Synthese und biologische Evaluierung von neo-Ras-Proteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
vom Fachbereich Chemie der
Universität Dortmund
angenommene

Inaugural-Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Reinhard Reents

aus Varel in Oldenburg

Dezember 2002

1. **Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann**
2. **Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht**

Meinen Eltern und 현종 als Dank

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Allgemeiner Teil 3

2.1 Die Funktion von Ras bei der Signaltransduktion 3

2.2 Posttranslationale Modifikationen der Proteine der Ras-Superfamilie 7

2.2.1 Isoprenylierung 8

2.2.2 Palmitoylierung 11

2.2.3 Weitere Prozessierung durch Proteolyse und Carboxymethylierung 12

2.2.4 Membranassoziation und Membranadressierung von Ras 13

2.3 Ras als molekulares Ziel für die Entwicklung von Antitumorwirkstoffen 15

2.4 Bioorganische Synthese von neo-Proteinen 17

2.4.1 Kopplung von aktivierten Lipopeptiden über den MIC-Linker 19

2.4.2 Intein-vermittelte Protein Ligation (IPL)/ *Expressed Protein Ligation* (EPL) und *Native Chemical Ligation* 19

3 Aufgabenstellung 23

4 Spezieller Teil 26

4.1 Neo-Ras-Proteine 26

4.1.1 Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-Ras-Protein 30

4.1.1.1 Synthese funktionalisierter Isoprenoid-Analoga 30

4.1.1.2 Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-R*as*-Proteins 37

4.1.2 Ligation zwischen Ras-Protein und *C*-terminalem Peptid 43

4.1.2.1 Maleimido-vermittelte Protein Ligation 43

4.1.2.2 Intein-vermittelte Ligation und Native Chemical Ligation 46

4.1.3 Biologische Evaluierung fluoreszenzmarkierter Ras-Proteine 48

4.2 Cerulenin Analoga 54

4.2.1 Synthese einer Ceruleninbibliothek 55

4.2.2 Biologische Evaluierung der Ceruleninanaloga 60

4.3 Isoprenoidpyrophosphat-Analoga 60

4.3.1 Hydrolysestabile Isoprenoidpyrophosphat-Analoga 60

4.3.1.1 Synthese hydrolysestabiler Isoprenoidpyrophosphat-Analoga 61

4.3.1.2 Anwendung in der Protein-Strukturaufklärung 65

4.3.2 Fluoreszenzmarkierte Isoprenoidpyrophosphat-Analoga 66
4.3.2.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Isoprenoid-pyrophosphat-Analoga 66
4.3.2.2 Anwendung fluoreszenzmarkierter Isoprenoid-pyrophosphat-Analoga 67

5 Zusammenfassung und Ausblick 72

6 Experimenteller Teil 83

6.1 Meßgeräte und Hilfsmittel 83
6.2 Versuche zu Kapitel 4.1 87
6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.1 87
6.2.1.1 Versuche zu Kapitel 4.1.1.1 87
6.2.1.2 Versuche zu Kapitel 4.1.1.2 116
6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.2 138
6.2.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2.1 138
6.2.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.2.2 138
6.3 Versuche zu Kapitel 4.2 139
6.4 Versuche zu Kapitel 4.3 154
6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1 154
6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2 164

7 Literaturverzeichnis 167

8 Abkürzungsverzeichnis 186

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Die Forschung in den Naturwissenschaften hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Statt einer strikten Trennung von Chemie, Biologie, Physik und Medizin setzt sich zunehmend die fachübergreifende, symbiotische Forschung in den *life sciences* durch. Dieses ist in der engen inhärenten Verzahnung der Wissenschaften begründet. So hat sich beispielsweise der ehemals phänomenologische Forschungsansatz der Biologie essentiell geändert: Viele biologische Prozesse können inzwischen in molekularer Auflösung, auf chemischen Prinzipien basierend, verstanden werden.

Am Beispiel der modernen Krebsforschung können diese neuen Möglichkeiten für das Studium biologischer Probleme illustriert werden. In der heutigen Zeit geht man davon aus, dass die Karzinogengese in einem mehrstufigen Prozess durch das Zusammenwirken von verschiedenen Faktoren über einen längeren Zeitraum ausgelöst wird. Ein Onkogen allein, d.h. ein Gen, das in der Lage ist, Tumore in Zellkulturen oder Organismen zu induzieren, ist normalerweise nicht befähigt, maligne Transformationen auszulösen. In einer menschlichen Tumorzelle müssen ca. sechs bis zehn genetische Veränderungen akkumuliert werden, die sich in ihrer

Wirkung ergänzen. Dabei herrschen einige Mutationen deutlich vor, weil sie an entscheidenden Stellen der Regulierung von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung eingreifen. So werden bei ca. 30% aller menschlichen Tumore Mutationen im Gen des Tumorsuppressor-Proteins p53 gefunden, das damit das am häufigsten auftretende Onkogen ist.

Von nahezu gleicher Bedeutung ist das Mitte der sechziger Jahre entdeckte *ras*-Onkogen, das in ca. 40% von allen menschlichen Tumoren, bei Darm-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs sogar in ca. 85% aller Fälle Mutationen aufweist.[1;2] Die aus diesen Genen exprimierten Proteine stimulieren permanent das Wachstum und können so die „normale“ Zelle zu einer Krebszelle transformieren. Ras-Proteine befinden sich in der Zelle auf der Innenseite der Plasmamembran, wo sie u.a. über Isoprenyl- und Palmitoylreste in der Lipiddoppelschicht verankert sind.[3]

Intention dieser Dissertation ist es, eine Synthese für im lebenden Organismus detektierbare, lipidmodifizierte Ras-Proteine zu finden. Das mit Hilfe dieser neo-Ras-Proteine zu gewinnende präzise molekulare Verständnis für diesen zentralen Schalter der Krebsentstehung könnte für die Entwicklung neuartiger Krebsmedikamente genutzt werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Die Funktion von Ras bei der Signaltransduktion

Das erste Ras-Gen wurde aus dem akut transformierenden Ratten-Adeno-Sarkom Virus isoliert (v-H-Ras: Harvey-Rat-adeno-sarcoma, nach dem Erstbeschreiber Harvey 1964).[4]

Mittlerweile sind drei Isoformen des proto-onkogenen Ras-Gens im Säugetier-Genom bekannt, die ubiquitär exprimiert werden: H-Ras, K-Ras und N-Ras. Die Genprodukte, ca. 21 kDa große, an der Plasmamembran lokalisierte, GTP-bindende Proteine, unterscheiden sich vor allem im *C*-terminalen Bereich, der die Signalsequenzen für die posttranslationalen Modifikationen enthält. Die biologische Funktion der drei Ras-Isoformen scheint sich dennoch nicht wesentlich zu unterscheiden. K-Ras (Kirsten-Ras), das zwei Spleiß-Varianten (K-Ras 4A und 4B) mit Unterschieden im *C*-terminalen Bereich aufweist, ist die in menschlichen Tumoren am häufigsten vorkommende onkogene Isoform.[5]

Die Ras-Signaltransduktionskaskade ist physiologisch ausserordentlich wichtig. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung; eine Fehlregulierung dieses Signalpfades kann einer der entscheidenden Schritte bei der Transformation von Zellen sein. Der Ras-Weg ist in verschiedenen Spezies hochkonserviert und seine Elemente werden z.B. von Hefen, Würmern, Fliegen und Säugetieren nach dem gleichen Muster zur Weiterleitung von Wachstumssignalen benutzt.[6;7]

Bei der Signaltransduktion nimmt Ras die Rolle eines molekularen Schalters ein (Abbildung 1). Es integriert dabei eine Reihe extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine und Neurotransmitter, die unterschiedliche Rezeptoren an der Plasmamembran aktivieren.[8]

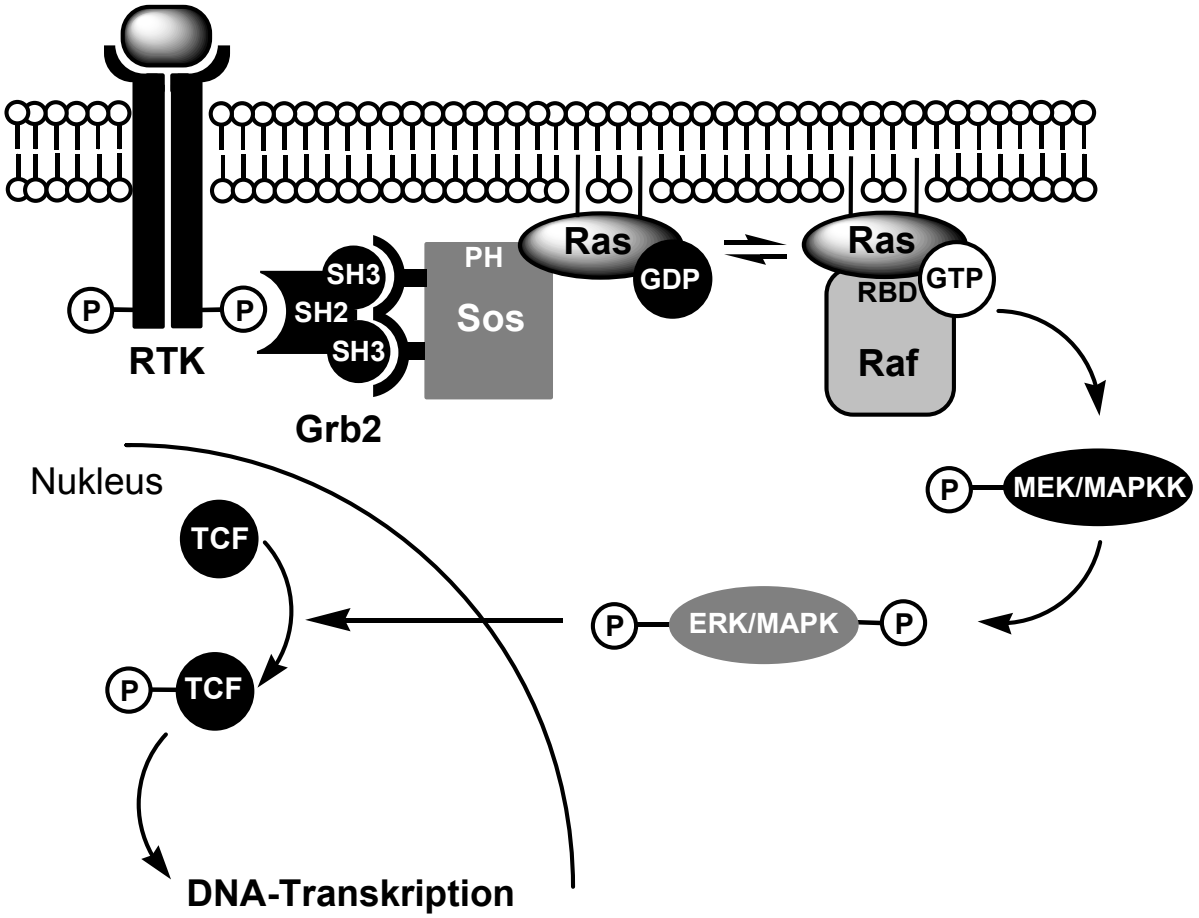


Abbildung 1: Die Ras/Raf-Signaltransduktionskaskade

So führt die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) an die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), einem Transmembranprotein,

bestehend aus einer extrazellulären Bindungsdomäne und einer membrandurchspannenden α-Helix, durch Dimerisierung zu dessen Aktivierung. Dabei kommt es zur Transphosphorylierung der Tyrosinreste im cytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors.[9] An diese neuen Bindungsstellen bindet im Anschluss das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor bound 2). Grb2 enthält eine SH-2 Domäne (**Src** homology 2), mit es sequenzspezifisch die Phosphotyrosine des Rezeptors erkennen und an sie binden kann, und zwei SH3-Domänen, die an eine Prolin-reiche Domäne des Adapterproteins und Ras-Austauschfaktors Sos (*Son of sevenless*, benannt nach einer *Drosophila* Mutante) binden können.
Diese Vorgänge und eine indirekte Interaktion der PH-Domäne (Pleckstrin homology) von Sos mit Phospholipiden führen zur starken Erhöhung der lokalen Sos-Konzentration an der Plasmamembran. So kommt es zum Nukleotidaustausch des membranassoziierten Ras. Der „molekulare Schalter“ wird angeschaltet.[10] Der als „molekulare Kleber“ wirkende Grb2/Sos-Komplex hat also die Funktion eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors (guanine nucleotide exchange factor, GEF).

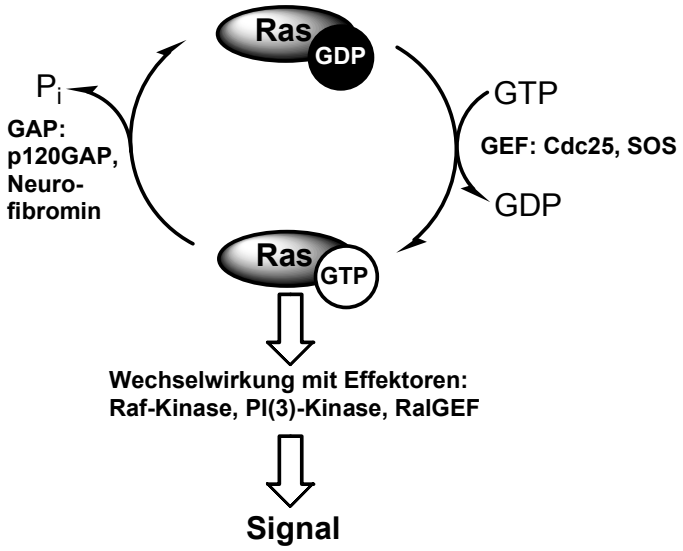


Abbildung 2: Ras als molekularer Schalter

Der Nukleotidaustausch an Ras führt zur Bindung von einer Reihe verschiedener Effektorproteine an Ras-GTP.[11-15] Gemeinsames Merkmal von Ras-Effektorproteinen ist die RBD (Ras binding domain), die mit hoher Affinität an die Effektorschleife von aktiviertem, GTP-gebundenem Ras bindet.

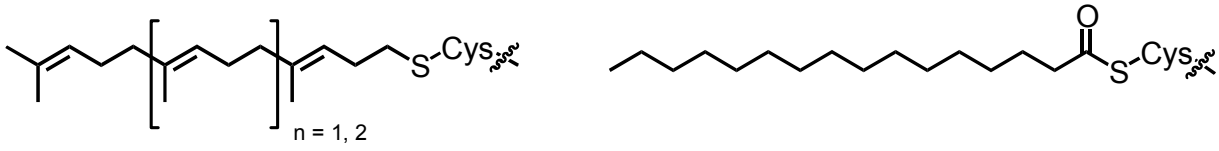
Einer der am meisten untersuchten Effektoren ist die Serin-Threonin Kinase Raf-1. Die aktivierte, GTP-bindende Form von Ras bindet den N-Terminus der von Raf-1 (rapid fibrosarcosis1), das durch die Rekrutierung an die Plasmamembran aktiviert wird (Analogie zur Immobilisierung von Sos an Grb2).[16] Der genaue Kinase-Aktivierungsmechanismus von Raf-1, das selbst als ein Onkogen identifiziert wurde, und seinen 70-80 kDa großen homologen Isoformen A-Raf und B-Raf, umfasst neben der Bindung an Ras über die Ras-binding domain (RBD) und die Cystein-reiche Domäne (CRD) auch die Phosphorylierung und allosterische Regulation von Raf. [17] Ist Raf, die erste Proteinkinase der MAP-Kinase-Signalkaskade, einmal aktiviert, bindet, phosphoryliert und aktiviert es seinerseits mit seinem *C*-Terminus die Proteinkinase MAP-Kinase-Kinase (mitogen activated protein kinase kinase, MAPKK), die auch als MEK bezeichnet wird (von MAP und ERK, extracellular signal regulated kinase). Daher kann Raf auch als MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) aufgefasst werden. Die so aktivierte MEK verfügt als dualspezifische Kinase über Tyrosin- und Serin/Threoninkinase-Aktivität und phosphoryliert als nächstes das Protein MAP-Kinase (MAPK, auch ERK genannt), bei dem es sich wiederum um eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase handelt. Die aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert und aktiviert nun weitere Kinasen des sogenannten MAP-Kinase Moduls,[18] die nun in den Zellkern diffundieren und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, z.B. den ternären Komplexfaktor der TCF/Ets-Familie (Ternary complex factor, E26 transformation specific, auch als Elk-1 bezeichnet), das schliesslich zur Expression verschiedener Gene führt.[19] Derartige Kinase-Module finden sich in großer Vielfalt in allen höheren eukaryontischen Zellen und sind manchmal an sogenannte Gerüstproteine gebunden, die dabei helfen, das Modul zu organisieren und die Spezifität der Signalweiterleitung zu gewährleisten.[20]

Da Ras nur über eine schwache GTPase-Aktivität verfügt, sind für die gegenüber der intrinsischen Hydrolyse um den Faktor 10^5 beschleunigte Abschaltung des Ras-vermittelten Signals GTPAse aktivierende Proteine (GAP) notwendig, von denen p120 GAP und Neurofibromin am besten charakterisiert sind.[21] Die molekulare Ursache für die onkogene Wirkung der häufigsten Ras-Mutanten G12V und Q61L konnte auf die fehlende Abschaltung von aktiviertem Ras zurückgeführt werden. Beide Mutanten führen zum Verlust der intrinsischen und GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse, G12V durch sterische Blockade des aktiven Zentrums und Q61L durch

Beeinträchtigung der Koordination des katalytisch wichtigen Wassermoleküls. Dadurch liegen diese Ras-Mutanten *in vivo* vorwiegend in GTP-gebundener, aktiver Form vor und führen schließlich zur ständigen Stimulation Ras-abhängiger Signalwege.

2.2 Posttranslationale Modifikationen der Proteine der Ras-Superfamilie

Durch Sequenzvergleiche konnten mittlerweile acht Unterfamilien Ras-homologer Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Grösse von 20-30 kDa auch kleine GTPasen genannt werden. Zu den Ras-Proteinen gehören neben den drei Isoformen H-,N- und K-Ras auch R-Ras, TC21, Rheb und die Rap und Ral-Proteine.[22] Die Proteine der Rho-Familie sind an der Organisation des Aktincytoskeletts beteiligt.[23] Sie indizieren die Bildung von Stressfasern und fokalen Kontakten (Rho), Membranausstülpungen und Lamellipodien (Rac) und Filopodien (Cdc42). Die mehr als 40 bekannten Rab-Proteine sind am vesikulären Transport beteiligt,[24] ebenso wie die Arf-Proteine.[25] Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kerntransports spielt Ran.[26] Die Funktionen der Rad-, Rheb- und Rit-Proteine sind noch nicht im Detail geklärt. Alle Mitglieder der Ras-Superfamilie werden posttranslational durch Isoprenylierung und/oder Acylierung modifiziert (Abbildung 3). Die einzige Ausnahme ist die am Kernimport und -export beteiligte kleine GTPase Ran.



n = 1: Farnesylierung
n = 2: Geranylgeranylierung

Palmitoylierung

Abbildung 3: Beispiele für natürliche Lipidmodifikationen von Ras-Proteinen

Isoprenylierungen und Myristoylierungen sind stabile Modifikationen, wohingegen die Palmitoylierung ein reversibler Prozess ist.[27;28] Die hydrophoben Modifikationen garantieren die Membranlokalisation der Ras-Proteine, ohne die sie ihre Funktionen nicht ausüben können. Dies ist vermutlich damit zu begründen, dass eine Oberfläche aufgrund der hohen lokalen Ras-Konzentration die Interaktionshäufigkeit mit Effektoren um einen Faktor von 10^6 verbessert.[29]

2.2.1 Isoprenylierung

Isoprenylierte Proteine können mehrere Arten von Konsensus-Sequenzen am *C*-Terminus enthalten, u.a. die sogenannte CAAX-Box und das CC- oder CXC-Motiv (Tabelle 1). Die Signalsequenz der CAAX-Box umfasst die letzten vier Aminosäuren des Proteins, wobei "C" das zu Isoprenylierende Cystein, "A" eine aliphatische Aminosäure und "X" eine beliebige Aminosäure darstellt. Die Eigenschaft von "X" bestimmt die Art der Isoprenylierung: Ist “X“ ein Leucin oder ein Phenylalanin, so wird das Protein von der Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) geranylgeranyliert; ist “X“ ein Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin, so wird es von der cytosolischen Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert. [30-33] Beide Isoprenyltransferasen sind Zink-bindende, heterodimere Proteine, die im Cytosol aller eukaryontischen Zellen vorkommen und aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen.
Röntgenkristallografische Daten der FTase aus Ratten zeigen eine vorwiegend α-helicale Struktur des Enzyms.[30] Die 15 Helices der α-Untereinheit umfassen halbmondförmig die β-Untereinheit, deren 14 Helices eine α-,α-Fassstruktur darstellen. Im Zentrum der Fassstruktur befindet sich eine hydrophobe Tasche zur Aufnahme des Farnesylpyrophosphats (FPP), an deren Ausgang das essentielle Zink-Ion koordiniert ist. Die Funktion der α-Untereinheit ist noch umstritten.[34] Die gleiche Untereinheit ist auch Teil der GGTase-I, die Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) als Kosubstrat erkennt.[35] Die Spezifität für GGPP bzw. FPP kann durch die Tiefe der hydrophoben Bindungstasche der β-Untereinheit erklärt werden. Zwar bindet GGPP auch an die FTase, wird aber nicht auf das CAAX-Peptid übertragen, da vermutlich das elektrophile Kohlenstoffatom zu weit von der Cystein-Thiolgruppe des Peptids entfernt ist. Die Bindung von GGPP an die GGTase-I ist dagegen 300fach stärker als die Bindung von FPP, was vermutlich auf die hydrophobe Interaktion der um 5 Kohlenstoffe längeren Isoprenoidstruktur des GGPP mit der tieferen Bindungstasche der GGTase-I zurückzuführen ist.[36]

Durch den derzeitigen Stand der Forschung wird das Bild entworfen, dass die Farnesylgruppe lediglich zur Ermöglichung einer Membraninsertion dient,[2;37-40] um dort im Fall von N- und H-Ras aufgrund einer ausreichend hohen Substratkonzentration durch eine zweite Lipidierung fest verankert zu werden.

Typ	FTase	GGTase-I	GGTase-II
Zusammensetzung der Untereinheiten	48 kDa (α) 46 kDa (β)	48 kDa (α) 43 kDa (β)	60 kDa (α) 38 kDa (β)
Metalle	Zn^{2+}, Mg^{2+}	Zn^{2+}	Mg^{2+} /Zn^{2+}
Isoprenylsubstrat	FPP	GGPP	GGPP
Proteinsubstrat	Ras	Rho, Rac, Ral, Rap	Rab/REP
Sequenzmotiv	-CAAX, X = M,S,Q, A,	-CAAX, X = L,F	Doppel-Cys-Motive -CC, -CXC, -CCX, -CCXX, -CCXXX

Tabelle 1: Isoprenyltransferasen und ihre Substrate
FPP: Farnesylpyrophosphat, GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat
FTase: Farnesyltransferase, GGTase: Geranylgeranyltransferase

So konnte bewiesen werden, dass der vollständige Ersatz der Farnesylgruppe durch eine Hexalysinsequenz[41] oder eine Hexadecylgruppe[42;43] zu Plasmamembran-lokalisierten und palmitoylierten Ras-Proteinen führt, die genau wie ihre farnesylierten Homologen eine Zelldifferenzierung und -Transformierung auslösen können. Erst die erhebliche Verringerung der Lipophilie - beispielsweise durch die Einführung eines Geranylrestes - verringert die biologische Aktivität,[44] vermutlich nicht nur aufgrund der geringeren Membranaffinität, sondern auch wegen der verschwindenden Affinität zu hSos1.[45] Daher erscheinen vielfach diskutierte Funktionen des Ras-Farnesylrestes bei Protein-Protein-Wechselwirkungen wie beispielsweise mit einem spezifischen Isoprenrezeptor an der PM unwahrscheinlich.[46]

Die das CC- bzw. CXC-enthaltenden Proteine gehören fast ausschliesslich zur Rab-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine und werden von der GGTase-II geranylgeranyliert (Abbildung 4). Dieses Enzym benötigt im Gegensatz zu beiden anderen Isoprenyltransferasen ein drittes Protein, das Rab Escort Protein (REP).[47;48] Vor dem Isoprenyltransfer bildet sich ein Komplex aus löslichem Rab-GDP und REP, der als Substrat von der GGTase-II erkannt wird. Die Isoprenylierung erfolgt dabei an beiden *C*-terminalen Cysteinresten. Rab-GDP allein wird nicht Isoprenyliert.

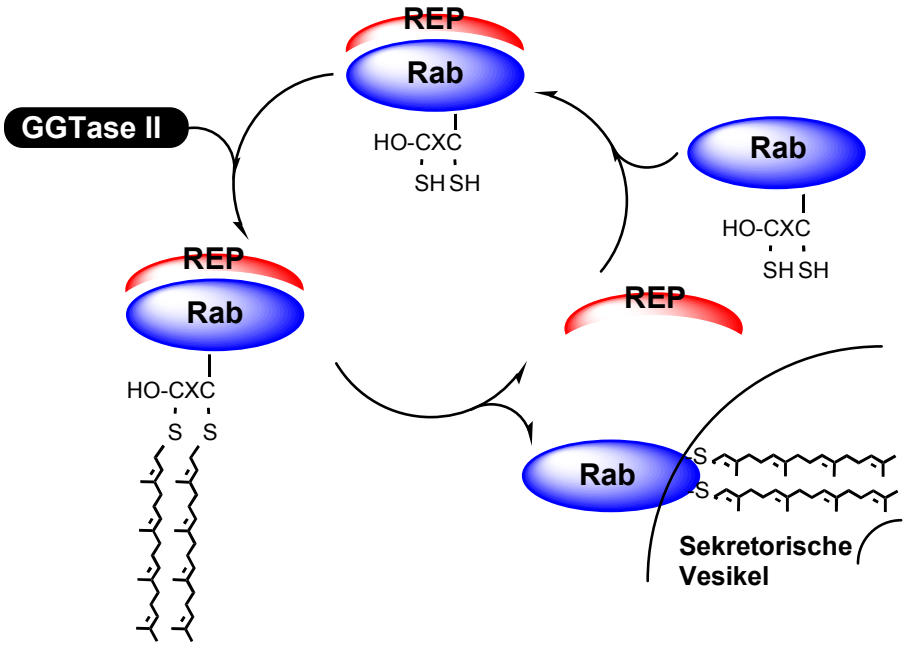
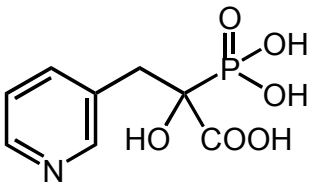
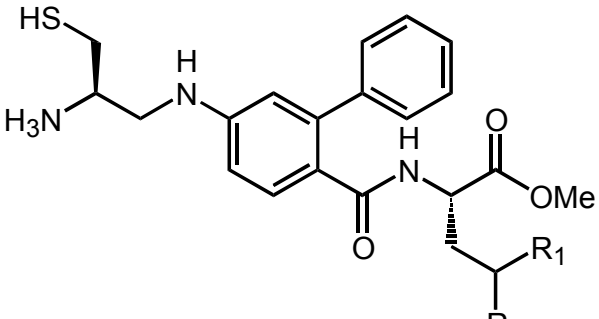


Abbildung 4: Intrazelluläre Modifizierung der Rab-Proteine durch Geranylgeranylierung der *C*-terminalen Cysteineinheiten

Nach der Übertragung der Geranylgeranylgruppen bleibt REP an das Rab gebunden und eskortiert es an seine Zielmembran.[49] Die über 60 verschiedenen Rab-Proteine sind an unterschiedlichen intrazellulären Membranen lokalisiert. Wie sie an ihre jeweilige Zielmembran gesteuert werden, ist noch weitgehend ungeklärt.[33]
Inzwischen konnten Inhibitoren entwickelt werden, die selektiv einzelne Transferasen inhibieren. So sind FTI-277[50;50] und GGTI-286[51] spezifische FTase- bzw. GGTase-Inhibitoren (Abbildung 5).



NE 10790



FTI-277: R_1 = H, R_2 = SMe
GGTI-286: R_1 = Me, R_2 = Me

Abbildung 5: Selektive GGTase- und FTase-Inhibitoren

Ein erstes Beispiel für einen spezifischen GGTase-II Inhibitor stellt NE10790 dar, das ein interessantes Wirkprofil bei postmenopausaler Osteoporose aufweist, weil

Osteoklasten auf ein Rab-abhängiges intrazelluläres *Membrane trafficking* angewiesen sind.[52]

2.2.2 Palmitoylierung

N-Ras und H-Ras sind am *C*-Terminus neben dem farnesylierten Cystein ein- bzw. zweifach palmitoyliert. Über den enzymatischen Mechanismus der Palmitoylierung ist bisher wenig bekannt.[53;54] Es gibt keine Konsenssequenz, die das Protein für eine Palmitoylierung bestimmen würde.[55] Allerdings müssen sie, um palmitoyliert werden zu können, eine Membranaffinität, wie beispielsweise durch einen Farnesylrest, aufweisen.

Die einzige bisher klonierte Palmitoyltransferase, die H-Ras als Substrat akzeptierte[54] und bereits als Durchbruch zur Auffindung des „*Mystery Enzyme*“[56] gehandelt wurde, erwies sich jedoch nach Sequenzierung und Datenbankvergleich als bereits klonierte peroxisomale 3-oxoacyl-CoA Thiolase A, d.h. als ein Enzym der Fettsäure-β-Oxidation.[57] Da Thiolasen in Organellen wie Mitochondrien und Peroxysomen lokalisiert sind, ist ihre Relevanz für Ras nicht ersichtlich.[58]

Das Bild wird noch zusätzlich durch Ergebnisse von Duncan *et al*. kompliziert, die zeigen konnten, dass die Palmitoylierung bei physiologischen Bedingungen *in vitro* ein nicht-enzymatischer, autokatalytischer Prozess sein kann.[28] So zeigten Silvius *et al*., dass aufgrund der ähnlich geringen Stabilität der Acyl-CoA und der Acyl-Cysteinbindung eine nichtenzymatische Transacylierung zwischen Cystein-haltigen Peptiden und Coenzym A in der Gegenwart von Membranen möglich ist.[59]

Dass die Theorie der Autopalmitoylierung von Ras kritisch zu prüfen ist, kann am Beispiel des palmitoylierten Proteins p59 fyn[60] gezeigt werden, bei dem eine *in vitro* beobachtete Autopalmitoylierung *in vivo* nie auftritt. Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit ist viel zu langsam für die schnelle Palmitoylierung *in vivo*.[58]

Mehr Erkenntnisse liegen für Palmitoyl-Protein-Thioesterasen vor. Zwei lysomale Thioesterasen (PPT1[61], PPT2[62]) und eine cytosolisch lokalisierte Acyl-Protein-Thioesterase (APT-1[63]) sind isoliert, kloniert und kristallisiert worden.[64] Inwieweit sie durch Deacylierung von Signalproteinen deren Membranverankerung regulieren und dadurch in die Signaltransduktion eingreifen, muß noch geklärt werden.

2.2.3 Weitere Prozessierung durch Proteolyse und Carboxymethylierung

Während die Rab-Proteine nach der doppelten Isoprenylierung durch die GGTase-II keine weiteren Modifikationen erfahren, werden alle CAAX-Box Proteine durch mindestens zwei zusätzliche Enzyme modifiziert, wobei anscheinend keine Unterscheidung zwischen farnesylierten und geranylgeranylierten CAAX-Proteinen gemacht wird.[31] Zunächst werden die letzten drei Aminosäuren (-AAX) proteolytisch entfernt, und anschließend wird das isoprenylierte Cystein an der Carboxylgruppe methyliert. Dieser Reifungsprozess wurde für Ras-Proteine zuerst beschrieben.[65] Durch genetische Methoden wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zwei für Isoprenylproteine spezifische Metalloproteasen identifiziert: das für das Hefehormon a-Faktor spezifische STE24/AFC1 und das u.a. für Ras spezifische hRCE1.[66] Die Bedeutung dieses Enzyms lässt sich daran ablesen, dass ein *knockout* von RCE1 bei Mäusen im späten embryonalen Stadium tödlich ist.[67] Beide Proteine sind im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert.[68]

Ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert sind die Isoprenylcystein spezifischen Carboxymethyltransferasen Ste14p[69] aus Hefe und pcCMT[70] aus Säugerzellen. Der Cofaktor für beide Enzyme ist *S*-Adenosyl-Methionin. Vermutlich dient die Generierung der Methylestergruppe lediglich zur Wahrung des lipophilen Charakters des *C*-Terminus von Ras. So treten durch das Ausschalten des Ste14-Proteins nur geringe Effekte auf die Ras-Lokalisation und -Funktion auf.[71;72]

Für die spezifische Bindung von isoprenylierten Proteinen an ihre Zielmembran sind diese drei Prozessierungsschritte nicht ausreichend, zumal die CAAX-Modifikationen verschieden lokalisierter Proteine einheitlich sind.[73] Das zweite Signal, das sowohl zur festen Bindung an biologische Membranen als auch zur Festlegung der spezifischen Adressierung in verschiedene Membrankompartimente dient, kann die zusätzliche Modifikation durch Palmitoylierung, wie z.B. bei H- und N-Ras, oder eine polybasische Domäne am *C*-Terminus des Isoprenylproteins, z.B. K-Ras 4B oder Rap1, sein.[2;74] Die Proteinadressierung der Ras-Proteine ist Teil des folgenden Abschnitts, in dem das kleine GTP-bindende Protein Ras näher beleuchtet wird.

2.2.4 Membranassoziation und Membranadressierung von Ras

Der Weg, wie Ras die Plasmamembran erreicht, ist umstritten (Abbildung 6). Zur Zeit werden zwei Modelle diskutiert.

Das auf der Basis kinetischer Daten von lipidierten Peptiden für palmitoylierte Proteine wie H- und N-Ras formulierte Modell der Membranfalle (*membrane trapping*) geht von der schnellen Adsorption und Desorption von farnesyliertem Ras an intrazellulären Membranstrukturen aus.[75] Die für die *S*-Palmitoylierung notwendige spezifische Palmitoyltransferase ist spezifisch in der Plasmamembran lokalisiert und verstärkt mit der zweiten hydrophoben Modifizierung die Membranbindung erheblich, sodass ein Verlassen der Zielmembran ohne vorherige Hydrolyse des Fettsäurerests nahezu unmöglich wird.

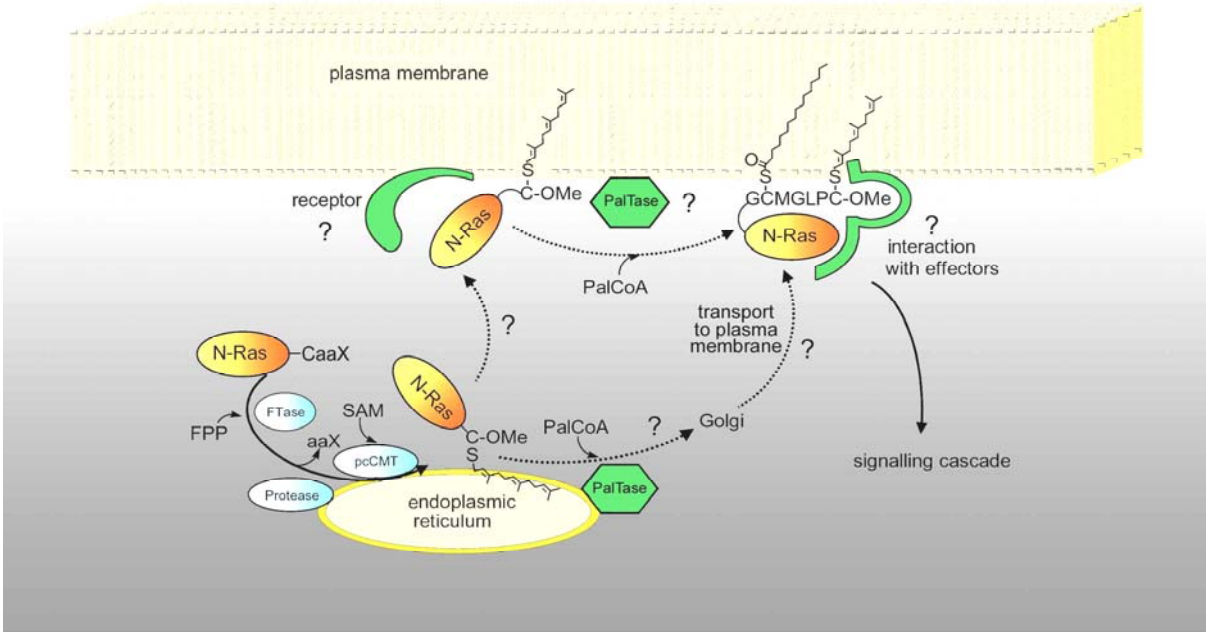


Abbildung 6: Posttranslationale Reifung von Ras-Proteinen[76]
pcCMT: Proteocytosolische Carboxymethyltransferase; SAM: *S*-Adenosyl-Methion; PalCoA: Palmitoyl-Coenzym A; PalTase: Palmitoyltransferase

Begründet durch die Entdeckung, dass mindestens zwei der für die posttranslationale Reifung erforderlichen Proteine in Endomembransystemen lokalisiert sind, wurde als Alternativmodell zur Adressierung von Ras an die

Zellmembran ein vektorieller vesikulärer Transport über den Golgi-Apparat angenommen.[68;70] In verschiedenen, unabhängigen Transfektionsexperimenten wurde die Lokalisation verschiedener Ras-Proteine als Fusion mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) in lebenden Zellen beobachtet.[67;77] Es konnte gezeigt werden, dass H- und N-Ras fünf bis acht Stunden nach der Translation mit dem intrazellulären Membransystem (ER- und Golgi-Apparat) assoziiert sind, was auf die Lokalisation der CaaX-Protease und der Methyltransferase in diesen Zellkompartimenten zurückgeführt wurde.[68;70] Der weitere Transport an die Zellmembran ist eng mit dem vesikulären Transport verbunden und konnte mit Brefeldin A (BFA), das selektiv den Golgi-Apparat zerstört, unterbunden werden. Da mit BFA allerdings nur der Transport zur Plasmamembran, nicht jedoch die Palmitoylierung von GFP-H-Ras inhibiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass eine Ras-Palmitoyltransferase in frühen Kompartimenten des exocytischen *pathways*, wie dem Endoplasmatischen Retikulum, zu finden sein müßte. Nach 12 bis 18 Stunden war sowohl eine intensive Fluoreszenz assoziiert mit den schnell beweglichen peri-Golgi Vesikeln als auch eine Plasmamembran-Lokalisation zu beobachten. Diese Fluoreszenzverteilung wurden nicht mit Mutanten erhalten, in denen das CAAX-Cystein C^{186} oder das zu palmitoylierende Cystein C^{181} zu einem Serin mutiert wurde. Stick *et al*.[73] und Choy *et al*.[78] zeigten, dass die letzten elf Aminosäuren von N-Ras die Signalsequenz für das korrekte Erreichen des Golgi, der peri-Golgi-Vesikel und der PM darstellen. So konnten bereits lediglich durch den zusätzlichen Einbau einer Kernlokalisations(NLS)-sequenz, wie sie sich bespielsweise in Kernlaminen befindet, N-Ras-Proteine an innere Kernmembranen fehlgeleitet werden.

Transfektionsuntersuchungen von Silvius *et al.* unter Verwendung von *Enhanced green fluorescent Protein* (EGFP) mit der carboxyterminalen K-Ras 4B-Sequenz[79;80] zeigen, dass im Gegensatz zu H- und N-Ras K-Ras 4B nicht über vesikulären Transport an die Zellmembran gelangt, obwohl die Proteolyse und die Carboxymethylierung wie bei H- und N-Ras an intrazellulären Membranen erfolgen. Der Lokalisationsmechanismus von K-Ras könnte im einfachsten Fall auf den elektrostatischen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden an der Zellmembran beruhen. Dies erklärt auch, warum BFA keinen Einfluss auf die korrekte Lokalisierung von K-Ras hat. Nach der Prozessierung würde K-Ras durch passive, gleichgewichtskontrollierte Diffusionsprozesse zwischen seiner cytosolischen und seiner transient an verschiedene, anionisch geladene

intrazelluläre Membranen gebundenen Form in einer Zufallsverteilung die PM erreichen.[81-83]

Gegenwärtig fokussiert sich ein Teil des Interesses auf Querverbindungen zwischen Vorgängen der Signaltransduktion und der Subkompartimentierung der Plasmamembran. So vermuten Hancock *et al.*, dass im Falle von H- und N-Ras der vesikuläre Transport dem Erreichen von weniger als 100 nm kleinen, sogenannten Lipidflößen (*lipid-rafts*) dient.[84] Als essentielles Signal könnte der Palmitoylrest dienen.[85] Die *rafts* können als Cholesterol- und Glycosphingolipid-reiche Domänen der PM in *caveolae*, kleinen Einstülpungen der Zellmembran, die Proteine der Signaltransduktion und die das Protein Caveolin anreichern, koaleszieren. Sie dienen als Signalplattformen[86] und ermöglichen Interaktionen diverser Signalproteine, wie z.B. Tyrosinkinasen, Kinasen der Src familie, G-Protein-Untereinheiten[87;88] und die EGF-stimulierte Aktivierung des Ras-Raf Weges[89]. Daher ist die Funktionstüchtigkeit von H- und N-Ras essentiell von der Lokalisation in den *lipid-rafts* abhängig.[84;90]

2.3 Ras als molekulares Ziel für die Entwicklung von Antitumorwirkstoffen

In der Entwicklung von Antitumorwirkstoffen wurden bis heute mehrere Ansätze verfolgt, die auf das Verhindern transformierender Aktivitäten durch mutierte Ras-Proteine zielen.[91]

(I) Die Unterbrechung des Reifungsprozesses von „normalem“ und onkogenem Ras stellt eine Möglichkeit für das Unterbrechen aberranter Wachstumssignale dar. Der Eingriff kann an jedem Prozessierungsschritt erfolgen. So sind Ras-Farnesyltransferaseinhibitoren,[92-98] die das CAAX-Motiv,[99] Farnesylpyrophosphat FPP[100-102] oder als Bisubstratinhibitoren[103-107] beide Motive imitieren, entwickelt worden. Derzeit sind mindestens vier FTase-Inhibitoren in der dritten und damit letzten klinischen Testphase. Allerdings wurde herausgefunden, dass die Zelle durch Ras-Geranylgeranylierung die fehlende Farnesylierung teilweise kompensiert.[108;109] Die beobachtete Wachstumshemmung ist vermutlich in der Inhibition der korrekten Prozessierung von RhoB und dem Ras-ähnlichen Rheb begründet.[110;111]

(II) Die Aktivierung von Ras-Proteinen findet durch den Austausch von GDP gegen GTP statt. Verhindert man den Austausch des Nukleotids, könnte man Ras blockieren.

(III) Der onkogene Wirkmechanismus einiger Ras-Mutanten beruht darauf, dass das Einwirken von RasGAPs verhindert und damit ein Ausschalten von Ras gestört wird. Die Stimulierung der intrinsischen GTPase-Aktivität von onkogenem Ras würde das entstandene permanente Wachstumssignal regulieren.
(IV) Könnte durch Antagonisten die Stimulation der abwärts in der Signaltransduktionskaskade gelegenen Proteine inhibiert werden, würde ein Signal durch transformiertes Ras nicht übertragen werden können. Sulindac-Sulfid stellt ein Beispiel für diese Klasse der Anti-Ras-Wirkstoffe dar, das die Ras-Raf-Wechselwirkung inhibiert.[112-114]

Ein neuartiger Ansatz, der Punkt (I) zuzuordnen ist, ist die Inhibierung der Palmitoylierung. Er könnte eine neue Alternative für die Regulation der PM-Lokalisierung und damit der biologischen Aktivität von H- und N-Ras eröffnen. C. Smith *et al.* geben an, dass der Naturstoff Cerulenin (Abbildung 7) die Ras-Palmitoylierung verhindern kann.[115-118]

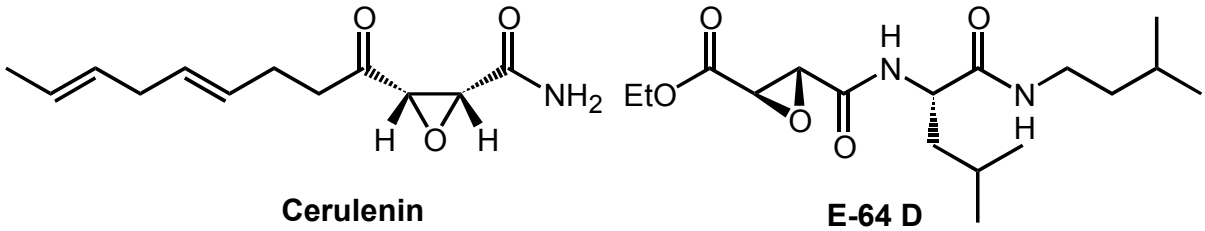


Abbildung 7: Strukturen biologisch-aktiver Epoxysuccinate

Allerdings inhibiert es ebenfalls die für die Fettsäuresynthese essentielle β-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase (KAS),[119-122] indem es den Übergangszustand der Fettsäurekondensation nachahmt. Es ist mit seiner Epoxyeinheit in dem Oxyanion-Loch und mit der C_8-Dienkette in einer hydrophoben Tasche der KAS lokalisiert und alkyliert so irreversibel die katalytisch bedeutende Cystein^{163}-Thiolgruppe (Abbildung 8).[121;123]
Epoxysuccinate wie Cerulenin lassen sich durch eine Variierung ihrer Substituenten für ihre Anwendung maßschneidern. So wurde das Cerulenin-verwandte E-64D (Abbildung 7) gegen muskulare Dystrophie unter dem Namen Loxistatin^{TM} von dem japanischen Pharmakonzern Taisho auf den Markt gebracht.[124;125] Dieser Wirkstoff

bindet irreversibel als Inaktivator an das aktive Zentrum der Cysteinprotease Calpain B.

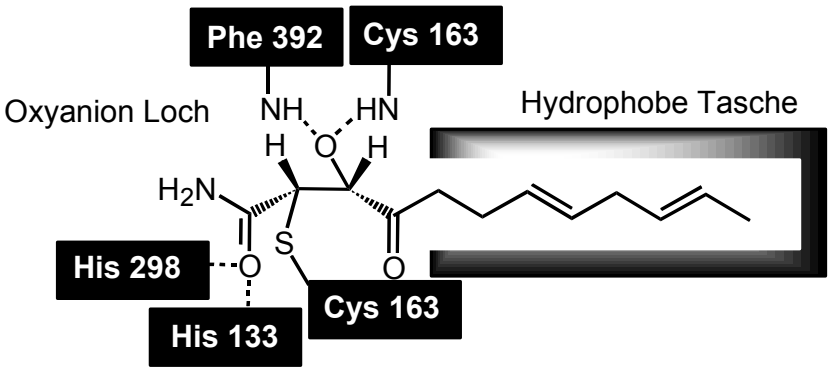


Abbildung 8: Prinzip der β-Ketoacyl-ACP-Synthase-Inhibition durch Cerulenin

Aufgrund der hohen potentiellen Wirkbreite von Cerulenin-Analoga ist die Entwicklung selektivitätsoptimierter Analoga, z.B. aromatischer Analoga[117] als Ras-Palmitoylierungsinhibitoren sehr vielversprechend.

2.4 Bioorganische Synthese von neo-Proteinen

Wie am Beispiel des Ras-Proteins erläutert, wird die biologische Funktion eines Proteins nicht allein durch die im Gen codierte Aminosäuresequenz, sondern oftmals erst durch bestimmte posttranslationale Modifikationen bestimmt. Die Einführung posttranslationaler Modifikationen, wie Phosporylierungen, Glycosylierungen, Isoprenylierungen oder Acylierungen ist ein Charakteristikum von eukaryontischen Organismen. In Prokaryonten, wie *E. coli*, tritt diese Form der Prozessierung von Proteinen nicht auf. Möchte man rekombinante Proteine samt der posttranslationalen Modifikationen exprimieren, muss dies in einem eukaryontischen Expressionssystem, wie Insekten- oder COS-Zellen, geschehen.[126] Dies ist jedoch aufgrund der langwierigen Aufreinigung der empfindlichen Produkte mit einem enormen Arbeitsaufwand, geringen Ausbeuten und hohen Kosten verbunden.

Einen Ausweg bietet ein semisynthetischer Ansatz zur Synthese von posttranslational modifizierten Ras-Proteinen. Der *C*-terminale Teil des Proteins samt seiner Modifikationen wird zunächst über organische Peptidsynthese[127] aufgebaut und anschließend an das verkürzte Ras-Protein aus bakterieller Produktion gekoppelt. Ein grosser Vorteil dieses semisynthetischen Ansatzes ist, dass je nach biologischer Fragestellung zusätzliche, nicht native Modifikationen über das

synthetisierte Peptid in das Protein eingebracht werden können, wie beispielsweise Fluoreszenzmarker[42] oder Photoaffinitätsmarker[128].

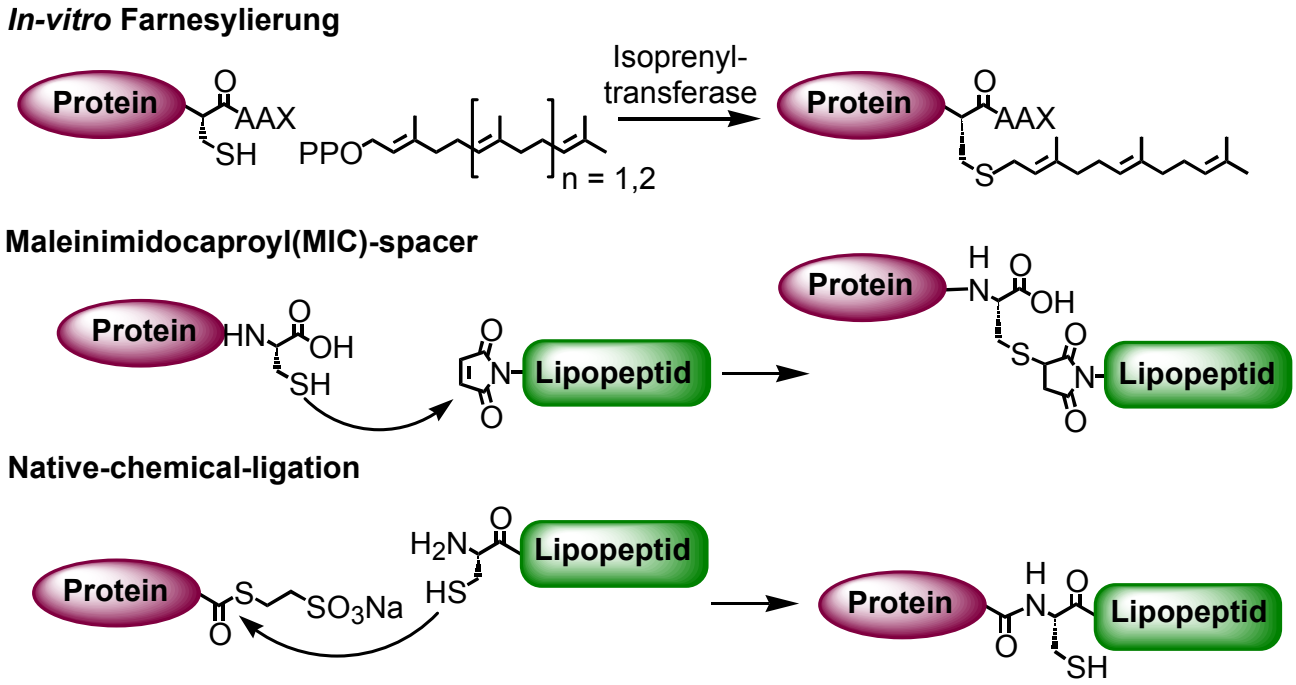


Abbildung 9: Strategien zur Synthese künstlicher Proteinkonjugate

Bisher sind drei Möglichkeiten gefunden worden, um künstliche Lipopeptid-Protein-Konjugate zu generieren (Abbildung 9). Erstens können modifizierte Lipide über Biokatalysatoren eingeführt werden. So können sowohl Ras[44;129] als auch Rab-Proteine[130;131] *in vitro* mit Hilfe der Farnesyltransferase mit artifiziellen Isoprenoiden modifiziert werden. Auch die *in vivo*-Alkylierung von bakteriell exprimiertem H-Ras in *Xenopus Oocyten* nach Inhibierung der endogenen FPP-Biosynthese und Injektion künstlicher FPP-Analoga, konnte erreicht werden.[44] Dies stellt jedoch keinen generellen Ansatz für die Synthese von neo-Proteinen dar, da Grenzen durch die Substratselektivität des Biokatalysators und der Menge der darstellbaren Proteine gesetzt werden. In einem zweiten Ansatz können synthetisierte Lipopeptide mit Hilfe eines Maleinimidocaproyl (MIC)-Linkers an verkürzte Proteine geknüpft werden. Der dritte Weg nutzt das Prinzip der *native chemical ligation*, bei der Proteine, die aus der *expressed protein ligation* erhalten wurden, mit Lipopeptiden gekoppelt werden. Im folgenden wird auf die letzten beiden Methoden eingegangen.

2.4.1 Kopplung von aktivierten Lipopeptiden über den MIC-Linker

Das zu koppelnde Lipopeptid wird mit einer Maleinimidocaproylgruppe (MIC) *N*-terminal als Thiolgruppen-spezifische elektrophile Gruppe aktiviert, die selektiv mit der endständigen Solvens-exponierten Cystein-Thiolgruppe des verkürzten Ras-Proteins unter Ausbildung eines stabilen Thioethers reagiert.[42;43;132] Die Kopplung verläuft in einem Detergenzpuffer in hohen Ausbeuten; danach werden die Reaktionsprodukte durch einfache Detergens-Extraktion und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Mit dieser Methode konnte eine Reihe von Ras-Proteinen mit verschiedenen Lipidierungsmustern in Multimilligrammmengen und in hoher Reinheit synthetisiert werden.[42]
Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Bindung zwischen Protein und Peptid über den MIC-Linker nicht der nativen Verknüpfung entspricht. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass diese Protein-Peptid-Konjugate aus H-Ras$^{1-181}$ und entsprechenden *C*-terminalen Lipopeptiden wie natürliches H-Ras mit Effektorproteinen, wie z.B. der Raf-Kinase, wechselwirken können und *in vivo* ihre biologische Aufgabe als molekularer Schalter in der Signalübertragung wahrnehmen.[43]

2.4.2 Intein-vermittelte Protein Ligation (IPL)/ *Expressed Protein Ligation* (EPL) und *Native Chemial Ligation*

Neben dem schon seit längerem bekannten Spleißen der mRNA, dem Herausschneiden einer internen Nukleotidsequenz (Intron) und der erneuten Ligation der flankierenden Segmente (Exons) (Abbildung 10), wurde 1990 eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation entdeckt: das Protein-Spleißen.[133;134] Hierbei werden interne Polypeptidsequenzen, in Analogie zum mRNA-Spleißen Inteine genannt, posttranslational aus einer Proteinvorstufe durch eine autokatalytische Reaktion entfernt. Inteine gehören zu einer Familie enzymähnlicher Proteine, die chemische Reaktionen nach den gleichen Strategien wie Enzyme katalysieren, aber nicht unterschiedliche Substrate umsetzen. Die ca. 150 Aminosäuren lange Domäne, die das Spleißen katalysiert, löst intramolekular ohne exogene Cofaktoren[135;136] die Spaltungen der Peptidbindungen an den *N*- und *C*-terminalen Spleißstellen aus. Gleichzeitig katalysiert sie die Bildung einer neuen Peptidbindung zwischen den flankierenden Polypeptiden, den Exteinen (Abbildung 10).[137] Alle für die Spaltung

notwendigen Informationen sind in der Polypeptidkette der Inteine, von denen bereits fast 100 identifiziert worden sind, und der ersten Extein-Aminosäure an der *C*-terminalen Spleißstelle enthalten. [135;136;138-142]

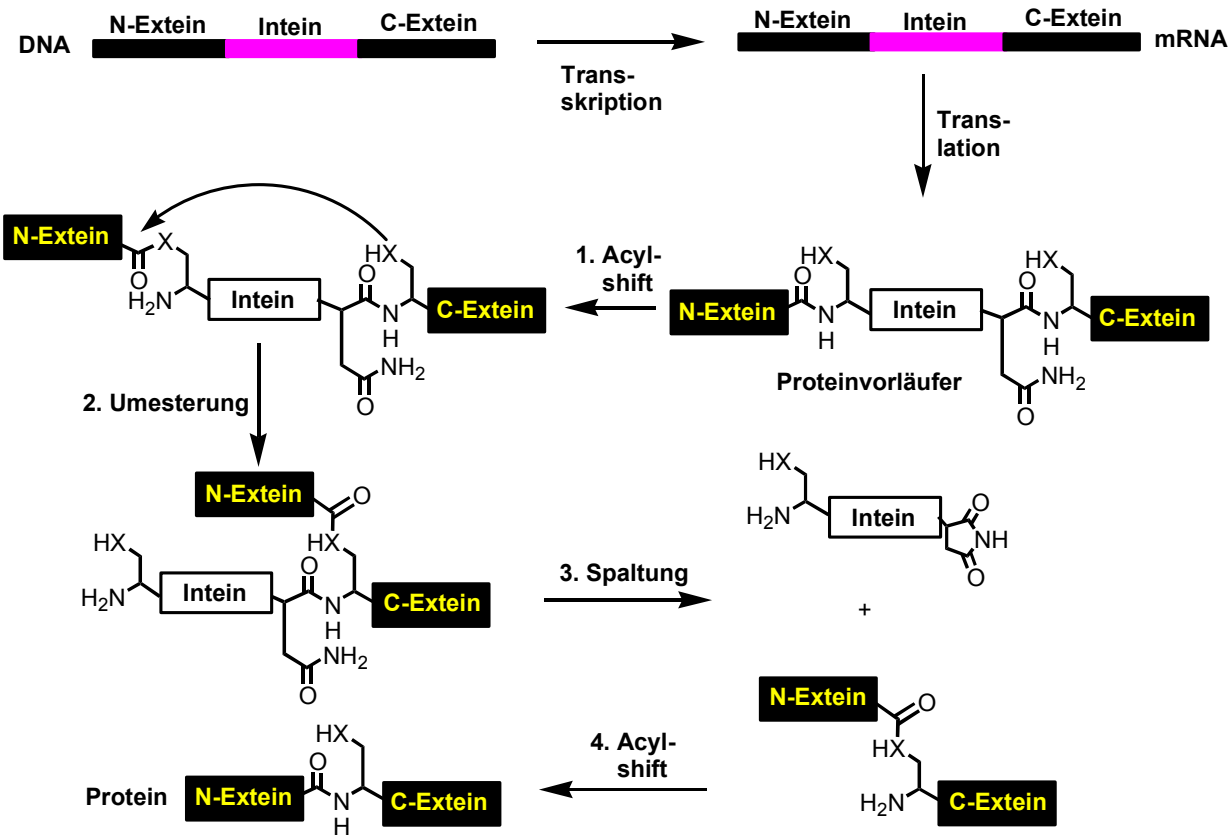


Abbildung 10: Genereller Protein-Spleißvorgang. Inteine spleißen als Proteine, nicht als RNA. X= O, S.

Der weithin akzeptierte Mechanismus der Protein-Spleiß-Reaktion besteht aus vier Schritten:

(I) Die Seitenkette des ersten Intein-Aminosäurerestes (Ser, Thr oder Cys) greift die Carbonylgruppe des in der Sequenz unmittelbar vorhergehenden Aminosäurerestes an, wodurch es zu einer Acyl-Verschiebung vom *N*-Extein an die Seitenkette des ersten Intein-Aminosäurerestes kommt. Dieser Angriff wird durch die proximale Extein-Aminosäure und die Faltung des Inteins beeinflusst.

(II) Es findet eine Umesterungsreaktion statt, bei der die Hydroxy- oder Thiolgruppe des ersten *C*-Extein- Aminosäurerestes (Ser, Thr oder Cys) die Thioesterbindung angreift. Das Ergebnis ist die Übertragung des *N*-Exteins auf die *C*-terminale Spleißstelle.

(III) Die Amidbindung am *C*-Terminus des Inteins wird durch Zyklisierung von Asparagin unter Freisetzung des Inteins gespalten.
(IV) Die Thioesterbindung zwischen den verbundenen Exteinen lagert sich zur stabileren Peptidbindung um.
Von zentraler Bedeutung für die IPL ist die dem Intein-Protein benachbarte erste Aminosäure der *N*-Extein-Sequenz. Obwohl diese an der *N*-terminalen Spleißstelle nicht aktiv als Nucleophil oder unterstützende Gruppe an der Spleißreaktion beteiligt ist, ist ihr Carbonyl-Kohlenstoffatom das Ziel von drei der vier nucleophilen Substitutionen. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass proximale *N*-Exteinreste die Spleißreaktion hemmen oder blockieren können.[138;140;143-145] Aufgrund dieser Beobachtungen kann man vermuten, dass Inteine sich zusammen mit ihren Exteinsequenzen dahin gehend entwickelt haben, dass die Spleiß-Effizienz maximiert wurde.
Auf der Grundlage der IPL/ EPL wurde in den letzten Jahren von der Firma New England Biolabs das IMPACT® (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) ein Protein-Reinigungssystem entwickelt, mit dem *C*-terminal aktivierte Proteine synthetisiert werden (Abbildung 11).[146-149] Dieses Zielprotein wird hierbei als Fusion mit einem Intein und zur einfachen Reinigung mit einer Chitin-Bindedomäne der Chitinase A1 von *Bacillus circulans* WL-12[148;150] als Affinitäts-Marker exprimiert, der mit hoher Affinität an ein mit Chitin (β-(1-4) *N*-acetyl Glucosamin) beladenes Säulenmaterial bindet. Um die induzierbare Selbstabspaltungsaktivität des Proteinspleißelements Intein zur Abspaltung von Fusionsproteinen auszunutzen, wurde durch gerichtete Mutation das Intein derart verändert, dass die Abspaltung des *N*-terminalen Exteins nur durch Thiolreagenzien wie Dithioerytrithol (DTE), Thiophenol, β-Mercaptoethanol oder Mercaptoethansulfonsäure (MESA) induziert werden kann.[151] Bei dem IMPACT-System kann anstelle des *N*-Exteins ein Protein exprimiert werden, das durch Thiole abgespalten werden kann. Das erhaltene, über einen Thioester aktivierte Protein, kann nun in einer *native chemical ligation*[152-155] durch die Thiolgruppe des *N*-terminalen Cysteins des zu koppelnden Peptids angegriffen und unter Ausbildung eines neuen Thioesters gespalten werden. Abschließend erfolgt ein letzter Acylshift, der die Ausbildung der nativen Peptidbindung zwischen Protein und Peptid generiert (Abbildung 11).

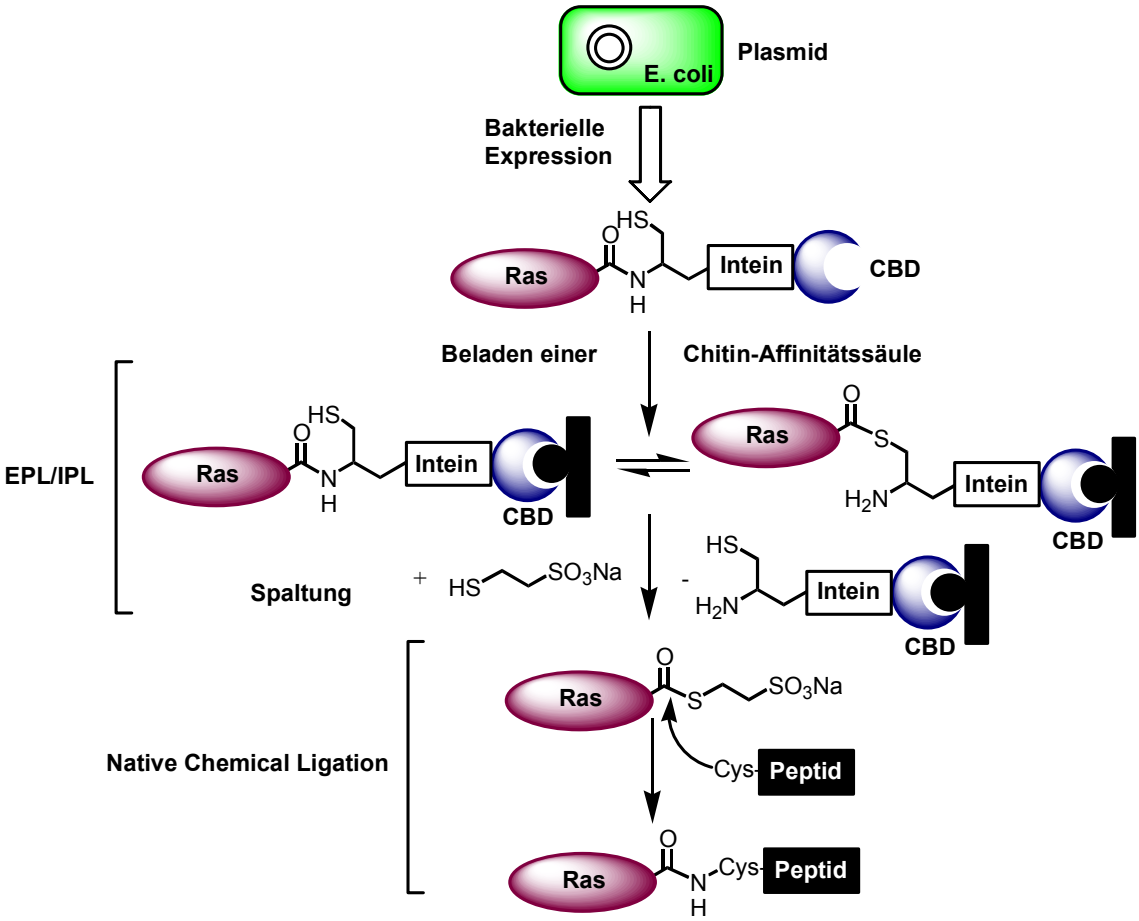


Abbildung 11: IMPACT-System zur Reinigung von Proteinen und nachfolgende *native chemical ligation*

Die *native chemical ligation* bietet einen vielversprechenden Ansatz, posttranslationale Modifikationen, Peptide und molekulare Sonden in Proteine einzuführen, beispielsweise fluoreszierende Biosensoren,[156;157] cytotoxische Proteine, Isotopenmarkierungen für die NMR-Spektroskopie,[138] Nucleopeptide,[158] Lipopeptide[159] und Glycopeptide[160] (Abbildung 11). Eine Erweiterung in den Anwendungsmöglichkeiten wird zur Zeit durch Auxiliar-assistierte Ligationsmethoden erreicht, in denen das zu koppelnde Peptid kein *N*-terminales Cystein mehr aufweisen muss.[161]

Für die Synthese von neo-Ras-Proteinen wurde die *native chemical ligation* noch nicht verwendet. Die so generierten Ras-Proteine könnten wertvolle Alternativen für die nach der MIC-Ligation erhaltenen Konjugate darstellen.

3 Aufgabenstellung

Molekulare Prozesse in der Signaltransduktion zeichnen sich durch eine hohe Komplexität aus. Um diese Vorgänge genauer studieren zu können, werden meist Partialstrukturen der beteiligten Proteine aufgebaut und diese hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften untersucht.
Das Ras Protein ist ein zentraler Schalter in der Wachstumskontrolle von Zellen. Um die Auswirkungen der posttranslationalen Modifikationen dieses Proteins im lebenden Organismus studieren zu können, sollte erstmalig auf einem chemischen Weg eine *in-vivo* detektierbare Fluoreszenzmarkierung des 186 Aminosäuren umfassenden N-Ras-Proteins erreicht werden (Abbildung 12).

Daher war eine Synthesestrategie für neo-Ras-Proteine auszuarbeiten, mit der biologisch aktive fluoreszenzmarkierte N-Ras Proteine generiert werden können. Dabei musste beachtet werden, dass einzelne *C*-terminale Aminosäuren austauschbar sind, die Länge der Isoprenkette variiert werden kann und die eingeführten Fluorophore dem intensiven Licht der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie standhalten.

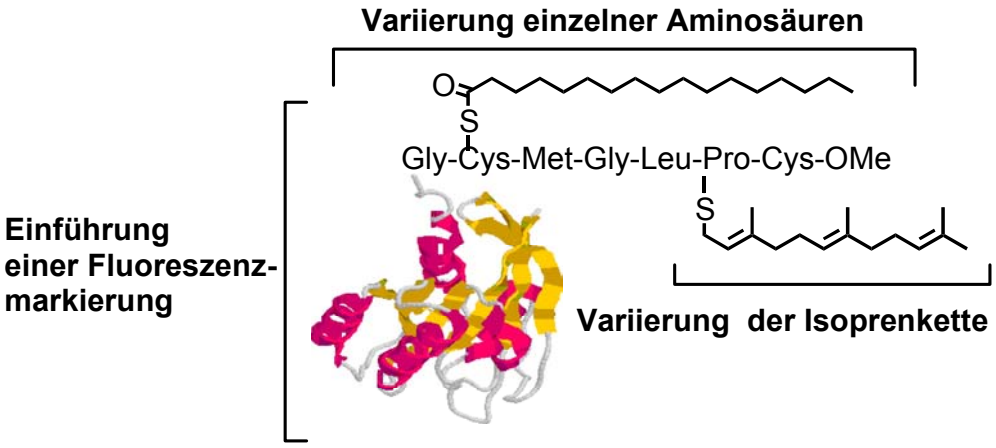


Abbildung 12: Syntheseanforderungen an neo-Ras-Proteine

Anhand der erhaltenen unterschiedlich lipidmodifizierten neo-Ras-Proteine könnte dann der genaue Einfluss dieser Lipidmodifikationen auf die Membranlokalisierung und die biologische Aktivität der Konjugate untersucht werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollte die Rolle der Ras-Palmitoylierung im Mittelpunkt stehen. Da onkogene Ras-Proteine zu einem bedeutenden Teil zur Krebsentstehung beitragen, könnten durch Verhinderung der vollständigen posttranslationalen Reifung Krebserkrankungen behandelt werden. Der Naturstoff Cerulenin (Abbildung 13), ein fungaler Metabolit, der aus dem Filtrat einer Kultur von *Cephalosporium caerulens* isoliert wurde,[162] kann die Palmitoylierung von Ras verhindern.[115-118] Der medikamentöse Einsatz der Verbindung ist jedoch aufgrund seiner nicht zwischen Krebszellen und gesunden Zellen unterscheidenden Zytotoxizität unmöglich.

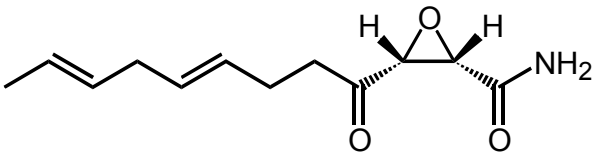


Abbildung 13: Struktur des Ras-Palmitoylierungsinhibitors Cerulenin

Im Rahmen der Arbeit sollte daher eine kombinatorische Synthese zur Darstellung einer Bibliothek von Cerulenin-Analoga als potentielle Anti-Krebsmittel entwickelt werden, mit der die beschriebene unselektive Toxizität überwunden werden kann.

Im dritten Abschnitt der Arbeit sollte ein Zugang zur Synthese von Analoga der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat entwickelt werden (Abbildung 14). Hydrolysestabile Analoga könnten als wertvolle Reagenzien für die Kristallisation verschiedener Isoprenyltransferkomplexe dienen.

Die posttranslationale Reifung von Ras-Proteinen kann neben der Inhibierung der Palmitoylierung ebenfalls durch die Inhibierung der Farnesylierung unterbunden werden. Fluoreszenzmarkierte Isoprenylanaloga könnten als Werkzeuge in einem *in vitro*-Assay zur Untersuchung der Wirksamkeit von Transferase-Inhibitoren dienen.

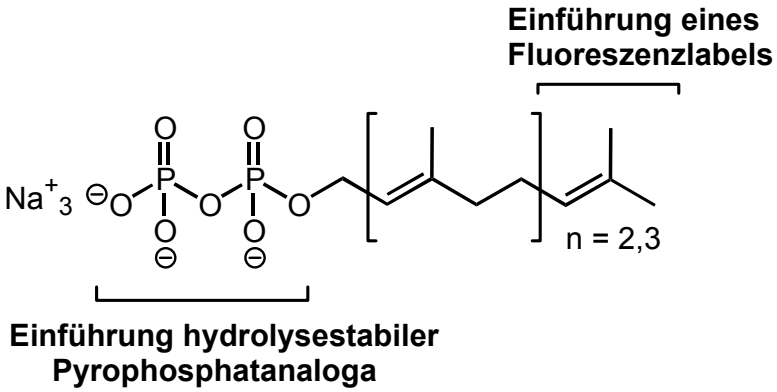


Abbildung 14: Synthese diverser Isoprenoidpyrophosphatanaloga

4 Spezieller Teil

4.1 Neo-Ras-Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene fluoreszenzmarkierte neo-N-Ras-Proteine zur Untersuchung biologischer Fragestellungen mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.
Das menschliche N-Ras-Protein ist nach erfolgter Prozessierung 186 Aminosäuren lang und trägt am *C*-Terminus zwei charakteristische Lipidierungen: An Cys^{186} ist ein Farnesylrest als Thioether gebunden, die Säurefunktion ist als Methylester geschützt und an Cys^{181} ist Palmitinsäure als Thioester gebunden.

Bei der zu entwickelnden Strategie zur Synthese von fluoreszenzmarkierten neo-Ras-Proteinen mussten folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden (Abbildung 15):

(I) Die Position 181 muss zur Untersuchung der Rolle der Palmitoylierung gegen *in vivo* nicht palmitoylierbare Aminosäuren wie Serin auswechselbar sein. Die Verknüpfung zwischen dem daher benötigten *C*-terminalen

Fragment und dem verkürztem Ras-Protein muss ohne Störung der biologischen Aktivität des neo-Ras-Proteins in hohen Ausbeuten, im Milligrammmaßstab und ohne irreversible Denaturierung der Proteinstruktur durchführbar sein.

(II) Der einzuführende Fluoreszenzmarker darf keine Störung der biologischen Aktivität des neo-Ras-Proteins ausüben. Daher war die Verwendung sehr kleiner Fluorophore von zentraler Bedeutung.

(III) Die Synthesestrategie muss die einfache Einführung verschiedener Fluorophore ermöglichen.

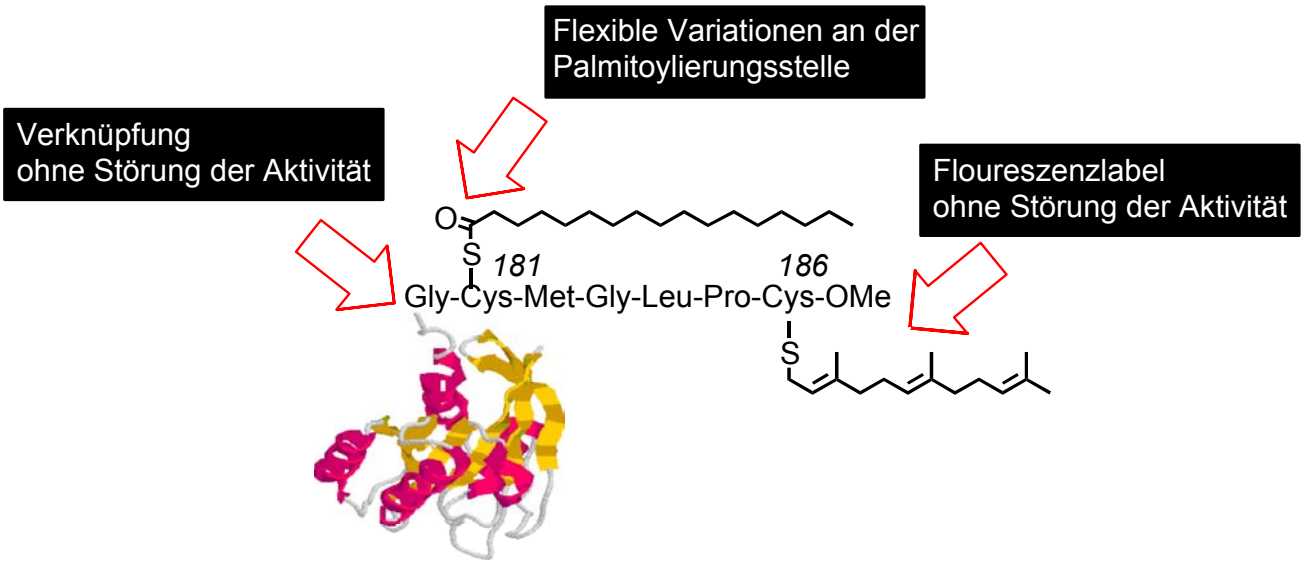


Abbildung 15: Anforderungen an fluoreszenzmarkierte neo-Ras-Proteine

(IV) Um die neo-Ras-Proteine *in vivo* detektieren zu können, müssen die verwendeten Fluoreszenzmarker den hohen Anforderungen der konfokalen Laserspektroskopie genügen. Dazu gehören hohe Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten sowie eine enge Anregungs- und Emissionsbandbreite. Weiterhin muss bei der Einwirkung des intensiven Laserlichtes eine maximale Stabilität gegen Ausbleichen gewährleistet sein. Von grundlegender Bedeutung war ebenfalls, dass die Emissionswellenlängen der Fluorophore nicht mit der Autofluoreszenz der Zelle durch endogene Fluorophore wie NADH, der reduzierten Form von Nicotinamidadenindinukleotid interferieren.

Um diese vier Anforderungen erfüllen zu können, wurden drei verschiedene Strategien entwickelt und verwendet. Sie basieren auf dem Prinzip, in konvergenten Synthesen *C*-terminale, fluoreszenzmarkierte, palmitoylierbare Peptide des menschlichen N-Ras-Proteins aufzubauen und an bakteriell überexprimierte, nicht-prozessierte, *C*-terminal verkürzte Ras-Proteine zu koppeln (Abbildung 16, S. 29).

In den Strategien **A** und **C** wurde der Fluoreszenzmarker als Teil des Isoprenoides in die neo-Ras Proteine **4** bzw. **10** eingeführt. Dieser Ansatz der Funktionalisierung von Isoprenoiden ist für die Einführung von photoaktivierbaren Gruppen entwickelt worden. [128;163-176]

Da eine Rolle des Farnesylrestes die Membranverankerung von N-Ras darstellt, war *in vivo* ein Eintauchen des Fluorophors die Plasmamebranlipiddoppelschichten zu erwarten.

Davon wurden folgende Vorteile erhofft:

(I) Durch die lipophile Umgebung wird ein Schutz der fluorophoren Gruppe vor Hydrolyse ermöglicht.

(II) Die Solvatation in der unpolaren Membran erhöht die Quantenausbeute vieler Fluorophore, wie z.B. von NBD.

(III) Die Störung durch kleine fluorophore Gruppen wurde als gering eingeschätzt, da lediglich eine hohe Lipophilie, nicht jedoch der exakte Aufbau des Isoprenoides für die biologische Aktivität relevant zu sein scheint.[177]

NBD-, Dansyl-, Pyren- und Bodipy FL-Flourophore zeichnen sich neben ihrer Lipophilie durch eine besonders hohe Kompaktheit aus. Diphenylhexatrien (DPH)-[178;179], *N*-Methylanthranilat (Mant)-[42;130], Coumarin-[180], *o*-Phthaldialdehyd-(OPA)-[177] oder Fluorenyl-[181] Chromophore zeichnen sich zwar ebenfalls durch diese beiden Parameter aus, schieden aber aufgrund ihrer deutlich zu geringen Fluoreszenzintensität und Interferenzen mit zelleigenen Chromophoren aus. So absorbiert/emittiert das Mant-Chromophor bei 368 nm/ 437 nm, das zelleigene „Reduktionsmittel“ NADH hingegen bei 365 nm/ 450 nm. Eine Visualisierung dieser Chromophore *in vivo* ist damit ausgeschlossen. Aus dem gleichen Grund war auch die Verwendung des fluoreszierenden Isoprenoids Didehydrogeranylgeraniol[182] nicht möglich.

Die Fluoreszenzmarker wurden in lipidierte Cysteine **1** eingeführt und an festphasengenerierte *C*-terminale Ras-Peptide **2** gekoppelt. Die Verknüpfung der *C*-terminalen Ras-Peptide erfolgte in der Strategie **A** in einer Thio-Michael-Reaktion über die Maleinimidocaproyleinheit (MIC) mit dem verkürztem N-Ras **3** (Abbildung 16).[42;43]

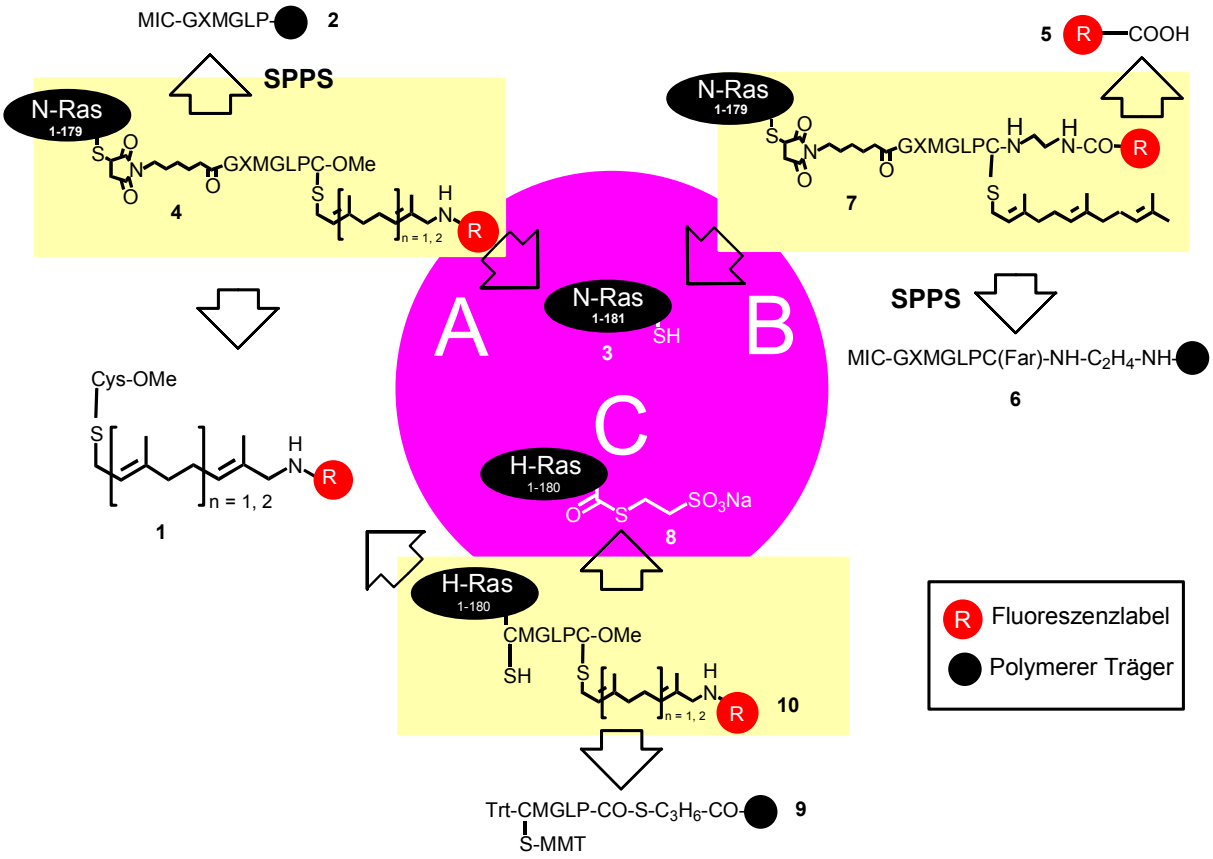


Abbildung 16: Retrosynthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras-Proteine

In der Strategie **B** wurde der Fluoreszenzmarker **5** an der Stelle des *C*-terminalen Methylesters eingeführt. Für diese Klasse von neo-Ras-Proteinen **7** sprach, dass ebenfalls keine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität zu erwarten war. Die ursprüngliche Ras-Methylestergruppe ist vermutlich nur zur Erhaltung der Lipophilie des *C*-Terminus vonnöten.[73] Aufgrund der Tatsache, dass durch Inhibierung der zur humanen Isoprenylcystein Carboxymethyltransferase (pcCMT) homologen Hefetransferase STE14 nur geringfügige Auswirkungen auf die Funktion und Lokalisation von Ras entstehen, kann vermutet werden, dass die Methylestergruppe kein Erkennungsmotiv für spätere Effektoren darstellt.[71;72] Um eine Störung des

Peptides durch die fluorophore Gruppe zu verhindern, wurde zur Anknüpfung an das *C*-terminale Ras-Peptid **6** ein Ethylendiaminlinker verwendet.[183]

In der Strategie **C** wurde eine Alternative zu der in der Strategie **A** und **B** verwendeten Methode der Verknüpfung des *C*-terminalen Ras-Peptides mit verkürztem Ras über eine Maleinimidocaproyleinheit (MIC) gesucht. Prinzipiell führt die MIC-Verknüpfung zur Einführung einer nicht-nativen Einheit in die Proteinchimäre. Auf der Suche nach einer Ligationsmethode, die zu neo-Ras-Proteinen mit einem natürlichen Peptidrückgrat (**10**) führt, wurde das fluoreszenzmarkierte und farnesylierte Cystein **1** mit einem neuartigen, an der festen Phase generiertem und in einem Schritt mild deprotonierbaren *C*-terminalen N-Ras Peptid **9** verknüpft. Das dadurch erhaltene freie Cystein am *N*-Terminus des Peptides konnte in einer Umthioesterung mit dem terminalen Thiomercaptoethan-sulfonsäureester des H-Ras-Proteins **8** reagieren. Die native Peptidbindung entstand in einem konsekutiven *S*-*N*-Acylshift (Methode der *native chemical ligation*). [152;153;184]

4.1.1 Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-Ras-Proteins

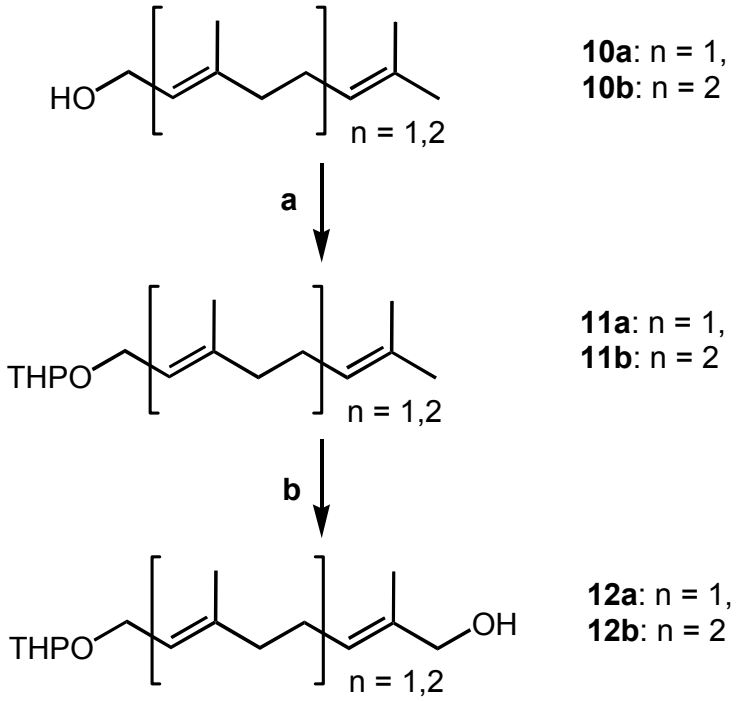
4.1.1.1 Synthese funktionalisierter Isoprenoid-Analoga

Um die optimale fluorophore Gruppe für die Synthese von lipidmodifizierten neo-Ras-Proteinen zu finden, wurden eine Reihe verschiedener (*S*-Isoprenyl)-L-cysteinderivate **1** in einer achtstufigen Synthese dargestellt.

Die Synthese gliedert sich in zwei Teile. Um ein Isoprenoidanalogon als zentralen Baustein zur Verfügung zu haben, an das hydrolysestabil eine Reihe verschiedener Fluorophore geknüpft werden konnte, wurden Geraniol (**10a**) und *trans*-*trans*-Farnesol (**10b**) selektiv über mehrere Stufen durch eine Aminogruppe endständig funktionalisiert. Für Fluorophore wie die 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-(NBD)-Gruppe, die nur als Amin gebunden fluoresziert, ist diese Funktionalisierung sogar essentiell. Nach der Einführung der fluorophoren Gruppe wurden in der zweiten Hälfte der Synthese die nun fluoreszierenden Isoprenole **20** über zwei Stufen α-ständig chloriert, um eine Kupplung mit Cystein zu ermöglichen.

Um selektiv ω-ständig Geraniol (**10a**) bzw. *trans*, *trans*-Farnesol (**10b**) funktionalisieren zu können, wurde zunächst die Hydroxyfunktion als Tetrahydropyranylacetal geschützt (Abbildung 17). Der Schutz der Alkohole erfolgte

Pydridinium-toluol-4-sulfonat (PPTS)-katalysiert[185] durch 3,4-Dihydro-2H-pyran (DHP) in quantitativer Ausbeute. Die geschützten Isoprenole[186] Ger-OTHP (**11a**) und Far-OTHP (**11b**) wurden in quantitativer Ausbeute erhalten.



10a: n = 1,
10b: n = 2

11a: n = 1,
11b: n = 2

12a: n = 1,
12b: n = 2

Abbildung 17: Synthese der ω-Hydroxy-Isoprenol-THP-Acetale **12**,
a) DHP, PPTS; **11a** = 56%; **11b** = quant.; b) *t*BuOOH, H_2SeO_3; **12a** = 56%, **12b** = 33%.

Da eine direkte ω-ständige Aminierung der Isoprenole **11** nicht möglich ist, wurde zunächst eine endständige Oxidation zu den Alkoholen **12** unter Sharpless-Bedingungen[187] durchgeführt. Selenige Säure führt als Enophil Hydroxylgruppen in einer elektrophilen, pericyclischen En-Reaktion in allylische Positionen ein.
Die Reoxidation des Katalysators erfolgt durch *tert*-Butylperoxid. Die Ausbeuten dieser Reaktion betrugen aufgrund der Vielzahl der Nebenreaktionen 56% bzw. 33%. Es wurde u.a. auch die Oxidation der nicht endständigen allylischen Positionen beobachtet[186]. Die Isolierung der dargestellten ω-Hydroxy-Isoprenol-THP-Acetale[168] HO-Ger-OTHP (**12a**) und HO-Far-OTHP (**12b**) erfolgte durch chromatographische Aufreinigung.
Die neu eingeführte Hydroxygruppe wurde nun in zwei Schritten in eine Aminogruppe überführt (Abbildung 18):

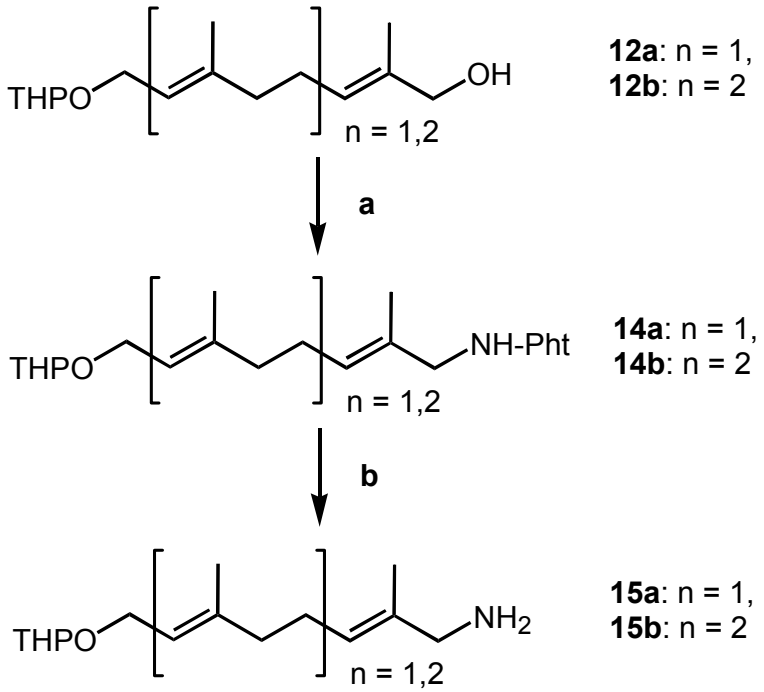


Abbildung 18: Synthese der ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetale **15**

a) Phthalimid, PPh_3, DEAD; **14a** = 81%, **14b** = 79%;

b) Hydrazin; **15a** = 84%, **15b** = 95%.

Zunächst wurden die ω-Phthalimido-Isoprenol-THP-Acetale **14**[168] in einer Mitsunobu-Reaktion[188] mit Triphenylphosphan, Diethylazodicarboxylat (DEAD) und Phthalimid dargestellt. Die Verbindungen[168] Pht-Ger-OTHP (**14a**) und Pht-Far-OTHP (**14b**) konnten in Ausbeuten von 81% bzw. 79% erhalten werden.

Die Darstellung der ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetale erfolgte über die selektive Freisetzung der Aminofunktion mittels Hydrazin in Ethanol unter Ing-Manske-Bedingungen.[189] Die ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetale[168] H_2N-Ger-OTHP (**15a**) und H_2N-Far-OTHP (**15b**) konnten so in Ausbeuten von 84% bzw. 95% dargestellt werden.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurden nun die fluorophoren Gruppen in die dargestellten Geraniol- bzw. Farnesol-Derivate **17a** und **17b** eingeführt (Abbildung 19). Als erstes wurde die NBD-Gruppe eingeführt (Abbildung 20). Sie wurde 1968 von P. B. Ghosh und M. W. Whitehouse[190] entwickelt und erlebte schnell eine breite Anwendung in der Peptidchemie.[191] Entsprechend dem formalen Charakter des Reaktionsmechanismus (S_NAr) sind Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute

entscheidend von der Nucleophilie des Aminstickstoffs und den sterischen Verhältnissen abhängig.[190]

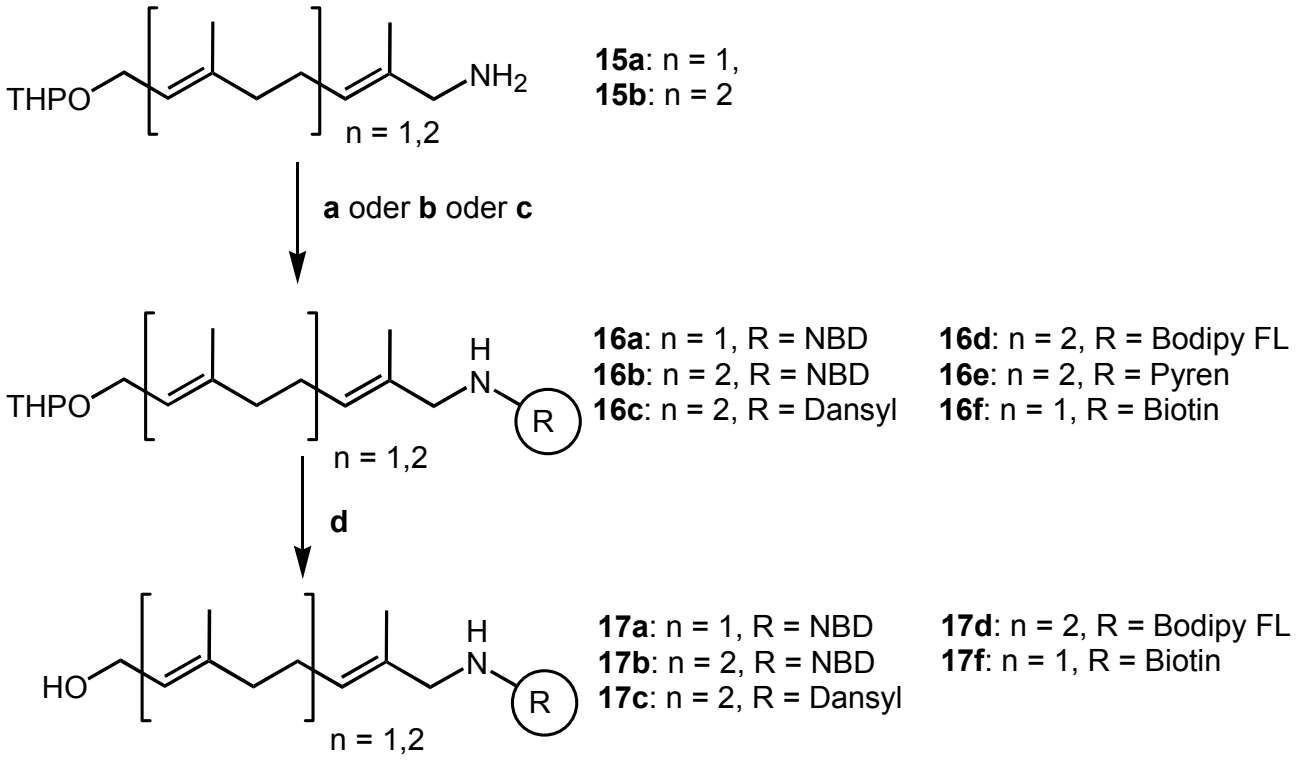


Abbildung 19: Synthese der ω-funktionalisierten-Isoprenole **17**

a) NBD-Cl, $NaHCO_3$-Puffer (pH 8-9), CH_3CN; **16a** = 67%, **16b** = 65%;
b) Dansylchlorid, MeOH/THF; **16c** = 85%;
   Bodipy FL, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; **16d** = 92%;
   Pyren-2-carbonsäure, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; **16e** = 88%;
   Biotin, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; **16f** = 75%;
c) PPTS, 60°C, EtOH; **17a** = 93%; **17b** = 94%; **17c** = 75%; **17d** = 92%; **17f** = 87%.

Mit einer Reihe organischer Lösungsmittel und organischen Hilfsbasen konnten nur mäßige Ausbeuten von ca. 40% erreicht werden. Erst in einem wässrigen Puffer mit einer anorganischen Base konnte die Darstellung der ω-NBD-Isoprenol-THP-Acetale NBD-NH-Ger-OTHP (**16a**) und NBD-NH-Far-OTHP (**16b**) in Ausbeuten von 67% bzw. 65% erreicht werden. In einer Aminolysereaktion reagierte H_2N-Far-OTHP (**15b**) sehr effektiv mit dem Sulfonsäurechlorid Dansyl-Cl in einer Ausbeute von 85% zu Dansyl-NH-Far-OTHP (**16c**).

Weitere Fluorophore, wie Bodipy FL oder Pyren-2-carbonsäure wurden als Amide mit dem ω-Amino-Farnesyl-THP-Acetal **15b** verknüpft. Bodipy FL wurde 1988 von R. Haughland *et al.* für Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) als optimiertes Analogon in der 1968 entwickelten Klasse der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen Farbstoffe synthetisiert[192;193] und weist Emissionsmaxima im Bereich von Fluorescein (515 nm) auf. Bodipy gilt als photostabiler[194] und unpolarer als NBD[195;196], sodass eine Lokalisierung in der Membran erhofft werden konnte.[197] Es wurde bereits in Lipidketten bei der Synthese von Sphingomyelinen zur Untersuchung endocytischer Reaktionswege in menschlichen Hautfibroblasten inkorporiert. Dabei ermöglichten die einzigartigen spektralen Eigenschaften von Bodipy, die Konzentration der Lipidanaloga in den verschiedenen intracellulären Kompartimenten abzuschätzen.[198] Die Synthese von Bodipy FL-NH-Far-OTHP (**16d**) gelang mit einer hervorragenden Ausbeute von 92% (Abbildung 19).

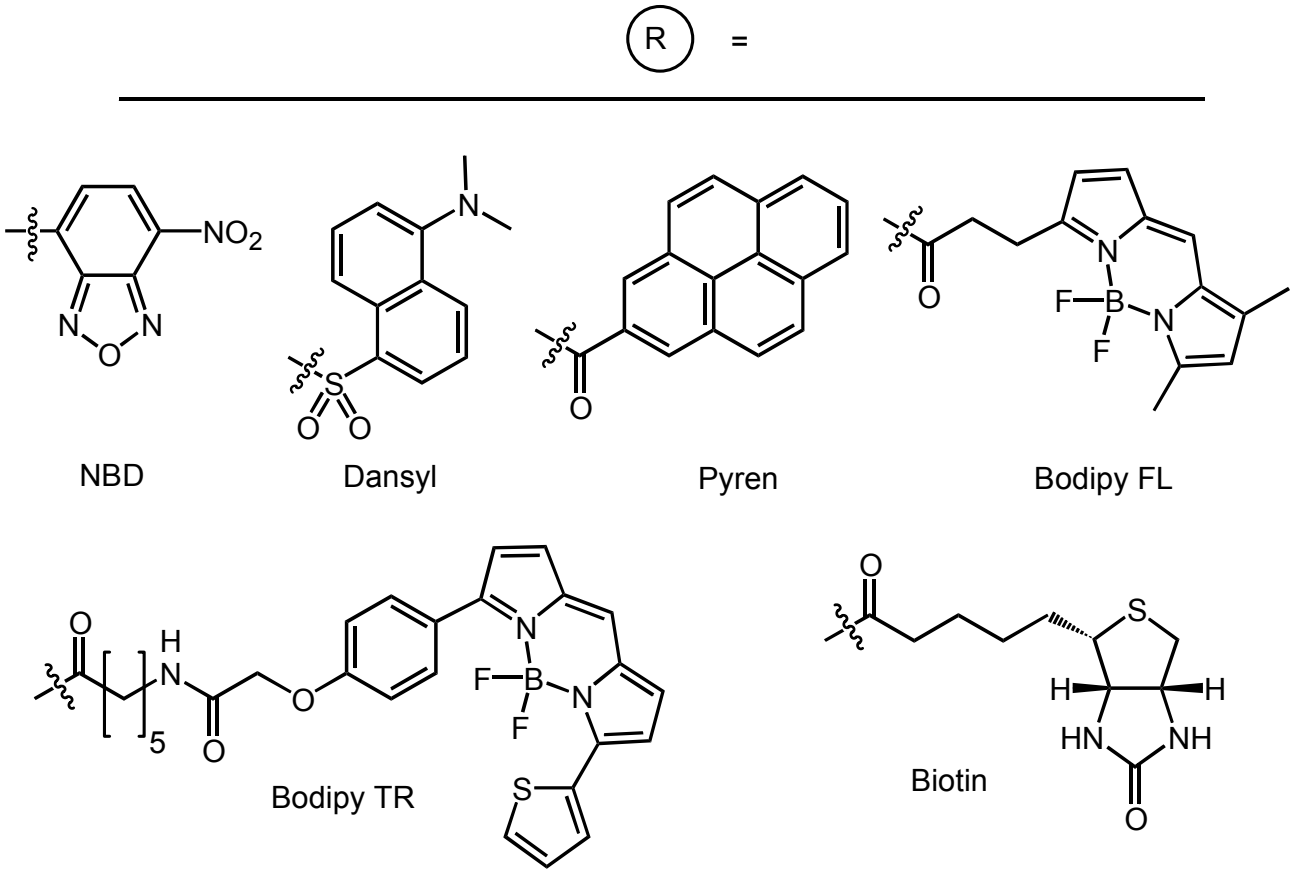


Abbildung 20: Strukturen der an Isoprenoide geknüpften Fluoreszenz- und Affinitätsmarker

Die Einführung der Pyrengruppe, einem Fluorophor, das sich durch seine sehr hohe Lipophilie auszeichnet (Abbildung 20), in Pyren-NH-Far-OTHP (**16e**), gelang mit einer Ausbeute von 88%.

Als Alternative zu den eingeführten Fluoreszenzmarkern wurde der Affinitätsmarker Biotin in das ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetal eingeführt (Abbildung 19). Biotin hat die Eigenschaft, mit einer der höchsten natürlichen Bindungskonstanten (10^{15} M^{-1}) an das 68kDa grosse tetramere Protein Streptavidin zu binden.[199] Die Ausnutzung dieser Tatsache erlaubt den Aufbau hochempfindlicher Detektionssysteme mit Biotin als Marker. Biotin wurde als Amid mit dem ω-Amino-Farnesyl-THP-Acetal **15b** in einer Ausbeute von 75% zu Biotin-NH-Ger-OTHP (**16f**) verknüpft.

Um im folgenden die funktionalisierten Isoprenoidanaloga an Cystein anknüpfen zu können, musste zunächst die Acetalschutzgruppe säurekatalysiert entfernt werden. Die Abspaltung der Tetrahydropyranylschutzgruppe erfolgte mittels Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat (PPTS)[185] meist in sehr guten Ausbeuten.
Chromatographische Aufreinigung ergab die ω-NBD-Isoprenole NBD-NH-Ger-OH (**17a**) und NBD-NH-Far-OH (**17b**) in sehr guten Ausbeuten von 93% und 94%. Die weiteren Analoga Dansyl-NH-Far-OH (**17c**), Bodipy FL-NH-Far-OH (**17d**) und Biotin-NH-Ger-OH (**17f**) waren in Ausbeuten von 57% bis 92% zugänglich.

B. Popkirova überprüfte, ob über das Medium verabreichtes Biotin-markiertes Geraniol **17f** von der Zelle aufgenommen, phosphoryliert und in Lipoproteine inkorporiert werden kann.[200] Nach einer Inkubation von zuvor mit H-Ras transfizierten Cos7-Zellen wurde das Biotinylierungsmuster des Zellysates nach SDS-PAGE und Elektrotransfer der Proteinbanden auf Polyvinyldifluorid (PVDF)-Membranen über die Wechselwirkung mit einem kommerziell erhältlichen Streptavidin-Peroxidase-Konjugat detektiert. Dabei konnte die Umsetzung des überexprimierten Ras-Proteins nachgewiesen werden.
Biotingeraniol (**17f**) erwies sich als potentes Reagenz für Studien mit isoprenylierbaren Proteinen. So könnte z.B. die *in vivo* oder *in vitro* Biotinylierung isoprenylierbarer Proteine die Identifizierung neuer Interaktionspartner über den Einsatz kommerziell erhältlicher Streptavidin-Beads ermöglichen.

Die Chlorierung der ω-funktionalisierten-Isoprenole erfolgte über eine Corey-Kim-Reaktion (Abbildung 21).[201] In dieser Variante wurde bei niedrigen Temperaturen das Salz aus *N*-Chlorsuccinimid (NCS) und Dimethylsulfid (DMS) in Methylenchlorid vorgelegt, das sodann den zugefügten allylischen Alkohol unter Bildung von Succinimid und Dimethylsulfoxid in des Allylchlorid überführte. Die Nebenprodukte waren elegant über eine einfache wässrige Aufarbeitung entfernbar.

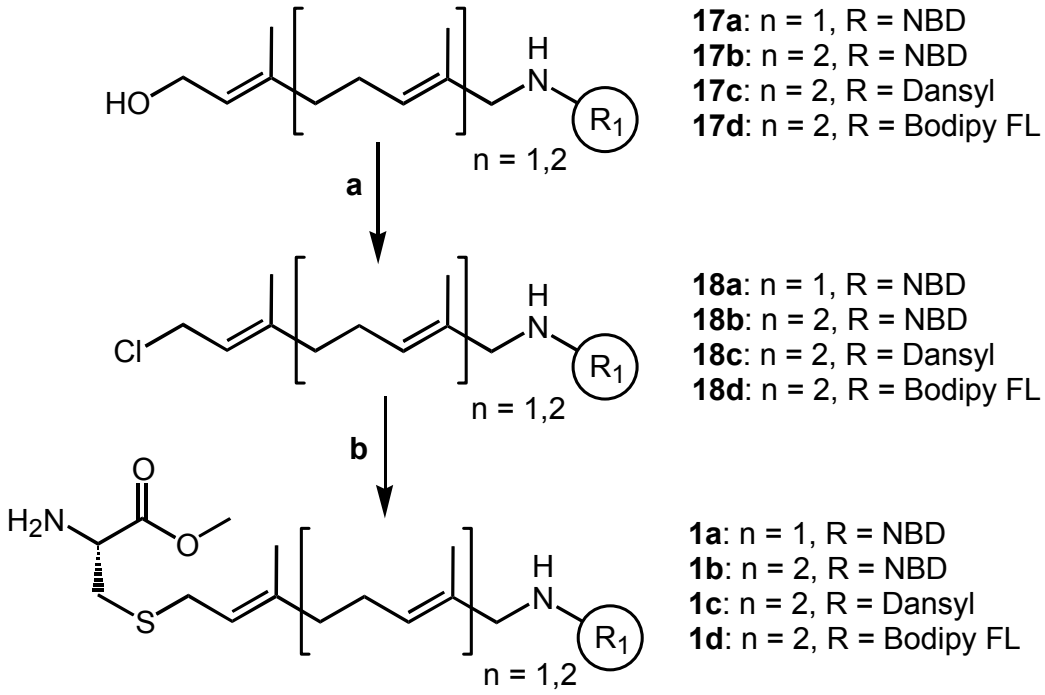


Abbildung 21: Synthese der ω-funktionalisierten-(*S*-Isoprenyl)-Cysteine **1**

a) NCS, DMS, -30°C→0°C; **22a** = quant.; **22b** = quant.; **22c** = 75%; **22d** = quant.;
b) NH_3 in MeOH (1M), 0°C, **1a** = quant.; **1b** = quant. ; **1c** = 95%; **1d** = 55%.

Die ω-funktionalisierten-Isoprenylchloride NBD-NH-Ger-Cl (**18a**), NBD-NH-Far-Cl (**18b**) und Bodipy FL-NH-Far-Cl (**18d**) konnten so in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Dansyl-NH-Far-Cl (**18c**) wurde zwar nur in 75% Ausbeute erhalten, konnte aber aufgrund seiner Hydrolyseinstabilität ohne chromatographische Aufreinigung weiter eingesetzt werden. Die abschließende Reaktion zur Darstellung der ω-fluoreszenzmarkierten (*S*-Isoprenyl)-Cysteinmethylester bestand aus der Kupplung der Chloride **18** an *L*-Cysteinmethylester (Abbildung 21). Diese modifizierten

Aminosäuren (**1**) stellten die *C*-terminalen Kopfkomponenten der Heptapeptide **19** dar.

Aufgrund der höheren Nucleophilie des Thiols bildete sich chemoselektiv der erwünschte Thioether und kein *N*-Alkylierungsprodukt. Die Reaktion konnte analog einer Vorschrift von C. D. Poulter *et al*. in flüssigem Ammoniak durchgeführt werden,[202] jedoch war die Verwendung einer 1M Lösung von Ammoniak in Methanol[203] praktikabler in der Durchführung. Die Darstellung von Cys-(*S*-Ger-NH-NBD)-OMe (**1a**), Cys-(*S*-Far-NH-NBD)-OMe (**1b**), und Cys-(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**1c**) gelang quantitativ. Lediglich die Synthese von Cys-(*S*-Far-NH-Bodipy FL)-OMe (**1d**) verlief mit 55% Ausbeute.

4.1.1.2 Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-Ras-Proteins

Die Cys^{181}-Cys^{186}-Sequenz des menschlichen N-Ras-Proteins weist vornehmlich drei Charakteristika auf: An Cys^{186} ist ein Farnesylrest als Thioether gebunden, die Säurefunktion ist als Methylester geschützt und an Cys^{181} ist Palmitinsäure als Thioester gebunden. Für die erfolgreiche Synthese von neo-Ras-Proteinen waren Analoga des *C*-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins nötig, die folgende Parameter erfüllen: Die Peptide mussten eine Fluoreszenzmarkierung aufweisen; sie mussten an der Position der Aminosäure 181 variierbar und mit dem verkürzten N-Ras-Protein verknüpfbar sein.

In vorbereitenden Untersuchungen des Arbeitskreises von H. Waldmann wurde die Gefährdung der isolierten Doppelbindungen der Isoprenylgruppe im sauren Milieu bestätigt, sodass für die Synthese der Peptide besondere Sorgfalt auf die Wahl der Schutzgruppen gelegt werden musste. Als Amin-Schutzgruppe wurde deshalb die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe, die sich Piperidin-vermittelt unter milden basischen Bedingungen abspalten läßt und die Trityl (Trt)-Gruppe, die sich unter extrem schwach sauren Bedingungen abspalten lässt, gewählt. Diese Schutzgruppe ist ebenfalls zuverlässig als Alkohol-Schutzgruppe verwendet worden. Als Thiol-Schutzgruppen wurden die Dithiothreitol (DDT)-vermittelt spaltbare Thio-*tert*-Butylester- (S*t*Bu) und die wie die Trt-Gruppe unter extrem schwach sauren Bedingungen abspaltbare 4-Monomethoxytrityl(MMT)-Schutzgruppe verwendet.

Zunächst wird die Darstellung von Analoga der *C*-terminalen Heptapeptide gemäß der Strategie **A** der Retrosynthese von neo-N-Ras Peptiden beschrieben (s. Kap. 4.1,

Abbildung 16). Die Aminosäuresequenzen Gly^{180}-Pro^{185} **19** inklusive der Maleinimidocaproyl (MIC)-Spacereinheit konnten effektiv und in sehr hohen Reinheiten, die keinerlei chromatographische Aufreinigung nötig machten, in einer automatisierten Festphasensynthese aufgebaut werden (Abbildung 22). So wurden nach ihrer Ablösung vom festen Träger das Analogon **19a** in 97%, das Analogon **19b** in 92% und das Analogon **19c** in 88% Ausbeute erhalten. Die für die Synthese des Peptides MIC-Gly-Cys(hd)-Met-Gly-Leu-Pro (**19b**) notwendige neue Aminosäure *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-hexadecyl-L-cystein Fmoc-Cys(hd) (**22**) wurde in zwei Stufen in einer Gesamtausbeute von 62% aus *S*-Hexadecyl-L-cystein-*tert*-butylester (**20**) synthetisiert.

Die labilen fluoreszenzmarkierten Cysteine **1** wurden sofort mit dem Hexapeptid MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro (**19a**) zu den Heptapeptiden MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Ger-NH-NBD)-OMe) (**23a**), MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far-NH-NBD)-OMe) (**23b**), MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe) (**23c**), MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Ger-NH-Bodipy FL)-OMe) (**23d**) umgesetzt (Abbildung 23).

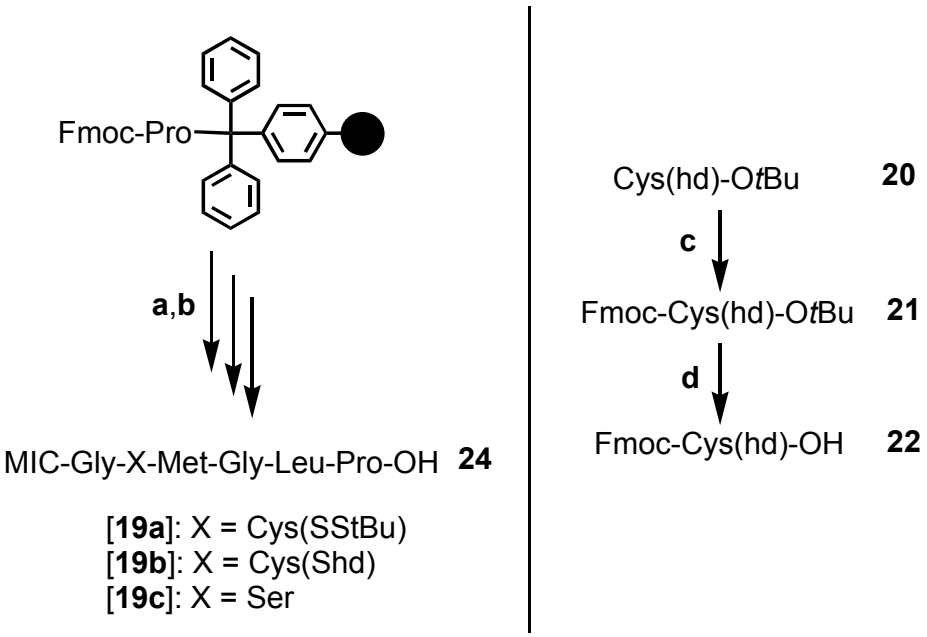


Abbildung 22: Synthese von Analoga der Gly^{180}-Pro^{185} –Sequenz des menschlichen N-Ras-Proteins

a) Fmoc-Festphasensynthese (Kopplung/Capping/Entschützen);

b) TFA (1%), TIS, CH_2Cl_2; **19a** = 97%; **19b** = 88%; **19c** = 92%;

c) Fmoc-Cl, Dioxan, H_2O, Na_2CO_3, 0°C→rt; **21** = 66%;

d) TFA, CH_2Cl_2; **22** = 94%.

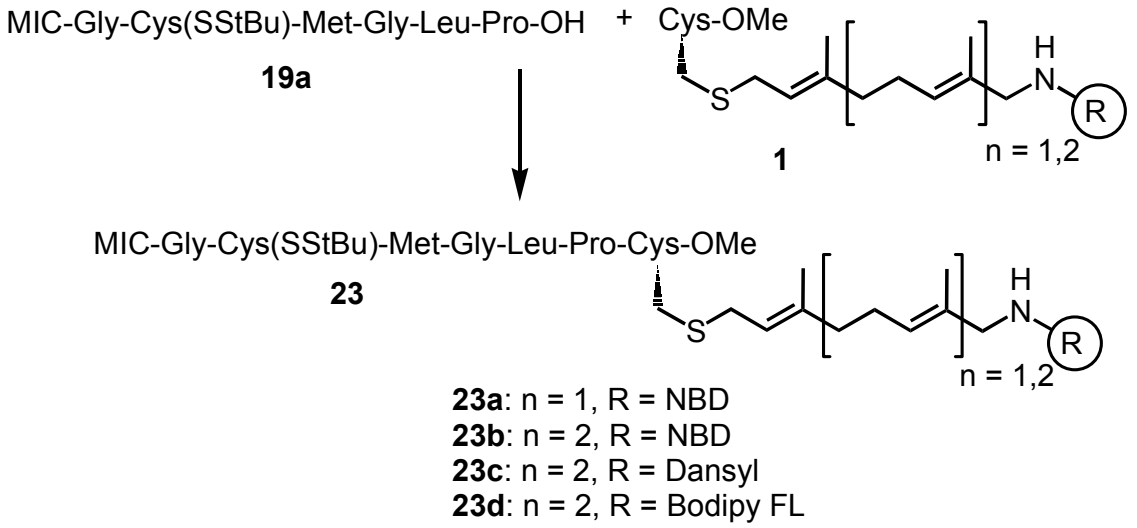


Abbildung 23: Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-terminaler N-Ras Peptide EDC, HOBt, Triethylamin, CH_2Cl_2; **23a** = 76%; **23b** = 64%; **23c** = 84%; **23d** = 77%.

Als Kupplungsmethode fand erneut die EDC/HOBt-Methode[204] Anwendung, mit der sich Ausbeuten von 64%-84% erzielen ließen. Besonders elegant bei dieser Methode ist die leichte Abtrennbarkeit der Nebenprodukte durch wässrige Aufarbeitung, was die nachfolgende chromatographische Aufreinigung sehr vereinfacht.

Im folgenden wurde die Synthese von Analoga der *C*-terminalen N-Ras Heptapeptide nach der Strategie **B** der Retrosynthese beschrieben (Abbildung 16, S. 29). Dabei wurde der Fluoreszenzmarker nicht in das Isoprenoid inkorporiert, sondern an Stelle der *C*-terminalen Methylestergruppe eingeführt. Der Vorteil dieser Strategie war die wesentlich kürzere Synthese, die nicht die in acht Stufen zu generierenden ω-fluoreszenzmarkierten (*S*-Isoprenyl)-Cysteinmethylester benötigte, sondern den Fluorophor in der letzten Stufe einbringt. Vor allem für kostenintensive Bodipy-Chromophore war dieses ein attraktiver Ansatz.
Um die Vorteile der automatisierten Festphasenpeptidsynthese optimal nutzen zu können, wurde die gesamte Aminosäuresequenz Gly^{180}-Cys^{187} **24** inklusive der Maleinimidocaproyl (MIC)-Einheit am Harz immobilisiert aufgebaut (Abbildung 24).

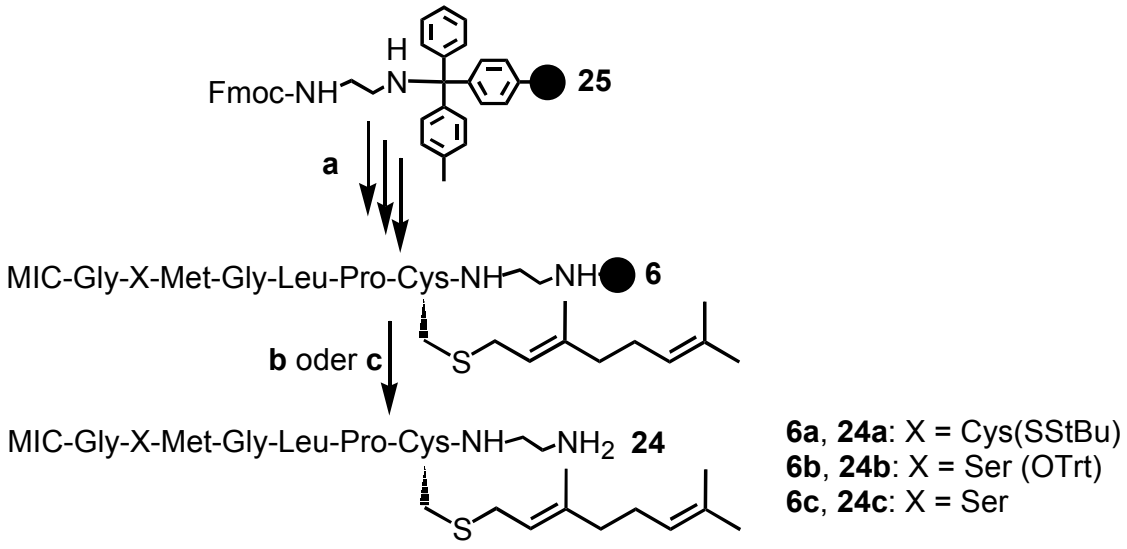


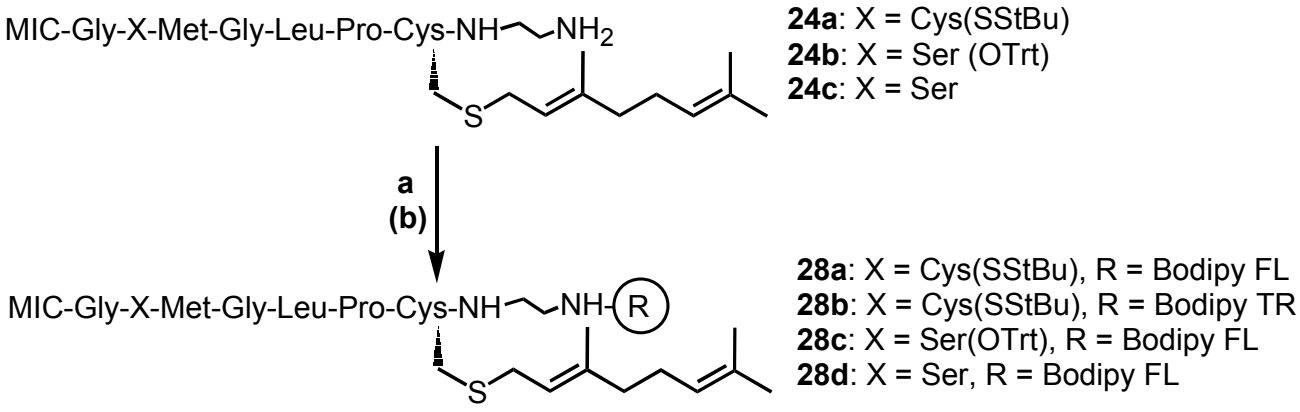
Abbildung 24: Synthese *C*-terminaler N-Ras Peptide mit Ethylendiamin-linker

a) Fmoc-Festphasen-Synthese (Kopplung/Capping/Entschützen);
b) TFA (1%), TIS, CH_2Cl_2; **24a** = 79% (**a** und **b**); **24c** = 84% (**a** und **b**);
c) CH_2Cl_2/Trifluorethanol/Essigsäure (3:1:1); **24b** = 25%.

Die Ethylendiamineinheit, die später als Abstandshalter bei der Verankerung der fluorophoren Gruppe diente, wurde zur Anknüpfung an die sehr mild abspaltbare 4-Methyl-Trityllinkergruppe **25** verwendet. Diese Eigenschaft der Linkergruppe war essentiell, zumal die erste zu immobilisierende Aminosäure das säureempfindliche *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-farnesyl-L-cystein Fmoc-Cys(*S*-Far)-OH (**26**) war. Diese Aminosäure konnte erstmalig in 39% Ausbeute durch Farnesylierung von *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Cystein (**27**) dargestellt werden.

Nach ihrem korrektem Aufbau an der festen Phase und Abspaltung mit 1%iger Trifluoressigsäure konnten die Sequenzen MIC-Gly-Cys(SStBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24a**) und MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24c**) in Ausbeuten von 79% und 84% und hohen Reinheiten, die keine weitere chromatographische Reinigung nötig machten, erhalten werden. Um die Sequenz MIC-Gly-Ser(*O*-Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24b**) zu generieren, bei der die extrem säurelabile O-Tritylschutzgruppe nicht abgespalten wird, konnte zur Abspaltung des Peptides eine Mischung aus Dichlormethan/ Trifluorethanol/ Essigsäure (3:1:1) verwendet werden. Höhere Ausbeuten, als die erhaltenen 25%, sind vermutlich nur mit einer 4-Methoxy-Trityllinkergruppe[205] zu erzielen.

An die nun zur Verfügung stehenden Ras-Peptide **24**, die alle eine freie Aminogruppe aufweisen, konnten mit Hilfe der EDC/HOBt-Methode[204] verschiedene Fluorophore als Amide angeknüpft werden (Abbildung 25).



24a: X = Cys(SStBu)
24b: X = Ser (OTrt)
24c: X = Ser

28a: X = Cys(SStBu), R = Bodipy FL
28b: X = Cys(SStBu), R = Bodipy TR
28c: X = Ser(OTrt), R = Bodipy FL
28d: X = Ser, R = Bodipy FL

Abbildung 25: Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-terminaler N-Ras Peptide

a) EDC, HOBt, Triethylamin, CH_2Cl_2, Bodipy-FL bzw. Bodipy-TR; **28a** = 81%; **28b** = 84%; **28c** = 90%;
b) TFA (1%), TIS, CH_2Cl_2, 10 min; **28d** = 91%.

So wurden an die Sequenz MIC-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24a**) die Fluorophore Bodipy FL und Bodipy TR in Ausbeuten von 81% und 84% gekuppelt (Abbildung 25). Die direkte Darstellung von MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL (**24d**) aus MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24c**) und der Carbonsäure Bodipy FL gelang jedoch nicht, da neben der gewünschten Anknüpfung der chromophoren Gruppe als Amid ebenfalls die Veresterung mit der Serin-Alkoholgruppe zu beobachten war. Daher wurde das Analogon MIC-Gly-Ser(*O*-Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH_2 (**24b**) verwendet, dessen Serin-Alkoholgruppe eine Tritylschutzgruppe aufweist. Nach der Anknüpfung von Bodipy FL mit einer Ausbeute von 90% konnte das erhaltene MIC-Gly-Ser(*O*-Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL (**28c**) mild säurekatalysiert in sehr kurzen Reaktionszeiten in einer 91%igen Ausbeute entschützt werden.

Die Synthese von *C*-terminalen N-Ras Peptiden für die Strategie der *native chemical ligation*[152;153;184] (Strategie **C** der Retrosynthese, Abbildung 16) erforderte einen völlig neuen Ansatz für die Festphasenpeptidsynthese. In der Strategie **A** und **B** wurde die Verknüpfung der Gly^{180}-Cys^{186} Peptide mit dem verkürzten N-Ras (1-179)-

Protein **3** über die Maleinimidocaproyl-(MIC)-Spacereinheit angestrebt. Für die in der Strategie **C** angestrebte Ligation nach der Methode der *native chemical ligation* waren jedoch Cys^{181}-Cys^{186} Peptide vonnöten, deren N-terminales Cystein *N*,*S*-deblockiert vorliegen musste (Abbildung 26). Da *S*-deblockierte Cysteinpeptide instabil sind, war eine Strategie verfolgt worden, bei der gleichzeitig sowohl die Amino- als auch die Thiolfunktion des N-Ras-Peptides freigesetzt wird. Diese Anforderung wurde dadurch erschwert, dass im Molekül ebenfalls die stark säurelabile Farnesylgruppe vorhanden ist. Daher wurde die neue Aminosäure *N*-Trityl-*S*-Monomethoxytrityl-L-cystein (Trt-Cys-MMT) (**33**) entwickelt, die in einer Einstufenreaktion simultan deblockierbar war, und dabei orthogonal zur Farnesylgruppe ist. Die Synthese gelang aus *S*-Monomethoxytrityl-L-Cystein (**34**) in einer Ausbeute von 86%.[210]

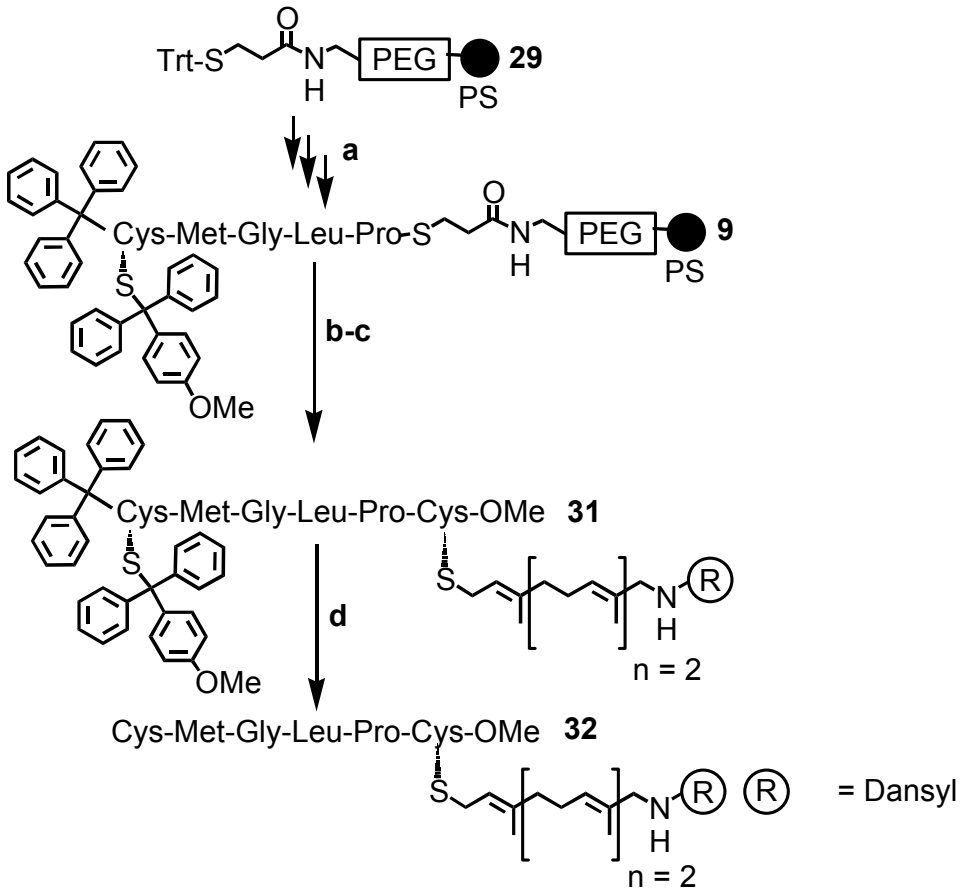


Abbildung 26: Synthese *C*-terminaler N-Ras Peptide für die *native chemical ligation*

a) Boc-Festphasen-Peptidsynthese (Kupplung/Capping/Entschützen);
b) 0.5 N NaOH/ CH_3CN, 10 min, 0°C; **30** = 52% (**a** und **b**);
c) EDC, HOBt, CH_2Cl_2,**1c**; **31** = 77%;
d) TFA (1%), Triisopropylsilan, CH_2Cl_2; **32** = 93%.

Aufgrund der sehr hohen Säurelabilität von *N*-Trityl-*S*-Monomethoxytrityl-L-cystein (**33**) war für den Aufbau des N-Ras Peptides an der festen Phase nicht mehr der Tritylinker verwendbar. Daher musste eine neue Linkerstrategie verwendet werden: Die im Jahr 2000 von T.W. Muir eingeführte Festphasenpeptidsynthese über 3-Thiopropionsäurelinker (**29**) immobilisiert Peptide über eine Thioester-Verknüpfung.[206] Diese kann durch eine Reihe von Nucleophilen gespalten, sehr gut aber auch basisch katalysiert hydrolysiert werden. Der Aufbau des Peptides geschieht daher nicht mehr nach der Fmoc-Strategie, sondern verwendet *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschützte Aminosäuren, die jeweils für den nächsten Zyklus mit Trifluoressigsäure entschützt werden.

Von besonderer Bedeutung bei dieser Strategie war die Wahl des polymeren Trägers. Es wurde ein Polyethylenglykol(PEG)-Polystyrol (PS)-Harz verwendet, das in wässrigen Solventien quillt und dadurch das Eindringen des Abspaltreagenzes erlaubte. So konnte das immobilisierte Peptid Trt-Cys(*S*-MMT)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**30**) mit einer Ausbeute von 52% aufgebaut und abgespalten werden. Um die anfangs während der Synthese beobachtete Diketopiperazinbildung zu unterdrücken, mussten die Reaktionszeiten der HBTU-vermittelten Aminosäurekupplungen mit ca. 20 min möglichst kurz gehalten werden.[207] Die Synthese gelang in sehr hoher Reinheit, die eine chromatographische Aufreinigung nicht erforderte. Im folgenden wurde die fluoreszenzmarkierte und isoprenylierte Aminosäure {*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Dansyl-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (**1c**) in 77% Ausbeute EDC/HOBt-vermittelt,[204] an **30** geknüpft. Das erhaltene, am Cystein vollgeschützte Peptid Trt-Cys(*S*-MMT)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**31**) konnte, wie erhofft, in einem Zuge innerhalb von 10 Minuten ohne jegliche Beeinträchtigung der Farnesylgruppe in der sehr guten Ausbeute von 93% gleichzeitig *S*,*N*-deblockiert werden. Der nun verfügbare Cys^{181}-Cys^{186}-Terminus Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**32**) wurde sofort in der *native chemical ligation* eingesetzt.

4.1.2 Ligation zwischen Ras-Protein und *C*-terminalem Peptid

4.1.2.1 Maleimido-vermittelte Protein Ligation

Das Prinzip der in den Retrosynthesestrategien **A** und **B** (Abbildung 16) vorgestellten Methode der Maleinimidocaproyl(MIC)-Linker vermittelten Ligation zwischen dem

verkürzten, bakteriell überexprimierten N-Ras **3** und den fluoreszenzmarkierten *C*-terminalen N-Ras Peptiden **23** und **28** wurde in den Abteilungen von H. Waldmann und A. Wittinghofer entwickelt.[42;43]

Maleinimide reagieren selektiv mit Thiolgruppen unter Ausbildung eines stabilen Thioethers, bei Proteinen also vorzugsweise mit dem Thiol der Seitengruppe von Cysteinen[132] (Abbildungen 27 und 28). In den von M. Wagner (Abteilung A. Wittinghofer, MPI Dortmund) durchgeführten Kopplungen wurde verkürztes N-Ras **3** verwendet, das als *C*-terminale Aminosäure Cystein 181 aufweist. Die Thiolgruppe dieses Cysteins ist im wässrigen Puffer exponiert und für die Kopplung der Maleinimidogruppe frei zugänglich. Verwendet wurde die punktmutierte, onkogene G12V-Variante von N-Ras. Die Verkürzung der N-*ras*-cDNA wurde durch Standard-PCR-Methoden erreicht. So wurde ein Stop codon in die Position 182 der N-Ras cDNA eingeführt und das resultierende PCR-Produkt in einen *E. coli* Expressionsvektor (ptac Expressionsvektor) kloniert. Im folgenden wurde die Proteinexpression im *E. coli* Stamm CK600K durchgeführt, die Zellen aufgeschlossen und das Protein mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration aufgereinigt.

Die Kopplung der Peptide mit dem N-Ras-Protein wurde in einem Triton X-114-haltigen Tris-Puffer acht Stunden bei 4°C durchgeführt. Dieses nichtionische Detergens ermöglichte es, sowohl die lipophilen Peptide **23** und **28**, als auch das hydrophile N-Ras **3** in Lösung zu halten. Die Reinigung der erhaltenen fluoreszierenden Lipoproteine **4** und **7** konnte ebenfalls unter Zuhilfenahme von Triton X-114 leicht bewerkstelligt werden, da es die Eigenschaft hat, in wässriger Lösung bei Temperaturen über 30°C eine Phasenseparation zu vollziehen.

Durch Zentrifugation konnte die dichtere Detergensphase von einer wässrigen Phase abgetrennt werden. Hydrophobe Proteine, wie die Lipoproteine **4** und **7** wurden in die Detergensphase extrahiert und ungekoppelte Protein wurden in der wässrigen Phase zurückgelassen, sodass die Proteine in sehr hoher Reinheit erhalten werden konnten. Die fluoreszenzmarkierten neo-Ras-Proteine wurden im folgenden von Triton X-114 Detergens durch DEAE-Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt und durch SDS-PAGE Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektroskopie charakterisiert.

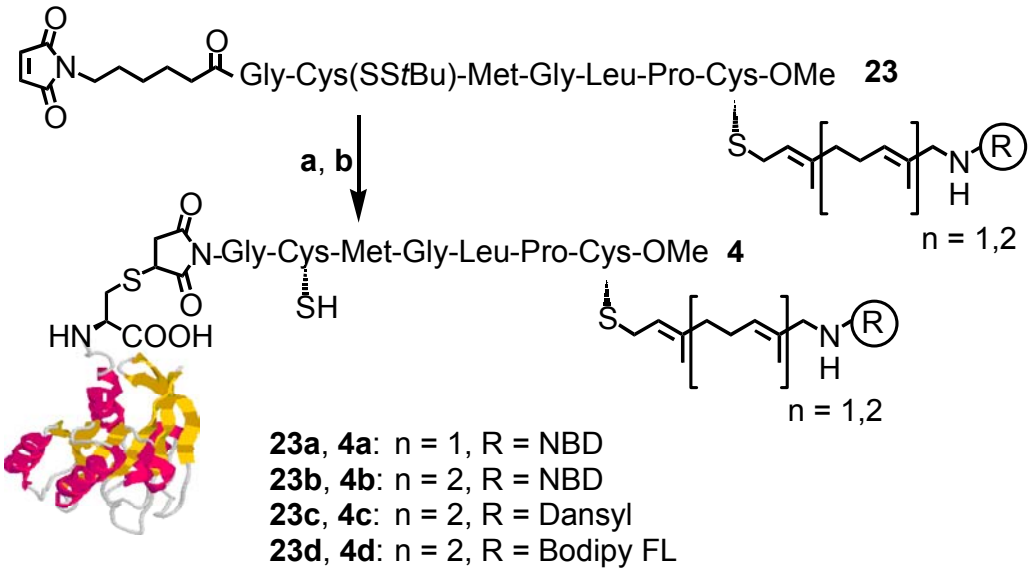


Abbildung 27: Synthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras Proteine **4** mit Hilfe der Maleimido-vermittelten Protein Ligation

a) N-Ras **3**, Puffer pH 7.4, Triton X-114, 4°C;

b) DTE, Puffer pH 7.4, 37°C.

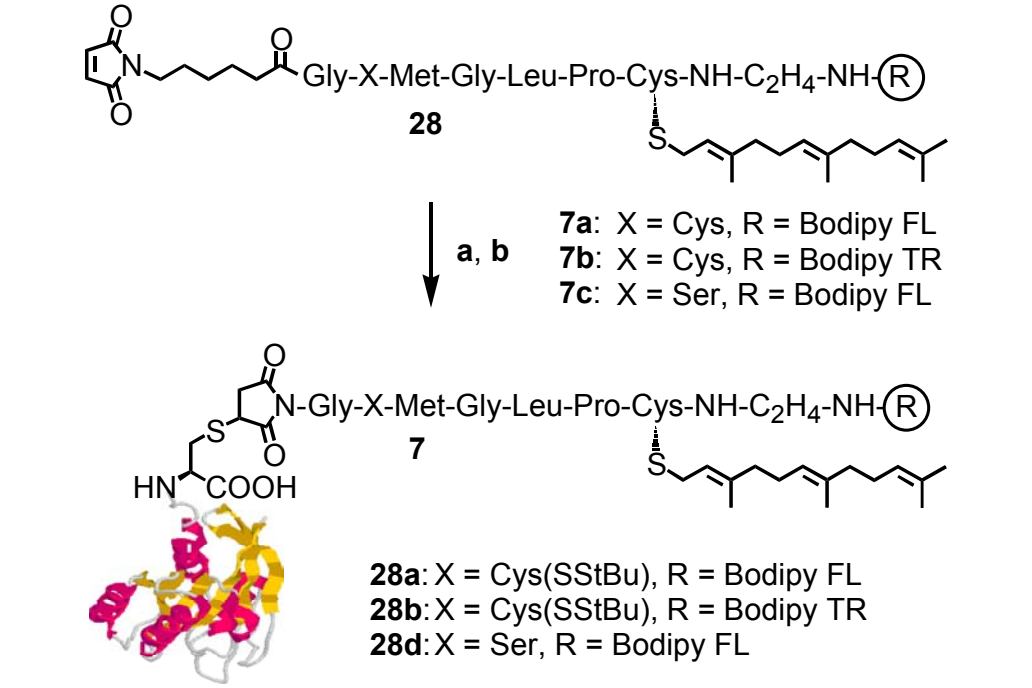


Abbildung 28: Synthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras Proteine **7** mit Hilfe der Maleimido-vermittelten Protein Ligation

a) N-Ras **3**, Puffer pH 7.4, Triton X-114, 4°C;

b) DTE, Puffer pH 7.4, 37°C.

Die Heptapeptide **23a**-**b** und **28a**-**b** sind am ersten Cystein der Aminosäuresequenz mit einer *tert*-Butylthio-Schutzgruppe (StBu) ausgestattet. Nach Kopplung an N-Ras wurde zur Abspaltung der Schutzgruppe die Disulfidbindung zwischen der Cystein Seitenkette und der *S-tert*-Butylthiolschutzgruppe StBu mit Dithioerytritol (DTE) über vier Stunden bei 37°C reduziert. Die nun verfügbaren palmitoylierbaren neo-Ras-Proteine wurden für verschiedene biologische Evaluierungen eingesetzt.

4.1.2.2 Intein-vermittelte Ligation und Native Chemical Ligation

Prinzipiell führt die MIC-Verknüpfung zur Einführung einer nicht-nativen Einheit in die neo-Ras-Proteinchimären. Auf der Suche nach einer Ligationsmethode zwischen verkürztem, bakteriell überexprimiertem Ras und einem fluoreszenzmarkierten *C*-terminalen N-Ras Lipopeptid, die zu einem natürlichen Peptidrückgrat führt, wurde die Methode der *native chemical ligation* ausgewählt (Retrosyntheseprinzip **C**, Abbildung 16, S. 29).

Das erforderliche, als Mercaptoethansulfonsäure (Mesa)-Thioester aktivierte Modellprotein H-Ras(1-180)-MESA (**8**) wurde in Zusammenarbeit mit Christine Nowak (Abteilung A. Wittinghofer) unter Verwendung der IMPACT-Technik (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)[146;147] gewonnen. Das Zielprotein wird als Fusion mit einem Intein und einer Chitin-Bindedomäne als Affinitäts-Tag exprimiert. Nach dem Zellaufschluss findet eine Reinigung über die *C*-terminal an das Intein gebundene Chitin Bindedomäne (CBD)[150] statt, die mit hoher Affinität an ein mit Chitin (Poly-β-(1-4)*N*-Acetylglucosamin) beladenes Säulenmaterial bindet. Das Abspleißen des H-Ras Fusionsproteins von der Inteindomäne konnte nun von einem Thiolreagenz wie Mercaptoethansulfonsäure (MESA)[151] induziert werden.

Das generierte H-Ras(1-180)-MESA (**8**) wurde direkt in einer *native chemical ligation*[152;153;184] mit dem Hexapeptid Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**32**) eingesetzt (Abbildung 29).
Das freie Cystein am N-Terminus des Peptides **32** reagierte in einer Umthioesterung mit dem terminalen Thiomercaptopropionsäureester des H-Ras-Proteins (**8**). Der

konsekutive *S-N*-Acylshifte führte zu einem fluoreszenzmarkierten neo-Ras-Protein **10** mit einem natürlichen Peptidrückgrat.

Von besonderer Bedeutung bei dieser Ligation war die Wahl des Detergens. So konnte beispielsweise bei Verwendung des in MIC-Ligationen bewährten Detergens Triton X-114 keine Ligation beobachtet werden. Als bestes Detergens hatte sich Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bewährt. Als problematisch hat sich jedoch herausgestellt, dass während der Ligation das Protein denaturierte, dadurch aggregierte und partiell präzipitierte. Dieser bei Inteinligationen bekannte Effekt[159;208;209] konnte nicht durch die Zugabe diverser Cosolventien verhindert werden.

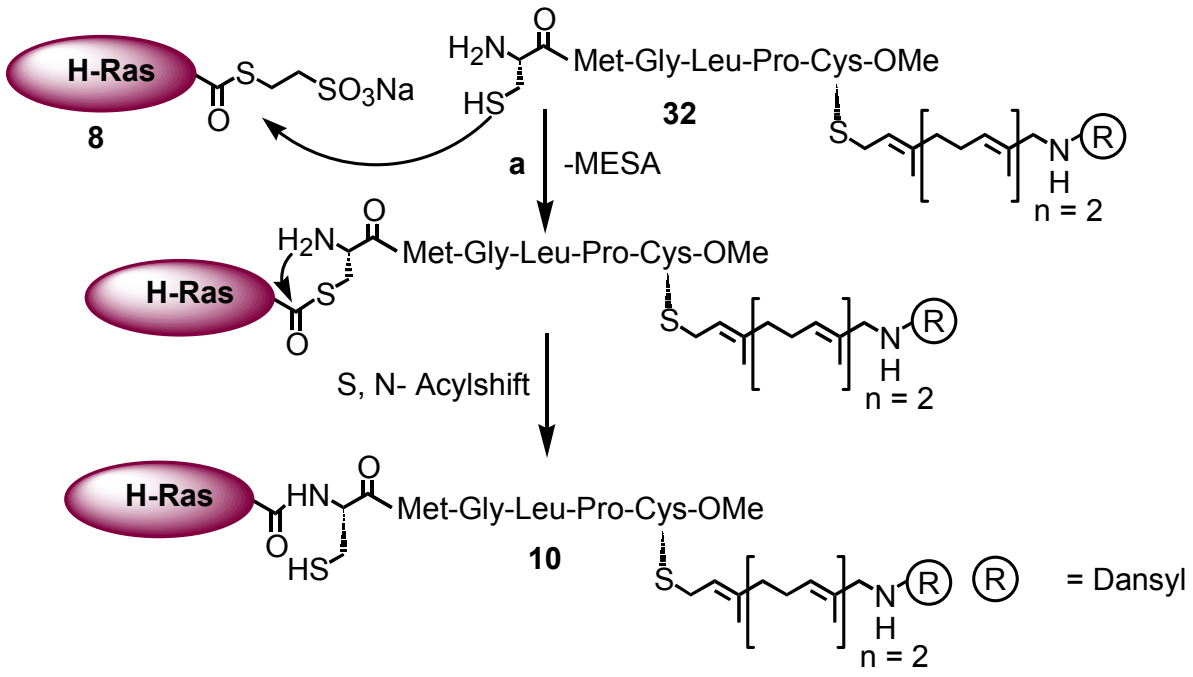


Abbildung 29: Synthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras Proteine **10** mit Hilfe der *native chemical ligation*
a) Puffer pH 7.4, Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), TCEP, 4°C

Beim Versuch der Aufreinigung über eine Triton X-114-vermittelte Extraktion fand eine vollständige Präzipitierung des neo-Ras-Protein **10** statt. Daher wurde nach erfolgter Ligation das Präzipitat abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das *Pellet* zur Abtrennung von nicht umgesetzten Lipopeptid **32** mit organischen Solventien gewaschen und dann in einem stark chaotropen Guanudiniumchlorid-

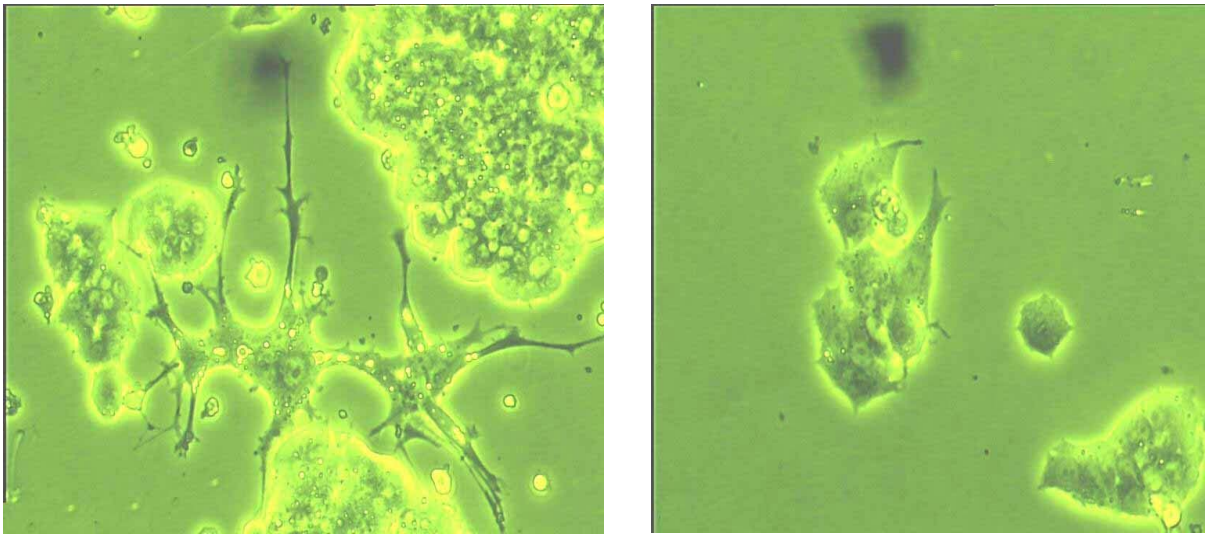
Puffer aufgenommen.[159;210;211] Nach der Rückfaltung des denaturierten neo-Ras-Proteins **10** und der Abtrennung des Guanudiniumchlorid-Puffers über eine Dialyse[159;210;211] war erstmalig eine abschließende Aufreinigung über eine DEAE-Ionenaustauschchromatographie möglich. Die Charakterisierung des erhaltenen fluoreszierenden neo-Ras-Proteins **10** erwies sich als schwierig.

Die Untersuchung von **10** in einer denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigte eine fluoreszierende, mit einem Comassie-Farbstoff anfärbbare, Proteinbande bei ca. 21 kDa. Das aperente Molekulargewicht lag damit im Bereich des Ras-MESA Edukts (MW (H-Ras-MESA): 20.049 Da) bzw. des Kopplungsprodukts (MW (**10**): 20.998 Da). Untersuchungen mit Hilfe der MALDI-Massenspektroskopie ergaben lediglich ein breites Signal bei 20.5 bis 21 kDa, ein Effekt der ebenfalls bei neo-Rab-Proteinen[210] aus der *native chemical ligation* auftritt. Auch unter Zuhilfenahme anderer massenspektroskopischer Verfahren (ESI, Nanospray-MS) konnte bislang kein höher aufgelöstes Massenspektrum aufgenommen werden. In aktuellen Arbeiten wird nun alternativ die Charakterisierung von **10** durch In-Gel-Trypsinverdau des Proteines aus der SDS-PAGE-Bande mit nachfolgender massenspektroskopischer Analyse fortgesetzt.

4.1.3 Biologische Evaluierung fluoreszenzmarkierter Ras-Proteine

Die sieben nach der MIC-Ligation erhaltenen neo-Ras-Lipoproteine **4** und **7** wurden von M. Wagner biologisch evaluiert. Von Interesse waren dabei vornehmlich die Überprüfung der biologischen Aktivität in einem Differenzierungsassay mit PC12-Zellen und die *in vivo* intrazelluläre Lokalisierung in MDCK und COS-7-Zellen.

Die Ratten-Phäochromocytomzellinie PC12 hat aufgrund ihrer Abstammung von neuronalen Zellen die Eigenschaft, sich unter Ausbildung von neuritenartigen Ausläufern zu differenzieren. Diese sehr deutliche Änderung des Phänotyps kann durch Zugabe von NGF (nerve growth factor) oder Mikroinjektion von onkogenem Ras-Protein[212] induziert werden. Die erfolgreiche Injektion wurde mit einem Fluoreszein-Dextranmarker kontrolliert. Zwei Tage nach der Mikroinjektion der neo-Ras-Lipoproteine **4** und **7** erfolgte die Quantifizierung der Ausläuferbildung, sodass eine Korrelierung mit dem Transformierungspotential dieser Mutanten möglich wird (Abbildung 30).



(a) (b)

Abbildung 30: Transformation von PC12-Zellen nach Mikroinjektion mit onkogenen Dansyl-markierten neo-Ras-Proteinen **4c** (a) oder NBD markierten neo-Ras-Proteinen **4b** (b)

Zunächst wurden die neo-Ras-Proteine **4** evaluiert, bei denen die fluorophore Gruppe als Teil des Isoprenoides inkorporiert wurde. Nach Injektion der rekombinanten, onkogenen N-Ras(G12V)Proteine mit den Fluorophoren NBD **4a-b** und Bodipy FL **4d** konnte kein deutlich differentierter Phänotyp induziert werden. Erst das neo-N-Ras(G12V)Protein mit dem Fluorophor Dansyl **4c** entwickelte in dem Grossteil der injizierten Zellen Neuriten, und wies somit vergleichbare biologische Aktivität wie das nicht modifizierte *full length protein* auf.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende biologische Aktivität der neo-N-Ras Proteine **4a-b** und **4d** könnte der in der Literatur beschriebene Effekt des *looping back* der fluoreszenzmarkierten Isoprenoide aus der Plasmamembranlipiddoppel-schicht sein (Abbildung 31).[213] So verhindert die Polarität der NBD-Gruppe das Eintauchen der Alkylketten von Phosphatidylethanolaminen (NBD-PE) in Membranen.[195;214-216] Diese Beeinträchtigung des Lipidrückgrates konnte in Sphingolipiden sowohl für NBD- als auch für Bodipy-markierte Lipidketten festgestellt werden. Dadurch wurden nur noch schwache Affinitäten für sphingolipid-cholesterolreiche Domänen (*rafts*) registriert.[213]

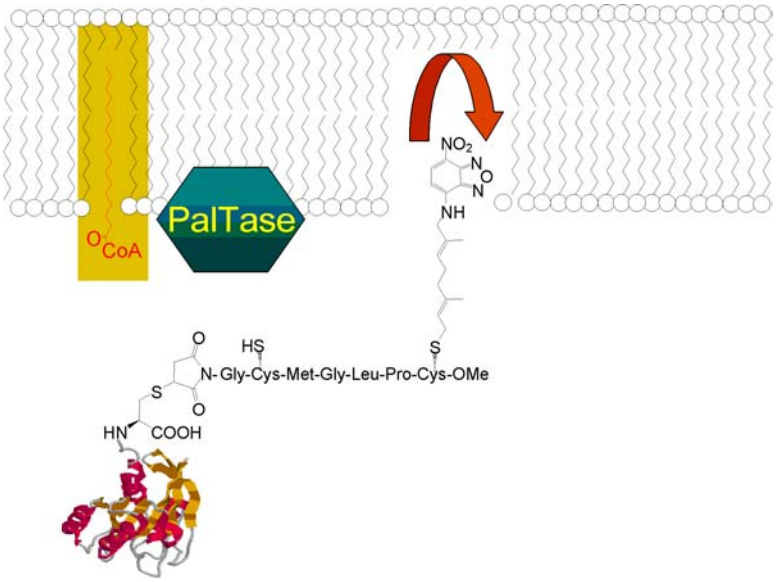


Abbildung 31: Theorie des *looping-back*[213] des Ras-Proteines **4a** aus biologischen Membranen

Im Falle der neo-Ras-Proteine könnte die stabile Membranverankerung verhindert sein, die die Palmitoylierung durch die putative Palmitoyltransferase ermöglicht. Lediglich die Naphtylgruppe des Dansylchromophors im Protein **4c** würde nach dieser Theorie eine ausreichende Lipophilie aufweisen, sodass eine stabile Membranverankerung ermöglicht wird.
Im folgenden wurden die neo-Ras Proteine **7** evaluiert. Bei ihnen war die fluorophore Gruppe nicht in das Isoprenoid inkorporiert, sondern anstelle der C-terminalen Methylestergruppe eingeführt worden.

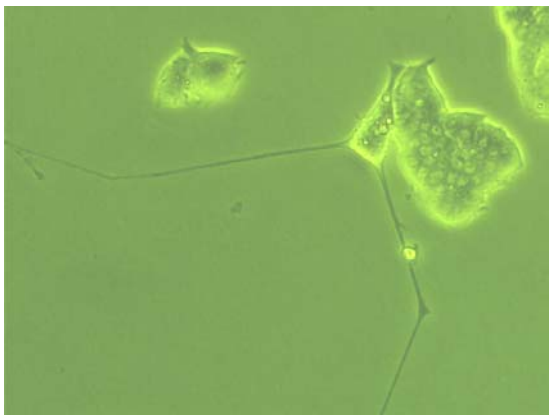
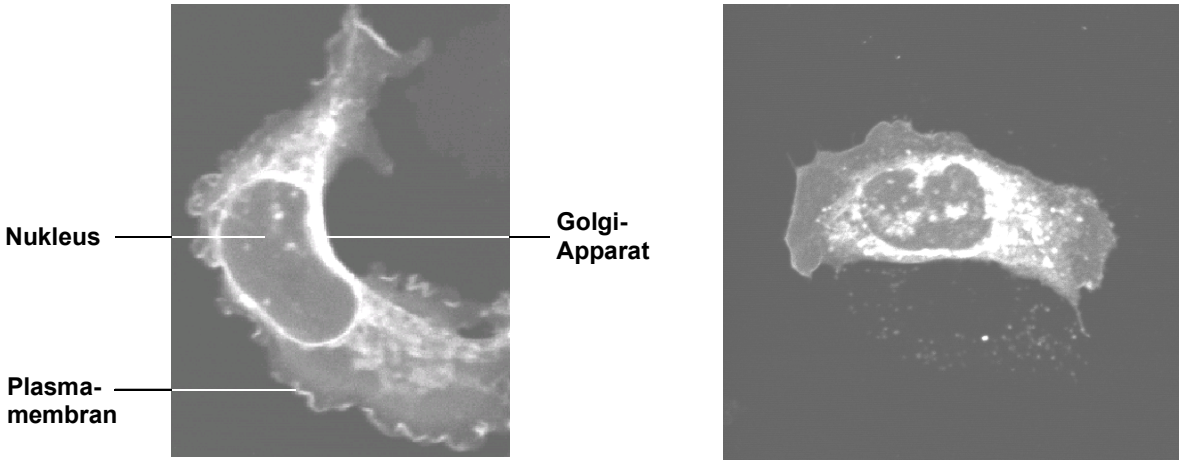


Abbildung 32: Transformation von PC12-Zellen nach Mikroinjektion mit onkogenen Bodipy FL-markierten neo-Ras-Proteinen **7a**

Nach der Mikroinjektion dieser rekombinanten, onkogenen N-Ras(G12V)-Proteine mit den Fluorophoren Bodipy FL **7a** und Bodipy TR **7b** in PC12 Zellen konnte ein deutlich diffentierter Phänotyp induziert werden. So wies der Grossteil der injizierten Zellen deutliches Neuritenwachstum auf (Abbildung 32). Diese Beobachtung stützt die Theorie des *looping back*,[195] zumal die Analoga **7** unmodifizierte Farnesylreste aufweisen.

Das fluoreszenzmarkierte Analogon **7c**, in dem das palmitoylierbare Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, war fast vollständig inaktiv in dem Assay. Das stimmt mit Transfektionsexperimenten überein, die unter Verwendung von Ras Konstrukten mit Mutationen am palmitoylierbaren Rest dramatisch reduzierte Transformierungs-aktivitäten und PM Lokalisationen beobachteten.[78] Eine einzige hydrophobe Modifikation ist demnach nicht für die biologische Aktivität von N-Ras ausreichend.
Die Untersuchung der biologischen Aktivität der neo-Ras-Proteine im Differenzierungsassay mit PC12-Zellen bildete die wesentliche Grundlage für die Lokalisationsstudien in MDCK- und COS-7 Zelllinien. Nach der Mikroinjektion einer wässrigen Lösung der Bodipy FL-markierten Proteinchimären **7a** in lebende COS-7 Zellen konnte mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie ein hochaufgelöstes Bild der Zelle erstellt werden. Dadurch wurde die subzelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proteinchimären untersucht (Abbildung 33).



(a) (b)

Abbildung 33: *In vivo* Lokalisierung von mikroinjizierten Bodipy FL-markierten neo-Ras-Proteinen **7a** nach Mikroinjektion in COS-7-Zellen (a) und MDCK-Zellen (b)

Auffällig war die Ras-spezifische Akkumulierung der Proteine im Golgi-Apparat und der Plasmamembran, den vermuteten Orten der zweiten posttranslationalen Lipidmodifikation und ihrer späteren Funktion. Diese Lokalisierung entsprach den Beobachtungen, die E. Choy *et al.* mit Hilfe von Green fluorescent Protein (GFP) markierten Ras-Proteinen machen konnte.[78]

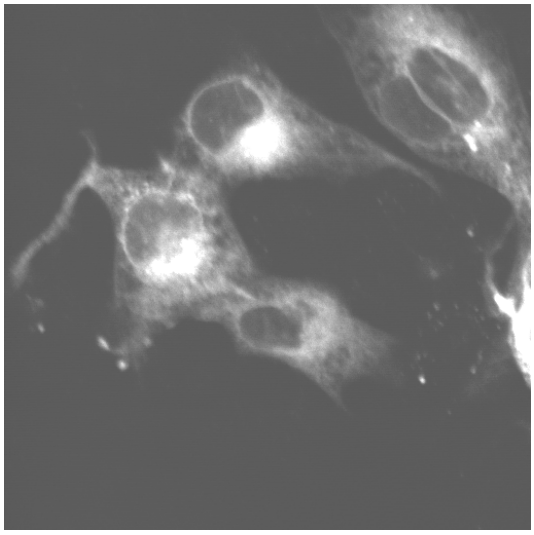


Abbildung 34: *In vivo* Lokalisierung von mikroinjizierten Bodipy FL-markierten neo-Ras-Proteinen **7c** nach Mikroinjektion in MDCK-Zellen

Im Fall des Proteins **7c**, das anstelle des palmitoylierbaren Cysteins C181 eine Serin-Aminosäure aufwies, war eine vergleichbare Lokalisation zu erkennen, mit dem wesentlichen Unterschied, dass eine Plasmamembranlokalisation nicht auftrat (Abbildung 34). Diese Beobachtung stimmte mit der bisherigen Annahme überein, dass für eine stabile Plasmamembraninsertion eine einfache Lipidierung durch einen Farnesylrest nicht ausreicht.[80]

Die NBD-markierten, biologisch inaktiven Proteinchimären **4a** und **4b** waren lediglich im Golgi-Apparat und nicht in der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 35). Dieser Befund ist mit der Annahme eines *looping back* im Einklang.

Für die Anregung der Fluoreszenz des biologisch aktiven, dansylmarkierten Ras-Analogons **4c** bei 340 nm war die Zweiphotonenspektroskopie oder die Anregung mittels UV-Laser erforderlich. Leider zeigte sich, dass jedoch die Intensität des UV-

Fluorophors zu schwach für eine *in vivo* Detektierbarkeit des Proteins ist.

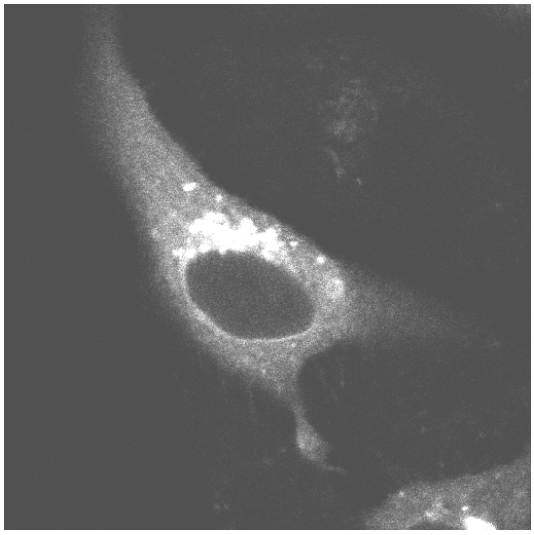


Abbildung 35: *In vivo* Lokalisierung des mikroinjizierten NBD-markierten neo-Ras-Proteins **4b** nach Mikroinjektion in MDCK-Zellen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass erstmalig mit niedermolekularen Fluorophoren ausgestattete, biologisch aktive und *in vivo* detektierbare neo-Ras-Proteine dargestellt werden konnten. Bisher beschriebene fluoreszierende Ras-Konjugate wiesen entweder GFP (*green fluorescent protein*)-Fluorophore auf, bei denen bereits die molekulare Masse des Fluorophors die des eigentlich zu untersuchenden Ras-Protein deutlich überschreitet (MW (GFP): 27 kDa, MW (Ras): 21 kDa)[77;79] oder bei denen der niedermolekulare *N*-Methylanthraniloyl-Fluorophor[77] *in vivo* nicht detektierbar ist.
Die neuartigen neo-Ras Proteine können in definierten Mengen in lebende Zellen mikroinjiziert werden. Durch die mögliche Ausstattung mit artifiziellen Resten stellen sie wertvolle Sonden zur Untersuchung der Membranassoziation von Ras dar. So konnte bestätigt werden, dass N-Ras über den Golgi-Apparat prozessiert wird. Palmitoylierbare Analoga erreichen danach die Plasmamembran, wohingegen Analoga, bei denen diese zweite Lipidmodifikation nicht erfolgen kann, im Golgi-Apparat verbleiben. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten mit Hilfe dieser Sonden noch keine der gängigen Theorien zur Membranadressierung von N-Ras ausgeschlossen werden. Drei Möglichkeiten werden im folgenden diskutiert (Abbildung 6, Seite 13):

(I) Eine enzymfreie Autopalmitoylierung von N-Ras vervollständigt die posttranslationale Reifung. Falls diese bereits am Golgi-Apparat stattfinden sollte, müsste das Herauslösen der dann fest in die Golgi-Membran verankerten Ras-Proteine durch Vesikelbildung oder Eskortproteine stattfinden. Falls die Autopalmitoylierung cytosolisch stattfindet, könnte das korrekte Erreichen der Plasmamembran durch bisher unbekannte (N-)Ras-Rezeptorproteine oder vermittelt durch eine Ras-Thioesterase[77] stattfinden.
(II) Die Pamitoylierung findet katalysiert durch eine am Golgi-Apparat lokalisierte Palmitoyltransferase statt. Das zweifach lipidierte N-Ras-Protein wird in einem vesikulären Transport an die Plasmamembran gebracht. Die korrekte Lokalisation wird wie im Falle (I) durch ein Rezeptorprotein oder eine Palmitoyl-Thioesterase kontrolliert.
(III) Nach dem Modell der Membranfalle (*membrane trapping*) kann das farnesylierte N-Ras-Protein aufgrund seiner schwachen Verankerung die Golgi-Membran verlassen und wechselt in einem gleichgewichtskontrollierten Diffusionsprozess zwischen dem Cytosol und den verschiedenen intrazellulären Membranen. Die spezifisch in der Plasmamembran lokalisierte Palmitoyltransferase verstärkt mit der zweiten hydrophoben Modifizierung die Membranbindung, so dass ein Verlassen der Zielmembran verhindert wird.
Durch zeitaufgelöste zelluläre Lokalisationsstudien im konfokalen Fluoreszenz-mikroskop und die Auswirkungen von Ras-Palmitoylierungsinhibitoren (Kap. 4.2) auf die Lokalisation der neo-Ras-Proteine kann versucht werden, Hinweise für die Bewertung der vorgestellten Theorien der Membranadressierung von N-Ras zu finden.

4.2 Cerulenin-Analoga

Die Inhibierung posttranslationaler Modifikationen von Ras-Proteinen stellt einen neuen Ansatz zur Entwicklung von Krebsmedikamenten dar. Bis jetzt beschränkte sich die Forschung lediglich auf die Entwicklung von Inhibitoren für die erste Ras-Lipidierung, der Farnesylierung.[92] Die konzentrierte Suche nach Inhibitoren für die zweite N-Ras Lipidierung, der Palmitoylierung, ist vermutlich vor allem noch nicht aufgenommen worden, da die postulierte Palmitoyltransferase (PalTase) bis jetzt noch nicht nachgewiesen und charakterisiert werden konnte.[54;57]

In ersten Versuchen konnte C.D. Smith zeigen, dass der Naturstoff Cerulenin (Abbildung 36) die Palmitoylierung von Ras verhindert.[115-118] Dieser fungale Metabolit wurde 1960 von Hata *et al.* aus dem Filtrat einer Kultur von *Cephalosporium caerulens* isoliert.[162]

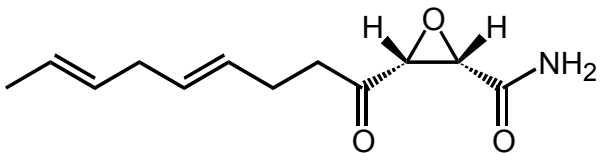


Abbildung 36: Struktur des Ras-Palmitoylierungsinhibitors Cerulenin

Der medikamentöse Einsatz von Cerulenin ist jedoch aufgrund der zytotoxischen Fettsäuresynthase-Inhibition unmöglich. Um dennoch die hohe Reaktivität der Leitstruktur auszunutzen und einen neuartigen Palmitoylierungsinhibitor mit einer optimierten Selektivität darzustellen, war eine Variierung der Substituenten von Cerulenin erstrebenswert. Obwohl mehrere Totalsynthesen von Cerulenin[217-223] und einige Analoga von Cerulenin beschrieben sind,[117;224-226] gab es keine Synthesestrategie, die in wenigen Schritten die kombinatorische Synthese einer Reihe von Analoga ermöglicht. Daher wurde im folgenden eine Synthesestrategie entworfen, die bereits in wenigen Schritten in Lösung eine Bibliothek verschiedener Cerulenin-Analoga entwickeln kann (Abbildung 37).

4.2.1 Synthese einer Ceruleninbibliothek

Bei der Strategie zur Synthese einer Ceruleninbibliothek wurde angestrebt, einen zentralen Baustein zu entwickeln, der die essentielle *cis*-Epoxysuccinimidstruktur von Cerulenin aufweist, sodass in den wenigen abschließenden Stufen eine Vielzahl diverser Elemente eingeführt werden kann (Abbildung 37).
Dieser zentrale, neuartige Epoxysuccinimidbaustein **41** konnte in nur sechs Stufen in einer Ausbeute von 28% im Multigrammmaßstab dargestellt werden. Zunächst wurde Maleinsäure nach einer Methode von Payne und Williams katalytisch *cis*-epoxidiert.[227] Die elektrophile, epoxidierende Spezies war ein hochmolekularer, das Substrat bichelatisierender Polywolframatkomplex.[228]
Auf die Synthese eines enantiomerenreinen Epoxysuccinatmonoesters[229;230] oder die Verwendung einer stereoselektiven Epoxidierungsmethode, wie z.B. der

Polyleucin-katalysierten Julia-Colonna-Epoxidierung[231-233], die Lanthan-Binol-Triphenylarsinoxid-katalysierten Epoxidierung nach Shibasaki *et al.*[234] oder der Salen-Mangan(III)-katalysierten Jacobsen-Epoxidierung[235], wurde verzichtet, da nicht bekannt ist, welche Enantiomere biologische Aktivität aufweisen.

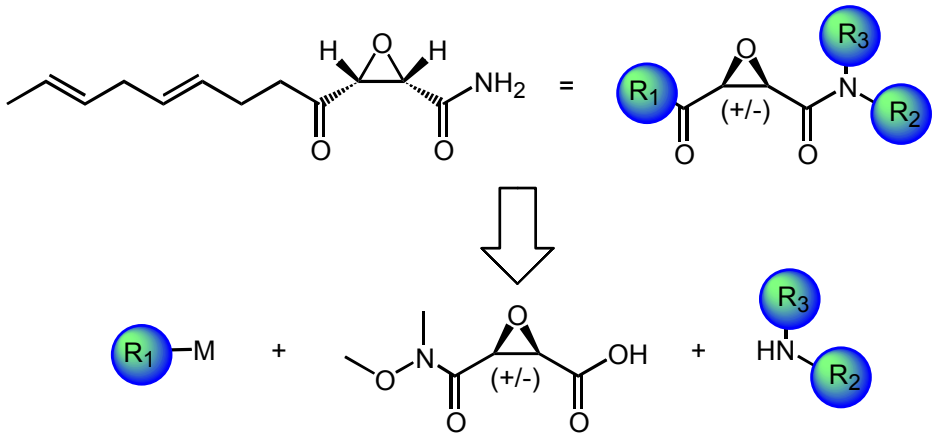


Abbildung 37: Retrosynthetische Analyse von Cerulenin-Analoga, M = Metall

Leicht möglich wäre jedoch auch die Racematspaltung durch das Kristallisieren diastereomerer Argininsalze von **38**.[236]

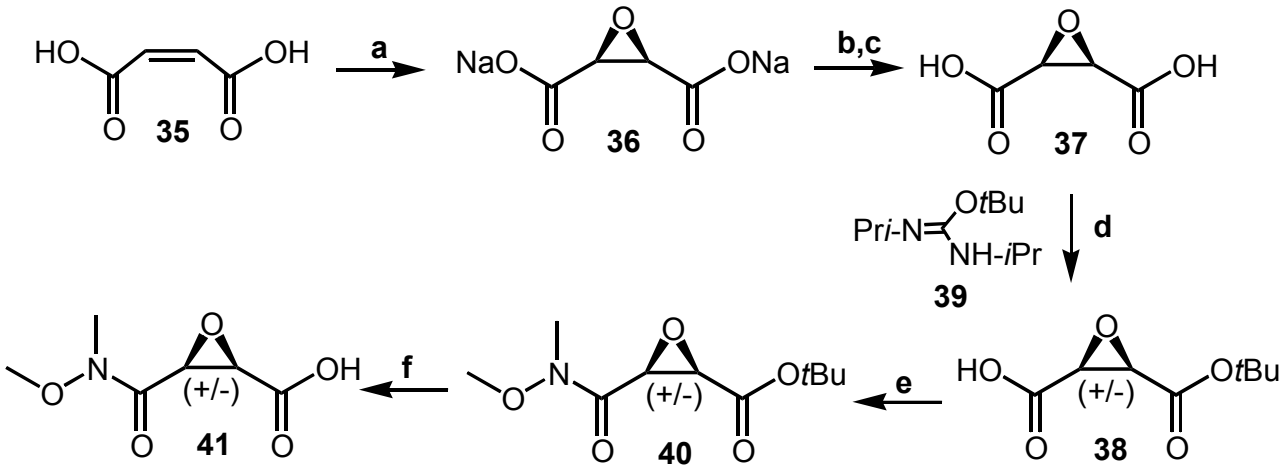


Abbildung 38: Synthese des zentralen Epoxysuccinimidbausteins **41** zur Synthese von Cerulenin-Analoga

a) H_2O_2, NaOH, Na_2WO_4; **36** = 95%; b) $BaCl_2$, H_2O; c) H_2SO_4, Et_2O; **37** = quant. (b und c); d) **39**, THF; **38** = 65%; e) HNMeOMe*HCl, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; **40** = 65% f) TFA, Et_3SiH, CH_2Cl_2; **41** = 69%.

Das nach der Epoxidierung generierte Dinatrium *cis*-Epoxysuccinat (**36**) war so polar, dass es nur noch in wässrigen Lösungsmitteln löslich war.
Um es in organischen Lösungsmitteln umsetzen zu können, wurde es in zwei Stufen in die *cis*-Epoxybernsteinsäure (**37**) überführt (Abbildung 38). Nach dem Ausfällen mit Bariumchlorid wurde das Barium *cis*-Epoxysuccinat in Diethylether suspendiert und mit Schwefelsäure umgesetzt. Dabei wurde die entstehende *cis*-Epoxybernsteinsäure (**37**) gelöst und das Nebenprodukt Bariumsulfat fiel aus. Dieser Effekt sorgte für die Triebkraft der Reaktion und ermöglichte eine quantitative Ausbeute. Die direkte Überführung der *cis*-Epoxybernsteinsäure (**37**) durch Monoamidierung mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid[237] in die 3-(Methoxymethyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure **41** gelang aufgrund der entstehenden kaum trennbaren, hochpolaren Mischung aus **37**, **41** und dem Bisamidierungsprodukt nicht. Daher wurde die chemoselektive mono-Schützung der Dicarbonsäure (**37**) mit einer *tert*-Butylesterschutzgruppe angestrebt. Als geeignetes Reagenz für diese in 65%-iger Ausbeute verlaufende Veresterung erwies sich 2-*tert*-Butyl-1,3-diisopropylharnstoff (**39**).[238;239] In den nun zur Verfügung stehenden *cis*-Epoxybernsteinsäuremono-*tert*-butylester (**38**) konnte nun die Weinrebamidgruppe selektiv mit Hilfe der EDC-Carbodiimidmethode[204] eingeführt werden. Die Darstellung und chromatographische Aufreinigung des 3-(Methoxymethylcarbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure-*tert*-butylesters (**40**) gelang mit einer Ausbeute von 65%. Die Trifluoressigsäure-katalysierte Abspaltung der *tert*-Butylestergruppe war unter Zusatz des Carbokationenfängers Triethylsilan[240] in 69% Ausbeute möglich, sodass der für die Synthese von Ceruleninanaloga essentielle Baustein 3-(Methoxymethyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (**41**) erstmalig erhalten werden konnte.

Ausgehend von 3-(Methoxymethylcarbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (**41**) konnten zum einen durch die Amidknüpfung an die Carbonsäureeinheit, zum anderen durch die Addition von organometallischen Reagenzien an die Weinrebamidgruppe[237] in zwei Richtungen variable Gruppen in das Epoxysuccinimid eingeführt werden (Abbildung 39). So wurden mit Hilfe der EDC/HOBt-vermittelten Amidierung[204] von 3-(Methoxymethyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (**41**) in 76% Ausbeute das Benzylamid **42** und in 47%iger Ausbeute das *N*-(Triphenylmethyl)ethylendiamid **44** synthetisiert. Die Einführung der hoch unpolaren Tritylgruppe[241] ermöglichte in den

folgenden Syntheseschritten die Verwendung von Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran (THF), Diethylether oder Pentan.

Die zweite Diversifikation konnte über den C-C verknüpfenden Angriff von Metallorganylen an die Weinrebamidgruppe erfolgen.[237;242-246] In dieser Reaktion konnten Analoga für die C_8-Dienkette des Cerulenins eingeführt werden.

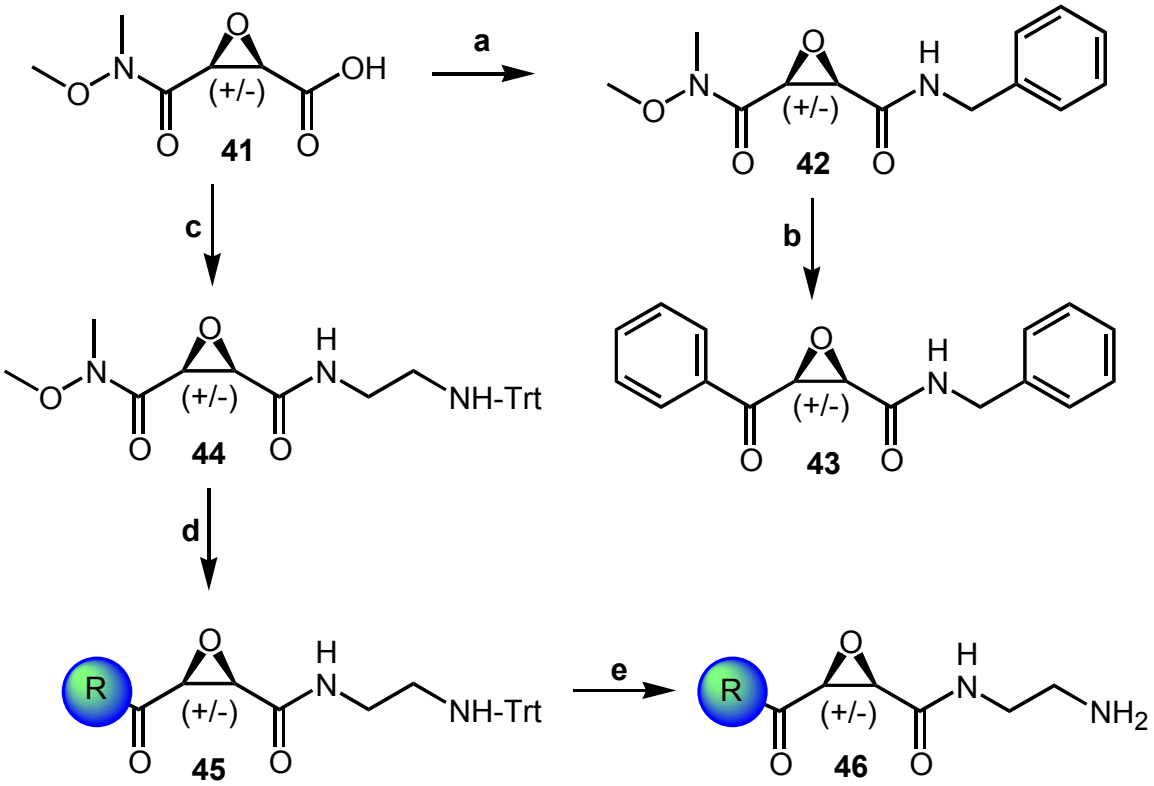


Abbildung 39: Synthese von Cerulenin-Analoga

a) $BnNH_2$, EDC, HOBt, THF; **42** = 76%; b) PhLi, THF, -78°C; **43** = 16%; c) Trt-NH-C_2H_4-NH_2, EDC, HOBt, THF; **44** = 47%; d) RI, *n*BuLi oder *t*BuLi, THF, -78°C->rt, R = Arom, Alk.; **45a** = 53%; **45b** = 40%; **45c** = 36%; **45d** = 32%; **45e** = 55%; **45f** = 21%; e) TFA (1%), CH_2Cl_2; **46a** = 68%; **46b** = 49%; **46c** = 96%; **46d** = 97%; **46e** = 52%; **46f** = 61%.

Die besondere Schwierigkeit in dieser Reaktion bestand darin, dass nicht nur die Weinrebamidgruppe eine Reaktivität gegenüber organometallischen Reagenzien aufwies, sondern auch die *cis*-Epoxideinheit leicht durch die *C*-Nucleophile geöffnet werden konnte. So wurde in ersten Versuchen zur Addition von Grignard-Reagentien an die Weinrebamidgruppe der 3-(Methoxymethylcarbamoyl)-oxiran-2-carbonsäuramide **42** und **44** selbst bei –78°C lediglich die Öffnung der Epoxidgruppe

beobachtet. Erst der Einsatz von Organolithiumreagentien bei –78°C ermöglichte die chemoselektive Substitution der Weinrebamidgruppe, ohne das Epoxysuccinimid zu zerstören. Erste Untersuchungen von C.D. Smith *et al*. zeigten, dass die Selektivität des Palmitoylierungsinhibitors durch die Einführung eines aromatischen Restes optimiert werden kann.[117] Daher wurden vor allem Aromaten mit verschiedenen Substituenten eingeführt (Abbildung 40).

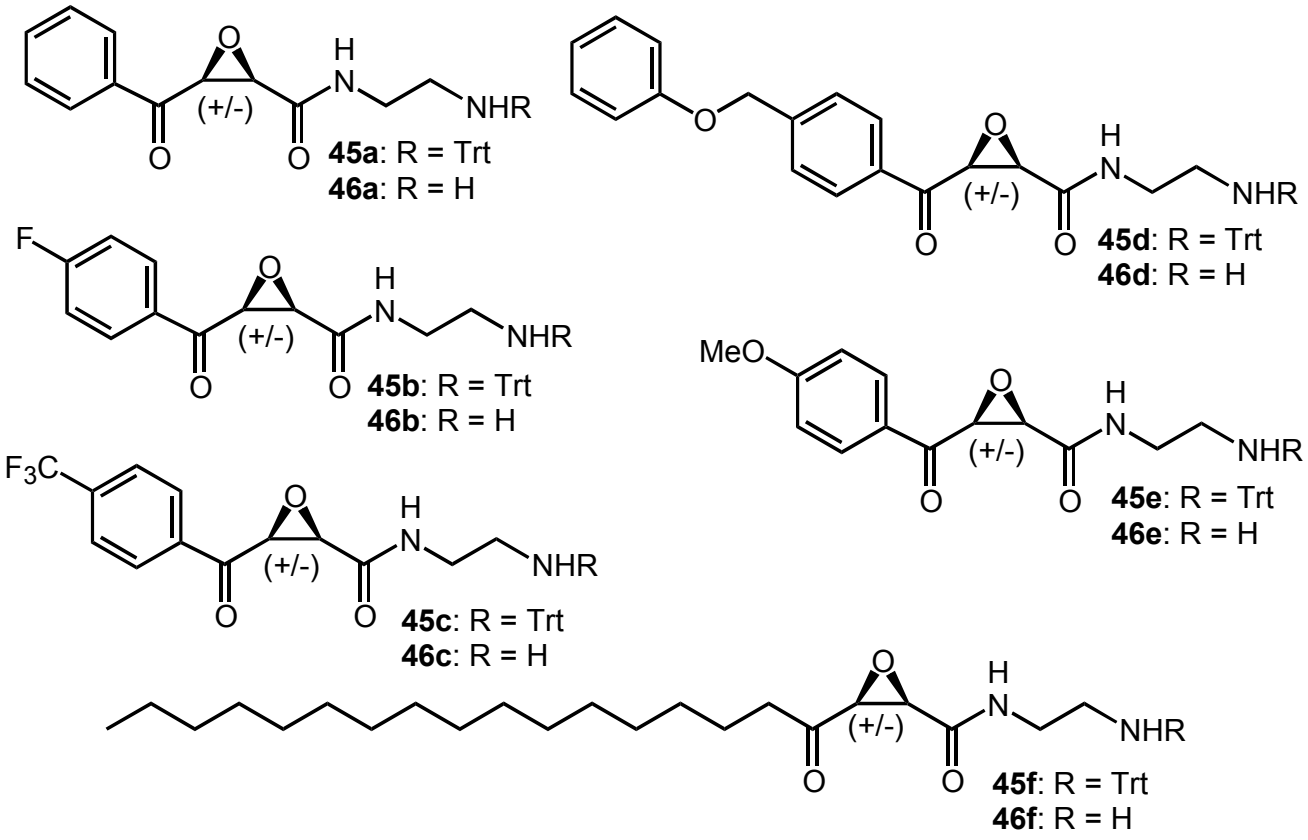


Abbildung 40: Übersicht über die dargestellten Cerulenin-Analoga **45** und **46**

Nach der Lithiierung der diversen Iodo- oder Bromo-Aromaten durch *n*-Butyllithium bei –78°C wurden die 3-(Methoxymethylcarbamoyl)-oxiran-2-carbonsäuramide **42** und **44** zugetropft. Bereits nach ca. zwei Stunden konnte der vollständige Umsatz dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden und nach chromatographischer Reinigung die α,β-Keto-Epoxycarbonamide **43** und **45** in bis zu 55%iger Ausbeute erhalten werden.

Eine besondere Herausforderung bestand in der Synthese von Alkylanaloga der α,β-Keto-Epoxycarbonamide. So kann eine eingeführte C_{16}-Alkylkette die Partialstruktur von Palmitoyl-CoenzymA nachahmen und könnte eine hohe Selektivität in der

Inhibierung der Ras-Palmitoylierung aufweisen. Das benötigte Hexadecyllithium ist auch bei tiefen Temperaturen sehr instabil und nur durch die Einwirkung von *tert*-Butyllithium auf das Alkyliodid in einem Pentan/Diethylethergemisch generierbar.[247] Dennoch konnte auch das C_{16}-Alkyl-Analogon **46f** von Cerulenin in einer Ausbeute von 21% dargestellt werden.
Um die Wasserlöslichkeit der noch geschützten Ceruleninanaloga zu erreichen, wurde im abschließenden Schritt die Tritylschutzgruppe Trifluoressigsäure-katalysiert in 49% bis 97% Ausbeute abgespalten. Mit dieser Reaktionssequenz konnten sieben Ceruleninanaloga **43** und **46** synthetisiert werden (Abbildung 40).

4.2.2 Biologische Evaluierung der Ceruleninanaloga

M. Wagner überprüfte die Aktivität eines ersten Cerulenin-Analogons in einem PC-12 Mikroinjektionsassay.[212]
Die Mikroinjektion einer 25 µmolaren konzentrierten onkogenen N-RasG12V Mutante in PC-12 Zellen führte bei 48 +/- 4 % der Zellen zu einem Neuritenwachstum. Wurde in einer 2 µmolaren Konzentration 3-Benzoyloxiran-2-carbon(2-aminoethyl)-amid (**46a**) koinjiziert, sank die Neuritenrate auf 13 +/- 8%. Da die Zellen zwei Tage nach der Injektion mit der Substanz adhärent waren und teilweise eine morphologische Änderung in Form von Neuritenwachstum beobachtet wurde, konnte indiziert werden, dass die Zellen vital blieben. Aufgrund der deutlichen Wirksamkeit und dem Ausbleiben zytotoxischer Effekte, könnte eine weitergehende Evaluierung der Mitglieder der Cerulenin-Bibliothek als Ras-Palmitoylierungsinhibitoren vielversprechend werden.

4.3 Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

4.3.1 Hydrolysestabile Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

Die dreidimensionale Struktur des Rab-Isoprenylierungskomplexes aus GGTase II und REP-1 war bis vor kurzem unbekannt. Als Problem erwies sich, dass Versuche zur Kristallisation und röntgenkristallographischen Messung in Abwesenheit des Substrates Geranylgeranylpyrophosphat vermutlich aufgrund der mangelnden Rigidität des Komplexes zu zu geringen Auflösungen führten. Wurde eine

Kokristallisation mit dem Substrat versucht, führte die intrinsische Phosphataseaktivität des Komplexes zur Hydrolyse des Substrates.
Hydrolysestabile Isoprenoide könnten einen Ausweg für die erfolgreiche Kristallisation des Rab-Isoprenylierungskomplexes bieten.

4.3.1.1 Synthese hydrolysestabiler Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

Da nicht bekannt war, welche der Sauerstoffbrücken durch die intrinsische Hydrolyseaktivität der GGTase II/REP-1-Proteinkristalle gespalten wurde, wurden zwei Sorten von Analoga synthetisiert, in denen jeweils mindestens eine Sauerstoffbrücke durch eine nicht spaltbare Methylenbrücke ersetzt wurde. Dabei wurden jeweils Analoga für die Farnesyl- und die Geranylgeranylkettenlänge dargestellt.
Phosphonylmethylphosphonat (PMP)-Isoprenoide **49** mit einer Kettenlänge von C_{12}- und einer C_{15}-Kettenlänge wurden analog einer für Farnesyl-Phosphonylmethyl-phosphonat beschriebenen Synthese dargestellt (Abbildung 41).[248]

Zunächst wurden die allylische Alkoholgruppen in Farnesol (**10b**) und dem in vier Stufen dargestellten Geranylgeraniol (**10c**)[249-251] quantitativ in einer Corey-Kim-Reaktion[201] bromiert. Als weniger geeignet hat sich die Verwendung von Tetrabromkohlenstoff und Triphenylphosphin in einer Appel-Reaktion erwiesen, da das entstehende Triphenylphosphinoxid schlecht abtrennbar ist.[252] Weil Isoprenoidhalogenide zum Zerfall über carbokationische Intermediate neigen, musste bei der Einführung der Methandiphosphonylgruppe ein aprotisches Lösungsmittel wie Acetonitril verwendet werden, das keine Solvolyse ermöglicht. Daher wurde ein Methandiphosphonat-Salz verwendet, das in diesem organischen Lösungsmittel löslich war. Tris(tetra-*N*-butylammonium)hydrogenmethyldiphosphonat (**48**)[253] war löslich in Acetonitril und zudem leicht zugänglich aus Methandiphosphonsäure.
Nach der Einführung der Methandiphosphonylgruppe in das Isoprenylhalogenid durch nucleophile Substitution des allylischen Bromides erfolgte die Überführung des Tetra-*N*-butylammoniumsalzes in das Ammoniumsalz mittels eines Kationenaustauschers. Nach der abschließenden Reinigung auf einer C18-RP-Säule mit einem Gradienten aus 25mM Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril wurden Farnesylphosphonylmethylphosphonat (Far-PCP) (**49a**)[248] und

Geranylgeraniolphosphonyl-methylphosphonat (GerGer-PCP) (**49b**) in Ausbeuten von 63% bzw. 61% gewonnen.

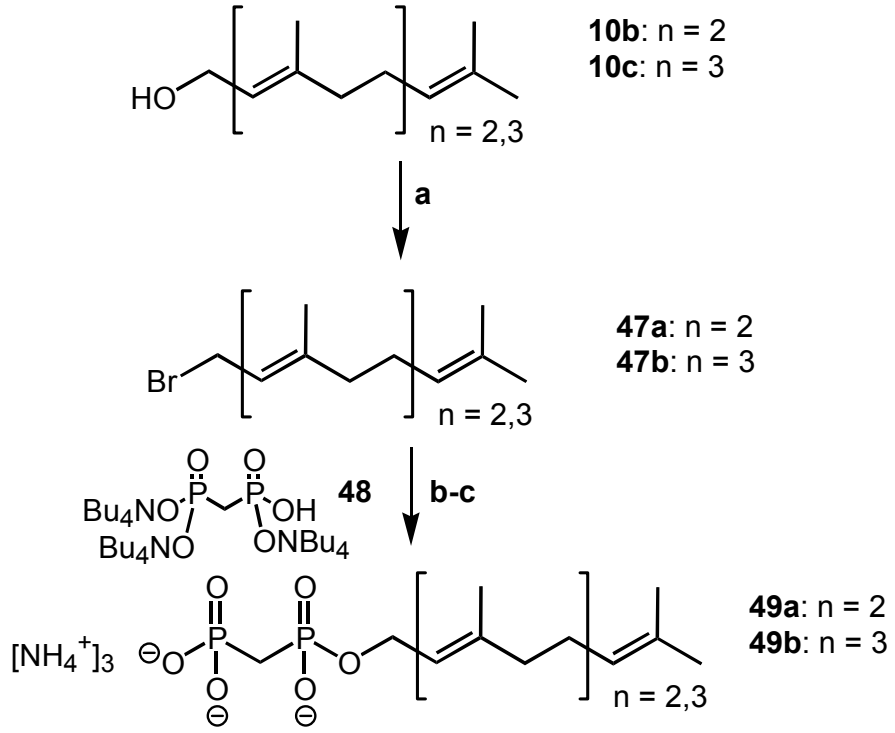


Abbildung 41: Synthese hydrolysestabiler Isoprenoidpyrophosphatanaloga Far-PCP **49a** und GerGer-PCP **49b**

a) NBS, DMS, CH_2Cl_2, -30°C →0°C; **47a** = **47b** = quant.; b) CH_3CN, rt, 2 h; c) Ionenaustausch NBu_4^+/NH_4^+; **49a** = 63%; **49b** = 61%.

Farnesyl- bzw. Geranylgeranylanaloga, bei denen auch die zweite Pyrophosphat-Sauerstoffbrücke durch eine Methylengruppe ersetzt wurde, sind die Isoprenylmethylphosphinylmethylphosphonate **52**. Hier war lediglich eine sechsstufige Synthese zur Darstellung des Farnesylpyrophosphatanlogons Far-CPCP (**55a**) aus Farnesol (**10b**) bekannt (Abbildung 42).[254] Nach dieser Strategie wurde auch der Zugang zum Geranylgeranylpyrophosphatanalogon **55b** versucht.

Zunächst wurden die Dimethyl(isoprenyl)methylphosphonate Farcp$(OMe)_2$ **50a** und GerGercp$(OMe)_2$ **50b** durch Zutropfen der oben beschriebenen Farnesyl- und Geranylgeranylbromide **47** zu lithiiertem Dimethylmethylphosphonat bei –78°C in

Ausbeuten von 93%[254-256] und 52% erhalten. Chemoselektiv und quantitativ wurde im folgenden nur eine der beiden Methylestergruppen Natriumhydroxid-katalysiert verseift.[254] Die Chlorierung der erhaltenen Monomethyl(isoprenyl)-methylphosphonsäuren Far-CP(OMe) **51a** und GerGer-CP(OMe) **51b** konnte durch Oxalylchlorid DMF-katalysiert erreicht werden.[254] Die erhaltenen hydrolyselabilen Phosphonsäurechloride wurden ohne weitere Aufreinigung zu lithiiertem Dimethylmethylphosphonat getropft.[254] Die beiden Trimethyl[{(isoprenylmethyl)-phosphinyl}methyl]phosphonate **52** wurden mit unterschiedlichen Erfolgen dargestellt. Das Farnesylanalogon Far-CPCP(OMe)$_3$ **52a**[254] wurde in der literaturbeschriebenen Ausbeute von 72% erhalten, das neue Geranylgeranylanalogon GerGer-CPCP(OMe)$_3$ **52b** hingegen konnte in nur in Spuren isoliert werden.

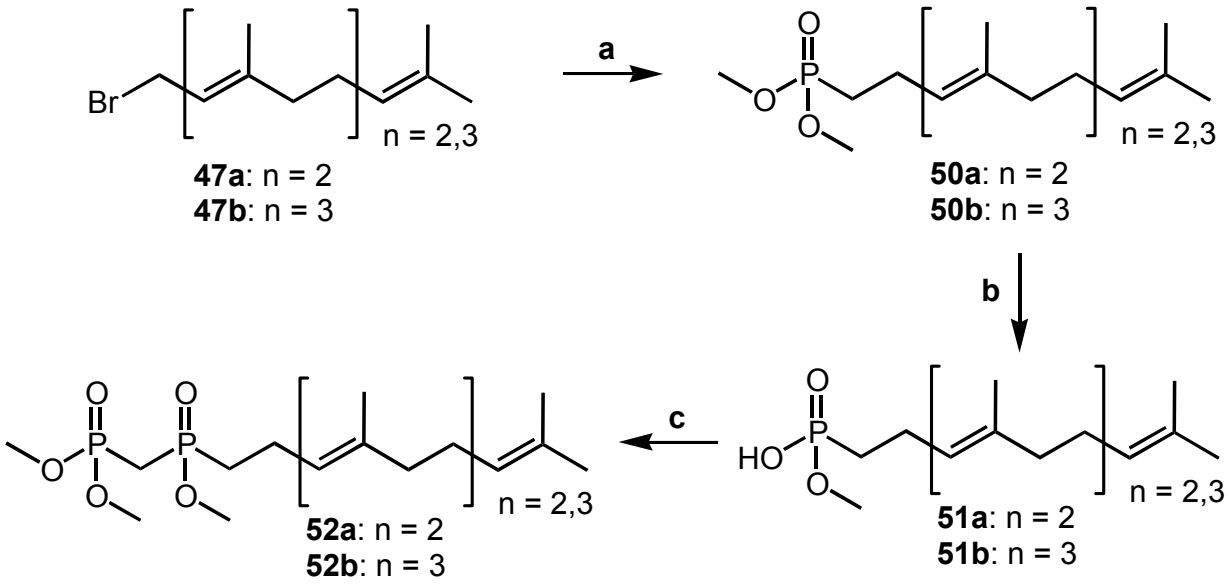


Abbildung 42: Synthese hydrolysestabiler Isoprenoidpyrophosphatanaloga

a) Dimethylmethylphosphonat, *n*-BuLi, THF, -78°C; **50a** = 93%; **50b** = 52%; b) KOH, MeOH, H_2O; **51a** = **51b** = quant.; c) CO_2Cl_2, DMF (kat.), Benzol; d) Dimethylmethylphosphonat, *n*-BuLi, THF, -78°C; **52a** = 72%; **52b** = 2%.

Folglich musste nach einer neuen Synthesestrategie zur Darstellung von Isoprenylmethylphosphinylmethylphosphonaten **52** gesucht werden.

Vielversprechend ist die Einführung der Methylphosphinylmethylphosphonylgruppe in einem Schritt (Abbildung 43). Die Synthese der erforderlichen cpcp-Einheit **53** wurde auf verschiedenen Wegen versucht, [257;258] jedoch erst die Umsetzung von lithiiertem Diisoproylmethylphosphonat mit Methylphosphonsäuredichlorid und nachfolgendem *quenching* mit Isopropanol führte zur erfolgreichen Synthese von (((Diisopropoxyloxyphosphinyl)methyl)isopropyloxyphosphinyl)methan (**53**).[259] Für eine C-C-Knüpfung zwischen der Methylgruppe von **53** und der allylischen Methylengruppe der Isoprenoide **47** musste zunächst **53** durch Deprotonierung zum Elektrophil werden. Da die Methylengruppe eine höhere Acidität aufweist, war eine Dianionbildung nötig. Mit der literaturbeschriebenen konsekutiven Deprotonierung durch Natriumhydrid und *n*-Butyllithium konnte das Dianion aus **53** nicht generiert werden.[258] Erst mit der Verwendung von 2.5 Äquivalenten *tert*-Butyllithium, einer nicht in der Literatur beschriebenen Deprotonierungsvariante, konnten Far-CPCP(O*i*Pr)$_3$ **54a** und GerGer-CPCP(O*i*Pr)$_3$ **54b** in guten bis hervorragenden Ausbeuten von 98% und 61% zugänglich gemacht werden.

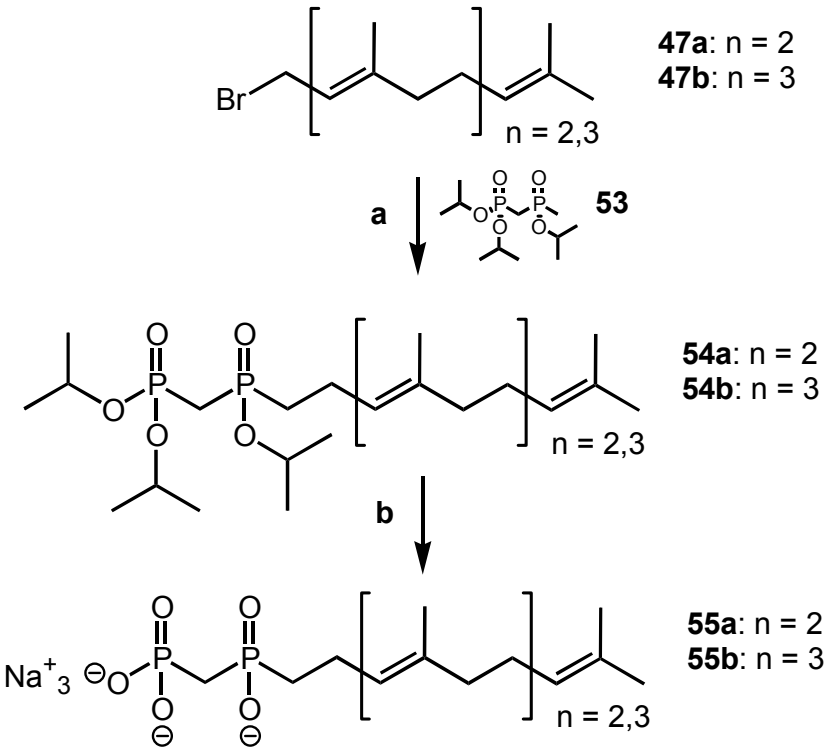


Abbildung 43: Synthese hydrolysestabiler Isoprenylmethylphosphinylmethyl-phosphonate **55**

a) *t*-BuLi, **53**, THF, -78°C; **54a** = 98%; **54b** = 61%; b) TMSBr, 2,4,6-Collidin, CH_2Cl_2, dann NaOH, H_2O; **55a** = 72%; **55b** = 68%.

Nach der abschließenden Isopropylesterspaltung von **54** durch Zugabe der Lewis-Säure Trimethylsilylbromid und der Base Collidin wurden die erhaltenen Isoprenylmethylphosphinylmethylphosphonsäuren mit Natronlauge neutralisiert.[258] Die Aufreinigung der Trinatrium{(isoprenylmethyl)phosphinyl}methylphosphonate **55** fand mit einer C_{18}-RP-Säule mit einem Gradienten aus 25mM Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril statt. Dabei konnten Far-CPCP **55a**[258] und GerGer-CPCP **55b** in Ausbeuten von 72% bzw. 68% isoliert werden.

4.3.1.2 Anwendung in der Protein-Strukturaufklärung

Die Anwendung der Pyrophosphatanaloga in der Protein-Strukturaufklärung wurde von K. Alexandrov und A. Rak (Abteilung R. Goody, MPI Dortmund) durchgeführt.

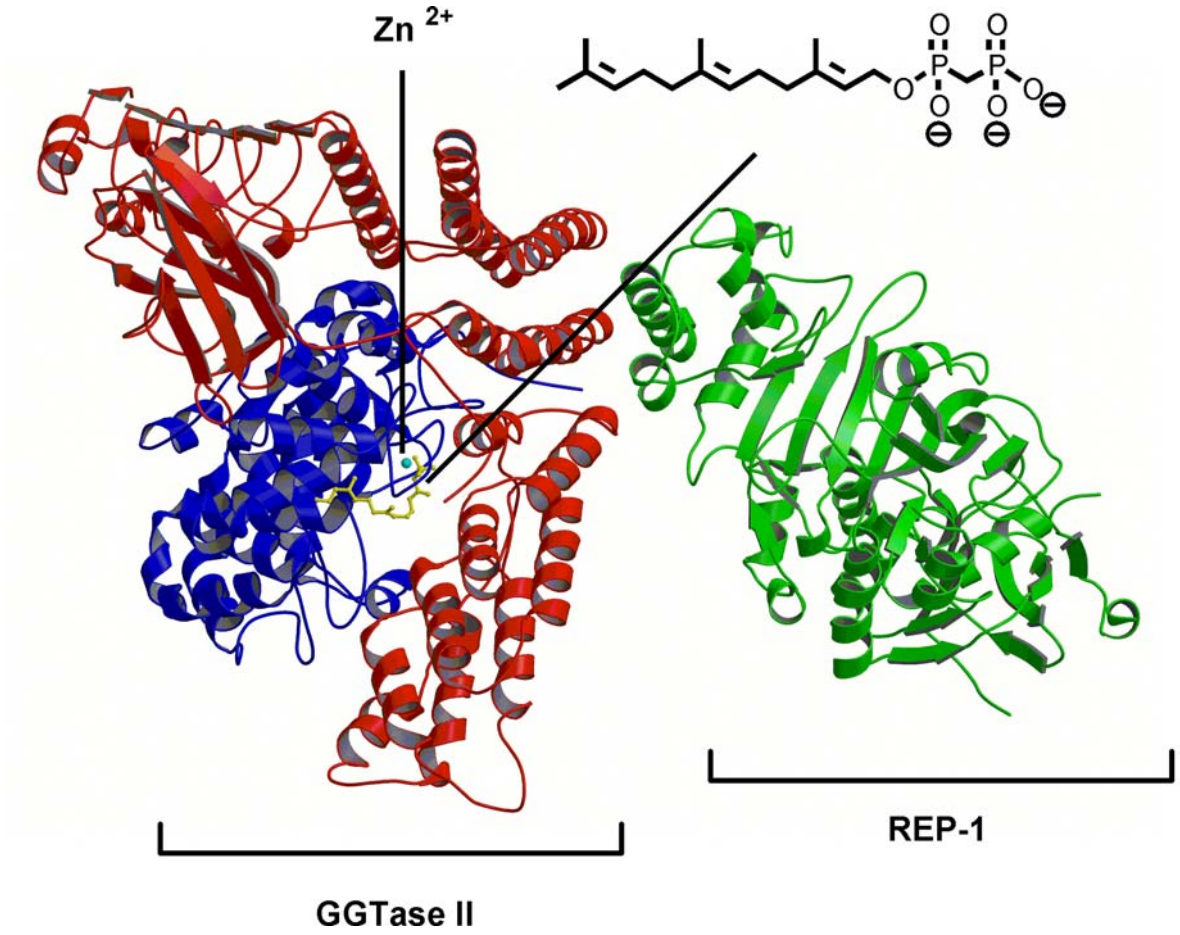


Abbildung 44: Röntgenstruktur des Komplexes REP-1: GGTase II: Far-PCP **49a**[261]

Die Proteine GGTase II und REP-1 wurden zusammen mit Farnesyl phosphonylmethylphosphonat (Far-PCP) (**49a**)[248] mittels der *hanging drop vapour*

diffusion Methode kristallisiert. Die röntgenspektroskopischen Daten wurden am *beam line ID14-1*, ESRF, Grenoble gesammelt und mittels des *XDS program suite* ausgewertet.[260]

Es zeigte sich, dass mit Hilfe von **49a** erstmalig die erhoffte Strukturaufklärung des Rab-Isoprenylierungskomplexes aus GGTase II und REP-1 mit einer Auflösung von 2.7 Å gelang (Abbildung 44).[260;261] Die intrinsische Phosphataseaktivität des Komplexes konnte das Pyrophosphatanalogon nicht hydrolysieren, sodass auch die Lage des Farnesolanalogons Far-PCP **49a** in der Röntgenstruktur erkannt werden konnte. Das besondere und seltene Charakteristikum dieses ternären Komplexes war, dass die hochaffine Bindung zwischen REP-1 und der GGTase II auf einer nur 680 $Å^2$ kleinen Plattform stattfindet. Dabei intercaliert eine aromatische Phenylalanin-Seitenkette des REP-1 in einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen zwei α-Helices der GGTase-II.[260]

4.3.2 Fluoreszenzmarkierte Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

In den vorigen Kapiteln sind zuverlässige, aber aufwendige Methoden zur Einführung von Fluoreszenzmarkierungen in Lipoproteine durch Ligationen von markierten Lipopeptiden und Proteinen beschrieben worden.

Als eine Methode zur Modifizierung und gleichzeitigen Markierung rekombinanter unisoprenylierter Proteine bietete sich ihre Isoprenylierung mit fluoreszenzmarkiertem Geranylgeranylpyrophosphat *in vitro* an.[130;131;262] Ähnlich wertvolle biochemische Sonden können nur Tritiummarkierte [^{3}H]-Farnesyl- oder [^{3}H]-Geranylgeranylpyrophosphate sein.[263]

4.3.2.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

Zur Synthese fluoreszenzmarkierter Isoprenoidpyrophosphate wurde auf die in den vorigen Kapiteln beschriebenen ω-NBD-Isoprenyl-Chloride **18** zurückgegriffen (Abbildung 45). Der Charakter der Pyrophosphorylierungsreaktion ist sehr vergleichbar mit der Methandiphosphonylierung von Isoprenhalogeniden.

Als Pyrophosphatsalz wurde Tris(tetra-*N*-butylammonium)hydrogenpyrophosphat[253] in einer S_N2-Reaktion mit NBD-NH-Ger-Cl **18a** und NBD-NH-Far-Cl **18b** eingesetzt.

Da sowohl das Tris(tetra-*N*-butylammonium)hydrogenpyrophosphat als auch die ω-NBD-Isoprenyl-Chloride hydrolyselabil sind, diente als Lösungsmittel absolutes Acetonitril. Die erhaltenen *N*-Butylammonium-Pyrophosphate sind *in vitro* nicht verwendbar, sondern wurden mittels eines Kationenaustauschers in das Ammoniumsalz überführt.

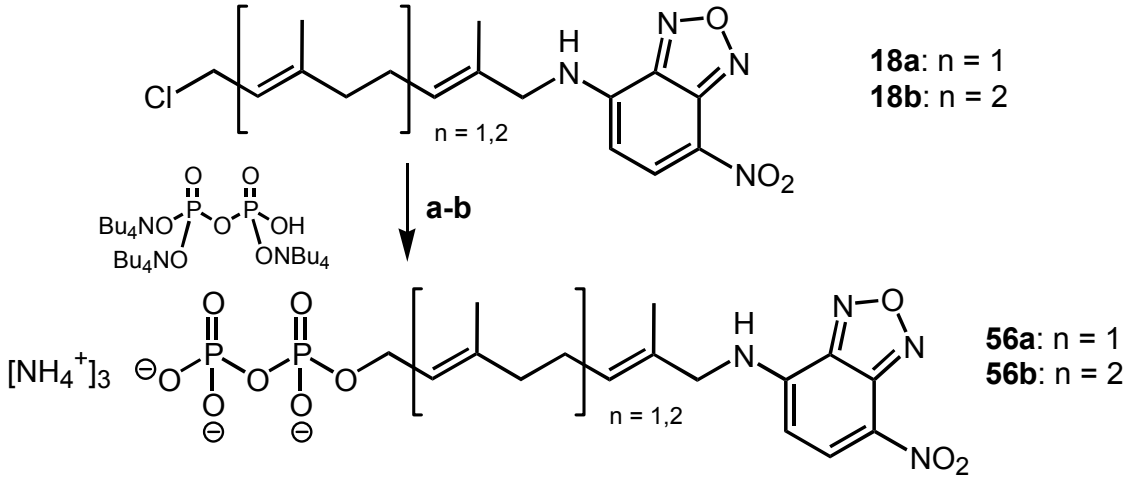


Abbildung 45: Synthese fluoreszenzmarkierter Isoprenoidpyrophosphatanaloga
a) CH_3CN, RT, 3h; b) Ionenaustausch NBu_4^+/NH_4^+; **56a** = 69%; **56b** = 61%.

Wie bei allen anderen Isoprenoidpyrophosphatanaloga erfolgte die Reinigung der hochpolaren wasserlöslichen Pyrophosphate **56** auf einer C18-RP-Chromatographiesäule. In Ausbeuten von 69% bzw. 61% konnten in zwei Schritten somit NBD-NH-Ger-OPP **56a** und NBD-NH-Far-OPP **56b** dargestellt werden.

4.3.2.2 Anwendung fluoreszenzmarkierter Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

Die Evaluierung der biologischen und biophysikalischen Eigenschaften der fluoreszenzmarkierten Isoprenoidpyrophosphatanaloga wurden von K. Alexandrov und B. Dursina (Abteilung R. Goody, MPI Dortmund) durchgeführt.
Die fluoreszenzmarkierten Isoprenoidpyrophosphate **56** konnten *in vitro*, katalysiert durch die GGTase-II und den Eskortkomplex REP, das Rab-7-Protein übertragen werden (Abbildung 46). Dieses Protein kontrolliert die Biogenese von späten Endosomen.[264] Um eine unspezifische Inkorporierung der fluroeszenzmarkierten Analoga auszuschließen, wurden Kontrollreaktionen ohne dem für die katalytische

Aktivität essentiellen REP-1 durchgeführt.[265] Als zusätzliche Kontrolle wurde den Reaktionen Geranylgeranylpyrophosphat als Konkurrenzsubstrat zugesetzt. Nach Inkubation wurden die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt, mit Aceton gewaschen, um den Überschuss an freien Lipiden abzutrennen, und schließlich an einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt.

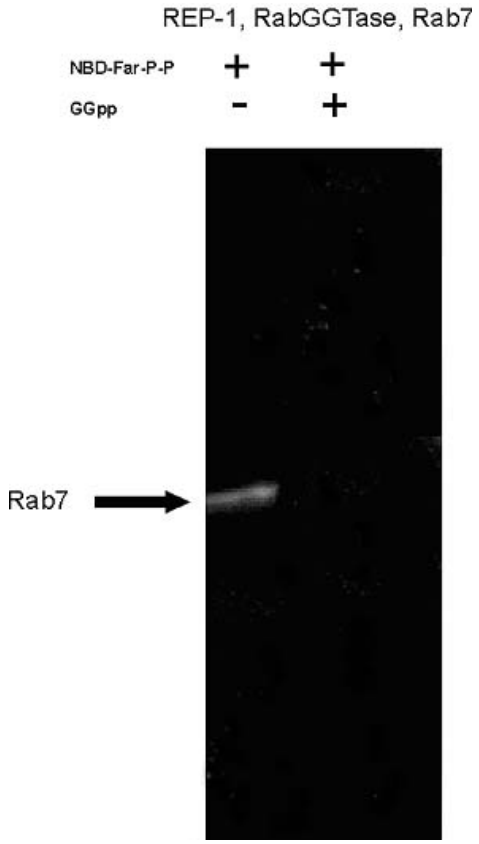


Abbildung 46: SDS-PAGE (Fluoreszenzaufnahme) nach *in vitro-M*arkierung von Rab-7 mit einem fluoreszenzmarkierten Geranylgeraniolpyrophosphat **56b**; Zugabe von Geranylgeranylpyrophosphat verhindert die Lipidierung

Fluoreszenzmarkierte Proteine konnten durch Anregung der NBD-Gruppe bei 430 nm sichtbar gemacht werden. Eine gut erkennbare fluoreszierende Bande fand man bei etwa 26 kDa. Eine Anfärbung des Gels durch Coomassie Reagenz bestätigte, dass die Fluoreszenz mit der Rab-7-Bande zusammenfällt. In den Kontrollreaktionen ohne REP-1 oder mit zugesetztem GGPP war keinerlei Fluoreszenz nachweisbar. Die beobachtete Hemmung war konsistent mit den Unterschieden in den Bindungsaffinitäten von RabGGTase von Geranylgeranylpyrophosphat und dem fluoreszierenden Analogon **56**. Hingegen konnte in Abwesenheit von

konkurrierendem GGPP bei beiden Analoga kein nachweisbarer Unterschied in der Effizienz der Isoprenylierungsreaktion festgestellt werden. Beide Verbindungen wurden bei den gewählten Konzentrationen effizient transferiert.

Die Übertragbarkeit der fluoreszenzmarkierten Isoprenoidpyrophosphate wurde mit einer Reihe weiterer Lipoproteine getestet.[266] So konnten die Isoprenoide **56a** erfolgreich unter Katalyse der FTase auf das Substrat K-Ras und die Isoprenoide **56b** unter Katalyse der GGTase-I auf Rho-Proteine übertragen werden.

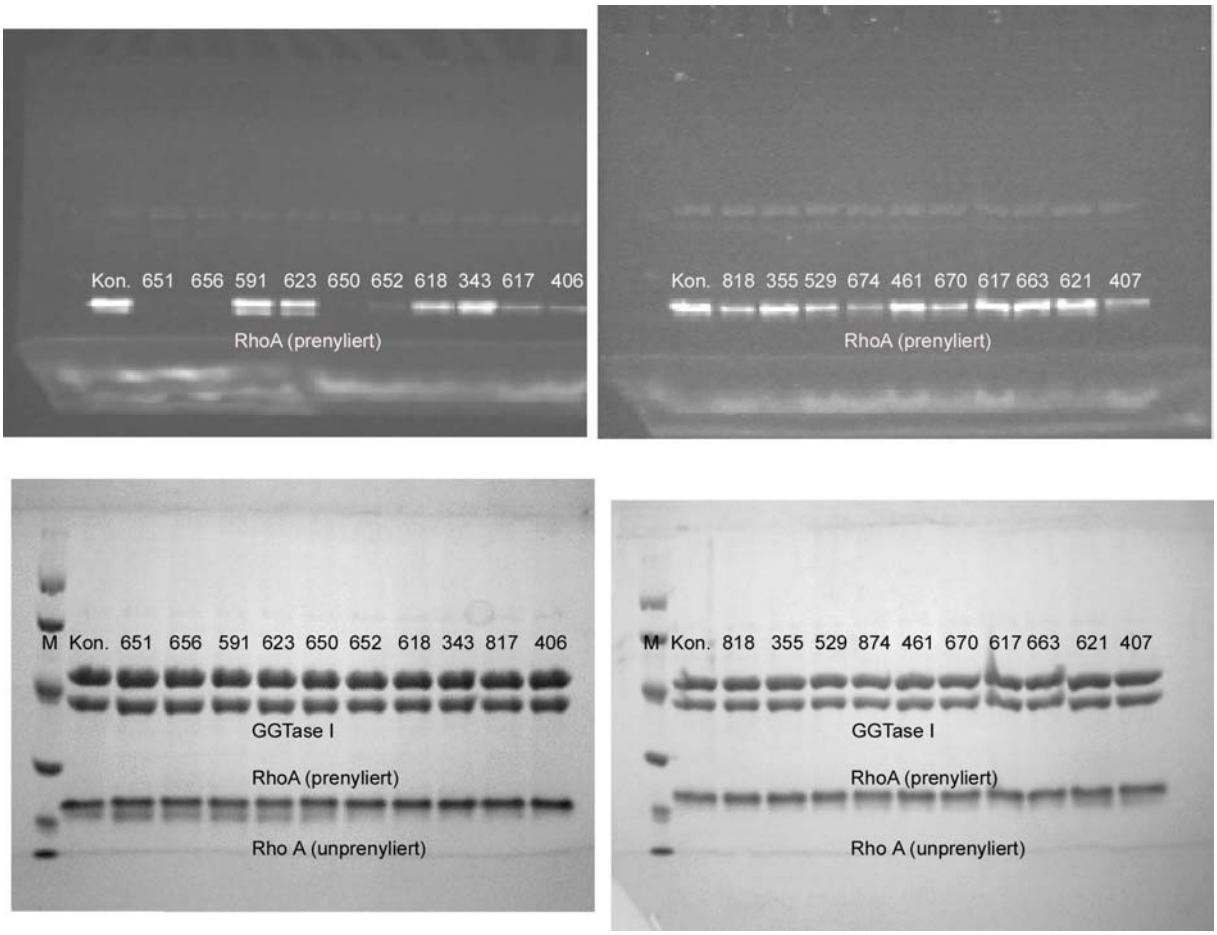


Abbildung 47: SDS-PAGES nach Inkubierung von RhoA mit **56b** in Gegenwart von GGTase-I Inhibitoren; Isoprenylierung: 5 μm RhoA, 5 μM GGTase-I, 15 μM **56b**, 100 μM Inhibitor (Substanzbibliothek M. Thutewohl[267]); Oben: Fluoreszenzaufnahmen; Unten: Comassieblau-Anfärbung; M: Marker; Kon.: Kontrollexperiment ohne Inhibitor

Darauf basierend konnte ein neuartiger *in vitro*-Assay entwickelt werden, der den Transfer fluoreszenzmarkierter Isoprenyl-Pyrophosphate im Beisein von Inhibitoren der Transferasen untersuchen kann (Abbildungen 47 und 48).[266]

Nach der Inkubation des Geranylgeranylpyrophosphat-Analogons **56a**, RhoA, GGTase-I und eines GGTase-I Inhibitors (100 μM Konzentration, Substanzbibliothek M. Thutewohl[267]) wurden die Reaktanden in einer SDS-Gelelektrophorese voneinander getrennt (Abbildung 47). Es sind deutliche Unterschiede in der Aktivität der Inhibitoren anhand der Menge des gebildeten fluoreszenzmarkierten RhoA-Proteins zu erkennen. Eine ausbleibende Bande spricht für einen „starken" Inhibitor, der die Lipidierung völlig verhindern konnte. Auf eine mögliche Quantifizierung der Inhibition wurde verzichtet.

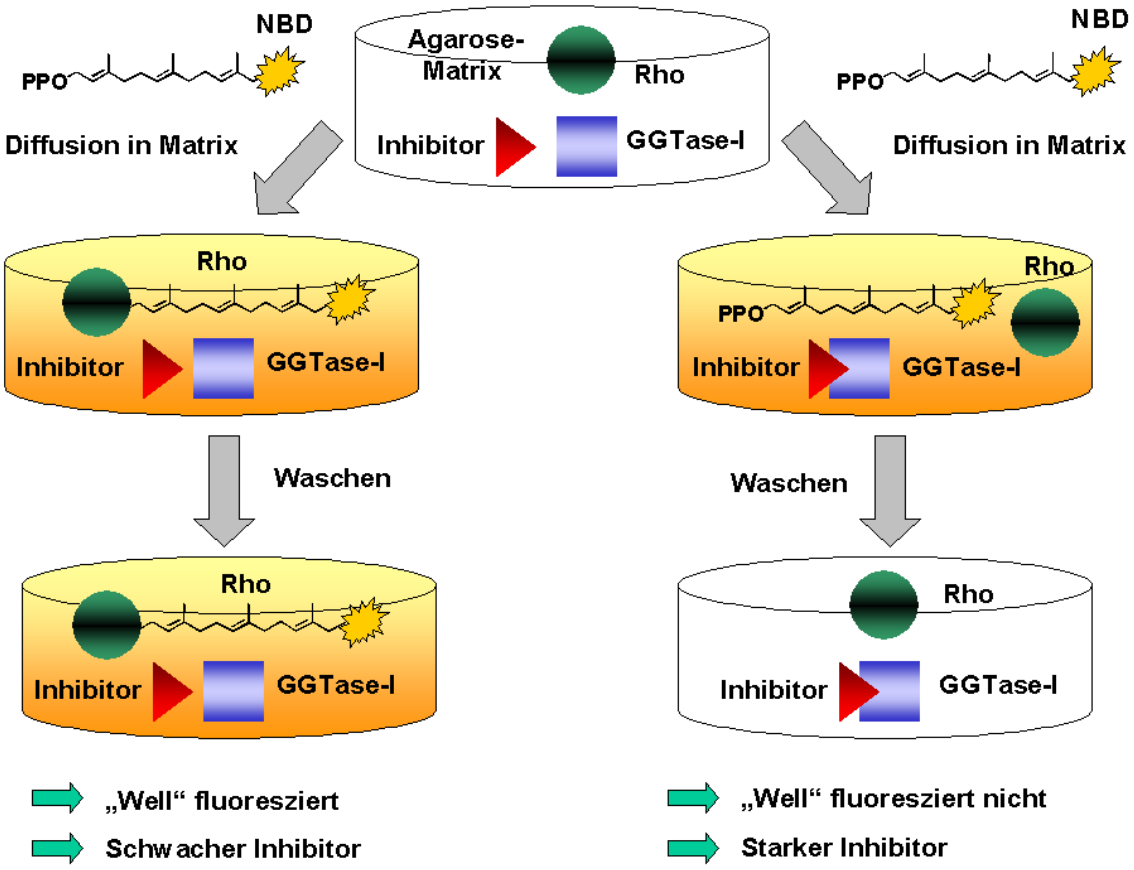


Abbildung 48: Neuartiger GGTase-I-Inhibitionsassay

Um die aufwendigen Schritte der Inkubation und der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine abzukürzen und das Testen grosser Mengen von

Inhibitoren zu ermöglichen, wurde die Technik der *3D gel pad arrays* verwendet (Abbildung 48).[266]

In diesem weiterentwickelten Assay wurden die GGTase-I, das unisoprenylierte Protein Rho und das fluoreszenzmarkierte Pyrophosphatanalogon **56b** zusammen einem GGTase-I-Inhibitor in der Agarosematrix einer 96-*Wellplate* immobilisiert. War der Inhibitor schwach, fand die erwartete Übertragung des Isoprenoides auf das Rho statt. Das nun fluoreszenzmarkierte Rho-Protein war nicht durch Waschen aus der Matrix entfernbar. Die Intensität der Fluoreszenz war mit der Wirksamkeit des Inhibitors proportional und könnte unter Verwendung eines *plate readers* quantifiziert werden. Ein starker Inhibitor hingegen verhinderte die Lipidierung und damit die Fluoreszenzmarkierung von Rho, sodass nach dem Auswaschen des nicht umgesetzten NBD-NH-Far-OPP **56b** keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte.

Die Validierung dieses Assays mit bekannten GGTase-I Inhibitoren und die Qantifizierung der Aktivität der Inhibitoren steht zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.

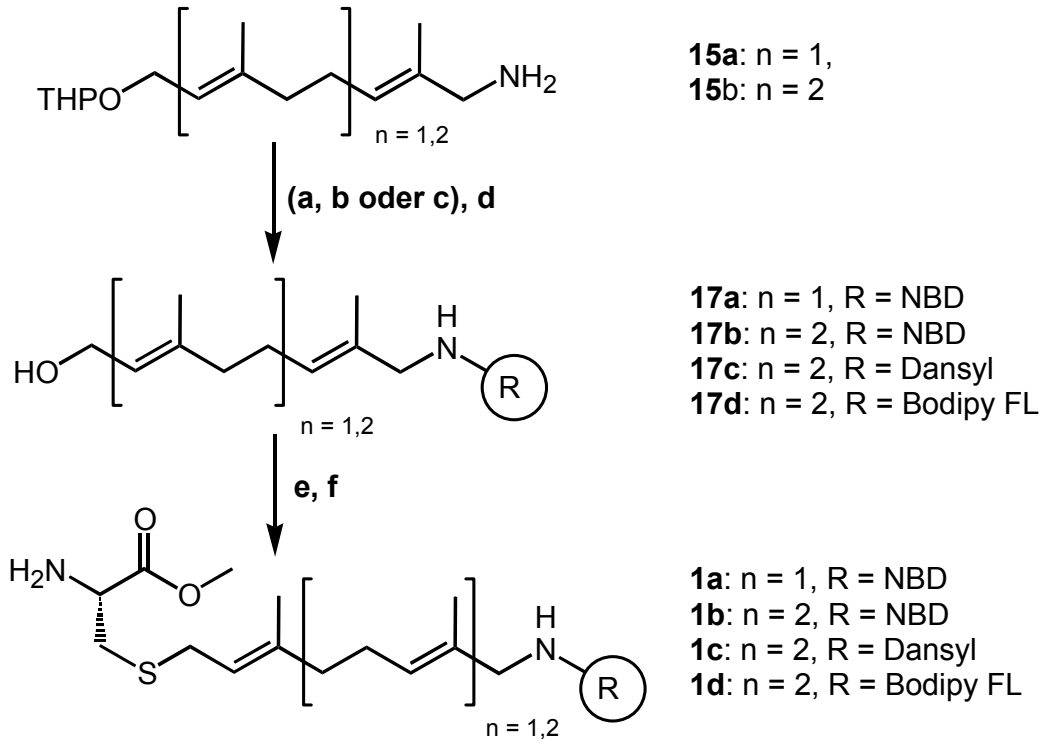
5 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig eine Syntheseroute für fluoreszenzmarkierte, zellulär detektierbare und biologisch aktive Ras-Proteine gefunden.

Nach drei verschiedenen konvergenten Strategien wurden fluoreszenzmarkierte Analoga des *C*-terminalen menschlichen N-Ras-Proteins aufgebaut. Die Peptide enthielten dabei ein freies Cystein, das für eine nachträgliche Palmitoylierung *in vivo* zur Verfügung steht. In Zusammenarbeit mit M. Wagner, MPI Dortmund, wurden sie an ein nicht-prozessiertes, entsprechend verkürztes Ras-Protein gekoppelt (Abbildungen 51 und 52).

In der ersten Synthesestrategie wurden Fluoreszenzmarker (Abbildung 50) über verschieden lange Isoprenoide an die Seitenkette von Cysteinmethylester gehängt

(Abbildung 49) und dieser an das *C*-terminale Ras Peptid **19a** gekuppelt, das zuvor durch Festphasensynthese generiert wurde (Abbildung 51).



15a: n = 1,
15b: n = 2

17a: n = 1, R = NBD
17b: n = 2, R = NBD
17c: n = 2, R = Dansyl
17d: n = 2, R = Bodipy FL

1a: n = 1, R = NBD
1b: n = 2, R = NBD
1c: n = 2, R = Dansyl
1d: n = 2, R = Bodipy FL

Abbildung 49: Synthese der ω-funktionalisierten (*S*-Isoprenyl)-Cysteine **1**

a) NBD-Cl, $NaHCO_3$-Puffer (pH 8-9)/CH_3CN; 65%-67%; b) Dansylchlorid, MeOH/THF; 85%; c) Bodipy FL, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; 92%; d) PPTS, EtOH, 60°C; **17a** = 93%; **17b** = 94%; **17c** = 75%; **17d** = 92%; e) NCS, Dimethylsulfid, -30°C→0°C; 75%-99%; f) NH_3 in MeOH (1M), 0°C; **1a** = **1b** = quant.; **1c** = 95%; **1d** = 55%.

Die fluoreszenzmarkierten (*S*-Isoprenyl)-Cysteinderivate **1** konnten in vier Stufen, ausgehend von den ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetalen **15**, mit Gesamtausbeuten von 35 bis 80% dargestellt werden. Die nach der Fluoreszenzmarkierung erfolgte PPTS-katalysierte Abspaltung der THP-Gruppe führte zur Darstellung der fluoreszierenden ω-markierten-Isoprenole **17** in Ausbeuten von 61-85% über zwei Stufen (Abbildung 49). Nach Chlorierung der Alkohole **17** in einer Corey-Kim-Reaktion[201] wurden die erhaltenen Allylchloride mit Cysteinmethylester unter Bildung der Cysteinderivate Cys-(*S*-Ger-NH-NBD)-OMe (**1a**), Cys-(*S*-Far-NH-NBD)-OMe (**1b**), Cys-(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**1c**) und Cys-(*S*-Far-NH-Bodipy FL)-OMe (**1d**) in Ausbeuten von 71 bis 99% über zwei Stufen umgesetzt.

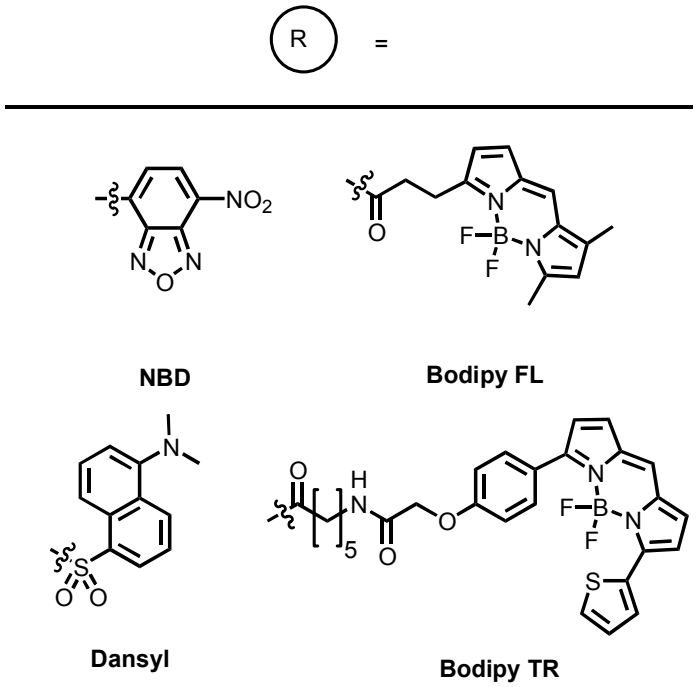


Abbildung 50: Strukturen der verwendeten Fluoreszenzmarker

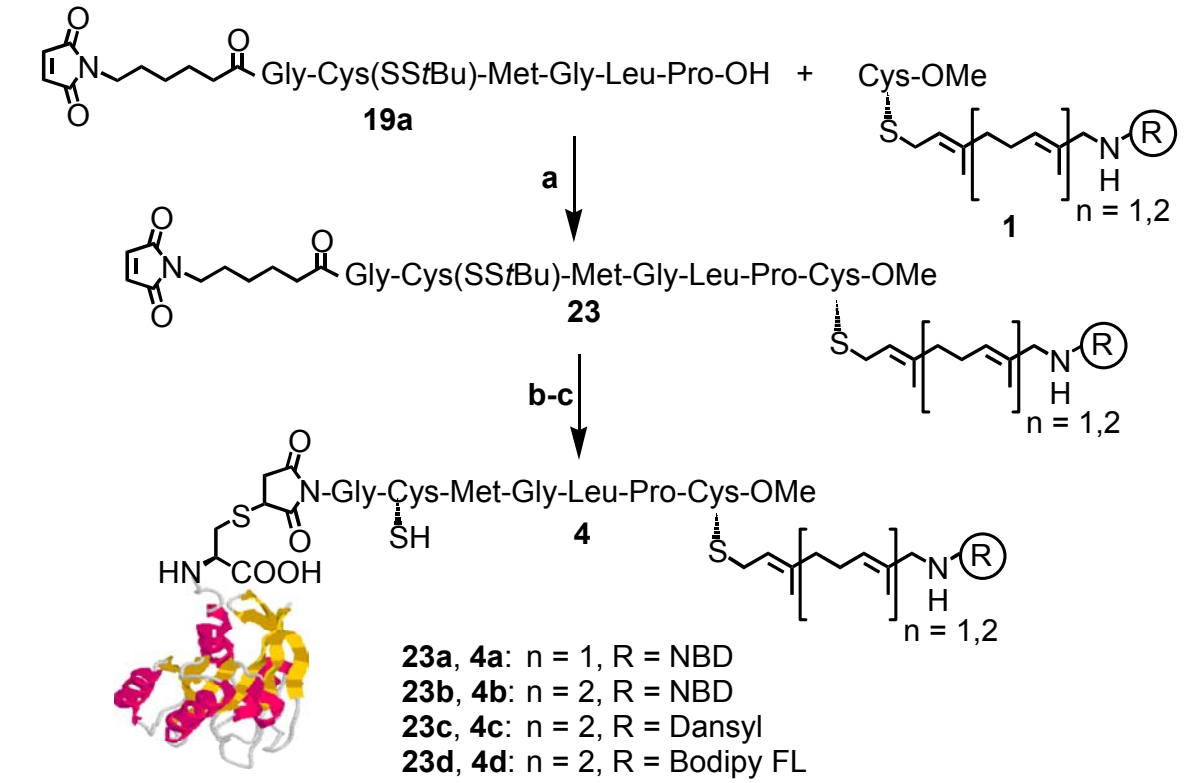


Abbildung 51: Synthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras Proteine **4**

a) EDC, HOBt, Triethylamin, CH_2Cl_2; **23a** = 76%; **23b** = 64%; **24c** = 84%; **24d** = 77%; b) N-Ras **3**, Puffer pH 7.4, Triton X-114, 4°C; c) DTE, Puffer pH 7.4, 37°C.

Das zentrale Hexapeptid MIC-GC(SStBu)MGLP-OH (**19a**) wurde mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese mit einer Ausbeute von 97% dargestellt und anschließend die fluoreszenzmarkierten lipidierten Cysteine **1** in Ausbeuten zwischen 64-84% angeknüpft. Die vervollständigten Peptide wurden dann in einer Thio-Michael-Reaktion über die Maleinimidocaproyleinheit (MIC)[42;43] mit verkürztem N-Ras (**3**) gekuppelt und nach reduktiver Enfernung der *S-tert*-Butyl-Gruppe die ersten *in vivo*-palmitoylierbaren neo-Ras-Proteine erhalten.

In einer zweiten Syntheseroute für neo-Ras Proteine wurde die Fluoreszenzmarkierung an der Stelle der *C*-terminalen Methylestergruppe eingeführt (Abbildung 52). Die *C*-terminalen Ras-Proteine wurden in einer Festphasensynthese an einem Ethylendiamino-Spacer aufgebaut. Nach ihrer Abspaltung konnten die Fluoreszenzmarker Bodipy FL und –TR (Abbildung 52) eingeführt werden. Die erhaltenen N-Ras-Peptide **28** wurden mit verkürztem N-Ras (**3**) ligiert und die *S-tert*-Butyl-Gruppe reduktiv entfernt.

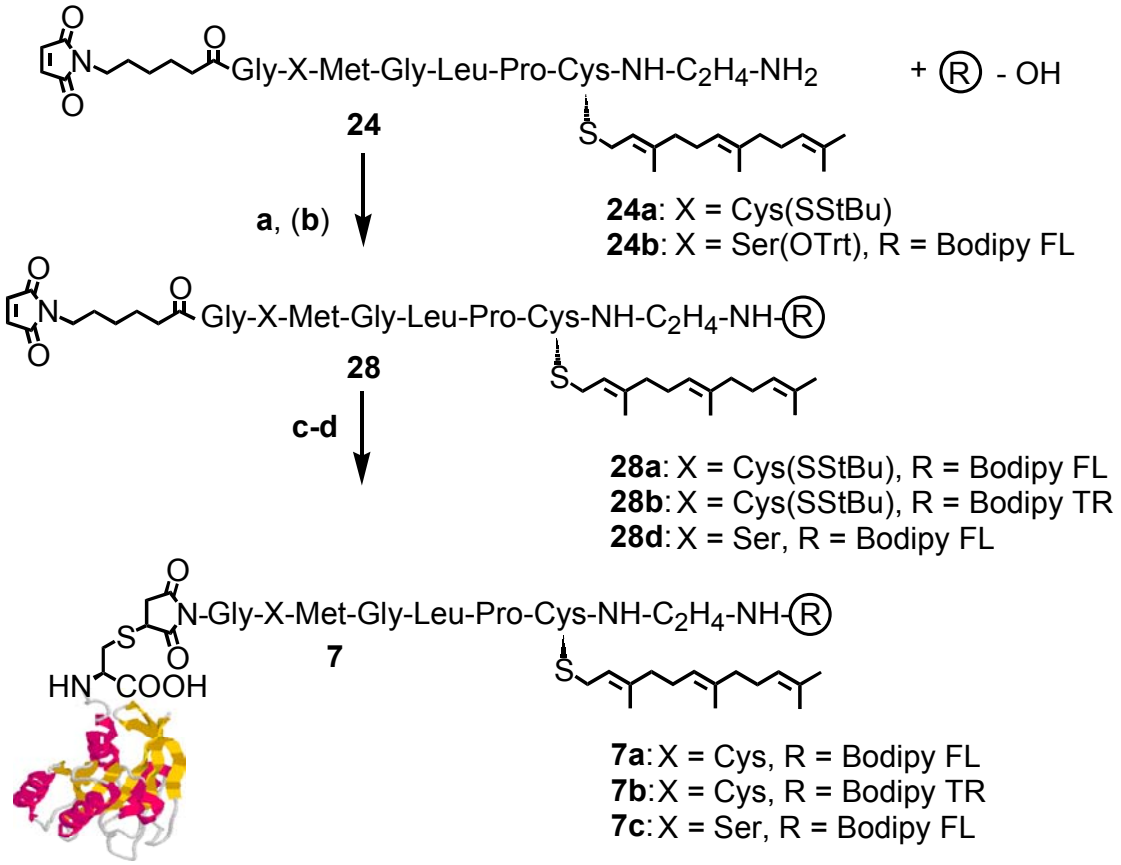


Abbildung 52: Synthese fluoreszenzmarkierter neo-Ras Proteine **7**

a) EDC, HOBt, Triethylamin, CH_2Cl_2; **28a** = 76%; **28b** = 64%; **28c** =84%; b) TFA (1%), CH_2Cl_2; **28d** = 65% (**a** und **b**); c) N-Ras **3**, Puffer, pH 7.4, Triton X-114, 4°C; d) DTE, Puffer pH 7.4, 37°C.

In der dritten Syntheseroute wurde erstmals für ein Ras-Protein die Methode der *native chemical ligation*[184] angewendet, die zu einem Produkt mit einem natürlichen Peptidrückgrat ohne die artifizielle MIC-Einheit führte.

Das dansylmarkierte und farnesylierte Cystein **1c** wurde mit einem neuartigen, an der festen Phase[206] in einer Ausbeute von 52% generiertem und in einem Schritt mild deprotonierbaren *C*-terminalen N-Ras Peptid **9** verknüpft (Abbildung 53). Das Problem der Additionsempfindlichkeit der Isoprenylgruppe konnte dabei durch eine Kombination hoch-säurelabiler Schutzgruppen gelöst werden. Das dadurch erhaltene freie Cystein am *N*-Terminus des Peptides **32** reagierte in einem Thioester-Austausch mit einem konsekutiven *S*-*N*-Acylshift mit dem terminalen Mercaptoethansulfonsäureester des H-Ras-Proteins **8**. Als nachteilig gegenüber der MIC-Ligation erwies sich jedoch die aufwendige Reinigung des Ligationsproteins.

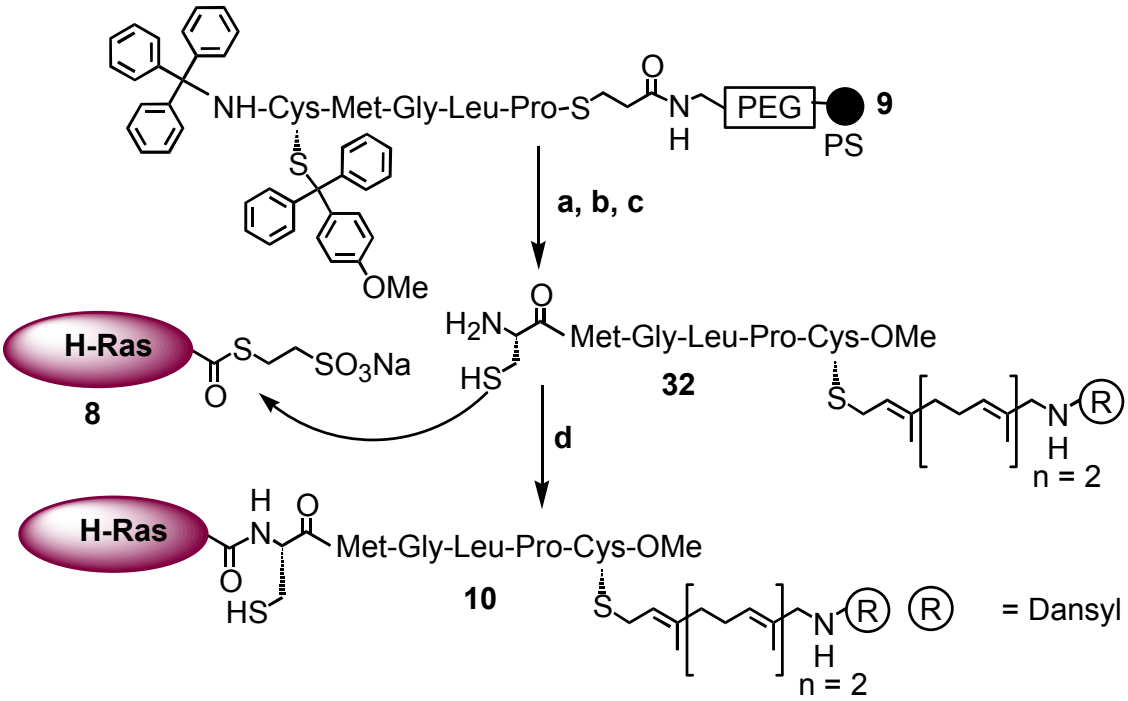
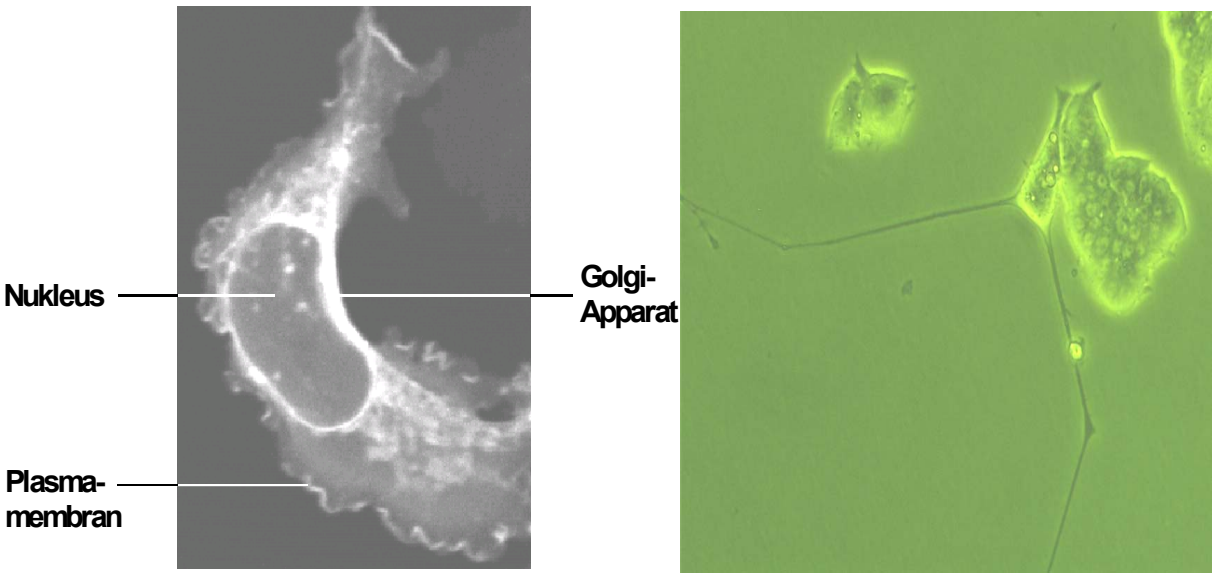


Abbildung 53: Synthese des fluoreszenzmarkierten neo-Ras Proteines **10** mit Hilfe der *native chemical ligation*

a) 0.5 N NaOH/ CH_3CN, 10 min, 0°C; 52%; b) EDC, HOBt, CH_2Cl_2, Cys-(S-Far-NH-Dansyl)-OMe (**1c**); 77%; c) TFA (1%), TIS, CH_2Cl_2; **32** = 93%; d) Puffer pH 7.4, CTAB, TCEP, 4°C.

Die biologische Evaluierung der Konstrukte **4** durch Mikroinjektion in COS-7 und PC-12 Zellen ergab, dass zwar die fluoreszenzierenden Gruppen NBD und Bodipy FL im konfokalen Lasermikroskop detektierbar waren, jedoch die neo-Proteine keine biologische Aktivität aufwiesen. Eine mögliche Erklärung könnte die durch das Fluorophor herabgesetzte Lipophilie des Isoprenoides sein, sodass die für die biologische Aktivität notwendige Membranaffinität der neo-Lipoproteine **4** nicht in ausreichendem Maße gewährleistet war. Im Fall des Proteins mit dem Dansyl-Fluoreszenzmarker **4c** war zwar biologische Aktivität vorhanden, jedoch erwies sich die Intensität des Dansyl-Fluorophors im UV-Fluoreszenzmikroskop oder nach Zwei-Photonenanregung als zu schwach für die Detektion des Proteins. Erst die neo-Ras-Proteine **7** stellten sich als die ersten biologisch aktiven und *in vivo* detektierbaren N-Ras Proteine heraus.

Nach Injektion einer wässrigen Lösung der Proteinchimären **7a** in COS-7 Zellen konnte mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie ein hochaufgelöstes Bild der Zelle erstellt werden und somit die subzelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proteinchimären untersucht werden (Abbildung 54).



(a) (b)

Abbildung 54: *In vivo* Lokalisierung von mikroinjizierten Bodipy FL-markierten neo-Ras-Proteinen **7a** nach Mikroinjektion in COS-7-Zellen (a); Transformation von PC12-Zellen nach Mikroinjektion mit onkogenen Bodipy FL-markierten neo-Ras-Proteinen **7a** (b)

Auffällig war die Akkumulierung der Ras-Proteine im Golgi-Apparat und der Plasmamembran, den vermuteten Orten der zweiten posttranslationalen Lipidmodifikation und ihrer späteren Funktion. Diese Lokalisierung entsprach den Beobachtungen, die E. Choy *et al.* mit Hilfe von Green Fluorescent Protein (GFP) markierten Ras-Proteinen machen konnten.[78]

Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine Strategie zur Synthese von neuen Cerulenin-Analoga entwickelt werden, die bereits in wenigen Schritten in Lösung zu einer Bibliothek von verschiedenen Inhibitoren der N-Ras-Palmitoylierung[115-118] führt (Abbildung 55).

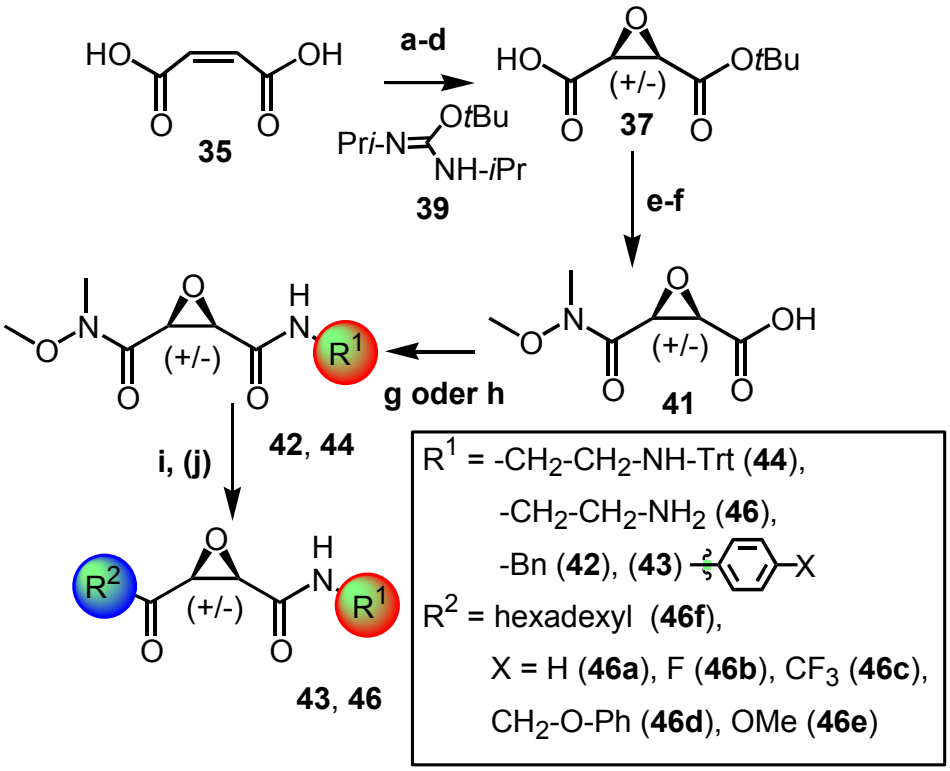


Abbildung 55: Synthese von Cerulenin-Analoga **43** und **46**

a) H_2O_2, NaOH, Na_2WO_4; 95%; b) $BaCl_2$, H_2O; quant.; c) H_2SO_4, Et_2O; quant.; d) **39**, THF; 65%; e) HNMeOMe*HCl, EDC, HOBt, CH_2Cl_2; 65%; f) TFA, Et_3SiH, CH_2Cl_2; 69%; g) $BnNH_2$, EDC, HOBt, THF; **42** = 76%; h) Trt-NH-C_2H_4-NH_2, EDC, HOBt, THF; **44** = 47%; i) R_2I, *n*BuLi oder *t*BuLi, THF, -78°C->rt; 16-55%; j) TFA (1%), CH_2Cl_2; **43**, **46** = 49-97%.

Die Darstellung der zentralen Epoxysuccinimideinheit **41** gelang im Multigrammmaßstab in sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von 28%.

Die variable Gruppe R^1 ist nun in einer Amidverknüpfung an diesen Baustein einführbar. Die zweite Diversifikation (R^2) erfolgte über den C-C verknüpfenden Angriff von Lithiumorganylen an die Weinrebamidgruppe. Mit dieser Reaktionssequenz konnten in kürzester Zeit sieben Ceruleninanaloga synthetisiert werden.

In Mikroinjektionsversuchen von **46a** (Konzentration: 2 μM) in PC-12 Zellen, die aufgrund einer eingeführten onkogenen G12V-Mutante von N-Ras Neuritenausläufer bildeten, war ein Rückgang der Neuritenrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 73% zu beobachten. Da keine zytotoxischen Eigenschaften beobachtet wurden, könnte eine weitergehende Evaluierung der Mitglieder der Cerulenin-Bibliothek als Ras-Palmitoylierungsinhibitoren vielversprechend werden.

Im dritten Teil der Untersuchung wurden fluoreszenzmarkierte und hydrolysestabile Isoprenoiddiphosphatanaloga für Lösung verschiedener biologischer Fragestellungen dargestellt (Abbildung 56). So konnten die Farnesol- und Geranylgeraniolanaloga **56** mit dem Fluoreszenzmarker NBD in einer zweistufigen Synthese aus den Allylchloriden **18** in Gesamtausbeuten von 69% bzw. 61% synthetisiert werden.

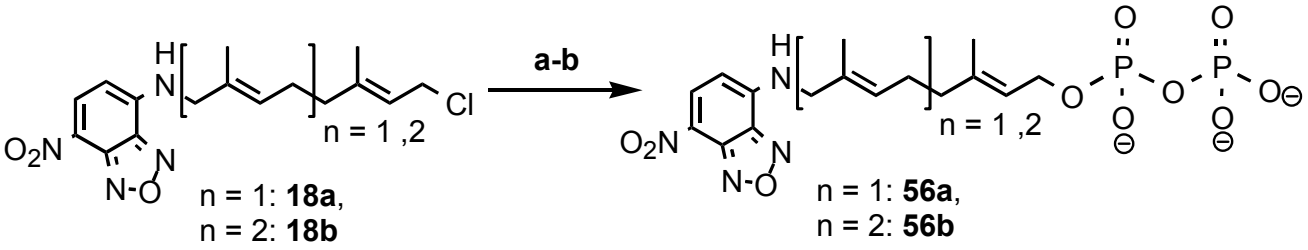


Abbildung 56: Synthese von fluoreszenzmarkierten Isoprenoidpyrophosphaten

a) CH_3CN, RT, 3h, Tris(tetra-*N*-butylammonium)pyrophosphat;
b) Ionenaustausch NBu_4^+/NH_4^+; **56a** = 69%, **56b** = 61%.

Diese wurden in einer *in vitro*-Isoprenylierung von der *Rab*-Geranylgeranyltransferase (*GGT*ase II) erkannt und erfolgreich zur Modifizierung und gleichzeitigen Markierung auf das *Rab-7* Protein, einem spezifische Regulator der Membrananlagerung und -verschmelzung in fast allen vesikulären Transportprozessen der eukaryotischen Zelle übertragen.

Basierend auf der Übertragbarkeit der Pyrophosphat-Analoga **56b** auf Lipoproteine konnte ein neuartiger *in vitro*-Assay entwickelt werden, mit dem Inhibitoren der FTase

und der GGTase-I evaluiert werden können.[266]

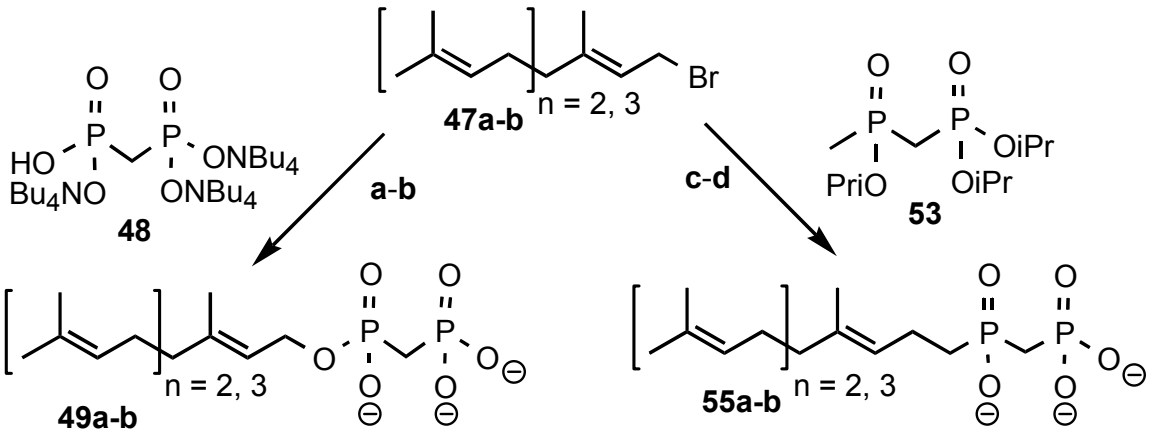


Abbildung 57: Synthese von hydrolysestabilen Isoprenoidpyrophosphaten
a) **48**, CH_3CN, rt, 2 h; b) Ionenaustausch NBu_4^+/NH_4^+; **49a** = 63%; **49b** = 61%; c) **53**, *t*-BuLi, THF, -78°C; n = 1: 98%, n = 2: 61%; d) TMSBr, 2,4,6-Collidin, CH_2Cl_2, dann NaOH, H_2O; **55a** = 72%; **55b** = 68%.

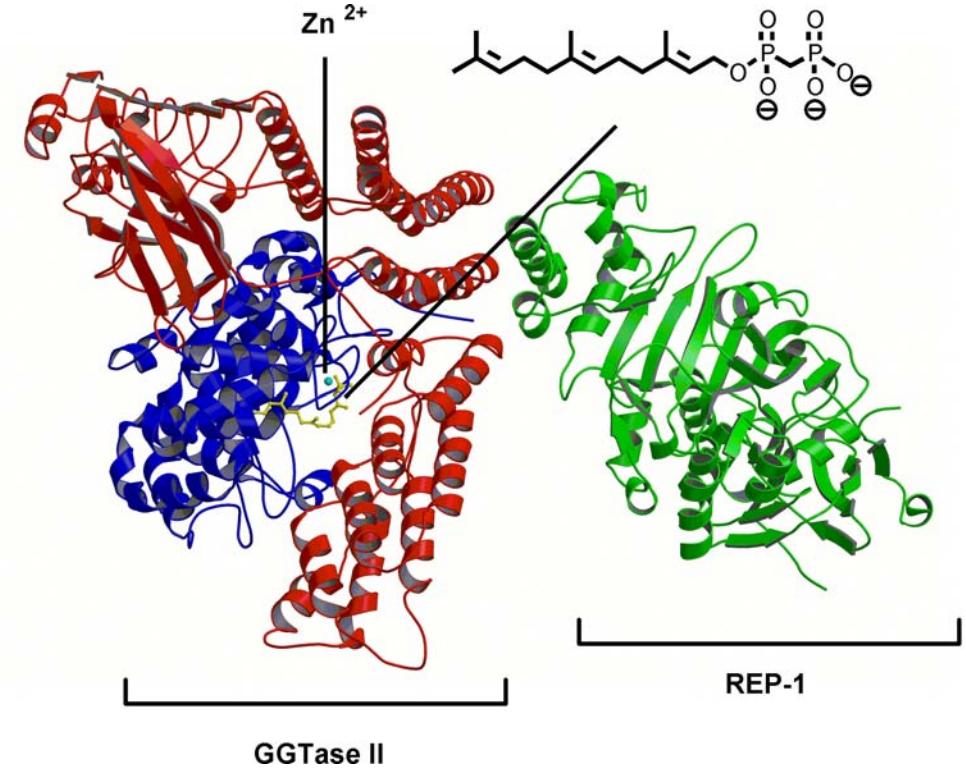


Abbildung 58: Röntgenstruktur des Komplexes REP-1: GGTase II: Far-PCP **49a**[261]

Die Isoprenylphosphonylmethylphosphonate Far-PCP **49a** und GerGer-PCP **49b**, also Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphatanaloga, deren Phosphoratome mit

einer Methylengruppe verbrückt sind, konnten in drei Stufen aus den Isoprenylbromiden in einer Gesamtausbeute von 63% bzw. 61% erhalten werden (Abbildung 57). Isoprenylmethylphosphinylmethylphosphonate Far-CPCP **55a** und GerGer-CPCP **55b**, bei denen auch die zweite Sauerstoffbrücke durch eine Methylengruppe ersetzt wurde, waren in drei Stufen in 70% bzw. 43% Ausbeute zugänglich. Mit Hilfe eines dieser hydrolysestabilen Pyrophosphate **49a**[248] gelang erstmalig die langjährig vergeblich versuchte Strukturaufklärung des Rab-Isoprenylierungskomplexes aus GGTase II und REP-1 mit einer Auflösung von 2.7 Å (Abbildung 58).[261]

Aufbauend auf den Ergebnissen der biologischen Experimente mit den neo-Ras-Proteinen könnten fluoreszenzmarkierte, palmitoylierbare *C*-terminale N-Ras Heptapeptide[268] verwendet werden, um einen neuartigen *in vitro*-Assay zur Evaluierung der Wirksamkeit der Ras-Palmitoylierungsinhibitoren zu entwickeln (Abbildung 59). Dieses Heptapeptid würde zusammen mit einem Inhibitor in das Medium einer Zellkultur gegeben werden. Nachdem beide Komponenten das Innere der Zelle erreicht haben, wären abhängig vom jeweilig verabreichten Inhibitor folgende Effekte zu erwarten:[260]

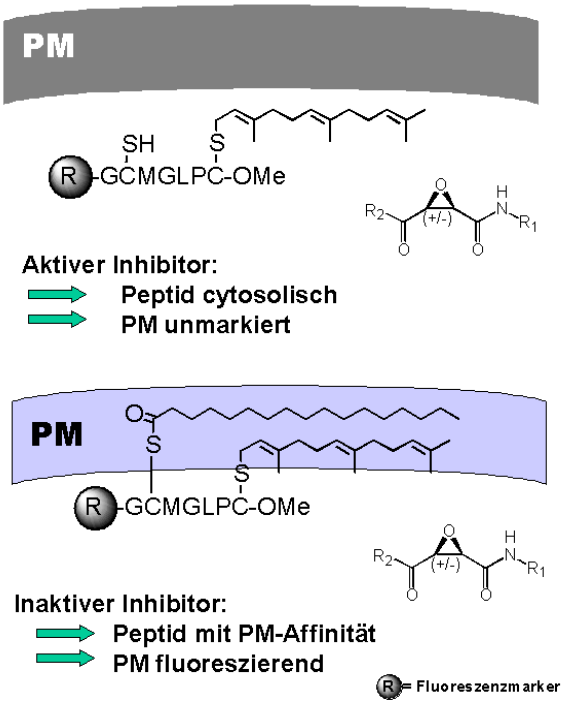


Abbildung 59: Mögliches Prinzip eines Ras-Palmitoylierungs-Inhibitoren Assays

Ein Inhibitor mit einem hohen Potential würde die Palmitoylierung des *C*-terminalen N-Ras Peptides verhindern und damit eine cytosolische Lokalisation bewirken.[269] Ein schwacher Inhibitor hingegen würde die Palmitoylierung nicht unterbinden können, sodass eine Fluoreszenz der Plasmamembran (PM) auftritt. Dieser Effekt könnte mit einer Vielzahl von Zellen mittels eines *flow cytometers* zuverlässig erfasst und quantifiziert werden.[270]

6 Experimenteller Teil

6.1 Meßgeräte und Hilfsmittel

NMR-Spektroskopie

Für die Aufnahme der NMR-Spektren standen folgende Geräte zur Verfügung:

Bruker AC 250	250 MHz (^{1}H-NMR), 62.8 MHz (^{13}C-NMR)
Bruker AM 400	400 MHz (^{1}H-NMR), 100.5 MHz (^{13}C-NMR)
Varian Mercury 400	400 MHz (^{1}H-NMR), 100.5 MHz (^{13}C-NMR), 162.0 (^{31}P-NMR)
Bruker DRX 500	500 MHz (^{1}H-NMR), 125.7 MHz (^{13}C-NMR) 202.5 (^{31}P-NMR)

Die in ppm angegebenen Verschiebungen δ beziehen sich auf Tetramethylsilan, $CHCl_3$, MeOH oder H_2O als internen Standard. Die verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische sind bei den jeweiligen Spektren vermerkt. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden wie in Kapitel 8 verzeichnet abgekürzt.

Massenspektrometrie

Die 70 eV-EI- und die FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Die FAB-MS-Spektren wurden in Glycerin und in m-Nitrobenzylalkohol- (3-NBA) Matrizes gemessen und gegebenfalls unter Zusatz von Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen. Die verwendete Matrix, die m/z-Werte sowie die relativen Intensitäten sind jeweils angegeben. Die EI-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70- und einem Finnigan MAT 8200 Massenspektrometer aufgenommen. Die ESI bzw. ESI-MS-Messungen wurden mit einem Finnigan LCQ Massenspektrometer durchgeführt.

Elementaranalysen

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

Optische Rotation

Die Spezifischen Drehwerte $[\alpha]^{20}_D$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 und einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 gemessen. Sie beziehen sich auf die Natrium D-Linie. Das Lösungsmittel und die Konzentrationen sind bezogen auf g/100 ml angegeben.

IR-Spektroskopie

Die Infrarotspektren wurden auf einem IR-Spektrometer IFS 88 und Vektor 22 der Firma Bruker mit einer diffusen Reflektionseinheit A527 der Firma Spektra Tech aufgenommen. Die Signalintensitäten werden wie in Kapitel 8 angegeben abgekürzt. Die Wellenzahlen (ν) sind in cm^{-1} angegeben.

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren wurden auf einem UV/VIS-Spektrometer Lambda 2 der Firma Perkin Elmer und einem Cary 50 UV/VIS-Spektrometer der Firma Varian aufgenommen. Die Anregungsmaxima (λ) sind in nm angegeben.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktgerät 530 gemesssen und sind nicht korregiert.

Chromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F_{254}). Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm, 366 nm und zur Anfärbung nachfolgende Reagenzien verwendet:

Reagenz A:	2.5 g Molybdatophosphorsäure, 1g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser
Reagenz B:	300 mg Iod auf 100 ml Kieselgel
Reagenz C:	5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser

Die entsprechenden Laufmittel und R_f-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angeführt. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-60 μm) mit einem Druck von 0.3- 0.8 bar. Zur Größenausschlußchromatographie wurde Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia verwendet.

Die analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde mit einem Gerät von Hewlett Packard (Agilent, 1100 series) und einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4-Säule von Macherey-Nagel durchgeführt. Zur Bestimmung der Retentionszeiten (t_R-Werte) wurde ein stufenloser Gradient von 100% A: Wasser/Ameisensäure 99.9:0.1 [v;v] (0 Min) auf 100% B: Acetonitril/Ameisensäure 99.9:0.1 [v;v] (40 min) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

Automatisierte Festphasensynthese

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

Chemikalien

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

Proteine, Zellkulturen und Mikroinjektionen

Alle verwendeten Proteine wurden, wenn nicht anders vermerkt, von C. Nowak, M. Wagner und A. Tebbe der Arbeitsgruppe J. Kuhlmann oder der Arbeitsgruppe K. Alexandrov, MPI Dortmund, überexprimiert. Die verwendeten *E. coli*-Stämme CK600K, BL21 (DE 3) und eukaryontischen Zelllinien PC12, MDCK und Cos 7 wurden ebenfalls von den oben angegebenen Wissenschaftlern kultiviert. Mikroinjektionen mit einem automatisierten Injektionssystem AIS unter Beobachtung der Zellen mit einem inversen Mikroskop Axiovert 135TV wurden von M. Wagner durchgeführt.

Proteinkristallisation und Röntgenspektroskopie

Die Proteine wurden mittels der *hanging drop vapour diffusion* Methode von A. Rak kristallisiert. Die röntgenspektroskopischen Daten wurden am *beam line ID14-1*, ESRF, Grenoble gesammelt und mittels des *XDS program suite* ausgewertet.[260]

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1: Synthese von Neo-Ras-Proteinen

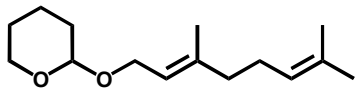
6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.1: Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-Ras-Proteins

6.2.1.1 Versuche zu Kapitel 4.1.1.1: Synthese funktionalisierter Isoprenoid-Analoga

Darstellung der Isoprenol-THP-Acetale 11[186]

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 1:
Zu einer Lösung von 41.4 mmol des Alkoholes in 62.1 mmol 3,4-Dihydropyran werden 4.14 mmol Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat gegeben. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt, die Lösung in 250 ml Diethylether aufgenommen und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

2-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyloxy)tetrahydropyran (Ger-OTHP) (11a)[186]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 werden 6.39 g (41.4 mmol) Geraniol, 5.22 g (62.1 mmol) 3,4-Dihydropyran und 1.04 g (4.14 mmol) Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat umgesetzt.

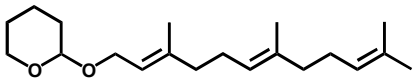
Farblose Flüssigkeit
R_f-Wert: 0.64 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 8:1 [v;v])
Ausbeute: 9.87 g (41.1 mmol, quant.)
$C_{15}H_{26}O_2$ (238.4)

250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.42-1.83 (m, 6H, CH_2-THP); 1.59 (s, 3H, CH_3-Ger); 1.65 (s, 6H, CH_3-Ger); 1.94-2.15 (m, 4H, CH_2-Ger); 3.45-3.54 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.84-3.93 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.02 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.23 (ddd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 6.5 Hz, *J* = 0.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.62 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.08 (tt, *J* = 4.0 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, CH-Ger); 5.35 (tt, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, CH-Ger).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 13.4 (CH_3 Ger); 16.1 (CH_3 Ger); 19.3 (CH_2 THP); 25.3 (CH_2 THP); 25.6 (CH_2 THP); 30.4 (CH_2 THP); 39.0 (CH_2 Ger); 62.0-63.4 (CH_2 Ger, CH_2 THP); 68.4 (CH_2OH); 97.6 (CH THP); 120.7 (CH Ger); 125.1 (CH Ger); 135.0 (C_q Ger); 139.6 (C_q Ger).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

2-(3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyloxy)-tetrahydropyran (Far-OTHP)(11b)[186]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 werden 9.99 g (44.9 mmol) Farnesol, 5.67 g (67.4 mmol) 3,4-Dihydropyran und 1.13 g (4.49 mmol) Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat umgesetzt.

Farblose Flüssigkeit
R_f-Wert: 0.68 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 4.5:1 [v;v])
Ausbeute: 13.8 g (44.9 mmol, quant.)
$C_{20}H_{34}O_2$ (306.5)

250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.54-1.76 (m, 6H, CH_2-THP); 1.60 (s, 6H, CH_3 Far); 1.68 (s, 6H, CH_3 Far); 1.97-2.11 (m, 8H, CH_2 Far); 3.53 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.89 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.04 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.23 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.63 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.10 (m, 2H, CH Far); 5.37 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH Far).

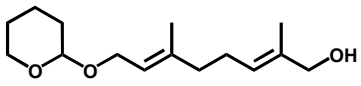
100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 16.0 (CH_3 Far); 16.4 (CH_3 Far); 17.7 (CH_3 Far); 19.6 (CH_2 THP); 25.6 (CH_2 THP); 25.6 (CH_2 THP); 25.7 (CH_3 Far); 26.3 (CH_2 Far); 26.7 (CH_2 Far); 30.7 (CH_2 THP); 39.6 (CH_2 Far); 37.7 (CH_2 Far); 62.2-63.6 (CH_2 Far, CH_2 THP); 97.7 (CH THP); 120.6 (CH Far); 123.9 (CH Far); 124.4 (CH Far); 131.2 (C_q Far); 135.2 (C_q Far); 140.2 (C_q Far).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

Darstellung der ω-Hydroxy-Isoprenol-THP-Acetale 12[187]

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 2:
Zu einer Lösung von 41.8 mmol des Isoprenol-THP-Acetales **11** in 100 ml abs. Methylenchlorid werden 166 mmol *tert*-Butylhydroperoxid, 4.18 mmol Salicylsäure und 2.34 mmol Selenige Säure gegeben. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird das *tert*-Butylhydroperoxid dreimal durch Codestillation mit Toluol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Diethylether aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

2,6-Dimethyl-8-(tetrahydropyran-2-yloxy)-octa-2,6-dien-1-ol (HO-Ger-OTHP) (12a)[168;187]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 werden 9.97 g (41.8 mmol) Ger-OTHP (**11a**), 29.3 g (166 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid, 0.58 g (4.18 mmol) Salicylsäure und 30.2 g (2.34 mmol) Selenige Säure umgesetzt. Eluens *n*-Hexan/Essigsäureethylester 6:1 [v;v].

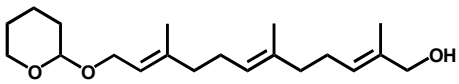
Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.14 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 6:1 [v;v])
Ausbeute: 5.97 g (23.5 mmol, 56%)
$C_{15}H_{26}O_3$ (254.4)

250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.47-1.78 (m, 6H, CH_2-THP); 1.67 (br s, 3H, CH_3-Ger); 1.68 (br s, 3H, CH_3-Ger); 1.84 (m, 2H, CH_2-Ger); 2.08 (m, 2H, CH_2-Ger); 2.18 (br s, 1H, OH); 3.50 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.89 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.99 (br s, 2H; HO-CH_2); 4.02 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.24 (ddd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.4 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.62 (m, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.33-5.41 (m, 2H, CH-Ger).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 13.4 (CH_3 Ger); 16.1 (CH_3 Ger); 19.3 (CH_2 THP); 25.3 (CH_2 THP); 25.3 (CH_3 Ger); 25.6 (CH_2 Ger); 30.4 (CH_2 THP); 39.0 (CH_2 Ger); 62.0-63.4 (CH_2 Ger, CH_2 THP); 68.4 (HO-CH_2); 97.6 (CH THP); 120.7 (CH Ger); 125.1 (CH Ger); 135.0 (C_q Ger); 139.6 (C_q Ger).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

2,6,10-Trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trien-1-ol (HO-Far-OTHP) (12b)[168;187;271]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 2 werden 13.9 g (45.3 mmol) Far-OTHP (**11b**), 31.8 g (180 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid, 0.63 g (4.53 mmol) Salicylsäure und 327 g (2.53 mmol) Selenige Säure umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 4.5:1 [v;v].

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.20 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 4.5:1 [v;v]).
Ausbeute: 4.82 g (15.0 mmol, 33%).
$C_{20}H_{34}O_3$ (322.5)

250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.48-1.90 (m, 6H, CH_2-THP); 1.54 (br s, 3H, CH_3-Far); 1.55 (br s, 3H, CH_3-Far); 1.60 (br s, 3H, CH_3-Far); 1.61 (br s, 3H, CH_3-Far); 1.95-2.30 (m, 8H, CH_2-Far); 3.47 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.83 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.92 (br s, 2H; HO-C$\underline{H}_2$); 3.95 (m, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.15 (m, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.57 (m, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.05 (m, 1H, CH-Far); 5.30 (m, 1H, CH-Far).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 13.5 (CH_3 Far); 15.8 (CH_3 Far); 16.2 (CH_3 Far); 19.3 (CH_2 THP); 25.3, 25.7, 26.0 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.5 (CH_2 THP); 39.1 (CH_2 Far); 39.4 (CH_2 Far); 62.0-63.4 (CH_2 Far, CH_2 THP); 68.5 (CH_2-OH); 97.4 (CH THP); 120.5 (CH Far); 124.0 (CH Far); 125.4 (CH Far); 135.1-140.1 (C_q Far).

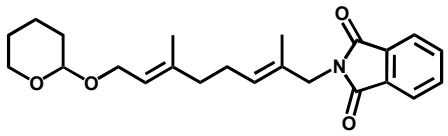
Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

Darstellung der ω-Phtalimino-Isoprenol-THP-Acetale 14[168]

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 3:

Zu einer Lösung von 1.18 mmol Phthalimid, 1.18 mmol Triphenylphosphan und 1.18 mmol des ω-Hydroxy-Isoprenol-THP-Acetales **12** in 10 ml abs. Tetrahydrofuran werden 1.18 mmol Diethylazodicarboxylat (DEAD) getropft. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird der Rückstand in 100 ml Diethylether digeriert und der Feststoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

2-[2,6-Dimethyl-8-(tetrahydropyran-2-yloxy)-octa-2,6-dienyl]-isoindol-1,3-dion (Pht-Ger-OTHP) (14a)[168]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 1.15 g (7.80 mmol) Phthalimid, 2.04 g (7.80 mmol) Triphenylphosphan, 1.98 g (7.80 mmol) 2,6-HO-Ger-OTHP (**12a**) und 1.36 g (7.80 mmol) Diethylazodicarboxylat (DEAD) umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 4:1 [v;v].

Farbloses Öl

R_f-Wert: 0.22 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 4:1 [v;v]).

Ausbeute: 2.24 g (6.32 mmol, 81%).

$C_{23}H_{29}NO_4$ (383.5)

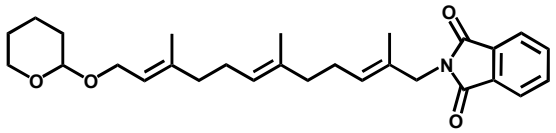
500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.65 (s, 3H, CH_3-Ger); 1.66 (s, 3H, CH_3-Ger); 1.59-1.74 (m, 6H, CH_2-THP); 2.04-2.07 (m, 2H, CH_2-Ger); 2.13-2.16 (m, 2H, CH_2-Ger); 3.49-3.52 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.68-3.88 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.97-4.01 (m, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.19 (s, 2H, R_2N-CH_2); 4.18-4.22 (m, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.61 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.33-5.38 (m, 2H, CH-Ger); 7.73 (m, 2H, CH Arom); 7.85 (m, 2H, CH Arom).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.4 (CH_3 Ger); 16.2 (CH_3 Ger); 19.4 (CH_2 THP); 25.3-25.9 (CH_2 THP, CH_2 Ger); 30.5 (CH_2 Ger); 38.8 (CH_2 Ger); 44.7 (R_2N-CH_2);

62.0-63.3 (CH_2 Ger, CH_2 THP); 97.5 (CH THP); 120.8 (CH Ger); 123.0 (CH Ger); 127.1 (CH Arom); 129.3 (C_q Arom); 131.9 (C_q Ger); 133.7 (CH Arom); 139.4 (C_q Ger); 167.9 (C=O).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

Darstellung von 2-[2,6,10-Trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienyl]-isoindol-1,3-dion (Pht-Far-OTHP) (14b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 204 mg (1.39 mmol) Phthalimid, 364 mg (1.39 mmol) Triphenylphosphan, 448 mg (1.39 mmol) HO-Far-OTHP (**12b**) und 242 mg (1.39 mmol) Diethylazodicarboxylat (DEAD) umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 6:1 [v;v].

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.30 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 6:1 [v;v]).
Ausbeute: 497 mg (1.10 mmol, 79%).
$C_{28}H_{37}NO_4$ (451.6)
HRMS- FAB (3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 474.2723 gef.: 474.2682.
m/z (%): 474 (10); 423 (10); 350 (35); 214 (38); 160 (49); 86 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.55 (s, 3H, CH_3 Far); 1.63 (s, 3H, CH_3 Far); 1.64 (s, 3H, CH_3 Far); 1.49-1.70 (m, 6H, CH_2 THP); 1.94-2.15 (m, 8H, CH_2 Far); 3.48-3.50 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.85-3.89 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.90-4.08 (m, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.17 (s, 2H, R_2N-CH_2); 4.10-4.30 (m, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.61 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.03-5.08 (m, 1H, CH Far); 5.32-5.34 (m, 2H, CH Far); 7.70 (m, 2H, CH Arom); 7.83 (m, 2H, CH Arom).

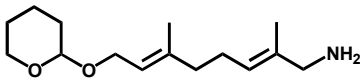
100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.6 (CH_3 Far); 16.0 (CH_3 Far); 16.4 (CH_3 Far); 19.6 (CH_2 THP); 25.5, 26.2, 26.4 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.7 (CH_2 THP); 39.1 (CH_2 Far); 39.5 (CH_2 Far); 44.9 (R_2N-CH_2); 62.2-63.6 (CH_2 Far, CH_2 THP); 97.7 (CH THP); 120.5 (CH Far); 123.2 (CH Far); 124.2 (CH Far); 127.4 (CH Arom); 129.1 (C_q

Arom); 132.1 (C_q Far); 133.9 (CH Arom); 134.7 (C_q Far); 140.2 (C_q Far); 168.2 (C=O).

Darstellung der ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetale 15[168]

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 4:
Zu einer Lösung von 1.48 mmol des ω-Phtalimino-Isoprenol-THP-Acetales **14** in 30 ml Ethanol werden 8.96 mmol Hydrazin bei Raumtemperatur zugegeben. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

2,6-Dimethyl-8-(tetrahydropyran-2-yloxy)-octa-2,6-dienylamin (H_2N-Ger-OTHP) (15a)[168]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV4 werden 1.85 g (4.83 mmol) Pht-Ger-OTHP (**14a**) und 1.45 g (29.0 mmol) Hydrazin umgesetzt. Eluens: Essigsäureethylester/Triethylamin 99:1 [v;v].

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.23 (Essigsäureethylester/Triethylamin 99:1 [v;v]).
Ausbeute: 1.03 g (4.06 mmol, 84%).
$C_{15}H_{27}NO_2$ (253.2)

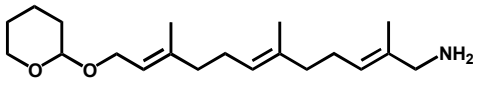
250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.64 (s, 3H, CH_3-Ger); 1.68 (s, 3H, CH_3-Ger); 1.50-1.88 (m, 6H, CH_2-THP); 2.05-2.09 (m, 2H, CH_2-Ger); 2.13-2.17 (m, 2H, CH_2-Ger); 3.16 (s, 2H, H_2N-C$\underline{H}_2$); 3.47-3.54 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.86-3.93 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.03 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.25 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.63 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.25-5.29 (m, 1H, CH-Ger); 5.35-5.39 (m, 1H, CH-Ger).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5 (CH_3 Ger); 16.3 (CH_3 Ger); 19.6 (CH_2 Ger); 25.4-25.9 (CH_2 THP, CH_2 Ger); 30.6 (CH_2 THP); 39.3 (CH_2 Ger); 49.7 (H_2N-CH_2);

62.2-63.6 (CH_2 Ger, CH_2 THP); 97.8 (CH THP); 120.7 (CH Ger); 123.4 (CH Ger); 139.9 (2*C_q Ger).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[186]

Darstellung von 2,6,10-Trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienylamin (H_2N-Far-OTHP) (15b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV4 werden 3.84 g (10 mmol) Pht-Far-OTHP (**14b**) und 3.00 g (60 mmol) Hydrazin umgesetzt. Eluens: Essigsäureethylester/Triethylamin 99:1 [v;v].

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.24 (Essigsäureethylester/Triethylamin 99:1 [v;v]).
Ausbeute: 3.05 g (9.50 mmol, 95%).
$C_{20}H_{35}NO_2$ (321.5)
HRMS- FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 322.2688 gef.: 322.2725.
m/z (%):322 (48); 220 (14); 86 (100).

250 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.61 (s, 3H, CH_3 Far); 1.64 (s, 3H, CH_3 Far); 1.68 (s, 3H, CH_3 Far); 1.40-1.90 (m, 6H, CH_2 THP); 2.07 (m, 8H, CH_2 Far); 3.16 (s, 2H, H_2N-C$\underline{H}_2$); 3.52 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.90 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.03 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.24 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.63 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, O-C$\underline{H}$(R)-O); 5.12 (t, *J* = 6.2, 1H, CH Far); 5.26 (t, *J* = 6.8, 1H, CH Far); 5.36 (t, *J* = 6.9, 1H, CH Far).

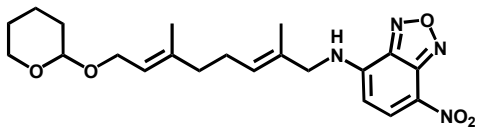
100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.4 (CH_3 Far); 15.9 (CH_3 Far); 16.3 (CH_3 Far); 19.5 (CH_2 THP); 25.4, 26.1, 26.2 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.6 (CH_2 THP); 39.4 (CH_2 Far); 39.5 (CH_2 Far); 44.9 (H_2N-CH_2); 62.1-63.5 (CH_2 Far, CH_2 THP); 97.6 (CH THP); 120.5 (CH Far); 123.4 (CH Far); 123.9 (CH Far); 135.1 (C_q Far); 137.2 (C_q Far); 140.2 (C_q Far).

Darstellung der ω-NBD-Isoprenol-THP-Acetale 16 a,b

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 5:

Zu einer Lösung von 1.00 mmol des ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetales **15** in 5 ml Acetonitril/ 25 mM $NaHCO_3$-Puffer (pH 8-9) 1:1 [v;v] werden 1.50 mmol 7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-chlorid (NBD-Cl) in 1 ml Acetonitril getropft. Anschließend wird eine Stunde gerührt, erneut 1.00 mmol NBD-Cl in 1 ml Acetonitril getropft und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird in 250 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

[2,6-Dimethyl-8-(tetrahydropyran-2-yloxy)-octa-2,6-dienyl]-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amin (NBD-NH-Ger-OTHP) (16a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV5 werden 253 mg (1.00 mmol) H_2N-Ger-OTHP (**15a**) und 498 mg (2.50 mmol) NBD-Cl umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 3:1 [v;v].

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.25 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 3:1 [v;v]).

Ausbeute: 279 mg (0.67 mmol, 67%).

$C_{21}H_{28}N_4O_5$ (416.3)

HRMS-EI ($[M+H]^+$) ber.: 416.2060 gef.: 416.2075.

m/z (%): 416 (1); 332 (6); 315 (5); 314 (4); 286 (5); 270 (2); 269 (8); 286 (4); 247 (3); 85 (100); 67 (13); 57 (10).

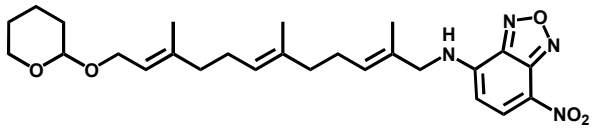
IR-Spektrum: $\tilde{\nu}$ = 3372 (w); 3081 (w); 2945 (m); 2872 (m); 1662 (m); 1582 (m); 1530 (m); 1495 (m); 1457 (s); 1441 (s); 1358 (s); 1303 (m); 1248 (m); 1190 (s); 1174 (w); 1123 (w); 1096 (w); 1076 (w); 1022 (w); 993 (w); 851 (w); 819 (w); 6698 (w).

Anregungsmaxima: λ = 233 nm; 325 nm; 453 nm ($CHCl_3$).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.68 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.74 (s, 3H, NH-CH_2-C(C$\underline{H}_3$)); 1.51-1.86 (6H, m, CH_2 THP); 2.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 2.23 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-C$\underline{H}_2$); 3.51-3.55 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.88-3.92 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.01 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.04 (s, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 4.26 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.63 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.35 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.50 (tq, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 6.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 6.51 (br, 1H, NH); 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.7 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 16.4 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-O); 19.7 (CH_2 THP); 25.5-25.9 (CH_2 THP, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 30.7 (CH_2 THP); 38.9 ($\underline{C}H_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 51.5 (HN-CH_2); 62.5-63.7 (CH-$\underline{C}H_2$-O, CH_2 THP); 98.2 (CH THP); 99.3 (CH Arom); 121.4 (CH-CH_2-O); 128.9 (NH-CH_2-C(CH_3)-$\underline{C}$H); 136.5 (CH Arom); 124.1, 128.9, 139.0, 143.9, 144.0, 144.3 (2*C_q Ger, 4*C_q Arom).

7-Nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-4-yl-1-[2,6,10-trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienyl]-amin (NBD-NH-Far-OTHP) (16b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV5 werden 322 mg (1.00 mmol) H_2N-Far-OTHP (**15b**) und 498 mg (2.50 mmol) NBD-Cl umgesetzt. Eluens: Methylenchlorid.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.10 (Methylenchlorid).

Ausbeute: 315 mg (0.65 mmol, 65%).

$C_{26}H_{36}N_4O_5$ (484.6)

HRMS- EI ($[M+H]^+$) ber.: 484.2686 gef.: 484.2707.

m/z (%): 484 (0.1); 400 (1); 383 (11); 135 (5); 95 (6); 93 (9); 85 (100); 84 (19); 81 (10); 57 (13); 55 (31); 43 (15).

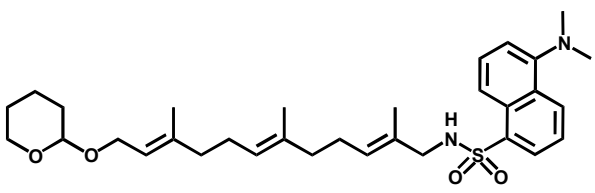
IR-Spektrum: $\tilde{\nu}$ = 3329 (w); 3074 (w); 2940 (m); 2303 (w); 1669 (m); 1623 (w); 1581 (m); 1530 (m); 1504 (m); 1441 (w); 1400 (m); 1328 (s); 1302 (s); 1076 (m); 1023 (w); 811(w).

Anregungsmaxima: λ = 228 nm; 325 nm; 453 nm ($CHCl_3$).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.54 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.61 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OR); 1.69 (s, 3H, NH-CH_2-C(C$\underline{H}_3$)); 1.46-1.81 (6H, m, CH_2 THP); 1.96-2.20 (m, 8H, CH_2 Far); 3.47 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.86 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.98 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.02 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 4.19 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.58 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.04 (tq, *J* = 6.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, C$\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 5.29 (ddq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.45 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 6.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 6.81 (t, *J* = 6.0, 1H, NH); 8.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5 (CH_3 Far); 15.9 (CH_3 Far); 16.3 (CH_3 Far); 19.6 (CH_2 THP); 25.4, 26.1, 26.2 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.6 (CH_2 THP); 38.9 (CH_2 Far); 39.4 (CH_2 Far); 51.4 (H_2N-CH_2); 62.3-63.6 (CH_2 Far, CH_2 THP); 97.8 (CH THP); 98.5 (CH Arom); 120.6 (CH Far); 123.5 (CH Far); 124.4 (CH Far); 128.9 (C_q Far); 136.5 (CH Arom); 128.6, 134.4, 139.9, 143.8, 144.2 (3*C_q Far, 4*C_q Arom).

Dansyl[2,6,10-trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienyl]-amid (Dansyl-NH-Far-OTHP) (16c)



Zu einer Lösung von 240 mg (0.75 mmol) H_2N-Far-OTHP (**15b**) in 5 ml Methanol/THF 1:1 [v;v] und 79 mg (0.75 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden 202 mg (0.75 mmol) Dansylchlorid in 1 ml THF getropft. Anschließend wird die Lösung zwei Stunden gerührt, in 250 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird

nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Eluens: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.35 (*c*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1 [v;v]).
Ausbeute: 325 mg (0.63 mmol, 85%).
$C_{32}H_{47}N_2O_4S$ (555.3)
HRMS-FAB ($[M+H]^+$, 3-NBA) ber.: 555.3256 gef.: 555.3242.
m/z (%): 554 (10); 453 (8); 250 (8); 183 (7); 170 (83); 95 (13); 85 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.40 (s, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.50 (s, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OR); 1.64 (s, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.45-1.75 (6H, m, CH_2 THP); 1.78-2.10 (m, 8H, CH_2 Far); 2.87 (s, 6H, NCH_3); 3.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 3.50 (m, 1H, O-CH(R)-O-$C\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.88 (m, 1H, O-CH(R)-O-$C\underline{H}_{2b}$-CH_2); 4.00 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, $C\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.19 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, $C\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.58 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.00 (tq, *J* = 6.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, C$\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 5.12 (ddq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.32 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH arom), 7.54 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.58 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom); 8.26 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 8.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom).

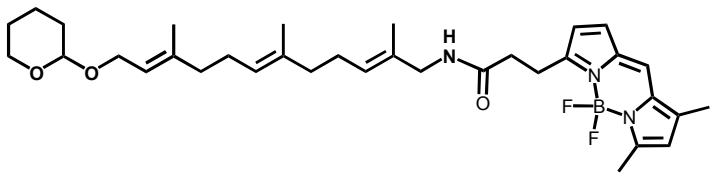
125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.4 (CH_3 Far); 16.2 (CH_3 Far); 16.6 (CH_3 Far); 19.8 (CH_2 THP); 25.7, 26.4, 27.1 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.9 (CH_2 THP); 39.2 (CH_2 Far); 39.8 (CH_2 Far); 45.6 (N-CH_3 Dansyl); 51.4 (R-HN-CH_2); 62.5, 63.6 (CH_2 Far, CH_2 THP); 98.0 (CH THP); 115.3 (CH Dansyl); 119.0(CH Dansyl); 120.9 (CH Far); 123.4 (CH Far); 124.4 (CH Far); 128.5 (CH Dansyl); 128.6 (CH Dansyl); 129.9 (CH Dansyl); 129.9 (C Dansyl) ; 130.1(C Dansyl); 130.4 (C Dansyl); 130.5 (CH Dansyl); 134.8 (C_q Far); 135.3 (C_q Far); 140.3 (C_q Far) 152.2 (C Dansyl).

Darstellung weiterer ω-funktionalisierter-Isoprenol-THP-Acetale

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 6:

Zu einer Lösung von 1.00 mmol des ω-Amino-Isoprenol-THP-Acetales **15**, 1.00 mmol der Carbonsäure (Bodipy FL, Biotin, Pyren-2-carbonsäure) und 1.50 mmol HOBt in 5 ml Dichlormethan werden unter Eiskühlung 1.30 mmol EDC in 1 ml Dichlormethan getropft. Anschließend wird acht Stunden gerührt, in 250 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

Bodipy FL-*N*-[2,6,10-trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienyl]-amid (Bodipy FL-NH-Far-OTHP) (16b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV6 werden 27 mg (86 µmol) H_2N-Far-OTHP (**15b**) und 25 mg (86 µmol) Bodipy FL umgesetzt. Elutionsgradient von 5:1 [v;v] auf 1:1 [v;v] (*c*-Hexan/Essigsäureethylester).

Oranges Öl

R_f-Wert: 0.35 (Essigsäureethylester/*c*-Hexan 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 47 mg (79 µmol, 92%).

$C_{34}H_{48}BF_2N_3O_3$ (595.6)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 596.3757 gef.: 596.3858.

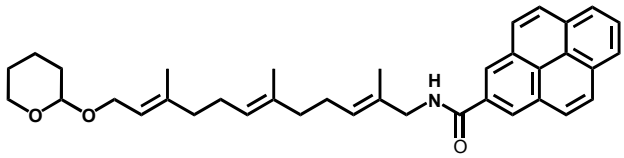
m/z (%): 525 (5); 474 (15); 393 (14); 307 (75); 299 (40); 154 (100); 136 (96).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.45 (s, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.50 (s, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OR); 1.60 (s, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.4-1.8 (6H, m, CH_2 THP); 1.9-2.1 (m, 8H, CH_2 Far); 2.18 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.49 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.43 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-C$\underline{H}_2$);

3.81 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.95 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.16 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.55 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.01 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, C$\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 5.12 (ddq, *J* = 6.7 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.28 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 5.63 (br t, *J* = 4.9 Hz , 1H, NH); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.22 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 6.80 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 7.00 (s, 1H, CH Bodipy FL).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 11.5 (CH_3 Bodipy FL); 14.6 (CH_3 Far); 15.1 (CH_3 Bodipy FL); 16.2 (CH_3 Far); 16.6 (CH_3 Far); 19.9 (CH_2 THP); 25.2 (CH_2 Bodipy FL); 25.7, 26.5, 26.7 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.9 (CH_2 THP); 36.3 (CH_2 Bodipy FL); 39.5 (CH_2 Far); 39.8 (CH_2 Far); 47.1 (R-NH-CH_2); 62.5, 63.9 (CH_2 Far, CH_2 THP); 98.0 (CH THP); 117.8; 120.6; 120.9; 124.0; 124.3; 126.7; 128.5 (4*CH Bodipy FL, 3*CH Far); 131.7; 133.1; 135.1; 140.3; 144.2; 157.3; 160.0 (3*C_q Far, 5*C_q Bodipy); 171.8 (CO Bodipy FL).

Pyren-2-carbonsäure [2,6,10-trimethyl-12-(tetrahydropyran-2-yloxy)-dodeca-2,6,10-trienyl]-amid (Pyren-NH-Far-OTHP) (16e)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV6 werden 321 mg (1.00 mmol) H_2N-Far-OTHP (**15b**) und 246 mg (1.00 mmol) Pyren-2-carbonsäure umgesetzt. Eluens: 1:1 [v;v] (*c*-Hexan/Essigsäureethylester).

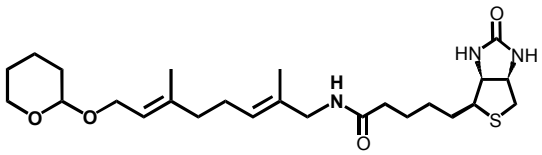
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.35 (Essigsäureethylester/*c*-Hexan 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 484 mg (0.88 mmol, 88%).
$C_{37}H_{43}NO_3$ (549.7)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 550.3321 gef.: 550.3337.
m/z (%): 550 (20); 466 (5); 448 (20); 307 (8); 245 (19); 229 (100); 201 (18).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.42 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.60 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OR); 1.80 (s, 3H, NH-CH_2-C(C$\underline{H}_3$)); 1.46-1.81

(6H, m, CH_2 THP); 1.96- 2.20 (m, 8H, CH_2 Far); 3.47 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.86 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.98 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.16 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 4.19 (dd, *J* = 11.9 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.58 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.11 (tq, *J* = 6.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, C$\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 5.29 (ddq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.45 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 6.14 (t, *J* = 6.0, 1H, NH); 7.88-8.10 (m, 5H, CH Arom); 8.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH Arom); 8.58 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 15.0 (CH_3 Far); 16.2 (CH_3 Far); 16.6 (CH_3 Far); 19.8 (CH_2 THP); 25.6, 26.5, 27.1 (2*CH_2 Far, CH_2 THP); 30.9 (CH_2 THP); 39.5 (CH_2 Far); 39.8 (CH_2 Far); 47.9 (CH_2-NH); 62.5, 63.8 (CH_2 Far, CH_2 THP); 97.0 (CH THP); 120.9, 124.6, 124.7, 124.7, 125.9, 126.0, 126.6, 127.3, 127.4, 127.7, 128.8, 128.9 (9*CH Pyrene, 3*CH Far); 124.6, 125.1, 128.9, 131.0, 131.4, 131.6, 131.8, 132.7, 135.0, 140.3 (7*C_q Pyr, 3*C_q Far); 170.0 (CONH).

Biotin [2,6-dimethyl-8-(tetrahydropyran-2-yloxy)-octa-2,6-dienyl]-amid (Biotin-NH-Ger-OTHP) (16f)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV6 werden 322 mg (1.00 mmol) H_2N-Ger-OTHP (**15a**) und 202 mg (1.00 mmol) Biotin umgesetzt. Eluens 5:1 [v;v] (Essigsäure-ethylester/Methanol).

Farbloses Öl

$[\alpha]^{20}_D$ = -35.0 ° (c = 1, MeOH).

R_f-Wert: 0.35 (Essigsäureethylester/Methanol 5:1 [v;v]).

Ausbeute: 359 mg (0.75 mmol, 75%).

$C_{25}H_{41}N_3O_4S$ (479.7)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 480.2818 gef.: 480.2935.

m/z (%): 480 (3); 460 (2); 378(10); 307(20); 289 (16); 154(100); 136 (85).

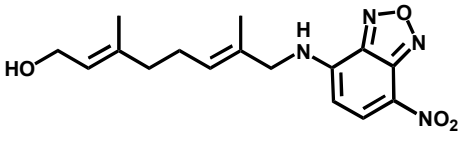
400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.2-2.1 (m, 8H, C$\underline{H}_2$-Biotin); 1.40 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OR); 1.47 (s, 3H, NH-CH_2-C(C$\underline{H}_3$)); 1.20-1.55 (6H, m, CH_2 THP); 1.8-2.4 (4H, m, CH_2 Far); 2.70 (dd, J = 12.7 Hz, 1H, S-C$\underline{H}_{2a}$); 2.92 (dd, *J* = 12.7 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, S-C$\underline{H}_{2b}$); 2.95 (d t, *J* = 7.3 Hz, *J* = 4.7 Hz, 1 H, S-C$\underline{H}$); 3.32 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2a}$-CH_2); 3.54 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 3.69 (m, 1H, O-CH(R)-O-C$\underline{H}_{2b}$-CH_2); 3.82 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.04 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$-O-CH(R)-O-CH_2); 4.11 (dd, *J* = 4.7 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH-NH-CO); 4.30 (dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, CH-NH-CO); 4.62 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, O-CH(R)-O), 5.07 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.14 (tq, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 6.68 (br, 1H, NH).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 16.5 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-O); 19.7 (CH_2 THP); 25.5, 25.8 (CH_2 THP, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 26.9 (CH_2 Biotin); 28.4 (CH_2 Biotin); 28.1 (CH_2 Biotin); 30.8 (CH_2 THP); 36.0 (CH_2 Biotin); 39.3 ($\underline{C}H_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 40.5 (CH_2 Biotin); 46.9 (R-NH-CH_2); 55.7 (CH Biotin); 60.4 (CH Biotin); 62.0 (CH Biotin); 62.5, 63.7 (CH-$\underline{C}H_2$-O, CH_2 THP); 98.2 (CH THP); 118.5, 120.9 (CH Ger), 132.2, 139.8 (CH Ger), 164.4 (CO Biotin); 173.6 (CONH).

Darstellung der ω-funktionalisierten Isoprenole 17

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 7:
Zu einer Lösung von 0.86 mmol des ω-funktionalisierten Isoprenol-THP-Acetals in 2 ml Ethanol werden 1.77 mmol Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat gegeben. Bei 60°C wird zwei Stunden gerührt, die Lösung in 250 ml Diethylether aufgenommen und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

3,7-Dimethyl-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-octa-2,6-dien-1-ol (NBD-NH-Ger-OH) (17a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV7 werden 358 mg (0.86 mmol) NBD-NH-Ger-OTHP (**16a**) umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 1.5:1 [v;v].

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.22 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1.5:1 [v;v]).

Ausbeute: 268.1 mg (0.81 mmol, 93%).

$C_{16}H_{20}N_4O_4$ (332.4)

HRMS- EI ($[M+H]^+$) ber.: 332.1485 gef.: 332.1498.

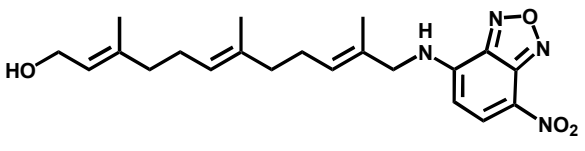
m/z (%): 332 (31); 246 (32); 231 (27); 134 (28); 121 (46); 117 (26); 109 (28); 107 (51); 94 (29); 93 (72); 91 (26); 81 (56); 79 (30); 69 (62); 67 (50); 57 (47); 55 (66); 43 (47); 41 (100).

Anregungsmaxima: λ = 230 nm; 326 nm; 454 nm ($CHCl_3$).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.61 (s, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 1.66 (s, 3H, NH-CH$_2$-C(C<u>H</u>$_3$)); 2.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-O); 2.15 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.0 Hz, 2H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-CH-C<u>H</u>$_2$); 2.26 (br, 1H, OH); 4.00 (s, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-OH); 5.31 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, C<u>H</u>-CH$_2$-OH); 5.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-C<u>H</u>); 6.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 7.33 (br, 1H, NH); 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.6 (NH-CH$_2$-C(<u>C</u>H$_3$)); 16.0 (C(<u>C</u>H$_3$)-CH-CH$_2$-O); 25.7 (NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-CH-<u>C</u>H$_2$); 38.6 (<u>C</u>H$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-O); 51.6 (HN-CH$_2$); 59.1 (CH-<u>C</u>H$_2$-O); 99.3 (CH Arom); 128.6 (NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-<u>C</u>H); 136.5 (CH Arom); 123.0, 129.2, 138.2, 143.9, 144.1, 144.5 (2*C_q Ger, 4*C_q Arom).

3,7,11-Trimethyl-12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-dodeca-2,6,10-trien-1-ol (NBD-NH-Far-OH) (17b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV7 werden 417 mg (0.86 mmol) NBD-NH-Far-OTHP (**16b**) umgesetzt. Eluens: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 1.5:1 [v;v].

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.23 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1.5:1 [v;v]).

Ausbeute: 324 mg (0.80 mmol, 94%).

$C_{21}H_{28}N_4O_4$ (400.5)

HRMS- EI ($[M+H]^+$) ber.: 400.2111 gef.: 400.2099.

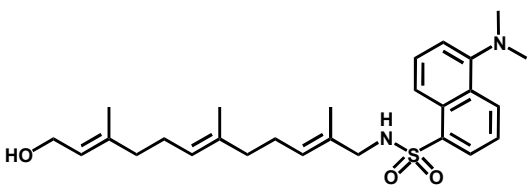
m/z (%): 400 (1); 385 (4); 384 (4); 383 (12); 382 (9); 247 (5); 246 (5); 193 (13); 187 (6); 181 (7); 150 (35); 93 (62); 81 (71); 69 (60); 59 (89); 41 (100).

IR-Spektrum: $\tilde{\nu}$ = 3335 (w); 3074 (w); 2928 (m); 2306 (m); 1668 (m); 1622 (w); 1583 (m); 1530 (w); 1500 (w); 1442 (w); 1403 (w); 1357 (s); 1300 (w); 1190 (m); 1125 (m); 999 (w); 904 (m); 847 (w); 811 (w); 780 (w); 740 (w); 683 (w).
Anregungsmaxima: λ = 232 nm; 326 nm; 459 nm ($CHCl_3$).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.59 (br, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 1.67 (br, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 1.73 (br, 3H, NH-CH$_2$-C(C<u>H</u>$_3$)); 1.95-2.30 (m, 8H, CH$_2$ Far); 4.02 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-OH); 5.08 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, C<u>H</u>-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 5.38 (tq, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C<u>H</u>-CH$_2$-OH); 5.46 (tq, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-C<u>H</u>); 6.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 6.84 (br, 1H, NH); 8.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.7 (NH-CH$_2$-C(<u>C</u>H$_3$)); 15.9 (C(<u>C</u>H$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 16.3 (C(<u>C</u>H$_3$)-CH-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 26.0, 26.1 (C(CH$_3$)-CH-CH$_2$); 38.9-39.4 (CH$_2$-C(CH$_3$)); 51.3 (H$_2$N-CH$_2$); 59.5 (CH$_2$-OH); 99.2 (CH Arom); 123.4 (CH-CH$_2$-OH); 124.5 (<u>C</u>H-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-OH); 136.5 (CH Arom); 123.8, 128.6, 134.4, 139.3, 143.9, 144.2, 144.3 (3*C_q Far, 4*C_q Arom).

Dansyl (12-hydroxy-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-amid (Dansyl-NH-Far-OH) (17c)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV7 werden 478 mg (0.86 mmol) Dansyl-NH-Far-OTHP (**16c**) umgesetzt. Eluens: 3:1 [v;v] (*c*-Hexan/Essigsäureethylester).

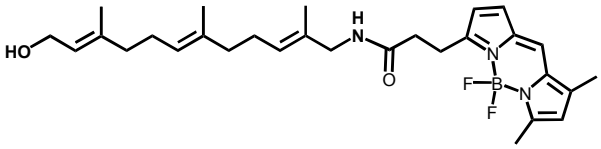
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.20 (Essigsäureethylester/*c*-Hexan 3:1 [v;v]).
Ausbeute: 304 mg (0.65 mmol, 75%).
$C_{27}H_{38}N_2O_3S$ (470.7)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 471.2681 gef.: 471.2675.
m/z (%): 470 (5); 250 (3); 218 (4); 186 (10); 170 (100); 133 (40).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.32 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OH); 1.45 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 1.63 (br, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.7-2.1 (m, 8H, CH_2 Far); 2.92 (s, 6H, NCH_3); 3.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 4.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$-OH); 4.83 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH); 4.92 (tq, *J* = 6.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, $C\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 5.06 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, $C\underline{H}$-CH_2-OH); 5.34 (tq, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-$C\underline{H}$); 7.12 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH arom), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH arom); 8.16 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, CH arom); 8.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH arom); 8.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.4 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 16.2 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-OH); 16.2 (C($\underline{C}H_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 26.2; 26.5 (C(CH_3)-CH-CH_2); 39.1; 39.5 (CH_2-C(CH_3)); 45.7 (N-CH_3 Dansyl); 51.4 (R-HN-CH_2); 62.9 (CH_2-OH);
115.5; 120.6; 123.5; 123.9; 123.9; 128.5; 128.6; 129.9; 130.4 (6*CH Dansyl; 3*CH Far); 129.9;129.9; 130.4; 135.2; 135.4; 142.8; 152.0 (4*C_q Dansyl; 5*C_q Far); 176.2 (CONH).

Bodipy FL -*N*-(12-hydroxy-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-amid (Bodipy FL-NH-Far-OH) (17d)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV7 werden 47 mg (79 µmol) Bodipy FL-NH-Far-OTHP (**16d**) umgesetzt. Elutionsgradient: 5:1 [v;v] bis 1:1 [v;v] (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester).

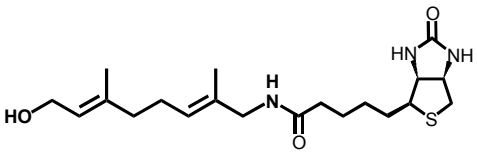
Oranges Öl
R_f-Wert: 0.35 (Essigsäureethylester/*c*-Hexan 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 37 mg (73 µmol, 92%).
$C_{29}H_{40}BF_2N_3O_2$ (511.5)
LR-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 534.31 gef.: 534.04.

m/z (%): 534 (20); 474 (18); 358 (78); 227 (17).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.46 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OH); 1.51 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 1.59 (br, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.85-2.30 (m, 8H, CH_2 Far); 2.18 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.49 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.66 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 4.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$-OH); 5.01 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, $C\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 5.12 (tq, *J* = 6.7 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, $C\underline{H}$-CH_2-OH); 5.32 (tq, *J* = 6.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-$C\underline{H}$); 5.73 (*J* = 4.9 Hz, 1H, NH); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.23 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 6.80 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 7.01 (s, 1H, CH Bodipy FL).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 11.5 (CH_3 Bodipy FL); 14.4 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 15.1 (CH_3 Bodipy FL); 16.2 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-OH); 16.5 (C($\underline{C}H_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 25.2 (CH_2 Bodipy FL); 26.4, 26.5 (2*C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 36.4 (CH_2 Bodipy FL); 39.4, 39.7 (2*CH_2-C(CH_3)); 47.1 (R-NH-CH_2); 59.6 (CH_2-OH); 117.9, 120.6, 123.8, 124.0, 124.3, 126.5, 128.5 (3*CH Far, 4*CH Bodipy FL); 131.8; 133.7; 135.0; 135.1; 139.5; 144.0; 157.8; 160.3 (5*C_q Bodipy, 3*C_q Far); 171.8 (CO Bodipy FL);

Biotin (8-hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienyl)-amid (Biotin-NH-Ger-OH) (17f)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV7 werden 413 mg (0.86 mmol) Biotin-NH-Ger-OTHP (**16f**) umgesetzt. Eluens 5:1 [v;v] (Essigsäure-ethylester/Methanol). Nachfolgend erfolgt eine Aufreinigung über eine C18-Sep-Pak-Kartusche (stufenweiser Elutionsgradient von Wasser auf CH_3CN).

Farbloses Öl

$[\alpha]^{20}_D$ = 24.8 ° (c = 1, MeOH).

R_f-Wert: 0.20 (Essigsäureethylester/Methanol 5:1 [v;v]).

Ausbeute: 296 mg (0.75 mmol, 87%).

$C_{20}H_{33}N_3O_3S$ (395.6)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 396.2243 gef.: 396.2312.

m/z (%): 396 (15); 378 (30); 307 (20); 289 (15); 227 (28); 154 (100); 136 (75); 89 (20).

400 MHz ^{1}H-NMR (CD_3OD): δ = 1.2-1.8 (m, 8H, C$\underline{H}_2$-Biotin);1.61 (s, 3H, C(C$\underline{H}_3$)-CH-CH_2-OH); 1.66 (s, 3H, NH-CH_2-C(C$\underline{H}_3$)); 2.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 2.23 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-C$\underline{H}_2$); 2.70 (d, J = 12.8 Hz, 1H, S-C$\underline{H}_{2a}$); 2.92 (dd, J = 12.8 Hz, J = 4.8 Hz, 1H, S-C$\underline{H}_{2b}$); 3.20 (d t, *J* = 7.3 Hz, *J* = 4.7 Hz ,1 H, S-C$\underline{H}$); 3.69 (s, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 4.12 (d, J = 6.9 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-OH); 4.29 (dd, *J* = 4.7 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH-NH-CO); 4.48 (dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, CH-NH-CO); 5.35 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C$\underline{H}$-CH_2-O); 5.50 (tq, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C$\underline{H}$); 6.51 (br, 1H, NH).

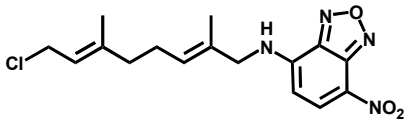
125.8 MHz ^{13}C-NMR (CD_3OD): δ = 13.5 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 15.1 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-O); 25.9 (NH-CH_2-C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 26.0 (CH_2 Biotin); 28.4 (CH_2 Biotin); 28.7 (CH_2 Biotin); 35.7 (CH_2 Biotin); 39.1 ($\underline{C}H_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 39.9 (CH_2 Biotin); 46.4 (R-NH-CH_2); 55.9 (CH Biotin); 58.3 (CH Biotin); 62.2 (CH-$\underline{C}H_2$-O); 60.5 (CH Biotin); 125.8; 128.7 (2*CH Ger); 131.9; 140.6 (C_q Ger); 164.3 (CO Biotin); 173.2 (CONH).

Darstellung der ω-markierten-Isoprenyl-Chloride 18

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 8:

Zu einer Lösung von 0.19 mmol *N*-Chlorsuccinimid in 2 ml abs. Methylenchlorid werden bei -30°C unter Argon-Atmosphäre 0.34 mmol Dimethylsulfid zugetropft. Man läßt sich die Lösung für fünf Minuten auf 0°C erwärmen und kühlt wieder auf -30°C. Anschließend werden 0.17 mmol des ω-Amino-Isoprenols in 2 ml abs. Methylenchlorid getropft. Die Lösung wird zwei Stunden bei 0°C gerührt und danach zweimal mit je 25 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

(8-Chloro-2,6-dimetyl-octa-2,6-dienyl)-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-yl)amin (NBD-NH-Ger-Cl) (18a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV8 werden 57 mg (0.17 mmol) NBD-NH-Ger-OH (**17a**) umgesetzt.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.33 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 3:1 [v;v]).

Ausbeute: 60 mg (0.17 mmol, quant.).

$C_{16}H_{19}N_4O_3Cl$ (350.8)

HRMS- EI ($[M+H]^+$) ber.: 350.1146 gef.: 350.1165.

m/z (%): 350 (3); 314 (28); 268 (17); 246 (18); 221 (16); 193 (11); 135 (25); 121 (15); 199 (22); 117 (18); 107 (34); 105 (16); 93 (100); 91 (33); 79 (52); 55 (49).

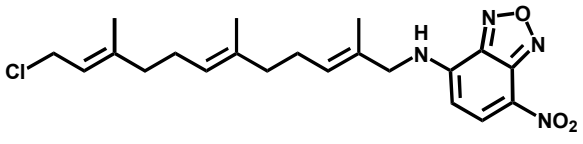
IR-Spektrum: $\tilde{\nu}$ = 3349 (w); 3080 (m); 2926 (m); 2299 (w); 1712 (m); 1622 (m); 1581(w); 1531 (m); 1501 (m); 1442 (w); 1402 (s); 1357 (s); 1302 (m); 1189 (s); 1124 (m); 1047 (m); 1026 (w); 999 (w); 904 (w); 847 (w); 811 (w); 780 (w); 740 (w); 680 (w).

Anregungsmaxima: λ = 228 nm; 325 nm; 453 nm, 460 nm ($CHCl_3$).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.73 (d, *J* = 1.2, 1H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 1.74 (br, 1H, NH-CH$_2$-C(C<u>H</u>$_3$)); 2.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 2.23 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.3 Hz, 2H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-CH-C<u>H</u>$_2$); 4.05 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-Cl); 5.42 (tq, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C<u>H</u>-CH$_2$-Cl); 5.48 (tq, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-C<u>H</u>); 6.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 6.53 (t, *J* = 5.5, 1H, NH); 8.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.7 (NH-CH$_2$-C(<u>C</u>H$_3$)); 16.0 (C(<u>C</u>H$_3$)-CH-CH$_2$-Cl; 25.7 (NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-CH-<u>C</u>H$_2$); 38.7 (<u>C</u>H$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 41.0 (CH-<u>C</u>H$_2$-Cl); 51.4 (HN-CH$_2$); 99.3 (CH Arom); 121.0 (<u>C</u>H-CH$_2$-Cl); 128.3 (NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-<u>C</u>H); 136.5 (CH Arom); 124.0, 129.3, 141.8, 143.9, 144.1, 144.3 (2*C_q Ger, 4*C_q Arom).

(12-Chloro-2,6,10-trimetyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-yl)amin (NBD-NH-Far-Cl) (18b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV8 werden 172 mg (0.43 mmol) NBD-NH-Far-OH (**17b**) umgesetzt.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.45 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 3:1 [v;v]).

Ausbeute: 182 mg (0.43 mmol, quant.).

$C_{21}H_{27}N_4O_3Cl$ (418.9)

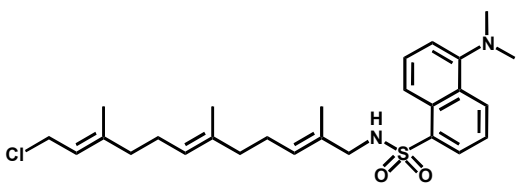
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 419.1772 gef.: 419.1760.

m/z (%):419 (6); 383 (5); 329 (3); 307 (21); 289 (12); 176 (6); 154 (100); 136 (78); 108 (23); 90 (24); 78 (19).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.55 (br, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 1.67 (d, *J* = 1.0, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 1.70 (br, 3H, NH-CH$_2$-C(C<u>H</u>$_3$)); 1.96-2.16 (m, 8H, CH$_2$ Far); 4.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-Cl); 5.04 (tq, *J* = 6.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, C<u>H</u>-(CH$_2$)$_2$-C(CH$_3$)-CH-CH$_2$-Cl); 5.38 (tq, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, C<u>H</u>-CH$_2$-Cl); 5.47 (tq, *J* = 6.6 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, NH-CH$_2$-C(CH$_3$)-C<u>H</u>); 6.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 6.78 (d, *J* = 5.8, 1H, NH); 8.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5 (CH$_3$ Far); 15.9 (2*CH$_3$ Far); 25.9- 26.2 (C(CH$_3$)-CH-<u>C</u>H$_2$); 38.9-39.2 (<u>C</u>H$_2$-C(CH$_3$)); 41.1 (CH$_2$-Cl); 51.4 (H$_2$N-CH$_2$); 99.3 (CH Arom); 120.2 (CH$_2$ Far); 123.9 (CH Far); 129.1 (CH Far); 136.6 (CH Arom); 123.4, 128.6, 134.7, 142.5, 143.8, 144.2 (3*C$_q$ Far, 4*C$_q$ Arom).

Dansyl (12-chloro-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-amid (Dansyl-NH-Far-Cl) (18c)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV8 werden 82 mg (173 µmol) Dansyl-NH-Far-OH (**17c**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.45 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 60 mg (130 µmol, 75%).

$C_{27}H_{37}ClN_2O_2S$ (489.1)

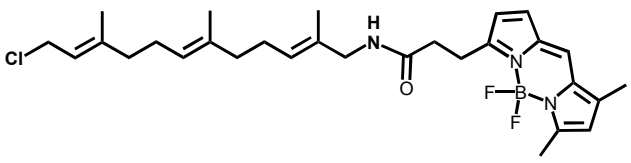
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 488.2264 gef.: 488.2289.

m/z (%): 488 (18); 453 (8); 327 (4); 250 (7); 185 (13); 170 (100); 133 (58).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.35 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-Cl); 1.48 (s, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-Cl); 1.59 (br, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.70-2.10 (m, 8H, CH_2 Far); 2.83 (s, 6H, NCH_3); 3.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 4.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$-Cl); 4.95 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz, NH); 5.08 (tq, *J* = 6.6 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, $C\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-Cl); 5.16 (tq, *J* = 6.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, $C\underline{H}$-CH_2-Cl); 5.33 (tq, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-$C\underline{H}$); 7.13 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.46 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH arom), 7.50 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH arom); 8.19 (dd, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, CH arom); 8.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.3 (CH_3 Far); 16.1; 16.4 (2*CH_3 Far); 26.3; 27.2 (C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 39.1; 39.6 (2*$\underline{C}H_2$-C(CH_3)); 45.6 (N-CH_3 Dansyl); 51.3 (R-HN-CH_2); 59.5 (CH_2Cl); 115.3; 119.2; 123.4; 123.8; 124.3; 128.3; 128.4; 129.7; 130.4 (6*CH Dansyl, 3*CH Far); 129.9; 130.0; 130.4; 134.8; 135.4; 139.2 (3*C_q Far; 4*C_q Dansyl); 171.4 (CONH).

_N_-(12-Chloro-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienyl)-Bodipy FL-amid (Bodipy FL-NH-Far-Cl) (18d)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV8 werden 47 mg (73 µmol) Bodipy FL-NH-Far-OH (**17d**) umgesetzt.

Oranges Öl

R_f-Wert: 0.45 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 39 mg (73 µmol, quant.).

$C_{29}H_{39}BClF_2N_3O$ (529.9)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 530.2843 gef.: 530.2745

m/z (%): 529(4); 474 (25); 329 (13); 227 (28); 136 (90).

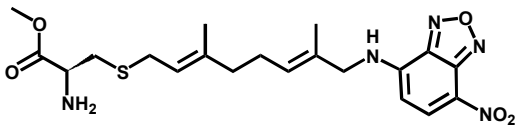
500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.46 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-Cl); 1.51 (d, *J* = 1.0, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-Cl); 1.64 (br, 3H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 1.86-2.05 (m, 8H, CH_2 Far); 2.18 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.48 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 4.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, $C\underline{H}_2$-Cl); 4.99 (tq, *J* = 6.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, $C\underline{H}$-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-Cl); 5.12 (tq, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, $C\underline{H}$-CH_2-Cl); 5.36 (tq, *J* = 6.6 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-$C\underline{H}$); 5.73 (br s, 1H, NH); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.23 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 6.90 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 7.02 (s, 1H, CH Bodipy FL).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 10.3 (CH_3 Bodipy FL); 13.4 (CH_3 Far); 13.9 (CH_3 Bodipy FL); 15.0; 15.1 (2*CH_3 Far); 23.9 (CH_2 Bodipy FL); 25.1, 25.4 (2*C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 35.0 (CH_2 Bodipy FL); 38.2; 38.4; 40.2(2*$\underline{C}H_2$-C(CH_3,CH_2-Cl); 45.9 (R-NH-CH_2); 116.6; 119.3; 122.6; 122.7; 122.8; 125.4; 127.3 (4*CH Bodipy, 3*CH Far); 130.5; 132.4; 134.1; 134.3; 141.7; 142.8; 156.5; 159.1 (5*C_q Bodipy, 3*C_q Far); 171.8 (CO Bodipy FL).

Darstellung der (*S*-Isoprenyl)-L-Cysteinmethylester 1

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 9:
Zu einer Lösung von 0.53 mmol Cysteinmethylester-Hydrochlorid in 1 ml Methanol werden 6 ml einer 2M Ammoniaklösung in Methanol gegeben. Anschließend werden 0.41 mmol des ω-Hydroxy-Isoprenyl-Chlorids zugetropft. Man rührt zwei Stunden, nimmt die Lösung in Essigsäureethylester und Wasser auf und extrahiert die wässrige Phase zweimal mit je 25 ml Essigsäureethylester. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

{*S*-[3,7-dimethyl-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-octa-2,6-dienyl]}-L-cysteinmethylester (Cys-(*S*-Ger-NH-NBD)-OMe) (1a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV9 werden 143 mg (0.41 mmol) NBD-NH-Ger-Cl (**18a**) umgesetzt.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.34 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:2.5 [v;v]).

$[\alpha]^{20}_D$ = -20.4 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 184 mg (0.41 mmol, quant.).

$C_{20}H_{27}N_5O_5S$ (449.5)

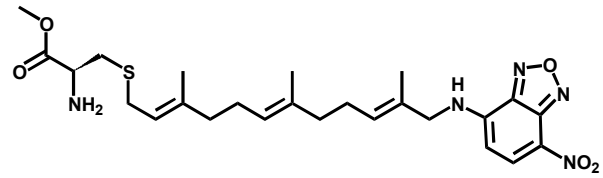
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 450.1733 gef.: 450.1870.

m/z (%):450 (20); 391 (5); 327 (2); 281 (5); 269 (20); 221 (8); 207 (10); 167 (20); 149 (100); 136 (48).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.64 (br, 3H, C($C\underline{H}_3$)-CH-CH_2-S); 1.73 (br, 1H, NH-CH_2-C($C\underline{H}_3$)); 2.01-2.13 (m, 2H, S-CH_2-CH-C(CH_3)-$C\underline{H}_2$); 2.17-2.35 (m, 2H, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-$C\underline{H}_2$); 2.85 (dd, *J* = 13.7 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 2.97 (dd, *J* = 13.7 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Far $C\underline{H}_{2a}$-S); 3.15 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Far $C\underline{H}_{2b}$-S); 3.75 (tdd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, α-CH Cys); 3.77 (s, 3H, CH_3 Cys); 4.02 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, NH-$C\underline{H}_2$); 5.15 (ddq, *J* = 7.7 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, $C\underline{H}$-CH_2-S); 5.41 (tq, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-$C\underline{H}$); 6.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom), 6.33 (d, *J* = 7.5, 2H, NH_2); 6.89 (br, 1H, NH); 8.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.8 (NH-CH_2-C($\underline{C}H_3$)); 16.0 (C($\underline{C}H_3$)-CH-CH_2-S); 25.7 (NH-CH_2-C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$); 30.1 (C(CH_3)-CH-$\underline{C}H_2$-S), 33.5 (β-CH_2 Cys); 38.8 ($\underline{C}H_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-S); 51.3 (HN-CH_2); 52.1 (CH_3 Cys), 52.8 (α-CH Cys); 99.2 (CH Arom); 120.4 (C(CH_3)-$\underline{C}$H-CH_2-S); 128.0 (NH-CH_2-C(CH_3)-$\underline{C}$H); 136.6 (CH Arom); 123.9, 129.1, 138.9, 144.0, 144.2, 144.4 (2*C_q Ger, 4*C_q Arom).

{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (Cys-(*S*-Far-NH-NBD)-OMe) (1b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV9 werden 172 mg (0.41 mmol) NBD-NH-Far-Cl (**18b**) umgesetzt.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.38 (Methylenchlorid/ Methanol 92:8 [v;v]).

$[\alpha]^{20}_D$ = -30.5 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 312 mg (0.41 mmol, quant.).

$C_{25}H_{35}N_5O_5S$ (517.7)

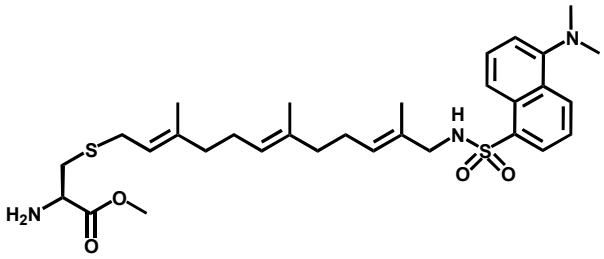
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 517.2359 gef.: 518.2455.

m/z (%):518 (6); 391 (12); 371 (6); 307 (19); 289 (14); 154 (100); 136 (82); 107 (30); 78 (29).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.51 (br, 3H, CH_3 Far); 1.58 (br, 3H, CH_3 Far); 1.65 (br, 3H, CH_3 Far); 1.84-2.14 (m, 8H, CH_2 Far); 2.63 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 2.86 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.07 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, Far CH_{2a}-S); 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, Far CH_{2b}-S); 3.69 (s, 3H, CH_3-Cys); 3.42-3.66 (m, 1H, α-CH Cys); 3.97 (m, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 5.00 (m, 1H, CH Far); 5.12 (m, 1H, CH Far); 5.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH Far); 6.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 8.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5 (CH_3 Far); 15.9 (CH_3 Far); 16.0 (CH_3 Far); 26.1; 29.7; 36.2; 38.9; 39.4; 43.1 (β-CH_2 Cys, 4*CH_2 Far); 51.3 (HN-CH_2); 52.3 (CH_3 Cys), 53.6 (α-CH Cys); 99.2 (CH Arom); 119.9; 124.2; 128.7 (3*CH Far); 123.2; 128.6; 134.5: 139.3; 143.8; 144.2 (3*C_q Far, 4*C_q Arom); 136.6 (CH Arom).

{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Dansyl-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (Cys-(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe) (1c)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV9 werden 201 mg (0.41 mmol) Dansyl-NH-Far-Cl (**18c**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.35 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

$[\alpha]^{20}_D$ = -2.1 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 229 mg (0.39 mmol, 95%).

$C_{31}H_{45}N_3O_4S_2$ (587.4)

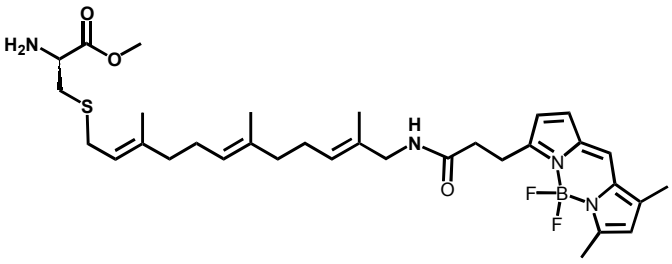
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 588.2850 gef.: 588.2880.

m/z (%): 588 (30); 263 (5); 250 (18); 186 (14); 170 (100); 95 (23); 81 (37).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.37 (br, 3H, CH_3 Far); 1.49 (br, 3H, CH_3 Far); 1.61 (br, 3H, CH_3 Far); 1.75-2.05 (m, 8H, CH_2 Far); 2.66 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 2.83 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 2.84 (s, 6H, NCH_3); 3.11 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, Far CH_{2a}-S); 3.13 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, Far CH_{2b}-S); 3.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 3.69 (s, 3H, CH_3-Cys); 3.60 (m, 1H, α-CH Cys); 4.97 (m, 1H, NH); 5.09 (m, 2H, CH Far); 5.17 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH Far); 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH arom), 7.47 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.51 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom); 8.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.4 (CH_3 Far); 16.2 (CH_3 Far); 16.3 (CH_3 Far); 26.4; 26.5 (CH_2 Far); 30.1 (CH_2S Far); 36.6 (β-CH_2 Cys); 39.1; 39.7 (CH_2 Far); 45.6 (NCH_3 Dansyl); 51.3 ($NHCH_2$); 52.4 (CH_3 Cys), 54.4 (α-CH Cys); 115.3; 119.1; 120.3; 123.4; 124.3; 128.4; 128.5; 129.8; 130.4 (6*CH arom, 3*CH Far); 129.8; 129.9; 130.0; 135.0; 135.2; 135.4; 139.6 (4*C_q Dansyl; 3*C_q Far); 174.7 (CONH).

{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Bodipy FL-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (Cys-(*S*-Far-NH-Bodipy)-OMe) (1d)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV9 werden 39 mg (74 µmol) Bodipy FL-NH-Far-Cl (**18d**) umgesetzt.

Rotbraunes Öl

R_f-Wert: 0.25 (*n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:10 [v;v]).

$[\alpha]^{20}_D$ = nd.[272]

Ausbeute: 25 mg (40 µmol, 55%).

$C_{33}H_{47}BF_2N_4O_3S$ (628.6)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 629.3430 gef.: 629.3508.

m/z (%): 474 (10); 289 (20); 227 (13).

500 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.47 (br, 3H, CH_3 Far); 1.51 (br, 3H, CH_3 Far); 1.59 (br, 3H, CH_3 Far); 1.80-2.10 (m, 8H, CH_2 Far); 1.97 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.48 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 2.63 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 2.80 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.09 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, Far CH_{2a}-S); 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, Far CH_{2b}-S); 3.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.55 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, NH-C$\underline{H}_2$); 3.62 (s, 3H, CH_3-Cys); 3.53 (m, 1H, α-CH Cys); 5.00 (m, 1H, CH Far); 5.13 (m, 1H, CH Far); 5.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH Far); 5.63 (br s, 1H, NH); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.23 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 6.80 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CH Bodipy FL); 7.01 (s, 1H, CH Bodipy FL).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 11.6 (CH_3 Bodipy FL); 14.5 (CH_3 Far); 15.1 (CH_3 Bodipy FL); 16.2 (CH_3 Far); 16.3 (CH_3 Far); 25.2 (CH_2 Bodipy FL); 26.6; 26.7 (CH_2 Far); 29.9; 30.1 (β-CH_2 Cys, S-CH_2 Far); 36.5 (CH_2 Bodipy FL); 39.5; 39.8 (CH_2 Far) 47.1 (R-NH-CH_2); 52.4 (CH_3 Cys), 54.5 (α-CH Cys);

117.8; 120.2; 124.0; 124.2; 124.3; 126.7; 128.6 (4*CH Bodipy FL, 3*CH Far); 131.8; 133.6; 135.3; 139.7; 141.0; 144.0; 157.8; 160.4 (5*C_q Bodipy FL, 3*C_q Far); 171.8 (CONH).

6.2.1.2 Versuche zu Kapitel 4.1.1.2: Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-Termini des N-Ras-Proteins

Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Synthese an fester Phase

Die allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 10 wird durch die Methoden A (*FastMoc* 0.25 Protokoll des Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizers) beschrieben. Die allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 11 wird durch die Methoden B (Manuelle Synthese) der Fmoc-Strategie beschrieben. Die allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 12 wird durch die Methoden der Boc-Strategie beschrieben.

Erstbeladung des Harzes

Fmoc-Strategie: Eine Lösung von 5.5 Äquivalenten der ersten Aminosäure und 11 Äquivalenten Diisopropylethylamin in abs. NMP (5 ml) wird unter Argon-Atmosphäre zum in 2 ml abs. Methylenchlorid vorgequollenen 2-Chlortritylchlorid-Harz oder 2-Chlormethyltritylchlorid-Harz gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend wird das Harz sechsmal mit NMP gewaschen.

Boc-Strategie: Eine Lösung von 5 Äquivalenten 3-(Tritylmethylthio)propansäure[273], 4.5 Äquivalenten HBTU, 6.2 Äquivalenten HOBt und 10 Äquivalenten Diisopropylethylamin in DMF (5 ml) wird nach zwei Minuten Voraktivierung unter Argon-Atmosphäre zum in 2 ml DMF vorgequollenen Novasyn®TG-Harz gegeben und zwanzig Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz sechsmal mit DMF gewaschen. Die Linkerimmobilisierung wird zweifach durchgeführt.

Kupplungen

Methode A (FastMoc 0.25 Protokoll des Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizers):
Zu einer Lösung von 1 mmol der Aminosäure in NMP (6 ml) 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 drei Minuten wird die

aktivierte Mischung unter Argon-Atmosphäre zum Harz gegeben und 21 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz sechsmal mit NMP gewaschen.

Methode B (Manuelle Synthese nach Fmoc- und Boc-Strategie): Eine Lösung von 4 Äquivalenten der Aminosäure, 3.6 Äquivalenten HBTU, 4 Äquivalenten HOBt und 4 Äquivalenten Diisopropylethylamin in DMF (5 ml) wird nach zwei Minuten Voraktivierung unter Argon-Atmosphäre zum in 2 ml Methylenchlorid vorgequollenen Harz gegeben und zwanzig Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz sechsmal mit DMF gewaschen.

Capping

(Manuelle Synthese nach Fmoc- und Boc-Strategie): Eine Lösung von 20 ml Acetanhydrid/Pyridin 9:1 [v;v] wird zum in 2 ml Methylenchlorid vorgequollenen Harz gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz sechsmal mit DMF gewaschen. Das Capping wird zweifach durchgeführt.

Entschützungen

Methode A (FastMoc 0.25 Protokoll des Perkin-Elmer ABI 433A Peptidsynthesizers): Das Harz wird dreimal zwei Minuten unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur einer Lösung aus Piperidin/NMP 3:17 [v;v] geschüttelt und anschließend sechsmal mit NMP gewaschen. Die Vollständigkeit der Entschützung wird anhand der UV-Absorption des Filtrates überwacht und ggf. der Entschützungsschritt erneut wiederholt (Feed-back monitoring).

Methode B (Manuelle Synthese nach Fmoc-Strategie): Das in 2 ml Methylenchlorid vorgequollene Harz wird zehn Minuten unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur mit 10 ml DMF/Piperidin 4:1 [v;v] geschüttelt und anschließend sechsmal mit DMF gewaschen. Die Entschützung wird zweifach durchgeführt.

Boc-Strategie (Manuelle Synthese nach Boc-Strategie): Das in 2 ml Methylenchlorid vorgequollene Harz wird zehn Minuten unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur mit 20 ml Trifluoressigsäure geschüttelt und anschließend sechsmal mit DMF gewaschen. Die Entschützung wird zweifach durchgeführt.

Abspaltung von der festen Phase

Fmoc-Strategie: Zu einer Suspension des in 10 ml Methylenchlorid vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 0.1 ml Trifluoressigsäure gegeben. Enthält die Peptidsequenz eine Trityl-Seitenkettenschutzgruppe, werden zusätzlich 0.5 ml Triisopropylsilan zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten geschüttelt und das Harz dreimal mit Methylenchlorid gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt. Enthält das abzuspaltende Peptid eine Tritylschutzgruppe, wird eine modifizierte Abspaltungsmethode gewählt: Zu einer Suspension des in 2 ml Methylenchlorid vorgequollenen Harzes werden unter Argon-Atmosphäre 10 ml Methylenchlorid/Trifluorethanol/Essigsäure 3:1:1 [v;v;v] gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten geschüttelt und das Harz dreimal mit Methylenchlorid gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrates wird durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt.

Boc-Strategie: Zu einer Suspension des in 2 ml DMF vorgequollenen Harzes werden bei 0°C unter Argon-Atmosphäre eine Lösung aus 0.5 M NaOH/ CH_3CN 1:1 [v;v] gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 Minuten geschüttelt und das Harz dreimal mit DMF gewaschen. Die Entschützung wird mit einer Lösung aus 0.5 M NaOH/ CH_3CN 1:3 [v;v] wiederholt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum und durch anschließende Gefriertrocknung entfernt. Der zurückgebliebene Feststoff wird in Methylenchlorid aufgenommen, 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und abfiltriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Aufreinigung

In den meisten Fällen ist nach der Festphasensythese aufgrund des hohen Reinheitsgrades eine Reinigung nicht notwendig. Ansonsten wird eine Größenausschlußchromatographie (Sephadex LH 20, Pharmacia) vorgenommen (Eluens: $CHCl_3$/MeOH 1:1 [v;v]).

Synthesebausteine

Die Synthesebausteine Maleinimidocapronsäure (MIC-OH), Fmoc-Gly, Fmoc-Cys(SS*t*Bu)-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro, Boc-Met-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Leu, Boc-Pro, Cys-OMe, Bodipy FL und Bodipy TR-X SE

wurden von Novabiochem, Fluka, Molecular Probes und Senn bezogen. *N*-Fluorenylmethoxycarbonylethandiamin Trifluoracetat[274;275] und 3-(Tritylmethylthio)-propansäure[273] wurden anhand beschriebener Darstellungsvorschriften synthetisiert.

_N_-Fluorenylmethoxycarbonyl-_S_-farnesyl-L-cystein (Fmoc-Cys(Far)-OH) (26)

Zu einer Lösung von 2.07 g (6.03 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Cystein in 1 ml Methanol werden 6 ml einer 2M Ammoniaklösung in Methanol gegeben. Anschließend werden 2.20 ml (8.04 mmol) Farnesylbromid zugetropft. Man rührt zwei Stunden, nimmt die Lösung in Essigsäureethylester und Wasser auf und extrahiert die wässrige Phase zweimal mit je 25 ml Essigsäureethylester. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis 1:5 [v;v]) erhalten.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.10 (*c*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 1.27 g (2.32 mol, 38.5%).
$[\alpha]^{20}_D$ = -2.5 ° (c = 1, $CHCl_3$).
$C_{33}H_{41}NO_4S$ (547.7)
LRMS-FAB(3-NBA, $[M-H]^-$) ber.: 547.27 gef.: 546.11.
m/z (%): 546 (5), 535 (5), 350 (35), 324 (35), 165 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.60 (s, 3H, CH_3 Far); 1.62 (s, 3H, CH_3 Far); 1.65 (s, 3H, CH_3 Far); 1.70 (s, 3H, CH_3 Far); 1.98-2.13 (m, 8H, CH_2 Far); 2.94 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 3.04 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.21 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, Far CH_2-S); 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.39 (m, 2H, CH_2 Fmoc); 4.63 (m, 1H, α-CH Cys); 5.11 (m, 2H, CH Far); 5.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Far); 5.97 (m, 1H, NH); 7.29 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.37 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.73 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 16.3; 16.4; 18.0; 26.0 (4*CH_3 Far); 26.7; 27.2 (2*CH_2 Far); 30.4 (β-CH_2 Cys); 33.7 (S-CH_2 Far); 39.9; 40.0 (2*CH_2 Far); 47.3 (CH Fmoc); 54.2 (α-CH Cys); 67.7 (CH_2 Fmoc); 119.9 (CH Fmoc);
120.2; 124.1; 124.7 (CH Far); 125.4 (CH Fmoc); 127.4 (CH Fmoc); 127.9 (CH Fmoc); 131.4; 135.5 (2*C_q Far); 140.2 (C_q Fmoc); 141.5 (C_q Far); 144.0 (C_q Fmoc); 156.5 (C=O Fmoc); 171.9 (C=O Cys).

_N_-Fluorenylmethoxycarbonyl-_S_-hexadecyl-L-Cystein-_tert_-butylester (Fmoc-Cys(hd)-O_t_Bu) (21)

Zu einer Lösung von 1.85 g (4.60 mmol) *S*-Hexadecyl-L-Cystein-*tert*-butylester in 4 ml einer 10%igen wässrigen Na_2CO_3-Lösung und 2 ml Dioxan wird bei 0°C eine Lösung von 1.19 g (4.60 mmol) 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid in 3 ml Dioxan zugetropft. Man rührt acht Stunden bei Raumtemperatur, gießt die Reaktionsmischung auf 40 ml Wasser und extrahiert zweimal mit 10 ml Diethylether. Unter Eiskühlung wird der pH-Wert der wässrigen Phase mit konzentrierter Salzsäure auf pH=1 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit 10 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 15:1 [v;v] bis 2:1 [v;v]) erhalten.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.50 (*c*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1 [v;v]).
$[\alpha]^{20}_D$ = -2.8 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 1.90 g (3.05 mol, 66%).
$C_{38}H_{57}NO_4S$ (623.9)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 623.4008 gef.: 623.4023.
m/z (%): 568 (10); 346 (10); 329 (12); 271(5); 179 (100); 178 (98); 58 (40).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.94 (t, *J* = 6.8, 3H, ω-CH_3 Hd); 1.53 (s, 3H, CH_3 *t*Bu); 1.25-1.63 (m, 28H, CH_2 Hd); 2.58 (t, J = 7.2 , 3H, α-CH_2 Hd); 2.98 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 3.05 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 4.25

(t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.40 (m, 2H, CH_2 Fmoc); 4.56 (m, 1H, α-CH Cys); 5.86 (m, 1H, NH); 7.32 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.39 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.63 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.74 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5; 23.0; 27.2; 28.2; 29.1; 29.5; 29.7; 29.8; 29.9; 30.0; 32.2; 33.3; 34.9 (15 CH_2 Hd, CH_3 *t*Bu, β-CH_2 Cys); 47.2 (CH Fmoc); 54.6 (α-CH Cys); 67.4 (CH_2 Fmoc); 82.7 (C_q *t*Bu); 120.3; 125.4; 127.4; 128.1 (CH Fmoc); 141.5 (C_q Fmoc); 144.1 (C_q Fmoc); 155.8 (C=O Fmoc); 170.1 (C=O Cys).

_N_-Fluorenylmethoxycarbonyl-_S_-hexadecyl-L-Cystein (Fmoc-Cys(hd)-OH) (22)

Zu einer Lösung von 1.90 g (3.05 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-hexadecyl-L-Cystein-*tert*-butylester (**21**) in 2 ml Methylenchlorid werden 5 ml Trifluoressigsäure gegeben. Bei Raumtemperatur wird eine Stunde gerührt, 1 ml Thioanisol hinzugegeben und die Lösungsmittel dreimal durch Codestillation mit Toluol im Vakuum entfernt.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.20 (*c*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1 [v;v]).
$[\alpha]^{20}_D$ = 6.2 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 1.62 g (2.85 mol, 94%).
$C_{34}H_{49}NO_4S$ (567.3)
HRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 568.3382 gef.: 568.3452.
m/z (%): 612 (10), 590 (46), 568 (1), 416 (3), 329 (7), 300 (6), 288 (12).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.92 (t, *J* = 6.8, 3H, ω-CH_3 Hd); 1.24-1.39 (m, 26H, CH_2 Hd); 1.51-1.63 (m, 2H, β-CH_2 Hd); 2.56 (t, J = 7.2 , 3H, α-CH_2 Hd); 3.05 (m, 2H, β- CH_2 Cys); 4.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc); 4.42 (m, 2H, CH_2 Fmoc); 4.67 (m, 1H, α-CH Cys); 5.82 (m, 1H, NH); 7.31 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.40 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc); 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.5; 23.1; 27.2; 28.2; 29.1; 29.5; 29.7; 29.8; 29.9; 30.0; 32.2; 33.3; 34.5 (15 CH_2 Hd, β-CH_2 Cys); 47.4 (CH Fmoc); 53.8 (α-CH Cys); 67.7 (CH_2 Fmoc); 119.8; 125.0; 127.0; 127.6 (CH Fmoc); 141.3 (C_q Fmoc); 143.8 (C_q Fmoc); 156.2 (C=O Fmoc); 175.3 (C=O Cys).

_N_-Trityl-_S_-Monomethoxytrityl-L-Cystein (Trt-Cys(Mmt)-OH) (33)[210]

Zu einer Lösung von 2.54 g (6.40 mmol) *S*-Monomethoxytrityl-L-Cystein in 10 ml Chloroform/Acetonitril 1:1 [v;v] werden 658 mg (3.20 mmol) Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) gegeben. Die Lösung wird zwei Stunden unter Rückfluss gerührt, auf Raumtemperatur abgekühlt und 1.79 ml (12.9 mmol) Triethylamin sowie 1.80 g (6.40 mmol) Tritylchlorid zugegeben. Die Lösung wird zwei Stunden gerührt, 1.3 ml Methanol (32.2 mmol) zugegeben und erneut eine Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Eluens: *c*-Hexan/ Essigsäure-ethylester 10:1 [v;v]) erhalten.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.30 (*c*-Hexan/Essigsäureethylester 5:1 [v;v]).
t_R-Wert: 30.78 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = 250 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 3.50 g (5.50 mmol, 86%).
$C_{42}H_{37}NO_3S$ (635.8)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M-H]^-$): ber.: 634.2 gef.: 634.1.
LRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 658.3 gef.: 657.9.
m/z (%): 658 (1), 490 (1), 482 (1), 460 (4).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.35 (dd, *J* = 12.1 Hz, *J* = 6.6 Hz, 1H, β- CH_{2a} Cys); 2.65 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H, β- CH_{2b} Cys); 3.40 (tdd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 5.9 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H, α-CH Cys); 3.75 (s, 3H, OMe); 6.77 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH Mmt); 7.10-7.44 (m, 27H, CH Arom).

100.6 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 27.0 (CH_2 Cys); 55.3; 55.7; 66.5; 71.5 (C_qPh_3 Trt, α-CH Cys, C_qPh_3 Mmt, OCH_3); 113.4 (CH Mmt); 129.9-131.0 (27*CH Arom); 136.6 (C_q Mmt); 145.0 (5*C_q Trt); 158.3 (C_q Mmt); 235.5 (COOH).

Synthese von Analoga des C-Terminus des N-Ras-Proteins

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolin (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-OH) (19a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 10 wird die Peptidsynthese an 260 mg (0.13 mmol) Fmoc-Pro-ClTrt-Harz (Novabiochem) [Beladung 0.49 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 16.64 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = -18.6 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 106 mg (0.12 mmol, 97% bezogen auf die Beladung des Harzes).
$C_{37}H_{59}S_3N_7O_{10}$ (858.1)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M-H]^-$): ber.: 856.3 gef.: 856.4
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 858.3486 gef.: 858.3503.
m/z (%):858.7 (10); 176.1 (8).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.70-0.95 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.10-1.30 (m, 11H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.39-1.73 (m, 7H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu); 1.90-2.16 (m, 7H, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH_2 Pro, SMe); 2.20-2.40 (m, 4H, α-CH_2 MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro); 2.47-2.74 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.95-3.20 (m, 2H, β-CH_2 Cys); 3.40-3.62 (m, 2H, NCH_2 MIC); 3.58-3.70 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.77-4.04 (m, 6H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´); 4.06-4.23 (m, 1H, α-CH Pro); 4.24-4.56 (m, 2H, α-CH Met, α-CH Cys); 4.60-4.81 (m, 1H, α-CH Leu); 6.68 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.18 (s, 1H, NH); 7.52 (s, 1H, NH); 7.75 (s, 1H, NH); 8.0 (s, 1H, NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-hexadecyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolin (MIC-Gly-Cys(Shd)-Met-Gly-Leu-Pro-OH) (19b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 10 wird die Peptidsynthese an 490 mg (0.25 mmol) Fmoc-Pro-ClTrt-Harz (Novabiochem) [Beladung 0.51 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 25.44 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = -2.2 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 217 mg (0.22 mmol, 88% bezogen auf die Beladung des Harzes).
$C_{49}H_{83}N_7O_{10}S_2$ (994.4)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 994.6 gef.: 994.3.
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 1016.5541 gef.: 1016.5520.
m/z (%):1016 (12); 807 (18); 647 (10); 514 (13); 300 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.85-0.90 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, ω-CH_3 Leu); 0.95-1.00 (t, *J* = 6.8, 3H, ω-CH_3 Hd); 1.20-1.40 (m, 32H, CH_2 MIC, CH_2 Hd); 1.50-1.70 (m, 7H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu); 1.95-2.19 (m, 7H, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH_2 Pro, SMe); 2.22-2.28 (m, 4H, α-CH_2 MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro); 2.48-2.62 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.80-3.05 (m, 2H, β-CH_2 Cys); 3.40-3.52 (m, 3H, NCH_2 MIC, δ-CH_{2b} Pro); 3.85-3.95 (m, 6H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´, α-CH Pro); 4.35-4.42 (m, 2H, α-CH Met, α-CH Cys); 4.45-4.65 (m, 1H, α-CH Leu); 6.79 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.80-7.40 (m, 5H, NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-L-serinyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolin (MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-OH) (19c)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 10 wird die Peptidsynthese an 490 mg (0.25 mmol) Fmoc-Pro-ClTrt-Harz (Novabiochem) [Beladung 0.51 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 2.75 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = -2.6 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 173 mg (0.23 mmol, 92% bezogen auf die Beladung des Harzes).

$C_{33}H_{51}N_7O_{11}S$ (753.9)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure):

ber.:$[M-H]^-$ 752.3 gef.:$[M-H]^-$ 752.4

ber.:$[M+Na]^+$ 776.3 gef.:$[M+Na]^+$ 776.4

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 776.3265 gef.: 776.3223

m/z (%):526 (19); 389 (6); 276 (20); 246 (29); 192 (78); 107 (70).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.91-1.11 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.26-1.36 (m, 2H, CH_2 MIC); 1.52-1.68 (m, 7H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu); 1.95-2.10 (m, 7H, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH_2 Pro, SMe); 2.15-2.35 (m, 4H, α-CH_2 MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro); 2.46-2.66 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.40-3.50 (m, 2H, NCH_2 MIC); 3.60 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.73-3.99 (m, 8H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´, β-CH_2 Ser, α-CH Pro); 4.41 (m, 2H, α-CH Met, α-CH Ser); 4.56 (m, 1H, α-CH Leu); 6.77 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.65 (m, 5H, NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamin (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2) (24a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11 wird 1g 4-Methyltritylchlorid-Harz (Beladung 2 mmol/g) mit 4.36 g (11.0 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonylethandiamintrifluoroacetat (Fmoc-NH-Et-NH_2) beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese an 186 mg (0.16 mmol) Fmoc-NH-Et-NH-MeTrt-Harz [Beladung 0.87 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl

t_R-Wert: 30.00 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = 3.2 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 154 mg (0.13 mmol, 79% bezogen auf die Beladung des Harzes).

$C_{57}H_{94}N_{10}O_{10}S_4$ (1207.7)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M-H]^-$): ber.: 1206.6 gef.: 1207.6

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 1207.6037 gef.: 1207.6161

m/z (%):1207.1; 913.0 (5); 776.3 (4); 630 (3).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.80-1.00 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.10-1.35 (m, 11H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.40-1.70 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.85-2.10 (m, 7H, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far); 2.24 (m, 4H, α-CH_2 MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro); 2.53-2.61 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.90 (m, 2H, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$-NH); 3.12 (m, 6H, β-CH_2 Cys, Far CH_2-S); 3.47 (m, 4H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$-NH); 3.60 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.80 (m, 5H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´); 4.00 (m, 1H, α-CH Pro); 4.38 (m, 3H, α-CH Met, 2*α-CH Cys); 4.50 (m, 1H, α-CH Leu); 5.07 (m, 2H, CH Far); 5.19 (m, 1H, CH Far); 6.69 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.25-8.15 (m, 8H, NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(O-trityl)-L-serinyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamin (MIC-Gly-Ser(Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2) (24b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11 wird 1g 4-Methyltritylchlorid-Harz (Beladung 2mmol/g) mit 4.36 g (11.0 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonylethandiamintrifluoroacetat (FmocNH-Et-NH_2) beladen. Anschließend wird die Peptidsynthese an 269 mg (0.24 mmol) Fmoc-NH-Et-NH-MeTrt-Harz [Beladung 0.87 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 35.00 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = 2.23 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 79 mg (0.06 mmol, 25% bezogen auf die Beladung des Harzes).
$C_{72}H_{100}N_{10}O_{11}S_2$ (1345.8)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1345.7 gef.: 1345.7
LRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.:1345.70 gef.: 1345.29
m/z (%):1367 (1); 1345 (1); 243 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.86 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.20 (m, 2H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.42-1.70 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.80-2.20 (m, 19H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC); 2.55 (m,

2H, γ-CH_2 Met); 3.11 (m, 8H, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$-NH, β-CH_2 Cys, Far CH_2-S); 3.45 (m, 4H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 3.60 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.65-4.00 (m, 8H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´, α-CH Pro, β-CH_2 Ser); 4.25-4.75 (m, 4H, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Ser, α-CH Leu); 5.07 (m, 2H, CH Far); 5.19 (m, 1H, CH Far); 6.65 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.00-8.20 (m, 8H, NH); 7.15-7.40 (m, 15H, CH Arom).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-L-serinyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamin (MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2) (24c)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11 wird 1g 4-Methyltritylchlorid-Harz (Beladung 2mmol/g) mit 4.36 g (11.0 mmol) *N*-Fluorenyl-methoxycarbonylethandiamintrifluoroacetat (FmocNH-Et-NH_2) beladen.
Anschließend wird die Peptidsynthese an 395 mg (0.35 mmol) Fmoc-NH-Et-NH-MeTrt-Harz [Beladung 0.87 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 28.1 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = 4.5° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 323 mg (0.29 mmol, 84% bezogen auf die Beladung des Harzes).
$C_{53}H_{86}N_{10}O_{11}S_2$ (1103.4)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1103.6 gef.: 1103.7
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 1103.5919 gef.: 1103.5952
m/z (%):1103 (18); 776 (3); 620 (4); 243 (100).
400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.89 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.25 (m, 2H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.56-1.70 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.80-2.20 (m, 19H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC); 2.55 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.12 (m, 8H, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$-NH, β-CH_2 Cys, Far CH_2-S); 3.43 (m, 4H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 3.60 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.65-3.95 (m, 8H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´, α-CH Pro, β-CH_2 Ser); 4.20-4.60 (m, 4H, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Ser, α-CH Leu); 5.07 (m, 2H, CH Far); 5.17 (m, 1H, CH Far); 6.65 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.00-8.20 (m, 8H, NH).

_N_-Trityl-(_S_-Monomethoxytrityl)-L-cysteyl L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolin (Trt-Cys(Mmt)-Met-Gly-Leu-Pro-OH) (30)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 12 wird die Linkerbeladung und die Peptidsynthese an 400 mg (0.11 mmol) NovaSyn®TG-Harz (Novabiochem) [Beladung 0.28 mmol/g] durchgeführt.

Gelbliches Öl
t_R-Wert: 30.14 min.
$[\alpha]^{20}_D$ = 3.5 ° (c = 1, $CHCl_3$).
Ausbeute: 60 mg (0.06 mmol, 52% bezogen auf die Beladung des Harzes).
$C_{60}H_{67}N_5O_7S_2$ (1034.3)
ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M-H]^-$): ber.: 1032.4 gef.: 1032.4.
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 1056.4380 gef.: 1056.4404.
m/z (%):1078 (9); 1056 (10); 329 (45).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.70-0.95 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.65-1.95 (m, 3H, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu); 2.10-2.45 (m, 9H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe); 2.41 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.16 (m, 2H, β-CH_2 Cys); 3.55 (s, 3H, OMe); 3.61-3.92 (m, 4H, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly); 4.16-4.23 (m, 1H, α-CH Pro, α-CH Met, α-CH Cys); 4.80 (m, 1H, α-CH Leu); 6.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Mmt); 7.0- 7.6 (m, 4H, NH); 6.98-7.38 (m, 27H, CH Arom).

Synthese fluoreszenzmarkierter Analoga des _C_-Terminus des N-Ras-Proteins

Allgemeine Arbeitsvorschrift der Peptidkupplung in Lösung mit EDC/HOBt (AAV 13):
Zu einer Lösung von 1 mmol des *N*-terminal geschützten Peptides, der Aminosäure oder der Carbonsäure und 1 mmol des *C*-terminal geschützten Peptides, der Aminosäure oder des Amins sowie 1.1 mmol Triethylamin in 20 ml Methylenchlorid werden unter Eiskühlung 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1 mmol *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N´*-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) gegeben. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt, die Lösung in Essigsäureethylester aufgenommen und je dreimal mit 25 ml 0.5 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, destilliertem Wasser und gesättigter

Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{*S*-[3,7-dimethyl-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-octa-2,6-dienyl]}-L-cysteinmethylester (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Ger-NH-NBD)OMe) (23a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 80 mg (93.2 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**19a**) und 41.9 mg (93.2 μmol) Cys-(*S*-Ger-NH-NBD)-OMe (**1a**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Rotbraunes Öl

t_R-Wert: 26.03 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = -36.6 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 91 mg (70.8 μmol, 76%).

$C_{57}H_{84}N_{12}O_{14}S_4$ (1289.6)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1289.5 gef.: 1289.2.

LRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 1289.5 gef.: 1289.1.

m/z (%):1311 (19); 1289 (12); 630 (5); 547 (100); 289 (13).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.95 (m, 6H, 2*ω-CH_3 Leu); 1.31 (m, 11H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.50-1.70 (m, 13H, 2*CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 2*CH_3 Ger); 2.00-2.20 (m, 9H, β-CH_{2b} Met, β-CH_{2b} Pro, γ-CH_2 Pro, -SMe, CH_2 Ger); 2.20-2.40 (m, 6H, α-CH_2 MIC, β-CH_{2a} Met, β-CH_{2a} Pro, CH_2 Ger); 2.50-2.70 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.00-3.15 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Ger C$\underline{H_2}$-S); 3.46 (m, 2H, NCH_2 MIC); 3.70 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro); 3.70 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.80-3.95 (m, 5H, α-CH_2 Gly, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly´); 4.00-4.08 (m, 3H, NH-C$\underline{H_2}$Ger, α-CH Pro); 4.40-4.75 (m, 4H, α-CH Leu, α-CH Met, 2*α-CH Cys); 5.15 (m, 1H, CH Ger); 5.41 (m, 1H, CH Ger); 5.46 (m, 2H, Ger NH); 6.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH NBD), 6.79 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.40-7.90 (m, 6H, NH); 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH NBD).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-NBD)OMe) (23b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 werden 65 mg (75.8 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**19a**) und 39 mg (75.8 μmol) Cys-(*S*-Far-NH-NBD)-OMe (**1b**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol1:1 [v;v]) erhalten.

Rotbraunes Öl

t_R-Wert: 26.12 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = 1.1 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 66 mg (48.6 μmol, 64%).

$C_{62}H_{92}N_{12}O_{14}S_4$ (1357.7)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1357.6 gef.: 1357.3.

LRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 1357.6 gef.: 1357.1.

m/z (%):1395 (30); 1379 (30); 1357 (22); 615 (10); 329 (10).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.95 (m, 6H, 2*ω-CH_3 Leu); 1.32 (m, 11 H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.50-1.75 (m, 13 H, 2*CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 3*CH_3 Far); 1.90-2.30 (m, 19H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, -SMe, 4*CH_2Far, α-CH_2 MIC); 2.45-2.80 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.95-3.25 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H_2}$-S); 3.47 (m, 2H, NCH_2 MIC); 3.71 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.60-3.90 (m, 6H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´); 4.10 (m, 3H, NH-C$\underline{H_2}$Far, α-CH Pro); 4.40-4.75 (m, 4H, α-CH Leu, α-CH Met, 2*α-CH Cys); 5.03 (m, 2H, CH Far); 5.12 (m, 1H, CH Far); 5.47 (m, 2H, Far NH); 6.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH NBD), 6.79 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.45-7.80 (m, 6H, NH); 8.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH NBD).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Dansyl-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Dansyl)OMe) (23c)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 38 mg (44.3 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**19a**) und 26 mg (44.3 μmol) Cys-(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**1c**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

t_R-Wert: 26.81 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = -12.9 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 53 mg (37.1 mmol, 84%).

$C_{68}H_{102}N_{100}O_{13}S_5$ (1427.9)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1427.6 gef.: 1427.3.

LRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 1449.6 gef.: 1450.0.

m/z (%): 1450 (20); 685 (9); 223 (10).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.87 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.20 (m, 11 H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.35-1.75 (m, 13 H, 2*CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 3*CH_3 Far); 1.80-2.15 (m, 19H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, -SMe, 4*CH_2Far, α-CH_2 MIC); 2.56 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.78 (s, 6H, NMe_2 Dansyl); 3.00-3.15 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H}_2$-S); 3.38 (m, 2H, NCH_2 MIC); 3.61 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.45-3.95 (m, 9 H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´, NH-C$\underline{H}_2$Far, α-CH Pro); 4.10-4.75 (m, 4H, α-CH Leu, α-CH Met, 2*α-CH Cys); 4.90 (m, 1H, CH Far); 4.94 (m, 1H, CH Far); 5.08 (m, 1H, CH Far); 6.69 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 7.45-7.71 (m, 6H, NH); 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH arom), 7.47 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.51 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom); 8.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Bodipy FL-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Bodipy FL)OMe) (23d)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 16 mg (18.6 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**19a**) und 12 mg (18.6 mmol) Cys-(*S*-Far-NH-Bodipy)-OMe (**1d**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Oranges Öl

t_R-Wert: 29.26 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = nd.[272]

Ausbeute: 21 mg (14.3 mmol, 77%)

$C_{70}H_{104}BF_2N_{110}O_{12}S_4$ (1468.7)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1468.4 gef.: 1468.7.

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.95-1.15 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.20-1.50 (m, 20 H, CH_2 MIC, S*t*Bu, 3*CH_3 Far); 1.65-2.05 (m, 15H, 2*CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_2Far); 1.95-2.35 (m, 11H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, -SMe, α-CH_2 MIC); 2.16 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.43 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.70 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 2.57 (m, 2H, CH_2 Bodipy FL); 2.96 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H}_2$-S); 3.15 (m, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.05-3.70 (m, 5H, NCH_2 MIC, δ-CH_{2b} Pro, NH-C$\underline{H}_2$Far); 3.63 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.85-4.55 (m, 10H, δ-CH_{2a} Pro, α-CH_2 Gly, α-CH_2 Gly´, α-CH Leu, α-CH Met, 2*α-CH Cys, α-CH Pro); 4.90-5.10 (m, 3H, CH Far); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.23 (m, 1H, CH Bodipy FL); 6.53 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.80 (m, 1H, CH Bodipy FL); 7.01 (s, 1H, CH Bodipy FL); 7.45-7.80 (m, 6H, NH).

_N_-Trityl-(_S_-Monomethoxytrityl)-L-cysteyl L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{_S_-[3,7,11-trimethyl-12-(Dansyl-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cystein-methylester (Trt-Cys(Mmt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Dansyl)OMe) (31)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 30 mg (29 μmol) Trt-Cys(Mmt)-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**30**) und 17 mg (29 μmol) Cys-(*S*-Far-NH-Dansyl)-OMe (**1c**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

t_R-Wert: 30.14 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = 7.4 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 36 mg (22.4 μmol, 77%).

$C_{91}H_{110}N_{80}O_{10}S_4$ (1604.2)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+Na]^+$): ber.: 1625.7 gef.: 1625.6.

400 MHz ^{1}H-NMR (MeOD): δ = 0.88 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.29 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.52 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.67 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.30-1.80 (m, 5 H, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, β-CH_2 Met); 1.95-2.10 (m, 8H, 4*CH_2Far); 2.20-2.40 (m, 9H, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, γ-CH_2 Met); 2.89 (s, 6H, NMe_2 Dansyl); 2.90-3.20 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H}_2$-S); 3.67 (s, 3H, OMe Mmt); 3.69 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.40-3.90 (m, 6 H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, NH-C$\underline{H}_2$Far); 4.10-4.75 (m, 4H, α-CH Leu, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Pro); 4.98 (m, 1H, CH Far); 5.11 (m, 2H, CH Far); 6.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Mmt); 6.98-7.38 (m, 28H, CH arom); 7.47 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 7.51 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom); 8.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom).

L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolinyl-{*S*-[3,7,11-trimethyl-12-(Dansyl-amino)-dodeca-2,6,10-trienyl]}-L-cysteinmethylester (Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Dansyl)OMe) (32)

Zu einer Lösung von 36 mg (22.4 μmol) Trt-Cys(Mmt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Dansyl)OMe (**31**) in 10 ml Methylenchlorid wird 0.1 ml Trifluoressigsäure getropft. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird 1 ml Methanol zugefügt und das Lösungsmittel durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

t_R-Wert: 30.83 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = 0.7 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 23 mg (20.8 μmol, 93%).

$C_{52}H_{80}N_8O_9S_4$ (1089.5)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1089.5 gef.: 1089.4.

LRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 1089.49 gef.: 1089.04

m/z (%): 1111 (1); 1089 (1); 905 (1).

400 MHz ^{1}H-NMR (MeOD): δ = 0.88 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.29 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.52 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.67 (s, 3 H, CH_3 Far); 1.30-1.80 (m, 5 H, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, β-CH_2 Met); 1.95-2.10 (m, 8H, 4*CH_2Far); 2.20-2.40 (m, 9H, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, γ-CH_2 Met); 2.89 (s, 6H, NMe_2 Dansyl); 2.90-3.20 (m, 6H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H}_2$-S); 3.72 (s, 3H, OCH_3 Cys); 3.40-3.90 (m, 6 H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, NH-C$\underline{H}_2$Far); 4.10-4.75 (m, 4H, α-CH Leu, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Pro); 5.00 (m, 1H, CH Far); 5.05 (m, 1H, CH Far); 5.18 (m, 1H, CH Far); 7.45-7.71 (m, 4H, NH); 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH arom), 7.47 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom), 7.51 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom); 8.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH arom); 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH arom); 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH arom).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-Bodipy FL (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL) (28a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 13.5 mg (11.2 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2 (**24a**) und 3.2 mg (11.2 μmol) Bodipy FL umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Rotes Öl

t_R-Wert: 29.48 min.

Ausbeute: 13.5 mg (9.1 μmol, 81%).

$[\alpha]^{20}_D$ = nd.[272]

$C_{71}H_{107}BF_2N_{12}O_{11}S_4$ (1481.8)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1481.7 gef.: 1481.5.

LRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 1503.70 gef.: 1503.22.

m/z (%): 1503 (1); 1325 (1); 695 (1).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.89 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.30-1.45 (m, 11H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.50-1.70 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.80-2.40 (m, 27H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH, 2*CH_3 Bodipy FL); 2.40-2.60 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.05-3.15 (m, 12H, 2*β-CH_2 Cys, Far C<u>H</u>$_2$-S, 2*CH_2 Bodipy FL, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 3.15-3.62 (m, 10H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´); 3.80-4.60 (m, 5H, α-CH Met, 2*α-CH Cys, α-CH Leu, α-CH Pro); 5.06 (m, 2H, CH Far); 5.17 (m, 1H, CH Far); 6.10 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.27 (m, 1H, CH Bodipy FL); 6.66 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.88 (m, 1H, CH Bodipy FL); 7.00-7.80 (m, 8H, NH); 7.08 (s, 1H, CH Bodipy FL).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(*S*-*tert*-butyl)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-Bodipy TR (MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy TR) (28b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 9.5 mg (7.9 μmol) MIC-Gly-Cys(S*t*Bu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2 (**24a**) und 5 mg (7.9 μmol) Bodipy TR-X umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Blaues Öl

t_R-Wert: 30.04 min.

$[\alpha]^{20}_D$ = 4.4 ° (c = 1, $CHCl_3$).

Ausbeute: 11.5 mg (6.6 μmol, 84%).

$C_{84}H_{118}BF_2N_{13}O_{13}S_5$ (1727.1)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1726.8 gef.: 1726.8.

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.89 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.30-1.45 (m, 11H, CH_2 MIC, S*t*Bu); 1.30-1.65 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.70-2.20 (m, 27H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC, 4*CH_2 Bodipy TR); 2.51 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.05-3.15 (m, 8H, 2*β-CH_2 Cys, Far C$\underline{H}_2$-S, NH-CH_2-C$\underline{H}_2$NH); 3.20-3.50 (m, 6H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C$\underline{H}_2$NH, NCH_2 Bodipy TR); 3.65-3.80 (m, 6H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´); 4.10-4.60 (m, 7H, α-CH Met, 2*α-CH Cys, α-CH Leu, α-CH Pro, OCH_2 Bodipy TR); 5.07 (m, 2H, CH Far); 5.21 (m, 1H, CH Far); 6.65 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.70- 8.00 (m, 20H, 12*CH Arom Bodipy TR, 8*NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-(O-trityl)-L-serinyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-Bodipy FL (MIC-Gly-Ser(Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL) (28c)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 11.5 mg (8.6 μmol) MIC-Gly-Ser(Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH_2 (**24b**) und 2.5 mg (8.6 μmol) Bodipy

FL umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Rotes Öl

t_R-Wert: 30.43.

Ausbeute: 12.5 mg (7.7 μmol, 90%).

$[\alpha]^{20}_D$ = nd.[272]

$C_{86}H_{113}BF_2N_{12}O_{12}S_2$ (1619.8)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M-H]^-$): ber.: 1617.8 gef.: 1617.7.

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.80 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.10 (m, 2H, CH_2 MIC); 1.45-1.60 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.75-2.00 (m, 21H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 2.28 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.42 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.58 (m, 2H, CH_2 Bodipy FL); 2.88 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.10 (m, 4H, β-CH_2 Cys, Far C<u>H</u>$_2$-S); 3.20 (m, 2H, CH_2 Bodipy FL); 3.40 (m, 4H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 3.60-3.90 (m, 8H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´, β-CH_2 Ser); 4.10-4.60 (m, 4H, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Ser, α-CH Leu, α-CH Pro); 5.00 (m, 2H, CH Far); 5.10 (m, 1H, CH Far); 6.04 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.23 (m, 1H, CH Bodipy FL); 6.59 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.79 (m, 1H, CH Bodipy FL); 7.00-7.80 (m, 8H, NH); 7.01 (s, 1H, CH Bodipy FL); 7.10-7.35 (m, 15H, CH Arom); 7.45-7.80 (m, 6H, NH).

Maleinimidocaproyl-Glycyl-L-serinyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(*S*-Farnesyl)-L-cysteyl-ethylendiamino-Bodipy FL (MIC-Gly-Ser-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL) (28d)

Zu einer Lösung von 12.5 mg (7.7 μmmol) MIC-Gly-Ser(Trt)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-NH-Et-NH-Bodipy FL (**28c**) in 10 ml Methylenchlorid wird 0.1 ml Trifluoressigsäure getropft. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird 1 ml Methanol zugefügt und das Lösungsmittel durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Rotes Öl

t_R-Wert: 30.23 min.

Ausbeute: 9.7 mg (7.0 μmol, 91%).

$[\alpha]^{20}_D$ = nd.[272]

$C_{67}H_{99}BF_2N_{12}O_{12}S_2$ (1377.5)

ESI-MS (Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, $[M+H]^+$): ber.: 1377.7 gef.: 1377.6.

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.80 (m, 6H, ω-CH_3 Leu); 1.20 (m, 2H, CH_2 MIC); 1.45-1.70 (m, 19H, 2 CH_2 MIC, β-CH_2 Leu, γ-CH Leu, 4*CH_3 Far); 1.85-2.15 (m, 21H, β-CH_2 Met, β-CH_2 Pro, γ-CH_2 Pro, SMe, 4*CH_2 Far, α-CH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 2.25 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.45 (s, 3H, CH_3 Bodipy FL); 2.58 (m, 2H, CH_2 Bodipy FL); 2.85 (m, 2H, γ-CH_2 Met); 3.05-3.35 (m, 6H, β-CH_2 Cys, Far C<u>H</u>$_2$-S, CH_2 Bodipy FL); 3.40 (m, 4H, NCH_2 MIC, NH-CH_2-C<u>H</u>$_2$NH); 3.65 (m, 8H, α-CH_2 Gly, δ-CH_2 Pro, α-CH_2 Gly´, β-CH_2 Ser); 4.20-4.70 (m, 4H, α-CH Met, α-CH Cys, α-CH Ser, α-CH Leu, α-CH Pro); 5.00 (m, 2H, CH Far); 5.10 (m, 1H, CH Far); 6.08 (s, 1H, CH Bodipy FL); 6.18 (m, 1H, CH Bodipy FL); 6.65 (s, 2H, -CH=CH- MIC); 6.85 (m, 1H, CH Bodipy FL); 7.10 (s, 1H, CH Bodipy FL); 7.25-7.95 (m, 8H, NH).

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.2: Ligation zwischen Ras-Protein und *C*-terminalem Peptid

6.2.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2.1: Maleimidocapronsäure(MIC)-vermittelte Protein Ligation

Alle Kupplungen von Lipoproteinen an *C*-terminal verkürztes H-Ras wurden von M. Wagner analog der Arbeitsvorschrift von B. Bader *et al.* durchgeführt.[42;43] Nach erfolgter Aufreinigung wird die S*t*Bu-Schutzgruppe des neo-Ras Proteins Dithioerythritol (DTE) vermittelt abgespalten.

6.2.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.2.2: Intein-vermittelte Protein Ligation

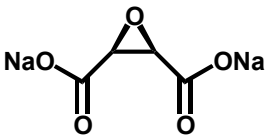
Zu einer Lösung von 0.8 mg (0.71 μmol) Cys-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far-NH-Dansyl)OMe (**32**) in 1 ml Kopplungspuffer (100 mM Na_2HPO_4, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 μM CTAB, 5 mM TCEP) werden 5 mg (0.24 μmol) gelöstes H-Ras(1-180)-MESA **8** (wt.) (Stammlösung (51.7 g/l) in 20mM Tris/HCl, 5mM $MgCl_2$) gegeben.

Anschließend wird die Lösung acht Stunden bei 4°C im Über-Kopf-Rad gemischt. Das entstandene Präzipitat wird abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm), der Überstand abgenommen und der Niederschlag viermal mit Methylenchlorid (1 ml), zweimal mit Essigsäureethylester/Methanol 4:1 [v;v] (1 ml), zweimal mit Methanol (1 ml), und zweimal mit Wasser (1 ml) gewaschen.

Um eine Proteinlösung der Konzentration von ca. 0.2 mg/ml zu erhalten, wird das Präzipitat in ca. 10 ml Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6M GdmHCl, 100 mM DTE, 1% Chaps, 1 mM EDTA) aufgenommen. Anschließend wird die Lösung über eine Stunde bei 4°C inkubiert und bei 15°C mit Rückfaltungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM DTE, 1% CHAPS) auf 1:20 verdünnt. Nach kurzem Mischen wird die Lösung für eine Stunde bei 15°C ohne Rühren inkubiert und 12 Stunden gegen einen Puffer aus 20mM TRIS/HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$ dialysiert. Das gelöste Protein wird im Dialysepuffer auf eine Niederdruck-DEAE-Gelfiltrationssäule (FPLC-System) aufgetragen und mit zwei Säulenvolumen Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$) gewaschen. Das gebundene, fluoreszierende Protein wird mit einem linearen Gradienten vom Bindungspuffer auf den Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 1M NaCl) über fünf Säulenvolumen eluiert.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.2: Cerulenin Analoga

Dinatrium *cis*-Epoxysuccinat (36)



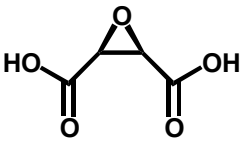
Zu einer Lösung von 100 g (0.86 mol) Maleinsäure in 300 ml destilliertem Wasser werden 52 g (1.30 mol) Natriumhydroxid in 100 ml Wasser getropft. Dabei erwärmt sich die Lösung auf ca. 70°C. Es werden nacheinander 5.70 g (0.02 mol) Natriumwolframat Dihydrat und 31.0 ml (1.20 mol) Wasserstoffperoxid (30% in Wasser) hinzugefügt. Durch Eiskühlung wird die Temperatur auf ca. 65°C eingestellt.

Der pH-Wert fällt von ca. 5.5 auf 4. Um pH = 4 zu halten, wird portionsweise eine 0.5 M Lösung Natriumhydroxid (100 ml) zugetropft. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei 65°C wird die Lösung auf 40°C gekühlt und die verbliebenene Natronlauge zugegeben. Das Lösungsmittel wird im Vakuum auf 300 ml konzentriert, der Rückstand unter Rühren in 1.5 l Aceton aufgenommen und der ausgefallene Feststoff abfiltriert.

Farbloses Pulver
Ausbeute: 143 g (95%).
$C_4H_2Na_2O_5$ (176.04)

400 MHz ^{1}H-NMR (D_2O): δ = 3.60 (s, 2H, CH Epox).
125.8 MHz ^{13}C-NMR (D_2O):δ = 55.6 (CH Epox); 173.9 (COONa).

cis-Epoxybernsteinsäure (Oxiran-2,3-dicarbonsäure) (37)[276]

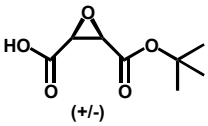


Zu einer Lösung von 143 g (0.81 mol) Dinatrium *cis*-Epoxysuccinat (**36**) in 300 ml Wasser wird 198 g (0.81 mol) Bariumchlorid Dihydrat in 300 ml warmes destilliertes Wasser gegeben. Das auskristallisierende Barium *cis*-Epoxysuccinat Dihydrat 245 g (0.81 mol) wird abfiltriert. Zu einer Suspension von 100 g (0.33 mol) Barium *cis*-Epoxysuccinat Dihydrat und 20 g (0.17 mol) wasserfreiem Magnesiumsulfat in 130 ml Diethylether wird bei 0°C während einer Stunde tropfenweise eine Lösung von 32.4 g Schwefelsäure in 500 ml Diethylether getropft. Nach einer weiteren Stunde bei 5-10°C wird acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Feststoff abfiltriert, das Filtrat über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Farbloser Feststoff
Ausbeute: 43.0 g (0.81 mol, quant.)
$C_4H_4O_5$ (132.1)
Schmelzpunkt (gem.): 148°C Schmelzpunkt (Lit.): 146-148°C.
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 133.0059 gef.: 133.0135.
m/z (%): 133 (43); 119 (41); 95 (49); 89 (70); 80 (50).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[276]

cis-Epoxybernsteinsäure mono-_tert_-butylester[238]
(Oxiran-2,3-dicarbonsäure mono-_tert_-butylester) (38)



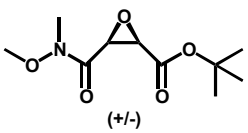
Zu einer Lösung 31.0 g (0.24 mol) *cis*-Epoxybernsteinsäure in 400 ml THF wird eine Lösung von 48.0 g (0.24 mol) 2-tert-Butyl-1.3-diisopropylharnstoff (**39**)[239] in 300 ml THF getropft. Anschließend wird acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Feststoffes nimmt man die Lösung in 400 ml Diethylether und 400 ml Wasser auf und wäscht die wässrige Phase zweimal mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Farbloses Öl
Ausbeute: 26.4 g (0.14 mol, 65%)
$C_8H_{12}O_5$ (188.2)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 189.0685 gef.: 189.0773
m/z (%): 189 (8); 154 (47); 58 (47).

400 MHz ^{1}H-NMR (CD_3OD): δ = 1.45 (s, 9H, CH_3); 3.68-3.84 (m, 2H, CH Epox).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[238]

3-(Methoxy-methyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure _tert_-butyl ester (40)



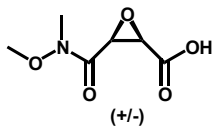
Zu einer Lösung von 11.7 g (68.3 mmol) *cis*-Epoxybernsteinsäure mono-*tert*-butylester (**38**), 11.5 g (75.2 mmol) HOBt, 28.5 g (75.2 mmol) HBTU und 22.9 g (178 mmol) DIPEA in 300 ml Methylenchlorid und 50 ml Dimethylformamid werden 10 g (102 mmol) N,O-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid gegeben. Bei Raumtemperatur wird acht Stunden gerührt, die Lösung in Essigsäureethylester aufgenommen und je dreimal mit 25 ml 0.5 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Eluens: *c*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.77 (Essigsäureethylester/Methanol 5:1 [v;v]).
Ausbeute: 10.4 g (44.8 mmol, 65%).
$C_{10}H_{17}NO_5$ (231.2)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 232.1107 gef.: 232.1088.
m/z (%): 232 (18); 145 (34); 58 (48).

400 MHz ^{1}H-NMR (CD_3OD): δ = 1.36 (s, 9H, CCH_3); 3.11 (s, 3H, NCH_3); 3.68 (s, 3H, OCH_3); 3.65-3.70 (m, 1H, CH Epox); 3.84 (m, 1H, CH Epox).

3-(Methoxy-methyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (41)



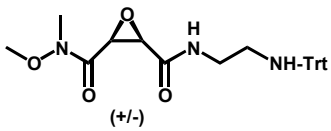
Zu einer Lösung 8.66 g (37.5 mmol) 3-(Methoxy-methyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure *tert*-butyl ester (**40**) und 15.0 ml (93.5 mmol) Triethylsilan in 100 ml Methylendichlorid werden unter Feuchtigkeitsausschluss 37.5 ml Trifluoressigsäure getropft. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Eluens: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.05 (Essigsäureethylester/Methanol 10:1 [v;v]).
Ausbeute: 4.80 g (25.7 mmol, 69%).
$C_6H_9NO_5$ (175.1)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 176.0481 gef.: 176.0575.
m/z (%): 176 (26); 155 (24); 136 (69); 120 (12); 107 (21); 58 (30).

400 MHz ^{1}H-NMR (CD_3OD): δ = 3.25 (s, 3H, NCH_3); 3.78 (s, 3H, OCH_3); 3.81 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH Epox); 4.14 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH Epox).

125.8 MHz ^{13}C-NMR (CD_3OD): δ = 32.8 (NCH_3); 50.2 (CH Epox); 53.6 (CH Epox); 62.4 (OCH_3); 166.2 (CONHR); 168.9 (CO_2H).

Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (44)



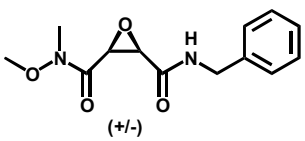
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 650 mg (3.72 mmol) 3-(Methoxy-methyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (**41**) und 1.10 g (3.72 mmol) *N*-(Triphenylmethyl)ethylendiamin[241] umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 3:1 [v;v] bis 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.20 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 801 mg (1.74 mol, 47%).
$C_{27}H_{29}N_3O_5$ (459.5)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 482.2056 gef.: 482.2031.
m/z (%): 482 (20); 243 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.21 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$NH); 2.90 (s, 3H, NCH_3); 3.24 (m, 1H, C$\underline{H}_{2a}$NH); 3.48 (m, 1H, C$\underline{H}_{2b}$NH); 3.61 (s, 3H, OCH_3); 3.73 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH Epox); 4.06 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH Epox); 6.80 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH); 7.14 (t, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH Trt); 7.24 (t, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH Trt); 7.46 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH Trt).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 32.4 (NCH_3); 40.0 (CH_2NH); 43.2 (CH_2NH); 54.1 (CH Epox); 54.8 (CH Epox); 62.1 (OCH_3); 70.9 ($\underline{C}Ph_3$ Trt); 126.4 (CH Trt); 127.9 (CH Trt); 128.7 (CH Trt); 146.1 (C_q Trt); 166.2 (CONHR); 171.2 (CONHR).

Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-benzylamid 3-(methoxy-methyl-amid) (42)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 13 werden 234 mg (1.33 mmol) 3-(Methoxy-methyl-carbamoyl)-oxiran-2-carbonsäure (**41**) und 143 mg (1.33 mmol) Benzylamin umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:3 [v;v] bis Essigsäureethylester) erhalten.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.30 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:10 [v;v]).

Ausbeute: 266 mg (1.00 mmol, 76%).

$C_{13}H_{16}N_2O_4$ (264.3)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 265.1110 gef.: 265.1202.

m/z (%): 287 (70); 265 (40); 91 (30).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.98 (s, 3H, NCH_3); 3.55 (s, 3H, OCH_3); 3.67 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 3.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.20 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$NH); 4.33 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$NH); 6.91 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH); 7.13-7.15 (m, 5H, CH Arom).

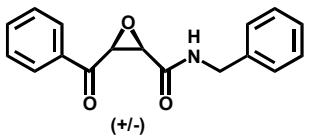
125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 32.4 (NCH_3); 43.2 (CH_2NH); 54.5 (CH Epox); 54.7 (CH Epox); 62.2 (OCH_3); 127.6 (CH Arom); 128.0 (CH Arom); 128.7 (CH Arom); 137.9 (C_q Arom); 165.2 (CONHR); 165.8 (CONHR).

Addition von Organolithiumverbindungen an α-Epoxyweinrebamide

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 14:

Zu einer Lösung von 250 μmol Aryl- bzw. Alkylhalogenid in 5 ml abs. Diethylether werden bei -78°C unter Argon-Atmosphäre 275 μmol *n*-Butyllithium (2.7 M in *n*-Hexan) bzw. *t*-Butyllithium (1.7 M in *n*-Pentan) getropft. Die Lösung wird 30 Minuten bei -78°C gerührt und anschließend wird 100 μmol des α-Epoxyweinrebamids in 5 ml Diethylether zugetropft. Die Lösung wird zwei Stunden bei -78°C gerührt und danach mit 5 ml 1N Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Danach nimmt man die Lösung in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Wasser auf und wäscht die wässrige Phase zweimal mit Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

3-Benzoyl-oxiran-2-carbonsäurebenzylamid (43)



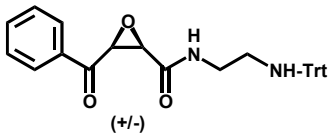
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 284 µl (568 µmol) Phenyllithium (hier keine Darstellung *in situ*, sondern Verwendung von 2M-Lösung in Toluol) mit 60 mg (227 µmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-benzylamid 3-(methoxy-methyl-amid) (**42**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 3:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1.5 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.20 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 10 mg (38 µmol, 16%).
$C_{17}H_{15}NO_3$ (281.3)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 282.1052 gef.: 282.1148.
m/z (%): 282 (30); 92 (40).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 3.93 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH Epox); 4.19 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.8 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2a}$NH); 4.23 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, C$\underline{H}_{2b}$NH); 4.37 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH Epox); 6.61 (m, 1H, NH); 7.01-7.09 (m, 2H, CH Arom); 7.10-7.38 (m, 3H, CH Arom); 7.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH Arom); 7.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH Arom); 7.86 (d, *J* = 7.2, 2H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 43.2 (CH_2NH); 55.8 (CH Epox); 58.3 (CH Epox); 127.7; 128.0; 128.7; 128.8; 129.3 (6*CH Arom); 134.8 (C_q Arom); 137.3 (C_q Arom); 165.0 (CONHR); 191.4 (CONHR).

3-Benzoyl-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 283 µl (566 µmol) Phenyllithium (hier keine Darstellung *in situ*, sondern Verwendung von 2M-Lösung in Toluol) mit 104 mg (226 µmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-

ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 10:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 2:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 4:1 [v;v]).

Ausbeute: 57 mg (120 μmol, 53%).

$C_{31}H_{28}N_2O_3$ (476.6)

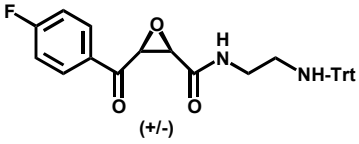
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 477.2100 gef.: 477.2145.

m/z (%): 477 (3); 243 (60); 58 (20).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.13 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.25 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.97 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, CH Epox); 4.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, CH Epox); 6.71 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH); 7.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH Trt); 7.24 (t, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH Trt); 7.35-7.45 (m, 2H, CH Ph); 7.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH Trt); 7.61 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH Ph); 7.81 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH Ph).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 40.2 (CH_2NH); 43.0 (CH_2NH); 56.2 (CH Epox); 58.1 (CH Epox); 71.0 (<u>C</u>(Ph)$_3$); 126.5; 128.1; 128.6; 128.8; 129.3 (3*CH Trt, 3*CH Ph); 134.8 (C_q Ph); 146.1 (C_q Trt); 164.9 (CONHR); 191.7 (COR).

3-(4-Fluoro-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 1-Fluoro-4-lithio-benzen (Darstellung *in situ* aus 121 mg (545 μmol) 1-Fluoro-4-iodobenzen und 222 μl (600 μmol) *n*-Butyllithium) mit 100 mg (218 μmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 4:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

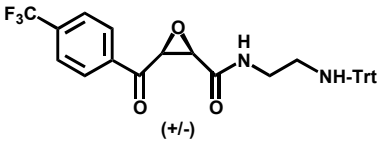
R_f-Wert: 0.50 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 43 mg (87 μmol, 40%).

$C_{31}H_{27}FN_2O_3$ (494.6)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 517.1904 gef.: 517.1917.
m/z (%): 517 (5); 479 (3); 243 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.15 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.33 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 4.13 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH Epox); 4.40 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH Epox); 6.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH);7.00-7.85 (m, 19 H, CH Arom).

3-(4-Trifluoromethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45c)



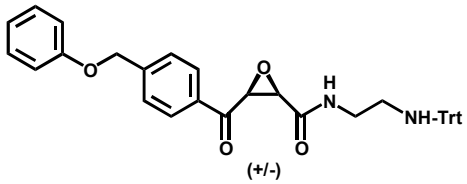
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 4-Lithiio-benzotrifluorid (Darstellung *in situ* aus 123 mg (545 μmol) 4-Bromo-benzotrifluorid und 222 μl (600 μmol) *n*-Butyllithium mit 100 mg (218 μmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 2:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.60 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v])
Ausbeute: 43 mg (79 μmol, 36%).
$C_{32}H_{27}F_3N_2O_3$ (544.6)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 545.1974 gef.: 545.2023.
m/z (%): 545 (3); 467 (3); 449 (2); 243 (100); 165 (17).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.14 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.64 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.78 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH Epox); 3.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH Epox); 7.06 (m, 19 H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 40.9 (CH_2NH); 42.4 (CH_2NH); 52.5 (CH Epox); 59.1 (CH Epox); 71.8 (<u>C</u>(Ph)$_3$); 115.7 (RCF_3); 125.7; 126.6; 126.9; 127.5; 128.5 (5*CH Arom); 142.4; 146.0; 148.7 (3*C_q Arom); 164.7 (CONHR); 191.0 (COR).

3-(4-Phenoxymethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45d)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 1-Benzyloxy-3-lithiobenzen (Darstellung *in situ* aus 169 mg (545 μmol) 1-Benzyloxy-3-iodobenzen und 222 μl (600 μmol) *n*-Butyllithium) mit 100 mg (218 μmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 2:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.50 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 40 mg (69 μmol, 32%).

$C_{38}H_{34}N_2O_4$ (582.7)

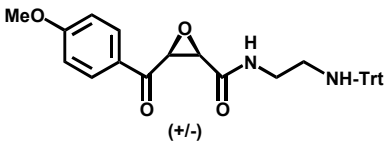
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 583.2519 gef.: 583.2583.

m/z (%): 583 (2); 505 (1); 457 (1); 379 (1); 243 (100); 165 (11).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.15 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.28 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.96 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.41 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.90 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH_{2a} Bn); 4.98 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH_{2b} Bn); 6.74 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH); 7.12-7.51 (m, 24H, CH Arom).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 40.2 (C<u>H</u>$_2$NH); 43.0 (C<u>H</u>$_2$NH); 56.3 (CH Epox); 58.1 (CH Epox); 70.4 (CH_2 Bn); 71.0 (<u>C</u>(Ph)$_3$); 113.7; 121.7; 126.5; 127.9; 128.1; 128.4; 129.0; 130.4 (8*CH); 136.0 (C_q Ph); 136.4 (C_q Ph); 146.1 (C_q Trt); 159.4 (<u>C</u>$_q$-OCH_2); 165.O (CONHR); 191.5 (COR).

3-(4-Methoxy-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45e)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 1-Lithiio-4-methoxy-benzen (Darstellung *in situ* aus 128 mg (545 μmol) 1-Iodo-4-methoxy-benzen und 222 μl (600 μmol) *n*-Butyllithium) mit 100 mg (218 μmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 3:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.15 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).

Ausbeute: 60.2 mg (199 μmol, 55%).

$C_{32}H_{30}N_2O_4$ (506.6)

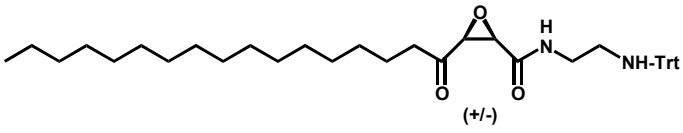
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 507.2206 gef.: 507.2263.

m/z (%): 507 (5); 457 (2); 429 (4); 379 (3); 243 (100); 165 (19).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.13 (m, 2H, C$\underline{H}_2$NH); 3.20 (m, 1H, C$\underline{H}_{2a}$NH); 3.32 (m, 1H, C$\underline{H}_{2b}$NH); 3.86 (s, 3H, OCH_3); 3.92 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH Epox); 4.40 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH Epox); 6.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH); 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Anisol); 7.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH Trt); 7.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 6H, CH Trt); 7.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 6H, CH Trt); 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Anisol).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 40.2 (CH_2NH); 43.1 (CH_2NH); 55.8; 56.2 (CH Epox, OCH_3); 57.9 (CH Epox); 71.0 ($\underline{C}(Ph)_3$); 114.5 (CH Anisol); 126.5; 127.9; 128.1; 128.9 (3*CH Trt, 1*CH Anisol); 131.0 ($\underline{C}_q$-OMe Anisol); 146.1 (C_q Trt); 164.8 (CONHR); 165.2 (CONHR); 189.8 (COR).

3-Heptadecanoyl-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (45f)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 14 werden 1-

Hexadecyllithium (Darstellung *in situ* aus 192 mg (545 μmol) 1-Iodohexadecan und 353 μl (600 μmol) *t*-Butyllithium) mit 100 mg (218 μmol) Oxiran-2,3-dicarbonsäure 2-(methoxy-methyl-amid) 3-{[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid} (**44**) umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromato-graphischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

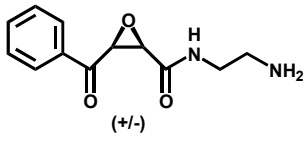
Gelbliches Öl
R_f-Wert: 0.60 (*c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 28 mg (45 μmol, 21%).
$C_{41}H_{56}N_2O_3$ (624.9).
HRMS-FAB(3-NBA, $[M-H]^-$) ber.: 623.4291 gef.: 623.4234.
m/z (%): 623 (20); 30 (35); 151 (55).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.82 (t, *J* = 6.8 , 3H, ω-CH_3 hd); 1.18 (m, 30H, CH_2 hd); 2.20 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.27 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.77 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.04 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 7.09-7.45 (m, 15H, CH Trt).

Deblockierung der Cerulenin-Bibliothek

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 15:
Zu einer Lösung von 1 mmol der *N*-tritylierten Ceruleninanaloga in 10 ml Methylenchlorid wird 0.1 ml Trifluoressigsäure getropft. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird 1 ml Methanol zugefügt und das Lösungsmittel durch mehrfache Coevaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v] bis Methanol) erhalten.

3-Benzoyl-oxiran-2-carbon (2-amino-ethyl)-amid (46a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 30 mg (63 μmol) 3-Benzoyl-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (**45a**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol)

Ausbeute: 10 mg (43 μmol, 68%).

$C_{12}H_{14}N_2O_3$ (234.3)

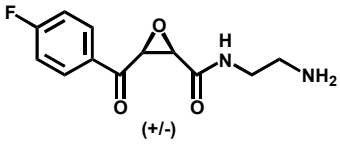
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 257.0902 gef.: 257.0886

m/z (%): 257 (10); 235 (46); 176 (38).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.87-2.95 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.08-3.15 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.98 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.46 (d, *J* =5.1 Hz, 1H, CH Epox); 7.32-7.38 (m, 2H, CH Ph); 7.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH Ph); 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH Ph).

125.8 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 36.8 (CH_2NH); 39.4 (CH_2NH); 55.7 (CH Epox); 60.8 (CH Epox); 127.1; 128.7; 129.3 (CH Ph); 135.2 (C_q Ph); 167.0 (CONHR); 192.9 (COR).

3-(4-Fluoro-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure (2-aminoethyl)-amid (46b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 33 mg (67 μmmol) 3-(4-Fluoro-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (**45b**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol).

Ausbeute: 8 mg (33 μmol, 49%).

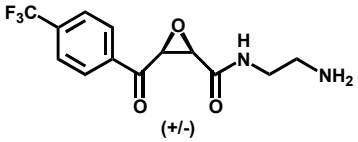
$C_{12}H_{13}FN_2O_3$ (252.2)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 252.0910 gef.: 252.1015

m/z (%): 252 (2); 203 (45); 185 (25); 76 (45).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 3.22 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.89 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 4.01 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH Epox); 4.75 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH Epox); 7.00 (m, 2H, CH Arom); 8.14 (m, 2 H, CH Arom).

3-(4-Trifluoromethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure (2-aminoethyl)-amid (46c)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 40 mg (74 μmol) 3-(4-Trifluoromethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (**45c**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol).

Ausbeute: 21 mg (70 μmol, 96%).

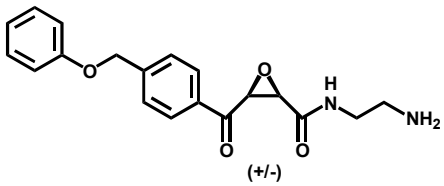
$C_{13}H_{13}F_3N_2O_3$ (302.2)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 325.0776 gef.: 325.0796

m/z (%): 325 (50); 303 (45); 285 (25); 176 (45).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 3.02 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.25 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.78 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH Epox); 3.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH Epox); 7.61-7.77 (m, 4 H, CH Arom).

3-(4-Phenoxymethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure (2-aminoethyl)-amid (46d)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 35 mg (61 μmol) 3-(4-Phenoxymethyl-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure[2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (**45d**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol).

Ausbeute: 20 mg (59 μmol, 97%).

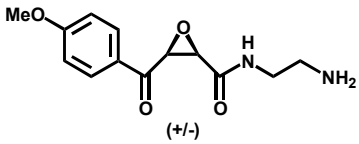
$C_{19}H_{20}N_2O_4$ (340.4)

HRMS-FAB (3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 341.1423 gef.: 341.1477.

m/z (%): 363 (6); 341 (18); 329 (8); 243 (35); 92 (40).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 3.02 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.14 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$NH); 4.04 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, CH Epox); 4.32 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, CH Epox); 4.90-5.04 (m, 2H, CH_2 Bn); 6.89-7.58 (m, 9H, CH Arom).

3-(4-Methoxy-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure (2-aminoethyl)-amid (46e)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 55 mg (109 μmol) 3-(4-Methoxy-benzoyl)-oxiran-2-carbonsäure [2-(trityl-amino)-ethyl]-amid (**45e**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol).

Ausbeute: 15 mg (60 μmol, 52%).

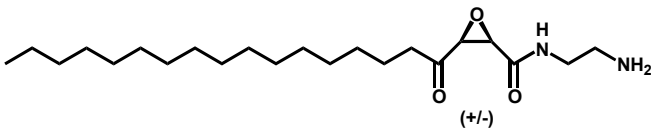
$C_{13}H_{16}N_2O_4$ (264.3)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 265.1110 gef.: 265.1180

m/z (%): 265 (3); 176 (8); 121 (10).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 2.93 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.40 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.86 (s, 3H, OCH_3); 3.98 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH Epox); 4.67 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH Epox); 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Anisol); 8.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH Anisol).

3-Heptadecanoyl-oxiran-2-carbonsäure (2-aminoethyl)-amid (46f)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 15 werden 20 mg (32 μmmol) 3-Heptadecanoyl-oxiran-2-carbonsäure [2-(tritylamino)-ethyl]-amid (**46f**) umgesetzt.

Gelbliches Öl

R_f-Wert: 0.20 (Methanol).

Ausbeute: 7.5 mg (20 μmol, 61%).

$C_{22}H_{42}N_2O_3$ (382.6)

HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 383.3195 gef.: 383.3289.

m/z (%): 383 (4); 243 (10); 176 (50).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.82 (t, *J* = 6.8 , 3H, ω-CH_3 hd); 1.18 (m, 30H, CH_2 hd); 2.90 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.12 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$NH); 3.82 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox); 4.23 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH Epox).

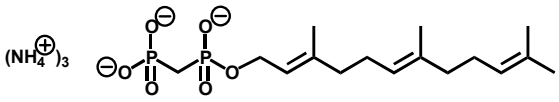
6.4 Versuche zu Kapitel 4.3: Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1: Hydrolysestabile Isoprenoidpyrophosphat-Analoga

Isoprenylphosphonylmethylphosphonate 49

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 16:
Zu einer Lösung von 1.22 mmol Tris(tetrabutylammonium) hydrogen methyldiphosphat (**48**)[253] in abs. Acetonitril (5 ml) werden 0.42 mmol des all-*trans*-Isoprenylbromides unter Argon-Atmosphäre getropft. Anschließend wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 5 ml 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer aufgenommen, auf eine 2x8 cm Dowex AG50x8 Ionenaustauschersäule gegeben (NH_4^+ Form) und mit 25 mM Ammoniumbicarbonat Puffer eluiert. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt durch eine flashchromatographische Reinigung an RP 18 Kieselgel erhalten (stufenweiser Elutionsgradient: 100% 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer, 1:1 [v;v] 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer/Acetonitril; 100% Acetonitril).

Farnesylphosphonylmethylphoshonat (Far-PCP) (49a)[248]



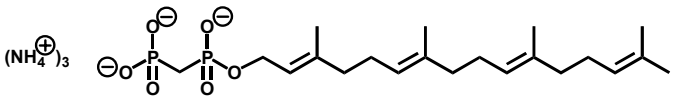
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 16 werden 1096 mg (1.22 mmol) Tris(tetrabutylammonium) hydrogen methyl-diphosphat (**48**)[253] (1.22 mmol) und 100 mg (415 μmol) *trans-trans*-Farnesylbromid umgesetzt.

Gelbliches, hygroskopisches Pulver
Ausbeute: 113 mg (63%, 262 μmol).
$C_{16}H_{39}N_3O_6P_2$ (431.5)
500 MHz ^{1}H-NMR (D_2O) δ = 1.44 (s, 3H, CH_3 Far); 1.46 (s, 3H, CH_3 Far); 1.51 (s, 3H, CH_3 Far); 1.57 (s, 3H, CH_3 Far); 1.75-2.05 (m, 8H, 4*CH_2 Far), 2.10 (t, *J* = 19.7 Hz, 2H, P-CH_2-P), 4.31 (t br, 2H, CH_2-O), 4.97-5.10 (m, 2H, CH Far), 5.25 (t br, 1H).

162 MHz ^{31}P-NMR (D_2O): δ = 17.20 (br s, 1P), 19.28 (br s, 1P).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[248]

Geranylgeraniolphosphonylmethylphoshonat (GerGer-PCP) (49b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 16 werden 1.23 g (1.36 mmol) Tris(tetrabutyl-ammonium)hydrogenmethyldiphosphat (**48**)[253] (1.22 mmol) und 60 mg (194 μmol) All-*trans*-Geranylgeranylbromid[249-251] umgesetzt.

Gelbliches, hygroskopisches Pulver
Ausbeute: 59 mg (61%, 118 μmol).
$C_{21}H_{47}N_3O_6P_2$ (499.6)

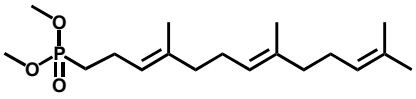
500 MHz ^{1}H-NMR (D_2O) δ = 1.46 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.48 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.53 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.58 (s, 3H, CH_3 GerGer); 2.08 (t, *J* = 19.7 Hz, 2H, P-CH_2-P), 1.83-1.95 (m, 12H, 6*CH_2 GerGer), 4.32 (t br, 2H, CH_2-O), 4.97-5.10 (m, 3H, 3*CH GerGer), 5.27 (t br, 1H, CH GerGer).

162 MHz ^{31}P-NMR (D_2O): δ = 16.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 1P), 19.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1P).

Dimethyl[isoprenyl]methylphosphonate 50

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 17:
Zu einer Lösung von 1.00 mmol Dimethylmethylphosphonat in 30 ml THF werden bei -78°C unter Argon-Atmosphäre 1.10 mmol *n*-Butyllithium (2.7 M in *n*-Hexan) getropft. Die Lösung wird 30 Minuten bei -78°C gerührt und anschließend 1 mmol All-*trans*-Isoprenylbromid zugetropft . Die Lösung wird zwei Stunden bei -78°C gerührt und danach mit 5 ml 1N Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Danach nimmt man die Lösung in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Wasser auf und wäscht die wässrige Phase zweimal mit Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

Dimethyl[4,8,12-trimethyl-3,7,11-tridecatrienyl]phosphonat (Far-CP(OMe)$_2$) (50a)[254-256]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 werden 435 mg (3.50 mmol) Dimethylmethylphosphonat mit 1.30 ml *n*-Butyllithium und 1.00 g (3.50 mmol) Farnesylbromid umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:4 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:9 [v;v]) erhalten.

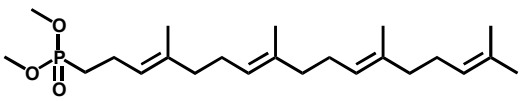
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.40 (Methylenchlorid/ Methanol 20:1 [v;v])
Ausbeute: 1.07 mg (3.26 mmol, 93%).
$C_{18}H_{33}O_3P$ (328.4)

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.34 (s, 6H, CH_3 Far); 1.35 (s, 3H, CH_3 Far); 1.42 (s, 3H, CH_3 Far); 1.45-1.55 (m, 2H, C$\underline{H}_2$CH$_2$P); 1.68-1.85 (m, 8H, CH_2 Far); 1.98-2.08 (m, 2H, C$\underline{H}_2$P); 3.48 (d, *J* = 10.8, 6H, OCH_3); 4.80-4.90 (m, 3H, CH).

100.7 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 15.9 (2*CH_3 Far); 17.6 (CH_3 Far); 20.8 (CH_2P); 24.2 (CH_2CH_2P); 25.6 (CH_3 Far); 26.4; 26.7; 39.5; 39.7 (4*CH_2 Far); 52.1 (d, J_{cp}= 10.8, 2*OCH_3); 122.9 (d, J_{cp}= 16.9, CH); 124.0; 124.3 (2*CH); 131.0; 134.9 (2*C_q).; 136.4 (d, J_{cp}= 1.8, C_q).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[254-256]

Dimethyl[4,8,12,16-Tetramethylheptadeca-3,7,11,15-tetraenyl]phosphonat (GerGer-CP(OMe)$_2$) (50b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 17 werden 93 µl (874 µmol) Dimethylmethylphosphonat mit 387 µl (1.05 mmol) *n*-Butyllithium und 244 mg (688 µmol) Geranylgeranylbromid[249-251] umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel

(Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 10:1 [v;v] bis *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]) erhalten.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.10 (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 1:1 [v;v]).
Ausbeute: 142 mg (358 μmol, 52%).
$C_{23}H_{41}O_3P$ (396.5)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 397.2793 gef.: 397.2905
m/z (%):419 (20); 397 (40); 329 (10); 261 (30); 82 (55).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.43 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.46 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.48 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.49 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.59 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.87-2.03 (m, 14H, 7*CH_2 GerGer); 2.16-2.24 (m, 2H, C$\underline{H_2}$P); 3.39 (d, *J* = 10.8, 6H, OCH_3); 5.02-5.11 (m, 4H, CH).

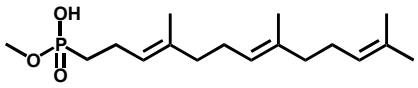
100.7 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 15.8; 15.9; 17.5 (4*CH_3 Far); 21.2 (d, J_{cp}= 4.6, CH_2P); 24.7 (CH_2CH_2P); 25.6 (CH_3 GerGer); 26.7; 26.9; 27.0; 39.8; 39.9; 40.0 (6*CH_2 GerGer); 51.5 (d, J_{cp}= 6.1, 2*OCH_3); 123.6 (d, J_{cp}= 16.5, CH); 124.4; 124.5; 124.7 (3*CH); 130.8; 134.7; 134.8 (C_q); 135.9 (d, J_{cp}= 1.6, C_q).

162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 35.7 (s, 1P).

Monomethyl[isoprenyl]methylphosphonsäuren 51

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 18):
Zu einer Lösung von 6.76 mmol des Dimethyl [isoprenyl] methylphosphonats in 10 ml Methanol/ Wasser 1:1 [v;v] werden 68.2 mmol Kaliumhydroxid gegeben.
Die Lösung wird 2 h bei 65-75°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 40 ml Methylenchlorid/Wasser 1:1 [v;v] aufgenommen und durch Zugabe von 10.0 g Kaliumhydrogensulfat angesäuert. Nach 5 Minuten Rühren werden 100 ml Methylenchlorid zugegeben und die Lösung je dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Monomethyl(4,8,12-Trimethyltrideca-3,7,11-trienyl)-phosphonsäure (Far-CP(OMe)) (51a)[254]



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 18 werden 2.22 g (6.76 mmol) Far-CP(OMe)$_2$ (**50a**) mit 4.40 g (68.2 mmol) Kaliumhydroxid umgesetzt.

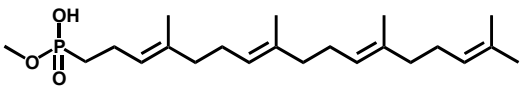
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.05 (Essigsäureethylester / Methanol 10:1 [v;v]).
Ausbeute: 2.12 g (6.76 mmol, quant.).
$C_{17}H_{31}O_3P$ (314.4)

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.56 (s, 6H, CH_3 Far); 1.59 (s, 3H, CH_3 Far); 1.65 (s, 3H, CH_3 Far); 1.70-1.80 (m, 2H, C$\underline{H_2}$CH$_2$P); 1.91-2.09 (m, 8H, 4*CH_2 Far); 2.23-2.33 (m, 2H, C$\underline{H_2}$P); 3.69 (d, *J* = 10.9, 3H, OCH_3); 5.03-5.16 (m, 3H, 3*CH Far).

162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 36.1 (s, 1P).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[254]

Monomethyl(4,8,12,16-Tetramethylheptadeca-3,7,11,15-tetraenyl)-phosphonsäure (GerGer-CP(OMe)) (51b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 18 werden 130 mg (328 μmol) GerGer-CP(OMe)$_2$ (**50b**) mit 214 mg (3.31 mmol) Kaliumhydroxid umgesetzt.

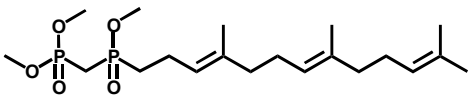
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.05 (Essigsäureethylester / Methanol 10:1 [v;v]).
Ausbeute: 125 mg (327 μmol, quant.).
$C_{22}H_{39}O_3P$ (382.5)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+Na]^+$) ber.: 405.2535 gef.: 405.2491.
m/z (%):405 (51); 202 (10); 70 (100).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.52 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.55 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.56 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.56 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.64 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.72-1.84 (m, 2H, C$\underline{H}_2$CH_2P); 1.98-2.15 (m, 12H, 6*CH_2 GerGer); 2.38-2.52 (m, 2H, C$\underline{H}_2$P); 3.56 (d, *J* = 10.7, 3H, OCH_3); 5.14-5.26 (m, 4H, CH GerGer).

100.7 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 15.9; 16.0 (4*CH_3 GerGer); 21.6 (d, J_{cp}= 3.8, CH_2P); 25.7 (CH_3 GerGer); 26.9; 27.0; 40.0; 40.1 (7*CH_2); 51.1 (d, J_{cp}= 6.5, 2*OCH_3); 124.1 (d, J_{cp}= 18.1, CH); 124.6; 124.6; 124.8 (3*CH); 130.9; 134.8; 134.9 (C_q); 135.8 (d, J_{cp}= 1.5, C_q).

162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 36.4 (s, 1P).

[Methoxy-(4,8,12-trimethyl-trideca-3,7,11-trienyl)-phosphinoylmethyl]-phosphonsäuredimethylester (Far-CPCP(OMe)$_3$) (52a)[254]



Zu einer Lösung von 2.05 g (6.50 mmol) Far-CP(OMe) (**51a**) in 20.0 ml Benzol und 2 Tropfen Dimethylformamid werden unter Argon-Atmosphäre 1.70 ml (19.5 mmol) Oxalylchlorid getropft. Die Lösung wird 2.5 Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das als orange Öl erhaltene Monomethyl [isoprenyl]methylphosphonsäurechlorid wird ohne Aufreinigung verwendet.

Zu einer Lösung von 1.80 g (14.5 mmol) Dimethylmethylphosphonat in 30 ml THF werden bei -78°C unter Argon-Atmosphäre 5.20 ml (14.0 mmol) *n*-Butyllithium (2.7 M in *n*-Hexan) getropft. Die Lösung wird 30 Minuten bei -78°C gerührt und das Monomethyl[isoprenyl]methylphosphonsäurechlorid in 15 ml THF zugetropft. Die Lösung wird zwei Stunden bei -78°C gerührt und danach mit 5 ml 1N Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Anschließend nimmt man die Lösung in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Wasser auf und wäscht die wässrige Phase zweimal mit Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/ Methanol 1:1 [v;v]) erhalten.

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.20 (Essigsäureethylester / Methanol 10:1 [v;v])
Ausbeute: 1.97 g (4.68 mmol, 72%).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.54 (s, 6H, CH_3 Far); 1.59 (s, 3H, CH_3 Far); 1.63 (s, 3H, CH_3 Far); 1.89-2.05 (m, 10H, 5*CH_2 Far); 2.20-2.32 (m, 2H, CH_2P); 2.31-2.41 (dd, $^2J_{P,H}$= 16.8 Hz, $^2J_{P,H'}$= 16.4 Hz, $^2J_{P',H}$ = 20.7 Hz, $^2J_{P',H'}$= 20.3 Hz, 2H, nichtäq. P-CH(H´)-P); 3.73 (d, *J* = 11.1, 3H, OCH_3); 3.76 (d, *J* = 11.3, 6H, OCH_3); 5.05 (t, *J* = 5.5, 2H, CH Far); 5.10 (t, *J* = 6.2, 1H, CH Far).

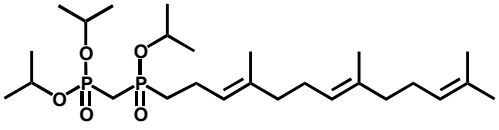
162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 23.9 (d, *J* = 4.5, 1P); 49.3 (d, *J* = 4.5, 1P).

Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[254]

Triisopropyl[{(isoprenylmethyl)phosphinyl}methyl]-phosphonate 54

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 19:
Zu einer Lösung von 0.88 mmol (Isopropoxymethylphosphinoylmethyl)-phosphonsäurediisopropylester (**53**)[259] in 15 ml THF werden bei -78°C unter Argon-Atmosphäre 2.20 mmol *t*-Butyllithium (1.7M in *n*-Pentan) getropft. Die Lösung wird 30 Minuten bei -78°C gerührt und anschließend 0.88 mmol Isoprenylbromid zugetropft . Die Lösung wird zwei Stunden bei -78°C gerührt und danach mit 5 ml 1N Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Danach nimmt man die Lösung in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Wasser auf und wäscht die wässrige Phase zweimal mit Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten.

[Isopropyloxy-(4,8,12-trimethyl-trideca-3,7,11-trienyl)-phosphinoylmethyl]-phosphonsäurediisopropylester (Far-CPCP(O*i*Pr)$_3$) (54a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 19 werden 264 mg (0.88 mmol) (Isopropoxy-

methylphosphinoylmethyl)phosphonsäurediiso-propylester (**53**)[259] mit 1.30 ml (2.20 mmol) *t*-Butyllithium und 0.25 g (0.86 mmol) Farnesylbromid umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/ Methanol 1:1 [v;v]).

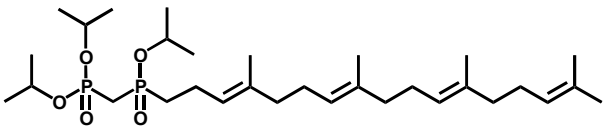
Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.5 (Essigsäureethylester / Methanol 10:1 [v;v]).
Ausbeute: 434 mg (0.86 mol, 98%).
$C_{26}H_{50}O_5P_2$ (504.6)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 505.3133 gef.: 505.3195.
m/z (%):505 (5); 301 (100); 175 (80); 70 (75).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.18-1.21 (m, 18H, 6*CH_3 *i*Pr); 1.44 (s, 3H, CH_3 Far); 1.52 (s, 3H, CH_3 Far); 1.54 (s, 3H, CH_3 Far); 1.57 (s, 3H, CH_3 Far); 1.80-2.00 (m, 12H, 6*CH_2 Far); 2.17-2.27 (dd, $^2J_{P,H}$= 18.0 Hz, $^2J_{P,H'}$= 17.6 Hz, $^2J_{P',H}$ = 20.3 Hz, $^2J_{P',H'}$= 20.7 Hz, 2H, nichtäq. P-CH(H´)-P); 4.60 (m, 3H, CH *i*Pr); 4.93 (t, *J* = 5.5, 2H, 2*CH Far); 5.37 (t, *J* = 6.2, 1H, CH Far).

162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 19.0 (d, *J* = 3.0, 1P); 44.4 (d, *J* = 3.0, 1P).

100.7 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 16.2 (d, *J* = 4.6 Hz); 16.4; 18.0; 26.0 (4*CH_3 Far);24.2-24.7(m, CH_3 *i*Pr); 31.1 (dd, *J* = 134.9 Hz, *J* = 82.3 Hz, PCH_2P); 26.4; 27.0; 29.8; 39.8; 40.0 (5*CH_2 Far); 69.9 (d, *J* = 6.5 Hz, CH *i*Pr); 71.3 (d, *J* = 6.9 Hz, CH *i*Pr); 71.5 (d, *J* = 6.5 Hz, CH *i*Pr); 120.7; 123.4; 124.4 (CH Far); 131.2; 135.5; 143.4 (C_q Far).

[Isopropyloxy-(4,8,12,16-tetramethyl-heptadeca-3,7,11,15-tetraenyl)-phosphinoylmethyl]phosphonsäurediisopropylester (GerGer-CPCP(O*i*Pr)$_3$) (54b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 19 werden 360 mg (1.21 mmol) (Isopropoxymethylphosphinoylmethyl)-phosphonsäurediisopropylester (**53**)[259] mit 1.75 ml (2.96 mmol) *t*-Butyllithium und

430 mg (1.21 mmol) Geranylgeranylbromid umgesetzt. Das Produkt wird nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten. (Elutionsgradient: *c*-Hexan/ Essigsäureethylester 5:1 [v;v] bis Essigsäureethylester/ Methanol 1:1 [v;v]).

Farbloses Öl
R_f-Wert: 0.75 (Essigsäureethylester / Methanol 1:1 [v;v])
Ausbeute: 419 mg (0.73 mmol, 61%).
$C_{31}H_{58}O_5P_2$ (572.7)
HRMS-FAB(3-NBA, $[M+H]^+$) ber.: 573.3759 gef.: 573.3825.
m/z (%): 595 (30); 573 (10); 407 (5); 323 (100); 175 (80); 70 (90).

400 MHz ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.17 (s, 18H, 6*CH_3 *i*Pr); 1.41 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.48 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.49 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.52 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.53 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.68-1.96 (m, 16 H, 8*CH_2 GerGer); 2.15-2.26 (dd, $^2J_{P,H}$= 18.2 Hz, $^2J_{P,H'}$= 17.6 Hz, $^2J_{P',H}$ = 20.5 Hz, $^2J_{P',H'}$= 20.7 Hz, 2H, nichtäq. P-CH(H´)-P); 4.35-4.59 (m, 3H, OC<u>H</u>CH_3); 4.91 (m, 4H, 4*CH GerGer).

162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 19.1 (br s, 1P); 44.5 (br s, 1P).

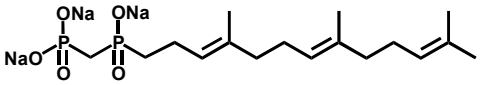
100.7 MHz ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ = 16.2; 16.3; 17.2; 17.9 (4*CH_3 GerGer); 24.1-24.7 (6*CH_3 iPr); 25.9 (CH_3 GerGer); 27.0 (CH_2 GerGer); 31.0 (d, J = 134.9; PCH_2P); 39.9 (7*CH_2 GerGer); 77.2; 77.5; 77.9 (CH *i*Pr); 124.1-124.6 (4*CH GerGer); 131.1 (d, J = 2.7 Hz); 134.8; 135.7; 148.3 (4*C_q).

Trinatrium{(isoprenylmethyl)phosphinyl}methylphosphonate 55

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 20:
Zu einer Lösung von 0.44 mmol des Trimethyl [{(isoprenylmethyl)phosphinyl}methyl]-phosphonates (**54**) und 0.66 mmol 2,4,6-Collidin in 1 ml abs. Methylenchlorid werden unter Argon-Atmosphäre 1.98 mmol Bromotrimethylsilan getropft. Die Lösung wird 6 Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Öl wird in 2 ml 1N Natronlauge aufgenommen und 15 min gerührt. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt durch eine flashchromatographische Reinigung an RP 18 Kieselgel erhalten (stufenweiser Elutionsgradient: 100% 25 mM

Ammoniumbicarbonat-Puffer, 1:1 [v;v] 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer/Acetonitril; 100% Acetonitril).

Trinatrium [Hydroxy-(4,8,12-trimethyl-trideca-3,7,11-trienyl)phosphinoyl methyl] phosphonat (Far-CPCP) (55a)



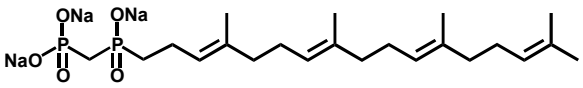
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 20 werden 99 mg (197 mmol) Far-CPCP(O*i*Pr)$_3$ (**54a**), 36 mg (296 mmol) 2,4,6-Collidin und 136 mg (0.89 mmol) Bromotrimethylsilan umgesetzt.

Farbloses, hygroskopisches Pulver
Ausbeute: 65 mg (0.14 mmol, 72%).
$C_{17}H_{29}O_5P_2Na_3$ (444.3)
HRMS-FAB(-) ber.: 377.1725 gef.: 377.1641
(Triethanolamin, $M(C_{17}H_{32}O_5P_2)-H)^-$
m/z (%):399 (1); 377 (2);297 (33); 175 (8).

400 MHz ^{1}H-NMR (D_2O): δ = 1.52 (s, 6H, 2*CH_3 Far); 1.53 (s, 3H, CH_3 Far); 1.59 (s, 3H, CH_3 Far); 1.89-2.09 (m, 12H, 6*CH_2 Far); 2.15 (m, 2H, PCH_2P); 5.03-5.13 (m, 3H, CH).

162.1 MHz ^{31}P-NMR (D_20): δ = 17.6 (m, 1P); 38.4 (m, 1P).
Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Werten überein.[254]

Trinatrium [Hydroxy-(4,8,12,16-tetramethyl-heptadeca-3,7,11,15-tetraenyl)-phosphinoylmethyl]-phosphonat (GerGer-CPCP) (55b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 20 werden 100 mg (175 μmol) GerGer-CPCP(O*i*Pr)$_3$ (**54b**), 32 mg (262 μmol) 2,4,6-Collidin und 120 mg (788 μmol) Bromotrimethylsilan umgesetzt.

Farbloses, hygroskopisches Pulver

Ausbeute: 61 mg (119 μmol, 68%).

$C_{22}H_{37}Na_3O_5P_2$ (512.4)

LRMS-FAB(-) ber.: 445.235 gef.: 445.229

(Triethanolamin, $M(C_{22}H_{40}O_5P_2)$-$H)^-$.

m/z (%): 446 (2), 445 (1), 363 (5).

400 MHz ^{1}H-NMR (MeOD): δ = 1.58 (s, 6H, 2*CH_3 GerGer); 1.59 (s, 6H, 2*CH_3 GerGer); 1.68 (s, 3H, CH_3 GerGer); 1.80-2.16 (m, 18 H, 9*CH_2 GerGer); 5.12 (m, 4H, 4*CH GerGer).

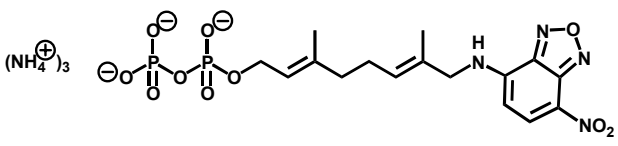
162.1 MHz ^{31}P-NMR ($CDCl_3$): δ = 14.2 (br s, 1P); 33.7 (br s, 1P).

6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2: Fluoreszenzmarkierte Isoprenoidpyrophosphat-Analoga 56

Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 21:

Zu einer Lösung von 1.23 mmol Tris(tetra-*N*-butylammonium) pyrophosphat[253] in 8 ml abs. Acetonitril werden 0.19 mmol ω-NBD-Isoprenyl-Chlorid **18** getropft. Anschließend wird zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 5 ml 1:19 [v;v] *i*-Propanol/ 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer aufgenommen, auf eine 2x8 cm Dowex AG50x8 Ionenaustauschersäule gegeben (NH_4^+ Form) und mit 1:19 [v;v] *i*-Propanol/ 25 mM Ammoniumbicarbonat eluiert. Nach Gefriertrocknung wird das Produkt durch eine flashchromatographische Reinigung an RP 18 Kieselgel erhalten (stufenweiser Elutionsgradient: 100% 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer, 1:1 [v;v] 25 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer/Acetonitril; 100% Acetonitril).

Tris-Ammonium{3,7-Dimethyl-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-octa-2,6-dien-1}pyrophosphat (NBD-NH-Ger-OPP) (56a)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 21 werden 1.76 g (1.85 mmol) Tris(tetra-*N*-butylammonium) pyrophosphat[253] und 100 mg (284 μmol) NBD-NH-Ger-Cl (**18a**) umgesetzt.

Oranges, hygroskopisches Pulver

Ausbeute: 106 mg (196 μmol, 69%).

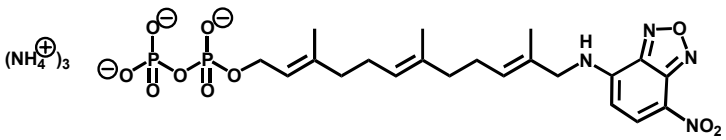
$C_{16}H_{31}N_7O_{10}P_2$ (543.4).

HRMS- FAB(-):(3-NBA, M($C_{16}H_{22}N_4O_{10}P_2$)-H^+) ber.: 491.0811 gef.: 491.0698.

200 MHz ^{1}H-NMR (D_2O): δ = 1.52 (s, 6H, 2*CH_3 Far); 1.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-O); 2.04 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.0 Hz, 2H, NH-CH_2-C(CH_3)-CH-C<u>H</u>$_2$); 3.90 (s, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.29 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-OH); 5.26 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C<u>H</u>-CH_2-OH); 5.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH-CH_2-C(CH_3)-C<u>H</u>); 6.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

200 MHz ^{31}P-NMR (D_2O): δ = -9.50 (d, 1P), -7.90 (d, 1P).

Trisammonium{3,7,11-Trimethyl-12-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazo-4-ylamino)-dodeca-2,6,10-trien-1}pyrophosphat (NBD-NH-Far-OPP) (56b)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 21 werden 1.17 g (1.23 mmol) Tris(tetra-*N*-butylammonium)pyrophosphat[253] und 79 mg (186 μmol) NBD-NH-Far-Cl (**18b**) umgesetzt.

Oranges, hygroskopisches Pulver

Ausbeute: 62 mg (115 μmol, 61%).

$C_{21}H_{39}N_7O_{10}P_2$ (611.5).

HRMS-FAB(+):(3-NBA, M($C_{21}H_{30}N_4O_{10}P_2$)+NH_4^+) ber.: 578.1781 gef.: 578.1921.

200 MHz ^{1}H-NMR (D_2O): δ = 1.26 (br, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-CH_2-OH); 1.41 (br, 3H, C(C<u>H</u>$_3$)-CH-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 1.46 (br, 3H, NH-CH_2-C(C<u>H</u>$_3$)); 1.68-1.87 (m, 8H, CH_2 Far); 3.87 (m, 2H, NH-C<u>H</u>$_2$); 4.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, C<u>H</u>$_2$-OH); 5.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C<u>H</u>-$(CH_2)_2$-C(CH_3)-CH-CH_2-OH); 5.13-5.25 (m, 2H, C<u>H</u>-CH_2-OH, NH-

CH_2-C(CH_3)-C<u>H</u>); 6.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom); 8.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH Arom).

200 MHz ^{31}P-NMR (D_2O): δ = -9.20 (m, 1P), -5.40 (m, 1P).

7 Literaturverzeichnis

[1.] S. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1992,** *61*, 355-386.

[2.] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989,** *57*, 1167-1177.

[3.] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000,** *39*, 4193-4214.

[4.] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987,** *56*, 779-827.

[5.] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989,** *49*, 4682-4689.

[6.] M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993,** *366*, 643-654.

[7.] F. McCormick, *Nature* **1993,** *363*, 15-16.

[8.] J. L. Bos, *EMBO J.* **1998,** *17*, 6776-6782.

[9.] G. J. Pronk, J. L. Bos, *Biochim. Biophys. Act.* **1994,** *1198*, 131-147.

[10.] L. Buday, *Biochim. Biophys. Act.* **1999,** *1422*, 187-204.

[11.] A. Minden, A. Lin, M. McMahon, C. Langecarter, B. Derijard, R. J. Davis, G. L. Johnson, M. Karin, *Science* **1994,** *266*, 1719-1723.

[12.] R. M. F. Wolthuis, B. Bauer, L. J. vantVeer, A. M. M. deVriesSmits, R. H. Cool, M. Spaargaren, A. Wittinghofer, B. M. T. Burgering, J. L. Bos, *Oncogene* **1996,** *13*, 353-362.

[13.] S. N. Peterson, L. Trabalzini, T. R. Brtva, T. Fischer, D. L. Altschuler, P. Martelli, E. G. Lapetina, C. J. Der, G. C. White, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 29903-29908.

[14.] R. M. F. Wolthuis, J. L. Bos, *Curr. Opin. in Gen. & Develop.* **1999,** *9*, 112-117.

[15.] P. T. Hawkins, A. Eguinoa, R. G. Qiu, D. Stokoe, F. T. Cooke, R. Walters, S. Wennstrom, L. Claessonwelsh, T. Evans, M. Symons, L. Stephens, *Curr. Biol.* **1995,** *5*, 393-403.

[16.] C. Hagemann, U. R. Rapp, *Exp.Cell Res.* **1999,** *253*, 34-46.

[17.] C. D. Hu, K. Kariya, M. Tamada, K. Akasaka, M. Shirouzu, S. Yokoyama, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 30274-30277.

[18.] C. Block, A. Wittinghofer, *Structure* **1995,** *3*, 1281-1284.

[19.] S. L. Campbell, R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, G. J. Clark, C. J. Der, *Oncogene* **1998,** *17*, 1395-1413.

[20.] T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997,** *278*, 2075-2080.

[21.] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Trends Biochem.Sci.* **1998,** *23*, 257-262.

[22.] J. L. Bos, *Biochim. Biophys. Act.* **1997,** *1333*, 19-31.

[23.] D. J. G. Mackay, A. HALL, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 20685-20688.

[24.] F. Schimmoller, I. Simon, S. R. Pfeffer, *J. Biol.Chem.* **1998,** *273*, 22161-22164.

[25.] J. Moss, M. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 21431-21434.

[26.] M. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 22857-22860.

[27.] A. I. Magee, L. Guitierrez, I. A. McKay, C. J. Marshall, A. Hall, *EMBO J.* **1987,** *6*, 3353-3357.

[28.] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 23594-23600.

[29.] M. H. GELB, *Science* **1997,** *275*, 1750-1751.

[30.] H. W. Park, S. R. Boduluri, J. F. Moomaw, P. J. Casey, L. S. Beese, *Science* **1997,** *275*, 1800-1804.

[31.] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996,** *65* 241-269.

[32.] M. D. Resh, *Cellular Signalling* **1996,** *8*, 403-412.

[33.] M. C. Seabra, *Cellular Signalling* **1998,** *10*, 167-172.

[34.] P. Dunten, U. Kammlott, R. Crowther, D. Weber, R. Palermo, J. Birktoft, *Biochemistry* **1998,** *37*, 7907-7912.

[35.] M. C. Seabra, Y. Reiss, P. J. Casey, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Cell* **1991,** *65*, 429-434.

[36.] K. Yokoyama, K. Zimmerman, J. Scholten, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 3944-3952.

[37.] J. F. Hancock, K. Cadwallader, H. Paterson, C. J. Marshall, *EMBO J.* **1991,** *10*, 4033-4039.

[38.] D. Stokoe, S. G. MacDonald, K. Cadwallader, M. Symons, J. F. Hancock, *Science* **1994,** *264*, 1463-1467.

[39.] S. J. Leevers, H. F. Paterson, C. J. Marshall, *Nature* **1994,** *369*, 411-414.

[40.] A. Hall, *Science* **1994,** *264* 1413-1414.

[41.] M. A. Booden, T. L. Baker, P. A. Solski, C. J. Der, S. G. Punke, J. E. Buss, *J. Biol. Chem.* **1999,** *274*, 1423-1431.

[42.] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123*, 1023-1035.

[43.] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000,** *403*, 223-226.

[44.] T. Dudler, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1997,** *36*, 12434-12441.

[45.] P. McGeady, E. Porfiri, M. H. GELB, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997,** *7*, 145-150.

[46.] A. A. Siddiqui, J. R. Garland, M. B. Dalton, M. Sinensky, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 3712-3717.

[47.] M. C. Seabra, M. S. Brown, C. A. Slaughter, T. C. Sudhof, J. L. Goldstein, *Cell* **1992,** *70*, 1049-1057.

[48.] M. C. Seabra, J. L. Goldstein, T. C. Sudhof, M. S. Brown, *J. Biol. Chem.* **1992,** *267*, 14497-14503.

[49.] K. Alexandrov, H. Horiuchi, O. Steelemortimer, M. C. Seabra, M. Zerial, *EMBO J.* **1994,** *13*, 5262-5273.

[50.] E. C. Lerner, Y. M. Qian, M. A. Blaskovich, R. D. Fossum, A. Vogt, J. Z. Sun, A. D. Cox, C. J. Der, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 26802-26806.

[51.] E. C. Lerner, Y. M. Qian, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 26770-26773.

[52.] F. P. Coxon, M. H. Helfrich, B. Larijani, M. Muzylak, J. E. Dunford, D. Marshall, A. D. McKinnon, S. A. Nesbitt, M. A. Horton, M. C. Seabra, F. H. Ebetino, M. J. Rogers, *J. Biol. Chem.* **2001,** *276*, 48213-48222.

[53.] L. Gutierrez, A. I. Magee, *Biochim. Biophys. Act.* **1991,** *1078*, 147-154.

[54.] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 23269-23276.

[55.] S. Yalovsky, M. Rodriguez-Concepcion, W. Gruissem, *Trends in Plant Science* **1999,** *4*, 439-445.

[56.] S. Borman, *Chem. Eng. News* **1996,** *74* 36.

[57.] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J.Biol.Chem.* **1999,** *274*, 3252.

[58.] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Act.* **1999,** *1451*, 1-16.

[59.] S. Quesnel, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1994,** *33*, 13340-13348.

[60.] L. Berthiaume, M. D. Resh, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 22399-22405.

[61.] L. A. Camp, L. A. Verkruyse, S. J. Afendis, C. A. Slaughter, S. L. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1994,** *269* ,23212-23219.

[62.] A. A. Soyombo, S. L. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 27456-27463.

[63.] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273,* 15830-15837.

[64.] Y. Devedjiev, Z. Dauter, S. R. Kuznetsov, T. L. Z. Jones, Z. S. Derewenda, *Structure* **2000,** *8*, 1137-1146.

[65.] A. Fujiyama, K. Matsumoto, F. Tamanoi, *EMBO J.* **1987,** *6*, 223-228.

[66.] V. L. Boyartchuk, M. N. Ashby, J. Rine, *Science* **1997,** *275*, 1796-1800.

[67.] A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000,** *20*, 2475-2487.

[68.] W. K. Schmidt, A. Tam, K. Fujimura-Kamada, S. Michaelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998,** *95*, 11175-11180.

[69.] J. D. Romano, W. K. Schmidt, S. Michaelis, *Molecular Biology of the Cell* **1998,** *9*, 2231-2247.

[70.] Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 15030-15034.

[71.] C. A. Hrycyna, S. K. Sapperstein, S. Clarke, S. Michaelis, *EMBO J.* **1991,** *10*, 1699-1709.

[72.] C. A. Hrycyna, S. Clarke, *Mol. Cell. Biol.* **1990,** *10*, 5071-5076.

[73.] H. Hofemeister, K. Weber, R. Stick, *Molecular Biology of the Cell* **2000,** *11*, 3233-3246.

[74.] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990,** *63*, 133-139.

[75.] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995,** *34*, 3813-3822.

[76.] M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001,** *382*, 1133-1145.

[77.] E. Choy, M. Philips, *Method. Enzymol. 332*, **2001,** *332*, 50-64.

[78.] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999,** *98*, 69-80.

[79.] M. O. Roy, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2000,** *39*, 8298-8307.

[80.] M. O. Roy, R. Leventis, J. R. Silvius, *Mol. Biol. Cell* **1998,** *9* , 486.

[81.] H. Niv, O. Gutman, Y. Kloog, Y. I. Henis, *J. Cell Biol.* **2002,** *157*, 865-872.

[82.] H. Niv, O. Gutman, Y. I. Henis, Y. Kloog, *J. Biol.Chem.* **1999,** *274*, 1606-1613.

[83.] E. Yokoe, T. Meyer, *Nature Biotech.* **1996,** *14*, 1252-1256.

[84.] I. A. Prior, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nature Cell Biol.* **2001,** *3* , 172.

[85.] D. A. Zacharias, J. D. Violin, A. C. Newton, R. Y. Tsien, *Science* **2002,** *296*, 913-916.

[86.] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997,** *387*, 569-572.

[87.] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273*, 5419-5422.

[88.] K. A. Melkonian, A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, D. A. Brown, *J. Biol. Chem.* **1999,** *274* 3910-3917.

[89.] C. Mineo, G. L. James, E. J. Smart, R. G. W. Anderson, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 11930-11935.

[90.] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. HANCOCK, R. G. Parton, *Nature Cell Biol.* **1999,** *1*, 98-105.

[91.] C. W. M. Reuter, M. A. Morgan, L. Bergmann, *Blood* **2000,** *96*, 1655-1669.

[92.] A. D. Cox, C. J. Der, *Curr. Op. Pharm.* **2002,** *2*, 388-393.

[93.] J. K. Buolamwini, *Curr. Op. Chem. Biol.* **1999,** *3*, 500-509.

[94.] K. G. Waddick, F. M. Uckun, *Biochem. Pharmacol.* **1998,** *56*, 1411-1426.

[95.] D. M. Leonard, *J. Med. Chem.* **1997,** *40*, 2971-2990.

[96.] J. E. Buss, J. C. Marsters, *Chem. & Biol.* **1995,** *2*, 787-791.

[97.] J. B. Gibbs, S. L. Graham, G. D. Hartman, K. S. Koblan, N. E. Kohl, C. A. Omer, A. Oliff, *Curr. Op. Chem. Biol.* **1997,** *1*, 197-203.

[98.] A. D. Cox, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Act.* **1997,** *1333* , 51-71.

[99.] N. E. Kohl, F. R. Wilson, S. D. Mosser, E. Giuliani, S. J. Desolms, M. W. Conner, N. J. Anthony, W. J. Holtz, R. P. Gomez, T. J. Lee, R. L. Smith, S. L. Graham, G. D. Hartman, J. B. Gibbs, A. Oliff, *Proc. Natl. Acad. Sci .U.S.A.* **1994,** *91*, 9141-9145.

[100.] K. Kato, A. D. Cox, M. M. Hisaka, S. M. Graham, J. E. Buss, C. J. Der, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992,** *89*, 6403-6407.

[101.] M. S. Kang, D. M. Stemerick, J. H. Zwolshen, B. S. Harry, P. S. Sunkara, B. L. Harrison, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995,** *217*, 245-249.

[102.] M. Yonemoto, T. Satoh, H. Arakawa, I. Suzuki-Takahashi, Y. Monden, T. Kodera, K. Tanaka, T. Aoyama, Y. Iwasawa, T. Kamei, S. Nishimura, K. Tomimoto, *Mol. Pharmacol.* **1998,** *54*, 1-7.

[103.] D. V. Patel, E. M. Gordon, R. J. Schmidt, H. N. Weller, M. G. Young, R. Zahler, M. Barbacid, J. M. Carboni, J. L. Gullobrown, L. Hunihan, C. Ricca,

S. Robinson, B. R. Seizinger, A. V. TuomariI, V. Manne, *J. Med. Chem.* **1995,** *38*, 435-442.

[104.] V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. G. Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995,** *10* ,1763-1779.

[105.] N. Yan, C. Ricca, J. Fletcher, T. Glover, B. R. Seizinger, V. Manne, *Cancer Res.* **1995,** *55*, 3569-3575.

[106.] M. Schlitzer, I. Sattler, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **1999,** *38*, 2032-2034.

[107.] a) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Retey, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998,** *37* 1236-1239. b) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Retey, H. Waldmann, *Chemistry* **1999,** *5*, 227-236.

[108.] D. B. Whyte, P. Kirschmeier, T. N. Hockenberry, I. NunezOliva, L. James, J. J. Catino, W. R. Bishop, J. K. Pai, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 14459-14464.

[109.] C. A. Rowell, J. J. Kowalczyk, M. D. Lewis, A. M. Garcia, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 14093-14097.

[110.] P. F. Lebowitz, P. J. Casey, G. C. Prendergast, J. A. Thissen, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272* 15591-15594.

[111.] G. J. Clark, M. S. Kinch, K. RogersGraham, S. M. Sebti, A. D. Hamilton, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 10608-10615.

[112.] C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Moroy, O. Muller, *Oncogene* **1998,** *17*, 1769-1776.

[113.] G. Winde, K. W. Schmid, W. Schlegel, R. Fischer, H. Osswald, H. Bunte, *Dis. Colon & Rectum* **1995,** *38*, 813-830.

[114.] H. J. Thompson, C. Jiang, J. X. Lu, R. G. Mehta, G. A. Piazza, N. S. Paranka, R. Pamukcu, D. J. Ahnen, *Cancer Res.* **1997,** *57*, 267-271.

[115.] M. L. De Vos, D. S. Lawrence, C. D. Smith, *Biochem. Pharmacol.* **2001,** *62*, 985-995.

[116.] M. L. De Vos, D. S. Lawrence, C. D. Smith, *Clin. Cancer Res.* **1999,** *5,* 185.

[117.] D. S. Lawrence, J. T. Zilfou, C. D. Smith, *J. Med. Chem.* **1999,** *42* , 4932-4941.

[118.] C. D. Smith, D. S. Lawrence, J. T. Zilfou, *FASEB J.* **1999,** *13* , A1474.

[119.] K. H. Choi, A. Price, R. Heath, Z. M. Li, S. White, C. Rock, *FASEB J.* **2001,** *15* , A191.

[120.] A. C. Price, K. H. Choi, R. J. Heath, Z. M. Li, S. W. White, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.* **2001,** *276* , 6551-6559.

[121.] M. Moche, G. Schneider, P. Edwards, K. Dehesh, Y. Lindqvist, *J. Biol. Chem.* **1999,** *274* , 6031-6034.

[122.] M. Moche, K. Dehesh, P. Edwards, Y. Lindqvist, *J. Mol. Biol.* **2001,** *305*, 491-503.

[123.] S. M. Sakya, M. Suarez-Contreras, J. P. Dirlam, T. N. O'Connell, S. F. Hayashi, S. L. Santoro, B. J. Kamicker, D. M. George, C. B. Ziegler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001,** *11*, 2751-2754.

[124.] E. Satoyoshi, *Internal Med.* **1992,** *31*, 841-846.

[125.] M. Tamai, K. Matsumoto, S. Omura, I. Koyama, Y. Ozawa, K. Hanada, *J.Pharmacobio-Dyn.* **1986,** *9*, 672-677.

[126.] M. J. Page, A. Hall, S. Rhodes, R. H. Skinner, V. Murphy, M. Sydenham, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1989,** *264*, 19147-19154.

[127.] *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Eds.: W. C. Chan, P. D. White, Oxford University Press, New York **2000,** pp. 1-346.

[128.] J. Kuhlmann, A. Tebbe, M. Volkert, M. Wagner, K. Uwai, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002,** *41*, 2546.

[129.] P. McGeady, S. Kuroda, K. Shimizu, Y. Takai, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 26347-26351.

[130.] D. J. Owen, K. Alexandrov, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999,** *38*, 509-512.

[131.] N. H. Thoma, A. Iakovenko, D. Owen, A. S. Scheidig, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2000,** *39*, 12043-12052.

[132.] G. T. Hermanson, *Bioconj. Techn.*, Academic Press, London **1996**.

[133.] R. Hirata, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990,** *265*, 6726-6733.

[134.] P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebl, T. H. Stevens, *Science* **1990,** *250*, 651-657.

[135.] M. Kawasaki, Y. Satow, Y. Ohya, Y. Anraku, *FEBS Lett.* **1997,** *412*, 518-520.

[136.] M. Q. Xu, M. W. Southworth, F. B. Mersha, L. J. Hornstra, F. B. Perler, *Cell* **1993,** *75*, 1371-1377.

[137.] C. J. Noren, J. M. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000,** *39* ,450-466.

[138.] S. R. Chong, K. S. Williams, C. Wotkowicz, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1998,** *273,* 10567-10577.

[139.] S. R. Chong, G. E. Montello, A. H. Zhang, E. J. Cantor, W. Liao, M. Q. Xu, J. Benner, *Nucleic Acids Res.* **1998,** *26*, 5109-5115.

[140.] A. Telenti, M. Southworth, F. Alcaide, S. Daugelat, W. R. Jacobs, F. B. Perler, *J.Bacteriol.* **1997,** *179*, 6378-6382.

[141.] A. A. Cooper, Y. J. Chen, M. A. Lindorfer, T. H. Stevens, *EMBO J.* **1993,** *12*, 2575-2583.

[142.] E. O. Davis, P. J. Jenner, P. C. Brooks, M. J. Colston, S. G. Sedgwick, *Cell* **1992,** *71*, 201-210.

[143.] S. Nogami, Y. Satow, Y. Ohya, Y. Anraku, *Genetics* **1997,** *147,* 73-85.

[144.] M. Kawasaki, S. Nogami, Y. Satow, Y. Ohya, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 15668-15674.

[145.] M. W. Southworth, K. Amaya, T. C. Evans, M. Q. Xu, F. B. Perler, *BioTechniques* **1999,** *27*, 110.

[146.] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998,** *95*, 6705-6710.

[147.] T. C. Evans, J. Benner, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999,** *274*, 18359-18363.

[148.] S. R. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997,** *192*, 271-281.

[149.] M. Holford, T. W. Muir, *Structure with Folding & Design* **1998,** *6*, 951-956.

[150.] T. Watanabe, Y. Ito, T. Yamada, M. Hashimoto, S. Sekine, H. Tanaka, *J. Bacteriol.* **1994,** *176*, 4465-4472.

[151.] S. R. Chong, Y. Shao, H. Paulus, J. Benner, F. B. Perler, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 22159-22168.

[152.] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000,** *69*, 923-960.

[153.] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994,** *266*, 776-779.

[154.] P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001,** *42*, 1831-1833.

[155.] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. J. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1999,** *121*, 8720-8727.

[156.] M. W. Southworth, E. Adam, D. Panne, R. Byer, R. Kautz, F. B. Perler, *EMBO J.* **1998,** *17*, 918-926.

[157.] K. Shingledecker, S. Q. Jiang, H. Paulus, *Gene* **1998,** *207*, 187-195.

[158.] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000,** *65*, 4900-4908.

[159.] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124* , 5648-5649.

[160.] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000,** *122*, 5421-5428.

[161.] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124*, 4642-4646.

[162.] Hata T., Y. Sano, A. Matsumae, Y. Kanio, S. Nomura, R. Sugawara, *Jap. J. Bacteriology* **1960,** *15*, 1075.

[163.] Y. E. Bukhtiyarov, C. A. Omer, C. M. Allen, *J. Biol. Chem.* **1995,** *270*, 19035-19040.

[164.] Y. E. Bukhtiyarov, C. A. Omer, C. M. Allen, *FASEB J.* **1995,** *9*, 1471.

[165.] T. C. Turek, I. Gaon, M. D. Distefano, C. L. Strickland, *J. Org. Chem.* **2001,** *66*, 3253-3264.

[166.] M. D. Distefano, T. A. Kale, R. L. Edelstein, T. C. Turek, V. A. Weller, I. Gaon, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1998,** *216*, 311.

[167.] M. D. Distefano, R. L. Edelstein, T. C. Turek, V. A. Weller, I. Gaon, T. A. Kale, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1998,** *215* , 186.

[168.] T. C. Turek, I. Gaon, D. Gamache, M. D. Distefano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997,** *7* ,2125-2130.

[169.] M. D. Distefano, R. L. Edelstein, T. C. Turek, I. Gaon, V. A. Weller, D. Gamache, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1997,** *214,* 384.

[170.] T. C. Turek, R. L. Edelstein, I. Gaon, S. K. Singh, V. Weller, M. D. Distefano, *Protein Eng.* **1997,** *10*, 91.

[171.] M. D. Distefano, R. L. Edelstein, T. C. Turek, I. Gaon, V. A. Weller, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1997,** *213*, 313.

[172.] T. C. Turek, I. Gaon, M. D. Distefano, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1997,** *39*, 139-146.

[173.] I. Gaon, T. C. Turek, M. D. Distefano, *Tetrahedron Lett.* **1996,** *37*, 8833-8836.

[174.] I. Gaon, T. C. Turek, V. A. Weller, R. L. Edelstein, S. K. Singh, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **1996,** *61*, 7738-7745.

[175.] T. C. Turek, I. Gaon, M. D. Distefano, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1996,** *212*, 166.

[176.] D. M. Marecak, Y. Horiuchi, H. Arai, M. Shimonaga, Y. Maki, T. Koyama, K. Ogura, G. D. Prestwich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997,** *7*, 1973-1978.

[177.] X. P. Li, K. Abdi, S. J. Mentzer, *J. Immunol. Methods* **1994,** *172*, 141-145.

[178.] R. D. Kaiser, E. London, *Biochemistry* **1999,** *38*, 2610.

[179.] R. D. Kaiser, E. London, *Biochemistry* **1998,** *37*, 8180-8190.

[180.] R. L. Atkins, D. E. Bliss, *J. Org. Chem.* **1978,** *43*, 1975-1980.

[181.] A. K. Lala, R. R. Dixit, V. Koppaka, S. Patel, *Biochemistry* **1988,** *27*, 8981-8989.

[182.] X. H. Liu, G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124*, 20-21.

[183.] A. Cotte, B. Bader, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chemistry* **1999,** *5*, 922-936.

[184.] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996,** *118*, 5891-5896.

[185.] M. Miyashita, A. Yoshikoshi, P. A. Grieco, *J. Org. Chem.* **1977,** *42*, 3772-3774.

[186.] D. S. Brown, S. V. Ley, S. Vile, M. Thompson, *Tetrahedron* **1991,** *47*, 1329-1342.

[187.] M. A. Umbreit, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977,** *99*, 5526-5528.

[188.] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981,** 1-28.

[189.] Ing, Manske, *J. Chem. Soc.* **1926,** 2348.

[190.] P. B. Ghosh, M.W.Whitehouse, *Biochem.J.* **1968,** *108*, 155.

[191.] S. Hrafnsdottir, J. W. Nichols, A. K. Menon, *Biochemistry* **1997,** *36*, 4969-4978.

[192.] A. Treibs, F. H. Kreuzer, *Ann. Chem. J. Liebig* **1968,** *718*, 208.

[193.] R.P. Haughland,M. S. Kang, 83,458, [4,774,339], pp. 1-18, **1987**. US Patent.

[194.] I. D. Johnson, H. C. Kang, R. P. Haughland, *Anal. Biochem.* **1991,** *198*, 228-237.

[195.] A. Chattopadhyay, E. London, *Biochemistry* **1987,** *26*, 39-45.

[196.] D. E. Wolf, A. P. Winiski, A. E. Ting, K. M. Bocian, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1992,** *31*, 2865-2873.

[197.] R. D. Kaiser, E. London, *Biochim. Biophys. Act.* **1998,** *1375*, 13-22.

[198.] R. E. Pagano, R. Watanabe, C. Wheatley, C. S. Chen, *Chem. Phys. Lipids* **1999,** *102*, 55-63.

[199.] N. M. Green, *Methods Enzymol.* **1990,** *184*, 51-67.

[200.] B. Popkirova, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Ruhr-Universität Bochum, Diplomarbeit **2001**.

[201.] E. J. Corey, M. Takeda, C. U. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1972,** 4339.

[202.] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991,** *113*, 3176-3177.

[203.] C. C. Yang, C. K. Marlowe, R. Kania, *J. Am. Chem. Soc.* **1991,** *113*, 3177-3178.

[204.] J. M. Tedder, A. Nechvatal, A. W. Murray, in *Basic organic chemistry*, John Wiley & Sons, London **1972**, pp. 305-342.

[205.] S. Eleftheriou, D. Gatos, A. Panagopoulos, S. Stathopoulos, K. Barlos, *Tetrahedron Lett.* **1999,** *40*, 2825-2828.

[206.] J. A. Camarero, A. Adeva, T. W. Muir, *Lett. Pept. Sci.* **2000,** *7*, 17-21.

[207.] A. Tebbe, Max-Plank-Institut für molekulare Physiologie und Ruhr-Universität Bochum, Diplomarbeit **2001**.

[208.] R. R. Flavell, M. Huse, M. Goger, M. Trester-Zedlitz, J. Kuriyan, T. W. Muir, *Organic Letters* **2002,** *4*, 165-168.

[209.] J. R. Sydor, M. Mariano, S. Sideris, S. Nock, *Bioconj. Chem.* **2002,** *13*, 707-712.

[210.] I. Heinemann, geplante Dissertation, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und Universität Dortmund, **2002**.

[211.] T. Durek, geplante Dissertation, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und Universität Dortmund, **2003**.

[212.] D. Barsagi, J. R. Feramisco, *Cell* **1985,** *42*, 841-848.

[213.] E. Ikonen, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001,** *13*, 470-477.

[214.] S. Lew, J. Ren, R. Kaiser, E. London, *Biophys. J.* **1999,** *76*, 123.

[215.] A. Chattopadhyay, E. London, *Biochim. Biophys. Acta* **1988,** *938*, 24-34.

[216.] F. S. Abrams, E. London, *Biochemistry* **1993,** *32*, 10826-10831.

[217.] R. K. Boekman, E. W. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1977,** *99*, 2805-2806.

[218.] R. K. Boekman, E. W. Thomas, *J.Am. Chem. Soc.* **1979,** *101*, 987-994.

[219.] R. K. Boekmann, E. W. Thomas, *J.Am. Chem. Soc.* **1977,** *99*, 2805-2806.

[220.] A. A. Jakubowski, F. S. Guziec, M. Tishler, *Tetrahedron Lett.* **1977,** 2399-2402.

[221.] J. Furukawa, H. Funabashi, N. Morisaki, S. Iwasaki, S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1988,** *36*, 1229-1232.

[222.] A. A. Jakubowski, F. S. Guziec, M. Sugiura, C. C. Tam, M. Tishler, S. Omura, *J. Org. Chem.* **1982,** *47*, 1221-1228.

[223.] E. J. Corey, D. R. Wiliams, *Tetrahedron Lett.* **1977,** 3847-3850.

[224.] N. Morisak, H. Funabashi, J. Furukawa, R. Shimazawa, A. Kanematsu, T. Ando, S. Okuda, S. Iwasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1992,** *40*, 2945-2953.

[225.] N. Morisaki, H. Funabashi, R. Shimazawa, J. Furukawa, A. Kawaguchi, S. Okuda, S. Iwasai, *Eur.J.Biochem.* **1993,** *211*, 111-115.

[226.] J. J. Blumenstein, R. Luftig, M. Bu, T. D. Copeland, C. J. Michejda, S. Oroszlan, in *Current Communications in Molecular Biology, Proteinases and Targets for Chemotherapy,* Eds.: H. G. Krausslich, S. Oroszolan, E. Werner, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York **1989**, pp. 211-214.

[227.] G. B. Payne, P. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1958,** *24*, 54-55.

[228.] K. S. Kirshenbaum, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985,** *50*, 1979-1982.

[229.] A. C. Korn, L. Moroder, *J. Chem. Res.* **1995,** 102-103.

[230.] A. Korn, S. Rudolphbohner, L. Moroder, *Tetrahedron* **1994,** *50*, 8381-8392.

[231.] W. Kroutil, M. E. LasterraSanchez, S. J. Maddrell, P. Mayon, P. Morgan, S. M. Roberts, S. R. Thornton, C. J. Todd, M. Tuter, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1996,** 2837-2844.

[232.] W. Kroutil, P. Mayon, M. E. LasterraSanchez, S. J. Maddrell, S. M. Roberts, S. R. Thornton, C. J. Todd, M. Tuter, *Chem. Comm.* **1996,** 2495.

[233.] W. Kroutil, P. Mayon, M. E. LasterraSanchez, S. J. Maddrell, S. M. Roberts, S. R. Thornton, C. J. Todd, M. Tuter, *Chem. Comm.* **1996,** 845-846.

[234.] T. Nemoto, T. Ohshima, K. Yamaguchi, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123*, 2725-2732.

[235.] E. N. Jacobsen, L. Deng, Y. Furukawa, L. E. Martinez, *Tetrahedron* **1994,** *50*, 4323-4334.

[236.] M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987,** *35*, 1098-1104.

[237.] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981,** *22*, 3815-3818.

[238.] R. M. DeMarinis, J. C. Boehm, J. V. Uri, J. R. Guarini, L. Phillips, G. L. Dunn, *J. Med. Chem.* **1977,** *20*, 1164-1169.

[239.] R. A. Henry, *J. Heterocycl. Chem.* **1976,** *13*, 391-392.

[240.] A. Mehta, R. Jaouhari, T. J. Benson, K. T. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1992,** *33*, 5441-5444.

[241.] J. W. Tilley, P. Levitan, R. W. Kierstead, M. Cohen, *J. Med. Chem.* **1980,** *23*, 1387-1392.

[242.] G. A. Molander, C. D. Losada, *Tetrahedron* **1998,** *54*, 5819-5832.

[243.] G. A. Molander, C. D. Losada, *J. Org. Chem.* **1997,** *62*, 2935-2943.

[244.] S. Marumoto, H. Kogen, S. Naruto, *Tetrahedron* **1999,** *55*, 7129-7144.

[245.] S. Marumoto, H. Kogen, S. Naruto, *Tetrahedron-Asymm.* **1999,** *10*, 675-678.

[246.] K. Woydowski, B. Ziemer, J. Liebscher, *J. Org. Chem.* **1999,** *64*, 3489-3491.

[247.] W. F. Bailey, E. R. Punzalan, *J. Org. Chem.* **1990,** *55*, 5404-5406.

[248.] J. T. Eummer, B. S. Gibbs, T. J. Zahn, J. S. Sebolt-Leopold, R. A. Gibbs, *Bioorg. Med. Chem.* **1999,** *7*, 241-250.

[249.] S. Klinge, M. Demuth, *Synlett* **1993,** 783-784.

[250.] K. Eis, H. G. Schmalz, *Synthesis* **1997,** 202.

[251.] E. E. VanTamelen, R. G. Nadeau, *Bioorg.Chem.* **1982,** *11*, 197-218.

[252.] M. Tokumasu, H. Ando, Y. Hiraga, S. Kojima, K. Ohkata, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999,** 489-496.

[253.] V. J. Davisson, A. B. Woodside, T. R. Neal, K. E. Stremler, M. Muehlbacher, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1986,** *51*, 4768-4779.

[254.] S. A. Biller, C. Forster, *Tetrahedron* **1990,** *46*, 6645-6658.

[255.] S. A. Holstein, D. M. Cermak, D. F. Wiemer, K. Lewis, R. J. Hohl, *Bioorg. Med. Chem.* **1998,** *6*, 687-694.

[256.] E. J. Corey, R. P. Volante, *J. Am. Chem. Soc.* **1976,** *98*, 1291-1293.

[257.] M. P. Teulade, P. Savignac, E. E. Aboujaoude, N. Collignon, *J. Organomet. Chem.* **1986,** *312* , 283-295.

[258.] M. H. B. Stowell, J. F. Witte, R. W. McClard, *Tetrahedron Lett.* **1989,** *30*, 411-414.

[259.] C. Grison, P. Coutrot, S. Joliez, L. Balas, *Synthesis* **1996,** 731.

[260.] A. Rak, O. Pylypenko, R. Reents, A. Niculae, N. H. Thomä, H. Waldmann, I. Schlichting, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Cell* **2002,** submitted.

[261.] A. Rak, R. Reents, O. Pylypenko, A. Niculae, V. Sidorovitch, N. H. Thoma, H. Waldmann, I. Schlichting, R. S. Goody, K. Alexandrov, *J. Struct. Biol.* **2001,** *136*, 158-161.

[262.] B. Dursina, N. H. Thoma, V. Sidorovitch, A. Niculae, A. Iakovenko, A. Rak, S. Albert, A. C. Ceacareanu, R. Kolling, C. Herrmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2002,** *41*, 6805-6816.

[263.] P. S. Gromov, P. Madsen, J. E. Celis, *Electrophoresis* **1996,** *17*, 1728-1733.

[264.] I. Simon, M. Zerial, R. S. Goody, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 20470-20478.

[265.] F. Shen, M. C. Seabra, *J. Biol. Chem.* **1996,** *271*, 3692-3698.

[266.] K. Alexandrov, R. Reents, H. Waldmann, R.S. Goody, Patententwurf, **2002**.

[267.] M. Thutewohl, Dissertation, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und Universität Dortmund, **2002**.

[268.] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nagele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997,** *36*, 2238-2241.

[269.] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nagele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997,** *36*, 13102-13109.

[270.] S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124*, 2444-2445.

[271.] O. P. Vig, M. L. Sharma, R. Gauba, S. K. Puri, *Indian J. Chem. Sect. B* **1985,** *24*, 513-515.

[272.] Emission des Fluorophors interferiert mit Messwellenlänge des Polarimeters

[273.] A. M. Bray, D. P. Kelly, P. O. L. Mack, R. F. Martin, L. P. G. Wakelin, *Aust. J. Chem.* **1990,** *43*, 629-634.

[274.] A. P. Krapcho, C. S. Kuell, *Synth. Commun.* **1990,** *20*, 2559-2564.

[275.] M. Adamczyk, J. Grote, *Org. Prep. Proced. Int.* **1995,** *27*, 517.

[276.] S.M. Creighton, D. L. Mitchell, *Can. J. Chem.* **1967,** *45*, 1304.

8 Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]^{20}_{D}$	Spezifischer Drehwert bei 20°C
arom	aromatisch
Boc	2-(*tert*-Butoxycarbonyloxy
Bodipy FL	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-propionsäure
Bodipy TR	6-(((4-(4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-yl)phenoxy) acetyl)amino)hexansäure
br	stark verbreitertes Signal
bu	Butyl
BuLi	Butyllithium
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
d	Dublett
Dansyl	5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl
dd	Doppeldublett
ddd	Doppeldublett-Duplett
ddq	Doppeldublett-Quartett
DEAD	Azodicarbonsäurediethylester

DHP	3,4-Dihydro-2H-Pyran
DMF	Dimethylformamid
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDC	*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N´*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EI	Electron Impact (MS)
EPL	Expressed Protein Ligation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Electrospray Ionisations-massenspektroskopie
Et	Ethyl
FAB	Fast Atom Bombardement (MS)
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy-
FPP	Farnesylpyrophosphat
Ftase	Farnesyltransferase
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
HBTU	*O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N′,N′*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hd	Hexadecyl
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol Hydrat
HRMS	Hochauflösende Massenspektroskopie
IPL	Intein-vermittelte Ligation
KDa	Kilodalton
LRMS	Niedrigauflösende Massenspektroskopie
m	Multiplett (NMR) oder mittel (IR)
Mant	*N*-Methylanthraniloyl
MCPBA	3-Chloroperbenzoesäure
Me	Methyl
MESA	2-Mercaptoethansulfonsäure

MIC	Maleinimidocaproyl
MMT	Monomethoxytrityl
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NBD	7-Nitronbenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NCS	*N*-Chlorosuccinimid
nd	nicht bestimmt
NMR	Kernresonzspektroskopie
OPA	*O*-Phthaldialdehyd
PAGE	Polyamid-Gelelektrophorese
PalTase	Palmitoyltransferase
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl
PM	Plasmamembran
PPTS	Pyridinium *p*-Toluolsulfonat
PS	Polystyrol
Ras	Adenosarkom aus Ratten
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
Rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Singulett (NMR) oder stark (IR)
t	Triplett
tBu	*tert*-Butyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TIS	Triisopropoylsilan
tq	Triplett-Quartett
Trt	Trityl
tt	Triplett-Triplett

Danksagung

Zu dem Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken möchte.

Mein erster Dank gebührt Prof. Dr. Herbert Waldmann, der mich mit spannenden Aufgabenstellungen in Karlsruhe und Dortmund betraute, für alle Mittel und Freiheiten bei der Umsetzung und Entwicklung meiner Ideen sorgte und das Fortschreiten des Projektes stets durch Anregungen begleitete.

Während der vergangenen Jahre hatte ich das Glück, in einem außerordentlich motivierenden Umfeld zu arbeiten. Im Labor D 3.14 mit den Lanzaroteños Dipl.-Chem. Carsten *Pepe* Peters, Dipl.-Chem. Lars *B*. Wittenberg, Sasiskala *Sasi* Thavam und Dipl.-Chem. Martin Völkert entstand eine Arbeitsatmosphäre, die immer wieder ermutigte, auch bei Rückschlägen nie aufzugeben, neue Lösungen zu entwerfen und sie zu diskutieren. Für die brilliante praktische Hilfe danke ich besonders *Sasi.*

Die Kooperationen mit der Abteilung von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer gelangen vor allem aufgrund der hervorragenden Zusammenarbeit mit Dipl.-Biochem. Melanie Wagner. Dr. Jürgen Kuhlmann danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Die Zusammenarbeit mit der Abteilung von Prof. Dr. Roger S. Goody war vor allem geprägt durch die sprühende Ideenvielfalt von Dr. Kirill Alexandrov und der präzisen Umsetzung von Dipl.-Biochem. Beatrice Dursina.
Dipl.-Biochem. Thomas Durek und Dipl.-Chem. Dipl.-Biol. Ines Heinemann danke ich für ihre praktischen Tipps bei der *Intein mediated Protein ligation*. Christine Nowak und Dipl.-Biochem. Andreas Tebbe gilt mein ganz besonderer Dank für ihre unermüdliche Hilfe in der Entwicklung dieser Methode für Ras-Proteine.

Die umfangreiche Analytik der darstellten Verbindungen gelang nur aufgrund der sorgfältigen Arbeit von C. Vornweg, D. Göhrke, Dr. H. Prinz, Dr. B. Griewel, A. Danzmann, Dr. B. Costisella, Dr. P. Janning und Dr. H. Röttele.

Last but not least danke ich den gewissenhaften Korrekturlesern dieser Arbeit, Dr. Dipl.-Chem. Rolf Breinbauer, Dr. Dipl.-Chem. Dirk Brohm, Dipl.-Biochem. Melanie Wagner, Dipl.-Chem. Carsten Peters, Dipl.-Chem. Lars Wittenberg und Dipl.-Chem. Martin Völkert.

Lebenslauf

Name:	Reinhard Reents
Geburtsdatum und –ort:	19.08.1972 in Oldenburg (i. O.)
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1978 - 1982	Georg-Ruseler-Grundschule Varel-Obenstrohe
1982 - 1984	Orientierungsstufe Varel-Obenstrohe
1984 - 1991	Lothar-Meyer-Gymnasium Varel
1991	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

08/1991 - 10/1992	Staatliches Amt für Wasser- und Abfallwirtschaft (StAWA) Aachen

Hochschulausbildung:

10/1992 - 10/1994	Chemie-Grundstudium an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen
11/1994 - 05/1998	Chemie-Hauptstudium an der RWTH Aachen
05/1998	Abschluß der Diplom-Chemiker Hauptprüfungen an der RWTH Aachen
06/1998 - 12/1998	Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. C. Bolm (RWTH Aachen) an dem Institut für Organische Chemie an der Universität Fridericana zu Karlsruhe (TH) unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Waldmann, Thema: „Synthese fluoreszenzmarkierter *C*-terminaler Fragmente des menschlichen N-Ras Proteins“

Promotion:

02/1999	Beginn an der Universität Fridericana zu Karlsruhe (TH) unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann
11/1999 -12/2002	Fortsetzung am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Dortmund und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund

Dortmund, im Dezember 2002