskiert werden.



**Schema 7:** Prinzip der Peptidsynthese.

Die Aktivierung der Carboxygruppe erfolgt entweder als gemischtes Anhydrid **2a** mit Kupplungsreagenzien wie z. B. 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ)<sup>[78]</sup> oder als *O*-Acylureid **2b** mittels Carbodiimidreagenzien wie z. B. Diisopropyl- (DIC) oder *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC).<sup>[79]</sup> Die bei der Reaktion mit Carbodiimiden drohende Bildung von unreaktiven *N*-Acylureiden **4** kann durch den Zusatz von Nucleophilen wie z. B. 1-Hydroxybenzotriazol vermieden werden.<sup>[80]</sup> Diese

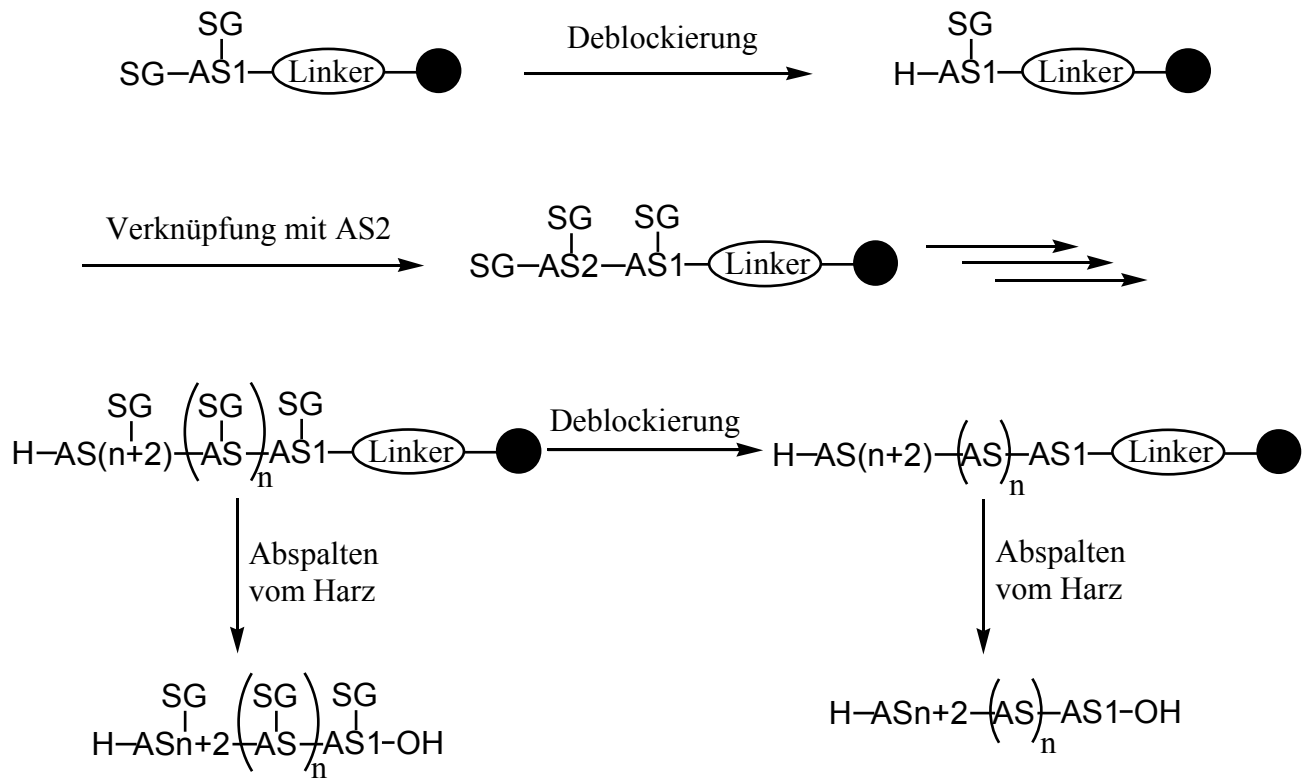
reagieren mit den *O*-Acylureiden **2b** zu den entsprechenden Aminosäureaktivestern **3** bevor die Umlagerung zu den *N*-Acylureiden **4** erfolgen kann. Moderne Kupplungsreagenzien vom Phosphonium- oder Uronium-Typs wie z. B. 2-(1H)-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat (HBTU) generieren diese Aktivester direkt. Der so erzeugte Aktivester wird dann mit der Aminokomponente zum erwünschten Peptid umgesetzt.

Bei der Peptidknüpfung sollte als Carboxykomponente eine Aminosäure verwendet werden, welche N-terminal eine Schutzgruppe vom Urethantyp trägt. Somit kann die Bildung von epimerisierungsanfälligen Oxazolidinonen **5** vermieden werden, welche bei der Verwendung von N-terminalen Schutzgruppen des Amidtyps oder bei der Verwendung von Peptidbausteinen droht. Läßt sich die Fragmentkondensation bei der Synthese größerer Peptidbausteine nicht vermeiden, ist es vorteilhaft, diese Peptidknüpfungen C-terminal an Glycin oder dem nicht zu Racemisierungen neigenden Prolin durchzuführen. Kann auf Grund der Sequenz eine Fragmentkondensation an anderen Aminosäuren nicht umgangen werden, so kann die Racemisierung durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen, die Verwendung oben erwähnter Nucleophile und das Vermeiden von Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel minimiert werden.<sup>[81]</sup>

Im Unterschied zur Peptidsynthese in Lösung ist bei der Darstellung von Peptiden an fester Phase die erste Aminosäure meist mit ihrer Carboxyfunktion über eine selektiv spaltbare Ankergruppe (Linker) an einem polymeren Träger wie z. B. Polystyrolharz angebunden. Die Zielsequenz wird dann durch alternierende Kupplungs- und *N*<sup>α</sup>-terminale Deblockierungsschritte an der festen Phase aufgebaut. Nach vollendeter Synthese kann das Zielpeptid durch Spaltung der Ankergruppe wahlweise im geschützten oder im deblockierten Zustand erhalten werden (Schema 8).

Durch die Verankerung am polymeren Träger entfallen die zeitaufwendigen Aufreinigungsschritte zwischen den einzelnen Reaktionen. Der Überschuß der verwendeten Reagenzien kann durch einfaches Waschen des Harzes entfernt werden. Diese einfachen Syntheseschritte ermöglichen eine weitgehende Automatisierung der Peptidsynthese durch Syntheseroboter. Voraussetzung für eine Automatisierung ist, daß alle Reaktionen an fester Phase in nahezu quantitativem Umfang stattfinden, da das bei unvollständigem Umsatz erhaltene Produktgemisch häufig schwer aufzureinigen ist. Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wird mit einem grossen Überschuß der Reaktanden im Vergleich zum Harz gearbeitet. Dennoch kommt es vor allem bei der Synthese längerer Peptide zu Deletionssequenzen. Können diese trotz des Reaktandenüberschusses und Doppelkupplungen

der einzelnen Aminosäuren nicht vermieden werden, empfiehlt es sich, nach den einzelnen Kupplungen einen sogenannten Capping-Schritt einzuführen. Dabei werden nicht umgesetzte Aminofunktionen mit Essigsäureanhydrid acyliert. Dies führt nur zur Bildung von leichter abtrennbarer Abbruchsequenzen führt. Trotzdem ist die Synthese von definierten Peptidsequenzen an fester Phase auf circa 50 Aminosäuren limitiert.



SG: Schutzgruppe

AS: Aminosäure

### Schema 8: Prinzip der Festphasensynthese.

Für die Synthese von Peptiden an fester Phase haben sich zwei Methoden etabliert. Bei der von *Merrifield* ursprünglich vorgeschlagene *tert*-Butyloxycarbonyl/Benzyl(Boc/Bzl)-Schutzgruppenstrategie werden die  $N^\alpha$ -Aminogruppen Boc-geschützt, während die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren von Schutzgruppen des Benzyl-Typs maskiert werden. Entfernt werden die Schutzgruppen durch eine abgestufte Azidolyse.<sup>[77]</sup> Als zweite Methode wurde die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-Butyl(Fmoc-/*t*Bu)-Methode entwickelt. Dabei wird die Orthogonalität dieser beiden Schutzgruppen ausgenutzt. Während die Fmoc-Gruppe von der  $N^\alpha$ -Aminogruppe unter leicht basischen Bedingungen entfernt werden kann, werden die Seitenkettenfunktionalitäten durch säurelabile Schutzgruppen des *t*Bu- oder des Triphenylmethyl-Typs blockiert.<sup>[82]</sup>

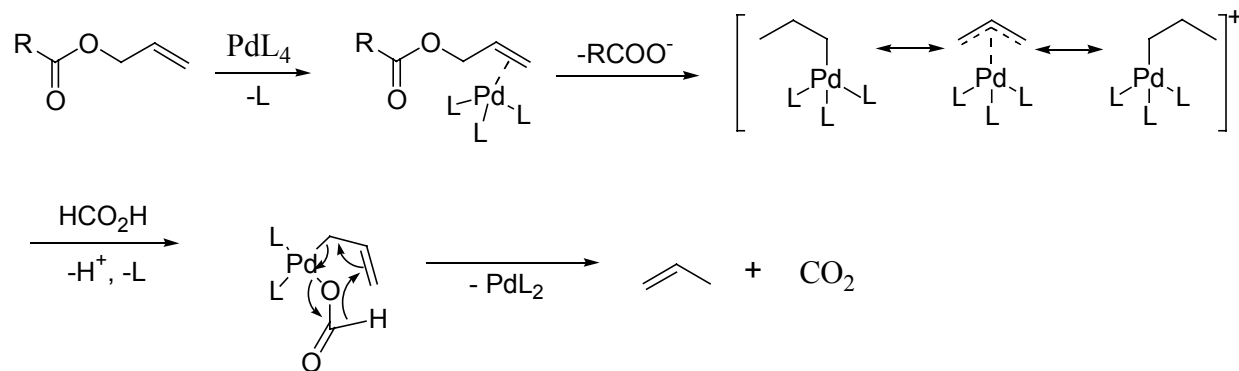
### 2.4.2 Schutzgruppen in der Peptidsynthese

Unabhängig davon, ob Peptide in Lösung oder an fester Phase synthetisiert werden, ist die Wahl der Schutzgruppen von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Darstellung von Peptiden. Die Entwicklung zahlreicher, teilweise orthogonaler Schutzgruppen zeigt die Bedeutung der Schutzgruppenstrategie für das Gelingen der Peptidsynthese. Einige in dieser Arbeit verwendete Schutzgruppen sollen kurz vorgestellt werden.

Aminofunktionalitäten werden zumeist aus oben angeführten Gründen durch Schutzgruppen des Urethantyps maskiert. Die Blockierung von Carboxygruppen wird beinahe ausschließlich durch Ester-Schutzgruppen erreicht, während Alkoholgruppen in Aminosäureseitenketten als Ether geschützt werden.

Neben den schon länger benutzten Schutzgruppen wie Z/Bzl und Boc/*tert*-Butyl wurden in den letzten Jahren neue Schutzgruppen entwickelt, die sich unter milderer Bedingungen abspalten lassen.<sup>[83]</sup>

Die Aloc-Gruppe läßt sich über ihren Chlorameisensäureester einführen. Der Allylester wird meist durch azeotrope Veresterung mit Allylalkohol dargestellt. Obwohl diese Schutzgruppen schon seit den 50er Jahren bekannt sind, erlangten sie erst größere Bedeutung seit man eine milde Schwermetall-katalysierte Abspaltungsmethode entwickelt hatte. Dabei bildet das Olefin mit dem zumeist verwendeten Pd(0)-Katalysator ein  $\eta^3$ - $\pi$ -Allylintermediat, welches die Allylgruppe auf einen nukleophilen Fänger (z. B. Morpholin, Dimethylbarbitursäure, u. v. m.) überträgt oder in einer pericyclischen Reaktion mit einem Hydridonor zu Propen weiterreagiert (Schema 9).<sup>[84]</sup> Da die Abspaltung unter neutralen Bedingungen abläuft, konnten durch Variieren der Abspaltungsbedingungen zahlreiche Methoden gefunden werden, welche die Synthese labiler Verbindungen wie Gluco- und Phosphopeptiden, Oligonukleotiden und Naturstoffen ermöglichten.<sup>[85]</sup>



L:  $PPh_3$

R: Aminosäure-/Peptidrest

**Schema 9:** Allylentschützung nach der Methode von *Noyori et al.*<sup>[85b]</sup>

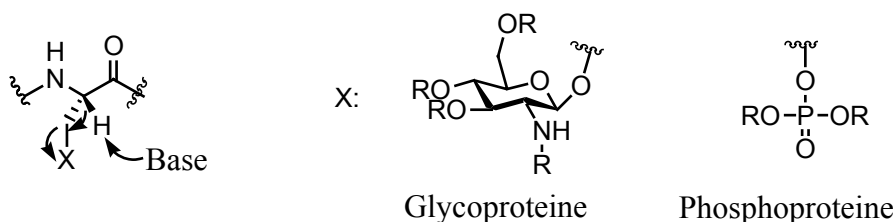
Die Maskierung des N-Terminus mit der Fmoc-Gruppe erfolgt über eine Reaktion mit dem korrespondierenden Chlorameisensäureester. Die Deblockierung erfolgt unter basischen Bedingungen mit Piperidin, Diethylamin oder Morpholin. Dabei wird das acide Proton in doppelt benzylicher Position abgespalten, worauf eine  $\beta$ -Eliminierung erfolgt. Das durch die Reaktion mit der Base entstandene Fulvenaddukt muß bei Synthesen in Lösung chromatographisch entfernt werden. Die UV-Aktivität der Fmoc-Gruppe und ihres Abspaltungsproduktes ermöglicht eine einfache Reaktionskontrolle, weshalb die Fmoc-Schutzgruppe bei Synthesen an fester Phase gern verwendet wird.<sup>[86]</sup>

Bei der Synthese labiler Peptidkonjugate haben sich neben den klassisch-chemischen Schutzgruppen auch die Enzym-labilen Schutzgruppen bewährt. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Schutzgruppen sowohl für den Amino- als auch für den Carboxyterminus entwickelt. Sie alle lassen sich bei neutralem pH-Wert und  $37^\circ C$  durch die jeweiligen Enzyme entfernen. Sie wurden erfolgreich in der Synthese von Gluco-, Lipo-, Nukleo- und Phosphopeptiden eingesetzt.<sup>[87]</sup>

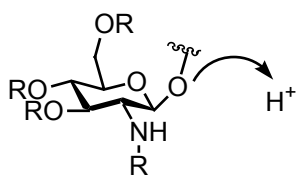
### 2.4.3 Glycosylierung und Phosphorylierung von Peptiden

Die meisten der an der Signaltransduktion beteiligten Peptide besitzen Seitenkettenmodifikationen, die für ihre biologische Wirkung essentiell sind. Die Synthese solcher Peptidbausteine ist oft nicht mit den Standardprozeduren der Peptidsynthese in Lösung und an fester Phase möglich. So neigen Glyco- und Phosphopeptide bei pH-Werten über 9 zur  $\beta$ -Eliminierung unter Ausbildung von Dehydroalaninderivaten.<sup>[88]</sup> Zu acidic Bedingungen können bei Glycopeptiden hingegen zur Anomerisierung oder zum Verlust des Zuckerrestes führen (Schema 10).<sup>[89]</sup> Auf Grund der hohen biologischen Relevanz dieser Peptidkonjugate wurden in den letzten Jahren zahlreiche Verfahren zu ihrer Synthese etabliert.<sup>[90]</sup> Auch die unter neutralen und damit sehr milden Bedingungen abspaltbaren, enzymlabilen Schutzgruppen wurden bei der Synthese dieser labilen Peptide eingesetzt.<sup>[91]</sup>

Basenlabilität:



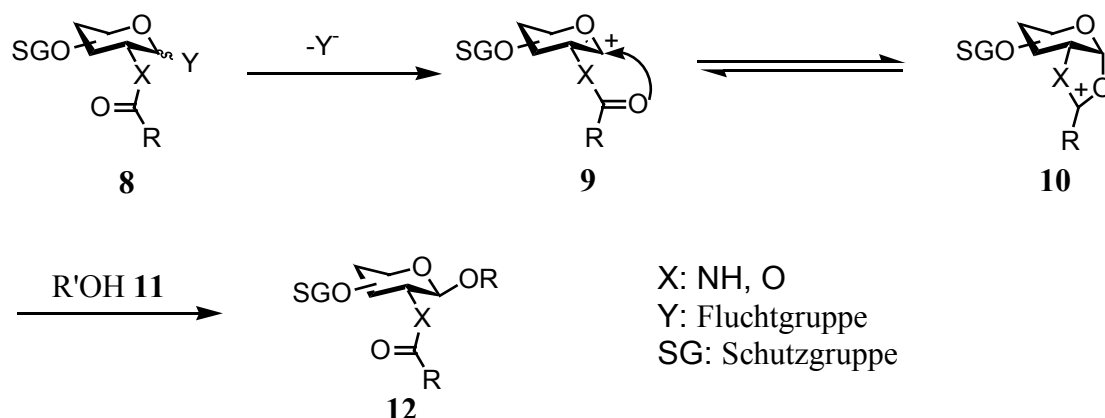
Säurelabilität:



**Schema 10:** Labilitäten bei Glyco- und Phosphopeptiden.

Für die chemische Synthese von Glycopeptiden ist es zuerst notwendig, die Hydroxyfunktionen des Glycosyldonors **8** zu schützen. Der Glycosyldonor **8** besitzt an seinem anomeren Zentrum eine Fluchtgruppe. Nach deren Aktivierung und Abspaltung bildet sich das Glycosylkation (Oxoniumion) **9**. Dieses reagiert, wenn die Schutzgruppe an C-2 einen Nachbargruppeneffekt ausüben kann, zum Oxazolin- oder Dioxolanintermediat **10** weiter. Diese werden vom Akzeptor **11** unter Ausbildung der erwünschten  $\beta$ -glycosidischen Bindung angegriffen wird (Schema 11).





**Schema 11:** Allgemeine Methode zur Darstellung von O-Glycosiden

Die in dieser Arbeit benutzten Glycosyldonoren **8a-c** und ihre jeweilige Aktivierung sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Acetylgruppe des peracetylierten D-Glucosamins **8a** wird durch die Behandlung mit Bortrifluorid Etherat abgespalten, es bildet sich das Oxazolin.<sup>[92]</sup> Die Effizienz der Glycosidsynthese kann dadurch noch gesteigert werden, daß die Acetylgruppe durch die elektronenziehende 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylgruppe ersetzt wird. Der Glycosyldonor **8b** mit der Trichloracetimidatfluchtgruppe kann mit Lewis-Säuren wie Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat (TMS-Triflat) aktiviert werden,<sup>[93]</sup> während der entsprechende Thioglycosyldonor **8c** durch Alkylierungsreagenzien wie z. B. Dimethyl-

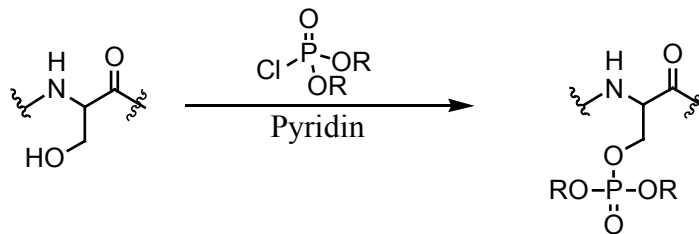
Glycosyldonor	Aktivierung
<p style="text-align: center;"><b>8a</b></p>	BF <sub>3</sub> *Et <sub>2</sub> O
<p style="text-align: center;"><b>8b</b></p>	TMSOTf
<p style="text-align: center;"><b>8c</b></p>	DMTST

**Tabelle 1:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Glycosyldonore und ihre Aktivatoren.

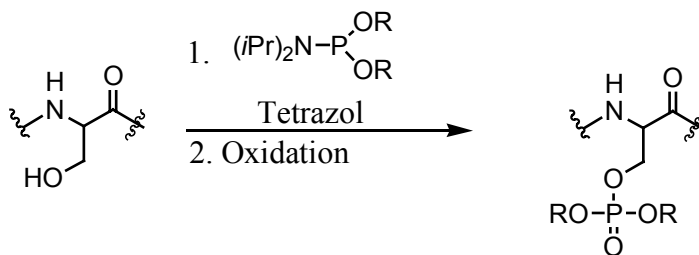
(methylthio)sulfoniumtriflat (DMTST) aktiviert werden kann.<sup>[94]</sup> Neben den hier vorgestellten sind noch zahlreiche weitere Glycosylierungsmethoden in der Literatur bekannt.<sup>[95]</sup>

Zur chemischen Darstellung von Phosphopeptiden finden hauptsächlich zwei Methoden Verwendung: Die Phosphorchloridat- und die Phosphoramidit-Methode. Bei der Phosphorchloridat-Methode wird das geschützte Peptid bzw. die Aminosäure mit dem Phosphorsäureesterchlorid in Pyridin direkt zum entsprechenden Phosphat umgesetzt.<sup>[96]</sup> Bei Synthesen nach der Phosphoramidit-Methode wird das geschützte Peptid bzw. die Aminosäure zuerst mit dem Phosphoramidit zum Phosphit umgesetzt, welches dann *in situ* zum Phosphat oxidiert wird (Schema 12).<sup>[97]</sup>

Phosphorchloridat-Methode:



Phosphoramidit-Methode:



**Schema 12:** Phosphorylierungsmethoden.

Befinden sich im Peptid keine oxidationsempfindlichen Aminosäuren, ist die Phosphoramidit-Methode auf Grund ihrer kürzeren Reaktionszeiten und den besseren Ausbeuten der Phosphorchloridat-Methode vorzuziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Phosphoramidit-Methode verwendet.

Neben den unterschiedlichen Phosphorylierungsmethoden kann zudem der Zeitpunkt der Phosphorylierung variiert werden. Bei der „*global phosphorylation*“-Strategie wird erst nach dem Abschluß der Peptidsynthese phosphoryliert, während bei der „*building block*“-Strategie bereits phosphorylierte Aminosäurebausteine zur Peptidsynthese eingesetzt werden. Vorteil der „*global phosphorylation*“-Strategie ist, daß während der Peptidsynthese auch Schutzgruppen verwendet werden können, die mit der Labilität der Phosphopeptide nicht kompatibel wären. Jedoch sind auch Fälle bekannt, in denen sich Peptide nicht nachträglich

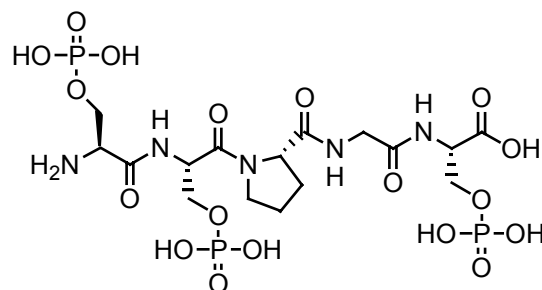
phosphorylieren ließen. Enthält die Zielstruktur auch freie Hydroxylgruppen, so würde die „*global phosphorylation*“-Strategie auch zu deren Phosphorylierung führen, weshalb in diesen Fällen die „*building block*“-Strategie zu bevorzugen ist.<sup>[90b]</sup>

### 3. Ziel der Arbeit

Zu den wichtigsten Hilfsmitteln, um die Vorgänge, welche während der Signaltransduktion in der Zelle ablaufen, auf molekularer Ebene besser zu verstehen, gehören Partialstrukturen der beteiligten, posttranslational modifizierten Proteine. Die wichtigste posttranslationale Veränderung während der Signalweiterleitung ist die Phosphorylierung, welche *in vivo* die Aufgabe einer Vielzahl von Kinasen ist.

Phosphorylierte Peptide, die Teilstrukturen von entscheidend an der Signalweitergabe beteiligter Proteine entsprechen, können wichtige Hilfsmittel zum Verständnis dieser Prozesse sein. Die Synthese phosphorylierter Peptide stellt immer noch hohe Anforderungen an den synthetisch arbeitenden Chemiker. Zum einen ist die bereits erwähnte ausgesprochene Basenlabilität der Phosphat-Gruppe zu beachten. Daraus resultiert die Notwendigkeit, orthogonale, unter milden Bedingungen abspaltbare Schutzgruppen zu verwenden. Deshalb beschränkten sich die bisherigen chemischen Synthesen von Phosphopeptiden, insbesondere bei der Darstellung in Lösung, beinahe ausschließlich auf monophosphorylierte Peptide. Dabei sind multiple Phosphorylierungen im Organismus von großer Bedeutung. So werden zahlreiche Proteine durch mehrfache Phosphorylierungen reguliert.<sup>[96]</sup> Auch bei der Alzheimer-Krankheit liegt das  $\tau$ -Protein in einem unnatürlich hyperphosphoryliertem Zustand vor.

Um die Leistungsfähigkeit moderner Synthesemethoden für Phosphopeptide unter Beweis zu stellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit das dreifach phosphorylierte Pentapeptid <sup>198</sup>Ser-<sup>202</sup>Ser aus der die Microtubuli-bindende Domäne flankierenden Region des menschlichen  $\tau$ -Proteins synthetisiert werden (Schema 13).

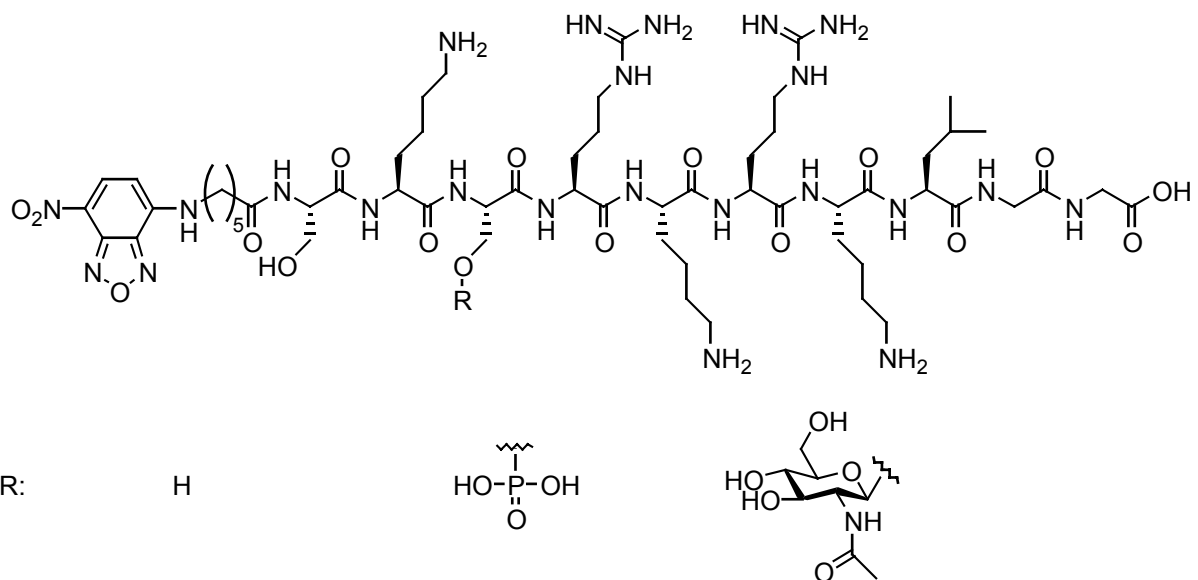


**Schema 13:** Charakteristisches dreifach phosphoryliertes Pentapeptid des  $\tau$ -Proteins.

Das Pentapeptid wird vom Antikörper Tau-1 erkannt, allerdings nur in der unphosphorylierten Form. *Avila et al.* vermuten, daß die drei Serinreste des Pentapeptides nicht mit den Micotubuli interagieren, sondern eine Rolle bei der Assoziation von  $\tau$ -Proteinen in der Zellmembran eine Rolle spielen. So gibt es eine reziproke Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsgrad und der Assoziation mit der Zellmembran.<sup>[97]</sup>

Auch für Untersuchungen zum Mechanismus des Kernimports stellen phosphorylierte Peptide ein wichtiges Hilfsmittel dar. Während die Rolle der Phosphorylierung bei der Regulation des Kernimportes zumindest ansatzweise verstanden wird,<sup>[54]</sup> ist die Wirkungsweise eines *O*-verknüpften *N*-Acetylglucosamins auf die Signaltransduktion immer noch unbekannt.<sup>[98]</sup> Da *N*-Acetylglucosamine häufig mit den Phosphatresten um die gleichen Serine/Threonine als Anknüpfungspunkte konkurrieren, wurde postuliert, daß *N*-Acetylglucosamin dazu benutzt wird, die Hydroxyfunktionen zu maskieren, um sie vor einer Phosphorylierung zu schützen.<sup>[99]</sup>

Um diese Fragestellung zu untersuchen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die mit 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) fluoreszenzmarkierte Kernlokalisierungssequenz des vJun-Proteins in ihrer glycosylierten, phosphorylierten und unmodifizierten Form synthetisiert werden (Schema 14).



**Schema 14:** Fluoreszenz-markierte NLS-Sequenz des vJun-Proteins in 3 biologisch relevanten Modifikationen.

Nach erfolgreicher Synthese sollten die dargestellten Verbindungen in Kooperation mit dem Arbeitskreis *Prof. Wittinghofer* in Zellen microinjiziert werden, um den Kernimport des Peptides in Abhängigkeit seiner Seitenkettenmodifikation zu untersuchen.

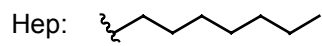
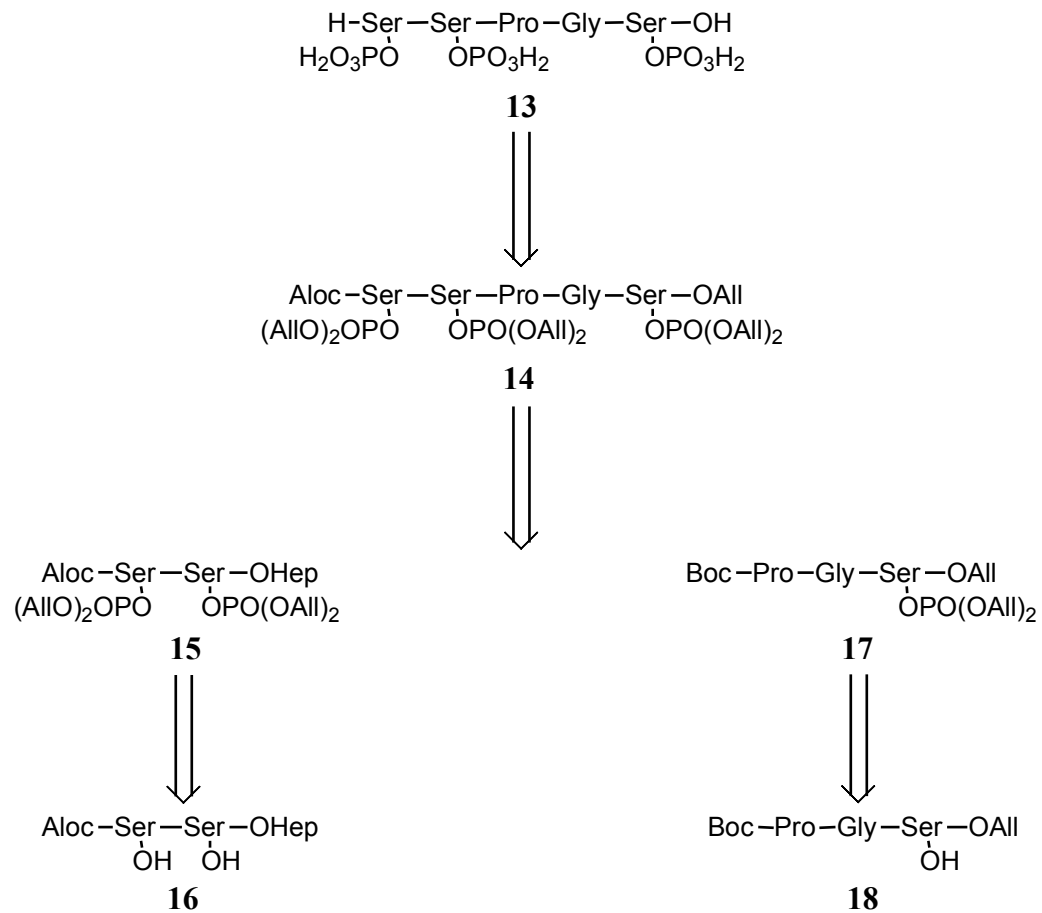
## 4. Spezieller Teil

### 4.1 Synthese des dreifach phosphorylierten Pentapeptids <sup>198</sup>Ser-<sup>202</sup>Ser des menschlichen $\tau$ -Proteins

#### 4.1.1 Retrosynthetische Überlegungen

Bedingt durch die Basenlabilität von Phosphopeptiden ist die Auswahl der zur Verfügung stehenden Schutzgruppen begrenzt. Auf Grund der milden Abspaltungsbedingungen der Palladium(0)-katalysierten Allylübertragung sollten sich Schutzgruppen des Allyltyps für die permanente Schützung der Phosphatgruppen eignen. Sie sollten alle in einem finalen Deblockierungsschritt entfernt sein. Als temporäre Schutzgruppe für den N-Terminus wurde die säurelabile Boc-Gruppe gewählt, während als temporäre Schutzgruppe für den C-Terminus die enzymlabile Heptylester-Gruppe benutzt werden sollte. Heptylester sind bei neutralem pH-Wert mit Lipasen aus *Aspergillus niger* abspaltbar.<sup>[99]</sup>

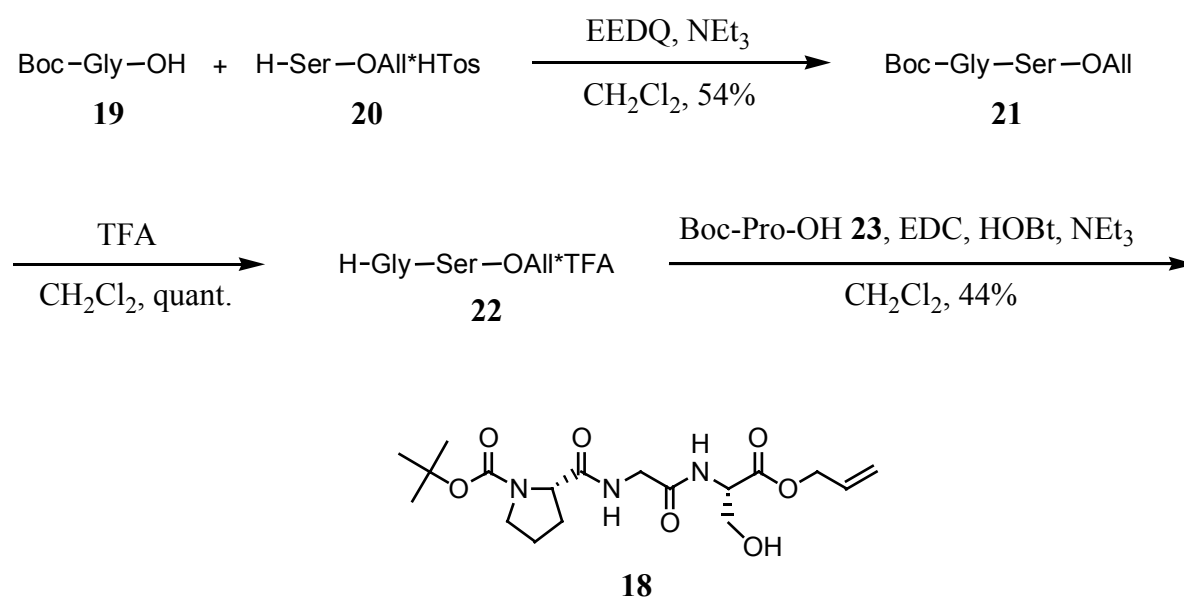
Das vollgeschützte phosphorylierte Pentapeptid **14** läßt sich auf das geschützte Phosphodipeptid **15** und das phosphorylierte Tripeptid **17** zurückführen. Eine „*global phosphorylation*“ des Pentapeptids erscheint nicht ratsam, da es auf Grund der großen räumlichen Nähe der Phosphorylierungsstellen zu sterischen Hinderungen kommen könnte. Die Di- und Tripeptide **15** und **17** sind aus den entsprechenden unphosphorylierten Peptiden **16** und **18** zugänglich sein, welche sich problemlos aus den geschützten Aminosäuren aufbauen lassen sollten (Schema 15).



**Schema 15:** Retrosynthese des phosphorylierten Pentapeptides.

## 4.1.2 Synthese

Zuerst wurde das unmodifizierte Tripeptid **18** dargestellt. Dazu wurde aus Boc-Gly-OH **19** und Ser-OAll\*HTos **20** mit EEDQ als Kupplungsreagenz das Dipeptid **21** synthetisiert. Nach quantitativer Entschützung mit TFA konnte das erhaltene TFA-Salz des Dipeptides **22** mit Boc-Pro-OH mit EDC/HOBt als Kupplungsreagenzien in zufriedenstellender Ausbeute zum Tripeptid **18** umgesetzt werden. (Schema 16)

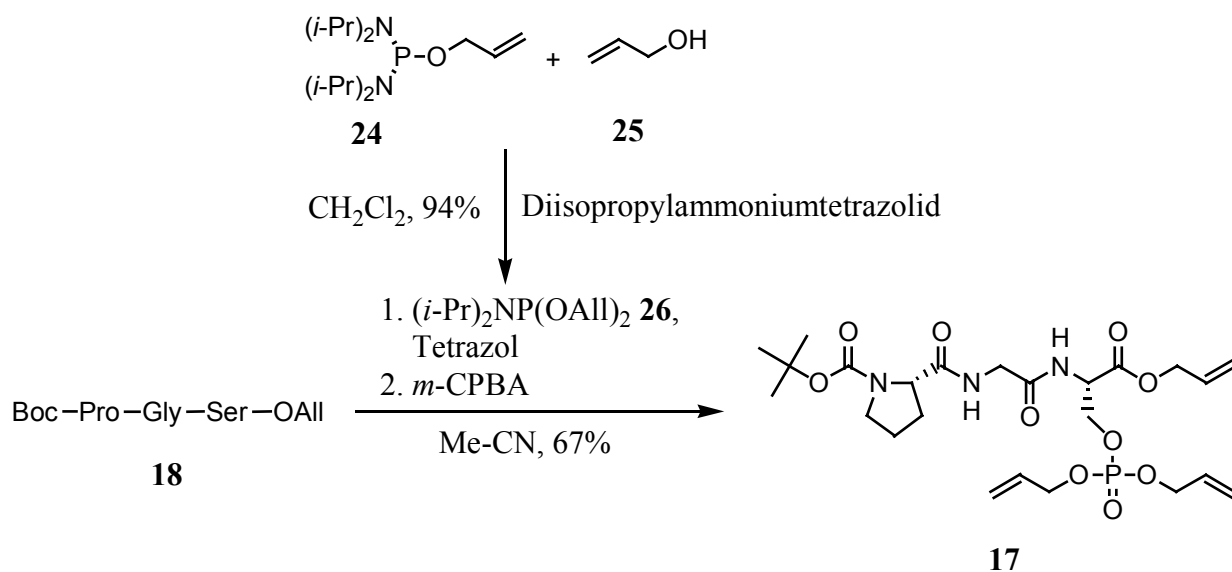


**Schema 16:** Darstellung des unphosphorylierten Tripeptids **18**.

Das Phosphorylierungsreagenz, Bis-(allyloxy)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **26**, konnte nach einer literaturbekannten Vorschrift aus kommerziell erhältlichem Allyloxy-bis-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **24** und Allylalkohol **25** in hoher Ausbeute dargestellt werden. Dieses Phosphorylierungsreagenz **26** ist unter Argon bei  $-20^\circ\text{C}$  mehrere Monate lagerstabil.<sup>[100]</sup>

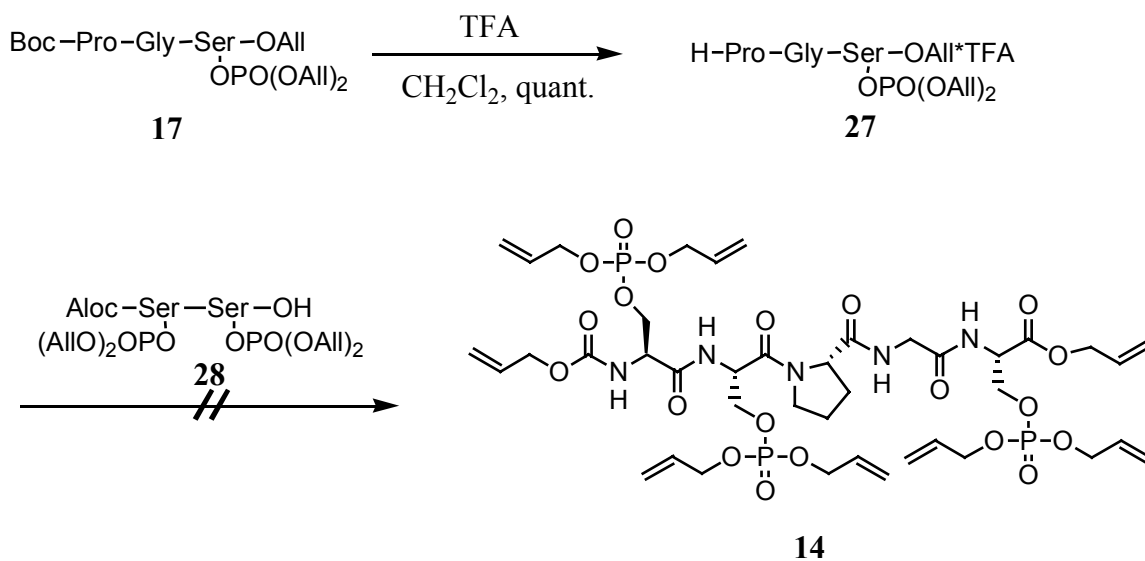
Das Tripeptid **18** wurde mit dem Phosphorylierungsreagenz **26** zum Phosphit umgesetzt, welches sofort mit *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) zum Phosphopeptid **17** aufoxidiert wurde (Schema 17).





**Schema 17:** Phosphorylierung des Tripeptids **18**.

Die N-terminale Deblockierung gelang mit TFA quantitativ. Die Blockkupplung mit dem zweifach phosphoryliertem Dipeptidbaustein *N*-Allyloxycarbonyl-*O*-(diallylphosphato)-L-seryl-*O*-(diallylphosphato)-L-Serin **28**, welcher mir freundlicherweise von Dr. Thomas Zelinski und Dr. Tanmaya Pathak überlassen wurde,<sup>[101]</sup> konnte mit EDC und HOBt als Kupplungsreagenzien in Dichlormethan nicht erfolgreich durchgeführt werden. Auch eine Variation des Lösungsmittels (Tetrahydrofuran, DMF) und des Kupplungsreagenzes (DIC, EEDQ) führte nicht zum erwünschten Pentapeptid **14** (Schema 18).

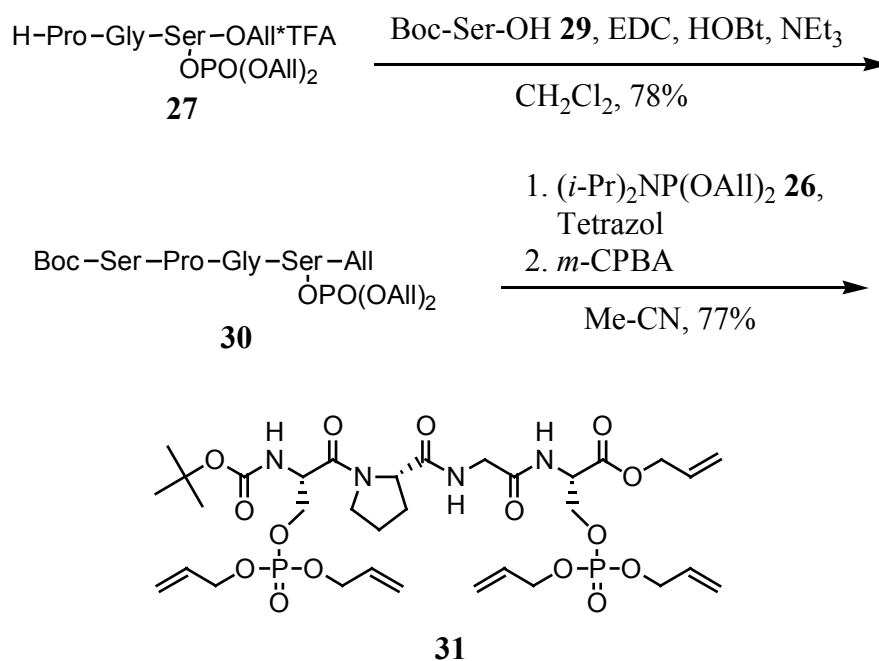


**Schema 18:** Versuch das vollgeschützte Pentapeptid **14** durch Blockkupplung darzustellen.

Statt dessen wurde immer eine  $\beta$ -Eliminierung einer Phosphatgruppe beobachtet. Es hat den Anschein, daß die Aktivierung der Aminosäure die Tendenz zur  $\beta$ -Eliminierung noch erhöht. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß der Heptylester der Verbindung **28** bei Lagerung bei 4° C eine der Phosphatgruppen verlor, während die freie Säure **28** unter diesen Bedingungen lagerstabil war.<sup>[102]</sup>

Nach dem Mißlingen der Blockkupplung sollte das Peptid durch schrittweise Kettenverlängerung mit direkt anschließender Phosphorylierung dargestellt werden. Deshalb wurde das N-terminal deblockierte Tripeptid **27** mit dem Boc-geschützten Serin-Baustein **29** umgesetzt. Die Reaktion wurde mit EDC/HOBt als Kupplungsreagenzien durchgeführt.

Nach der Phosphorylierung mit Bis-(allyloxy)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **26** und anschließender Oxidation konnte das zweifach phosphorylierte Tetrapeptid in hoher Ausbeute erhalten werden. Jedoch mussten die Reaktionszeiten und die Menge des Phosphorylierungsreagenz im Vergleich zur 1. Phosphorylierung erhöht werden (Schema 19).



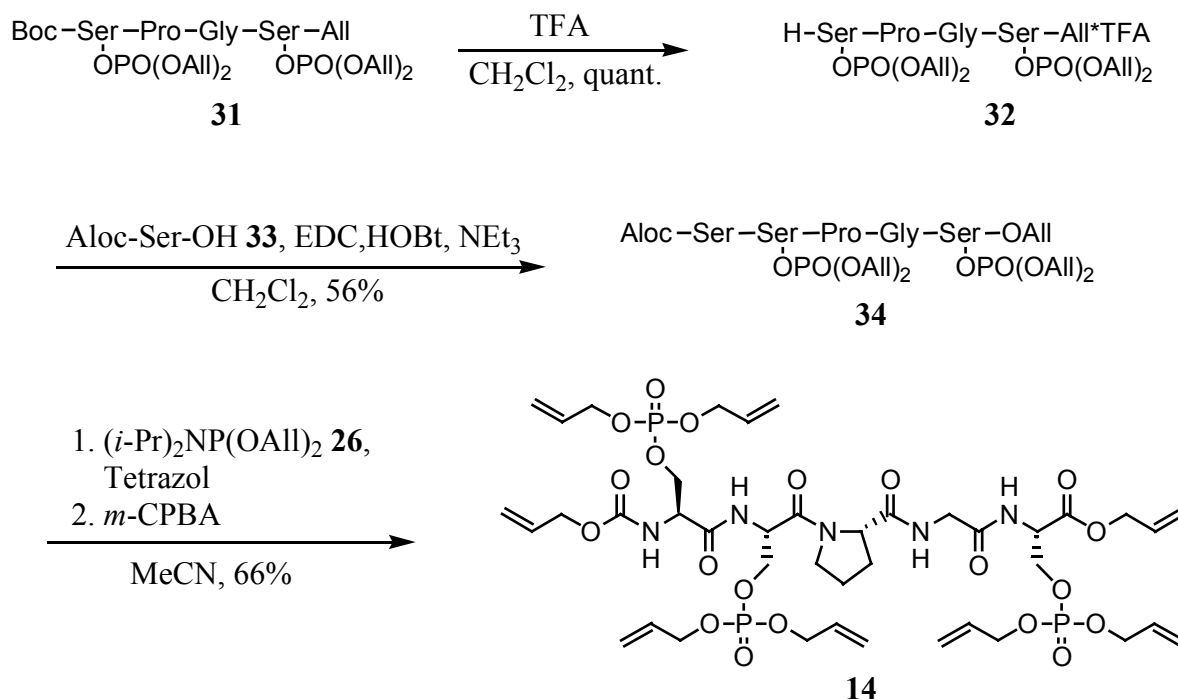
**Schema 19:** Darstellung des bisphosphorylierten Tetrapeptids **31**.

Nach saurer Abspaltung der N-terminalen Boc-Schutzgruppe konnte das Tetrapeptid **32** in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Die Kettenverlängerung zum Pentapeptid **34** wurde mit Aloc-Serin **33** und EDC/HOBt als aktivierende Reagenzien durchgeführt.

Zur Phosphorylierung des Pentapeptids **34** mußte das Phosphorylierungsreagenz **26** mehrmals zugegeben und die Reaktionszeit verlängert werden, bis das Phosphit mit *m*-CPBA zum vollgeschützten Pentapeptid **14** oxidiert werden konnte. Insgesamt konnte die

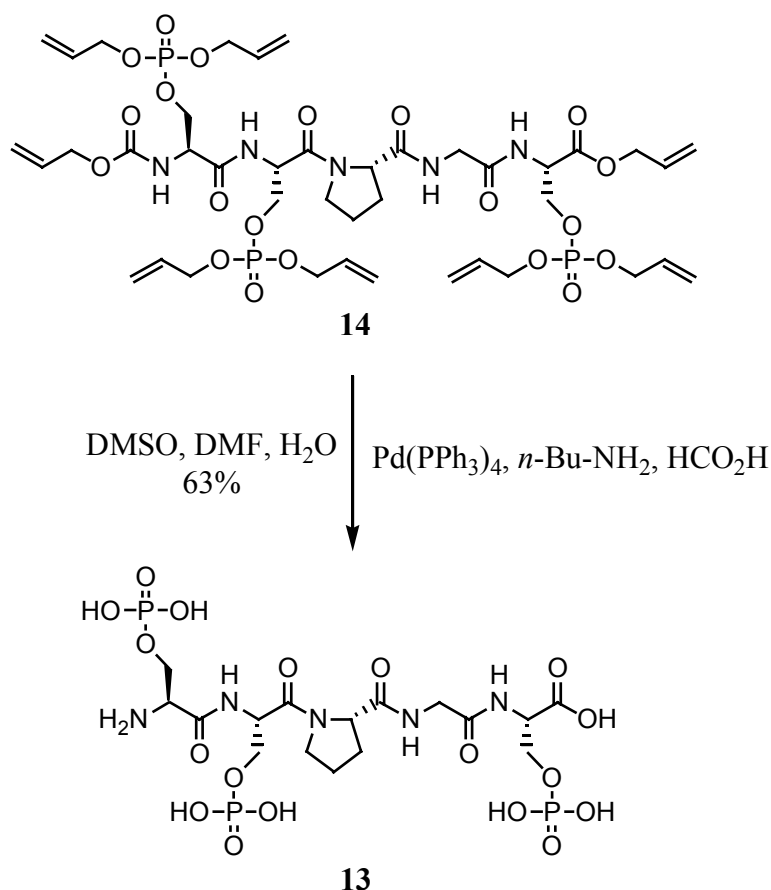
Phosphorylierung trotz der befürchteten sterischen Hinderung in 66%iger Ausbeute durchgeführt werden (Schema 20).

Das dreifach phosphorylierte Pentapeptid **14** erwies sich bei 0° über mehrere Monate als stabil. Die befürchtete, während der Blockkupplung und beim Dipeptid **15** beobachtete,  $\beta$ -Eliminierung konnte nicht nachgewiesen werden (Schema 20).



**Schema 20:** Synthese des geschützten dreifach phosphorylierten Pentapeptids **14**.

In einem globalen Entschützungsprozess sollten alle acht Schutzgruppen des Allyltyps simultan durch Pd(0)-katalysierte Allylübertragung entfernt werden. Auf Grund der ausgeprägten Tendenz zur  $\beta$ -Eliminierung der Phosphopeptide wurde auf die sonst üblichen Allylakzeptoren wie Morpholin oder Dimethylbarbitursäure verzichtet, und die Methode nach *Noyori et al.*<sup>[85b]</sup> angewandt, welche bei der Synthese von Nucleopeptiden, die ebenfalls zur  $\beta$ -Eliminierung neigen, erfolgreich benutzt wurde. Wegen der hohen Polarität der Zielverbindung **13** konnte die Deblockierung nur in sehr polaren Lösungsmitteln durchgeführt werden. Am geeignetsten erwies sich eine Mischung aus DMSO/DMF/Wasser im Verhältnis 45:45:10. In dieser Mischung wurden in Gegenwart von Ameisensäure und *n*-Butylamin alle Schutzgruppen simultan durch Pd(0)-katalysierte Allylübertragung abgespalten. Das entschützte dreifach phosphorylierte Pentapeptid war somit in 63%iger Ausbeute zugänglich. Eine  $\beta$ -Eliminierung konnte während der Reaktion nicht beobachtet werden (Schema 21).



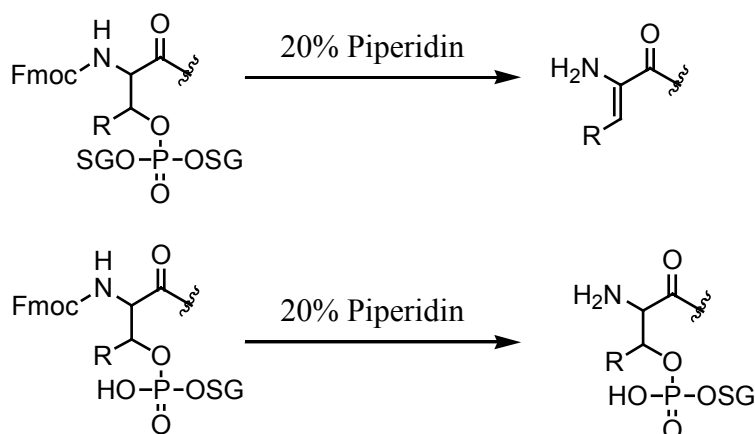
**Schema 21:** Finale Deblockierung zum Zielpeptid **13**.

Das dreifach phosphorylierte Pentapeptid **13** war nicht in der ursprünglich geplanten Weise zu synthetisiert, da augenscheinlich mehrfach phosphorylierte Peptide in erhöhtem Maße zu  $\beta$ -Eliminierung neigen. Erst durch schrittweise Kettenverlängerung mit unmodifizierten Aminosäure und deren anschließender Phosphorylierung konnte das geschützt Pentapeptid **14** dargestellt werden. Durch den ausschließliche Gebrauch Urethan-geschützter Aminosäuren war zudem die Epimerisierungsgefahr im Vergleich zur Fragmentkondensation minimiert. Damit wurde gezeigt, daß auch so labile, biologisch interessante Strukturen wie **13** durch moderene Synthesemethoden zugänglich sind.

## 4.2 Synthese der fluoreszenzmarkierten NLS des vJun-Proteins

### 4.2.1 Retrosynthetische Überlegungen

Auch bei der Synthese der fluoreszenzmarkierten NLS des vJun-Proteins ist bei dem vollgeschützten Phosphat-Restes und dem Glucosamin-Restes deren Basenlabilität während der Synthese zu beachten. Es ist jedoch bekannt, daß *N*-Acetylglucosaminreste die Bedingungen der Fmoc-Abspaltung an fester Phase tolerieren.<sup>[103]</sup> Bei der Synthese von Phosphopeptiden an fester Phase hat sich der Gebrauch von Phosphodiestern an Stelle der Phosphotriestern bewährt. Diese sind unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung stabil (Schema 22).<sup>[104]</sup>



SG: Schutzgruppe

R: H, CH<sub>3</sub>

**Schema 22:** Basenlabilität des Phosphotriesters und Basenstabilität des Phosphordiesters.

Auf Grund dieser Vorteile sollten die markierten Dekapeptide an fester Phase nach der Fmoc/*t*Bu-Methode<sup>[82]</sup> aufgebaut werden. Als zu den beiden säure- bzw. basenlabilen Schutzgruppentypen orthogonaler Linker sollte sich wegen der milden Abspaltungsbedingungen der allylische Hycron-Linker eignen, welcher sich ebenfalls unter Pd(0)-Katalyse entfernen läßt.<sup>[105]</sup> Der Hycron-Linker wurde schon vielfach erfolgreich bei der Synthese von Gluco- und Nucleopeptiden eingesetzt.<sup>[103,106]</sup>

Als säurelabile Seitenkettenschutzgruppen waren *t*Bu für die Hydroxyfunktionen des Serins, Boc für die Aminofunktion des Lysins, 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf)<sup>[107]</sup> für die Guanidinogruppe des Arginins sowie Bzl im Falle des phosphorylierten

---

Serins vorgesehen. Die Hydroxyfunktionalitäten des Zuckerrestes sollten durch Acetylschutzgruppen maskiert werden, welche erst nach dem Abspalten vom Harz durch Hydrazinolyse entfernt werden. Als Fluoreszenzmarker hat sich bei den geplanten biologischen Untersuchungen die NBD-Aminocaprinsäure (NBD-Aca) bewährt.<sup>[108]</sup>

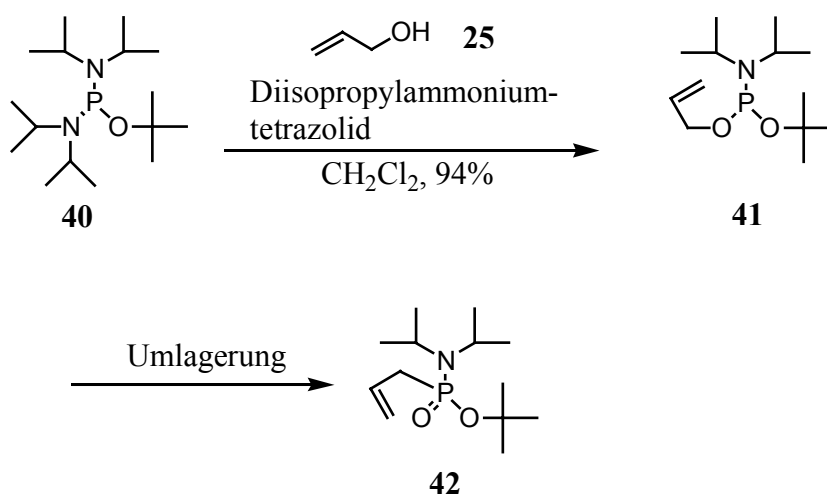
Um die bei Glycin-Glycin drohende Diketopiperazinbildung an fester Phase zu vermeiden, ist es vorteilhaft, das C-terminale Tripeptid Fmoc-Leu-Gly-Gly-OH **39** in Lösung zu synthetisieren, mit dem Hycron-Linker zu verknüpfen und dann an fester Phase zu verankern.

Damit lassen sich die Zielstrukturen **35a-c** auf die an fester Phase verankerten Dekapeptide **36a-c** zurückführen, welche wiederum aus ihren geschützten Analoga **37a-c** zugänglich sind. Durch Peptidsynthese an fester Phase ist die Darstellung dieser vollgeschützten Dekapeptide aus dem an fester Phase angeknüpften Tripeptid **38** möglich, welches wiederum durch Reaktion des Tripeptides **39** mit dem Hycron-Linker und anschließender Verknüpfung mit dem polymeren Träger darstellbar sein sollte (Schema 23).



#### 4.2.2 Synthese des glycosylierten und phosphorylierten Serinbausteins

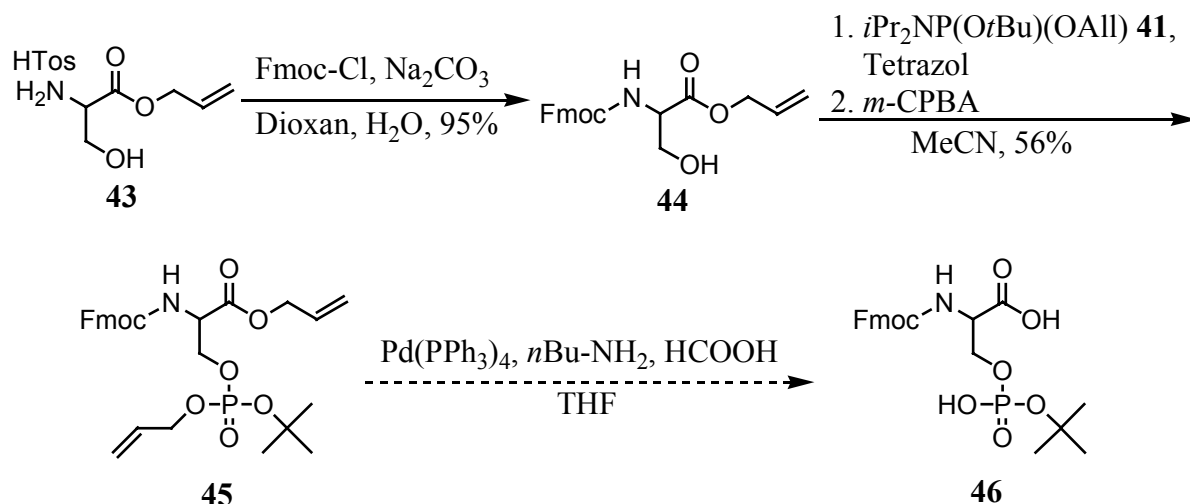
Für die Synthese des weniger zu Eliminierung neigenden Phosphodiesters wurde zuerst analog der Darstellung eines symmetrischen Phosphoramidits das unsymmetrische Phosphoramidit **41** generiert. Allerdings tritt schon während der Darstellung eine unerwünschte, der Claisen-Umlagerung ähnliche [2.3]-sigmatrope Umlagerung auf.<sup>[109]</sup> Auf Grund der hohen Labilität des Phosphoramidites **41** kann dieses nicht vom unerwünschten Nebenprodukt abgetrennt werden, da während der Chromatographie Zersetzung eintritt (Schema 24).



**Schema 24:** Darstellung des Phosphoramidites **41**.

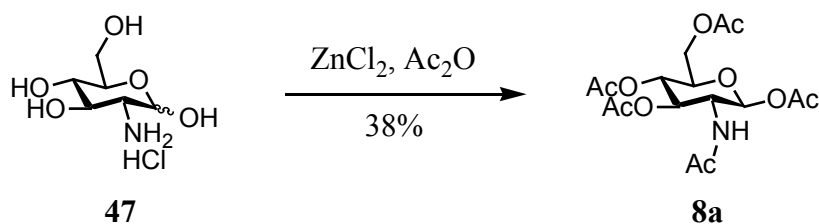
Die Darstellung des phosphorylierten Serinderivates **45** aus dem zuvor dargestellten geschützten Serin **44** mit dem nicht aufgereinigten Phosphoramidit **41** und anschließender Oxidation war nur in stark schwankenden Ausbeuten möglich. Auch erwies sich die Isolierung des vollgeschützten phosphorylierten Serinbausteins **45** als nicht trivial. Bei der Entfernung der Allyl-Schutzgruppen nach der Methode von *Noyori et al.*<sup>[85b]</sup> konnte das Produkt **46** zwar detektiert, nicht jedoch isoliert werden (Schema 25).





**Schema 25:** Versuch der Darstellung des phosphorylierten Serinbausteins **46**.

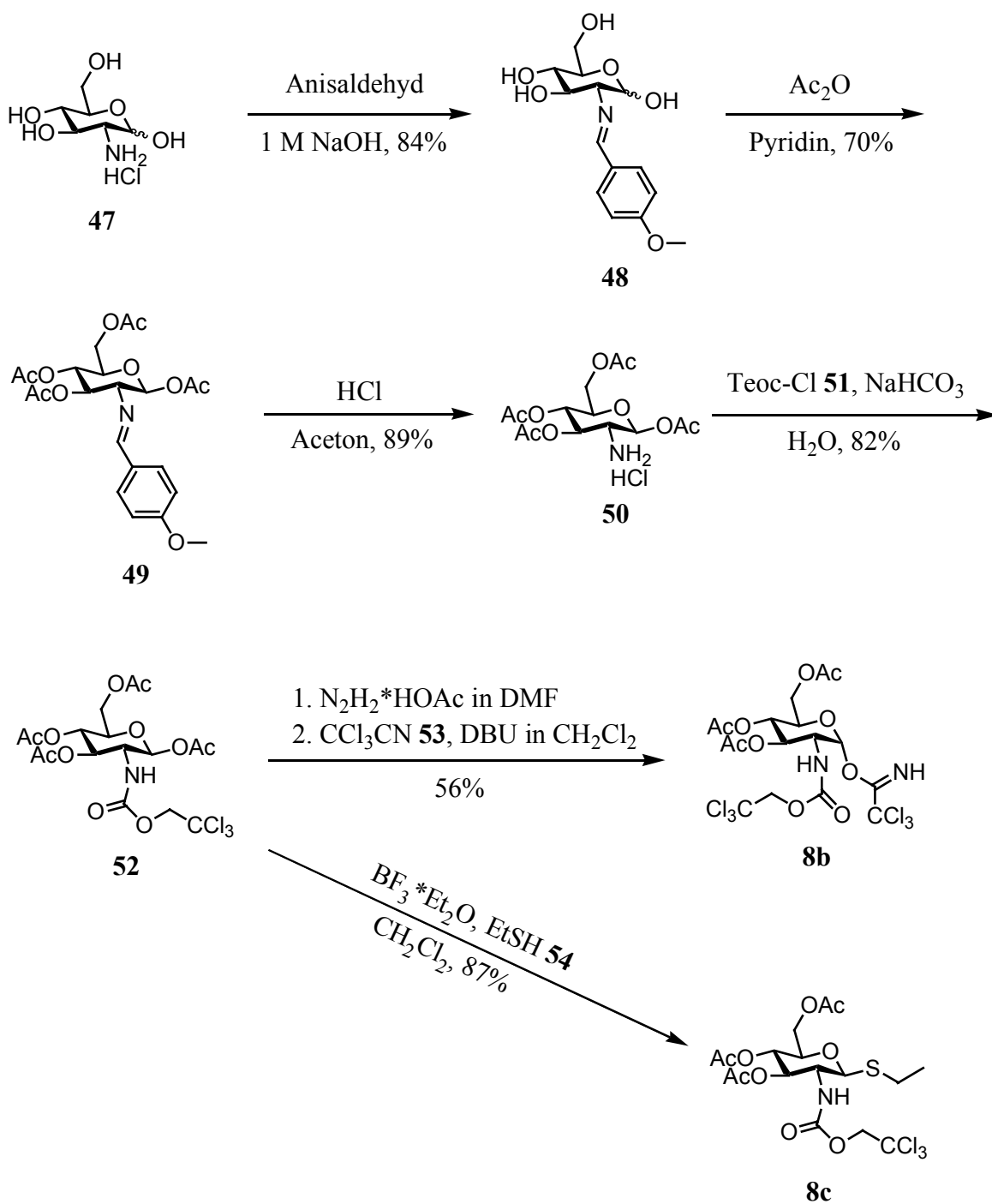
Diese Probleme in Verbindung mit einem aufgetretenen Lieferengpaß für das Phosphoramidit **40** führten dazu, daß auf den kommerziell erhältlichen *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-(benzylphosphato)-*L*-Serin-Baustein, welcher schon mehrfach erfolgreich zur Phosphopeptidsynthese an fester Phase eingesetzt wurde, zurückgegriffen werden mußte.<sup>[104]</sup> Zur Darstellung des glycosylierten Serinbausteins wurden drei unterschiedliche Glycosyldonoren erprobt. Die Darstellung des peracetylierten *D*-Glucosamins **8a** konnte in einer einstufigen Synthese von *D*-Glucosamin Hydrochlorid **47** ausgehend in zufriedenstellender Ausbeute durchgeführt werden (Schema 26).<sup>[110]</sup>



**Schema 26:** Darstellung des peracetylierten  $\beta$ -*D*-Glucosamins **8a**.

Die Synthese der Glycosyldonoren **8b** und **8c** gelang nach der Methode von *R. R. Schmidt et al.*<sup>[93b]</sup> Zuerst wurde D-Glucosamin Hydrochlorid **47** mit Anisaldehyd zur Schiffischen Base **48** umgesetzt und anschließend die Hydroxyfunktionen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Beim vollständig geschützten Zucker **49** wird die Schiffische Base mit Salzsäure gespalten und der entstandene Zucker **50** mit 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid **51** an der Aminofunktion geschützt. Diese Schutzgruppenmodifikationen konnten alle in hohen Ausbeuten und, da alle Produkte kristallin anfielen, im Multigrammaßstab durchgeführt werden.

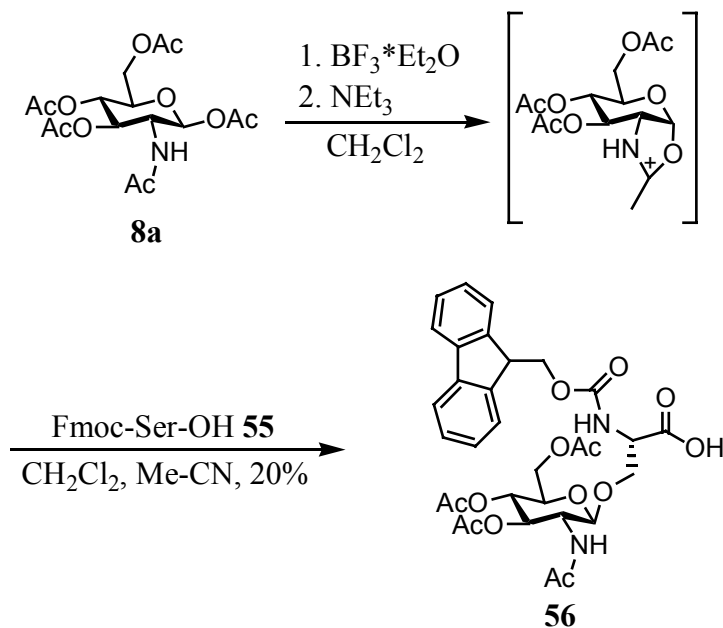
Der von *R. R. Schmidt et al.*<sup>[93b]</sup> beschriebene direkte Zugang zum Zucker **52** führte zu geringeren Ausbeuten in den folgenden Schritten, weshalb in Folge nur der oben beschriebene Syntheseweg benutzt wurde. Der Glycosyldonor **8b** konnte in einer „Eintopf“-Reaktion ausgehend vom Zucker **52** dargestellt werden. Dabei wird die Acetylgruppe am anomeren Zentrum mit Hydrazinacetat gespalten und die entstandene Hydroxyfunktion mit Trichloracetonitril **53** umgesetzt. Der Glycosylierungsbaustein **8c** konnte wiederum ausgehend vom Zucker **52** dargestellt werden. Da der Glycosylierungsbaustein **8c** im Gegensatz zu **8b** kristallin ist, erleichterte die Transformation im Multigrammaßstab (Schema 27).



**Schema 27:** Darstellung der Glycosyldonoren **8b** und **8c**.

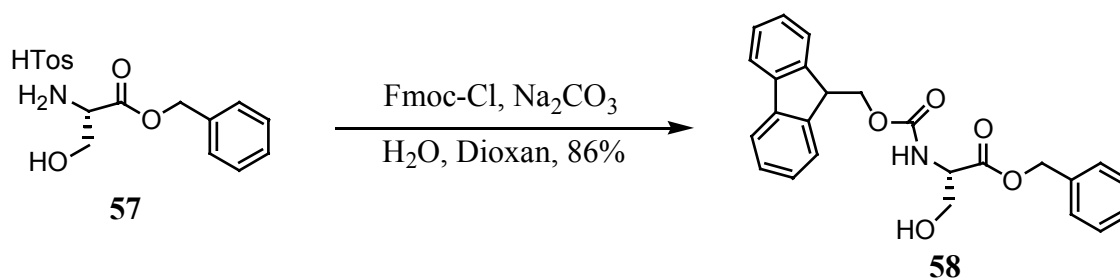
Die Glycosylierung mit dem Glycosyldonor **8a** wurde nach der Methode von *G. Arsequell et al.* durchgeführt.<sup>[92]</sup> Die Oxazolinbildung wurde durch die Zugabe von Bortrifluorid Etherat erreicht. Dies reagierte mit der Hydroxygruppe des Serins zum erwünschten Produkt **56**. Trotz verlängerten Reaktionszeiten konnte die Ausbeute nicht über 20% gesteigert werden. Auch konnte das Produkt nie vollständig von Nebenprodukten abgetrennt werden. Vermutlich

wurde nicht nur die Hydroxygruppe des Serins sondern auch die Carboxyfunktion glycosyliert (Schema 28).<sup>[111]</sup>



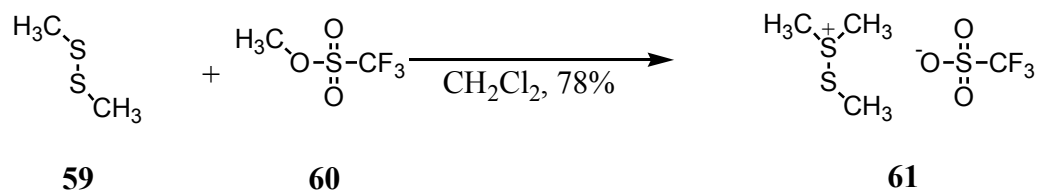
**Schema 28:** Glycosylierung mit dem Glycosyldonor **8a**.

Zur Glycosylierung mit den Glycosyldonoren **8b** und **8c** kann kein C-terminal ungeschützter Serinbaustein verwendet werden. Deshalb wurde die Aminofunktion des L-Serinallylester Hydrotosylats **57** mit Fmoc blockiert. Damit steht der zu glycosylierende Baustein **58** zur Verfügung (Schema 29).



**Schema 29:** Darstellung von Fmoc-Serin-OBzl **58**.

Das zur Aktivierung des Glycosyldonors **8c** notwendige Alkylierungsreagenz Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat (DMTST) **61** wurde aus Dimethyldisulfid **59** und Methyltriflat **60** dargestellt.<sup>[112]</sup> Das erhaltene Produkt **61** ist sowohl Luft- als auch Wasser-empfindlich, kann jedoch unter Argon bei  $-20^\circ \text{C}$  mehrere Wochen gelagert werden (Schema 30).



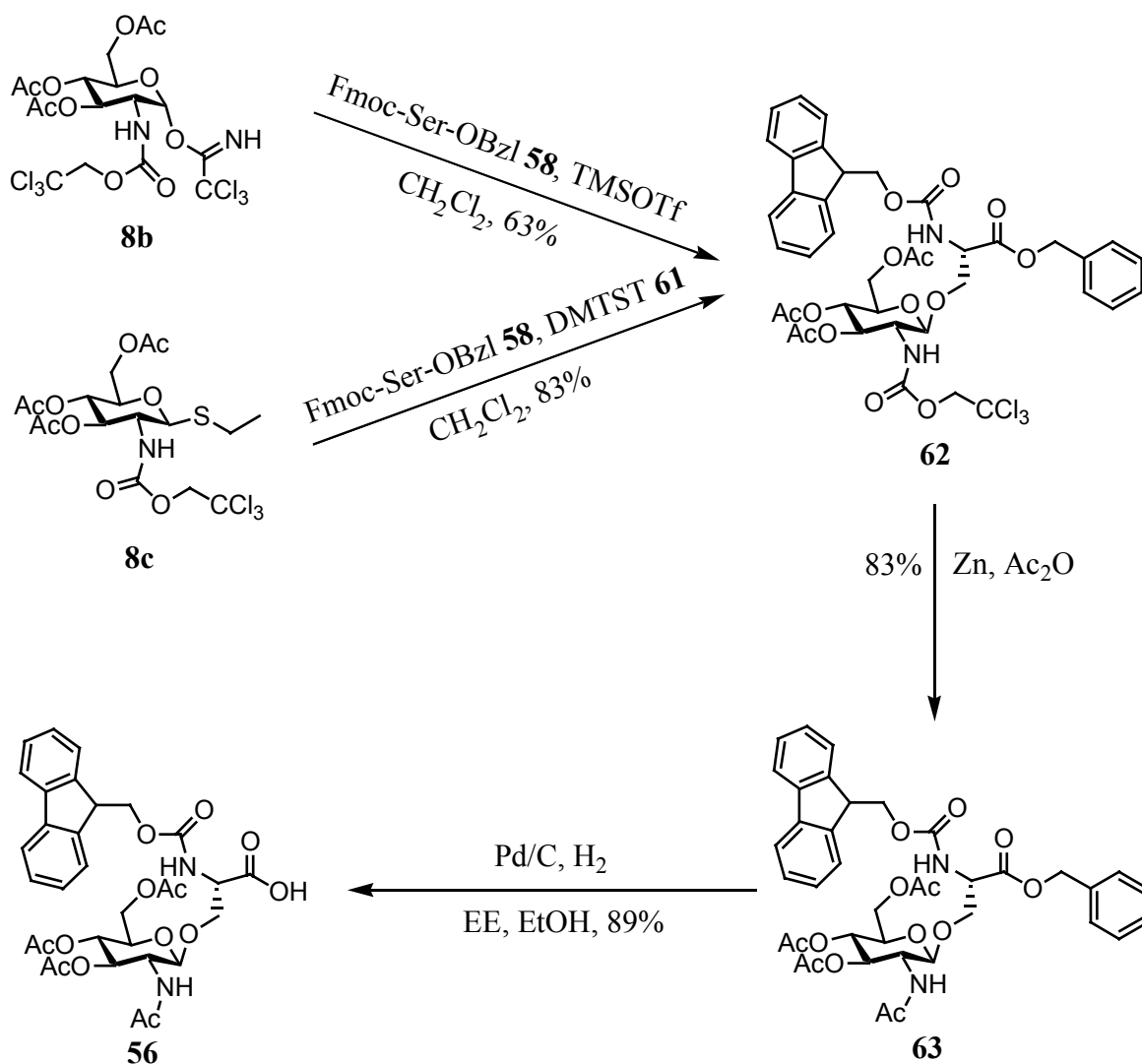
**Schema 30:** Darstellung von Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat **61**.

Zur Glycosylierung mit dem Glycosyldonor **8b** wird dieser mit der Lewis-Säure TMS-Triflat aktiviert und mit Fmoc-Ser-OBzl **58** zum vollgeschützten Serinbaustein **62** in zufriedenstellender Ausbeute umgesetzt.<sup>[93]</sup> In hoher Ausbeute erhält man dieses Serinderivat **62** nach der Alkylierung des Glycosyldonors **8c** mit DMTST **61** unter anschließenden Umsetzung des gebildeten Oxazolins mit Fmoc-Ser-OBzl **58**.<sup>[94]</sup>

Der Austausch der aktivierenden Teoc-Schutzgruppe gegen den erwünschten Acetylrest konnte in einer „Eintopf“-Reaktion mit frisch aktiviertem Zinkpulver und Essigsäureanhydrid durchgeführt werden.<sup>[93]</sup> Die sonst ebenfalls übliche zweistufige Austauschreaktion, in der im ersten Reaktionsschritt die Teoc-Gruppe mit frisch aktiviertem Zink in Essigsäure abgespalten und die entstandene Aminogruppe anschließend mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert wird, führte zu deutlich verminderten Ausbeuten.

Die C-terminale Entschützung des Serinbausteins **63** konnte mit 5% Pd auf Kohle unter Wasserstoffatmosphäre in hoher Ausbeuten durchgeführt werden. Dabei ist eine ständige Reaktionskontrolle notwendig, da bei zu langen Reaktionszeiten oder einer Änderung des Lösungsmittelgemisches auch die Fmoc-Schutzgruppe abhydriert wird.

Der erwünschte glycosylierte Serinbaustein **56** ist somit mit der Literatur vergleichbaren Ausbeuten und hoher Reinheit zugänglich (Schema 31).<sup>[93,94]</sup>



**Schema 31:** Synthese des glycosylierten Serinbausteins **56** mit den Glycosyldonoren **8b** und **8c**.

Die analoge Synthese mit dem Glycosylakzeptor Fmoc-Ser-OAll ergab im Fall des Glycosyldonors **8b** vergleichbare Ausbeuten bei der Glycosylierung und dem Teoc-Acetyl-Austausch, jedoch schlechtere Ergebnisse bei der Pd(0)-katalysierten C-terminalen Deblockierung, insbesondere bei größeren Ansätzen. Im Falle des Glycosyldonors **8c** gelang die Glycosylierung nicht; vermutlich reagierte das Alkylierungsmittel DMTST **54** mit der Allyl-Gruppe.

Die Ergebnisse mit den Glycosyldonoren **8a-c** sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Ausbeuten sind jeweils auf D-Glucosamin Hydrochlorid **47** bezogen.

Glycosyldonor	Aktivierungsreagenz	Ausbeute an dem glycosylierten Serinbaustein 56
<b>8a</b>	BF <sub>3</sub> *Et <sub>2</sub> O	7.6%
<b>8b</b>	TMS-Triflat	11.2%
<b>8c</b>	DMTST	22.9%

**Tabelle 2:** Vergleich der verwendeten Glycosylierungsmethoden ausgehend von D-Glucosamin Hydrochlorid **47**.

Die Methode nach *Arseque et al.*<sup>[92]</sup> mit dem Glycosyldonor **8a** erwies sich als ungeeignet. Obwohl die Synthese nur zwei Stufen umfaßte, war die Ausbeute am niedrigsten. Zudem ließ sich der glycosylierte Serinbaustein nicht vollständig von ebenfalls entstandenen Nebenprodukten trennen.

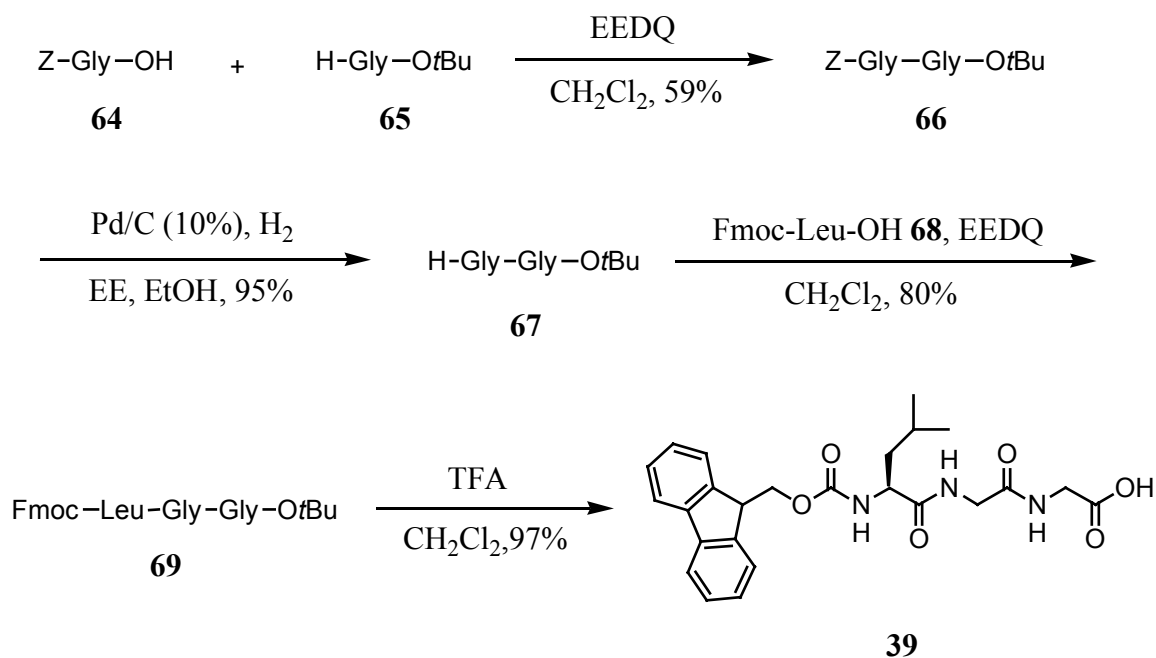
Die Trichloracetimidat-Methode<sup>[93]</sup> mit Glycosyldonor **8b** lieferte ebenfalls nicht zufriedenstellende Ergebnisse. Jedoch stimmten die analytischen Daten mit den literaturbekannten Werten überein. Die Synthese umfasste insgesamt zehn Stufen.

Die mit Abstand besten Resultate wurden mit dem Glycosyldonor **8c** erzielt.<sup>[94]</sup> Auch ließ sich bei dieser Methode am leichtesten mit großen Ansatzgrößen arbeiten, da der Glycosyldonor **8c** kristallin vorlag. Einziger Nachteil der insgesamt neun-stufigen Synthese ist die hohe Toxizität des Aktivierungsreagenz DMTST. Auch hier stimmten die physikalischen Daten mit den literaturbekannten Werten überein.

### 4.2.3 Darstellung des C-terminalen Tripeptids **39** und dessen Verankerung an der festen Phase

Da bei der Festphasenpeptidsynthese mit hohen Reagenzüberschüssen gearbeitet wird, war es notwendig, das C-terminale Tripeptid-Linker-Konjugat im größeren Maßstab darzustellen. Die Verknüpfung von Z-Glycin **64** mit Glycin-*tert*-butylester **65** mit EEDQ als Kupplungsreagenz verlief in zufriedenstellender Ausbeute. Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe des vollgeschützten Dipeptids **66** führte zum N-terminal entschützten Dipeptid **67**.

Nach einer Verlängerung mit Fmoc-L-Leucin **68**, wiederum mit EEDQ als Kupplungsvermittler, wurde das geschützte Tripeptid **69** in guter Ausbeute erhalten. Die säurekatalysierte C-terminale Deblockierung führt zum erwünschten Tripeptid **39**, welches mit dem Linker verknüpft werden soll (Schema 32).



**Schema 32:** Synthese des C-terminalen Tripeptids **39**.

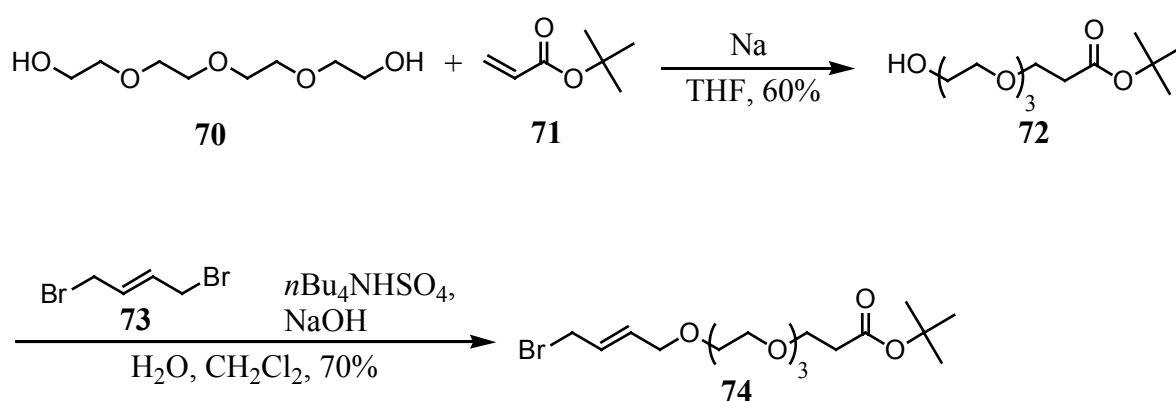
Eine Änderung des Schutzgruppenkonzeptes zu Allyl als C-terminale Schutzgruppe und Boc als N-terminale Schutzgruppe des Dipeptids führte zu vergleichbaren Ergebnissen während der Peptidkupplungen. Die C-terminale Entschützung im letzten Schritt der Reaktionssequenz konnte jedoch nicht in zufriedenstellenden Ausbeuten im Multi-Gramm-Maßstab durchgeführt werden.



Die Verwendung des Benzylesters als C-terminale Schutzgruppe und wiederum Boc als N-terminale Schutzgruppe führte zu insgesamt etwas verminderten Ausbeuten bei der Synthese des Tripeptides **39**. Die mit dem ursprünglichen Schutzgruppenkonzept erzielte Gesamtausbeute von 43.5% konnte nicht erreicht werden, womit sich dieses als optimal erwiesen hat.

Die Wahl des Hycronlinkers beruhte auf seiner Orthogonalität zu säure- und basenlabilen Schutzgruppen. Der Hycron-Linker beinhaltet neben der durch Pd(0)-Katalyse abspaltbaren Allyleinheit auch einen flexiblen, polaren Spacer in Form einer Triethylenglycoleinheit. Dieser vermindert die sterische Hinderung und die Assoziation mit dem Polystyrol.<sup>[105]</sup>

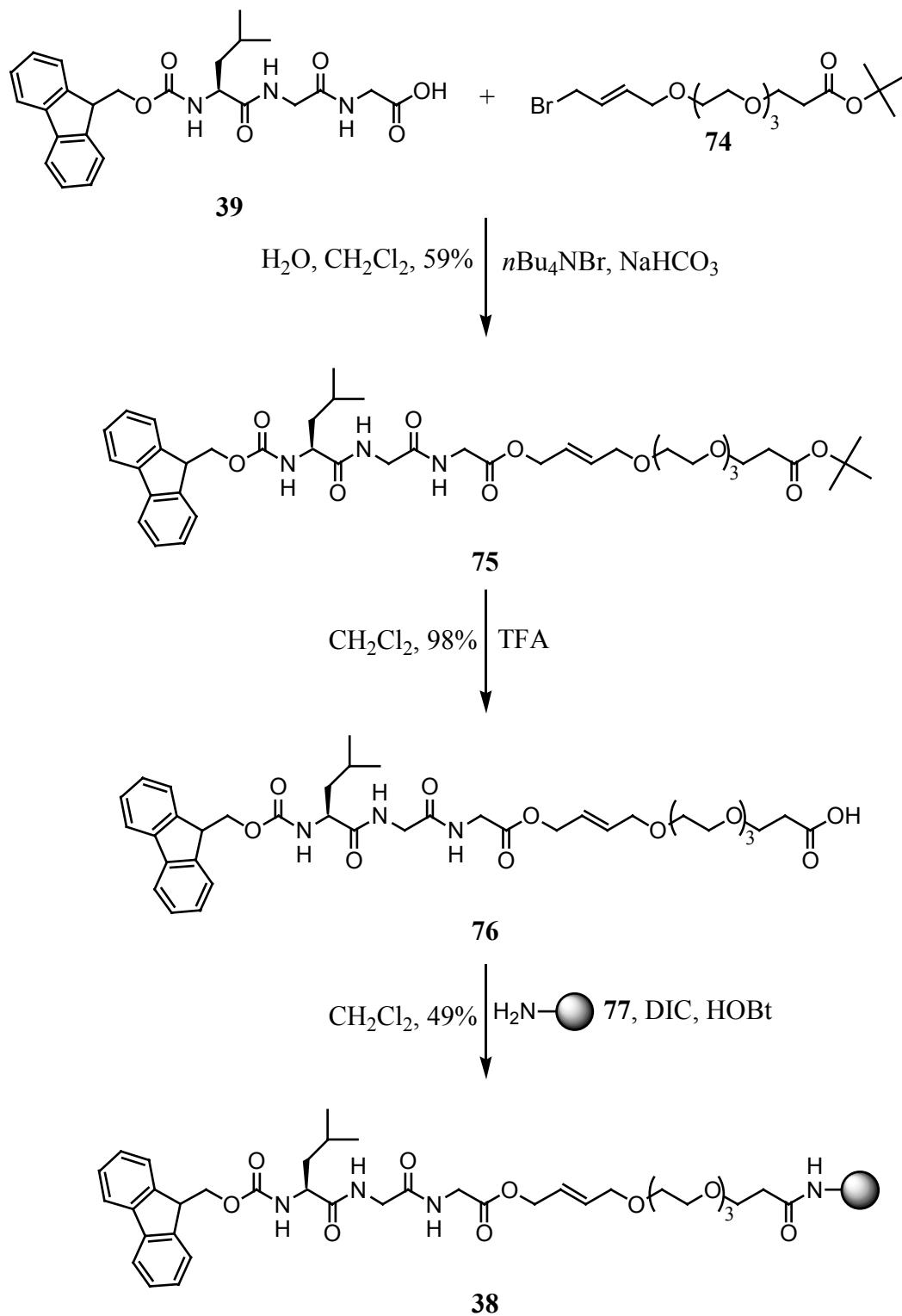
Zur Synthese des Linkers wird Triethylenglycol **70** in einer Na-vermittelten 1,4-Addition an *tert*-Butylacrylat **71** addiert. Unter Phasentransferbedingungen wird das entstandene Produkt **72** mit 1,4-Dibrombut-2-en **73** verethert um das Hycronbromid **74** zu erhalten.<sup>[105]</sup> Die Ausbeute der Veretherung konnte im Vergleich zur Originalliteratur annähernd verdoppelt werden (Schema 33).



**Schema 33:** Synthese des Hycronbromids **74**.

Die Verknüpfung zwischen dem C-terminalen Tripeptid **39** und dem Hycronbromid **74** unter Phasentransferkatalyse verläuft im Vergleich zur Literatur<sup>[105]</sup> in etwas geringerer Ausbeute. Dies lässt sich mit der Anknüpfung eines Tripeptids im Vergleich zur Anknüpfung einer einzelnen Aminosäure und den damit auftretenden sterischen Hinderungen erklären. Auch eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeiten steigerte die Ausbeute nicht.

Das entstandene Tripeptid-Hycron-Addukt **75** wurde C-terminal durch die Behandlung mit TFA deblockiert und die freie Säure **76** mit Aminomethylpolystyrolharz **77** durch eine DIC/HOBt-vermittelte Kupplung zum belegten Harz **38** verknüpft. Die Ausbeute der Reaktion an fester Phase wurde, wie üblich, durch photometrische Bestimmung des Piperidin-Fulven-Addukts bestimmt (Schema 34).<sup>[113]</sup>



**Schema 34:** Verknüpfung des C-terminalen Tripeptids **39** mit dem Hycron-Linker **74** und Anknüpfung an die feste Phase.

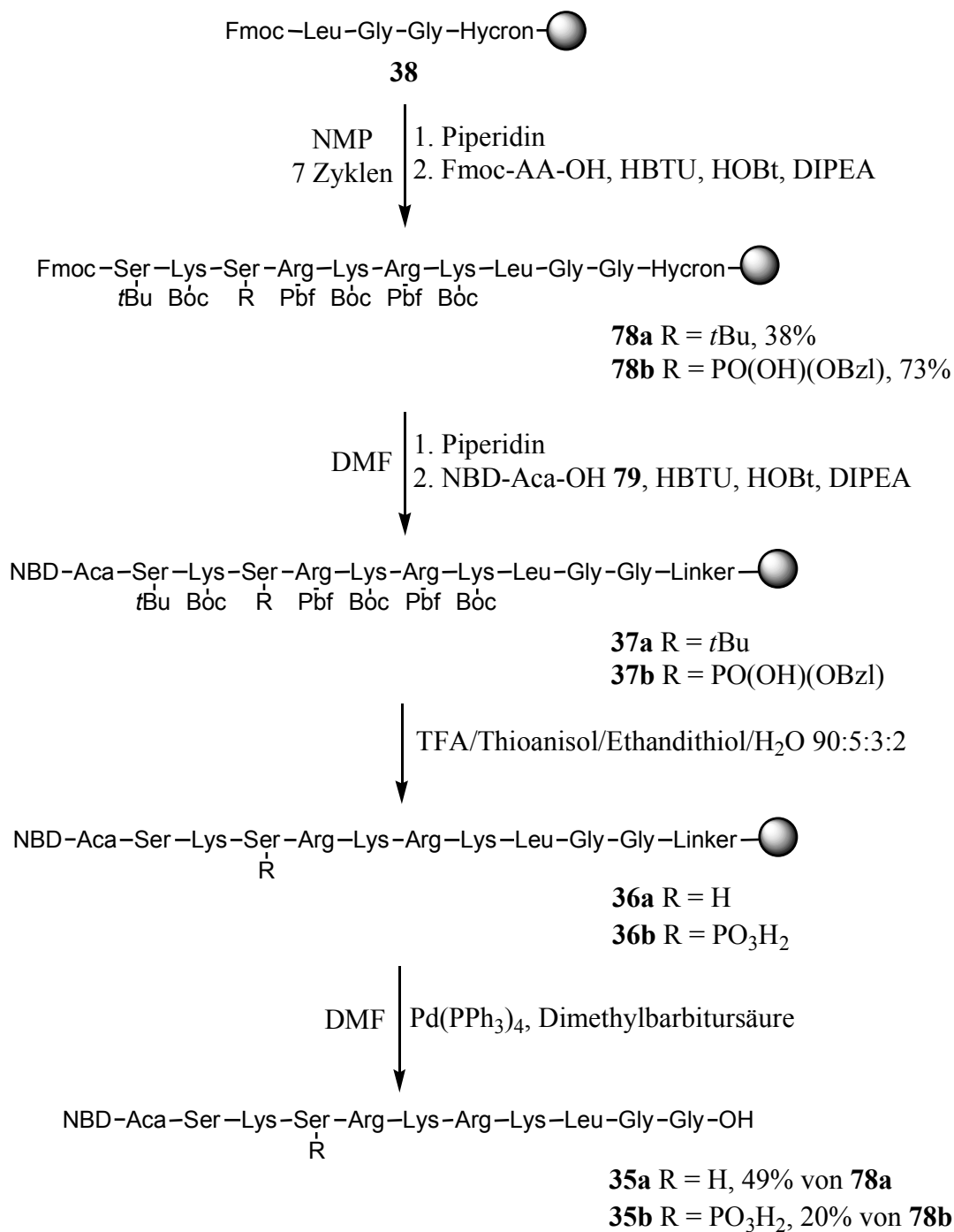
#### 4.2.4 Darstellung der Dekapeptide an fester Phase

Nachdem alle Aminosäure-Bausteine zur Verfügung standen, konnte mit der Synthese der Dekapeptide **35a-c** an fester Phase begonnen werden. Die Peptidsynthese sollte, soweit möglich, automatisiert am Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll *FastMoc 0.25 mmol chemistry* durchgeführt werden.<sup>[114]</sup> Dabei wurden die Peptidverknüpfungen mit einem 4-fachen Überschuss der anzuknüpfenden Aminosäure, 3,6-fachen Überschuss an Kupplungsreagenz (HBTU/HOBt) nach 3 min Voraktivierung in NMP durchgeführt. Die Kupplungsdauer betrug 21 Minuten. Die Fmoc-Deblockierung wurde drei mal 2 min mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP durchgeführt. Bei manuellen Arbeitsschritten wurde DMF als Lösungsmittel verwendet und die Reaktionszeiten verlängert. Die Reaktionskontrolle wurden über die photometrische Detektion des Piperidin-Fulven-Adduktes durchgeführt.<sup>[113]</sup>

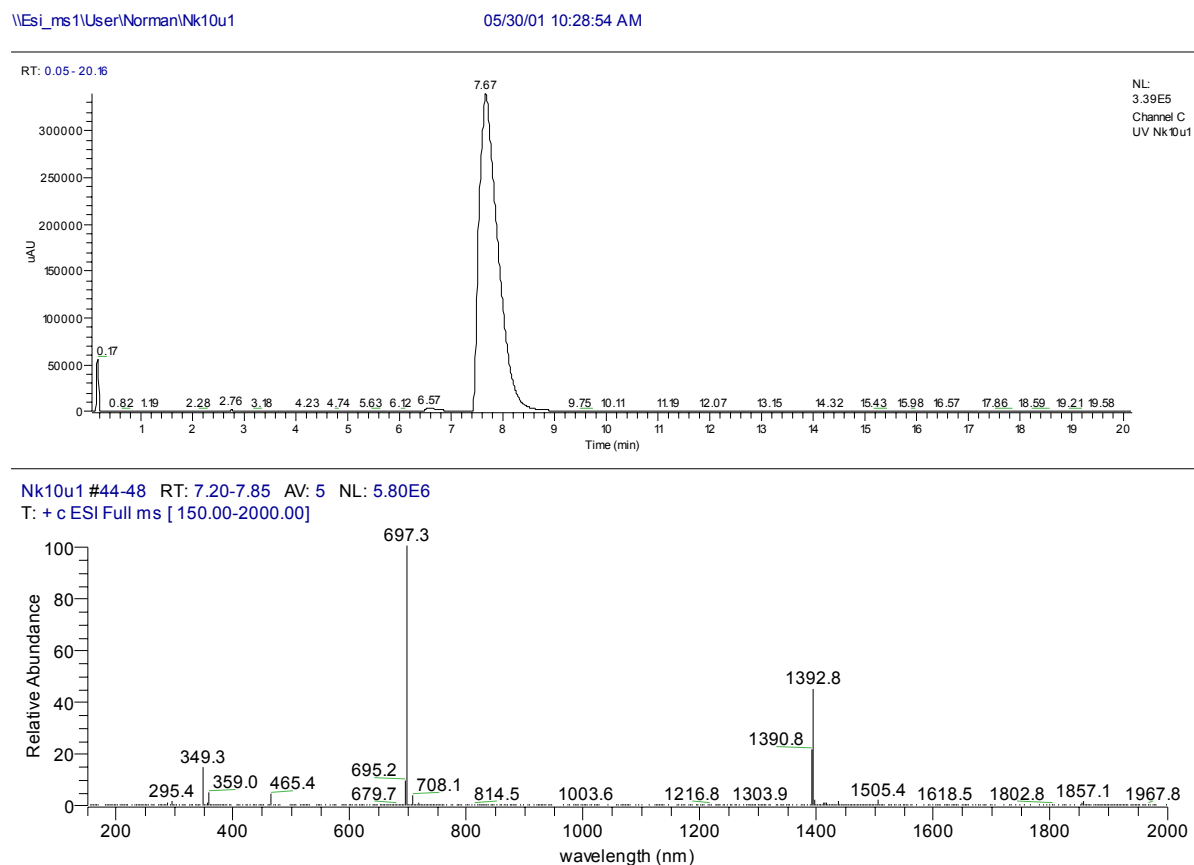
Das unmodifizierte sowie das phosphorylierte Dekapeptid **78a** und **78b** konnten vollständig mit dem Peptidsynthesizer aufgebaut werden. Die Ausbeuten waren vor allem für das unmodifizierte Dekapeptid **78a** für eine automatisierte Synthese nicht zufriedenstellend. Die Ursache kann in der Bildung von Sekundärstrukturen des Peptides liegen, welche zu einer sterischen Hinderung führte. Da jedoch die Deletionssequenzen problemlos mittels HPLC abgetrennt werden konnten, wurden keine weiteren Optimierungsschritte unternommen.

Die Fluoreszenzmarkierung mit NBD-Aminocaprinsäure wurde auf Grund des geringeren Ansatzvolumens manuell durchgeführt. Zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten erwies sich eine Mischung von TFA/Thioanisol/Ethandithiol/Wasser im Verhältnis 90:5:3:2 als geeignet. Versuche mit TFA/Thioanisol 95:5 führten nicht zum erwünschten entschützten Dekapeptid **36**. Die Abspaltung des Dekapeptides vom Harz wurde in DMF mit Dimethylbarbitursäure als Allyl-Akzeptor durchgeführt (Schema 35).

Die Dekapeptide **35a** und **35b** konnten mittels HPLC aus den Rohprodukten isoliert werden. Ihre hohe Reinheit konnte sowohl durch HPLC-Analyse als auch ESI-MS belegt werden (Abbildung 1 und 2).

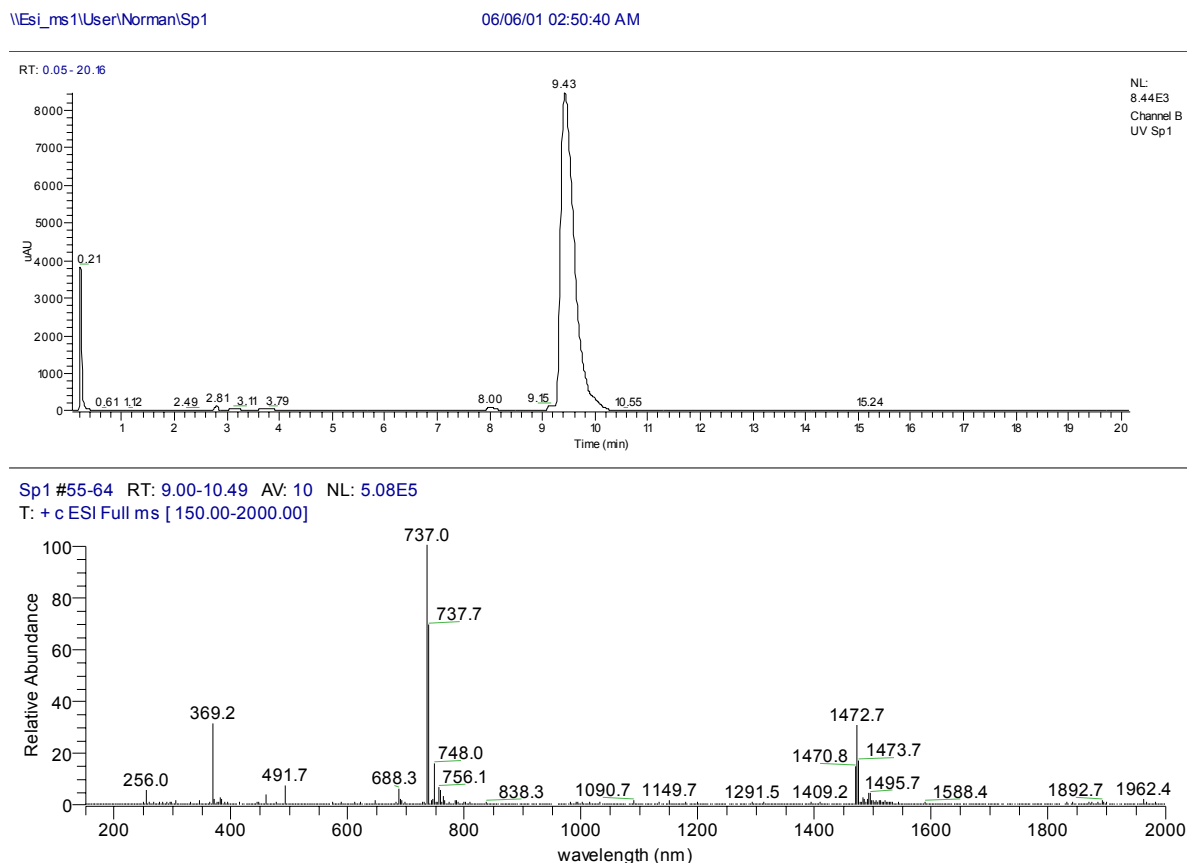


**Schema 35:** Festphasensynthese der Dekapeptide **35a, b**.



**Abbildung 1:** HPLC-ESI-MS-Analyse des Dekapeptids **35a**.

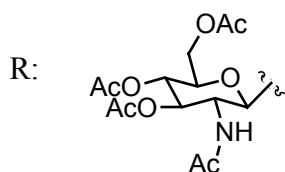
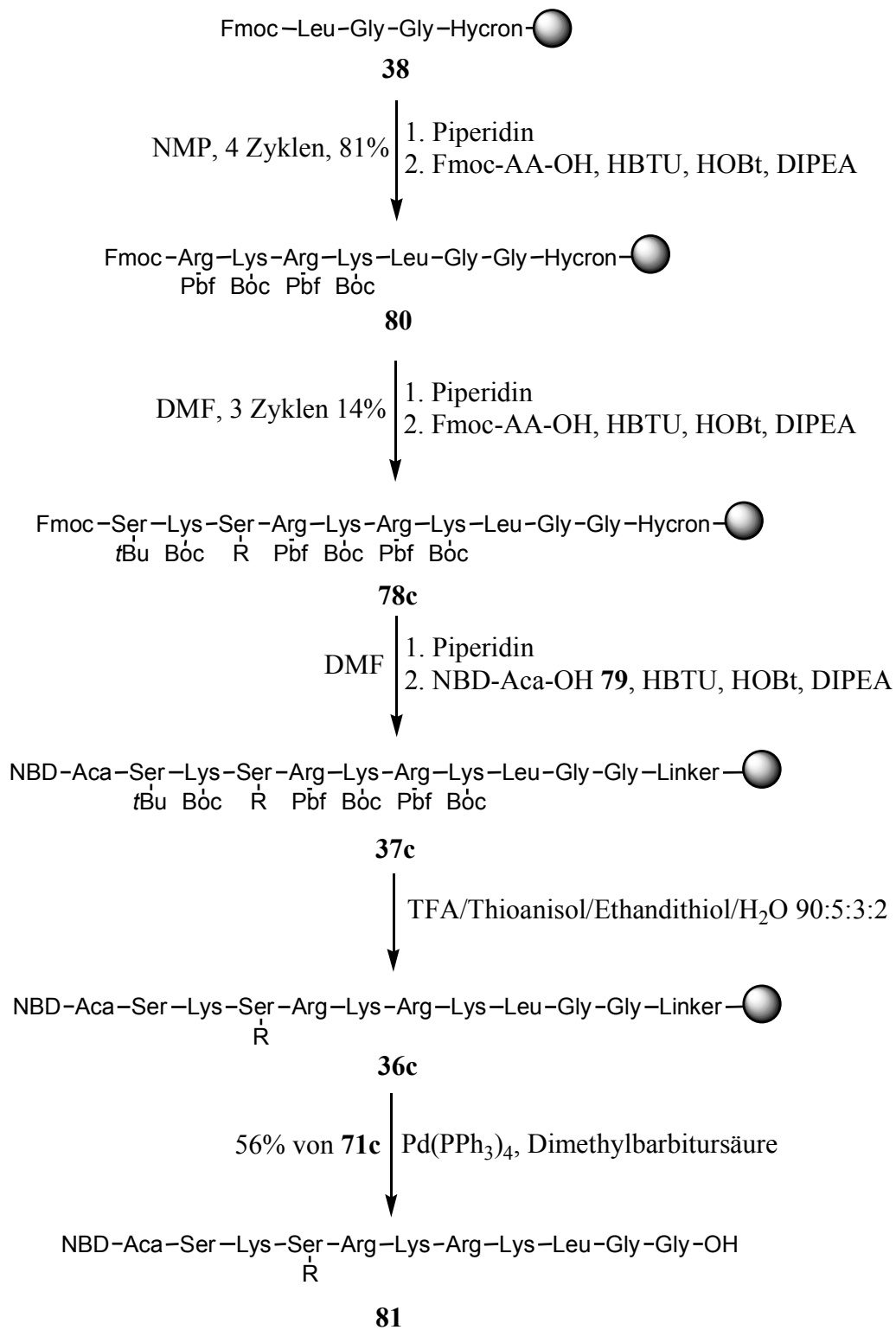
Die Synthese des glycosylierten Dekapeptids wurde nur bis zum Heptapeptid **80** automatisiert in hoher Ausbeute durchgeführt. Die Anknüpfung der letzten drei Aminosäuren wurde manuell durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß sich trotz Doppelkupplung der letzten 3 Aminosäuren ein nicht zu trennendes Gemisch aus dem Produkt und Deletionssequenzen ergab. Dabei scheinen vor allem die letzten zwei Kupplungsschritte nur unvollständig abgelaufen zu sein. Aus diesem Grund wurde nach den letzten drei Doppelkupplungsschritten ein Cappingschritt mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 4:1 eingefügt. Die Bestimmung der Ausbeute ergab für den Kupplungsschritt der glycosylierten Aminosäure noch eine Ausbeute von 85%, während die Prolongation um die nächsten zwei Aminosäuren nur mit insgesamt 17% ablief. Vermutlich blockiert der voluminöse Zuckerrest die Aminofunktion der Aminosäuren. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeiten konnte die Ausbeute nicht signifikant steigern. Da jedoch die Abbruchsequenzen mittels HPLC leicht abgetrennt werden konnten, wurden keine weiteren Optimierungsversuche unternommen.



**Abbildung 2:** HPLC-ESI-MS-Analyse des Dekapeptides **35b**.

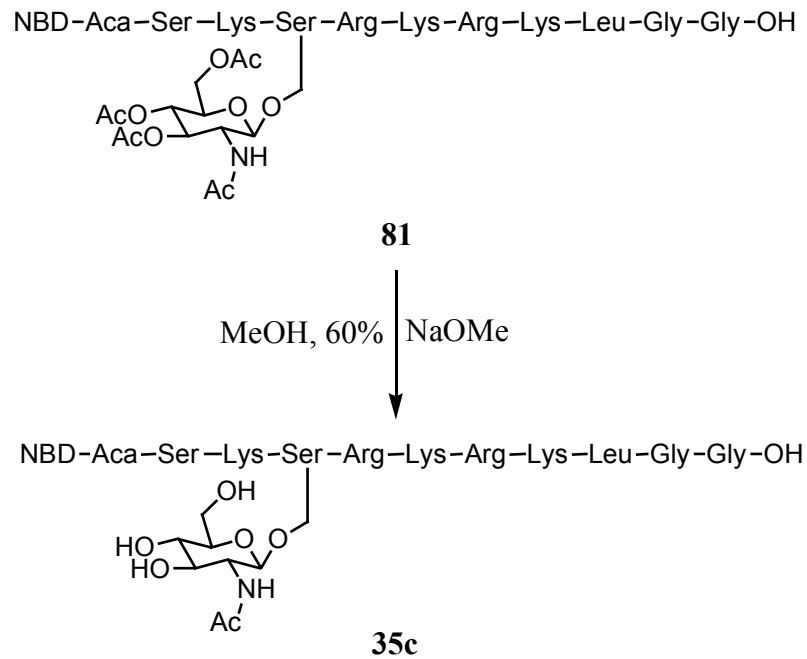
Die Anknüpfung des Fluoreszenzmarkers wurde ebenfalls manuell durchgeführt. Die Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren wurde mit dem bereits erprobten Abspaltungsgemisch entschützt. Es ist bekannt, daß *N*-Acetylglucosaminreste diese oder ähnliche Abspaltungsbedingungen tolerieren,<sup>[103]</sup> so konnte auch in diesem Fall kein Verlust oder Anomerisierung des Zuckerrestes nachgewiesen werden.

Die Abspaltung vom Harz wurde wiederum in DMF mit Dimethylbarbitursäure als Allylakzeptor durchgeführt. Das Dekapeptid **81** wurde mittels präoperativer HPLC aufgereinigt (Schema 36).



**Schema 36:** Festphasensynthese des Dekapeptids **81**.

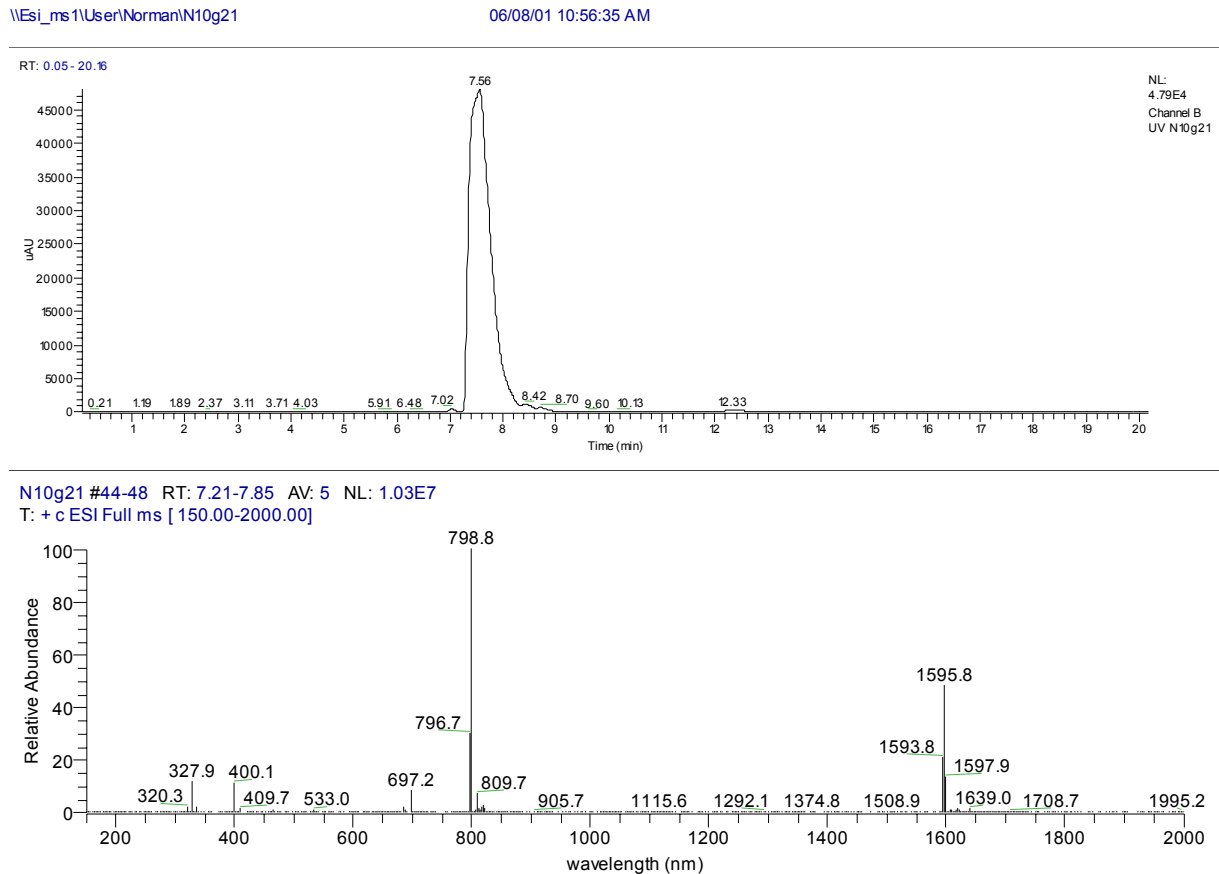
Um die Zielstruktur **35c** zu erhalten, mußten noch die *O*-Acetyl-Gruppen abgespalten werden. Dazu wurde die acetylierte Verbindung mit Natriummethanolat in Methanol umgesetzt. Der nukleophile Angriff des Methanolations an die *O*-Acetyl-Gruppen führt zu einer Entschützung der Alkoholfunktionalitäten. Die *N*-Acetyl-Gruppe wird unter diesen Reaktionsbedingungen nicht angegriffen. Die Zielstruktur **35c** konnte somit in hoher Ausbeute dargestellt werden (Schema 37).



**Schema 37:** Darstellung des Dekapeptids **35c** durch Deacetylierung des Zuckerrestes.

Die hohe Reinheit des Dekapeptids **35c** konnte mittels HPLC und ESI-MS belegt werden. (Abbildung 3)





**Abbildung 3:** HPLC-ESI-MS-Analyse des Decapeptids **35c**.

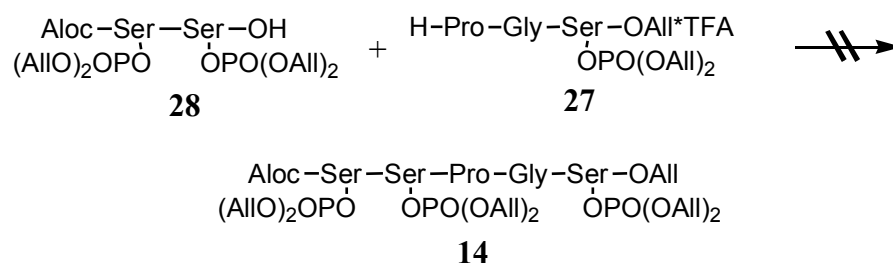
Die drei Modifikationen der Kernlokalisierungssequenz des vJun-Proteins konnten mit hoher Reinheit an fester Phase dargestellt werden. Durch eine geeignete Wahl der Schutzgruppen konnte die zu befürchtende Eliminierung der Seitenkettenmodifikationen vermieden werden. Die geplanten biologischen Test werden zur Zeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Wittinghofer durchgeführt. Ergebnisse über den Kernimport in Abhängigkeit der Seitenmodifikation stehen noch aus.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Bedingt durch das immer bessere Verständnis biologischer Vorgänge, auch auf molekularer Ebene, ist in den letzten Jahren das Interesse an kleineren definierten Verbindungen mit molekularbiologischer Relevanz deutlich angestiegen. Diese für die weitere Erforschung biologischer Vorgänge notwendigen Verbindungen kann oft nur die Organische Chemie bereitstellen. Damit ergeben sich neue Herausforderungen für den synthetisch arbeitenden Chemiker, da die benötigten Verbindungen sich häufig durch ausgeprägte Labilitäten wie einer Säuren- und Basenlabilität auszeichnen. In den letzten Jahren wurden daher verstärkt neue Methoden entwickelt, welche die Synthese solcher Moleküle ermöglichen sollen.

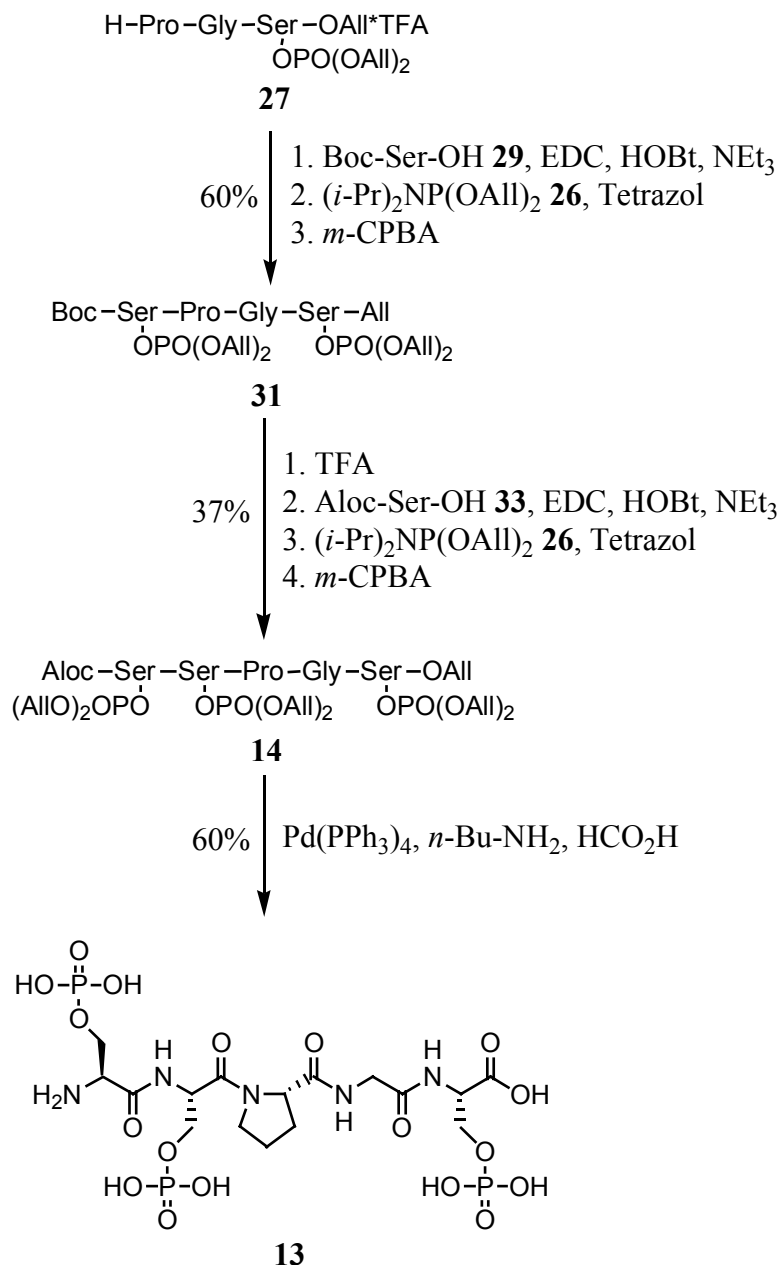
Von besonderem biologischen Interesse sind Fragmente der an den jeweiligen Vorgängen beteiligten Biopolymere. Für die Untersuchung der zellulären Signalweiterleitung werden dabei zumeist glykosylierte, lipidierte oder phosphorylierte Peptidkonjugate benötigt, welche wegen ihrer Labilität nur schwer zugänglich sind. Während lipidierte Proteine bestimmte extrazelluläre Signale an der Zellmembran empfangen, erfolgt die Weiterleitung zum Zellkern über eine Phosphorylierungskaskade. Dabei nimmt die Phosphorylierung häufig die Funktion eines molekularen Schalters wahr. Das Verständnis dieser Prozesse ist auf Grund zahlreicher, durch Störungen im Signaltransduktionsweg ausgelöster Krankheiten von besonderem Interesse.

Um die Leistungsfähigkeit moderner Phosphorylierungsmethoden unter Beweis zu stellen, sollte das dreifach phosphorylierte Pentapeptid **13** des menschlichen  $\tau$ -Proteins synthetisiert werden. Nach Darstellung des monophosphorylierten C-terminalen Tripeptids **27** konnte die Verknüpfung mit dem diphosphorylierten N-terminalen Dipeptid **28** nicht verwirklicht werden. Statt dessen wurde die Eliminierung einer Phosphatgruppe während der Fragmentkondensation beobachtet. Dies beweist wiederum die hohe Labilität mehrfach phosphorylierter Peptide (Schema 38).



**Schema 38:** Versuch, das Pentapeptid **14** durch Fragmentkondensation darzustellen.

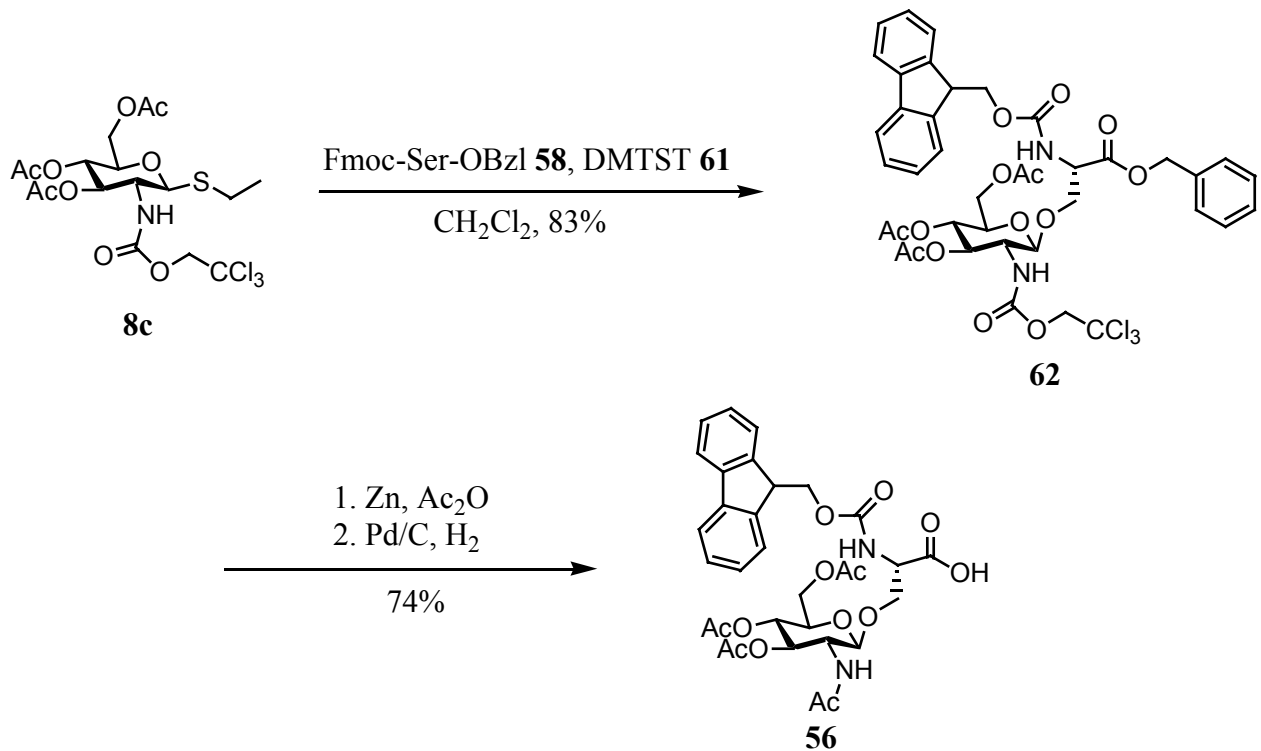
Aus diesem Grund wurde der Synthesepfad geändert. Das Pentapeptid **14** sollte jetzt durch schrittweise Prolongation des Tripeptids **27** mit unmodifizierten Serinbausteinen und deren anschließender Phosphorylierung synthetisiert werden. Die Verknüpfung mit den N-terminal geschützten Serinbausteinen **29** und **33** sowie deren anschließende Phosphorylierung verlief in durchweg hohen Ausbeuten. Zur Deblockierung des vollgeschützten Pentapeptids **14** wurden alle acht Schutzgruppen des Allyltyps simultan unter *Noyori*-Bedingungen<sup>[86b]</sup> entfernt, um das Zielpeptid **13** zu erhalten (Schema 39).



**Schema 39:** Synthese des dreifach phosphorylierten Pentapeptids **13**.

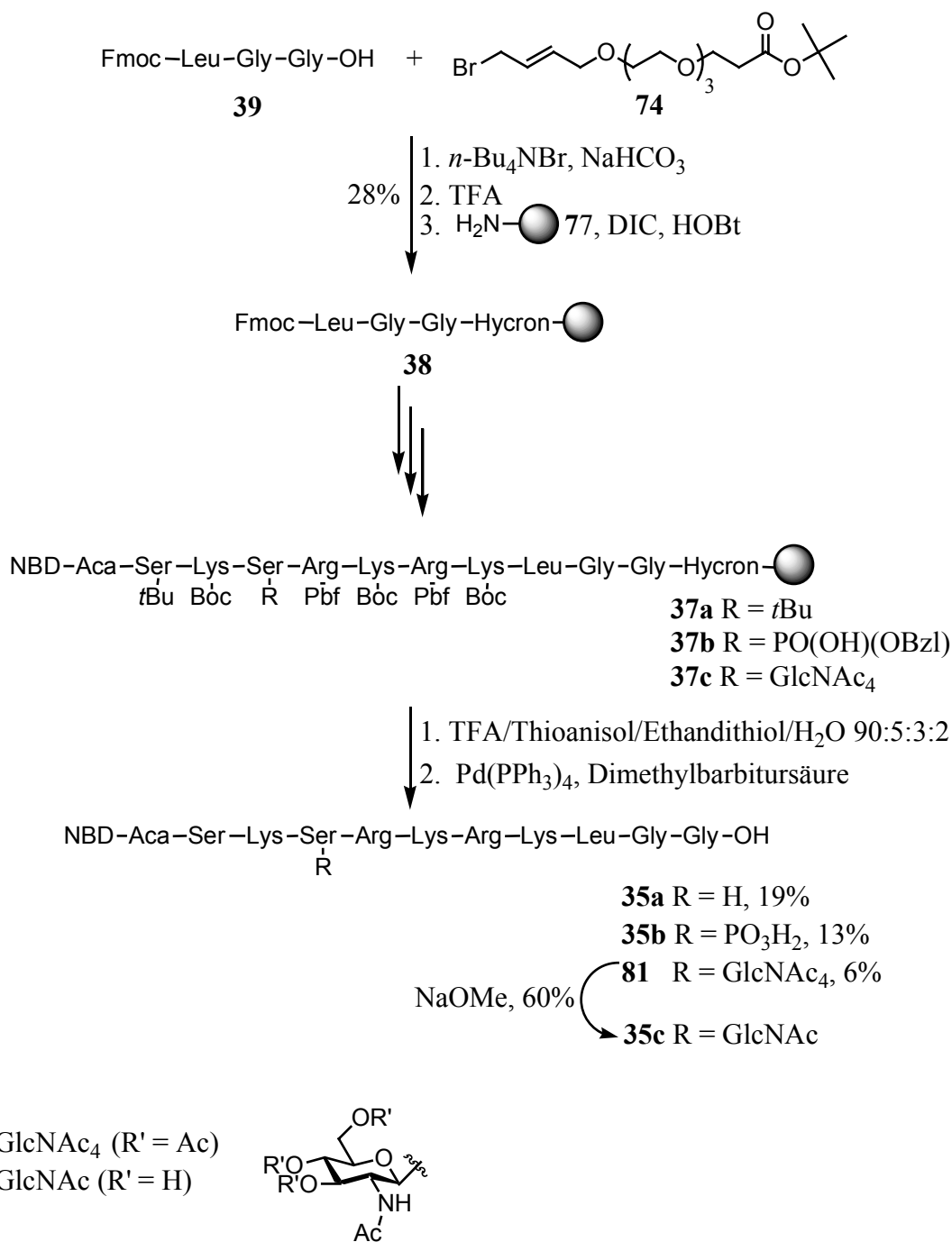
Desweiteren sollte im Rahmen dieser Dissertation die Kernlokalisierungssequenz des viralen Jun-Proteins in seiner glycosylierten, phosphorylierten und unmodifizierten Form dargestellt werden. Die fluoreszenzmarkierten Peptide ermöglichen Microinjektionsexperimente, um den Kernimport in Abhängigkeit der Seitenkettenmodifikation zu erforschen.

Zur Synthese des glycosylierten Serinbausteins wurden mehrere Glycosylierungsmethoden getestet. Am besten erwies sich der Thioglykosyldonor **8c**. Mit ihm konnte in hoher Ausbeute der glycosylierte Serinbaustein dargestellt werden (Schema 40).



**Schema 40:** Synthese des glycosylierten Serinbausteins **56**.

Die Synthese der Dekapeptide **35a-c** wurde an fester Phase mit dem Hycron-Linker durchgeführt. Um die Diketopiperazinbildung zu vermeiden, wurde das C-terminale Tripeptid **39** in Lösung synthetisiert, mit dem Hycron-Linker verknüpft und an fester Phase verankert. Anschließend wurde das fluoreszenzmarkierte Dekapeptid am polymeren Träger aufgebaut, die säurenlabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt und durch Pd(0)-katalysierte Allylübertragung vom Harz abgespalten. Nach HPLC-Reinigung konnten die Dekapeptide **35a,b** und **81** in hoher Reinheit und zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten werden. Nach der *O*-Deacetylierung des *N*-Acetylglucosaminrestes konnte die Zielstruktur **35c** erhalten werden (Schema 41).

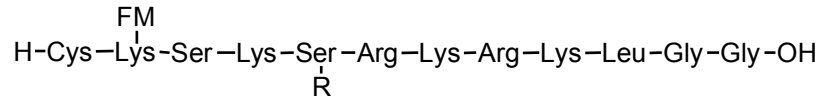


**Schema 41:** Synthese der Dekapeptides **35a-c**.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch die Synthese des Pentapeptids **13** die Leistungsfähigkeit moderner Phosphorylierungsmethoden unter Beweis gestellt werden. Die Darstellung der fluoreszenzmarkierten Kernlokalisierungssequenz des viralen Jun-Proteins in glycosylierter, phosphorylierter und unmodifizierter Form gelang ebenfalls. Damit stehen die Verbindungen **35a-c** für die geplanten biologischen Experimente zur Verfügung.

Aufbauend auf den Ergebnissen der biologischen Experimente könnten Derivate der Dekapeptide **35a-c** synthetisiert werden. So könnte die Stelle der Modifizierung vom <sup>248</sup>Ser

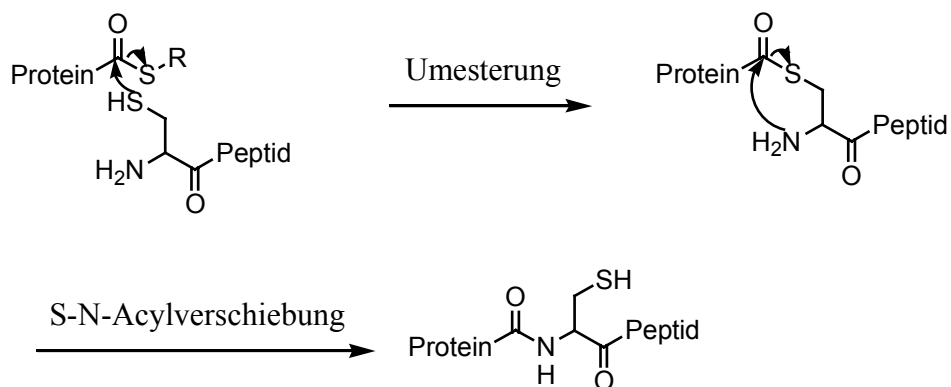
auf das  $^{246}\text{Ser}$  verlagert werden, um zu untersuchen, ob diese Verschiebung um zwei Aminosäuren eine Auswirkung auf den Kernimport hat. Interessant sind auch Strukturen wie in Schema 42 gezeigt.



R = H,  $\text{PO}_3\text{H}_2$ , GlcNAc  
 FM = Fluoreszenzmarker

**Schema 42:** Noch zu synthetisierendes Dodekapeptid.

Mit ihnen wären nach der von *Kent et. al.*<sup>[115]</sup> entwickelten „native chemical ligation“ biologische Experimente mit vollständigen Proteinen möglich (Schema 43).



R: Fluchtgruppe, meist Benzyl oder Phenyl

**Schema 43:** Prinzip der "native chemical ligation".

Die Untersuchung der Transportprozesse mit vollständigen Proteinen hätte den Vorteil, daß der passive Diffusionsprozess durch den NPC ausgeschlossen werden kann.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Meßgeräte und Hilfsmittel

#### Kernresonanzspektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

250 MHz $^1\text{H}$ -NMR	Bruker AC 250
400 MHz $^1\text{H}$ - und 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ -NMR	Bruker AM 400
400 MHz $^1\text{H}$ -, 100.6 MHz $^{13}\text{C}$ - und 162.1 MHz $^{31}\text{P}$ -NMR	Varian Mercury 400
500 MHz $^1\text{H}$ -, 125.7 MHz $^{13}\text{C}$ - und 202 MHz $^{31}\text{P}$ -NMR	Bruker DRX 500
600 MHz $^1\text{H}$ -NMR	Varian Inova 600

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  beziehen sich auf Tetramethylsilan als internen Standard und sind in ppm angegeben. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben und die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

#### Massenspektrometrie

Die 70 eV Elektronenionisations- (EI) und die FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde bei den FAB-MS-Spektren *m*-Nitrobenzylalkohol benutzt.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation und einer Voyager-DE Pro BioSpectrometry<sup>TM</sup> Workstation der Firma PerSeptive Biosystems aufgenommen mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix.

Die ESI-MS-Spektren wurden mit einem Thermoquest LCQ ESI-Massenspektrometer gemessen.

#### Spezifische Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte  $[\alpha]_D^{20}$  wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 und einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 gemessen. Das verwendete Lösungsmittel und die Konzentration ist jeweils angegeben.

### Schmelzpunkte

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

### Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde mit einem Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizer durchgeführt.

### Chromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) benutzt. Zur Detektion wurde UV-Licht ( $\lambda = 254\text{nm}$ ,  $366\text{nm}$ ) und zur Anfärbung folgende Reagenzien verwendet:

- a) 2.5 g Molybdätdiphosphorsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure in 94 ml Wasser.
- b) 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure in 997 ml Ethanol.
- c) 5 g Kaliumpermanganat in 100 ml Wasser.

Die entsprechenden Laufmittel und R<sub>F</sub>-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel der Firma Baker (Korngröße 40-60  $\mu\text{m}$ ) mit einem Überdruck von 0.3-0.8 bar.

Für die präparative Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie (HPLC) wurde eine Varian Pro Star Anlage mit einem Varian Detektor Model 340 benutzt. Die verwendeten Säulen sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

Für die analytische HPLC wurde eine Hewlett Packard Serie 1100 Anlage genutzt. Die verwendeten Säulen sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

### Chemikalien

Alle benutzten L-Aminosäuren wurden von der Degussa AG gespendet. Alle übrigen Chemikalien und Harze wurden je nach Verfügbarkeit von den Firmen Acros Chimica, Aldrich, Bachem, Fluka, Riedel de Haen und Senn Chemicals bezogen.

### Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardverfahren absolutiert.<sup>[116]</sup>



## 6.2 Versuche zu Kapitel 4.1

### *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycyl-L-serinallylester **21**

Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycin **19** (1.4 g, 8.1 mmol), L-Serinallylester Hydrotosylat **20** (2.6 g, 8.1 mmol) und Triethylamin (1.1 ml, 8.1 mmol) in Dichlormethan (30 ml) wird bei 0° C tropfenweise eine Lösung von EEDQ (4 g, 16.2 mmol) in Dichlormethan (20 ml) gefügt. Nach 30 min Rühren bei 0° C wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktionsmischung jeweils dreimal mit 0.5 M HCl-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 50 ml) gewaschen. Nachdem die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:3 als Eluens gereinigt um **21** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.3 g (4.4 mmol, 54%);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.2 (*n*-Hexan/Essigester 1:3);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -5.9° (c = 0.9, Methanol);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 1.45 (s, 9H, Boc), 3.3 (s, 1H, Ser-OH), 3.85 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 4.0 (m, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.68 (m, 3H, Ser-αCH, All-OCH<sub>2</sub>), 5.3 (m, 2H, All-CH<sub>2</sub>), 5.5 (s, 1H, NH), 5.9 (m, 1H, All-CH), 7.22 (m, 1H, Urethan-NH);

<sup>13</sup>C-NMR (100.6-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 28.37 (Boc-CH<sub>3</sub>), 44.14 (Gly-CH<sub>2</sub>), 54.82 (Ser-αCH), 62.60 (Ser-CH<sub>2</sub>), 66.37 (All-OCH<sub>2</sub>), 80.48 (Boc-C<sub>q</sub>), 118.89 (All-CH<sub>2</sub>), 131.46 (All-CH), 156.45 (CO, Urethan), 170.10, 170.13 (2\*CO);

C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

HR-MS(70 eV, EI) (*m/z*): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 303.1556

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 303.1551.

### Glycyl-L-serinallylester Trifluoracetat **22**

Zur Entfernung der *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycyl-L-serinallylester **21** (1.3 g, 4.4 mmol) in einer 50%igen Mischung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan (3 ml) gelöst und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das

Lösungsmittel wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt um **22** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.38g (4.4 mmol, quant.);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.07 (Chloroform/Ethanol 10:1 + 2% Triethylamin);

$[\alpha]_D^{20}$ : -8.2° (c=1.1, Methanol);

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

δ = 3.91 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 4.13 (s, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.64 (m, 3H, Ser-αCH, All-OCH<sub>2</sub>), 5.31 (m, 2H, All-CH<sub>2</sub>), 5.89 (m, 1H, All-CH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD/TMS):

δ = 40.62 (Gly-CH<sub>2</sub>), 55.24 (Ser-αCH), 61.89 (Ser-CH<sub>2</sub>), 66.56 (All-OCH<sub>2</sub>), 118.91 (All-CH<sub>2</sub>), 131.51 (All-CH), 166.79, 170.22 (2\*CO);

C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>\*C<sub>2</sub>HO<sub>2</sub>F<sub>3</sub>

HR-MS(70 eV, EI) (*m/z*): ber.: [M]<sup>+</sup> 202.0954

gef.: [M]<sup>+</sup> 202.0968.

### ***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-prolylglycyl-L-serinallylester **18****

Zu einer Lösung von Glycyl-L-serinallylester Trifluoacetat **22** (500 mg, 1.58 mmol), *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-prolin **23** (317 mg, 1.47 mmol) und Triethylamin (0.22 ml, 1.6 mmol) in Dichlormethan (20 ml) bei 0 °C wird tropfenweise eine Lösung von EDC (350 mg, 1.8 mmol) und HOBt (400 mg, 3 mmol) in Dichlormethan (10 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei 0° C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 1M HCl-Lösung, 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 30 ml) gewaschen. Nachdem über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:4 als Eluens gereinigt um **18** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 260 mg (0.652 mmol, 44%);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.13 (*n*-Hexan/Essigester 1:6);

$[\alpha]_D^{20}$ : -45.3° (c=1.1, Methanol)

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

$\delta = 1.44$  (s, 9H, Boc), 1.87 (m, 1H, Pro- $\text{CH}_{2a}$ ), 1.98 (s, 1H, Pro- $\gamma\text{CH}_{2b}$ ), 2.09 (m, 1H, Pro- $\beta\text{CH}_{2a}$ ), 2.14 (m, 1H, Pro- $\beta\text{CH}_{2b}$ ) 3.43 (m, 1H, Pro- $\delta\text{CH}_{2a}$ ), 3.51 (m, 2H, Pro- $\delta\text{CH}_{2b}$ ), 3.91 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 12$  Hz  $^2J(\text{H,H}) = 2$  Hz, 2H, Ser- $\text{CH}_2$ ), 4.03 (m, 1H, Pro- $\alpha\text{CH}$ ), 4.20 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.58 (s, 1H, Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 4.65 (d, 2H,  $J=6$  Hz, All- $\text{OCH}_2$ ), 5.29 (m, 2H, All- $\text{CH}_2$ ), 5.89 (m, 1H, All- $\text{CH}$ ), 7.45 (s, 2H, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (125-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta = 24.61$  (Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ), 28.45 (Boc- $\text{CH}_3$ ), 29.83 (Pro- $\beta\text{CH}_2$ ), 43.18 (Pro- $\delta\text{CH}_2$ ), 47.63 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 53.26 55.01 ( $2^*\alpha\text{CH}$ ), 60.57 (Ser- $\text{CH}_2$ ), 66.23 (All- $\text{OCH}_2$ ), 80.90 (Boc- $\text{C}_q$ ), 118.68 (All- $\text{CH}_2$ ), 131.64 (All- $\text{CH}$ ), 155.58 (CO, Urethan), 169.41, 170.16, 172.01 ( $3^*\text{CO}$ );

$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$

HR-MS(70 eV, EI) ( $m/z$ ): ber.:  $[\text{M}]^+$  399.2005

gef.:  $[\text{M}]^+$  399.2019.

### **Bis-(allyloxy)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit 26**

Zu einer Lösung von Allyloxy-bis-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **24** (5 g, 17.3 mmol) und Diisopropylammoniumtetrazolid (1.34 g, 7.85 mmol) in Dichlormethan (50 ml) wird bei Raumtemperatur unter Rühren absoluter Allylalkohol (1.17 ml, 17.3 mmol) getropft. Nachdem 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird die Reaktionsmischung mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 ml) versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch drei mal mit Dichlormethan (je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **26** als gelbe Flüssigkeit zu erhalten.

Ausbeute: 3.99 g (16.26 mmol, 94%);

$R_f$ -Wert: 0.42 (Diethylether);

$^1\text{H-NMR}$  (250-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta = 1.21$  (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 12 H,  $4^*i\text{Pr-CH}_3$ ), 3.65 (m, 2H,  $2^*i\text{Pr-CH}$ ), 4.2 (m, 4 H,  $2^*\text{All-OCH}_2$ ), 5.25 (m, 4H,  $2^*\text{All-CH}_2$ ), 5.98 (m, 2H,  $2^*\text{All-CH}$ );

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[100]</sup>

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-serinallylester 17**

Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-prolyl-glycyl-*L*-serinallylester **18** (500 mg, 1.25 mmol) und Tetrazol (175 mg, 2.5 mmol) in Acetonitril (20 ml) bei 0 °C werden (460 mg, 2.5 mmol) Bis-allyloxy-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **26** (460 mg, 2.5 mmol) gegeben. Nach 2 h wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Wenn noch Edukt vorhanden ist, wird erneut Phosphoramidit zugegeben, andernfalls werden 70% *m*-Chlorperbenzoesäure (388 mg, 2.25 mmol) zugegeben. Die nach Zugabe des Phosphoramidits eingetrübte Lösung wird klar und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Diethylether gelöst. Die Lösung wird je dreimal mit 5 % Natriumhydrogensulfit-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 20 ml) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:4 als Eluens gereinigt um **17** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 467 mg (0.835, 67 %);

$R_f$ -Wert: 0.24 (*n*-Hexan/Essigester 1:10);

$[\alpha]_D^{20}$ : -34.8 (c=1.3, Methanol);

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

$\delta$  = 1.46 (s, 9H, Boc), 1.85-1.92 (m, 2H, Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ), 2.07 (m, 2H, Pro- $\beta\text{CH}_2$ ), 3.38 (m, 1H, Pro- $\delta\text{CH}_{2a}$ ), 3.49 (m, 2H, Pro- $\delta\text{CH}_{2b}$ ), 3.95-4.13 (m, 2H, Ser- $\beta\text{CH}_2$ ), 4.32 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.45 (m, 1H, Pro- $\alpha\text{CH}$ ), 4.55 (m, 4H, All- $\text{OCH}_2$ ), 4.65 (d, 2H,  $J=6$  Hz, All- $\text{OCH}_2$ ), 4.79 (s, 1H, Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 5.33 (m, 6H, All- $\text{CH}_2$ ), 5.9 (m, 3H, All- $\text{CH}$ ); 7.32 (m, 2H, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta$  = 24.47 (Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ), 28.39 (Boc- $\text{CH}_3$ ), 29.82 (Pro- $\beta\text{CH}_2$ ), 43.03 (Pro- $\delta\text{CH}_2$ ), 46.47 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 52.91, 53.03 (2\* $\alpha\text{CH}$ ), 59.54 (Ser- $\text{CH}_2$ ), 66.87, 66.99, 68.83 (3\*All- $\text{OCH}_2$ ), 80.45 (Boc- $\text{C}_q$ ), 118.91, 119.06, 119.21 (3\*All- $\text{CH}_2$ ), 131.31, 132.01, 132.09 (3\*All- $\text{CH}$ ), 156.66 (CO, Urethan), 168.47, 169.42, 169.60 (3\*CO);

$^{31}\text{P-NMR}$  (202-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta$  = -0.58 (1P);

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$

HR-MS(70 eV, EI) ( $m/z$ ): ber.:  $[\text{M}]^+$  559.2295

gef.:  $[\text{M}]^+$  559.2339.

**L-Prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester Trifluoracetat 27**

Zur Entfernung der *N-tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe werden *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-prolylglycyl-(*O*)-diallylphosphato-L-serinallylester **17** (467 mg, 0.8 mmol) in einer 50%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan (6 ml) 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt um **27** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 479 mg (0.8 mmol, quant.);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.10 (Chloroform/Methanol 10:1 + 2 % Triethylamin);

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -11° (c = 1, Methanol);

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

$\delta$  = 1.95-2.03 (m, 3H, Pro- $\beta$ CH<sub>2a</sub>, Pro- $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 2.34-2.38 (m, 1H, Pro- $\beta$ CH<sub>2b</sub>), 3.35 (m, 2H, Pro- $\delta$ CH<sub>2</sub>), 3.85 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 16.6 Hz, <sup>2</sup>*J*(H,H) = 4.7 Hz, 2H, Ser-CH<sub>2a</sub>), 4.06 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 16.6 Hz, <sup>2</sup>*J*(H,H) = 5.2 Hz, 2H, Ser-CH<sub>2b</sub>), 4.28 (m, 1H, Gly-CH<sub>2a</sub>), 4.35 (m, 1H, Gly-CH<sub>2b</sub>), 4.42-4.47 (m, 4H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.53 (m, 1H, Pro- $\alpha$ CH), 4.57 (m, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.74 (m, 1H, Ser- $\alpha$ CH), 5.16-5.30 (m, 6H, All-CH<sub>2</sub>), 5.78-5.88 (m, 3H, All-CH), 7.91 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  = 28.39 (Pro- $\beta$ CH<sub>2</sub>), 42.82 (Pro- $\delta$ CH<sub>2</sub>), 47.24 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.76, 52.86 (2\* $\alpha$ CH), 60.21 (Ser-CH<sub>2</sub>), 66.44, 68.49, 68.57 (3\*All-OCH<sub>2</sub>), 80.39 (Boc-C<sub>q</sub>), 118.51, 118.90, 119.05 (3\*All-CH<sub>2</sub>), 131.26, 132.13 (3\*All-CH), 168.21, 169.36, 172.84 (3\*CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  = -1.08 (1P);

C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P\*C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F<sub>3</sub>

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 459.43

gef.: 459.7 [M<sup>+</sup>], 481.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 497.7 [M+K]<sup>+</sup>.

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester 30**

Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-serin **29** (160 mg, 0.78 mmol), L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester Trifluoracetat **27** (372 mg, 0.65 mmol) und Triethylamin (90  $\mu$ l, 0.65 mmol) in Dichlormethan (10 ml) bei 0°C wird tropfenweise

eine Lösung von EDC (174 mg, 0.91 mmol) und HOBt (175 mg, 1.3 mmol) in Dichlormethan (5 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 0°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem mit 1M HCl-Lösung, 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 10 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet wurde, wird nach Entfernen des Lösungsmittel unter vermindertem Druck das anfallende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:10 als Eluens gereinigt um **30** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 250 mg (0.387 mmol, 78%);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.04 (*n*-Hexan/Essigester 1:10);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -36° (c=0.9, Methanol);

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

δ = 1.42 (s, 9H, Boc), 1.82-2.19 (m, 4H, Pro-βCH<sub>2</sub>, Pro-γCH<sub>2</sub>), 3.6-3.7 (m, 2H, Pro-δCH<sub>2</sub>), 3.7-3.8 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 3.85-4.04 (m, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.2-4.32 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 4.39-4.49 (m, 4H, 2\*All-OCH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, Pro-αCH), 4.52-4.54 (m, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.65-4.8 (m, 2H, 2\*Ser-αCH), 5.12-5.3 (m, 6H, All-CH<sub>2</sub>), 5.75-5.9 (m, 3H, All-CH), 5.93 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 7.58 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 7.64 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 24.79 (Pro-γCH<sub>2</sub>), 28.19 (Boc-CH<sub>3</sub>), 28.69 (Pro-βCH<sub>2</sub>), 42.49 (Pro-δCH<sub>2</sub>), 47.53 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.65, 53.62 (2\*Ser-αCH), 60.61 (Pro-αCH), 66.28, 66.73 (Ser-CH<sub>2</sub>), 68.32, 68.53, 68.57 (3\*All-OCH<sub>2</sub>), 79.49 (Boc-C<sub>q</sub>), 118.40, 118.62, 118.67 (3\*All-CH<sub>2</sub>), 131.20, 131.85, 131.95 (3\*All-CH), 155.44 (CO, Urethan), 167.97, 169.68, 171.29, 171.65 (4\*CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = -0.77 (1P);

C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>P

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 646.62

gef.: 670.49 [M+Na]<sup>+</sup>, 686.35 [M+K]<sup>+</sup>.

### ***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-(diallylphosphato)-*L*-seryl-*L*-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-serinallylester **31****

Zu einer Lösung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-glycyl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-serinallylester **30** (157 mg, 0.24 mmol) und Tetrazol (175 mg, 2.5 mmol) in Acetonitril (20 ml) wird bei 0°C Bis-allyloxy-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **26** (400 mg, 1.44 mmol)

gegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Wenn immer noch Edukt vorhanden ist, wird erneut Phosphorylierungsreagenz, anderenfalls *m*-Chlorbenzoesäure (500 mg, 2.25 mmol) zugegeben. Die nach Zugabe des Phosphoramidites eingetrübte Lösung wird klar und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand in Diethylether gelöst und je dreimal mit 5 % Natriumhydrogensulfit-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 15 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:4 - 1:10 als Eluens gereinigt um **31** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 152 mg (0.189 mmol, 77%);

R<sub>F</sub>-Wert: 0.03 (*n*-Hexan/Essigester 1:10);

$[\alpha]_D^{20}$ : -10° (c=1, Methanol);

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

δ = 1.43 (s, 9H, Boc), 1.98-2.22 (m, 4H, Pro-βCH<sub>2</sub>, Pro-γCH<sub>2</sub>), 3.75-3.79 (m, 2H, Pro-δCH<sub>2</sub>), 3.89-3.93 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 17 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2a</sub>), 4.00-4.02 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 17 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2b</sub>), 4.26-4.31 (m, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.46-4.5 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>), 4.51 (s, 1H, Pro-αCH), 4.52-4.56 (m, 8H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.66 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 5 Hz, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.79 (m, 2H, 2\*Ser-αCH), 5.24-5.38 (m, 10H, All-CH<sub>2</sub>), 5.87-5.96 (m, 5H, All-CH), 6.07 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, NH), 7.52 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 7.59 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 24.97 (Pro-γCH<sub>2</sub>), 28.33 (Boc-CH<sub>3</sub>), 29.03 (Pro-βCH<sub>2</sub>), 43.06 (Pro-δCH<sub>2</sub>), 47.86 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.11, 52.85 (2\*Ser-αCH), 61.5 (Pro-αCH), 66.41, 66.78 (2\*Ser-CH<sub>2</sub>), 68.43, 68.48, 68.56, 68.61, 68.77 (5\*All-OCH<sub>2</sub>), 80.15 (Boc-C<sub>q</sub>), 118.59, 118.80, 118.85 (5\*All-CH<sub>2</sub>), 131.44, 132.05, 132.11, 132.20, 132.32 (5\*All-CH), 155.32 (CO, Urethan), 168.39, 169.68, 169.77, 171.51 (4\*CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = -0.24 (1P), -0.87 (1P);

C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub>

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 806.73

gef.: 831.65 [M+Na]<sup>+</sup>, 847.88 [M+K]<sup>+</sup>.

***O*-(Diallylphosphato)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester-Trifluoracetat **32****

Zur Entfernung der *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurden *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-(diallylphosphato)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester **31** (100 mg, 0.136 mmol) in einer 50%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan (5 ml) 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt um **32** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 112 mg (0.136 mmol, quant.);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.1 (Chloroform/Ethanol 10:1 + 2% Triethylamin);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -7° (c=1, Methanol);

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

δ = 1.97-2.05 (m, 3H, Pro-βCH<sub>2a</sub>, Pro-γCH<sub>2</sub>), 2.06-2.09 (m, 1H, Pro-βCH<sub>2b</sub>), 3.62 (m, 1H, Pro-δCH<sub>2a</sub>), 3.77 (m, 1H, Pro-δCH<sub>2b</sub>), 3.85 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 17 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 5 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2a</sub>), 4.07 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 16.6 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 5.2 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2b</sub>), 4.29-4.32 (m, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>), 4.43-4.57 (m, 11H, 4\*All-OCH<sub>2</sub>, Ser-CH<sub>2</sub>, Pro-αCH), 4.64-4.68 (m, 3H, All-OCH<sub>2</sub>, Ser-αCH), 4.83 (m, 1H, Ser-αCH), 5.24-5.38 (m, 10H, All-CH<sub>2</sub>), 5.86-5.94 (m, 5H, All-CH), 7.56 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 8.21 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 25.12 (Pro-γCH<sub>2</sub>), 29.29 (Pro-βCH<sub>2</sub>), 42.77 (Pro-δCH<sub>2</sub>), 47.94 (Gly-CH<sub>2</sub>), 52.80, 52.85 (2\*Ser-αCH), 61.76 (Pro-αCH), 66.64, 68.74, 68.79, 68.83, 68.87, 69.13, 69.17 (5\*All-OCH<sub>2</sub>, 2\* Ser-CH<sub>2</sub>), 118.81, 118.83, 119.01, 119.03, 119.08 (5\*All-CH<sub>2</sub>), 131.26, 131.84, 131.89, 131.96, 132.02 (5\*All-CH), 165.21, 168.58, 170.05, 171.98 (4\*CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = -0.72 (1P), -1.55 (1P);

C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>P<sub>2</sub>

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 706.62

gef.: 708.58 [M+H]<sup>+</sup>, 730.53 [M+Na]<sup>+</sup>, 746.58 [M+K]<sup>+</sup>.



***N*-(Allyloxycarbonyl)-L-seryl-*O*-(diallylphosphato)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester **34****

Zu einer Lösung von *N*-(Allyloxycarbonyl)-L-serin **33** (42 mg, 0.22 mmol), *O*-(diallylphosphato)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-L-serinallylester **32** (159 mg, 0.186 mmol) und Triethylamin (28  $\mu$ l, 0.186 mmol) in Dichlormethan (10 ml) wird tropfenweise bei 0°C eine Lösung von EDC (42 mg, 0.22 mmol) und HOBt (45 mg, 0.3 mmol) in Dichlormethan (5 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wird mit 1M HCl-Lösung, 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 15 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das anfallende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:10 als Eluens gereinigt um **34** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 91 mg (104  $\mu$ mol, 56%);

R<sub>F</sub>-Wert: 0.13 (Essigester/Ethanol 10:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -37° (c=1, Methanol);

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

$\delta$  = 1.99-2.09 (m, 3H, Pro- $\beta$ CH<sub>2a</sub>, Pro- $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 2.11 (m, 1H, Pro- $\beta$ CH<sub>2b</sub>), 3.67 (m, 2H, Pro- $\delta$ CH<sub>2a</sub>), 3.75 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>, Pro- $\delta$ CH<sub>2b</sub>), 3.98 (m, 1H, Ser-CH<sub>2a</sub>), 4.17 (m, 1H, Ser-CH<sub>2b</sub>), 4.32-4.35 (m, 4H, Gly-CH<sub>2</sub>, Ser-CH<sub>2</sub>), 4.44 (m, 1H, Pro- $\alpha$ CH), 4.47-4.57 (m, 10H, 5\*All-OCH<sub>2</sub>), 4.66 (m, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 4.80 (m, 1H, Ser- $\alpha$ CH), 5.01 (m, 1H, Ser- $\alpha$ CH), 5.18-5.39 (m, 12H, All-CH<sub>2</sub>), 5.85-5.95 (m, 6H, All-CH), 6.32 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 7.54-7.59 (m, 2H, 2\*NH), 8.01 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  = 25.24 (Pro- $\gamma$ CH<sub>2</sub>), 29.17 (Pro- $\beta$ CH<sub>2</sub>), 42.83 (Pro- $\delta$ CH<sub>2</sub>), 48.10 (Gly-CH<sub>2</sub>), 51.95, 52.63, 56.60 (3\*Ser- $\alpha$ CH), 62.19 (Pro- $\alpha$ CH), 63.38 (Ser-CH<sub>2</sub>), 65.76, 65.89, 66.42, 66.60, 66.84, 68.71, 68.92, 68.97 (2\*Ser-CH<sub>2</sub>, 6\*All-OCH<sub>2</sub>), 117.86, 118.60, 118.89, 118.97, 119.14, 119.22 (6\*All-CH<sub>2</sub>), 131.47, 131.85, 131.90, 131.96, 132.05, 132.66(6\*All-CH), 156.04 (CO, Urethan), 168.38, 168.94, 169.85, 171.03 (5\*CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

$\delta$  = -1.55 (1P), 0.20 (1P)

C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>17</sub>P<sub>2</sub>

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 877.77

gef.: 879.15 [M+H]<sup>+</sup>, 901.35 [M+Na]<sup>+</sup>, 918.53 [M+K]<sup>+</sup>

***N*-(Allyloxycarbonyl)-*O*-(diallylphosphato)-*L*-seryl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-seryl-*L*-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-serinallylester **14****

Zu einer Lösung von *N*-(Allyloxycarbonyl)-*L*-seryl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-seryl-*L*-prolylglycyl-*O*-(diallylphosphato)-*L*-serinallylester **34** (87 mg, 0.1 mmol) und Tetrazol (73 mg, 1 mmol) in Acetonitril (5 ml) wird bei 0°C Bis-allyloxy-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **26** (170 mg, 0.693 mmol) gegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Wenn immer noch Edukt vorhanden ist, wird erneut Phosphorylierungsreagenz, anderenfalls 70% *m*-Chlorperbenzoesäure (210 mg, 1.21 mmol) zugegeben. Die nach Zugabe des Phosphoramidites eingetrübte Lösung wird klar und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand in Chloroform gelöst und je dreimal mit 5 % Natriumhydrogensulfit-Lösung, ges. Natriumcarbonat-Lösung und Wasser (je 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigester als Eluens gereinigt um **14** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 68 mg (0.066 mmol, 66%);

$R_f$ -Wert: 0.18 (Essigester/Ethanol 10:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -21° (c=1, Methanol);

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

$\delta$  = 2.01-2.14 (m, 3H, Pro- $\beta\text{CH}_{2a}$ , Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ), 2.26-2.29 (m, 1H, Pro- $\beta\text{CH}_{2b}$ ), 3.71-3.8 (m, 3H, Pro- $\delta\text{CH}_2$ , Ser- $\text{CH}_{2a}$ ), 4.23-4.3 (m, 5H, Ser- $\text{CH}_{2b}$ , Ser- $\text{CH}_2$ , Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.41-4.44 (m, 2H, Ser- $\text{CH}_2$ ), 4.47-4.64 (m, 16H, 7\*All-O- $\text{CH}_2$ , Pro- $\alpha\text{CH}$ , Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 4.65 (m, 2H, All-O $\text{CH}_2$ ), 4.77 (m, 1H, Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 5.09 (m, 1H, Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 5.19-5.40 (m, 16H, All- $\text{CH}_2$ ), 5.86-5.96 (m, 8H, Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 6.56 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9$  Hz, 1H, NH), 7.54 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 1H, NH), 7.59 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 8$  Hz, 1H, NH), 8.28 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 8$  Hz, 1H, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (125-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta$  = 25.07 (Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ), 29.37 (Pro- $\beta\text{CH}_2$ ), 42.84 (Pro- $\delta\text{CH}_2$ ), 48.21 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 51.13, 52.93, 55.03 (3\*Ser- $\alpha\text{CH}$ ), 62.25 (Pro- $\alpha\text{CH}$ ), 65.96, 66.19, 66.28, 66.83, 67.64, 67.68, 68.35, 68.39, 68.58, 68.62, 68.90 (3\*Ser- $\beta\text{CH}_2$ , 8\*All-O $\text{CH}_2$ ), 117.93, 118.43, 118.45, 118.49, 118.77, 118.80, 119.13, 119.21 (8\*All- $\text{CH}_2$ ), 131.48, 131.85, 131.90, 132.16, 132.22, 132.33, 132.38, 132.59, (8\*All- $\text{CH}$ ) 155.91 (CO, Urethan), 168.26, 168.74, 168.92, 170.17, 170.89 (5\*CO);

$^{31}\text{P}$ -NMR (202-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta = -0.04$  (1P),  $-0.36$  (1P),  $-2.05$  (1P)

$\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_{20}\text{P}_3$

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 1037.87

gef.: 1039.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1062.16  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1077.73  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

### ***O*-(Phosphato)-L-seryl-*O*-(phosphato)-L-seryl-L-prolylglycyl-*O*-(phosphato)-L-serin 13**

In einer sauerstofffreien Mischung aus 45% DMSO, 45% DMF und 10% Wasser (10 ml) werden *N*-Allyloxycarbonyl-(*O*)-diallylphosphato-L-seryl-(*O*)-diallylphosphato-L-seryl-L-prolyl-glycyl-(*O*)-diallylphosphato-L-serinylester 14 (7 mg, 6.8  $\mu\text{mol}$ ) gelöst. Unter Argon werden gleichzeitig *n*-Butylamin (5.1 mg, 70  $\mu\text{mol}$ ) und Ameisensäure (4.6 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Nachdem im Argongegenstrom  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (5 mg) zugefügt wurde, rührt die Reaktionsmischung unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur über Nacht. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser gelöst und durch Filtrieren über eine SepPac<sup>®</sup>-C18-Kartusche mit Wasser zu Wasser/Acetonitril 1:1 gereinigt um nach Gefriertrocknung 13 als farbloses Pulver zu erhalten.

Ausbeute: 2.9 mg (4  $\mu\text{mol}$ , 63%);

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-18^\circ$  (c = 0.1, Wasser);

$^1\text{H}$ -NMR (500-MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta = 2.01$ - $2.14$  (m, 3H, Pro- $\beta\text{CH}_{2a}$ , Pro- $\gamma\text{CH}_2$ ),  $2.34$ - $2.40$  (m, 1H, Pro- $\beta\text{CH}_{2b}$ ),  $3.83$ - $3.88$  (m, 2H, Pro- $\delta\text{CH}_2$ ),  $4.07$ - $4.25$  (m, 7H, 2\*Ser- $\text{CH}_2$ , Ser- $\alpha\text{CH}_{2a}$ ),  $4.30$ - $4.34$  (m, 1H, Ser- $\text{CH}_{2b}$ ),  $4.41$ - $4.51$  (m, 3H, Pro- $\alpha\text{CH}$ , 2\*Ser- $\alpha\text{CH}$ ),  $5.08$  (m, 1H, Ser- $\alpha\text{CH}$ );

$^{31}\text{P}$ -NMR (202-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):

$\delta = 0.41$  (1P),  $0.72$  (1P),  $0.84$  (1P);

Electrospray Mass (Wasser/Methanol/Essigsäure):

$[\text{M}+\text{H}^+]$ : ber.: 674.1                      gef.: 674.2

$[\text{M}+\text{Na}^+]$  ber.: 696.1                      gef.: 696.2

$[\text{M}+\text{K}^+]$  ber.: 712.1                      gef.: 712.1.

## 6.3 Versuche zu Kapitel 4.2

### 6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.2

#### Allyloxy-*tert*-butyloxy-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit **41**

Zu einer Lösung von *tert*-Butyloxy-bis-(*N,N*-diisopropyl)-phosphoramidit **40** (3.04 g, 10 mmol) und Diisopropylammoniumtetrazolid (0.856 g, 5 mmol) in Dichlormethan (50 ml) wird bei Raumtemperatur unter Rühren absoluter Allylalkohol **25** (0.68 ml, 10 mmol) getropft. Nachdem 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird die Reaktionsmischung mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 ml) versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch drei mal mit Dichlormethan (je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **40** als farblose Flüssigkeit zu erhalten.

Ausbeute: 2.45 g (9.38 mmol, 94%);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.38 (Diethylether);

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

δ = 1.17 (m, 12 H, 4\**i*Pr-CH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 9H, *t*Bu), 3.62 (m, 2H, 2\**i*Pr-CH), 4.04 (m, 1H, All-OCH<sub>2a</sub>), 4.12 (m, 1H, All-OCH<sub>2b</sub>), 5.1 (m, 1H, All-CH<sub>2a</sub>), 5.28 (m, 1H, All-CH<sub>2b</sub>) 5.95 (m, 2H, All-CH);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 24.20, 24.27, 24.55 24.60 (4\**i*Pr-CH<sub>3</sub>), 30.86 (3\**t*Bu-CH<sub>3</sub>) 42.97, 42.07 (2\**i*Pr-CH), 63.74 (All-OCH<sub>2</sub>), 74.90 (*t*Bu-C<sub>q</sub>), 114.99 (All-CH<sub>2</sub>), 136.22 (All-CH);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 137.73 (1P);

C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>P.

#### *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinallylester **44**

Zu einer Lösung von L-Serinallylester Hydrotosylat **43** (9.5 g, 30 mmol) in 10%iger Natriumcarbonatlösung (85 ml) und Dioxan (60 ml) wird bei 0° C eine Lösung von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (7.74 g, 30 mmol) in Dioxan (60 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf Wasser (500 ml) gegossen und drei mal mit Essigester (je 200 ml) extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 2:1 als Eluens gereinigt um **44** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 10.35 g (28.2 mmol, 94%);

R<sub>f</sub>: 0.19 (Cyclohexan/Essigester 2:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 6° (c=0.5, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 3.88 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 17 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2a</sub>), 4.00 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 17 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 6 Hz, 1H, Ser-CH<sub>2b</sub>), 4.23 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.40 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ser-αCH), 4.66 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 5.3 (m, 2H, All-CH<sub>2</sub>), 5.9 (m, 1H, All-CH), 6.25 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, Urethan), 7.28-7.42 (m, 4H, Fmoc), 7.57 (m, 2H, Fmoc), 7.74 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>.

#### ***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-(allyl-*tert*-butylphosphato)-*L*-serinallylester **45****

Zu einer Lösung von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-serinallylester **44** (78 mg, 0.23 mmol) und Tetrazol (150 mg, 0.575 mmol) in Acetonitril (10 ml) wird bei 0°C Allyloxy-*tert*-butyloxy-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **41** (32 mg, 0.46 mmol) gegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Wenn immer noch Edukt vorhanden ist, wird erneut Phosphorylierungsreagenz, anderenfalls 70% *m*-Chlorperbenzoesäure (142 mg, 0.575 mmol) zugegeben. Die nach Zugabe des Phosphoramidites eingetrübte Lösung wird klar und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wird der Rückstand in Chloroform gelöst und je dreimal mit 5 % Natriumhydrogensulfit-Lösung, ges. Natriumcarbonat-Lösung und Wasser (je 5 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Essigester als Eluens gereinigt um **45** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 70 mg (0.129 mmol, 56%);

R<sub>f</sub>-Wert: 0.18 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -3.7° (c=1, Chloroform);

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

δ = 1.50 (s, 9H, *t*Bu), 4.25 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.35 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>) 4.42-4.56 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, All-OCH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 1H, Ser-αCH), 4.71 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, All-OCH<sub>2</sub>), 5.3 (m, 4H, All-CH<sub>2</sub>), 5.9 (m, 2H, All-CH), 7.28-7.42 (m, 4H, Fmoc), 7.62 (m, 2H, Fmoc), 7.77 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

<sup>13</sup>C-NMR (125-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 29.8 (3\**t*Bu-CH<sub>3</sub>), 47.06 (Fmoc-CH), 54.58 (Ser-αCH), 66.54, 67.37, 67.40, 68.05 (2\*All-OCH<sub>2</sub>, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ser-CH<sub>2</sub>), 84.18 (*t*Bu-C<sub>q</sub>), 118.21, 119.05 (2\*All-CH<sub>2</sub>), 119.98, 125.14, 127.10, 127.74, 131.30 (8\*Fmoc-CH), 132.50 (All-CH) 141.28, 142.30, 143.71, 143.85 (4\*Fmoc-C<sub>q</sub>), 155.95 (CO, Urethan), 168.83 (CO);

<sup>31</sup>P-NMR (202-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = -4.80 (1P);

C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>8</sub>P.

### 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl -2-deoxy-β-D-glucopyranose **8a**

Zu einer Lösung von Zinkchlorid (36 g, 256 mmol) in 250 ml Essigsäureanhydrid wird 2-Amino-2-desoxy-D-glucopyranose Hydrochlorid **47** (30 g, 139 mmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 Minuten auf 80° C erhitzt und danach auf 400 ml Eiswasser gegeben. Die Lösung wird langsam durch Zugabe von Natriumcarbonat neutralisiert und über Nacht bei 0° C stehen gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert, gewaschen, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert um **8a** als farblosen kristallinen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 20.5 g (52.7 mmol, 38%);

Schmelzp.: 189° C;

R<sub>f</sub>: 0.3 (*n*-Hexan/Essigester 2:1);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 4° (c = 1, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/d-MeOD/TMS):

δ = 1.71 (s, 3H, NAc), 1.88, 1.89 2.01, 2.03, (4\*s, 4\*3H, 4\*OAc), 3.65 (m, 1H, H-5), 3.9-4.1 (m, 2H, H-2, H-6a), 4.13 (dd, <sup>3</sup>*J*(H,H)= 11 Hz, <sup>2</sup>*J*(H,H)= 3 Hz, 1H, H-6b), 4.98 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H)= 9 Hz, 1H, H-4), 5.13 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H)= 9 Hz, 1H, H-3), 5.54 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H)= 9 Hz, 1H, H-1);

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[110,117]</sup>

**2-Deoxy-2-(*p*-methoxybenzylidenamino)-D-glucopyranose 48**

Zu einer Lösung von 2-Amino-2-desoxy-D-glucopyranose Hydrochlorid **47** (30 g, 139 mmol) in 141 ml 1 N NaOH-Lösung wird Anisaldehyd (17.15 ml, 141 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Danach wird die inzwischen breiige Lösung auf 0° C abgekühlt und danach abgelfiltriert, mit eiskaltem Wasser und einem ebenfalls kalten Ethanol/Ether 1:1 Gemisch gewaschen und getrocknet um **48** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 34.8 g (117 mmol, 84%);

Schmelzpt.: 160° C;

R<sub>f</sub>: 0.08 (Cyclohexan/Essigester 1:1);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/d-DMSO/TMS):

δ = 2.53 (m, 1H, H-2), 2.82 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, H-5), 3.32 (m, 1H H-6a), 3.56-3.64 (m, 2H, H-4, H-6b), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, H-3) 4.80 (m, 1H, H-1), 6.92 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 2H, Ar), 7.62 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 2H, Ar), 8.16 (s, 1H, N=CH);

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[118]</sup>

**1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-N-(*p*-methoxybenzylidenamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranose 49**

Zu einer Lösung von 2-N-(*p*-Methoxybenzylidenamino)-2-deoxy-D-glucopyranose **48** (34.8 g, 117 mmol) in trockenem Pyridin (243 ml) wird unter Eiskühlung Essigsäureanhydrid (130 ml) getropft. Nachdem die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird auf Eiswasser (500 ml) gegossen. Die Reaktionsmischung wird 3 h auf 0° C abgekühlt und der entstandene farblose Niederschlag abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert um **49** als farblosen Feststoff zu ergeben.

Ausbeute: 38 g (81.6 mmol, 70%);

Schmelzpt.: 185° C;

R<sub>f</sub>: 0.24 (Cyclohexan/Essigester 2:1);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: 97° (c = 1, Chloroform);

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

δ = 1.88, 2.01, 2.03, 2.10 (4\*s, 4\*3H, 4\*OAc), 3.44 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, H-2), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (m, 1H, H-5), 4.12 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 11 Hz, 1H, H-6a), 4.37 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 11 Hz,

$^2J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$ , 1H, H-6b), 5.13 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-4), 5.43 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-3), 5.94 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-1), 6.92 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 2H, Ar), 7.66 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 2H, Ar), 8.16 (s, 1H, N=CH);

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[118]</sup>

### 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose Hydrochlorid 50

Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-*N*-(*p*-methoxybenzylidenamino)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose 49 (38 g, 81.6 mmol) in Aceton (220 ml) wird 10 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 6 N HCl-Lösung (13.5 ml) entsteht sofort ein farbloser Niederschlag. Nach Abkühlen der Lösung wird Diethylether (250 ml) zugegeben, 3 h bei 0° C stehen gelassen, der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Ether gewaschen, um 50 als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 27.9 g (72.7 mmol, 89%);

Schmelzpt.: >250° C, Verfärbung bei 230° C

$R_f$ : 0.07 (Cyclohexan/Essigester 1:1 + 2% Triethylamin);

$[\alpha]_D^{20}$ : 49° (c=1, Wasser);

$^1\text{H-NMR}$  (250-MHz, d-DMSO/TMS):

$\delta = 1.88$ , 2.01, 2.03, 2.10 (4\*s, 4\*3H, 4\*OAc), 3.44 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-2), 3.96 (m, 1H, H-5), 4.12 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 11 \text{ Hz}$ , 1H, H-6a), 4.37 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 11 \text{ Hz}$ ,  $^2J(\text{H,H}) = 3 \text{ Hz}$ , 1H, H-6b), 5.13 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-4), 5.43 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-3), 5.94 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9 \text{ Hz}$ , 1H, H-1);

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9 \cdot \text{HCl}$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[118]</sup>

### 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranose 52

Zu einer Lösung von 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose Hydrochlorid 50 (27.9 g, 72.7 mmol) und Natriumhydrogencarbonat (12.2 g, 154.4 mmol) in



Wasser (570 ml) wird 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylchlorid **51** (16.6 g, 78.3 mmol) in Chloroform (380 ml) gegeben und 3 Stunden gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit Chloroform (je 250 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 0.5 M HCl-Lösung (je 200 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in möglichst wenig Ethanol aufgenommen und durch Zugabe von kaltem Wasser ausgefällt. Das Rohprodukt wird in Essigester gelöst und **52** als farbloser Feststoff durch Zugabe von *n*-Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 31.2 g (59.6 mmol, 82%);

Schmelzp.: 124° C;

R<sub>f</sub>: 0.21 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 14.4° (c=1, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 2.01, 2.05, 2.17 (3 s, 12H, 4 \* OAc), 4.0-4.15 (m, 2H, H-5, H-6a); 4.22 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 3 Hz, 1H, H-2), 4.31 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 4 Hz, 1H, H-6b), 4.63 (d, <sup>2</sup>J(H,H) = 12 Hz, 1H, Teoc-CH<sub>2a</sub>), 4.85 (d, <sup>2</sup>J(H,H) = 12 Hz, 1H, Teoc-CH<sub>2b</sub>), 5.1-5.33 (m, 3H, H-3, H-4, NH), 6.23 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 1H, H-1);

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[119]</sup>

### ***O*-[3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosyl]-trichloracetimidat **8b****

Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranose **82** (3 g, 5.7 mmol) und Hydrazinacetat (0.57 g, 6.3 mmol) in absolutem DMF (24 ml) wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit Essigester (150 ml) verdünnt und mit Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und wieder mit Wasser (je 50 ml) gewaschen. Nachdem über Natriumsulfat getrocknet wurde, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in absolutem Dichlormethan (30 ml) gelöst. Zur Lösung werden Trichloracetonitril **53** (3 ml, 30 mmol) und DBU (0.45 ml, 3 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das

Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:1 + 0.1 % Triethylamin als Eluens gereinigt um **8b** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 2 g (3.2 mmol, 56%);

R<sub>f</sub>: 0.17 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 68° (c=0.8, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 2.03, 2.06 (2 s, 9H, 3 \* OAc), 4.14 (m, 2H, H-5, H-6a); 4.25 (m, 2H, H-2, H-6b), 4.73 (s, 2H, Teoc-CH<sub>2</sub>), 5.18-5.39 (m, 3H, H-3, H-4, NH), 6.42 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 5 Hz, 1H, H-1), 8.81 (s, 1H, NH);

C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>10</sub>Cl<sub>6</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[120]</sup>

### **Ethyl-3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-1-thio-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid 8c**

Zu einer Lösung von 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranose **52** (13.1 g, 25 mmol) in absolutem Dichlormethan (55 ml) wird 4 Angström Molsieb (2.2 g) gegeben und die Mischung 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem Ethylmercaptan **54** (5.13 ml, 70 mmol) zugegeben wurde, wird die Reaktionsmischung auf -10° C abgekühlt und Bortrifluorid Etherat (10.5 ml, 84.5 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 Minuten bei -10° C gerührt und anschließend 90 min bei Raumtemperatur. Es wird über Celite filtriert und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (200 ml) neutralisiert. Nachdem die Phasen getrennt wurden, wird die wäßrige Phase mit Dichlormethan (100 ml) nochmals extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (100 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Essigester gelöst. Durch Zugabe von kaltem Cyclohexan wird **8c** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11.4 g (21.7 mmol, 87%);

Schmelzp.: 139° C;

R<sub>f</sub>: 0.23 (Cyclohexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -15° (c=1, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 1.28 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.03, 2.08 (2 s, 9H, 3 \* OAc), 2.73 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>), 3.70 (m, 1H, H-5), 3.79 (m, 1H, H-2), 4.13 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 11 Hz, 1H, H-6a); 4.25 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 5 Hz, 1H, H-6b), 4.68 (m, 2H, H-1, Teoc-CH<sub>2</sub>a), 4.73 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, 1H, Teoc-CH<sub>2</sub>b), 5.11 (m, 2H, H-4, NH), 5.23 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, H-3);

C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>9</sub>SCl<sub>3</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[119]</sup>

### **N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinbenzylester 58**

Zu einer Lösung von L-Serinbenzylester Hydrotosylat **57** (7.35 g, 20 mmol) in 10%iger Natriumcarbonatlösung (50 ml) und Dioxan (40 ml) wird bei 0° C eine Lösung von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (5.18 g, 20 mmol) in Dioxan (40 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf Wasser (500 ml) gegossen und drei mal mit Essigester (je 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 2:1 als Eluens gereinigt um **58** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 7.18 g (17.2 mmol, 86%);

R<sub>f</sub>: 0.21 (Cyclohexan/Essigester 2:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 1.5° (c=1.2, Essigester);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 2.35 (s, 1H, OH), 3.91 (m, 1H, Ser-CH<sub>2</sub>a), 4.00 (m, 1H, Ser-CH<sub>2</sub>b), 4.20 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.40 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, Ser-αCH), 5.2 (m, 2H, Bzl-CH<sub>2</sub>), 5.7 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz), 1H, Urethan), 7.24-7.40 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.57 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc), 7.74 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[121]</sup>

**Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat 61**

Zu einer Lösung von Dimethyldisulfid **59** (2.4 g, 25 mmol) in trockenem Dichlormethan (50 ml) wird eine Lösung von Methyltriflat **60** (4.1 g, 25 mmol) in trockenem Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von trockenem Ether (150 ml) wird das erwünschte Produkt ausgefällt, welches unter Argon abgetrennt und mit trockenem Ether gewaschen wird, um **61** als braunen Feststoff zu erhalten, welcher sowohl Luft- als auch Wasser-empfindlich ist, jedoch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  unter Argon mehrere Wochen gelagert werden kann.

Ausbeute: 5.04 g (19.5 mmol, 78%);

Schmelzpt.:  $34^{\circ}\text{C}$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (250-MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 2.81$  (s, 3H);  $3.21$  (s, 6H);

$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_3\text{S}_3\text{F}_3$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[112]</sup>

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-serin 56**

Zu einer Lösung von 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose **8a** (0.48 g, 1.232 mmol) in trockenem Dichlormethan (10 ml) wird Molsieb ( $4\text{\AA}$ , 1 g) gegeben. Zu dieser Suspension wird bei  $0^{\circ}\text{C}$  frisch destilliertes Bortrifluorid Etherat (0.4 ml, 3.82 mmol) getropft. Nach dem Rühren des Reaktionsgemisches über Nacht bei Raumtemperatur wird die Oxazolinbildung mittel Dünnschichtchromatographie (Chloroform/Methanol 10 : 1) überprüft. Bei vollständigem Umsatz wird bei  $0^{\circ}\text{C}$  Triethylamin (0.16 ml, 1.148 mmol) zugetropft. Nach 10 Minuten Rühren wird eine Lösung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serin **55** (416 mg, 1.27 mmol) in einer Mischung aus Dichlormethan/Acetonitril 2 : 1 zugegeben. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird bei  $0^{\circ}\text{C}$  nochmals die gleiche Menge Oxazolin, welches wie oben beschrieben dargestellt wurde, zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 150 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und mit Triethylamin neutralisiert. Die Lösung wird mit Dichlormethan (50 ml) verdünnt und über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt

und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 30 : 1 – 10 : 1 als Eluens gereinigt um verunreinigtes **56** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 0.179 g (0.255 mmol, 20%);

R<sub>f</sub>: 0.13 (Chloroform/Methanol 10:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 1.6° (c=1, Methanol);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 1.89 (s, 3H, NAc), 2.02, 2.04, 2.07 (3\*s, 9H, 3\*OAc), 3.66-3.81 (m, 3H, H-2, H-5, Ser-CH<sub>2</sub>a), 3.94-4.10 (m, 1H, H-6a, Ser-CH<sub>2</sub>b), 4.17-4.25 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, H-6b), 4.48 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.56 (m, 1H, H-1), 4.93-5.06 (m, 2H, H-4, Ser-αCH), 5.18 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, 1H, H-3), 5.93 (m, 1H, NH), 6.79 (m, 1H, NH), 7.3-7.42 (m, 4H, Fmoc), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.77 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>

Die analytischen Daten stimmen nur teilweise mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[122]</sup>

***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **62****

Nach der Trichloracetimidat-Methode:

Zu einer Lösung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinbenzylester **58** (1.14 g, 2.73 mmol) und *O*-[3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosyl]-trichloracetimidat **8b** (1.98 g, 3.17 mmol) in Dichlormethan (75 ml) bei Raumtemperatur wird eine 0.1 M Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung (0.35 ml, 35 μmol) in Dichlormethan gegeben. Nachdem 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 1:1 als Eluens gereinigt um **62** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.54 g (1.75 mmol, 64%);

Mit dem Thioglycosyl-Donor:

Zu einer Lösung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-serinbenzylester **58** (0.292 g, 0.7 mmol) und Ethyl-3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-1-thio-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl-

amino)- $\beta$ -D-glucopyranosid **8c** (1.28 g, 2.44 mmol) in absolutem Dichlormethan (25 ml) wird Molsieb (4Å, 4 g) gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Dimethyl-(methylthio)-sulfonat Triflat **61** (0.54 g, 2.74 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Triethylamin (0.38 ml, 2.75 mmol) zugegeben, über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 2:1 als Eluens gereinigt um **62** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 0.51 g (0.58 mmol, 83%);

R<sub>f</sub>: 0.19 (Cyclohexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 24° (c=1.0, Chloroform);

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

$\delta$  = 2.02, 2.03, 2.07 (3\*s, 9H, 3\*OAc), 3.59 (m, 2H, H-5, H-2), 3.92 (m, 1H, H-6a), 4.10 (m, 1H, H-6a), 4.23 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ser-CH<sub>2</sub>a), 4.39-4.53 (m, 3H Ser- $\alpha$ CH, Fmoc-CH, Ser-CH<sub>2</sub>b), 4.58-4.81 (m, 3H, H-1, Teoc-CH<sub>2</sub>), 5.02 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, 1H, H-4), 5.17-5.31 (m, 3H, H-3, Bzl-CH<sub>2</sub>), 5.81 (m, 2H, 2\*NH), 7.27-7.42 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.61 (m, 2H, Fmoc), 7.76 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

C<sub>40</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>Cl<sub>3</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[123]</sup>

### ***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **63****

Zu einer Lösung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-L-serinbenzylester **62** (2.64 g, 3 mmol) in Essigsäureanhydrid (4 ml) wird frisch aktiviertes Zinkpulver (1 g) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit Toluol verdünnt, das Zinkpulver abfiltriert und das Lösungsmittel durch Coevaporation mit Toluol unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 2:1 als Eluens gereinigt um **63** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.82 g (2.43 mmol, 81%);

R<sub>f</sub>: 0.34 (Cyclohexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : 7° (c=1.0, Chloroform);

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

δ = 1.82 (s, 1H, NAc), 2.03, 2.04, 2.07 (3\*s, 9H, 3\*OAc), 3.62 (m, 1H, H-5), 3.7 (m, 1H, H-2), 3.86 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 2 Hz, 1H, H-6a), 4.08 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 2 Hz, 1H, H-6a), 4.23 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ser-CH<sub>2</sub>a), 4.45 (m, 2H, Fmoc-CH, Ser-CH<sub>2</sub>b), 4.53 (m, 1H Ser-αCH), 4.67 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, H-1), 5.02 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, 1H, H-4), 5.19 (m, 2H, Bzl-CH<sub>2</sub>), 5.25 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, 1H, H-3), 5.37 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 5.81 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, NH), 7.3-7.42 (m, 9H, Fmoc, Bzl), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.77 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

C<sub>39</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[124]</sup>

### ***N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-β-*D*-glucopyranosyl-*L*-serin 56**

Zu einer Lösung von *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy-β-*D*-glucopyranosyl-*L*-serinbenzylester **63** (2.54 g, 3.4 mmol) in Essigester/Ethanol 1:1 (40 ml) wird eine katalytische Menge 5% Palladium auf Kohle (20 mg) gegeben und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Sobald sich mittels Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr nachweisen läßt, wird das Reaktionsgemisch über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 30 : 1 – 10 : 1 als Eluens gereinigt um **56** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.89 g (3.03 mmol, 89%);

R<sub>f</sub>: 0.13 (Chloroform/Methanol 10:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -7.3° (c=0.8, Chloroform);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 1.86 (s, 3H, NAc), 2.01, 2.03, 2.07 (3\*s, 9H, 3\*OAc), 3.68 (m, 2H, H-5, Ser-CH<sub>2</sub>a), 3.79 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H, H-2), 3.96 (dd, <sup>3</sup>J(H,H) = 12 Hz, <sup>2</sup>J(H,H) = 2 Hz, 1H, H-6a), 4.06 (m, 1H, Ser-CH<sub>2</sub>b), 4.21 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, H-6b), 4.48 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.62 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 8 Hz, 1H, H-1), 5.02 (m, 2H, H-4, Ser-αCH), 5.18 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 10 Hz, 1H, H-3), 5.53 (d, 1H,

---

NH), 6.61 (m, 1H, NH), 7.3-7.42 (m, 4H, Fmoc), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.77 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, Fmoc);

$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{13}$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[122]</sup>



### 6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.3

#### ***N*-(Benzyloxycarbonyl)-glycylglycin-*tert*-butylester 66**

Zu einer Lösung von *N*-(Benzyloxycarbonyl)-glycin **64** (7.82 g, 37.4 mmol) und Glycin-*tert*-butylester **65** (4.9 g, 37.4 mmol) in Dichlormethan (100 ml) wird bei 0° C eine Lösung von EEDQ (18.5 g, 75 mmol) in Dichlormethan (50 ml) getropft. Nach dem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung jeweils dreimal mit 0.5 N HCl, 10% Natriumcarbonat-Lösung und Wasser (je 50 ml) gewaschen. Das nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck zurückbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:1 als Eluens gereinigt um **66** als leicht gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 7.1 g (22.1 mmol, 59 %);

R<sub>f</sub>: 0.18 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

<sup>1</sup>H-NMR (250-MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS):

δ = 1.48 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 3.9 (m, 4H, 2x Gly-CH<sub>2</sub>), 5.12 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 5.62 (s, 1H, NH), 6.63 (s, 1H, NH), 7.35 (s, 5H, Aromat).

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[125]</sup>

#### **Glycylglycin-*tert*-butylester 67**

Zu einer Lösung von (*N*-Benzyloxycarbonyl)-glycylglycin-*tert*-butylester **66** (7 g, 21.7 mmol) in einer Mischung aus Essigester/Ethanol 1:1 (80 ml) wird bei Raumtemperatur eine katalytische Menge 10% Palladium auf Kohle (25 mg) gegeben. Es wird über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, der Palladiumkatalysator durch Filtration über Celite abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt um **67** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 3.88 g (20.6 mmol, 95%);

R<sub>f</sub>: 0.2 (*n*-Hexan/Essigester 1:1 + 2% Triethylamin);

$^1\text{H-NMR}$  (250-MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): 1.48 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.79 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.4 (s, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 3.97 (d,  $J=7$  Hz, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 7.72 (s, 1H, NH).

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[125]</sup>

### ***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycin-*tert*-butylester 69**

Zu einer Lösung von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucin **68** (4.05 g, 11.45 mmol) und Glycylglycin-*tert*-butylester **67** (2.16 g, 11.5 mmol) in 40 ml Dichlormethan bei 0° C wird tropfenweise eine Lösung von EEDQ (3.7 g, 15 mmol) in 10 ml Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend je drei mal mit 0.5 M HCl-Lösung, 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und Wasser (je 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:4 als Eluens gereinigt um **69** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 4.83 g (9.22 mmol, 80%);

$R_f$ : 0.06 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

$[\alpha]_D^{20}$ : -11.2° (c = 1.3 in Dichlormethan);

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

$\delta$  = 0.91-0.94 (m, 6H, 2\*Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.41 (s, 9H, *t*Bu), 1.53-1.59 (m, 1H, Leu- $\gamma\text{CH}$ ), 1.65-1.67 (m, 2H, Leu- $\text{CH}_2$ ), 3.82-3.83 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 3.94-4.06 (m, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.16-4.23 (m, 2H, Leu- $\alpha\text{CH}$ , Fmoc-CH), 4.33-4.45 (m, 2H, Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 5.6 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 8$  Hz, 1H, Leu-NH), 7.0 (s, 1H, Gly-NH), 7.12 (s, 1H, Gly-NH), 7.26-7.39 (m, 4H, Fmoc), 7.56 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, Fmoc), 7.74 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, Fmoc);

$^{13}\text{C NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):

$\delta$  = 21.86 (2\*Leu- $\text{CH}_3$ ), 22.94 (Leu- $\gamma\text{CH}$ ), 27.98 (3\**t*Bu- $\text{CH}_3$ ), 41.26 (Leu- $\text{CH}_2$ ), 41.92 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 41.97 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 47.14 (Fmoc-CH), 53.75 (Leu- $\alpha\text{CH}$ ), 67.04 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 82.31 (*t*Bu- $\text{C}_q$ ), 125.05, 127.06, 127.1, 127.73 (Fmoc-CH), 143.72, 143.75 (Fmoc- $\text{C}_q$ ), 156.49 (CO, Urethan), 168.84, 168.91, 173.03 (3\*CO);

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$

HR-MS(70 eV, EI) ( $m/z$ ): ber.:  $[\text{M}]^+$  523.2682

gef.:  $[\text{M}]^+$  523.2667.

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycin 39**

Zu einer Lösung von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycin-*tert*-butylester **69** (1.81 g, 3.5 mmol) in 6 ml Dichlormethan werden bei Raumtemperatur 6 ml TFA gegeben. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt und die TFA mit Toluol coevaporiert um **39** als braunes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.6 g (3.42 mmol, 97%);

R<sub>f</sub>: 0.12 (*n*-Hexan/Essigester 1:1 + 2% Essigsäure);

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -16.2° (c = 1.25 in Methanol);

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

δ = 0.85-0.89 (m, 6H, 2\*Leu-CH<sub>3</sub>), 1.58-1.62 (m, 3H, Leu-γCH, Leu-CH<sub>2</sub>), 3.78-4.14 (m, 5H, Gly-CH<sub>2</sub>, Gly-CH<sub>2</sub>, Fmoc-CH), 4.23-4.25 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.32-4.37 (m, 1H, Leu-αCH), 6.01 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 1H, Leu-NH), 7.17-7.35 (m, 4H, Fmoc), 7.56 (m, 3H, Fmoc, Gly-NH), 7.69 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc), 7.78 (s, 1H, Gly-NH), 10.51 (s, 1H, COOH),

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):

δ = 21.56 (Leu-CH<sub>3</sub>), 22.84 (Leu-CH<sub>3</sub>), 24.61 (Leu-γCH), 40.81 (Gly-CH<sub>2</sub>), 41.1 (Gly-CH<sub>2</sub>), 42.64 (Leu-CH<sub>2</sub>), 46.91 (Fmoc-CH), 53.75 (Leu-αCH), 67.33 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.0, 124.97, 127.1, 127.8 (Fmoc-CH), 141.21, 143.41, 143.58 (Fmoc-C<sub>q</sub>), 156.89 (CO, Urethan), 170.57, 172.12, 174.38 (3\*CO);

C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

HR-FAB-MS (*m/z*): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 468.2134

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 468.2143.

**12-Hydroxy-4,7,10-trioxydodecansäure-*tert*-butylester 72**

Zu einer Lösung von wasserfreiem Triethylenglycol **70** (64 ml, 0.47 mol) in absolutem THF (500 ml) wird bei Raumtemperatur Natrium (0.1 g, 4.3 mmol) gegeben. Nachdem sich das Natrium aufgelöst hat, wird *tert*-Butylacrylat **71** (24 ml, 0.17 mol) zugegeben. Nach 20 stündigem Rühren wird die Reaktionsmischung mit 1 N HCl-Lösung neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in einer wäßrigen Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wäßriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt um **72** als farbloses Öl zu ergeben.

Ausbeute: 28.46 g (102.2 mmol, 60%);

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

$\delta = 1.43$  (s, 9H, *Ot*Bu), 2.48 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, H-2), 2.61 (s, 1H, OH), 3.58-3.73 (m, 14H, H-3, 3\*O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O);

$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_6$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[105]</sup>

### ***E*-17-Bromo-4,7,10,13-tetraoxo-15-heptadecansäure-*tert*-butylester 74**

Zu einer Lösung von 12-Hydroxy-4,7,10-trioxydodecansäure-*tert*-butylester **72** (28.4 g, 102 mmol) und *E*-1,4-Dibrombut-2-en **73** (43.86 g, 205 mmol) in Dichlormethan (320 ml) wird eine Lösung von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (34.62, 102 mmol) und Natriumhydroxid (8.29 g, 207 mmol) in Wasser (165 ml) gegeben und 90 Minuten heftig gerührt. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und zwei mal mit Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Diethylether aufgenommen, filtriert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:1 als Eluens gereinigt um **74** als leicht gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 28.84 g (67.5 mmol, 70%);

$R_f$ : 0.33 (*n*-Hexan/Essigester 1:1);

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

$\delta = 1.43$  (s, 9H, *Ot*Bu), 2.48 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, H-2), 3.58-3.73 (m, 14H, H-3, 3\*O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.95 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, H-17), 4.03 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 5$  Hz, 2H, H-14) 5.79-6.00 (m, 2H, 2\*CH);

$\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{Br}$

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.<sup>[105]</sup>

***E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-leucylglycylglyoxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure-*tert*-butylester **75****

Zu einer Lösung von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*L*-leucylglycylglycin **39** (1.47 g, 3.14 mmol) und (*E*)-17-Brom-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure-*tert*-butylester **74** (1.44 g, 3.5 mmol) in 15 ml Dichlormethan wird bei Raumtemperatur Tetrabutylammoniumbromid (1.13 g, 3.5 mmol) in 15 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Nach 3 Tage heftigem Rühren wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit *n*-Hexan/Essigester 1:4 als Eluens gereinigt um **75** als leicht gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.49 (1.87 mmol, 59%)

*R*<sub>f</sub>: 0.08 (*n*-Hexan/Essigester 1:4);

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -5.5° (c = 1 in Methanol);

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

δ = 0.93 (m, 6 H, Leu-CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9 H, *t*Bu), 1.55 (m, 1H, Leu-γCH), 1.67 (m, 2 H, Leu-CH<sub>2</sub>), 2.49 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, H-2), 3.56-3.65 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 3.7 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, H-3), 3.91-4.03 (m, 6H, Gly-CH<sub>2</sub>, H-14), 4.16-4.2 (m, 2H, Fmoc-CH, Leu-αCH), 4.39-4.42 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.56 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 2H, H-17), 5.5 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 1H, Leu-NH), 5.75-5.81 (m, 2H, H-15, H-16), 7.02 (s, 1H, Gly-NH), 7.06 (s, 1H, Gly-NH), 7.27-7.39 (m, 4H, Fmoc), 7.56 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc), 7.75 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H, Fmoc);

<sup>13</sup>C NMR (125.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):

δ = 21.8, 22.9 (2\*Leu-CH<sub>3</sub>), 24.7 (Leu-CH), 28.1 (3\**t*Bu-CH<sub>3</sub>), 36.3 (C-2), 41.1, 41.2 (Leu-CH<sub>2</sub>, Gly-CH<sub>2</sub>), 43.0 (Gly-CH<sub>2</sub>), 47.2 (Fmoc-CH), 53.9 (Leu-αCH), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 65.1 (C-17), 66.9, 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>, C-3), 69.7 (C-14), 70.3, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, 80.6 (*t*Bu-C<sub>q</sub>), 120.0, 125.0 (Fmoc-CH), 125.7 (C-16), 127.1, 127.8 (Fmoc-CH), 131.7 (C-15), 141.3, 143.7 (Fmoc-C<sub>q</sub>), 156.6(CO, Urethan), 169.2, 169.3, 171.0, 173.0 (4\*CO);

C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>

HR-FAB-MS (*m/z*): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 798.4177

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 798.4203.

***E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycyloxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure 76**

Zu einer Lösung von *E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycyloxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure-*tert*-butylester **75** (1.34 g, 1.68 mmol) in Dichlormethan (6 ml) wird bei Raumtemperatur TFA (6 ml) gegeben. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die TFA mit Toluol coevaporiert um **76** als braunes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.23 g (1.66 mmol, 98%);

$R_f$ : 0.06 (*n*-Hexan/Essigester 1:10 + 2% Essigsäure);

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-5.3^\circ$  ( $c = 0.75$  in Methanol);

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

$\delta = 0.92$  (m, 6 H, Leu- $\text{CH}_3$ ), 1.56 (m, 1H, Leu-CH), 1.63 (m, 2 H, Leu- $\text{CH}_2$ ), 2.59 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 2H, H-2), 3.55-3.61 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 3.72 (m, 2H, H-3), 3.9-4.03 (m, 4H, Gly- $\text{CH}_2$ , H-14), 4.08 (dd,  $^3J(\text{H,H}) = 17$  Hz,  $^2J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 2H, Gly- $\text{CH}_2$ ), 4.18 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz), 1H, Fmoc-CH), 4.22 (s, 1H, Leu- $\alpha\text{CH}$ ), 4.35-4.42 (m, 2H, Fmoc- $\text{CH}_2$ ), 4.55 (s, 2H, H-17), 5.70-5.82 (m, 2H, H-15, H-16), 5.91 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 1H, Leu-NH), 7.27-7.39 (m, 4H, Fmoc), 7.53 (m, 2H, Gly-NH), 7.57 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, Fmoc), 7.74 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H, Fmoc);

$^{13}\text{C NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):

$\delta = 21.7, 23.0$  (Leu- $\text{CH}_3$ ), 24.7 (Leu- $\gamma\text{CH}$ ), 34.8 (C-2), 41.1, 41.3 (Leu- $\text{CH}_2$ , Gly- $\text{CH}_2$ ), 42.8 (Gly- $\text{CH}_2$ ), 47.1 (Fmoc-CH), 53.9 (Leu- $\alpha\text{CH}$ ), 58.4 ( $\text{CH}_2$ ), 64.8 (C-17), 66.6, 67.1 (Fmoc- $\text{CH}_2$ , C-3), 69.2 (C-14), 70.0, 70.2, 70.2, 70.3, 70.8, ( $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ )<sub>3</sub>, 120.0, 125.1 (Fmoc-CH), 126.3 (C-16), 127.1, 127.8 (Fmoc-CH), 130.7 (C-15), 141.3, 143.7, 143.8 (Fmoc- $\text{C}_q$ ), 156.7(CO, Urethan), 169.4, 170.0, 173.7, 174.9 (4\*CO);

$\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{12}$

MALDI-TOF-MS (DHB): ber.: 741.82

gef.: 742.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 764.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 780.7  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

***E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucylglycylglycyloxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecanylaminomethylpolystyrol 38**

Zu einer Suspension von Aminomethylpolystyrolharz **77** (0.656 g, 0.63 mmol, Beladung 0.96 mmol/g) in 10 ml Dichlormethan werden *E*-17-(*N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-

---

leucylglycylglycyloxy-4,7,10,13-tetraoxa-15-heptadecansäure (1.4 g, 1.89 mmol) **76**, DIC (0.28 g, 2.2 mmol) und HOBt (0.58 g, 3.8 mmol) gegeben. Nach 18 Stunden Schütteln wird das Harz 6 mal mit Dichlormethan gewaschen und zum Cappen zweimal 5 Minuten mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 3:1 geschüttelt. Das Harz wird 6 mal mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet um **38** zu erhalten. Die Beladung wird über das *N*-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Abspaltungsprodukt photometrisch bestimmt.

Beladung: 0.433 mmol/g;

Ausbeute: 0.71 g (0.31 mmol, 49%).

### 6.3.3 Versuche zu Kapitel 4.2.4

#### Allgemeine Vorschriften zur Synthese an fester Phase

##### Fmoc-Entschützungen

Methode A: Das Harz wird drei mal 2 min bei Raumtemperatur mit einer 15%igen Lösung von Piperidin in NMP geschüttelt und anschließend sechs mal mit NMP gewaschen gemäß des *FastMoc* 0.25 mmol Protokolls des Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizers.

Methode B: Das Harz wird zwei mal 6 min bei Raumtemperatur mit einer Mischung von DMF/Piperidin 4:1 geschüttelt und anschließend sechs mal mit DMF gewaschen.

##### Kupplungen

Methode A: Zu einer Lösung von 1 mmol der Aminosäure in NMP (6ml) und 0.9 mmol einer 0.45 M Lösung von HBTU/HOBt in DMF (2 ml) werden zur Aktivierung eine 2 M Diisopropylethylamin-Lösung in NMP (1 ml) gegeben. Nach 3 min wird die aktivierte Mischung zum Harz gegeben und 21 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz sechs mal mit NMP gewaschen gemäß des *FastMoc* 0.25 mmol Protokolls des ABI 433A Peptidsynthesizers.

Methode B: Eine Lösung von 4 Äquivalenten der Aminosäure, 3.6 Äquivalenten HBTU, 4 Äquivalenten HOBt und 4 Äquivalenten Diisopropylethylamin in DMF (5 ml) wird nach 2 min Voraktivierung zum Harz gegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz 6 mal mit DMF gewaschen.

Folgende Aminosäurederivate werden benutzt: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Ser( $\beta$ Ac<sub>3</sub>GlcNAc)-OH und Fmoc-Ser(PO(OH)OBzl)-OH.

##### Entschützung der Aminosäureseitenketten

Das Harz wird zwei mal 45 min mit einer Mischung von TFA/Thioanisol/Ethandithiol/Wasser 90:5:3:2 geschüttelt. Anschließend wird das Harz je sechs mal mit Dichlormethan und DMF gewaschen.

##### Abspaltung von der festen Phase

Zu einer Suspension des Harzes in DMF (10 ml) werden 1.5 Äquivalente Dimethylbarbitursäure gegeben. Das Reaktionsgefäß wird bis zur Gasentwicklung evakuiert und anschließend mit Argon belüftet. Nach 5 Wiederholungen wird im Argongegenstrom



Tetrakis(triphenylphosphin)palladium-Katalysator (10 mg) zugegeben und die Reaktionsmischung für 15 h unter Lichtausschluß geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert und drei mal mit DMF gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt um das Rohprodukt zu erhalten.

### Aufreinigung

Das Rohprodukt wird in Wasser suspendiert und durch Filtrieren über eine SepPac<sup>®</sup>-C18-Kartusche (Wasser zu Wasser/Acetonitril 1:1) vorgereinigt. Nach der Lyophilisation wird das vorgereinigte Produkt durch HPLC an einer C18HD-Säule (Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100-5 C18 HD, Fluß 3.5 ml/min 0 min (5 % B) und 20 min (30% B) oder 0 min 25% B und 20 min 40% B, A = Wasser + 0.1% Ameisensäure, B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure) gereinigt.

Auf diese Weise wurden dargestellt:

### ***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronyl-L-seryl-L-lysyl-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin 35a**

Sämtliche Kupplungen mit Aminosäuren werden nach Methode A durchgeführt. Die Verknüpfung mit dem Fluoreszenzmarker *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronsäure **79** wird gemäß Methode B durchgeführt. Nach der HPLC-Reinigung wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt um **35a** als rotes Pulver zu erhalten.

Ausbeute: 12 mg (8.6 µmol, 18.6% bezogen auf die Beladung des Harzes);

$t_R$ : 7.67 min [Macherey-Nagel CC250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN, Fluß 1 ml/min, 0 min (5 % B) und 20 min (30% B), A = Wasser + 0.1% Ameisensäure, B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure];

$[\alpha]_D^{20}$ : -16.7° (c = 0.6 in Methanol);

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

$\delta$  = 0.77 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 0.82 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 1.27-1.38 (m, 6H; 3\*Aca-CH<sub>2</sub>), 1.45-1.8 (m, 29 H; Leu-CH<sub>2</sub>, Leu- $\gamma$ CH, 3\*(Lys- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 2\*(Arg- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Arg- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>)), 2.24 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H; Aca- $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 2,89 (m, 6H; Lys- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.07 (m, 4H; Arg- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 3.5 (s, w, 2H; Aca- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.65-3.77 (m, 4H, 2\*Ser-

CH<sub>2</sub>), 3.81-3.93 (m, 4H, 2\*Gly-CH<sub>2</sub>), 4.15-4.31 (m, 8H; 8\*αCH), 6.31 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H; NBD), 8.43 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H; NBD);

C<sub>58</sub>H<sub>102</sub>N<sub>23</sub>O<sub>17</sub>

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 1392.78

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 1392.82.

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronyl-L-seryl-L-lysyl-(*O*)-phosphato-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin **35b****

Sämtliche Kupplungen mit Aminosäuren werden nach Methode A durchgeführt. Die Verknüpfung mit dem Fluoreszenzmarker *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronsäure **79** wird gemäß Methode B durchgeführt. Nach der HPLC-Reinigung wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt um **35b** als rotes Pulver zu erhalten.

Ausbeute: 6 mg (4.1 μmol, 11.9% bezogen auf die Beladung des Harzes);

*t*<sub>R</sub>: 9.77 min [Macherey-Nagel CC250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN, Fluß 1 ml/min, 0 min (5 % B) und 20 min (30% B), A = Wasser + 0.1% Ameisensäure, B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure];

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -32° (c = 0.3 in Wasser);

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 0.77 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 0.82 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 1.23-1.43 (m, 6H; 3\*Aca-CH<sub>2</sub>), 1.52-1.85 (m, 29 H; Leu-CH<sub>2</sub>, Leu-γCH, 3\*(Lys-β-CH<sub>2</sub>, Lys-γ-CH<sub>2</sub>, Lys-δ-CH<sub>2</sub>), 2\*(Arg-β-CH<sub>2</sub>, Arg-γ-CH<sub>2</sub>)), 2.27 (t, <sup>3</sup>J(H,H) = 7 Hz, 2H; Aca-α-CH<sub>2</sub>), 2.92 (m, 6H; Lys-ε-CH<sub>2</sub>), 3.1 (m, 4H; Arg-δ-CH<sub>2</sub>), 3.5 (s, w, 2H; Aca-ε-CH<sub>2</sub>), 3.60-3.84 (m, 5H), 3.91-3.99 (m, 2H), 4.02-4.09 (m, 1H), 4.15-4.31 (m, 8H; 8\*αCH), 6.31 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H; NBD), 8.43 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 9 Hz, 1H; NBD);

<sup>31</sup>P NMR (162.1 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 2.29 (1P);

C<sub>58</sub>H<sub>103</sub>N<sub>23</sub>O<sub>20</sub>P

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 1472.75

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 1472.6.

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronyl-L-seryl-L-lysyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin **81****

Die Kupplung mit den ersten 4 Aminosäuren wird nach Methode A durchgeführt, die folgenden 3 Verlängerungsschritte und das Anbringen des Fluoreszenzlabels *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronsäure **79** nach Methode B mit einer auf 2 h verlängerten Reaktionszeit. Nach den letzten 3 Kupplungsschritten wird das Harz durch eine zweimalige, jeweils 4 Minuten lang Behandlung mit Pyridin/Essigsäureanhydrid 4:1 gecappt. Anschließend wird das Harz 6 mal mit DMF gewaschen. Nach der HPLC-Reinigung wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt um **81** als rotes Pulver zu erhalten.

Ausbeute: 5 mg (2.9  $\mu$ mol, 6.5% bezogen auf die Beladung des Harzes);

$t_R$ : 12.05 min [Macherey-Nagel CC250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN, Fluß 1ml/min, 0 min (5 % B) und 20 min (30% B), A = Wasser + 0.1% Ameisensäure, B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure];

$[\alpha]_D^{20}$ : -19.2° (c = 0.25 in Methanol);

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

$\delta$  = 0.92 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 0.95 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 1.46-1.56 (m, 6H; 3\*Aca-CH<sub>2</sub>), 1.61-1.98 (m, 29 H; Leu- $\gamma$ CH<sub>2</sub>, Leu-CH, 3\*(Lys- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 2\*(Arg- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Arg- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>)), 1.94 (s, 3H; NAc), 1.97 (s, 3H; OAc), 2.01 (s, 3H; OAc), 2.05 (s, 3H; OAc), 2.37 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 7$  Hz, 2H; Aca- $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 2,95 (m, 6H; Lys- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.22 (m, 4H; Arg- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 3.57 (s, w, 2H; Aca- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.74-4.03 (m, 10H; 2\*Ser-CH<sub>2</sub>, 2\*Gly-CH<sub>2</sub>, H-2, H-6a), 4.11 (dd,  $^2J(\text{H,H}) = 2$  Hz,  $^3J(\text{H,H}) = 11$  Hz, 1H; H-6b), 4.25-4.37 (m, 8H; 8\* $\alpha$ CH), 4.47 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 6$  Hz, 1H; H-5), 4.67 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9$  Hz, 1H; H-1), 4.98 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 10$  Hz, 1H; H-3), 5.17 (t,  $^3J(\text{H,H}) = 10$  Hz, 1H; H-4), 6.37 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9$  Hz, 1H; NBD), 8.51 (d,  $^3J(\text{H,H}) = 9$  Hz, 1H; NBD);

C<sub>72</sub>H<sub>121</sub>N<sub>24</sub>O<sub>25</sub>

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 1721.89

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 1721.85.

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronyl-L-seryl-L-lysyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin **35c****

Der pH-Wert einer Lösung von *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronyl-L-seryl-L-lysyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-seryl-L-arginyl-L-lysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-leucylglycylglycin **81** (3.7 mg, 2.1  $\mu$ mol) in trockenem Methanol (1 ml) wird durch die Zugabe von 0.1 M Lösung von Natriummethanolat in trockenem Methanol auf 9 eingestellt. Nach 30 min Rühren wird der pH-Wert durch die Zugabe von Essigsäure auf 3 gebracht. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine SepPak<sup>®</sup>-C18 Kartusche gereinigt um **35c** als rotes Pulver zu erhalten.

Ausbeute: 2 mg (1.3  $\mu$ mol, 60%);

$t_R$ : 7.56 min [Macherey-Nagel CC250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN, Fluß 1 ml/min, 0 min (5 % B) und 20 min (30% B), A = Wasser + 0.1% Ameisensäure, B = Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure];

$[\alpha]_D^{20}$ : -28° (c = 0.1 in water);

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):

$\delta$  = 0.77 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 0.83 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6 Hz, 3H; Leu-CH<sub>3</sub>), 1.23-1.4 (m, 6H; 3\*Aca-CH<sub>2</sub>), 1.43-1.77 (m, 29 H; Leu- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, Leu-CH, 3\*(Lys- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>, Lys- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 2\*(Arg- $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Arg- $\gamma$ -CH<sub>2</sub>)), 1.8 (s, 2H; NAc Rotamer), 1.91 (s, 1H; NAc Rotamer), 2.24 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 7 Hz, 2H; Aca- $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 2.88 (m, 6H; Lys- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.07 (m, 4H; Arg- $\delta$ -CH<sub>2</sub>), 3.28-3.37 (m, 2H; H-4, H-5), 3.43 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 10 Hz, 1H; H-3), 3.51 (s, w, 2H; Aca- $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 3.56-3.94 (m, 11H; 2\*Ser-CH<sub>2</sub>, 2\*Gly-CH<sub>2</sub>, H-2, H-6), 4.15-4.26 (m, 8H; 8\* $\alpha$ CH), 4.42 (m, 1H; H-1), 5.17 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 10 Hz, 1H; H-4), 6.33 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9 Hz, 1H; NBD), 8.42 (s, 1H; NBD);

C<sub>66</sub>H<sub>115</sub>N<sub>24</sub>O<sub>22</sub>

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure): ber.: [M+H]<sup>+</sup> 1595.86

gef.: [M+H]<sup>+</sup> 1595.88.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Robert, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, Weinheim, **1995**.
- [2] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360-4383; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 4192-4214.
- [3] K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716-780  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 688-752.
- [4] Review: L. Buée, T. Bussièrè, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, P. Hof, *Brain Res. Review* **2000**, *33*, 95-130.
- [5] a) D. W. Cleveland, S.-Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, *116*, 207-225; b) G. Lee, N. Cowan, M. W. Kirschner, *Science* **1988**, *239*, 285-288.
- [6] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, R. A. Crowther, E. Vanmelchen, A. Probst, J. Gotz, K. Burki, P. Cohen, *Neurobiol. Aging* **1995**, *16*, 325-334.
- [7] a) M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R. A. Crowther, *Neuron* **1989**, *3*, 519-526; b) M. Goedert, C. Wischik, R. A. Crowther, J. Walker, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4051-4055; c) M. Goedert, R. Jakes, *EMBO J.* **1990**, *9*, 4225-4230.
- [8] A. Himmler, D. Drechsel, M. W. Kirschner, D. W. Martin Jr., *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1381-1388.
- [9] a) N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9511-9522; b) B. Goode, M. Chau, P. Denis, S. Feinstein, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38182-38189.
- [10] U. Preuss, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *J. Cell. Sci.* **1997**, *110*, 789-800.
- [11] A. Schneider, J. Biernat, M. van Bergen, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3549-3558.
- [12] a) J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Neuron* **1993**, *11*, 153-163; b) B. Trinczek, J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 1887-1902; c) G. Drewes, A. Ebnet, U. Preuss, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Cell* **1997**, *89*, 297-308; d) S. Jenkins, G. Johnson, *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 1463-1468; e) D. Hanger, J. Betts, T. Loviny, W. Blackstock, B. Anderton, *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 2465-2476.

- 
- [13] R. Brandt, G. Lee, D. B. Teplow, D. Shalloway, M. Abdel-Ghany, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11776-11782.
- [14] a) D. Selkoe, *Trends in Cell Biol.* **1998**, *8*, 447-453; b) E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Trends in Cell Biol.* **1998**, *8*, 425-427.
- [15] a) H. Braak, E. Braak, *Acta Neuropathol.* **1991**, *82*, 239-259; b) T. Gomez-Isla, R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi, B. T. Hyman, *Ann. Neurol.* **1997**, *41*, 17-24.
- [16] a) K. Imahori, T. Uchida, *J. Biochem.* **1997**, *121*, 179-188; b) M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani, Y. Ihara, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 823-829; c)
- [17] a) E. S. Matsuo, R.-Y. Shin, M. L. Billingsley, A. Van de Voorde, M. O'Connor, V. M.-Y. Lee, *Neuron* **1994**, *13*, 989-1002; b) W.-K. Liu, S.-H. Yen, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1131-1139.
- [18] a) B. Lichtenberg-Kraag, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, B. Steiner, C. Schröter, N. Gustke, H. E. Meyer, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5384-5388; b) S. G. Greenberg, P. Davies, J. D. Schein, L. I. Binder, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 564-569.
- [19] a) K. Kanemaru, K. Takio, R. Miura, K. Titani, Y. Ihara, *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 1667-1675; b) A. Waranabe, M. Hasegawa, M. Suzuki, K. Takio, M. Morishima-Kawashima, K. Titani, T. Arai, K. S. Kosik, Y. Ihara, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25712-25717.
- [20] a) Review: E. Hellström-Lindahl, *Eur. J. Pharmacology* **2000**, *393*, 255-263; b) J. Busciglio, A. Lorenzo, J. Yeh, B. Yankner, *Neuron* **1995**, *14*, 879-888; c) W. Le, W. Xie, R. Kong, S. Appel, *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 978-985; d) T. Shea, S. Prabhakar, F. Ekinici, *J. Neurosci. Res.* **1997**, *49*, 759-768.
- [21] a) S. Greenberg, E. Koo, D. Selkoe, W. Qui, K. Kosik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7104-7108; b) A. Takashima, K. Nogushi, G. Michel, M. Hoshi, K. Ishiguro, K. Imahori, *Neurosci. Lett.* **1996**, *203*, 33-36.
- [22] a) P. Davies, G. Johnson, *Biochem. J.* **1999**, *340*, 51-58; b) J. Zhang, G. Johnson, *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 2346-2357.
- [23] Review: A. Delacourte, L. Buée, *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *171*, 167-224.
- [24] G. V. W. Johnson, J. A. Hartigan, *Alzheimer's Disease Review* **1998**, *3*, 125-141.
- [25] C. Gong, T. Lidsky, J. Wegiel, L. Zuck, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5535-5544.

- 
- [26] S. Jenkins, M. Zimmerman, C. Garner, G. Johnson, *Biochem. J.* **2000**, *345*, 263-270.
- [27] G. Patrick, L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes, L.-H. Tsai, *Nature* **1999**, *405*, 615-622.
- [28] K. Sobue, A. Agarwal-Mawal, W. Li, W. Sun, Y. Miura, H. Paudel, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16673-16680.
- [29] Review: M. L. Billingsley, R. L. Kincaid, *Biochem. J.* **1997**, *323*, 577-591.
- [30] O. Schweers, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8463-8467.
- [31] M. Ackmann, H. Wiech, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30335-30343.
- [32] T. Gamblin, M. King, J. Kuret, R. Berry, L. Binder, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14203-14210.
- [33] O. Schweers, E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24290-24297.
- [34] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5129-5134.
- [35] a) M. P. Rout, S. R. Went, *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 357-365; b) N. Panté, U. Aebi, *Int. Rev. Cytol.* **1995**, *162*, 225-255.
- [36] D. Kalderon, W. D. Richardson, A. F. Markham, A. E. Smith, *Nature* **1984**, *311*, 33-38.
- [37] a) D. S. Goldfarb, J. Gariépy, G. Schoolnik, R. D. Kornberg, *Nature* **1986**, *322*, 641-644; b) Y. Yoneda, T. Arioka, N. Imamoto-Sonobe, H. Sugawa, Y. Shimonishi, T. Uchida, *Exp. Cell. Res.* **1987**, *170*, 439-452.
- [38] R. E. Lanford, J. S. Butel, *Cell* **1984**, *37*, 801-813.
- [39] a) J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey, C. Dingwall, *Cell* **1991**, *64*, 615-623; b) C. Dingwall, R. A. Laskey, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 478-481.
- [40] a) N. Michaud, D. S. Goldfarb, *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 215-223; b) U. Fischer, E. Darzynkiewicz, S. M. Tahara, N. A. Dathan, R. Lührmann, I. W. Mattaj, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 705-714; c) C. Kambach, I. W. Mattaj, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 11-12; d) H. Siomi, G. Dreyfuss, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 551-560; e) F. Weighardt, G. Biamonti, S. Riva, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 545-555; f) J. P. S. Makkerh, C. Dingwall, R. A. Laskey, *Cell* **1996**, *6*, 1025-1027; g) P. Wang, P. Palese, R. E. O'Neil, *J. Virol.* **1997**, *71*, 1850-1856; h) W. M. Michael, P. S. Eder, G. Dreyfuss, *EMBO J.* **1997**, *16*, 215-223.
- [41] N. Imamoto, T. Tachibana, M. Matsubae, Y. Yoneda, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8559-8565.

- 
- [42] M. Pfeifer, S. Berg, A. B. Reynolds, *Cell* **1994**, *76*, 789-791.
- [43] a) N. Imamoto, T. Shimamoto, T. Takao, T. Tachibana, S. Kose, M. Matsubae, T. Sekimoto, Y. Shimonishi, Y. Yoneda, *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 415-419; b) A. Radu, G. Blobel, M. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1769-1773.
- [44] a) F. Melchior, L. Gerace, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 175-179; b) N. R. Yaseen, G. Blobel, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26493-26502.
- [45] a) M. S. Moore, G. Blobel, *Nature* **1993**, *365*, 661-663; b) F. B. Melchior, J. Paschal, J. Evans, L. Gerace, *J. Cell. Biol.* **1993**, *123*, 1649-1659.
- [46] a) M. S. Moore, G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *93*, 10212-10216; b) B. M. Paschal, L. Gerace, *J. Cell. Biol.* **1995**, *129*, 925-937.
- [47] F. B. Melchior, T. Guan, N. Yokoyama, T. Nishimoto, L. Gerace, *J. Cell. Biol.* **1995**, *131*, 571-581.
- [48] V. Doye, E. Hurt, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1997**, *9*, 401-411.
- [49] a) M. Rexach, G. Blobel, *Cell* **1995**, *83*, 683-692; b) J. Moroianu, G. Blobel, A. Radu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7059-7062; c) K. M. Lounsbury, S. A. Richards, R. R. Perlungher, I. G. Macara, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2357-2360.
- [50] a) D. Görlich, F. Vogel, A. D. Mills, E. Hartman, R. A. Laskey, *Nature* **1995**, *377*, 246-248; b) J. Moroianu, M. Hijikata, G. Blobel, A. Radu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6532-6536; c) D. Görlich, N. Panté, U. Kutay, U. Aebi, R. F. Bischoff, *EMBO J.* **1996**, *15*, 5584-5594.
- [51] Y. Azuma, M. M. Tabb, L. Vu, M. Nomura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5159-5163.
- [52] a) D. Görlich, P. Henklein, R. A. Laskey, E. Hartmann, *EMBO J.* **1996**, *15*, 1810-1817; b) K. Weis, U. Ryder, A. I. Lamont, *EMBO J.* **1996**, *15*, 1818-1825.
- [53] V. Pollard, W. M. Michael, S. Nakielny, M. C. Siomi, F. Wang, G. Dreyfuss, *Cell* **1996**, *86*, 985-993.
- [54] Review: M. Vandromme, C. Gauthier-Rouvière, N. Lamb, A. Fernandez, *TIBS* **1996**, *21*, 59-64.
- [55] a) H. P. Rihs, D. A. Jans, H. Fan, R. Peters, *EMBO J.* **1991**, *10*, 633-639; b) I. Vancurova, T. M. Paine, W. Lou, P. L. Paine, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 779-787.
- [56] a) D. A. Jans, M. J. Ackermann, J. R. Bischoff, D. H. Beach, R. Peters, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1203-1212; b) T. Moll, G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch, K. Nasmyth, *Cell* **1991**, *66*, 743-758.



- [57] a) G. D. Holt, C. M. Snow, A. Senior, R. S. Haltiwanger, L. Gerace, G. W. Hart, *J. Cell Biol.* **1987**, *104*, 1157-1164; b) J. A. Hanover, C. K. Cohen, M. C. Willingham, M. K. Park, *J. Biol. Chem* **1987**, *262*, 9887-9894; c) M. Schindler, M. Hogan, R. Miller, D. DeGaetano, *J. Biol. Chem* **1987**, *262*, 1254-1260.
- [58] a) G. W. Hart, K. D. Greis, L.-Y. D. Dong, M. A. Blomberg, T.-Y. Chou, M.-S. Jiang, E. P. Roquemore, D. M. Snow, L. K. Kreppel, R. N. Cole, B. K. Hayes, *Pure Appl. Chem* **1995**, *67*, 1637-1645; b) G. W. Hart, K. D. Greis, L.-Y. D. Dong, M. A. Blomberg, T.-Y. Chou, M.-S. Jiang, E. P. Roquemore, D. M. Snow, L. K. Kreppel, R. N. Cole, F. I. Comer, C. S. Arnold, B. K. Hayes, *Adv. Exp.Med. Biol.* **1995**, *376*, 115-123.
- [59] E. Duverger, V. Carpentier, A. C. Roche, M. Monsigny, *Exp. Cell Res.* **1993**, *207*, 197-201.
- [60] E. Duverger, C. Pellerin-Mendes, R. Mayer, A. C. Roche, M. Monsigny, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 1325-1332.
- [61] E. Duverger, A. C. Roche, M. Monsigny, *Glycobiology* **1996**, *6*, 381-386.
- [62] a) B. R. Franza, F. J. Rauscher, S. F. Josephs, T. Curran, *Science*, **1988**, *239*, 1150-1153; b) F. J. Rauscher, L. C. Sambucetti, T. Curran, R. J. Distel, B. M. Spiegelman, *Cell* **1988**, *52*, 471-480; c) F. J. Rauscher, D. R. Cohen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian, B. R. Franza Jr., *Science* **1988**, *240*, 1010-1016; d) R. Chiu, W. J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter, M. Karin, *Cell* **1988**, *54*, 541-552.
- [63] a) Y. Maki, T. J. Bos, C. Davies, M. Starbuck, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2848-2852; b) P. K. Vogt, T. J. Bos, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 3316-3319.
- [64] a) D. Bohman, T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt, R. Tjian, *Science* **1987**, *238*, 1386-1392; b) P. Angel, E. A. Allegretto, S. T. Okino, K. Hattori, W. J. Boyle, T. Hunter, M. Karin, *Nature* **1988**, 166-171.
- [65] P. J. Mitchell, R. Tjian, *Science* **1989**, *245*, 371-378.
- [66] a) Y. Nakabeppu, D. Nathans, *Cell* **1988**, *55*, 907-915; b) T. D. Halazonetis, K. Georgopoulos, M. E. Greenberg, P. Leder, *Cell* **1988**, *55*, 917-924; c) J. T. Kouzarides, E. Ziff, *Nature* **1988**, *336*, 646-651.
- [67] a) W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science* **1988**, *240*, 1759-1764; b) R. Turner, R. Tjian, *Science* **1989**, *243*, 1689-1694; c) R. Gentz, F. J. Rauscher, C. Abate, T. Curran, *Science* **1989**, *243*, 1695-1699.
- [68] P. Angel, T. Smeal, J. Meek, M. Karin, *New Biol.* **1989**, *1*, 35-43.

- [69] P.K. Vogt, T. J. Bos, *Adv. Cancer Res.* **1990**, *55*, 1-35.
- [70] K. Chida, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4290-4294.
- [71] T. Nishimura, P. K. Vogt, *Oncogene* **1988**, *3*, 659-663.
- [72] V. R. Baichwal, R. Tjian, *Cell* **1990**, *63*, 815-825.
- [73] W. J. Boyle, T. Smeal, L. H. K. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin, *Cell* **1991**, *64*, 573-584.
- [74] C. Abate, L. Patel, F. J. Rauscher, T. Curran, *Science* **1990**, *249*, 1157-1161.
- [75] T. Tagawa, T. Kuroki, P. K. Vogt, K. Chida, *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 255-263.
- [76] J. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides* Clarendon, Oxford, **1992**.
- [77] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *84*, 2149-2153; b) R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799-810.
- [78] J. Meienhofer, *The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptide Synthesis*, in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.), *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 1-9, Academic Press, New York, **1975-1987**, Vol. 1, Chapter 6.
- [79] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [80] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-789.
- [81] H.-D. Jakubke, *Peptide: Chemie und Biologie*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [82] E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid-Phase Synthesis – A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- [83] a) M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192-1201. b) F. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690; c) F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul, J. E. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 201-207.
- [84] a) C. M. Stevens, R. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 725-727; b) H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 426-427; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 436-437.
- [85] a) H. Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 297-311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 294-308; b) Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691-1696; c) S. Blechert, A. Kleine-Klausing *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 428-429; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 412-414.
- [86] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [87] a) H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911-937; b) K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* VCH, Weinheim, **1995**.

- [88] a) S. Ferrari, W. Bannwarth, S. J. Morley, N. F. Totty, G. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7282-7287; b) K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, *35*, 3-14.
- [89] A. J. Mort, A. D. T. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [90] a) M. Meldal, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 710-718, b) J. W. Perich in *Peptides and Protein Phosphorylation* (Hrsg.: B. E. Kemp), CRC Press, Boca Raton, FL (USA) **1990**, S. 289.
- [91] a) M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192-2219; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056-2083; b) T. Kappes, H. Waldmann, *Liebigs Ann.* **1997**, 803-813; c) B. Sauerbrei, T. Kappes, H. Waldmann, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *186*, 65-86.
- [92] G. Arsequell, L. Krippner, R. A. Dwek, S. Y. C. Wang, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2383-2384.
- [93] a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235; b) W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135-147.
- [94] a) P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconjugate J.* **1987**, *4*, 97-108; b) D. R. Mootoo, P. Konradson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584; c) H. Waldmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 675-682; d) K. Toshima, K. Tatasuta, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531; e) U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, 251-260.
- [95] a) W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981; b) T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431-432; c) T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123-6126; d) H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8748-8750.
- [96] F. Marks, (Ed.); *Protein Phosphorylation* VCH, New York, **1996**.
- [97] M. Arrasate, M. Pérez, J. Avila, *Neurochem. Res.* **2000**, *1*, 43-50.
- [98] L. Wells, K. Vosseller, G. W. Hart, *Science* **2001**, *291*, 2376-2378.
- [99] D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, *9*, 1098-1108.
- [100] W. Bannwarth, E. Küng, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4219-4222.
- [101] N. Kuder, T. Zelinski, T. Pathak, O. Seitz, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2433-2439.
- [102] T. Zelinski, T. Pathak, persönliche Mitteilung.
- [103] O. Seitz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776.

- [104] a) T. Wakamiya, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, *Chem. Lett.* **1994**, 1099-1102; b) T. Vorherr, W. Bannwarth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2661-2664; c) Z. Kupihár, G. Váradi, É. Monostri, G. K. Tóth *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4457-4461.
- [105] a) O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901-904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 807-810; b) O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813-826.
- [106] Stefanie Flohr, Dissertation, Universität Karlsruhe **1998**.
- [107] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7829-7832.
- [108] E. Nägele, M. Schelhaas, N. Kuder, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6889-6902.
- [109] Ähnliche Beobachtungen machten: a) N. Arbusov, *Zh. Obshch. Khim.* **1948**, 18, 2008-2014; b) X. Lu, J. Zhu, *J. Organomet. Chem.* **1986**, 304, 239-244; c) S. K. Armstrong, E. W. Collington, J. G. Knight, A. Naylor, S. Warren *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 13, 1433-1448.
- [110] J. K. N. Jones, M. B. Perry, B. Shelton, D. J. Walton, *Can. J. Chem.* **1961**, 39, 1005-1016.
- [111] Ähnliche Beobachtungen machten: L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1995**, 51, 5643-5656.
- [112] M. Ravenscroft, R. M. G. Roberts, J. G. Tillett *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1982**, 12, 1569-1572.
- [113] M. F. Gordeev, G. W. Luehr, H. C. Hui, E. M. Gordon, D. V. Patel, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15879-15890.
- [114] *ABI 433A Peptide Synthesizer User Manual Vol 1*, PE Applied Biosystems, **1997**.
- [115] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [116] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3<sup>rd</sup> Ed., Pergamon, Oxford, **1988**.
- [117] G. Kretschmar, W. Stahl, *Tetrahedron* **1998**, 54, 6341-6358.
- [118] a) M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1931**, 64, 975-980; b) A. Medgyes, E. Farkas, A. Lipták, V. Pozsgay *Tetrahedron* **1997**, 53, 4159-4178; c) D. J. Silva, H. Wang, N. M. Allanson, R. K. Jain, M. J. Sofia *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5926-5929.
- [119] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 251-260.
- [120] H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 289-313.
- [121] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-980.
- [122] L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 5643-5656.

- [123] H. Kunz, J. Zimmer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2907-2910.
- [124] S. A. Mitchell, M. R. Pratt, Victor J. Hruby, R. Polt, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2327-2342.
- [125] A. T. Moore, H. N. Rydon, M. J. Smithers, *J. Chem. Soc. C.* **1966**, 24, 2349-2359.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Aca	Aminocapronsäure
Aloc	Allyloxycarbonyl
All	Allyl
AP	Amyloid Plaques
AP1	Aktivator-Protein-1
APP	Amyloid $\beta$ Vorgängerprotein
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
Bzl	Bzl
Cdk5	Cyclin-abhängige Kinase 5
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
CKII	Casein-Kinase II
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTST	Dimethyl-(methylthio)-sulfonium Triflat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ESI-MS	Elektrospray Ionisationsmassenspektrometrie
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HBTU	2-(1H)-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorphosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie
HTos	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
cJun	zelluläres Jun
vJun	virales Jun
MARK	Microtubuli Affinität regulierende Kinase
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NCLK	Neuronale Cdc2-ähnliche Protein Kinase

NFT	Neurofibrillärer Knoten
NLS	Kernlokalisierungssignal
NMR	Kernresonanzspektrometrie
NPC	Kernporenkomplex
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PHF	Gepaarte helikale Fasern
PKA	Protein Kinase A
SAPK	Stress-aktivierte Protein Kinase
TAD	Transaktivierungsdomäne
Teoc	Trichlorethoxycarbonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z	Benzyloxycarbonyl

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Waldmann für die interessante Themenstellung und für die stete Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dipl. Chem. Laurent Bialy, Herrn Dipl. Chem. Patrik Deck, Frau Dipl. Chem. Jantje Gerdes, Frau Dipl. Chem. Dipl. Bio. Ines Heinemann, Frau Dipl. Chem. Stefanie Schlummer und Herrn Dipl. Chem. Michael Thutewohl bedanke ich mich für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Bei meiner zeitweiligen Laborantin Elke Simon und bei meiner Vertiefungspraktikantin Corinna Haindl möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe im Labor bedanken. Ebenso möchte ich mich bei meinen OCII- und Wahlpflicht-Praktikanten für ihre Unterstützung im Labor bedanken.

Bei den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen in Dortmund und Karlsruhe möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken. Namentlich hervorheben möchte ich Herrn Dr. Röttele, der in Karlsruhe immer ein offenes Ohr für auftretende NMR-Probleme hatte.

Bei Herrn Dr. Oliver Seitz möchte ich mich für seine Anregungen und Tips bedanken.

Bei *Soicher*, *Gerda* und *Dörte* möchte ich mich für die angenehme gemeinsame Zeit im Labor und die fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt mein Dank für unvergessene TGIFs, sonstige Feten, dem gemeinsamen Sport, usw. . Sprich alles was diesen Arbeitskreis so lebenswert gemacht hat.

Last but not least gilt ein großer Dank meinen Eltern, die mich über die gesamte Zeit meines Studiums unterstützt haben.



# Lebenslauf

Name: Norman Kuder  
Geboren: am 14.03.1971 in Pforzheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1977-1981 Besuch der Weiherberggrundschule in Pforzheim  
1981-1987 Besuch des Reuchlin-Gymnasiums in Pforzheim  
1987-1990 Besuch des Fritz-Erler-Wirtschaftsgymnasium in Pforzheim  
Mai 1990 Abitur

## Grundwehrdienst

1990-1991 Grundwehrdienst beim Luftlandebataillon 253 und der Luftlandemörserkompanie 250

## Studium

1991-1996 Studium der Chemie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe  
01/1997-07/1997 Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann: „Synthese von lipidierten Partialstrukturen des C-Terminus des menschlichen *N*-Ras-Protein“  
07/1997 Diplom

## Promotion

10/1997-09/2001 Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe und der Universität Dortmund/MPI-Dortmund: „Synthese biologisch interessanter Glyco- und Phosphopeptide“

Dortmund, im August 2001