

Synthese und biologische Evaluierung photoaktivierbarer menschlicher N-Ras-Peptide und –Proteine

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

Dissertation

von

Diplomchemiker

Martin Völkert

aus Mannheim

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Lehnig

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2003

S. D. G.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Tyrosinase – eine Polyphenoloxidase	3
2.1.1	Der Katalysemechanismus der Tyrosinase.....	6
2.2	Peptidsynthese	9
2.2.1	Synthese lipidierter Peptide	9
2.2.2	Phenylhydrazid als aktivierende Schutzgruppe.....	11
2.3	Krebs - Fehlsteuerung zellulärer Prozesse	11
2.3.1	Die Ras-Proteine als zelluläre Schalter.....	13
2.3.2	Posttranslationale Modifikation von Ras.....	15
2.3.3	Ras-Proteine als molekulares Ziel in der Krebstherapie	18
2.3.4	Photoaffinitätsmarkierung	20
3	Ziel der Arbeit	23
4	Ergebnisse und Diskussion	26
4.1	Synthese und Evaluierung menschlicher N-Ras-Peptide	26
4.1.1	Synthesestrategie	26
4.1.2	Synthese photoaktivierbarer N-Ras-Peptide und ihr Einsatz in biologischen Experimenten	29
4.1.3	Synthese und Untersuchung von N-Ras-D-Peptiden	45
4.1.4	Fluoreszierende Peptide.....	48
4.2	Enzymatische Entschützung von Phenylhydraziden	53
4.2.1	Isolierung und Aufreinigung der Tyrosinase	53
4.2.2	Charakterisierung der Enzympräparation	54
4.2.3	Entschützung von Phenylhydraziden mit Tyrosinase	60
4.2.4	Mechanistische Untersuchungen	69
5	Zusammenfassung und Ausblick	85
5.1	Zusammenfassung	85
5.2	Ausblick	91
6	Experimenteller Teil	93
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel	93
6.2	Versuche zu Kapitel 4.1: Synthese und Evaluierung menschlicher N-Ras-Peptide	95

6.2.1	Versuche zu Kapitel 4.1.2: Synthese photoaktivierbarer N-Ras-Peptide und ihr Einsatz in biologischen Experimenten	95
6.2.2	Versuche zu Kapitel 4.1.3: Synthese und Untersuchung von N-Ras-D-Peptiden.....	118
6.2.3	Versuche zu Kapitel 4.1.4: Fluoreszierende Peptide	120
6.3	Versuche zu Kapitel 4.2: Enzymatische Entschützung von Phenylhydraziden	125
6.3.1	Versuche zu Kapitel 4.2.1: Isolierung und Aufreinigung der Tyrosinase	125
6.3.2	Versuche zu Kapitel 4.2.2: Charakterisierung der Enzympräparation.....	125
6.3.3	Versuche zu Kapitel 4.2.3: Entschützung von Phenylhydraziden mit Tyrosinase	127
6.3.4	Versuche zu Kapitel 4.2.4: Mechanistische Untersuchungen.....	143
7	Abkürzungsverzeichnis.....	150
8	Literaturverzeichnis	153

1 Einleitung

*Und Noah, ein Landmann, begann auch, Weinberge zu pflanzen.
Und er trank von dem Wein und wurde betrunken
und lag entblößt im Innern seines Zeltes.*

GENESIS 9, 20-21

Eigentlich begann das *Biotech*-Zeitalter vor 7000 Jahren – in Mesopotamien soll bereits im 5. Jahrtausend vor Christus Wein hergestellt worden sein. Auch die Bibel verfolgt den Weinbau weit zurück und benennt nicht nur Noah als ersten Winzer, sondern berichtet auch von den Folgen einer Produktverkostung.^[1]

Während Käserei, Braukunst und Weinbau über die Jahrtausende zu den wichtigsten Kulturleistungen zählten, entwickelte sich die Chemie erst ab dem 17. Jh. zur Blüte. Das Jahr 1828 markiert eine besondere Zäsur: die Synthese des Harnstoffs durch F. WÖHLER machte deutlich, dass es keiner geheimnisvollen „Lebenskraft“ zur Herstellung organischer Verbindungen bedarf. Die neue Disziplin der „Organischen Chemie“ sollte eine rasante Entwicklung erleben, von der Synthese der ersten Farb-, Wirk- und Kunststoffe über die Aufklärung der Strukturen von Benzol und vieler Naturstoffe zu immer neuen, ausgefeilteren Synthesemethoden und einem logischen Verständnis der zugrundeliegenden Prinzipien. Inzwischen scheint die Synthese beliebig komplexer Naturstoffe nur mehr eine Frage der Zeit und der Arbeitskraft; selbst vielstufige Synthesen können industriell verwirklicht werden, wenn nur der Wert des Produkts den Aufwand rechtfertigt.

Weniger offensichtlich zwar, aber genauso bedeutsam ist der Einfluss, den die Chemie auf die Entwicklung der Biologie genommen hat: nämlich jeden Vorgang in einer Zelle als einen Vorgang auf molekularer Ebene zu begreifen, die Chemie sozusagen als „Maschinensprache des Lebens“ zu sehen. Ohne diese chemischen Grundlagen besäßen die *life sciences* bei weitem nicht den heutigen Stellenwert; ein Meilenstein auf diesem Weg war sicherlich der Vorschlag zur Struktur der DNS von CRICK und WATSON.^[2]

Aber auch in umgekehrter Richtung sind die Grenzen durchlässig geworden: Proteine werden als Module verstanden, die genau definierte chemische Aufgaben ausführen können, Enzyme

katalysieren chemische Reaktionen, und das oft selektiver und milder, als es die Chemiker mit ihren Katalysatoren bisher könnten. In der Industrie stechen biotechnologische Prozesse immer häufiger alle chemischen Verfahren aus, wenn es um die billige Herstellung komplexer Wirkstoffe geht – etwa in der Produktion von Vitaminen.^[3, 4]

Heute ist klar, dass Chemiker und Biologen aus verschiedenen Richtungen dieselben Gegenstände betrachten.^[5-7] Aus dem Wunsch, den eigenen Standort zu benennen, sind folgerichtig neben der Biochemie weitere Disziplinen entstanden, etwa die Biophysikalische, die Bioanorganische und die Bioorganische Chemie. Werden diese unterschiedlichen Sichtweisen zusammengeführt, ergeben sich neue Einsichten und Erkenntnisse, die *alle* beteiligten Disziplinen gleichzeitig herausfordern und weiterbringen.

Genau darum geht es in der vorliegenden Arbeit. Wie im Zeitraffer werden diese 7000 Jahre Biotechnologie nachgezeichnet: eine chemische Reaktion wird durch ein Enzym katalysiert, das Millionen Jahre alt ist; dieses Phänomen wird zunächst dankbar zur Kenntnis genommen und vielfach angewendet, dann erwacht aber auch das Interesse, den Ablauf dieser Reaktion chemisch zu verstehen. Ein weiterer Teil handelt von der Entwicklung chemischer Sonden zur Untersuchung des Lebens und seiner Prozesse und davon, wie diese für biologische Experimente angepasst werden können; so trägt die Chemie dazu bei, die Abläufe z.B. in einer Zelle im Detail zu verstehen – und letztlich die Entwicklung neuer Medikamente zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit ist ein Beispiel dafür, wie dieses Geben und Nehmen für beide Disziplinen fruchtbar gestaltet werden kann.

2 Allgemeiner Teil

Think simplicity; then discard it.

ALFRED NORTH WHITEHEAD (1861-1947)

2.1 Tyrosinase – eine Polyphenoloxidase

Geschnittene Äpfel, Bananen oder Avocados werden braun, lässt man sie an der Luft stehen – jeder kennt das und findet es mehr oder weniger unappetitlich. Fast jeder kennt auch den alten „Hausfrauentrick“, das Obst mit Zitronensaft zu beträufeln, um das schön frische Aussehen zu erhalten. Die wenigsten Hausfrauen dagegen dürften wissen, *warum* das Obst braun wird: in den Zellen enthaltene Phenole werden zu Chinonen oxidiert, welche in der Folge polymerisieren. Ausgelöst wird dieser Prozess durch eine Gruppe von kupferhaltigen Enzymen, die als Polyphenol-Oxidasen (PPO) bezeichnet werden.^[8] Diese Polyphenol-Oxidasen lassen sich nach ihren Substraten weiter einteilen in Tyrosinasen, Catechol-Oxidasen und Laccasen. Sie alle gehören zu den zweikernigen Typ-3-Kupferproteinen.^[9, 10] Die Tyrosinase* katalysiert zwei verschiedene Reaktionen, zum einen die *ortho*-Oxygenierung von Phenolen, zum anderen die Oxidation von Catecholen zu den korrespondierenden *o*-Chinonen. Dies macht eine eindeutige Benennung schwierig und hat in der Literatur zu einer gewissen Uneinheitlichkeit geführt. Die beiden Enzymaktivitäten werden zumeist nach den umgesetzten Substraten bezeichnet, im ersten Fall also als (mono)-Phenolase- oder Cresolase-Aktivität, im zweiten als Catecholase- oder (*o*)-Diphenolase-Aktivität. Jede Tyrosinase ist damit gleichzeitig eine Catechol-Oxidase, nicht aber umgekehrt! Früher wurde versucht, diese „zusätzliche“ Aktivität zu erfassen, indem man die Tyrosinase auch als Catechol-Oxidase (EC 1.10.3.1) auflistete. Diese doppelte Auflistung hat für Verwirrung gesorgt und wird daher nicht mehr praktiziert.^[11] Viele Quellen verwenden den Begriff „Polyphenol-Oxidase“ synonym für Tyrosinase, teilweise auch, um zwischen pflanzlichem (PPO) und tierischem Ursprung (Tyrosinase) zu unterscheiden. Diese Arbeit gebraucht PPO als Oberbegriff für alle drei Enzyme, also Tyrosinase, Laccase und

* EC 1.14.18.1, CAS-Nr. 9002-10-2, auch: Monophenol-monooxygenase, systematischer Name: Monophenol,L-Dopa:oxygenoxidoreductase,

Catecholase. Als Tyrosinase werden alle PPOs klassifiziert, die Phenole zu hydroxylieren vermögen. Die Enzymaktivitäten der Tyrosinase werden im Folgenden als Phenolase- und Catecholase-Aktivität bezeichnet.

Tyrosinase kommt fast in jedem Organismus vor. Sie sorgt nicht nur für die Braunfärbung von geschnittenem Obst, Gemüse und Pilzen,^[12] sondern auch für die Bildung des Exoskeletts von Insekten^[12] und die Melaninpigmentierung bei Säugetieren, den Menschen eingeschlossen.^[8]

Warum sollten sich Chemiker für Tyrosinase interessieren? Zum Beispiel, weil die Hausfrau nichts anderes will als die Nahrungsmittelindustrie – beide möchten ihre Produkte wertvoll, also appetitlich erhalten, und niemand isst Obst mit braunen Stellen noch lieber als ohne sie. Ob Zitronensaft oder *N*-Acetylcystein – Inhibition der Tyrosinase ist ein Milliardengeschäft.^[13] Oder vielmehr: es könnte eines sein, gäbe es bereits *den* Inhibitor, der nicht nur ungiftig und billig ist, sondern auch die „organoleptischen“ Eigenschaften der Nahrungsmittel nicht verändert, also Geruch und Geschmack. Übrigens – der Zitronensaft verschiebt nicht nur den pH-Wert aus dem für Tyrosinase optimalen Bereich, die enthaltene Ascorbinsäure verhindert auch die Polymerisation des Chinons.^[14]

Lebensmittel mit ungesättigten Fettsäuren versucht man wiederum zu konservieren, indem neben Antioxidantien auch Oxidationsenzyme *zugesetzt* werden, die eindringenden Sauerstoff verbrauchen sollen.^[15] Tatsächlich kann so im Experiment die Oxidation der Doppelbindungen z.B. von Olivenöl in erheblichem Maße unterdrückt werden. Catechinase und Quercetinase eignen sich gut dafür, denn sie binden den Sauerstoff an ihre Substrate, Laccase oder Tyrosinase dagegen nicht – sie setzen ihre Substrate zu Radikalkationen und Chinonen um, reaktiven Verbindungen, mit denen nichts gewonnen wäre. Derzeit sind diese Enzyme aber weder in der nötigen Reinheit verfügbar noch überhaupt als Lebensmittelzusätze zugelassen.

Wer dies als „Küchenchemie“ abtut und sein Ziel darin sieht, Kranke zu heilen, wird dagegen vielleicht hellhörig, wenn er erfährt, dass Melanokarzinomzellen besonders hohe Expressionsraten von Tyrosinase zeigen.^[16] So dienen schon heute monoklonale Antikörper gegen Tyrosinase als hoch empfindliche immunohistochemische Marker für Melanocyten, und sogar an Impfungen oder Immunotherapien gegen Melanome wird geforscht.^[16] Einen neuen Ansatz stellt die MDEPT-Therapie (Melanocyte-directed Enzyme Prodrug Therapy) dar.^[17, 18] Dabei sollen zelltoxische Wirkstoffe so maskiert werden, dass sie unter Einwirkung von Tyrosinase freigesetzt werden. Melanomzellen mit ihrem hohen Tyrosinase-Gehalt würden dann besonders viel Wirkstoff freisetzen und sich dadurch selbst töten.

Die Tyrosinase wurde bereits 1856 von C. F. SCHÖNBEIN aus Basel entdeckt: er fand eine „Materie“ im Saft von Pilzen, die Sauerstoff binden und auf oxidierbare Substanzen übertragen kann.^[19] Sein Artikel besticht durch den Scharfsinn und die Klarheit der Schlussfolgerungen – zu einer Zeit, in der die Chemie noch viele ungelöste Rätsel aufgab.

Obwohl die Tyrosinase schon 1938 (partiell) aufgereinigt wurde,^[20] war das Wissen um die genaue Struktur des Enzyms lange widersprüchlich, und eine Kristallstruktur existiert bis heute nicht.^[11, 21] Es gibt viele Gründe dafür, dass die Aufreinigung der Tyrosinase so schwierig ist: Tyrosinasen sind intrazellulär zumindest partiell an Organellen oder Membranstrukturen gebunden,^[22] und in allen Extrakten kommen phenolische Substrate vor, deren Oxidationsprodukte mit dem Enzym reagieren können.^[23] Außerdem scheint es verschiedene Isoformen des Enzyms zu geben,^[21] und in höheren Organismen ist die Tyrosinase zudem noch post-translational modifiziert: menschliche Tyrosinase ist z.B. ein Glykoprotein mit 13 % Kohlenhydratgehalt.^[24]

Von der Tyrosinase aus Champignons (*Agaricus bisporus*) dachte man in den 60er Jahren, sie sei ca. 120 kDa groß und als Tetramer aus vier identischen Untereinheiten von etwa 32 kDa aufgebaut.^[25, 26] 1976 wurde dagegen von einer heterotetrameren Struktur aus zwei schweren (H, 43 kDa) und zwei leichten Einheiten (L, 13 kDa) berichtet,^[27] was in der folgenden Zeit als „Stand der Kenntnis“ allgemein akzeptiert werden sollte. Die aktiven Zentren wurden als Teil der H-Untereinheiten identifiziert und der Kupfergehalt mit 4 Cu-Atomen pro H₂L₂ Holoenzym bestimmt.^[27] Außerdem wurden mindestens fünf verschiedene Isoformen beschrieben, doch ist ihre Charakterisierung nicht konsistent.^[25, 28, 29]

Dank der modernen Analysemethoden hat sich das Bild in letzter Zeit etwas geklärt. Die Sequenzen von Tyrosinasen aus mindestens 25 verschiedenen Organismen konnten aufgeklärt werden,^[12] darunter sind Hefen (*Streptomyces sp.*), Pilze (*Agaricus bisporus*^[30], *Neurospora crassa*), Obst und Gemüse (Apfel, Birne, Tomate, Kartoffel), Insekten (Seidenraupe, *Drosophila melanogaster*^[31]) und Wirbeltiere (Frosch, Huhn, Maus, Mensch^[32]). Demnach besitzt die Champignon-Tyrosinase zwei monomere Isoformen mit Massen von 43 bzw. 47 kDa.^[30] Außerdem wurde eine cDNA kloniert, die ein 64 kDa schweres Proenzym kodiert.^[12]

Die *Homologie* der untersuchten Sequenzen ist hoch, und es wurden konservierte Regionen identifiziert, die in allen Tyrosinasen vorhanden sind. Andere Regionen kommen dagegen auch nur in bestimmten Gruppen vor, z.B. den Enzymen aus pflanzlichen Quellen.^[12] Zudem besteht eine große Homologie zu Catechol-Oxidase,^[33] es wird sogar diskutiert, ob in der Evolution Hämocyanine, Tyrosinasen und Catechol-Oxidase alle aus einem einzigen primitiven Typ-3-Kupferprotein als Vorläufer entstanden sein könnten.^[34]

Die *Sequenzidentität* der Tyrosinasen schwankt allerdings je nach verglichenem Enzympaar: Die Tyrosinase-Gene *tomato-e* und *potato-b* sind zu 92% identisch, während die Identität zwischen Tyrosinase aus *N. crassa* und den verschiedenen Sequenzen aus Tomaten nur 11% beträgt. Vergleicht man alle bekannten Tyrosinase-Sequenzen, ist die kupferbindende Domäne die einzige wirklich konservierte Domäne. Diese Domäne ist sowohl bei den meisten Tyrosinasen wie auch bei Catechol-Oxidasen und Hämocyaninen konserviert. Die beiden Kupferatome des aktiven Zentrums werden von jeweils drei Histidinen mit hoher Affinität gebunden. Die Tyrosinase aus *Drosophila melanogaster* scheint dagegen aus einem anderen Vorläuferenzym entstanden zu sein, da ihre kupferbindende Domäne aus anderen Einheiten aufgebaut ist.^[31, 34]

Die Tyrosinasen höherer Eukaryonten besitzen Transmembran-Domänen und Cystein-reiche Domänen, welchen eine Rolle in der Signaltransduktion zugeordnet wird. Pflanzliche Tyrosinasen wiederum weisen eine Histidin-reiche Region auf, deren Funktion unbekannt ist. Zudem scheinen viele Tyrosinasen eine „Schnittstelle“ für eine Proteolysereaktion aufzuweisen, durch die sie aus einer inaktiven „latenten Form“ erst freigesetzt werden.^[35]

Leider liegt leider noch keine Kristallstruktur für eine Tyrosinase vor. Wertvolle Rückschlüsse lassen sich immerhin aus dem Vergleich mit der Kristallstruktur einer pflanzlichen Catechol-Oxidase ziehen, die relativ eng mit der Tyrosinase verwandt ist.^[33, 36] Kristallstrukturen existieren für die *met*- und *desoxy*-Form dieser Catechol-Oxidase,^[33, 36] daneben auch noch für die *desoxy*- und die *oxy*-Formen von Hämocyanin aus verschiedenen Organismen.^[37-39]

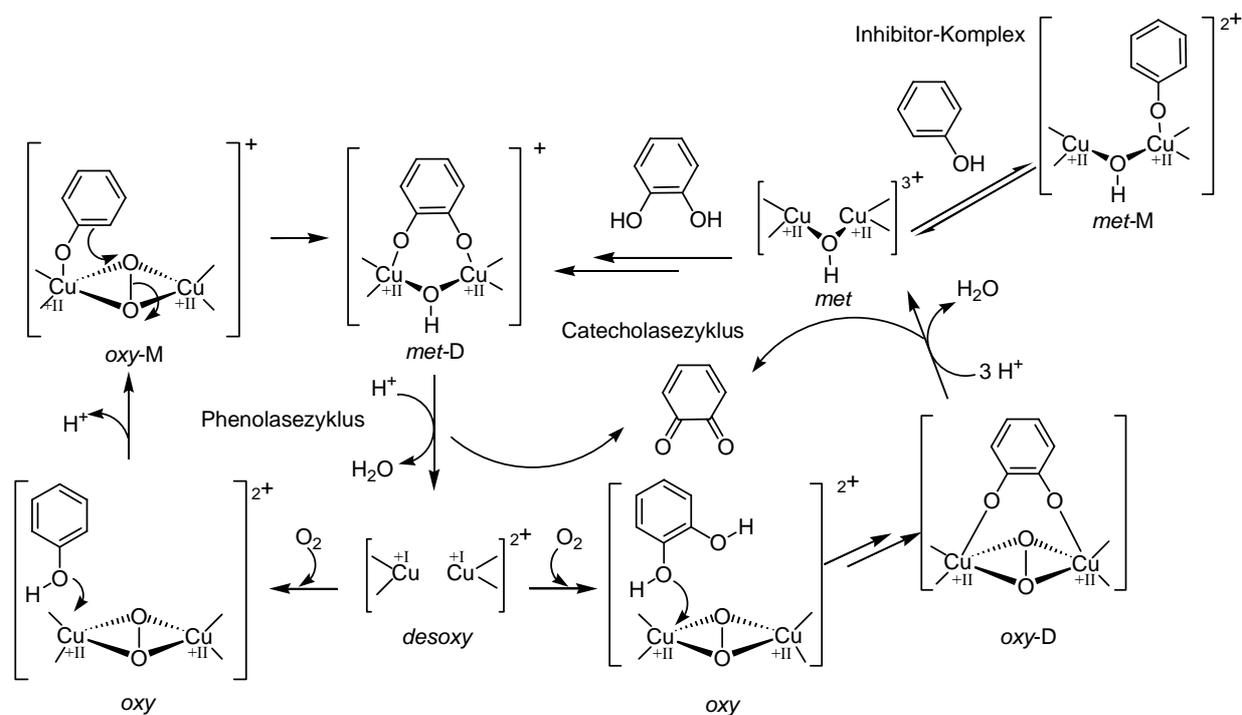
2.1.1 Der Katalysemechanismus der Tyrosinase

Trotz der Schwierigkeit, Tyrosinase in reiner Form zu isolieren und zu kristallisieren, ist der Mechanismus der Tyrosinase-katalysierten Reaktionen recht gut untersucht.^[40-43] Neben Versuchen mit dem Enzym selbst^[44-46] wurden auch Studien an Modellverbindungen durchgeführt.^[47-49]

Die aktive Tasche der Tyrosinase liegt recht nahe an der Oberfläche des Enzyms, so dass sogar tyrosinhaltige Polypeptide von ihr oxidiert werden können.^[50] Außerdem unterscheidet sich das aktive Zentrum der Tyrosinase von denen des Hämocyanins und der Catechol-Oxidase nur in seiner Zugänglichkeit: Beim Hämocyanin wird das aktive Zentrum durch ein Phenylalanin blockiert. So können nur kleine Moleküle (z.B. Sauerstoff) gebunden werden. Bei Schnecken und Gliederfüßern transportiert tatsächlich Hämocyanin, und nicht Hämoglobin, den Sauerstoff durch den Körper.^[51] Die Catechol-Oxidase dagegen erfüllt eine

ähnliche Funktion wie die Tyrosinase, ist also für größere Substrate zugänglich. Ihr fehlt aber die Fähigkeit, Phenole in *ortho*-Position zu hydroxylieren.

Für den Katalysezyklus der Tyrosinase ist ein Mechanismus weitgehend akzeptiert, der erstmals 1985 von E. I. SOLOMON vorgeschlagen^[52] und seither nur leicht modifiziert wurde.^[53] Dieser Zyklus ist in Schema 1 abgebildet.



Schema 1: Modell des Katalysezyklus der Tyrosinase, dargestellt nach ESPIN et al.^[41] Der Übersichtlichkeit halber sind keine Substituenten am Substrat und nur zwei der jeweils drei Kupfer-Histidin-Liganden dargestellt. –M: Monophenol gebunden; –D: Diphenol gebunden.

Im *Phenolasezyklus* ist demnach der erste Schritt die Koordination von Sauerstoff an das Enzym in der *desoxy*-Form; hierdurch wird die *oxy*-Form* gebildet. Das Phenol bindet an ein Kupferatom des *oxy*-Komplexes und wird zum *o*-Diphenol hydroxyliert. Dieses bindet vermutlich zweizählig an den *met*-Komplex, welcher unter Oxidation des Diphenols zum *o*-Chinon und Wasserabspaltung zur *desoxy*-Form reduziert wird. Dadurch ist der Zyklus geschlossen.

In den *Catecholasezyklus* kann das Substrat dagegen an zwei Punkten eintreten, nämlich am *oxy*-Komplex und am *met*-Komplex. Der *oxy*-Komplex bildet sich wie auch beim Phenolasezyklus durch Koordination von Sauerstoff an die *desoxy*-Form des Enzyms; das

* Der Sauerstoff wird an das Kupferzentrum in einem planaren $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Komplex gebunden, in dem die O-O-Bindung erhalten bleibt.

Diphenol bindet daran und wird zum Chinon oxidiert. Die resultierende *met*-Form kann ein weiteres Diphenol oxidieren, wodurch die *desoxy*-Form zurückgebildet und der Zyklus geschlossen wird. Ein Durchlauf des Catecholasezyklus verbraucht ein O₂-Molekül und liefert zwei Moleküle des *o*-Chinons, der Phenolasezyklus dagegen nur eines.

Koordiniert jedoch das *Monophenol* an den *met*-Komplex, führt dies in eine Sackgasse, den „Inhibitorkomplex“. Dieser erklärt, warum die Tyrosinase Phenole erst nach einer Latenzzeit, der sogenannten „lag period“ umsetzen kann.^[11] Die Ruheform der Tyrosinase besteht – je nach Quelle des Enzyms und Art der Präparation – zu 70-98 % aus dem *met*-Komplex.^[53] Dieser *met*-Komplex stellt keinen Zugang zum Phenolasezyklus dar, und so wäre die Latenzphase als zeitweilige Inhibierung der *met*-Form durch gebundenes, im Überschuss vorliegendes Phenol aufzufassen. Der Phenolasezyklus kommt erst in Gang, wenn der verbleibende Rest des Enzyms genug Diphenol dargestellt hat, um das Monophenol aus dem Inhibitorkomplex zu verdrängen. Auch die Zugabe einer kleinen Menge Catechol oder 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin (L-Dopa) löscht die Latenzperiode aus.^[11]

Im Detail erweist sich der Mechanismus leider als nicht ganz so eindeutig, wie er hier dargestellt ist. Drei offene Fragen sollen hier kurz angerissen werden:

Erstens gibt es für die Erklärung der *o*-Hydroxylierung drei mechanistische Szenarien.^[40, 43] hier geht es darum, ob die O-O-Bindung des oxy-Komplexes *vor*, *nach* oder *gleichzeitig* mit dem Angriff des Sauerstoffs auf den aromatischen Ring gespalten wird. Diese drei Szenarien würden über folgende Zwischenstufen verlaufen (Abb. 1):

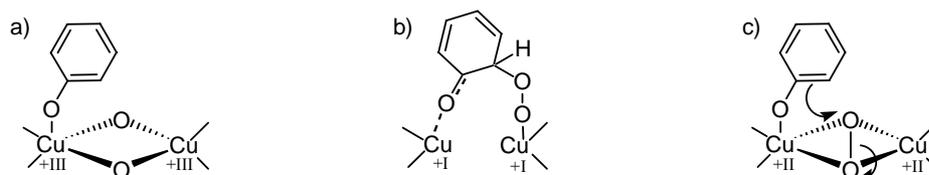


Abbildung 1: Mögliche Zwischenstufen im *o*-Hydroxylierungsschritt.

Im Fall a), der Spaltung der Bindung vor dem Angriff, würde die Hydroxylierung durch einen bis- μ -*oxo*-Komplex, also ein Cu(III)-Intermediat, erfolgen. Dass solche Komplexe durchaus in der Lage sind, Aromaten zu hydroxylieren, ist von W. B. TOLMAN an Modellverbindungen gezeigt worden.^[54, 55] Der Fall b) wäre durch die radikalische Bildung der Aryl-peroxo-Zwischenstufe nach der Bindung des Phenols an ein Kupferzentrum zu erklären.^[56] Dagegen ist im Fall c) von einer elektrophilen Substitution am Aromaten auszugehen, wobei eine Ladungsdonierung in die Cu-Zentren die Elektrophilie des Peroxoliganden vergrößert. Für ein Modellsystem, das erstmals von K. D. KARLIN beschrieben wurde,^[47, 48] konnte die

Beteiligung des bis- μ -*oxo*-Komplexes wie im Fall a) ausgeschlossen werden.^[49] Welcher dieser drei Mechanismen von der Tyrosinase tatsächlich durchlaufen wird, ist noch nicht geklärt; ein genaueres Verständnis der Reaktion könnte aber möglicherweise zu besseren Inhibitoren führen.

Die zweite Frage ist, ob das Diphenol nach der *o*-Hydroxylierung freigesetzt wird und neu angebunden werden muss, oder ob es erst nach der Oxidation zum *o*-Chinon das Enzym verlässt. Für die Betrachtung der Latenzperiode würde letzteres bedeuten, dass das Chinon erst chemisch zum Catechol reduziert werden muss, ehe es als Substrat für Tyrosinase dienen und das Phenol vom *met*-Komplex verdrängen kann. Es gibt einen Bericht über die direkte Freisetzung des Diphenols,^[46] dessen endgültige Einordnung aber abzuwarten bleibt.

Drittens ist nicht sicher, dass Catechole wirklich zweizählig an den Kupferkomplex binden, wie es in Schema 1 dargestellt ist. Die Kristallstruktur der Catechol-Oxidase aus Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*)^[33, 36] zeigt eine rigide aktive Tasche, in der die Bindung des Catechols nur an *ein* Kupferatom erfolgt: das andere wird durch ein Phenylalanin abgeschirmt. Möglicherweise ist aber genau dies der Grund, weshalb die Catechol-Oxidase keine Phenolaseaktivität zeigt, Tyrosinase dagegen schon. Dann wäre im Fall der Tyrosinase auch die zweizählige Bindung des Catechols möglich.

2.2 Peptidsynthese

Für einen auch nur einigermaßen umfassenden Überblick über moderne Methoden zur Synthese von Peptiden erscheint der Platz hier nicht ausreichend; für diese Arbeit sind jedoch zwei umgrenzte Themen besonders relevant: die Synthese lipidierter Peptide und die Verwendung von Phenylhydrazid als Schutzgruppe. Deshalb soll im folgenden Abschnitt in aller gebotenen Kürze auf diese beiden Aspekte eingegangen werden. Einen umfassenden Überblick über Kenntnisstand und Entwicklungen in der Peptidsynthese gibt ein neuer Band des HOUBEN-WEYL „Methoden der Organischen Chemie“.^[57]

2.2.1 Synthese lipidierter Peptide

Sowohl in Lösung als auch an der festen Phase sind lipidierte Peptide erfolgreich dargestellt worden, und eine Reihe von Übersichtsartikeln gibt einen Überblick über die zugrundeliegenden Synthesestrategien.^[58-60] Grundsätzlich können verschiedene Lipid-Reste (z.B. Farnesyl-, Palmitoyl- oder Myristoylgruppen, Abb. 2) entweder durch Ankupplung modifizierter Bausteine oder durch nachträgliche Modifikation des selektiv geschützten Peptids eingeführt werden.

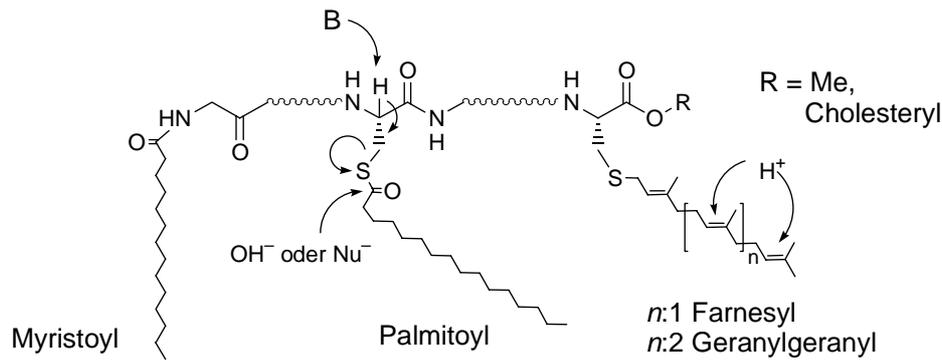


Abbildung 2: Einige posttranslationale Lipidmodifikationen und ihre Labilität gegen Säuren und Basen.

Jede Synthesestrategie muss dabei die ausgeprägte Labilität der einzelnen Modifikationen beachten: Isoprenoide sind äußerst empfindlich gegenüber Säuren, so dass sich der Einsatz säurelabiler Boc-Schutzgruppen genauso verbietet wie der hydrogenolytisch abzuspaltender Funktionalitäten, z.B. Z- oder Benzylgruppen. Im Gegensatz dazu werden die Thioesterfunktion palmitoylierter Cysteine von Nukleophilen angegriffen, und unter basischen Bedingungen kommt es zur Eliminierung zum Dehydroalanin.

Bei *N*-terminal freiem *S*-palmitoyliertem Cystein tritt als Nebenreaktion eine *S/N*-Acylwanderung auf, die eine weitere *N*-terminale Verlängerung verhindern kann. Dipeptid-Ester neigen ferner bei ihrer Entschützung zur Bildung von Diketopiperazinen. Bei der Synthese lipidierter Peptide ist es aus diesen Gründen oft schwierig, eine geeignete Schutzgruppenstrategie zu finden, ganz besonders, wenn *unterschiedliche* Lipide eingebaut werden müssen.

Die Methoden zur Festphasensynthese lipidierter Peptide lassen sich weiter einteilen: zum ersten in die Synthese unmodifizierter Peptide an der festen Phase, welche anschließend in Lösung mit lipidierten Bausteinen kondensiert werden;* zum zweiten die Ankupplung lipidierter Bausteine am polymeren Träger; zum dritten die Synthese des Peptidrückgrats und nachfolgende selektive Lipidierung an der festen Phase.

Seit einiger Zeit sind sowohl die Palmitoylierung^[60-63] als auch die Farnesylierung^[64] am polymeren Träger möglich. Werden die Palmitoylierungs- und Farnesylierungspositionen im Molekül mit geeigneten Schutzgruppen orthogonal maskiert, können farnesylierte *und* palmitoylierte Peptide an der festen Phase dargestellt werden.

* Offensichtlich handelt es sich hierbei nicht im eigentlichen Sinne um eine Lipopeptidsynthese an der festen Phase; dennoch wird diese Methode hier mitgezählt, da sie u.a. in dieser Arbeit von praktischer Bedeutung ist.

2.2.2 *Phenylhydrazid als aktivierende Schutzgruppe*

Phenylhydrazide wurden bereits 1951 als oxidativ spaltbare Schutzgruppe in der Peptidsynthese beschrieben.^[65] In den folgenden Jahrzehnten wurden eine Reihe verschiedener Einführungs- und Abspaltungsmethoden entwickelt.^[66-70] Besonders vielversprechend erschien folgende Entdeckung: bei der Oxidation mit *N*-Brom-Succinimid (NBS) kann das intermediär gebildete Acyldiazon isoliert werden; dieses lässt sich als aktivierte Verbindung direkt mit Aminen in Peptidkupplungen einsetzen.^[71] Der Siegeszug der Carbodiimid-vermittelten Peptidkupplung marginalisierte die Phenylhydrazidgruppe jedoch fast völlig. Eine begrenzte Renaissance erlebt sie erst in jüngster Zeit, da ihre Verwendung als oxidationslabile Linkergruppe in der Festphasensynthese – obwohl erstmals schon 1970 von T. WIELAND et al. beschrieben^[72] – wiederentdeckt wurde.^[64, 73-75]

Berichte von A. N. SEMENOV et al. über eine enzymatische Abspaltungsmethode mit Laccase oder Meerrettich-Peroxidase^[76, 77] bildeten den Ausgangspunkt für Arbeiten zur Oxidation von Phenylhydraziden mit Tyrosinase, die von Dr. Gernot Müller begonnen^[78, 79] und von mir im Rahmen dieser Dissertation fortgeführt wurden.^[80]

2.3 Krebs - Fehlsteuerung zellulärer Prozesse

Unermüdlich setzt sich die Weltgesundheitsorganisation WHO für den Kampf gegen Infektionskrankheiten ein – ob Pocken, Pest und Polio, oder HIV, Tuberkulose und Malaria. Durch Impfungen, Medikation und verbesserte Hygiene konnten Pest und Pocken tatsächlich zurückgedrängt werden, selbst wenn in jüngster Zeit Erkrankungen wie die Tuberkulose wieder auf dem Vormarsch zu sein scheinen.

Diese Bemühungen haben zusammen mit verbesserten Nahrungsmitteln, aber auch Arbeitsschutzmaßnahmen die Lebenserwartung in den Industrienationen deutlich steigen lassen. Mit dem Rückgang der Infektionskrankheiten hat die Bedeutung von Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen deutlich *zugenommen*; in Deutschland sind sie derzeit hinter Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Etwa jeder vierte Bundesbürger stirbt an Krebs, im Jahr 2000 waren das 210000 Menschen.^[81] Da die Todesfälle durch Herz-Kreislauferkrankungen seit 1970 stetig abnehmen, dürfte in knapp zwanzig Jahren Krebs sogar zur häufigsten Todesursache werden. In der öffentlichen Wahrnehmung wird Krebs als besonders tückisch empfunden; immer wieder wird Krebs als neue „Geißel der Menschheit“ bezeichnet. Diese Wahrnehmung spiegelt sich auch in der Politik wieder: so „erklärten“ die Vereinigten Staaten von Amerika 1971 in Person ihres Präsidenten Richard Nixon dem Krebs „den Krieg“ und begründeten ein

nationales Anti-Krebs-Programm, für das in den darauf folgenden zwanzig Jahren 25 Milliarden US-Dollar ausgegeben wurden.^[82]

Hand in Hand mit der stürmischen Entwicklung der Biologie hat die Krebsforschung in den letzten dreißig Jahren einen Wissensschatz von unglaublicher Komplexität generiert. An zahllosen Beispielen ist deutlich geworden, dass Krebs auf dynamische Veränderungen im Erbgut zurückgeht. Mutationen wurden identifiziert, die zu Onkogenen mit erhöhter Aktivität führen, und solche, die Tumorsuppressoren rezessiv abschalten; immer schneller gewann das Bild an Komplexität, bis es zu dem beinahe unüberschaubaren Netzwerk aus herauf- und heruntergeregelten zellulären Schaltern wurde, das die heutige Literatur beschreibt.^[83]

Derzeit vollzieht sich jedoch ein Paradigmenwechsel - ein Auslöser dafür war die Feststellung, dass Krebs erst nach vier bis sieben zufälligen Ereignissen (Mutationen) entsteht.^[84] Tritt man von der Ebene der mutierten Gene und Proteine einen Schritt zurück und betrachtet Krebs von einem funktionalen Standpunkt, unterscheiden sich Krebszellen nach D. HANAHAN und R. A. WEINBERG von gesunden Zellen in sechs Eigenschaften: sie

- brauchen keine externen Wachstumssignale,
- ignorieren wachstumshemmende Signale,
- umgehen den programmierten Zelltod (Apoptose),
- besitzen die Fähigkeit zur unbegrenzten Replikation (Immortalisation),
- versorgen sich mit Nährstoffen, indem sie die Bildung neuer Adern (Angiogenese) herbeiführen, und
- sind schließlich in der Lage, in andere Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden.^[83]

Diese sechs Eigenschaften hängen mit Veränderungen der zellulären Signalverarbeitung zusammen, Krebs lässt sich daher (ebenso wie andere, z.B. entzündliche Erkrankungen) als eine „Signaltransduktionskrankheit“ auffassen.^[82] Jeder Tumor erwirbt diese Eigenschaften in einem „evolutiven“ Prozess durch die erwähnten vier bis sieben Mutationen, die Reihenfolge ist dabei nicht festgelegt. Manche Mutationen aktivieren mehrere Funktionen gleichzeitig, z.B. kann der Verlust des Tumor-Suppressor-Proteins p53 sowohl die Angiogenese fördern als auch die Apoptose ausschalten.^[85] Andere Eigenschaften werden erst im Zusammenspiel mehrerer Mutationen erworben; daraus ergibt sich die genannte Anzahl von Mutationen.

Bis weit in die 90er Jahre bestand die Behandlung von Krebs hauptsächlich aus der (chirurgischen) Entfernung des Krebsgewebes in Kombination mit Bestrahlung und/oder

Chemotherapie. Als Chemotherapeutika wurden Substanzen verwendet, die auf verschiedene Weise in die Mechanismen der Zellteilung eingreifen, Stoffe beispielsweise, die mit der DNA reagieren (*cis*-Platin, alkylierende Verbindungen) oder in die Stabilität des Cytoskeletts eingreifen (Vinblastin, Taxol). Diese cytotoxischen Substanzen weisen zwar beträchtliche Nebenwirkungen auf, für bestimmte Krebsarten können aber gute Heilungsraten erzielt werden, etwa bei verschiedenen Leukämien, Blasen- und Hodenkrebs. Gerade bei den häufigsten Krebsarten (Brust-, Lungen-, Dickdarmkrebs) versagen diese Chemotherapeutika jedoch häufig, und so sucht man seit den 90er Jahren intensiv nach Alternativen. Beispiel dafür sind Versuche, direkt in die veränderte Signaltransduktion des Tumors einzugreifen.^[82]

Das Modell von HANAHAN und WEINBERG macht klar, warum die Krankheit (trotz gewisser Fortschritte) erst so wenig von ihrem Schrecken verloren hat: Zu jeder der sechs erwähnten Eigenschaften gibt es eine Vielzahl möglicher Wege, und somit können Therapien, die an *einer bestimmten* Mutation angreifen, auch nur dann wirken, wenn der individuelle bekämpfte Krebs eben diese Mutation aufweist. Somit müsste eine große Zahl verschiedener Zielproteine gleichzeitig adressiert werden, was die Suche nach neuen Wirkstoffen in ein gewaltiges Puzzle verwandelt. Zum Glück gibt es aber einige wenige „prominentere“ Mutationen, die so oft an der Tumorentstehung beteiligt sind, dass sie einen Ansatzpunkt für die Krebstherapie bieten können. Zu diesen herausgehobenen „Targets“ gehören die onkogenen Ras-Proteine.

2.3.1 Die Ras-Proteine als zelluläre Schalter

Säugetierzellen enthalten 50-100 verschiedene GTP-bindende Proteine. Diese agieren als molekulare Schalter und steuern so verschiedene biologische Prozesse, z.B. die Protein-Biosynthese, Transportvorgänge innerhalb der Zelle oder die Weiterleitung von externen Signalen in das Zellinnere.^[86] Unter diesen GTP-bindenden Proteinen besitzen die Ras-Proteine eine besonders herausragende Stellung.

Es gibt drei *ras*-Gene, die vier verschiedene Ras-Proteine kodieren: H-, N- und K-Ras, welches in zwei Varianten (K-Ras4A und 4B) vorkommt. Diese Proteine unterscheiden sich im wesentlichen nur in ihrem C-terminalen Bereich, der „hypervariablen Domäne“. Ras reguliert verschiedene Signaltransduktionsprozesse, es durchläuft dabei zyklisch einen GTP-gebundenen aktiven und einen GDP-gebundenen inaktiven Zustand und übersetzt so Wachstumssignale in die Expression von Genen (Abb. 3).^[5, 87]

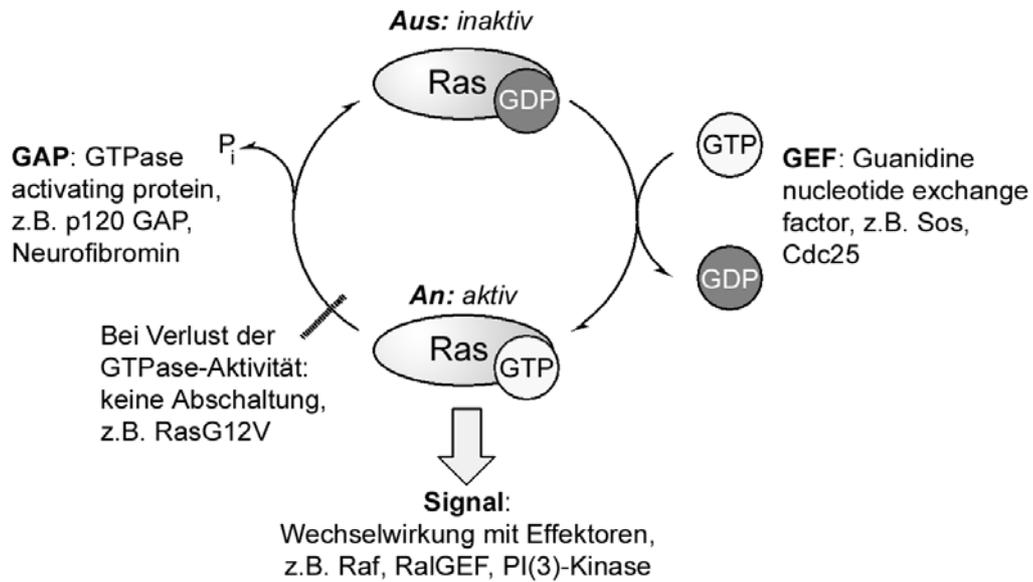


Abbildung 3: Der Aktivierungszyklus von Ras.

Die regulierten Prozesse sind vielfältig; sie umfassen beispielsweise Zellwachstum und -differenzierung, die Steuerung von Zellzyklus und Apoptose.^[88] Obwohl sich diese Funktionen zu widersprechen scheinen, haben gerade sie zu einer realistischeren Vorstellung davon geführt, wie die Informationsverarbeitung in der Zelle abläuft. Lange Zeit lag es nahe, einzelne Signaltransduktionskaskaden als lineare „Leitung“ zur Signalweitergabe zu sehen, deren Aktivierung ein bestimmtes zelluläres Ereignis zur Folge habe. Diese Vorstellung bezauberte durch ihre Einfachheit, ist aber falsch. Heute weiß man, dass die einzelnen Kaskaden überaus stark vernetzt sind und sich so ein komplexer „Schaltplan“ der Zelle ergibt.^[83, 88, 89] Nicht das Signal der einzelnen Kaskade bestimmt, wie die Zelle auf einen Reiz antwortet, sie reagiert vielmehr auf den Zustand des gesamten Netzwerks.^[87] In Abb. 4 sind einige Signalkaskaden angedeutet, die durch Ras stimuliert werden. Inzwischen weiß man, dass nicht nur Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) Ras aktivieren, sondern auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Tyrosinkinase wie Src. Ebenso stimuliert Ras seinerseits nicht nur das Raf-Protein und damit den MAPK-Signalweg (Mitogen Activated Protein Kinase), sondern auch die PI3-Kinase und den Ral-Signalweg. Die Ras-Proteine sind also in mehrere Signalkaskaden eingebunden und nehmen eine Schlüsselstellung in der Regulation der zellulären Abläufe ein.

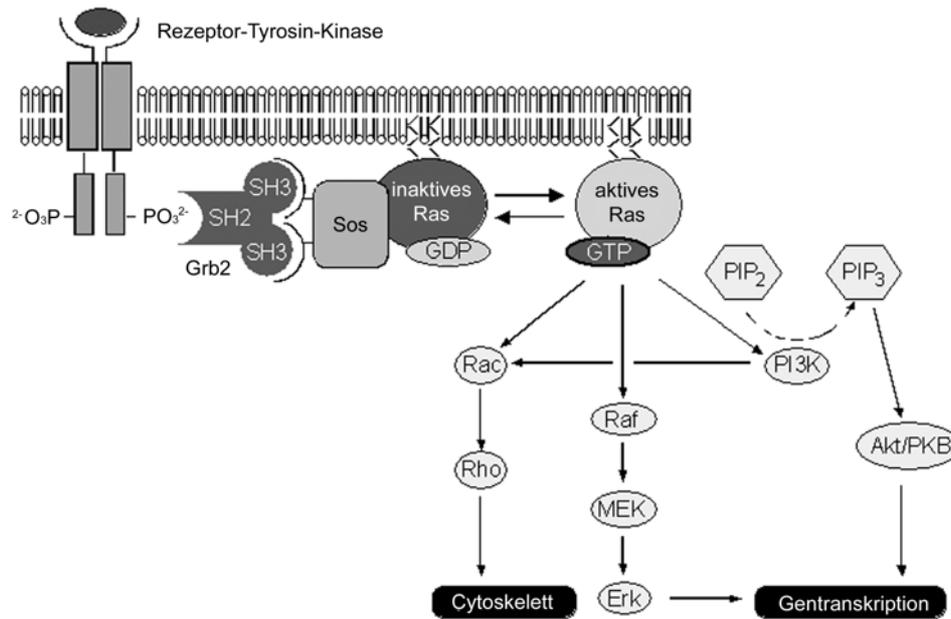


Abbildung 4: Durch Ras stimulierte zelluläre Signalkaskaden.^[90]

Punktmutationen in den *ras*-Genen können zu Proteinen führen, die unfähig sind, GTP zu hydrolysieren – sie sind folglich immer aktiviert und damit unabhängig von externen Wachstumssignalen. Dies war aber die erste der sechs Eigenschaften, die eine Zelle auf dem Weg zur Krebszelle erwerben muss! Ras ist an entscheidender Stelle in mehreren Kaskaden eingebettet; darum weisen über 30 % der menschlichen Tumore aktiviertes Ras auf. Somit stellt Ras ein ähnlich prominentes Ziel für die Krebstherapie dar wie das Protein p53, das die Integrität der Erbinformation überprüft und sogar in 50 % der Tumore inaktiviert ist.^[91]

2.3.2 Posttranslationale Modifikation von Ras

Ras-Proteine sind nur dann biologisch aktiv, wenn sie an der Innenseite der Plasmamembran (PM) lokalisiert sind. Hierzu durchlaufen die Proteine eine Serie posttranslatiöner Modifikationen.^[92] Ras, das diese Modifikationen nicht aufweist, befindet sich im Cytosol und ist inaktiv. Für die Membrananbindung ist allein die hypervariable Domäne ausschlaggebend.

Ras gehört zu den sogenannten CaaX-Proteinen; der Name stammt von der Sequenz des C-Terminus nach der Expression.* Das CaaX-Motiv ist eine Erkennungssequenz für Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferasen, die die entsprechenden Isoprenoide auf das Cystein in der

* Hierin steht die Bezeichnung a für (beliebige) aliphatische Aminosäuren, X für die Aminosäure, die bestimmt, ob das Protein farnesyliert oder geranylgeranyliert wird: Farnesyliert werden Proteine mit X = S, M, C, A, Q; geranylgeranyliert werden Proteine mit X = L oder F.^[93] Im Falle von N-Ras ist die CaaX-Sequenz CVVM.

Nähe des C-Terminus übertragen.* Nach der Prenylierung wird das aaX-Tripeptid von einer Protease entfernt und das freie Cystein durch eine Methyltransferase verestert (Abb. 5). Im Endeffekt tragen somit alle Ras-Proteine an ihrem C-Terminus einen farnesylierten Cysteinmethylester. Von diesem Punkt an aber verlaufen die Wege der Isoformen unterschiedlich: K-Ras4B weist eine polybasische Sequenz in der Nähe des C-Terminus auf, die durch elektrostatische Interaktion mit der positiv geladenen Membranoberfläche die feste Anbindung an die Plasmamembran herbeiführt, die anderen Isoformen werden mit einem oder mehreren Palmitoylresten versehen.^[92] Abbildung 5 stellt diese Prozessierung am Beispiel des N-Ras-Proteins dar.

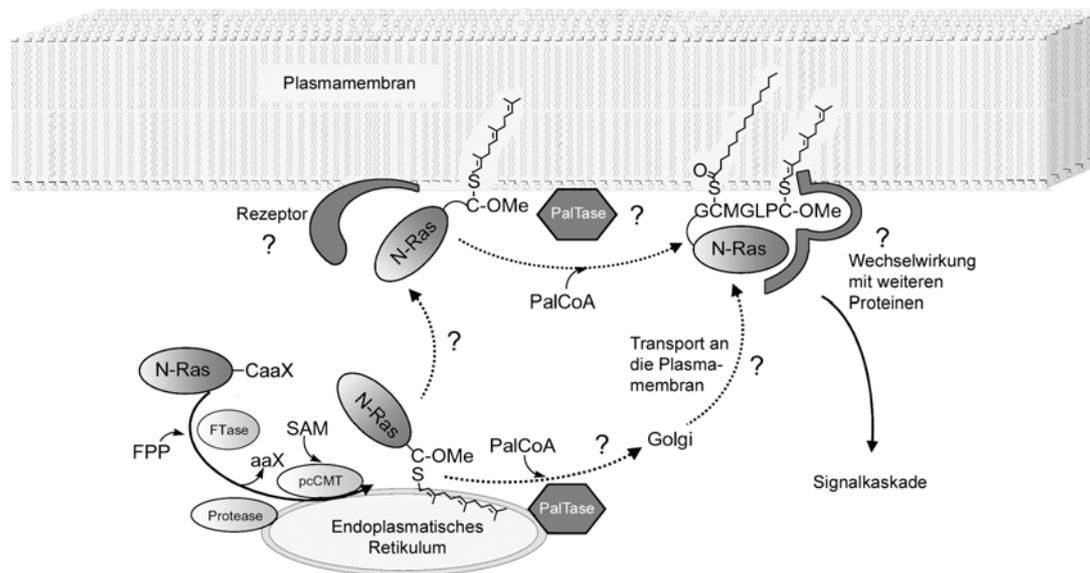


Abbildung 5: Posttranslationale Modifikation von N-Ras.^[90] Abkürzungen: FPP: Farnesylpyrophosphat, FTase: Farnesyl Transferase, pcCMT: proteocytosolische Carboxymethyltransferase, SAM: S-Adenosyl-Methionin, PalCoA: Palmitoyl-Coenzym A, PalTase: Palmitoyltransferase.

Da wir um die ersten Schritte der N-Ras-Prozessierung so genau Bescheid wissen, erscheint es fast kurios, wie sehr wir über das weitere Schicksal des Proteins im Dunkeln tappen: Gibt es ein Enzym, das den Palmitoylrest auf Ras überträgt? Wo würde sich eine solche Palmitoyltransferase befinden, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), an der Plasmamembran oder im Golgiapparat? Besitzt die Plasmamembran einen Rezeptor für Ras-Proteine und werden sie dorthin vektorieell transportiert? Und dann – spielt die Farnesylgruppe neben ihrer Funktion als Membrananker auch eine direkte Rolle bei der Wechselwirkung von

* Die Ras-Proteine sind alle farnesyliert. Wird die Farnesyltransferase blockiert, können sie jedoch auch geranylgeranyliert werden, dies geschieht aber deutlich langsamer.

Ras mit manchen seiner Effektoren? Und wie viel Richtiges ist an der Vermutung, dass die physiologisch reversible Palmitoylierung die Aktivität des Proteins steuert?

Derzeit werden zwei Modelle diskutiert, die erklären, wie Ras-Proteine palmitoyliert und an die Plasmamembran gebunden werden.

Das erste Modell wird als „kinetic trapping“-Modell bezeichnet. Ihm liegt die Annahme zugrunde, dass sich farnesylierte Proteine reversibel in verschiedene zelluläre Membranen einlagern können.^[94, 95] Erst durch den zweiten Lipidrest würden sie irreversibel an die Membran gebunden. Demnach müsste die Palmitoylierung an der Plasmamembran stattfinden, sei es enzymatisch oder spontan; tatsächlich gibt es Berichte über einen PM-gebundenen „Ras-Rezeptor“.^[96, 97] Gestützt wird dieses Modell durch Vesikelexperimente, mit denen die Dissoziation modifizierter Peptide untersucht wurde. Farnesylierte Peptide wiesen in diesen Membranmodellen eine Halbwertszeit von Minuten, zusätzlich palmitoylierte eine Halbwertszeit von mehreren Tagen auf.^[94]

Das zweite Modell wird durch Experimente der Gruppen von J. F. HANCOCK und M. R. PHILIPS gestützt. Sie untersuchten verschiedene Ras-Mutanten und beobachteten, dass die CaaX-Box und ein weiteres Signal (also eine Palmitoylierung oder polybasische Sequenz) erforderlich sind, um die Proteine an die Plasmamembran zu binden.^[92, 98, 99] Dabei leitet das CaaX-Motiv die Proteine zum Endomembransystem, an dem die CaaX-Endopeptidase^[100] und die Carboxymethyltransferase^[101] lokalisiert sind. Elegante Transfektionsexperimente zeigten, dass Ras-GFP-Konstrukte (Green Fluorescent Protein) auf ihrem Weg zur Plasmamembran zunächst im ER und dann im Golgiapparat auftauchen, von wo sie in Vesikeln an die Plasmamembran transportiert werden.^[102, 103] Anscheinend wird K-Ras durch sein polybasisches Motiv auf das Netzwerk der Mikrotubuli umgeleitet, denn Behandlung mit Taxol stört seine Lokalisation. H-Ras-Mutanten ohne Palmitoylierungsstelle werden zwar zum Golgiapparat transportiert, können ihn aber nicht mehr verlassen. Hieraus schließen die Autoren, dass die Palmitoyltransferase am Endoplasmatischen Retikulum oder am Golgiapparat lokalisiert sein müsste.

Großes Aufsehen erregte 1996 der Bericht über die Aufreinigung einer Palmitoyltransferase von der Gruppe von M. H. GELB.^[104] Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich bei dem Enzym in Wirklichkeit um eine Thiolase aus den Peroxisomen handelte; als Bestandteil dieser Organellen kommt sie für die physiologische Regulation der Ras-Palmitoylierung nicht in Frage.^[105]

Eine neue Veröffentlichung aus der Gruppe von R. J. DESCHENES berichtet über die Identifikation einer Palmitoyltransferase in Hefe (*S. cerevisiae*).^[106] Dieses Produkt der *erf2*-

und *erf4*-Gene soll am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sein. Die Autoren deuten an, dass es zwei Palmitoylierungswege für Ras geben könnte: der eine hinge von dieser Palmitoyltransferase am ER ab, der andere nicht.

Ergänzend seien hier Untersuchungen mit dem Ergebnis erwähnt, dass die Farnesylgruppe und die CaaX-Sequenz als solche für die biologische Aktivität gar nicht unbedingt benötigt werden.^[107, 108] Proteine, bei denen die C-terminale Farnesylgruppe durch einen N-terminalen Myristoylrest ersetzt wurde, waren trotzdem aktiv, ebenso nicht farnesylierbare Proteine, die stattdessen eine Hexalysinsequenz aufweisen. Auch die Inkorporation einer Hexadecylgruppe anstelle des Farnesylrestes beeinflusst die biologische Aktivität nicht entscheidend.^[109] Diese Beobachtungen sind allesamt konsistent mit dem *kinetic trapping*-Modell, dagegen nur schwer mit den Befunden von HANCOCK und PHILIPS in Einklang zu bringen.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Interaktion von Ras mit anderen Proteinen: es wurde für eine Reihe von Effektorproteinen beobachtet, dass ihre Bindung an Ras die Farnesylgruppe einschließt.^[110] Effektoren, für die diese Wechselwirkung mit der Farnesylgruppe nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise Raf^[111], PI-3-Kinase^[112] oder Sos^[113, 114]. Demnach scheint die Farnesylgruppe über ihre Funktion als Membrananker hinaus auch aktiv bestimmte Protein-Proteinwechselwirkungen zu steuern.

Schließlich deutet manches darauf hin, dass die verschiedenen Ras-Proteine unterschiedlich in cholesterolreiche „Membrankompartimente“ – so genannte *lipid rafts*^[115, 116] – assoziiert sind,^[117, 118] und dass ihre Präferenz für diese „rafts“ sogar vom gebundenen Nukleotid abhängt.^[119] Was das für die Signalweiterleitung bedeutet, ist völlig ungewiss. Auf dieselbe regulatorische Funktion könnte aber hinauslaufen, dass die Palmitoylierung physiologisch reversibel ist.^[93, 120-122]

Das Wissen um die Palmitoylierung von Ras und seine Anbindung an die Plasmamembran ist also bruchstückhaft: die beteiligten Proteine sind noch nicht zweifelsfrei identifiziert, und was die Veresterung mit Fettsäuren für Membraneinlagerung und Wechselwirkung mit anderen Proteinen bedeutet, wird ebenfalls widerstreitend debattiert.

2.3.3 Ras-Proteine als molekulares Ziel in der Krebstherapie

Im Abschnitt 2.3.1 (Die Ras-Proteine als zelluläre Schalter) wurde gezeigt, *weswegen* Ras-Proteine einen guten Ansatzpunkt zur Therapie von Krebserkrankungen darstellen – in diesem Abschnitt soll es darum gehen, *wie* solche Therapien aussehen könnten. Ziel muss es sein, das dauerhafte Signal des mutierten Ras-Proteins zu stören und so die laufende Zellteilung zu

unterbinden; dies kann nach DE GUNZBURG mit vier verschiedenen Strategien erreicht werden.^[123] So könnte man

- die Signalweitergabe blockieren,
- das „Anschalten“ des Proteins verhindern,
- das Protein gezielt „abschalten“, oder
- es gar nicht erst an die Plasmamembran gelangen lassen, also seine Biosynthese und Prozessierung stören.

Die erste Strategie basiert darauf, dass die Wechselwirkung von Ras mit seinen Effektoren, also mit Raf, PI3-Kinase etc., verhindert werden soll. In der Tat sind Raf-Peptide beschrieben worden, die die Ras-Raf-Wechselwirkung *in vitro* mit mikromolarer Affinität inhibieren.^[124]

Auch Sulindac-Sulfid blockiert diese Wechselwirkung.^[125] In klinischen Phase-II-Studien wurden Patienten vorbeugend mit Sulindac behandelt, die erblich zu Darmpolypen und Dickdarmkrebs neigen.^[126] Diese Untersuchungen sind vielversprechend verlaufen.

Das *Anschalten* des onkogenen Ras-Proteins ließe sich verhindern, indem man den Austausch des GDP durch GTP ausschließt. Dieser Austausch wird durch Austauschfaktoren (GEF) katalysiert; die Inhibition dieser Proteine könnte Ras im ausgeschalteten Zustand halten.

Das gezielte *Abschalten* des Proteins könnte auf zwei Arten hervorgerufen werden: entweder durch Stimulierung der GTPase-Aktivität der mutierten Ras-Proteine oder durch direkte Hydrolyse des gebundenen GTP. Zwar gibt es die Beobachtung, dass das GTP-Derivat DABP-GTP von onkogenem Ras schneller hydrolysiert wird als vom Wildtyp,^[127] aber es ist schwierig, dies tatsächlich für eine Therapie zu nutzen.

Am weitesten sind die Versuche gediehen, in die Synthese und Modifikation der Ras-Proteine einzugreifen. Allerdings steht eine Antisense-Therapie mit Oligonukleotiden noch vor einer Reihe praktischer Probleme: zum Beispiel müsste sie selektiv die *Translation* des *onkogenen* Ras-Proteins verhindern, nicht aber die des Wildtyps. In die post-translationale *Prozessierung* kann man dagegen schon recht erfolgreich eingreifen: einige Farnesyltransferaseinhibitoren sind bereits in klinischen Tests der Phase III.^[123] Allerdings wurde deutlich, dass die Zellen die fehlende Farnesylierung teilweise durch Geranylgeranylierung kompensieren;^[128] verantwortlich für die Effekte auf Tumoren scheint gar nicht Ras selbst zu sein, sondern andere farnesylierte Proteine.^[129]

Verstände man die letzten Schritte der Ras-Prozessierung genauer, böten sich womöglich neue, bessere Ziele, z.B. die Blockierung eines möglichen Ras-Rezeptors oder der Palmitoyltransferase. So könnte die Suche nach den beteiligten Proteinen zu selektiveren

Medikamenten mit geringeren Nebenwirkungen führen – und das wäre nicht nur akademisch interessant, sondern auch praktisch bedeutsam.

2.3.4 Photoaffinitätsmarkierung

1962 berichteten F. WESTHEIMER et al.^[130] von ihrer Idee, nicht-kovalente Wechselwirkungen durch photolytische Aktivierung von Diazoverbindungen zu fixieren und so nachzuweisen. Seitdem hat sich die Photoaffinitätsmarkierung fest im biochemischen Repertoire etabliert, und sie ist ständig weiter entwickelt worden.^[131-136] Standen zunächst neue photoaktivierbare Gruppen und das Verständnis ihres photochemischen Verhaltens im Vordergrund, hat sich der Schwerpunkt in den letzten Jahrzehnten im Zuge der Leistungszunahme der analytischen Verfahren verschoben: immer komplexer werden die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, die mit Hilfe der Photoaffinitätsmarkierung entschlüsselt werden können.

Das Grundprinzip ist über die Jahre unverändert geblieben: Ein chemisch inertes, aber durch Licht aktivierbares Analogon des Liganden bildet unter UV-Bestrahlung eine hochreaktive Spezies (z.B. ein Carben, Nitren oder Radikal), die irreversibel mit dem Rezeptor reagiert (Abb. 6). Mit Hilfe einer zweiten Markierung kann der vernetzte Ligand-Rezeptor-Komplex detektiert werden, woran sich z.B. die Charakterisierung der Bindungsstellen anschließen kann. Als Markierungen dienen häufig radioaktive Isotope (^3H , ^{33}S , ^{125}I), aber auch Biotin eignet sich für diesen Zweck.

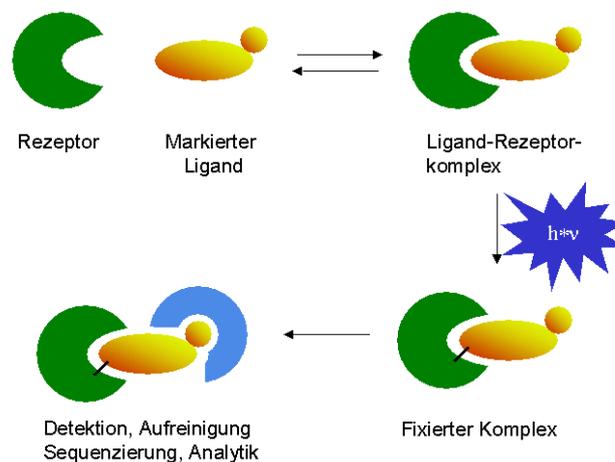


Abbildung 6: Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung.

Die wichtigsten photoaktivierbaren Gruppen sind heute Arylazide (**a**), Trifluormethyldiazirine (**b**) und Benzophenone (**c**) (Abb. 7).

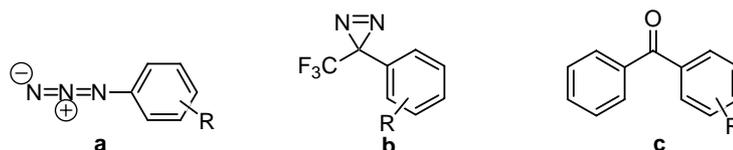


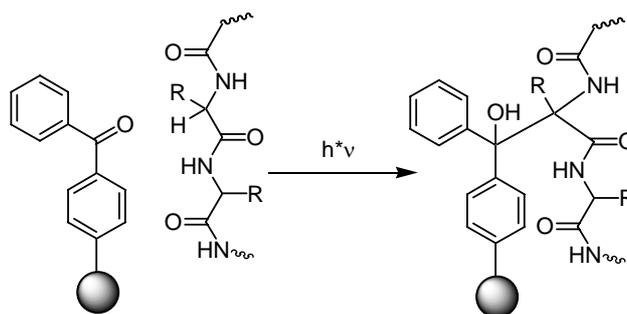
Abbildung 7: Einige ausgewählte Photolabel.

Arylazide (**a**) sind die mit Abstand am häufigsten verwendeten Photoaffinitätsmarker; sie sind klein, synthetisch gut zugänglich, leicht handhabbar und chemisch (im Dunkeln) relativ stabil. Sie haben aber zwei gravierende Nachteile: Erstens lassen sich die wenigsten Arylazide mit Licht von Wellenlängen *über* 300 nm aktivieren, kurzwelligere Strahlung führt jedoch zur Schädigung des untersuchten Proteins. Und zweitens ist die reaktive Spezies gar nicht das Nitren, wie lange vermutet wurde: dieses lagert zum Didehydroazepin um, das eine ganz andere Reaktivität als das Nitren zeigt und nur mit starken Nukleophilen reagiert, z.B. mit Cystein- und Histidinseitenketten, nicht aber mit Hydroxygruppen oder Lysin.^[137]

Die Trifluormethylphenyldiazirine^[138] (**b**, TPD) sind von ihren photochemischen Eigenschaften deutlich besser als Markierung geeignet: Durch Bestrahlung bei 320-350 nm bildet sich das Triplett-Carben, das in C-H- oder O-H-Bindungen insertieren kann. Dabei werden nicht nur hohe Quantenausbeuten, sondern auch befriedigende chemische Ausbeuten erzielt. Dieses Label ist chemisch stabil*, muss allerdings über sechs Stufen hergestellt und unter absolutem Lichtausschluss gehandhabt werden. Diazirine sind äußerst erfolgreich eingesetzt worden, um vielschichtige biologische Bindungsphänomene zu untersuchen. Exemplarisch sei hier die Untersuchung des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors erwähnt, bei der mit radioiodierten Diazirinen Ausdehnung und Lage der Transmembrandomänen kartiert wurden.^[139]

Benzophenone (**c**, BP) sind dagegen in verschiedensten Substitutionsmustern kommerziell verfügbar und können ohne besondere Vorkehrungen gehandhabt werden. Sie werden bei Wellenlängen um 350 nm aktiviert, und das Ketylradikal insertiert bevorzugt in nichtaktivierte C-H-Bindungen. Bei Peptiden sind das die α -CH-Bindungen, wobei keine Selektivität für bestimmte Aminosäuren vorliegt (Schema 2).^[133]

* Bei der Markierung primärer Amine tritt jedoch eine Eliminierung auf, durch die das Label verloren geht.



Schema 2: Insertion von Benzophenon in nicht-aktivierte CH-Bindungen des Peptidrückgrats.

Zwar ist die Quantenausbeute bei diesem Prozess nicht sehr hoch, in Ermangelung geeigneter Bindungspartner relaxiert das Diradikal aber zum Benzophenon zurück, so dass das Label regeneriert wird; zudem ist die chemische Stabilität der Benzophenone außerordentlich gut.

Benzophenone sind beispielsweise an N-Ras-CaaX-Peptide angeknüpft worden, um die Farnesyltransferase zu untersuchen.^[140] BP-markierte Farnesylanaloga sind in den Gruppen von M. D. DISTEFANO und G. D. PRESTWICH hergestellt worden. Mit diesen Analoga wurden die Farnesyl- und Geranylgeranyltransferase untersucht.^[141-145] Parallel zu dieser Dissertation ist BP-markiertes farnesyliertes Cystein als Sonde zur Kartierung der Bindungsstellen zwischen G-Proteinen und ihren Effektoren vorgeschlagen worden.^[146]

Zusammengefasst sind also sowohl Benzophenone (**c**) als auch Diazirine (**b**) als Photolabel sehr gut geeignet; im Vergleich weisen Diazirine in der Regel höhere Quantenausbeuten und damit eine bessere Kopplungseffizienz auf, während Benzophenone eine leicht geringere Chemospezifität zeigen. Diazirine sind dafür schwieriger zu handhaben, zudem muss der Photophor erst in sechs Stufen hergestellt werden. Diese Synthese entfällt für die Benzophenone.

3 Ziel der Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war, einen synthetischen Zugang zu photoaktivierbaren menschlichen N-Ras-Peptiden zu gewinnen und einen Satz verschieden modifizierter Sonden darzustellen. Biologische Experimente sollten anschließend absichern, dass die bereitgestellten Sonden zur Untersuchung der Ras-Prozessierung wirklich geeignet sind. Diese Peptide sollten dem C-terminalen N-Ras-Heptapeptid nach erfolgter post-translationaler Modifikation, jedoch vor dem Palmitoylierungsschritt entsprechen. Als Photoaffinitätsmarkierung wurden verschieden substituierte Benzophenone (BP) ausgewählt; diese versprachen nicht nur günstige photochemische Eigenschaften, sondern sollten synthetisch leicht zugänglich und gut handzuhaben sein. Die entwickelte Synthesestrategie sollte eine große Flexibilität aufweisen, um ggf. schnell auf Anforderungen aus den biologischen Experimenten reagieren zu können.

Anfänglich war beabsichtigt gewesen, solche Peptide unter Verwendung der Tyrosinase-lablen Phenylhydrazid-Schutzgruppe aufzubauen. Nach einigen orientierenden Experimenten wurde dieser ursprüngliche Plan jedoch aufgegeben und die beiden Projekte getrennt, denn es war abzusehen, dass die Phenylhydrazid-Schutzgruppe der stattdessen entwickelten festphasengestützten Baukastenstrategie in Geschwindigkeit und Flexibilität deutlich unterlegen sein würde. Unabhängig voneinander konnten für beide Projekte eigenständige Ziele definiert und effizienter verfolgt werden, die Trennung erwies sich also für beide Arbeitsgebiete als vorteilhaft.

Die Benzophenongruppe sollte in den Farnesylrest inkorporiert werden, da hier die Chance für eine räumliche Nähe zu möglichen membrangebundenen Effektoren als besonders groß eingeschätzt wurde. Darüber hinaus könnten solche Peptide auch eingesetzt werden, um den Beitrag der Farnesylgruppe zur Wechselwirkung von Ras mit seinen Interaktionspartnern zu untersuchen.

Zur Detektion der UV-vernetzten Produkte wurde die Bindung von Biotin mit Streptavidin gewählt. Neben seiner Funktion als Detektions-„tag“ kann Biotin auch ggf. zur Aufreinigung markierter Produkte herangezogen werden.

Als erstes sollte also ein konvergenter Zugang zu verschieden modifizierten N-Ras-Peptiden entwickelt werden.

Dies umfasste im einzelnen:

1. Die Synthese von BP-modifizierten Farnesylanaloga - Kettenlänge, Art der Anknüpfung und Substitutionsgeometrie der Benzophenone waren zu variieren;
2. Die Anbindung dieser Farnesylanaloga an Cysteinmethylester;
3. Die Entwicklung einer festphasengestützten Synthese zur Darstellung verschieden modifizierter Peptide, z.B. mit MIC oder Biotin am *N*-Terminus;
4. Schließlich die Kondensation der Fragmente.

Diese Peptide sollten anschließend in biologischen Experimenten eingesetzt werden, um zu evaluieren, ob das aufgestellte Konzept gültig ist und die Photomarkierung funktioniert.

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die *C*-terminalen Aminosäuren auf die Palmitoylierung des Proteins und somit seine biologische Aktivität haben, wurden zusätzlich noch die *D*-Enantiomere einiger *C*-terminaler *N*-Ras-Peptide nach der gleichen Strategie synthetisiert.

Auf dem zweiten Arbeitsgebiet, der Tyrosinase-vermittelten oxidativen Abspaltung von Phenylhydraziden, sollten die Vorarbeiten aufgegriffen werden,^[78, 79] bisher war gezeigt worden, dass die Phenylhydrazidgruppe von Boc-, *Z*- und Aloc-geschützten Aminosäuren mit Tyrosinase abgespalten werden kann und dass sich die Methodik prinzipiell für die Peptidsynthese eignet. Die Voruntersuchungen waren auszuweiten, um die Phenylhydrazidgruppe als enzymlabile Schutzgruppe in der (Lipo-)Peptidsynthese zu etablieren.

Im Einzelnen waren zu untersuchen:

1. Die Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen der Seitenketten;
2. Der Einfluss der Polarität der Substrate;
3. Die Anwendbarkeit in der Synthese von Peptidkonjugaten;
4. Die Entschützung von Oligopeptiden und die Handhabbarkeit der Enzymreaktion im präparativen Maßstab.

Um schärfere Aussagen über die Anwendungsbreite der Methode und ihre Begrenzungen treffen zu können, sollte zuerst das Wissen um die einsetzbaren Substrate ergänzt werden. Hierzu sollte untersucht werden, inwieweit die leicht oxidierbaren schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein sowie das Disulfid Cystin eingesetzt werden können, ebenso die heterocyclischen Aminosäuren Histidin und Tryptophan.

Am Beispiel eines lipidierten Dipeptidfragmentes sollte untersucht werden, ob die Phenylhydrazid-Schutzgruppe den Ansprüchen der Synthese labiler Peptidkonjugate gerecht werden kann. Schließlich sollte die Eignung der enzymatischen Entschützung in Synthesemaßstäben untersucht werden, wie sie für mehrstufige Peptidsynthesen benötigt werden, und somit die Anwendungstauglichkeit der Methode unter Beweis gestellt werden.

Zusätzlich zu diesen Fragen, die sich mit der *Anwendung* der Reaktion beschäftigen, sollte versucht werden, zum *Verständnis* der Reaktion durch eine orientierende Modellvorstellung beizutragen. Die Oxidation der Phenylhydrazide ist eine grundlegend neue Funktion der Tyrosinase, die nicht mit dem bekannten Katalysemechanismus der Tyrosinase zusammenzuhängen scheint. Bisläng ist die enzymatische Phenylhydrazidspaltung allein phänomenologisch untersucht worden – der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht aufgeklärt.

4 Ergebnisse und Diskussion

*Darin besteht das Wesen der Wissenschaft:
zuerst denkt man etwas, das wahr sein könnte -
und dann sieht man nach, ob es der Fall ist,
und im Allgemeinen ist es nicht der Fall.*

BERTRAND RUSSELL (1872-1970)

4.1 Synthese und Evaluierung menschlicher N-Ras-Peptide

4.1.1 Synthesestrategie

Ehe eine Synthesestrategie ausgearbeitet werden konnte, mussten die gewünschten Eigenschaften der Zielverbindungen definiert werden: sie sollten

- die Sequenz des C-terminalen N-Ras-Heptapeptids aufweisen (Abb. 8),
- korrekt an der Plasmamembran lokalisiert werden,
- den Phosphor in der Farnesylseitenkette tragen,
- am N-Terminus mit Gruppen modifiziert werden, die eine weitere Funktionalisierung oder Detektion ermöglichen.



Abbildung 8: Sequenz und post-tranlationalale Modifikation des C-terminalen N-Ras-Heptapeptids.

Das C-terminale N-Ras-Heptapeptid wurde als *Zielsequenz* gewählt, weil die hypervariable Domäne alleine für die Membranassoziation verantwortlich ist. Deswegen erscheint plausibel, dass hauptsächlich dieser Bereich die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen im Zuge der Palmitoylierung steuert; auch für die Bindung weiterer Ras-Interaktionspartner dürften diese Peptide geeignete Sonden darstellen, da in vielen Fällen eine Beteiligung der Farnesylgruppe an solchen Wechselwirkungen vermutet wird.

In vivo ist es zur korrekten *Lokalisierung* ausreichend, ein palmitoylierbares Cystein an der Palmitoylierungsstelle zur Verfügung zu stellen – dies hatten vorhergehende Untersuchungen ergeben:^[109, 147] Nach Mikroinjektion in PC12-Zellen wird die Palmitoylierung von der zellulären Maschinerie übernommen. Das palmitoylierbare Cystein muss während der

Peptidsynthese maskiert werden, um seine Oxidation zum Disulfid zu verhindern. Besonders bewährt hat sich dafür die *tert*-Butyldisulfid-Maskierung, die unter milden reduktiven Bedingungen entfernt werden kann, ohne das Protein zu beeinträchtigen.^[148]

Der *Photophor* sollte an die Farnesylgruppe des Peptides angebracht werden. Eine Anknüpfung anstelle des C-terminalen Methylesters wurde ebenfalls erwogen; allerdings führt die direkte Veresterung von Cystein mit Hydroxybenzophenonen zu aktivierten Verbindungen, die nicht stabil sind. Ein Abstandshalter wie Ethylenglykol hätte die Distanz zwischen der Palmitoylierungsstelle und dem Photolabel jedoch noch weiter vergrößert. Da alle bisher publizierten Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Palmitoyltransferase ein membrangebundenes Protein ist, könnte sich der Einsatz des Labels in der Farnesylkette sogar als besonderer Vorteil erweisen.

Nicht nur wegen ihrer chemischen Stabilität und leichten Zugänglichkeit wurde den Benzophenonen als photoaktivierbare Gruppe der Vorzug gegeben: Ihre Aktivierung bei Wellenlängen um 350 nm ist für Proteine weniger schädlich als die bei Aziden notwendige kurzwelligere Strahlung. Auch die Reaktivität des Ketylradikals, nämlich die bevorzugte Insertion in nichtaktivierte C-H-Bindungen, sprach für dieses Label, denn sie lässt eine geringe intrinsische Selektivität erwarten: Markiert werden Aminosäuren dann, wenn sie räumlich nah liegen, und nicht etwa aufgrund einer überlagerten chemischen Selektivität. Die Anknüpfung des Labels sollte als Ether oder als Ester am Ende des Isoprenoids erfolgen. Die Orientierung des Labels kann durch Verwendung von *m*- oder *p*-substituierten Benzophenonen zusätzlich beeinflusst werden.

Am *N*-Terminus können *weitere Modifikationen* nach den Erfordernissen der biologischen Experimente angebracht werden: Eine Maleimidocaproylgruppe (MIC) dient als Ligationsstelle für die Anknüpfung von Proteinen;^[109] Biotin kann als Detektions- und Reinigungsmarkierung für die Photoaffinitätsmarkierung verwendet werden.^[149, 150] Auch die Anknüpfung von Fluoreszenzfarbstoffen oder weiterer Gruppen wäre ohne weiteres möglich.* In Abbildung 9 sind die hier besprochenen grundlegenden Anforderungen an die Sonden schematisch dargestellt.

* Allerdings sei man sich hierbei der Gefahr bewusst, dass bei der Aktivierung des Photolabels der Fluoreszenzfarbstoff wahrscheinlich ausbleichen würde!

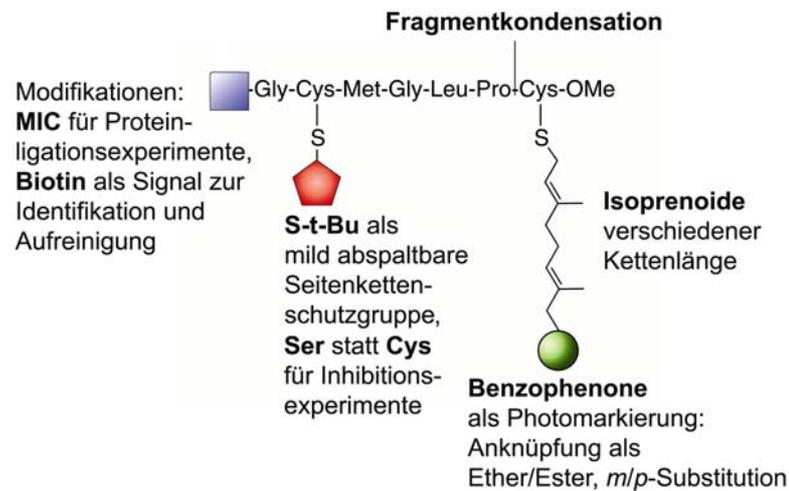


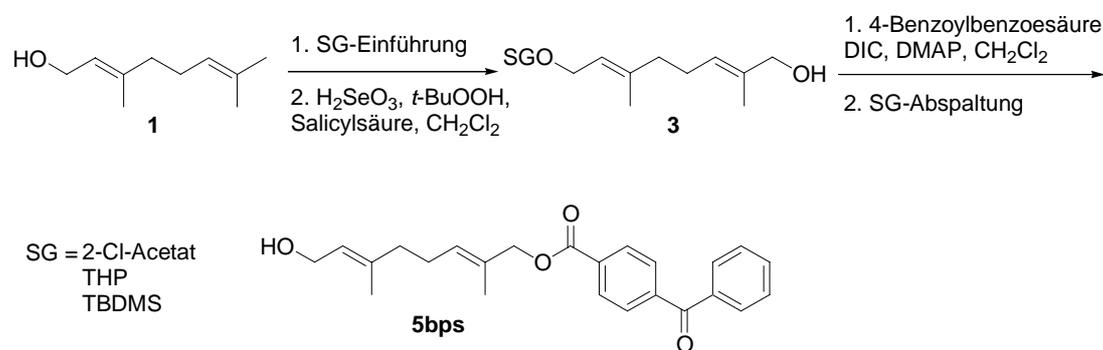
Abbildung 9: Generelle Synthesestrategie für die Darstellung BP-modifizierter N-Ras-Peptide

Als Schlüsselschritt für den Aufbau der Lipopeptide wurde die Kondensation zwischen dem C-terminalen Cysteinfragment und einem modifizierten Hexapeptidbaustein identifiziert. Das Hexapeptid beinhaltet - maskiert als *tert*-Butyldisulfid - die Palmitoylierungsstelle, sowie die N-terminalen Modifikationen MIC oder Biotin. Alternativ kann Serin anstelle des Cysteins eingeführt werden; dies führt zu nicht palmitoylierbaren Peptiden und Proteinen für Vergleichs- und Inhibitionsexperimente.

Es bietet eine Reihe strategischer Vorteile, die Fragmentkondensation an genau dieser Position durchzuführen: Erstens spielt bei der C-terminalen Verlängerung von Glycin oder Prolin die Racemisierung der aktivierten Aminosäure keine Rolle; zweitens generiert der retrosynthetische Schnitt an dieser Stelle zwei Fragmente ähnlicher Komplexität, was in einer konvergenten Synthese erwünscht ist, weil so die Gesamtausbeute steigt; drittens kann der Hexapeptidbaustein überaus schnell und variabel an der festen Phase aufgebaut werden. Zusammen mit den verschiedenen substituierten Cysteinbausteinen steht somit ein „Baukasten“ zur Verfügung, mit dem für verschiedene biologische Anwendungen maßgeschneiderte Sonden hergestellt werden können, und das vergleichsweise schnell und einfach.

Für Vergleichszwecke sollten am Cysteinfragment Isoprenoide verschiedener Kettenlängen angebracht werden. Benzophenon ist länger als ein Isoprenbaustein und weist auch einen etwas größeren Raumbedarf auf (Abb. 10).

Um die optimale Schutzgruppenstrategie für die Darstellung der Farnesylanaloga zu bestimmen, wurden parallel alle drei geschützten Geraniole oxidiert, mit *p*-Benzoylbenzoesäure verestert und entschützt (Schema 3).



Schema 3: Synthese von 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geraniol **5bps** unter Verwendung von Chloracetat, THP und TBDMS als Hydroxylschutzgruppe.

Die Ausbeuten für die einzelnen Reaktionsschritte sind in Tabelle 1 angegeben.

SG	Einführung über	Schützung [%]	Oxidation [%]	Veresterung [%]	Abspaltung	Absp. [%]	Gesamt [%]
Chloroacetat	Anhydrid	quant.	41	50	NH ₄ OH/MeOH	40	8.2
THP	DHP/PPTS	quant.	28	93	PPTS/EtOH	30	7.8
TBDMS	TBDMSCl	quant.	50	51	TBAF	74	18.9

Tabelle 1: Synthese von **5bps** unter Verwendung verschiedener Hydroxylschutzgruppen.

Zunächst wurden die drei verschiedenen Schutzgruppen unter Standardbedingungen eingeführt: Der 2-Chloressigsäureester wurde durch Veresterung mit dem Anhydrid gewonnen, das Tetrahydropyranylacetal (THP) wurde durch Addition an Dihydropyran unter Katalyse mit Pyridinium-paratoluolsulfonat (PPTS) gebildet und der Silylether wurde unter basischer Reaktion mit TBDMSCl generiert. Alle drei Schützungen verliefen quantitativ.

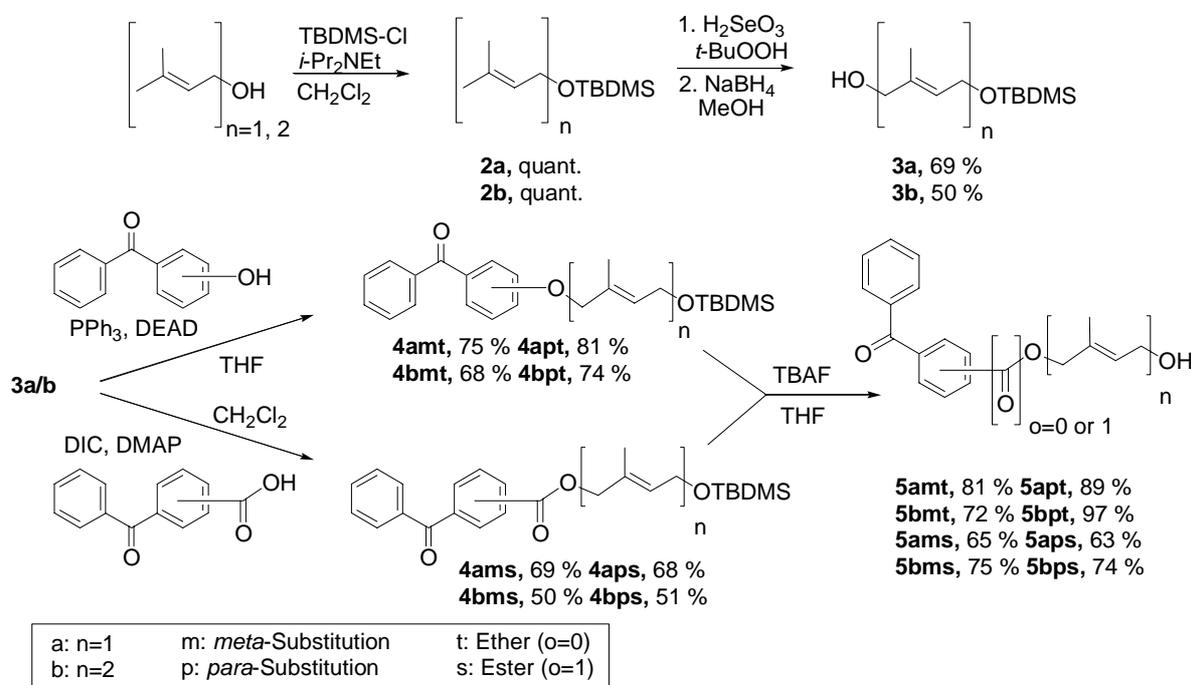
Nach der Einführung der jeweiligen Schutzgruppe wurde die allylische Oxidation unter Sharpless-Bedingungen durchgeführt.^[154] Hierbei wirkt Selendioxid im Sinne einer pericyclischen En-Reaktion als Enophil und überträgt in einer nachgelagerten sigmatropen Umlagerung eine Hydroxylgruppe auf das allylständige Methyl-C-Atom. Dabei lagert sich die selenige Säure ausschließlich am geringer substituierten Kohlenstoffatom der Doppelbindung an, und wegen des cyclischen Übergangszustandes bei der Umlagerung wird ausschließlich die *E*-ständige Methylgruppe oxidiert. Tatsächlich tritt keine Oxidation der *Z*-ständigen Methylgruppen, der 5- oder der 1-Position auf. Neben der erwünschten Hydroxylierung in 8-Position wird aber auch eine Funktionalisierung der 4-Position beobachtet, die unabhängig von den verwendeten Reaktionsbedingungen stets im selben molaren Verhältnis auftritt.

Dieses Isomer muss durch sorgfältige Flash-Chromatographie abgetrennt werden. Durch Überoxidation gebildeter Aldehyd kann vor der Aufreinigung durch Reduktion mit NaBH_4 reduziert werden.

Die neu eingeführte Hydroxylfunktion wurde anschließend unter Steglich-Bedingungen mit 4-Benzoylbenzoesäure verestert. Abgeschlossen wurde die Synthesesequenz durch die Abspaltung der Hydroxylschutzgruppen. Der Chloressigester wurde basisch mit methanolischer Ammoniaklösung verseift, das THP-Acetal durch Umacetalisierung auf EtOH unter PPTS-Katalyse und der Silylether durch Behandeln mit Tetrabutylammoniumfluorid gespalten.

Im Vergleich der Gesamtausbeuten erwies sich die TBDMS-Schutzgruppe als am besten geeignet. Während die Ausbeuten für die Reaktionsschritte mit der Chloroacetatschutzgruppe im Rahmen der berichteten Ausbeuten liegt,^[142] war die reproduzierbar schlechte Ausbeute für die Abspaltung der THP-Gruppe unerwartet. In der Synthese von fluoreszenzmarkierten und biotinylierten Verbindungen hatte diese Abspaltung verlässlich zwischen 65 % und 95 % des freien Alkohols geliefert.^[152, 153]

Somit wurden die anderen substituierten Analoga mit Hilfe der Silylschutzgruppe aufgebaut und die *m*- und *p*- verknüpften Ether und Ester von Prenol und Geraniol, insgesamt also die 8 Analoga **5amt** – **5bps** dargestellt (Schema 4).

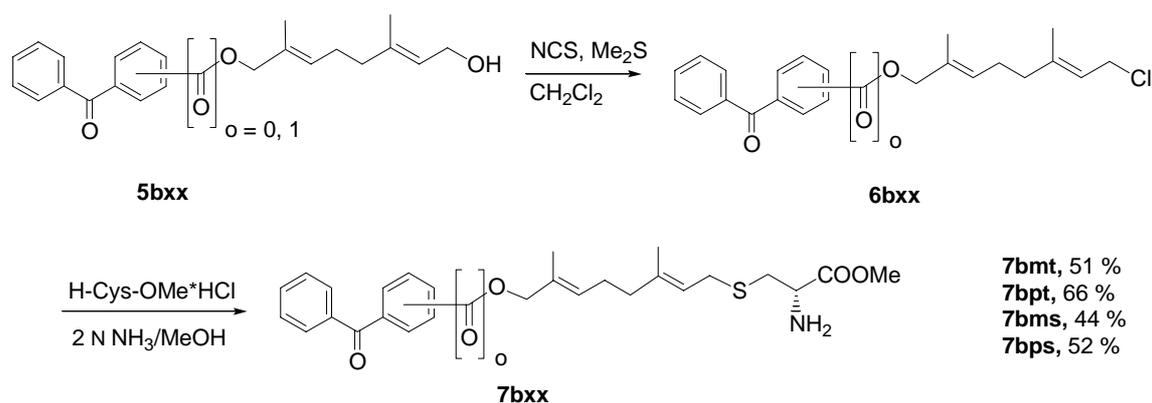


Schema 4: Darstellung der BP-markierten Analoga **5**.

Nach der Maskierung der Alkoholfunktion als Silylether **2a/b** wurde die terminale Hydroxylgruppe wie oben beschrieben unter Sharpless-Bedingungen eingeführt. Hieran schließt sich die Veretherung der Alkohole **3a/b** unter Mitsunobu-Bedingungen^[155] oder ihre Veresterung unter Steglich-Bedingungen an. Beide Reaktionen verlaufen verlässlich mit zufriedenstellenden Ausbeuten. Die abschließende Abspaltung der Silylschutzgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) liefert die freien Isoprenylanaloga **5**.

Diese Synthese eröffnet einen zuverlässigen Zugang zu den BP-markierten Analoga **5**, für die Ether liegt die Gesamtausbeute zwischen 24 % und 50 %, für die Ester mit 19 % bis 31 % ein wenig niedriger. Die weitere Umsetzung der Prenolderivate wurde von Dr. Koji Uwai vorgenommen, erfolgte aber analog der hier beschriebenen Vorgehensweise.

Zur Anknüpfung an Cysteinmethylester war es erforderlich, die Alkohole **5b** in ihre Chloride zu überführen; dies geschah in einer Corey-Kim-Reaktion durch Zugabe von **5b** zu *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schema 5).^[156] Wässrige Aufarbeitung lieferte die Chloride **6bxx**, die aufgrund ihrer begrenzten Stabilität nicht weiter aufgereinigt, sondern direkt weiter umgesetzt wurden.



Schema 5: Anknüpfung der BP-markierten Farnesylanaloga **5b** an Cysteinmethylester

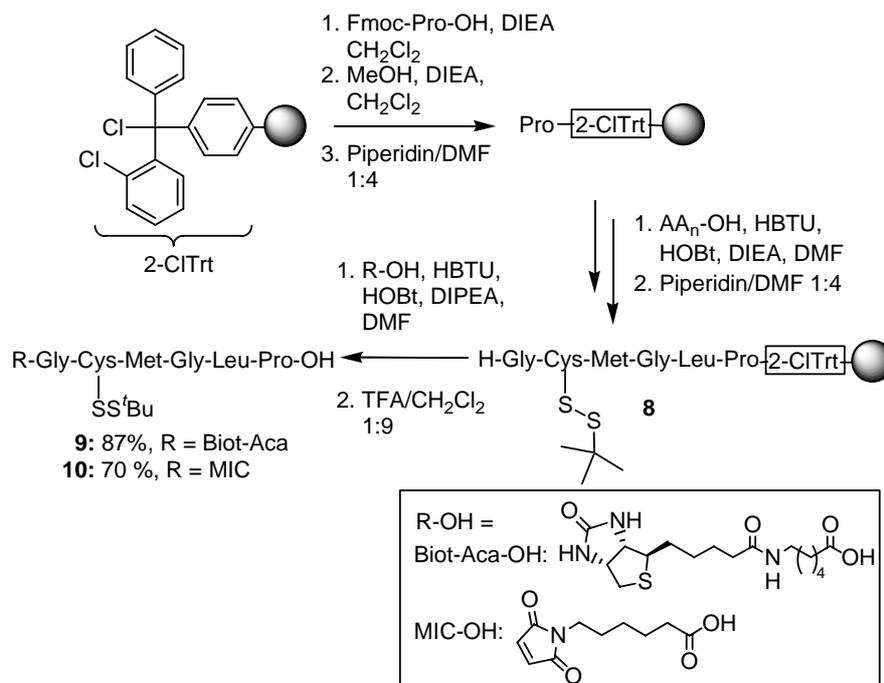
Die Alkylierung erfolgte unter Reaktionsbedingungen, die von der Gruppe von C. D. POULTER entwickelt wurden;^[157] auch in der Synthese von geranylgeranyliertem oder fluoreszenzmarkiertem prenyliertem Cysteinmethylester konnten sie bereits erfolgreich eingesetzt werden.^[153, 158] Hierbei wird das Chlorid **6b** zu einer Lösung von Cysteinmethylester·HCl in 2N methanolischem Ammoniak zugegeben. Extraktive Aufarbeitung und säulenchromatographische Reinigung lieferten die BP-markierten Cysteinbausteine **7bmt** – **7bps** in zufriedenstellenden Ausbeuten – um 50 % über beide Stufen (Schema 5). Ihre Lagerstabilität erwies sich als begrenzt, insbesondere bei Kontakt mit Luftsauerstoff. Bei der Zersetzung veränderte sich das Aussehen der Substanz: die klaren, nur leicht gefärbten Öle wandelten sich zu amorphen, bräunlich gefärbten wachsartigen Feststoffen um. Vor weiteren

Reaktionen war dann eine erneute säulenchromatographische Reinigung unerlässlich. Deutlich zurückgedrängt werden konnte die Zersetzung durch Aufbewahrung unter Argon und Lagerung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$; so reichte die Stabilität für die Lagerung über ein Jahr und länger ohne erkennbare Zersetzung aus. Dennoch erscheint es angebracht, die Alkohole **5** als die bevorzugte Lagerform anzusehen und sie erst bei Bedarf an Cysteinmethylester anzuknüpfen. Nachdem somit ein Zugang zu den Cysteinfragmenten **7** erschlossen war, musste als nächstes die Synthese der Hexapeptide entwickelt werden.

4.1.2.2 Festphasengestützte Synthese der Peptidfragmente

Zur Herstellung der Hexapeptidfragmente wurden Polystyrolharz und der 2-Chlorotryllinker verwendet. Von diesem Linker können die Produkte schonend unter schwach sauren Bedingungen gespalten werden, zur Abspaltung genügen 3-5 % TFA in CH_2Cl_2 .

Zum Aufbau der Produkte wurde ein Fmoc-basiertes Protokoll verwendet (Schema 6)



Schema 6: Aufbau der biotinylierten und MIC-modifizierten Hexapeptide **9** und **10** am polymeren Träger nach der Fmoc-Strategie.

Zunächst wurde Prolin unter basischen Bedingungen an das 2-Chlorotryllchloridharz gebunden. Hierzu wurden 1.2 Äquivalente der Aminosäure mit 4.8 Äquivalenten DIEA in trockenem CH_2Cl_2 mit dem vorgequollenen Harz geschüttelt. Für zufriedenstellende Beladungen (0.3-0.6 mmol/g) musste die Aminosäure vorher durch wiederholte Zugabe und Abdestillation von Toluol azeotrop getrocknet werden. Nach der Anbindung des Prolins

Verbindung	Substituent R	Substitution	Ester/Ether	Ausbeute [%]
11bmt	Biot	m	Ether	55
11bpt	Biot	p	Ether	43
11bms	Biot	m	Ester	76
11bps	Biot	p	Ester	44
12bmt	MIC	m	Ether	23
12bpt	MIC	p	Ether	55

Tabelle 2: Ausbeuten aus der Fragmentkupplungsreaktion

Diese Synthesen beweisen, dass die gewählte Strategie tatsächlich den erhofften schnellen und flexiblen Zugang zu BP-markierten N-Ras-Heptapeptiden liefert.

4.1.2.4 Biologische Untersuchung der BP-markierten Peptide 11 und 12

Die Peptide **11** und **12** wurden in Zusammenarbeit mit Diplom-Biochemiker Andreas Tebbe aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jürgen Kuhlmann am MPI für molekulare Physiologie biologisch untersucht.^[159] Besonders wichtig war zunächst, ob die Annahmen zutreffen, von denen in der Synthesepaltung (vgl. Kapitel 4.1.1: Synthesestrategie) ausgegangen wurde, ob somit das verfolgte Konzept Erfolg versprach. Zu diesem Zweck mussten zuallererst zwei Fragen geklärt werden: erstens, ob die Photoaffinitätsmarkierung mitsamt dem Detektionssystem funktioniert, und zweitens, ob die BP-markierten Peptide biologisch aktiv sind.

Diese ersten Experimente mussten also zeigen,

- ob das Photolabel unter den realisierbaren Bedingungen tatsächlich eine kovalente Bindung zu knüpfen vermag;
- ob das Produkt einer solchen Verknüpfung detektiert und ggf. isoliert werden kann – ob also die Wahl von Biotin als Detektionsmarker geeignet ist oder auf empfindlichere Radiolabel zurückgegriffen werden muss;
- ob durch den eingebrachten Photophor die biologische Wirksamkeit verändert wird – also, ob die Proteine, die für Wechselwirkung und/oder posttranslationale Modifikationen verantwortlich sind, auch mit dem markierten Peptid diese Wechselwirkungen eingehen.

Ein Modellexperiment sollte die ersten beiden Fragen beantworten: Das biotinylierte Peptid **11bpt** wurde mit einem fünffachen Überschuss Albumin aus Rinderserum (BSA) über einen Zeitraum von 60 Minuten mit Licht der Wellenlänge 300-400 nm bestrahlt (Abb. 11).

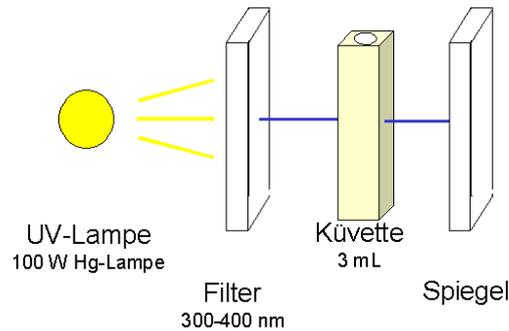


Abbildung 11: Versuchsaufbau für die UV-Bestrahlung photoaffinitätsmarkierter Peptide

Vor der Bestrahlung sowie nach 5, 15, 30 und 60 Minuten wurden Proben entnommen und durch denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Abb. 12a). Parallel wurde ein Western Blot mit Streptavidin – alkalischer Phosphatase angefertigt, in dem biotinylierte Proteine durch Blauviolett färbung sichtbar gemacht wurden (Abb. 12b).

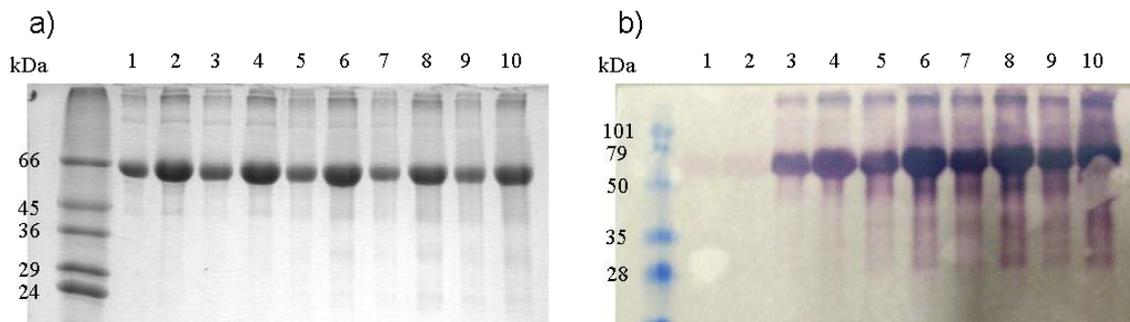


Abbildung 12: SDS-PAGE (a) und Western Blot (b) der UV-induzierten Kopplungsreaktion von **11bpt** mit BSA. Proben wurden vor der Bestrahlung (Spuren 1 & 2) sowie nach 5 (Spuren 3 & 4), 15 (Spuren 5 & 6), 30 (Spuren 7 & 8) und 60 Minuten (Spuren 9 & 10) entnommen; es wurden jeweils 3 μg (Spuren 1, 3, 5, 7, 9) und 10 μg (Spuren 2, 4, 6, 8, 10) aufgetragen.

Die Massenzunahme um 1454 Da nach der Addition des Peptids konnte im SDS-Gel wegen der geringen Massenauflösung in dem beobachteten Bereich (die Masse des Albumins beträgt 67 kDa) nicht detektiert werden. Alle bestrahlten Proben zeigen aber die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase nach dem Western Blot, bereits eine kurze Reaktionszeit (5 Minuten) führt also zu einer detektierbaren Kopplung. Eine längere Bestrahlung führte trotz Filterung des Lichts zum unspezifischen Abbau des Proteins, erkennbar an den verschmierten Gelen besonders in den Spuren mit 10 μg Protein (Abb. 12 a) und b), Spuren 6, 8 und 10). Ein Filter engerer Bandbreite könnte diesen Abbau reduzieren, generell aber sollten die Bestrahlungszeiten so kurz wie möglich gewählt werden.

Dieses Experiment belegt, dass mit dem Benzphenon-Photophor tatsächlich eine UV-induzierte Kopplung herbeigeführt werden kann und das Detektionssystem auf der Basis von

Biotin – Streptavidin grundsätzlich geeignet ist. Ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wäre durch die damit mögliche Chemolumineszenzdetektion noch etwa um eine Größenordnung empfindlicher.

Nachdem so gezeigt worden war, dass die UV-induzierte Kopplung erfolgreich herbeigeführt und detektiert werden kann, blieb die dritte Frage zu klären, ob nämlich die photoaktivierbaren Analoga von der zellulären Maschinerie überhaupt erkannt und prozessiert werden, ob sie also biologisch aktiv sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein onkogenes photoaktivierbares Ras-Protein hergestellt, indem das MIC-Peptid **12bpt** mit C-terminal verkürztem $^{1-181}\text{N-RasG12V}$ ligiert wurde (Abb. 13). Bereits in der Synthese verschieden lipidmodifizierter und fluoreszenzmarkierter Proteine ist diese Ligationstrategie erfolgreich eingesetzt worden.^[109, 147]

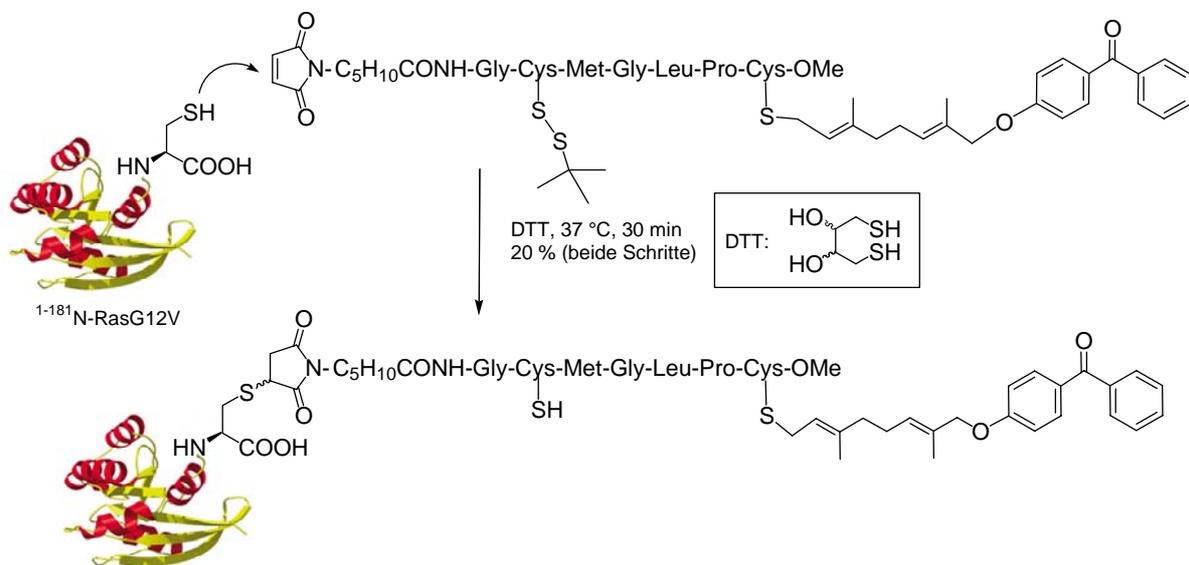


Abbildung 13: MIC-Ligation von $^{1-181}\text{N-RasG12V}$ mit **12bpt**.

Das freie Cystein, welches das verkürzte Ras-Protein an seinem C-Terminus trägt, kann in einer Thia-Michael-Addition mit dem MIC-modifizierten Peptid reagieren. Da dieses Cystein als einziges an der Oberfläche des Proteins liegt, ist eine mehrfache oder falsche Ligation weitgehend ausgeschlossen.

Zur Ligation wurde **12bpt** mit dem Protein in einem molaren Verhältnis von 1:1 in einem Gemisch aus dem Detergens Triton-X114 und Puffer bei 4 °C inkubiert. Triton-X114 ist ein nicht-ionisches Detergens, das unterhalb von 30 °C mit Wasser mischbar ist, oberhalb dieser Temperatur aber eine eigene, hydrophobe Phase bildet.

Diesen Umstand macht man sich bei der MIC-Ligation zur Aufreinigung des Produkts zunutze, denn das nach erfolgter Ligation lipidierter Protein löst sich in der Tritonphase,

unligiertes $^{1-181}\text{N-RasG12V}$ dagegen bleibt in der wässrigen Phase. Nach der Phasentrennung bei 37 °C wurde das Kopplungsprodukt über Ionenaustauschchromatographie gereinigt und vom Detergens befreit. Die massenspektrometrische Analyse des Kopplungsprodukts ($M = 21747 \text{ Da}$) zeigte, dass die Ligation wie erwartet ausschließlich in einer 1:1-Stöchiometrie abgelaufen war (Abb. 14).

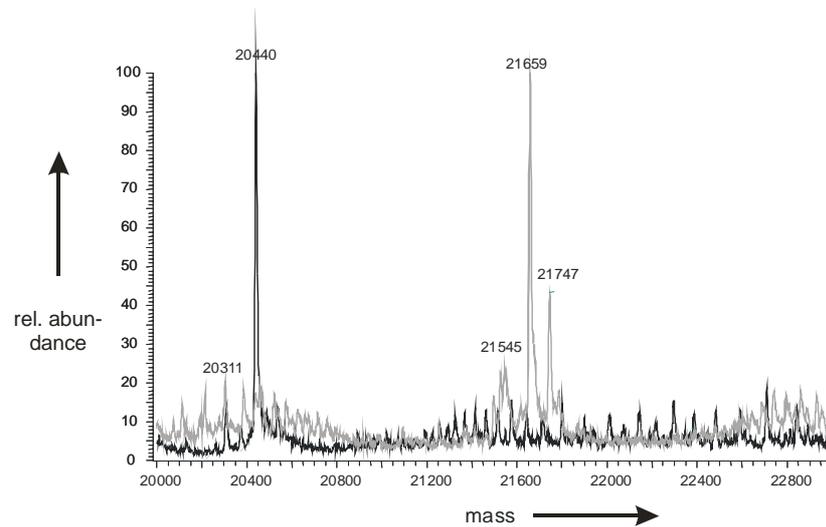


Abbildung 14: Massenspektrometrische Charakterisierung von N-RasG12V Δ 181 (schwarzer Graph) und des Kopplungsproduktes (grauer Graph) durch ESI-MS, Abbildung aus^[160]. Aufgetragen ist die Signalintensität gegen die Masse in Da. Das Signal bei 20440 Da entspricht der theoretischen Masse von N-RasG12V Δ 181, der kleinere Peak bei 20311 Da kann der Masse des Proteins ohne N-terminales Met¹ zugeordnet werden ($M_{\text{theor}}=20309 \text{ Da}$). Im Massenspektrum des Kopplungsprodukts (graues Spektrum) sind zwei starke Signale zu erkennen, die den Massen des Kopplungsprodukts mit (21747 Da) und ohne die Thiobutylschutzgruppe (21659 Da) entsprechen.

Dieses photoaktivierbare onkogene Ras-Protein wurde durch Mikroinjektion in Phaeochromocytomzellen (PC12) eingebracht. Diese Zellen werden durch Plasmamembrangebundenes onkogenes Ras zur Differentiation^[161] gebracht und bilden neuritenartige Auswüchse aus. Mit dem photoaktivierbaren Ras-Konstrukt konnte tatsächlich die Ausbildung dieser Auswüchse beobachtet werden (Abb. 15).

Im Rahmen seiner Diplomarbeit bestimmte Andreas Tebbe die Transformationsrate in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Diese quantitative Analyse ergab, dass die biologische Aktivität des photoaktivierbaren Proteins durchaus in der selben Größenordnung wie die des nativen Proteins liegt.^[159, 160] Die bei hohen Konzentrationen induzierte *maximale* Transformationsrate ist praktisch dieselbe wie bei unmodifizierten Konstrukten oder dem natürlichen Volllängenprotein, und die *kritische* Konzentration, bei der 50 % der injizierten

Zellen neuritenartige Auswüchse bilden, liegt bei 70 μm im Vergleich zu 20 μm für das Volllängenprotein.

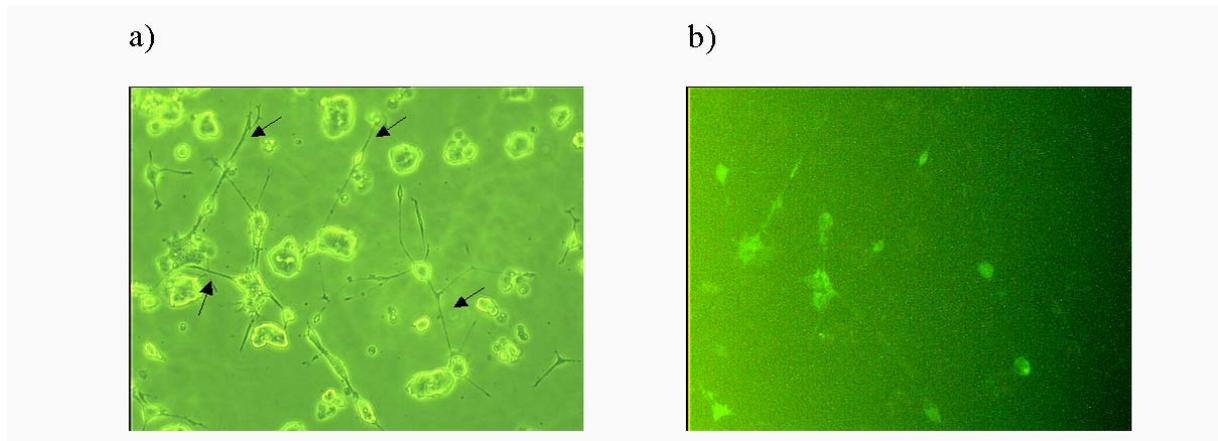


Abbildung 15: Phasenkontrastbild (a) und Fluoreszenzaufnahme (b) von PC12-Zellen zwei Tage nach der Mikroinjektion von onkogenem Ras und Fluorescein-Dextran als Fluoreszenzmarker. Deutlich erkennbar ist die Ausbildung von Neuriten (Abb. a, schwarze Pfeile). Der Vergleich der Fluoreszenzaufnahme und der Phasenkontrastaufnahme zeigt, dass die meisten der injizierten Zellen auch differenziert sind.

Diese Größenordnung erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Prozessierung des photoaktivierbaren Konstrukts nach den selben Mechanismen ablaufen müsste wie die des unmodifizierten Proteins. Somit sind BP-markierte Ras-Proteine zur Untersuchung molekularer Interaktionen prinzipiell geeignete Werkzeuge.

Neben Untersuchungen zur Ras-Palmitoylierung können die hier hergestellten Peptide auch dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Bindung zwischen Ras und seinen Effektoren zu gewinnen, z.B. wird für den Ras-GEF Sos *in vitro* eine Wechselwirkung mit der Farnesylgruppe des Ras-Proteins beobachtet.^[113, 114, 163] Die katalytische Domäne von Sos ist für den Austausch des Ras-gebundenen Nucleotids und somit für das „Anschalten“ von Ras verantwortlich. Sie besteht aus 500 Aminosäuren und enthält Bereiche, die auch in anderen Ras-spezifischen GEFs enthalten sind, beispielsweise in Cdc25.^[164] Anders als Cdc25 zeigt die katalytische Domäne von Sos eine Präferenz für prenyliertes gegenüber unprenyliertem Ras.^[114]

Im Rahmen ihrer Dissertation hat Diplom-Biochemikerin Boriana Popkirova aus der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann am MPI für molekulare Physiologie die Wechselwirkung zwischen BP-markiertem Wildtyp-Ras-Protein (wt-Ras) und der katalytischen Domäne von Sos untersucht. Hierzu stellte sie zunächst analog zur hier beschriebenen Vorgehensweise ein BP-markiertes farnesyliertes wt-Ras-Protein her. Zur UV-induzierten Kopplung inkubierte sie dieses Protein mit der katalytischen Domäne von menschlichem Sos und konnte ein

vernetztes Produkt mit einer Molmasse von ca. 80 kDa detektieren (Abb. 16a). Diese Masse wäre für die Kopplung zwischen Ras und Sos in einer 1:1-Stöchiometrie zu erwarten. Durch In-Gel-Verdau mit Trypsin und MALDI-TOF-massenspektrometrische Analyse der Kopplungsprodukte (Abb. 16b) konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Massen der Fragmente mit theoretisch zu erwartenden Fragmenten von Ras und Sos nach tryptischen Verdau übereinstimmen (Abb. 16c). Weitere Untersuchungen haben zum Ziel, die Bereiche oder sogar einzelnen Aminosäuren des Sos-Proteins ausfindig zu machen, die an der Bindung des Farnesylrests beteiligt sind.^[151]

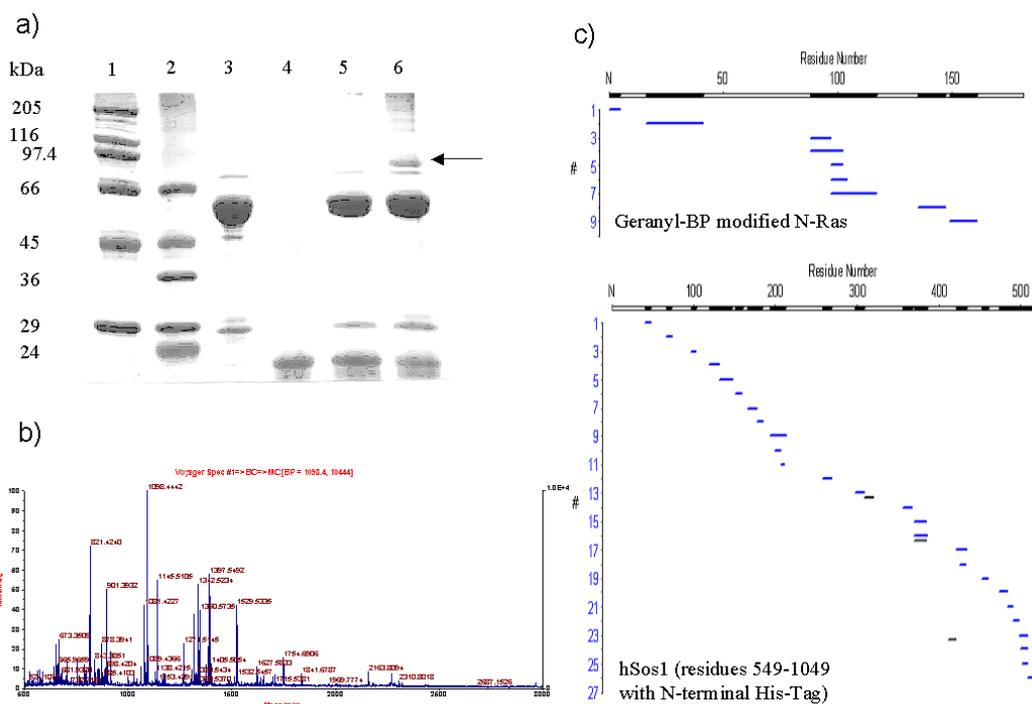


Abbildung 16: Photoaffinitätsmarkierung von $^{549-1049}$ hSos1 mit Geranyl-BP-modifiziertem $^{1-181}$ N-Ras.^[151]

a): Analyse der Photoreaktion durch SDS-Page; Spuren 1 und 2: Molmassenmarker, Spur 3: $^{549-1049}$ hSos1, Spur 4: Ger-BP-modifiziertes $^{1-181}$ N-Ras, Spur 5: Gemisch vor der UV-Bestrahlung, Spur 6: Gemisch nach UV-Bestrahlung. Der Pfeil zeigt das vernetzte Produkt an. b): MALDI-TOF-MS des Produkts nach In-Gel-Verdau mit Trypsin. c): Darstellung der gefundenen Fragmente des semi-synthetischen Ras-Proteins und der katalytischen Domäne von hSos1 nach Trypsin-Verdau.

4.1.2.5 Inhibitionsexperimente mit Serin-Peptiden

Nachdem nun eine erfolgreiche Synthesestrategie zur Darstellung photoaktivierbarer Peptide und Proteine zur Verfügung stand und gezeigt worden war, dass sich die gemachten Annahmen als richtig erwiesen, wurden strategische Überlegungen zu weiteren Experimenten angestellt.

Für zelluläre Photoaffinitätsmarkierungsexperimente wäre es wünschenswert, nicht nur über Peptide zu verfügen, die von der zellulären Maschinerie umgesetzt werden, sondern auch über

solche, die zwar gebunden, aber *nicht* weiter umgesetzt werden können. Unabhängig von ihrer genauen Funktion werden die Proteine, die für die Prozessierung von Ras-Proteinen verantwortlich sind, wahrscheinlich nur in niedrigen Konzentration in den Zellen vorliegen. Bringt man jetzt ein photoaktiverbares Substrat in diese Zelle, wird sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Substrat, Protein-Substrat-Komplex und dem prozessierten Substrat einstellen; möglicherweise ist im Gleichgewicht der Anteil des Substrat-bindenden Proteins gering, und nur dieser kann durch UV-Bestrahlung markiert werden. Eine gute Alternative könnte sein, ein Substrat zu verwenden, das in einer irreversiblen Reaktion an das Protein bindet und nicht weiter umgesetzt wird.

Für einen solchen Zweck erscheint die einfachste denkbare Veränderung, das Cystein an der Palmitoylierungsstelle durch Serin zu ersetzen. Dieses kann nicht palmitoyliert werden, sollte sonst aber ähnliche Eigenschaften wie das cysteininhaltige Peptid aufweisen. Somit wurden die beiden biotinylierten Serin-Analoga **13a/bpt** (Abb. 17) als Zielverbindungen gewählt und analog zur Synthese der Cysteinderivate aufgebaut. Basierend auf ähnlichen Überlegungen hat auch Dr. Reinhard Reents fluoreszenzmarkierte Serin-peptide hergestellt, die nach Mikroinjektion nicht an der Plasmamembran lokalisiert werden.^[153]

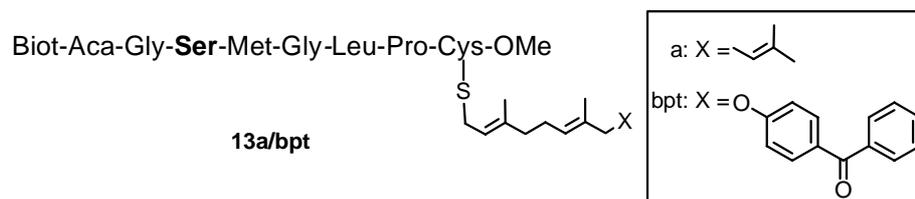
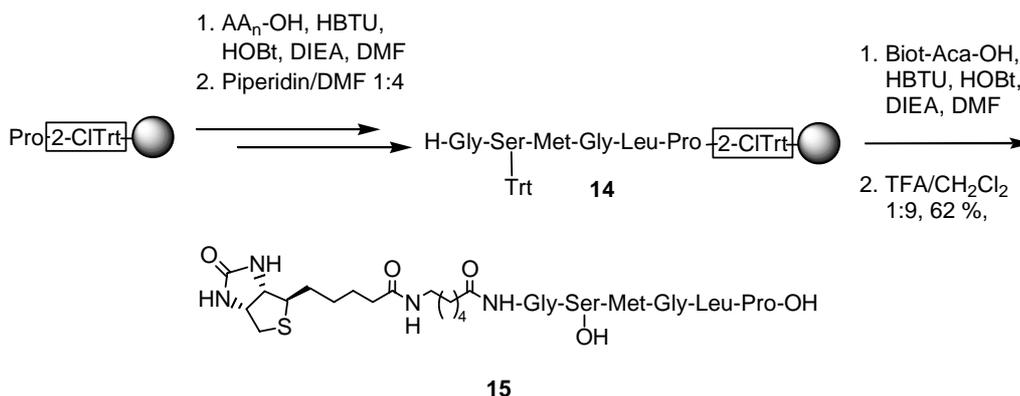


Abbildung 17: Serin-modifizierte Peptide **13** als Zielverbindung für Inhibitionsstudien.

Um sicherzustellen, dass auch hier die zugrunde gelegten Annahmen zutreffen, wurden zwei Derivate dargestellt: eines mit der „natürlichen“ Farnesylgruppe (**13a**) sowie ein BP-modifiziertes (**13bpt**). Das Peptid **13a** sollte zusammen mit onkogenem Ras in PC12-Zellen injiziert werden, um herauszufinden, ob dieses Peptid tatsächlich die Aktivität von Ras inhibiert. **13bpt** sollte dagegen in Photomarkierungsversuchen zum Einsatz kommen.

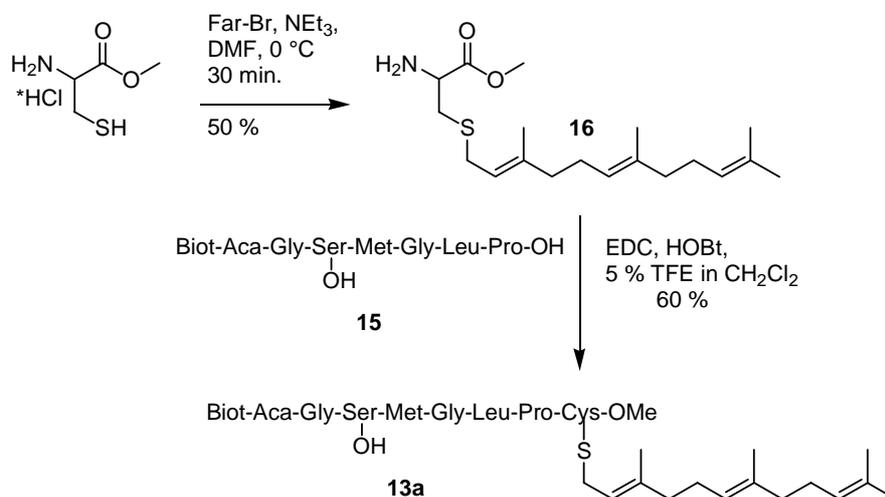
Die Synthese der Peptide **13** folgte genau der oben beschriebenen Methodik. Zunächst wurde das biotinylierte Serin-Peptid **15** an der festen Phase aufgebaut und in 62 % Ausbeute erhalten (Schema 8).



Schema 8: Festphasensynthese des biotinylierten Serinpeptids **15**.

Hierbei musste die Serinseitenkette während der Synthese durch eine Tritylschutzgruppe maskiert werden; ohne diese Blockierung verlief die Synthese in deutlich schlechteren Ausbeuten. Bei der Abspaltung vom Harz mit 10 % TFA in CH₂Cl₂ wird auch die Tritylgruppe von der Seitenkette abgespalten, die daraus entstehenden unpolaren Produkte werden bei der Aufreinigung durch Flash-Chromatographie bequem abgetrennt. Dies hat den Vorteil, dass kein weiterer Entschützungsprozess notwendig ist.

Die Anknüpfung von Farnesylbromid an Cysteinmethylester Hydrochlorid erfolgte nach einer Vorschrift von K. Kuhn.^[148] Anschließend wurde der farnesylierte Cysteinmethylester **16** mit dem Peptid **15** unter Aktivierung mit EDC und HOBT kondensiert (Schema 9).



Schema 9: Synthese von Cys(Far)OMe (**16**) und Kondensation mit dem Peptid **15**.

Wie schon bei dem biotinylierten Cysteinpeptid **9** war die Zugabe von 5 % TFE nötig, um das Peptid **15** in CH₂Cl₂ zu lösen. Anders als beim Aufbau des Peptids bereitete die freie Hydroxylgruppe des Serins bei der Fragmentkondensation keine Schwierigkeiten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt **13a** in 60 % Ausbeute erhalten. Analog wurde das BP-modifizierte Analogon **13bpt** in 58 % Ausbeute isoliert.

Um zu überprüfen, ob dieses Peptid tatsächlich Ras inhibiert, wurden von Diplom-Biochemikerin Melanie Wagner (Arbeitsgruppe Dr. J. Kuhlmann, MPI für molekulare Physiologie) Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. In diesen Experimenten wurden fl-RasG12V (*full length*, d.h. mit CaaX-Motiv) und **13a** gemeinsam in PC12-Zellen injiziert. Tatsächlich konnte zuerst eine Verringerung der Aktivität des Proteins beobachtet werden, d.h. eine Reduktion der Transformationsrate, jedoch erwies es sich als unmöglich, diesen Effekt zu quantifizieren; in der Größenordnung der natürlichen Fehlerbreite war die Aktivität reduziert, doch die Abhängigkeit dieser Inhibition von der Konzentration ließ sich nicht bestimmen. Genaue Beobachtung führte zu einer plausiblen Erklärung: Es war zu sehen, dass das Peptid aus dem Injektionspuffer ausfällt; die tatsächlich applizierte Konzentration ist deshalb zufällig und nicht bestimmbar.

Um dieses Problem zu lösen, wurde ein weiteres Peptid synthetisiert. Dieses Peptid **17** ist an seinem *N*-Terminus anstelle des Biotins mit einer Ethylenglykolkette versehen, die eine bessere Löslichkeit in wässrigem Puffer gewährleisten soll (Abb. 18).

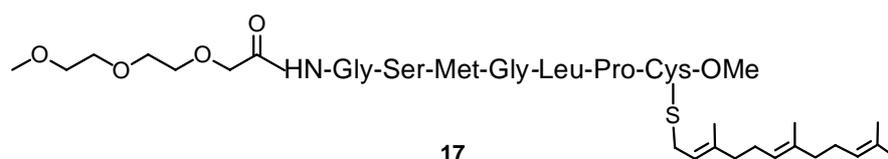
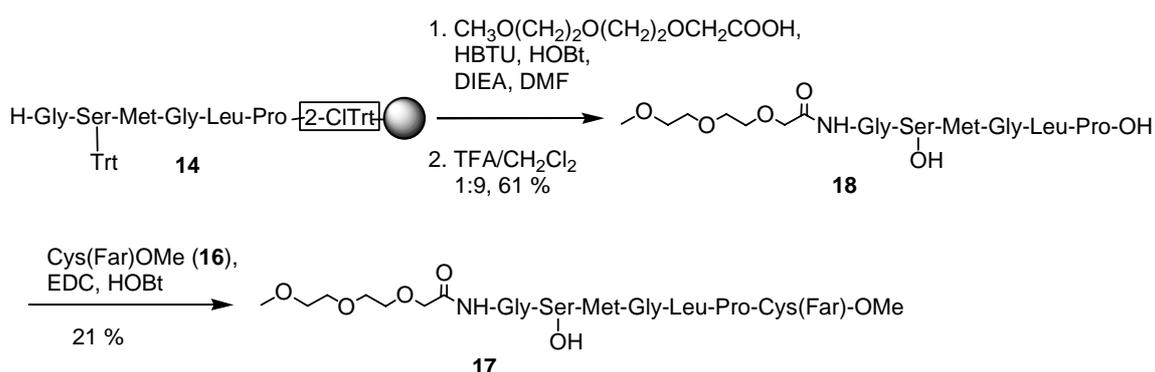


Abbildung 18: Farnesyliertes Serin-Analogon **17** mit Ethylenglykolkette zur Verbesserung der Löslichkeit.

Die Synthese wurde genauso wie bei den anderen Peptiden (Schema 10) durchgeführt. In diesem Fall bereitete jedoch die (erwünschte) hohe Polarität des Peptids **17** bei seiner Aufreinigung nicht unerhebliche Schwierigkeiten.



Schema 10: Darstellung des wasserlöslichen farnesylierten Serinpeptids **17**.

Die Anknüpfung der Methoxyethoxyethoxyessigsäure an das polymergebundene Hexapeptid **14** verlief glatt, die freie Säure **18** konnte jedoch nicht durch Säulenchromatographie gereinigt werden, da sie auf dem Kieselgel adsorbiert wurde und auch durch reines Methanol nicht eluiert werden konnte. Versuche zur Aufreinigung über HPLC scheiterten daran, dass das

Molekül UV-spektroskopisch nicht detektiert werden kann, weil seine ohnehin schwache Absorption unter der des Acetonitrils liegt; zudem wird es selbst von C18-funktionalisiertem Säulenmaterial kaum zurückgehalten. Auf eine echte Aufreinigung musste also verzichtet werden; da jedoch die Nebenprodukte aus der Tritylentschützung die Fragmentkondensation störten, wurde eine „Filtrierung“ über C18-funktionalisiertes Säulenmaterial in einer „sep-pac“-Kartusche durchgeführt. Hierzu wurde das Rohprodukt in wenig Wasser aufgenommen und auf eine vorgewaschene und mit Wasser konditionierte Kartusche aufgetragen. Durch Spülen mit Wasser und 10 % MeCN in Wasser wurde die freie Säure herausgewaschen; die Verunreinigungen blieben weitgehend an das Säulenmaterial gebunden.

Auch nach der Kupplung mit dem farnesylierten Cysteinmethylester **16** blieb die Aufarbeitung schwierig. Wie erhofft war das Produkt **17** gut in Wasser löslich, so dass sich eine extraktive Aufarbeitung verbot, wie sie für die anderen lipidierten Peptide nach der Fragmentkondensation zur Entfernung des Harnstoffs und des Hydroxybenzotriazols durchgeführt wurde. Säulenchromatographie auf Kieselgel führte auch hier nicht zu befriedigenden Ergebnissen: Zwar ließ sich das Produkt mit sehr polaren Lösungsmittelgemischen von der Säule waschen, die Ausbeuten waren aber verschwindend gering und die Reinheit nicht ausreichend. Das Detektionsproblem im UV, für **18** bereits angesprochen, bestand auch für das Peptid **17**, so dass die besten Ergebnisse auch in diesem Fall durch Reinigung über eine „sep-pac“-Kartusche erzielt wurden. Die lipophile Farnesylgruppe sorgte immerhin für eine so gute Anbindung an das Trägermaterial, dass durch fraktioniertes Spülen mit Acetonitril/Wassergemischen tatsächlich eine ausreichende Aufreinigung erzielt werden konnte: das Produkt wurde mit 40 Vol.-% Acetonitril in Wasser von der Säule gewaschen. Somit konnte das lösliche Peptid **17** in zwar nur mäßiger Ausbeute von 21 % hergestellt werden, stand aber immerhin in ausreichender Menge und Reinheit für die biologischen Experimente zur Verfügung. Die gute Wasserlöslichkeit versprach ein im Vergleich zum biotinylierten Peptid **13a** deutlich besseres Verhalten in den Mikroinjektionsexperimenten.

Die Mikroinjektionsstudien von Melanie Wagner verliefen jedoch allesamt ernüchternd: Bei der Injektion des full-length RasG12V-Proteins mit verschiedenen Mengen **17** konnte keine Reduktion der Transformationsrate beobachtet werden, also auch nicht der Abfall in der Größenordnung der Fehlerbreite, der für das biotinylierte Peptid **13a** festgestellt worden war. Dies kann zwei Ursachen haben: Entweder sind die Serinpeptide *per se* nicht aktiv, und die (ohnehin schwachen) Hinweise auf eine inhibitorische Aktivität des biotinylierten Peptids **13a** sind ein Artefakt; oder die Peptide **13a** und **17** weisen spezifisch verschiedene Eigenschaften

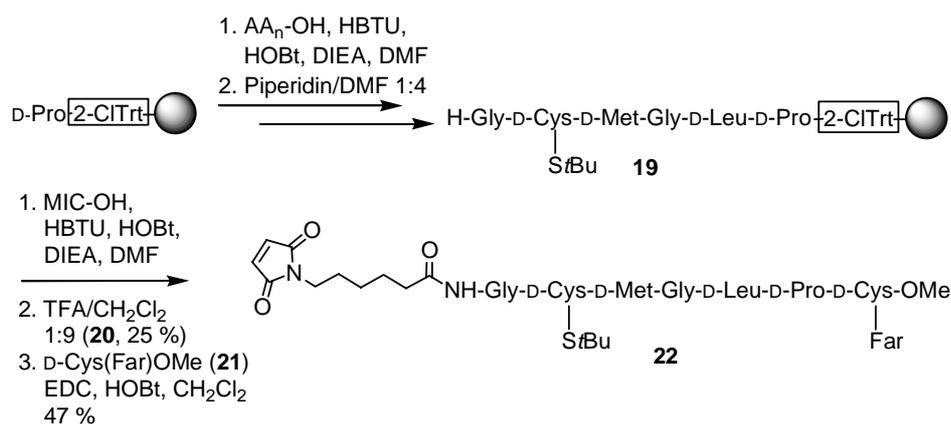
auf. Gerade die gute Löslichkeit des Ethylenglykolmodifizierten Peptids könnte ein Schlüssel zum Verständnis sein: möglicherweise wird das wasserlösliche Peptid während der Inkubation von den Zellen an das Medium abgegeben, sei es durch aktive Ausscheidungsvorgänge, sei es durch den Wechsel zwischen der inneren und äußeren Membranseite in einem „Flip-Flop-Mechanismus“. Wenn dieses sehr polare Peptid tatsächlich die Außenseite der Plasmamembran erreicht, wäre es nur natürlich, wenn es binnen kürzester Zeit an das Medium verloren ginge.

Arbeiten der Gruppe von G. M. WHITESIDES weisen aber auch auf eine weitere mögliche Erklärung hin: auf der Suche nach „Protein-resistenten“ Oberflächen fanden sie, dass mit Oligo(ethylenglykol) funktionalisierte Goldoberflächen deutlich widerstandsfähiger gegenüber Fibrinogen und Lysozym waren als solche mit gleich langen Alkylketten.^[165] Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass die Ethylenglykolkette *selbst* die Interaktion des Peptids mit anderen Proteinen stört.

Vernünftigerweise stünden an dieser Stelle Versuche, das biotinylierte Peptid **13a** doch noch in ausreichender Konzentration stabil zu lösen. Hierzu könnten z.B. Kosolventien verwendet, oder das Peptid an Streptavidin gebunden werden. Beides zöge umfassende Untersuchungen nach sich, um zu belegen, dass beobachtete Effekte nicht auf die Schädigung der Zelle durch das Cosolvens oder Streptavidin zurückzuführen sind, noch dass sie durch eine Inaktivierung des onkogenen Ras-Proteins zustande kommen. Da mit vertretbarem Aufwand keine eindeutigen Ergebnisse mehr zu erwarten waren, wurden die Experimente zu den inhibitorischen Serinpeptiden an dieser Stelle abgebrochen.

4.1.3 Synthese und Untersuchung von N-Ras-D-Peptiden

Einige Veröffentlichungen der letzten Jahre deuten auf einen spezifischen Rezeptor für Ras in der Plasmamembran hin, der den C-terminalen Bereich und die Farnesylgruppe erkennen soll.^[96, 97] Trifft dies zu, dürften Ras-Proteine, deren C-terminale Hexapeptidsequenz aus D-Aminosäuren aufgebaut ist, nicht erkannt werden und folglich biologisch nicht – oder zumindest nicht voll – aktiv sein. Dieser Überlegung folgend wurde mit der hier entwickelten „Baukastenstrategie“ das D-konfigurierte farnesylierte MIC-Peptid **22** aufgebaut (Schema 11) und von Melanie Wagner nach Ankopplung an Ras biologisch untersucht.



Schema 11: Synthese des D-konfigurierten farnesylierten MIC-peptids **22**.

Das MIC-modifizierte D-Hexapeptid **20** wurde durch Ankupplung von MIC an das Peptid **19** hergestellt und in 25 % Ausbeute (ausgehend vom D-Prolin-Harz) vom polymeren Träger abgespalten. Der farnesylierte D-Cysteinmethylester **21** wurde analog dem L-Enantiomer **16** in ebenfalls 50 % Ausbeute hergestellt (vgl. Schema 9). Die Fragmentkondensation zum Zielpeptid **22** verlief ohne Schwierigkeiten; die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte wie gewohnt durch Säulenchromatographie.

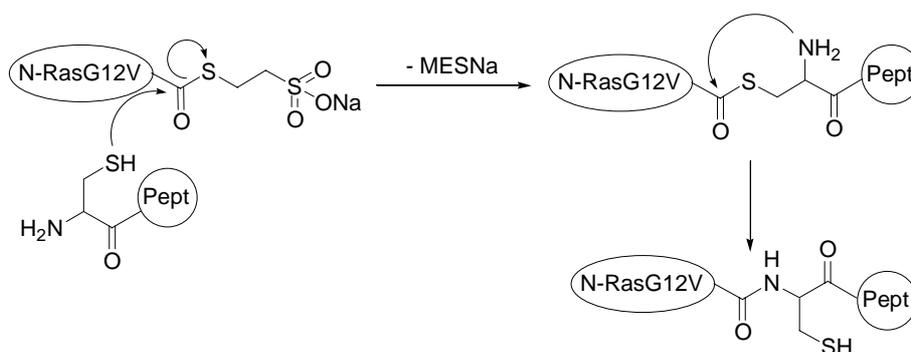
Die Ankupplung von **22** an ¹⁻¹⁸¹RasG12V und die Mikroinjektion des Ligationsprodukts in PC12-Zellen wurde wiederum von Melanie Wagner durchgeführt. Interessanterweise zeigte das Konstrukt mit D-konfiguriertem C-Terminus dieselbe biologische Aktivität wie das onkogene RasG12V mit der CaaX-Einheit. Da für die biologische Aktivität die Rekrutierung des Proteins an der Plasmamembran zwingend notwendig ist, muss trotz der D-konfigurierten Heptapeptidsequenz die Palmitoylierung erfolgt sein. Dafür gibt es drei mögliche Erklärungen: entweder ist die Palmitoyltransferase nicht stereospezifisch, oder sie erkennt einen *anderen* Teil des Proteins als das C-terminale Peptid, z.B. den Farnesylrest – oder es gibt gar keine Palmitoyltransferase für Ras! Dann wäre die Palmitoylierung ein spontaner, unspezifischer Prozess, was mit dem *kinetic trapping*-Modell durchaus im Einklang stünde.

Das Ergebnis passt zu zahlreichen anderen Untersuchungen, die gezeigt haben, dass ein lipophiler Rest (oder sogar eine Polylysinsequenz) und eine Palmitoylierungsstelle ausreichen, Peptide und Proteine an die Plasmamembran zu binden.^[107-109, 147] Unsere Untersuchungen schließen eine stereospezifische Erkennung der Aminosäuren zwischen Farnesylgruppe und Palmitoylierungsstelle im Zuge der Palmitoylierung aus.

Aufschlussreich wäre es nun, nicht nur die Palmitoylierung, sondern auch die Farnesylierung der zellulären Maschinerie zu überlassen. Dafür musste ein Protein hergestellt werden, das ebenfalls C-terminal aus D-Aminosäuren aufgebaut ist und zusätzlich über die CaaX-Einheit

verfügt. Für ein solches Konstrukt ist zu erwarten, dass es biologisch *nicht* aktiv ist, da die Farnesyltransferase spezifisch an die CaaX-Einheit bindet.

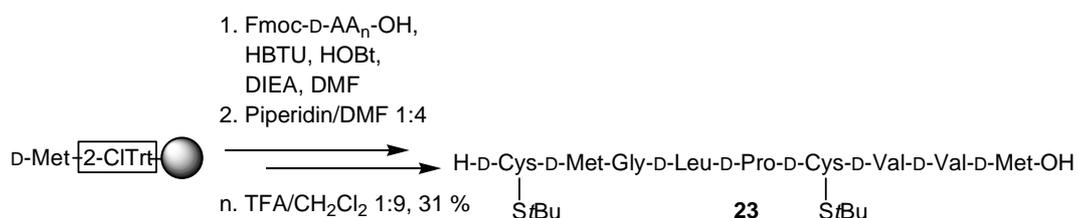
Als Ligationmethode sollte diesmal anstelle der MIC-Ligation die *expressed protein ligation* (EPL) verwendet werden. Bei dieser Methode wird das Protein auf biochemischem Wege als Thioester hergestellt. Durch das Thiol eines *N*-terminalen Cysteins wird eine Umesterung ausgelöst, an die sich eine *S,N*-Acylverschiebung anschließt (Schema 12).^[166]



Schema 12: Prinzip der *expressed protein ligation* (EPL).

Gegenüber der MIC-Ligation hat die EPL den Vorzug, dass das Ligationsprodukt ein „natürliches“ Peptidrückgrat ohne „fremde“ MIC-Gruppe aufweist. Für die Synthese des C-Terminus ergibt sich daraus, dass die Ankupplung der Maleimidocaprinsäure entfällt.

Nach diesen Vorüberlegungen ergibt sich das Peptid **23** als Zielverbindung; seine Synthese ist in Schema 13 dargestellt.



Schema 13: Festphasensynthese des D-konfigurierten Nonapeptids **23** für die EPL

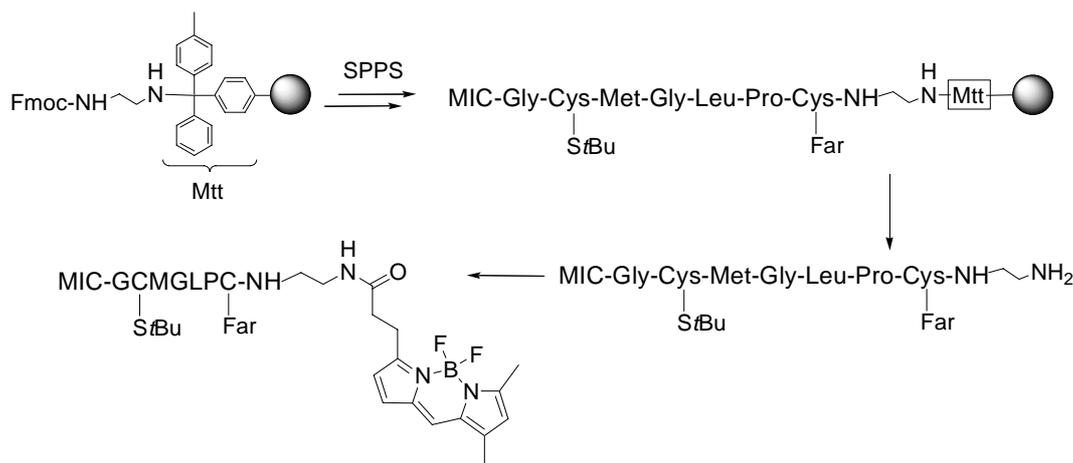
Um die freien Cystein-Seitenketten während der Reaktion zu schützen, wurde Thiobutylgeschütztes Fmoc-D-Cystein eingesetzt. Arbeiten von Dr. Ines Heinemann und Dipl.-Biochem. Thomas Durek hatten gezeigt, dass als Disulfid geschützte Peptide in der Proteinligation unter reduktiven Bedingungen eingesetzt und *in situ* durch Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz (MESNa) entschützt werden können.^[158, 167]

Die Synthese des Peptids verlief ohne besondere Vorkommnisse; Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 lieferte das reine Nonapeptid **23** in 31 % Ausbeute. Die Ligation und die biologische Untersuchung des resultierenden Proteins sollen von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kuhlmann durchgeführt werden; bislang liegen

noch keine Ergebnisse für dieses Peptid vor. Abhängig von den Ergebnissen dieser Experimente könnte es aufschlussreich sein, gemischt D- und L-konfigurierte Peptide herzustellen und in biologischen Tests einzusetzen. Besonders interessant wäre beispielsweise der Vergleich zwischen einem N-Ras-D-Peptid mit L-konfigurierter CaaX-Einheit und einem, bei dem nur das aaX-Tripeptid L-konfiguriert vorliegt. Mit solchen Verbindungen könnte z.B. die Selektivität der CaaX-Endoprotease untersucht werden.

4.1.4 Fluoreszierende Peptide

Obwohl die Untersuchung des D-Peptids **22** aufschlussreiche Ergebnisse gebracht hat, wäre es doch wünschenswert, die korrekte Lokalisation des Proteins auch visuell verfolgen zu können. Dies ist beispielsweise durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie möglich, bei der ein dreidimensionales Bild der Verteilung einer geeignet markierten Sonde in der Zelle erhalten wird. Zu diesem Zweck wäre ein D-Peptid herzustellen, das einen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Reinhard Reents hat im Rahmen seiner Dissertation^[153] zahlreiche Verbindungen mit verschiedenen Fluorophoren dargestellt. Dabei erwiesen sich leider gerade die Peptide als nicht aktiv, die BODIPY oder NBD als Fluorophor wie die hier beschriebenen BP-Analoga im Farnesylrest trugen. Dansyl- und Mant-markierte Peptide zeigten zwar eine biologische Aktivität, ihre Fluorophore erwiesen sich jedoch als ungeeignet für die Mikroskopie. Durch eine andere Strategie konnten indes Peptide hergestellt werden, die C-terminal anstelle des Methylrests mit BODIPY FL als Fluorophor versehen waren. Der Farbstoff wird über eine Ethylendiaminbrücke angebunden; die Synthesestrategie ist in Schema 14 dargestellt.



Schema 14: Darstellung von fluoreszierenden N-Ras-Peptiden nach R. REENTS.^[153]

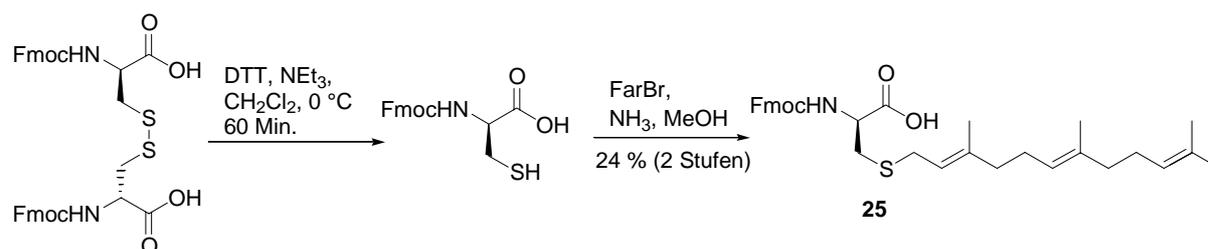
Weil es bei dieser Synthesestrategie nötig ist, die Farnesylgruppe bereits an der festen Phase einzuführen, muss der 2-Chlortrityllinker durch den Methyltrityllinker (Mtt) ersetzt werden, der durch noch schwächere Säuren gespalten wird. Nach der in Schema 14 dargestellten

Strategie sollte nun das BODIPY-markierte D-Peptid **24** dargestellt werden. Freundlicherweise stellte Reinhard Reents hierfür Ethylendiamin-funktionalisiertes Methyltritylharz zur Verfügung.

4.1.4.1 Synthese von Fmoc-D-Cys(Far)OH und BODIPY FL

Vor der Synthese mussten mit Fmoc-D-Cys(Far)-OH und BODIPY FL zwei Bausteine hergestellt werden, die nicht oder nur zu prohibitiven Preisen kommerziell verfügbar sind.

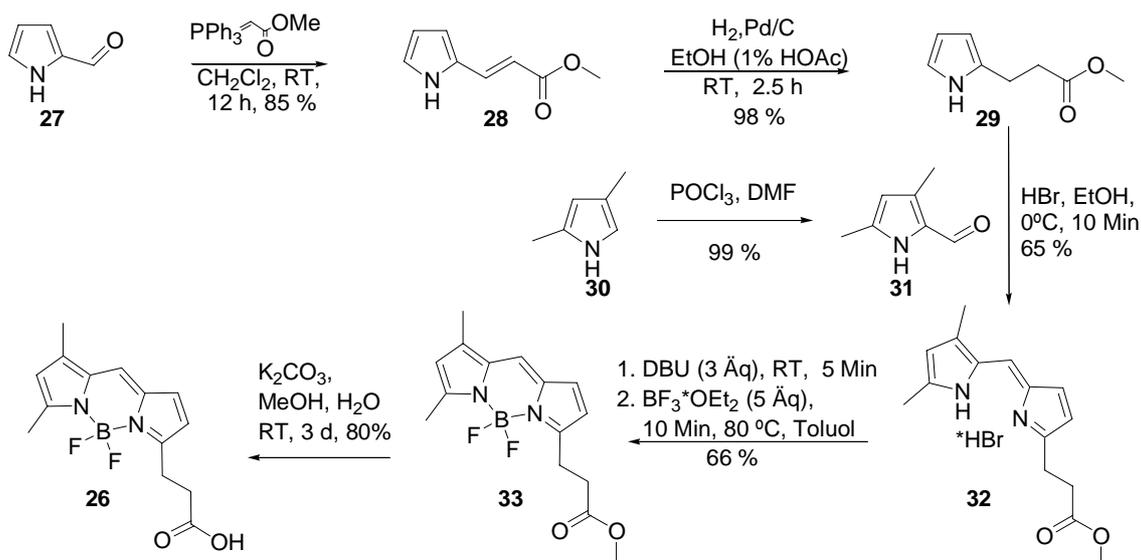
Für die Synthese des Fmoc-D-Cys(Far)-OH (**25**) wurde Fmoc-D-Cystin in CH_2Cl_2 bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ unter basischen Bedingungen mit DTT reduziert (Schema 15).



Schema 15: Synthese von Fmoc-D-Cys(Far)-OH **25**.

Nach Waschen mit 1N HCl wurde die organische Phase getrocknet und das CH_2Cl_2 entfernt. Die anschließende Alkylierung mit Farnesylbromid wurde in 2N NH_3 in MeOH durchgeführt^[157] und lieferte das gewünschte Produkt **25** in 24 % Gesamtausbeute. Da für die geplanten Synthesen genug Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt werden konnte, wurde diese Synthese nicht weiter optimiert.

Gleichzeitig wurde in Zusammenarbeit mit Diplom-Chemiker Carsten Peters eine Syntheseroute für BODIPY FL (**26**) ausgearbeitet (Schema 16), weil das käufliche Fluorophor mit einem Preis von 200 € für 5 mg viel zu teuer für eine Anwendung wäre. Da der Beitrag von Carsten Peters inhaltlich nicht von meinen Arbeiten zu trennen ist, findet sich dieser Abschnitt inhaltsgleich in seiner Dissertation wieder.^[168] Die Synthese geht auf ein Patent der Firma Molecular Probes zurück; hierin ist allerdings die Synthese nicht für BODIPY FL, sondern für ein anderes Derivat angegeben,^[169] welches aber nicht als freie Carbonsäure hergestellt werden kann und somit für die Markierung von Peptiden wertlos ist.



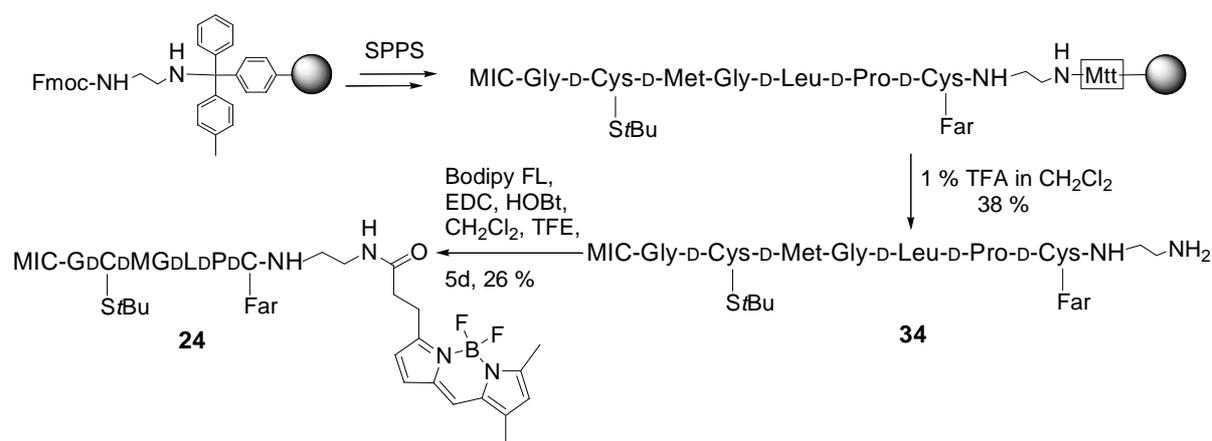
Schema 16: Synthese des Fluoreszenzfarbstoffs BODIPY FL (**26**).

Die Synthese des Farbstoffs geht von Pyrrol-2-carbaldehyd (**27**) aus, der zunächst in 85 % Ausbeute in einer Wittig-Reaktion zum Acrylsäuremethylester **28** verlängert wird. Die folgende Hydrierung der Doppelbindung verläuft fast quantitativ, wenn man den Fortgang der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Reaktion abbricht, ehe der Pyrrolring angegriffen wird. Das so erhaltene Produkt **29** reagiert selektiv an der 5-Position in einer sauer katalysierten Kondensationsreaktion mit 3,5-Dimethylpyrrol-2-carbaldehyd **31**. Dieser ist zwar kommerziell – zum Preis von 180 € pro Gramm – erhältlich, wird aber besser in einer Vilsmeier-Formylierung quantitativ aus 2,4-Dimethylpyrrol (9 €/g) gewonnen. Für die nachfolgende Verbrückung der beiden Pyrrolringe ist die Güte des BF_3 -Diethylether-Komplexes entscheidend; am besten wird das Reagens aus den handelsüblichen Flaschen in ein Schlenkrohr überführt und im Kühlschrank unter Argon aufbewahrt. Bei der Reaktion selbst sollte die Zeit zum Aufheizen auf 80 °C nach der Zugabe des Bortrifluoridkomplexes so kurz wie möglich gehalten werden. Es hat sich bewährt, ein Ölbad auf 80 °C vorzuheizen und den Kolben direkt nach der Zugabe des Komplexes damit zu beheizen; diese Technik bleibt naturgemäß jedoch auf kleine Reaktionsmaßstäbe beschränkt, weil sonst die Wärmeübertragung zu langsam vonstatten ginge. In Ansätzen im millimolaren Maßstab konnte unter diesen Bedingungen der stark fluoreszierende Ester **33** in einer Ausbeute von 66 % gewonnen werden. Als letzter Schritt muss noch die Carbonsäure freigesetzt werden. Die besten Bedingungen für die Verseifung waren – wie im Patent beschrieben – die Verwendung von K_2CO_3 als Base in einer Mischung aus MeOH und Wasser (4:1). Nach drei Tagen wird die Reaktionsmischung auf eine Mischung von Chloroform und Wasser verteilt und die wässrige Phase mehrmals mit Chloroform gewaschen, um Reste des Esters zu

entfernen. Anschließend wird die wässrige Phase unter Eiskühlung durch tropfenweise Zugabe von 0.1 N HCl auf pH 3 angesäuert und erneut drei Mal mit Chloroform extrahiert. Zu saure Bedingungen führen zur Zerstörung des Fluorophors, so dass diese Ansäuerung sehr langsam und sorgfältig durchgeführt werden sollte. Gegebenenfalls kann während des Ansäuerns bereits Chloroform als organische Phase angeboten werden, dann ist bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 der Übergang des Produkts in die organische Phase zu beobachten. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird BODIPY FL (**26**) in Ausbeuten um 80 % erhalten. Für die meisten Anwendungen ist dieses Rohprodukt bereits rein genug, doch kann es säulenchromatographisch noch weiter aufgereinigt werden, wenn dies erforderlich sein sollte.

4.1.4.2 Synthese des BODIPY-markierten farnesylierten D-Peptids **24**

Nachdem die Fragmente für die Synthese bereitgestellt waren, wurde das Peptid **34** an der festen Phase aufgebaut. Seine Synthese erfolgte in 10 % Gesamtausbeute analog der Beschreibung von Reinhard Reents (Schema 17).^[153]



Schema 17: Synthese des BODIPY-markierten D-Peptids **24**.

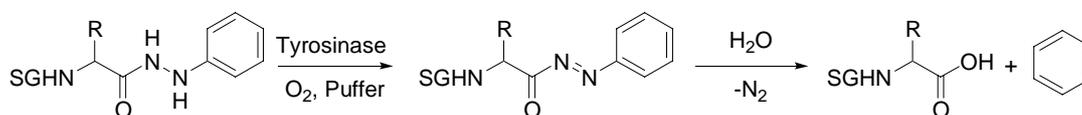
Auch hier wurden die Standardbedingungen der Fmoc-Peptidsynthese angewendet. Die Abspaltung des farnesylierten Peptids **34** mit 1 % TFA in CH₂Cl₂ lieferte das gewünschte Peptid in befriedigender Ausbeute. Die Ankupplung des Fluorophors verlief dagegen leider nur sehr langsam, und die Ausbeute war gering. Ein möglicher Grund ist, dass auch in diesem Fall die Verwendung von TFE als Cosolvens notwendig war; bis auf diesen Fall hatte es jedoch keine Anzeichen dafür gegeben, dass TFE die Peptidkupplung gestört hätte.

Die Ankupplung des D-Peptids **34** an das onkogene Ras-Protein und seine biologische Untersuchung sind noch nicht abgeschlossen.

Insgesamt ist in dieser Arbeit eine modulare Baukastenstrategie zum Aufbau unterschiedlich modifizierter Peptide entwickelt worden. Diese Strategie ermöglicht den schnellen und flexiblen Aufbau maßgeschneiderter Peptide für biologische Untersuchungen. Die Methodik erwies sich als sehr zuverlässig: die Synthese der verschiedenen Analoga verlief in der Regel in guten Gesamtausbeuten, und durch den modularen Aufbau der Sonden gelangen Veränderungen schnell. Mit dieser Strategie wurden photoaffinitätsmarkierte, D-konfigurierte und mit Serin modifizierte N-Ras-Peptide hergestellt und in biologischen Experimenten eingesetzt. In der Untersuchung vielfältiger Aspekte der Prozessierung und der Wechselwirkung von Ras mit weiteren Proteinen konnten diese Peptide ihren hohen Wert bereits unter Beweis stellen. Von den photoaffinitätsmarkierten Sonden darf nach den ersten Untersuchungen ein besonders hoher Erkenntnisgewinn erwartet werden.

4.2 Enzymatische Entschützung von Phenylhydraziden

Neben den Synthesen der photoaktivierbaren Peptide und ihrer biologischen Evaluierung wurde die enzymatische Phenylhydrazidentschützung untersucht. Bereits in den Arbeiten von Gernot Müller war gezeigt worden, dass die Phenylhydrazid-Schutzgruppe orthogonal zu Z-, Boc- und Alloc-Schutzgruppen ist (Schema 18). Boc- und Z- geschützte Aminosäurephenylhydrazide konnten so in guten bis sehr guten Ausbeuten entschützt werden.^[78] Fmoc-Prolin hatte sich dagegen nicht entschützen lassen. An zwei Boc- und zwei Z-geschützten Dipeptiden (Boc-Val-Ala, Boc-Leu-Thr, Z-Leu-Ser und Z-Ala-Pro) war ferner gezeigt worden, dass Dipeptide erfolgreich entschützt werden können, dass sich die Methodik also auch für die Peptidsynthese eignen müsste.



Schema 18: Enzymatische Abspaltung der Phenylhydrazid-Schutzgruppe von geschützten Aminosäuren

Sowohl die Einführung der Phenylhydrazide als auch die Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppen gelingen in guten bis sehr guten Ausbeuten.^[78] Zur Solubilisierung der Substrate während der Reaktion lassen sich eine Reihe von Cosolventien verwenden, darunter beispielsweise Acetonitril, Dioxan und DMF. Allerdings wird das Enzym deutlich inhibiert, wenn der Cosolvens-Anteil 20 Vol.-% übersteigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methodik für die Peptidsynthese etabliert werden.

4.2.1 Isolierung und Aufreinigung der Tyrosinase

Die Tyrosinase wurde weitgehend nach einer Prozedur von Gernot Müller isoliert und aufgereinigt.^[78] Die Rohextraktisolierung erfolgt dabei nach einer Vorschrift von S. G. BURTON,^[170] die Aufreinigung basiert auf der Methode von DUCKWORTH und COLEMAN.^[26]

Für die Isolierung wurden Champignons in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und portionsweise in Aceton homogenisiert. Nach Lyse der Zellen durch erneutes Einfrieren mit flüssigem Stickstoff wurden die hydrophoberen inaktiven Proteine mit Ammoniumsulfat (30 % Sättigung) ausgefällt. Durch weitere Steigerung der Ammoniumsulfat-Konzentration auf 60 % fällt die Tyrosinase aus. Dialyse des Sediments und anschließende Gefriertrocknung lieferte den zellfreien Extrakt, der eine genügende Reinheit für die weitergehenden Untersuchungen aufwies.

Bei der Isolierung der Tyrosinase ist vor allem darauf zu achten, dass alle Schritte im Kühlraum bei 0 bis 4 °C durchgeführt werden, da sonst die Aktivität der Enzympräparation drastisch sinkt.

Ferner ist wichtig, in welchem Entwicklungsstadium sich die Pilze befinden. Ihre Kappen sollten noch geschlossen sein, denn danach sinkt die Expressionsrate der Tyrosinase erheblich ab.^[30] Dagegen scheint es nicht ganz so bedeutsam zu sein, die Pilze absolut frisch zu beziehen: eine Enzymcharge, die aus Pilzen aus einem lokalen Supermarkt isoliert wurde, zeigte eine Aktivität im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite. Steht also kein Pilzzuchtbetrieb in der Nähe zur Verfügung, kann bequem auf diese alternative Bezugsquelle zurückgegriffen werden. Alles in allem ist also der Biokatalysator in einer vergleichsweise einfachen Prozedur aus billigen Ausgangsmaterialien in nahezu beliebiger Menge zugänglich. Aus 3 kg Pilzen können mit dieser Prozedur etwa 5-7 g Tyrosinasepräparation gewonnen werden.

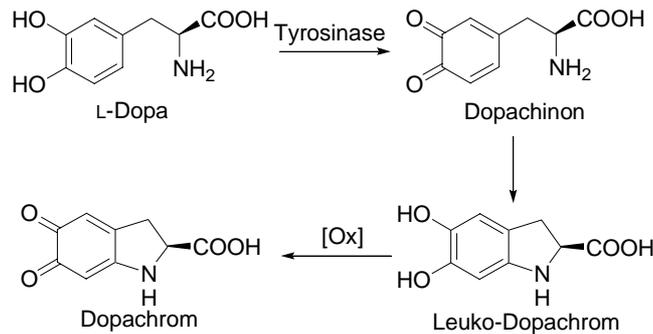
4.2.2 Charakterisierung der Enzympräparation

Die Frage der Aktivitätsbestimmung ist naturgemäß bei jeglicher Biokatalyse von außerordentlicher Bedeutung: Nur so ist zu unterscheiden, ob Schwankungen im Experiment auf Abweichungen zwischen verschiedenen Enzympräparationen zurückzuführen sind, oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen. Offenbar muss die Frage der Aktivitätsbestimmung bei der Tyrosinase besonders komplex sein, da diese zwei unterschiedliche Reaktionen katalysiert. Trotz vielfacher Bemühungen ist dieses Problem noch nicht befriedigend gelöst.^[11, 21, 171] Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Aktivitätsbestimmung zwei Assays benutzt, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll:

4.2.2.1 Dopachrom-Assay

Beim Dopachrom-Assay^[26] wird eine Unit definiert als die Menge Enzym, die in einer 10 mM Lösung L-Dopa in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 6.0 pro Minute 1 µmol Dopachrom erzeugt (Schema 19).

Da der Extinktionskoeffizient ϵ von Dopachrom bekannt ist, kann die Aktivität photometrisch durch Messung bei 305 nm oder 475 nm bestimmt werden. Ob es dabei Tyrosinase selbst ist, die Leuko-Dopachrom zu Dopachrom oxidiert, oder ob dies indirekt durch Reduktion von Dopachinon zu L-Dopa geschieht, ist für die Bestimmung unerheblich.



Schema 19: Oxidation von L-Dopa zu Dopachrom.

Dieses Assay besitzt den Vorzug, dass die gemessenen Werte direkt quantifiziert werden können, es liefert also „*International Units*“ nach den Vorgaben der *International Enzyme Commission* (IEC). Allerdings erfasst es offensichtlich nur die *Catecholase-Aktivität*; das Verhältnis aus Phenolase- und Catecholaseaktivität hängt indes mit Sicherheit vom Ursprungsorganismus der Tyrosinase ab, und möglicherweise auch von der Art der Präparation. Aus einer hohen Aktivität im Dopachromassay darf deshalb nicht auf eine hohe Phenolaseaktivität geschlossen werden. Zur Untersuchung der Tyrosinase (und insbesondere zur Unterscheidung zwischen Tyrosinase und Catechol-Oxidase) erscheint dieses Assay deswegen nur bedingt geeignet.

4.2.2.2 Tyrosin-Assay

Beim Tyrosin-Assay^[172] wird als Substrat L-Tyrosin eingesetzt und die Absorptionzunahme bei 280 nm photometrisch beobachtet. Die Definition der Unit erfolgt hier willkürlich: eine Unit erhöht die Absorption um 0.001 pro Minute. Bei 280 nm wird nicht nur die Absorption des L-Dopas beobachtet, sondern auch des Dopachinons und Dopachroms (vgl. Schema 19); demnach ist eine Quantifizierung hier nicht möglich.* Dieses Assay misst nicht alleine die Phenolase-Aktivität, da das entstehende L-Dopa sofort von der Tyrosinase weiter umgesetzt wird. Für die vorliegende Arbeit mag dies aber sogar ein Vorteil sein, da nicht klar ist, nach

* L. G. FENOLL et al. geben in einer neuen Veröffentlichung Extinktionskoeffizienten bei 280 nm an, die um die Einflüsse des Dopachroms und L-Dopas bereinigt sind.^[159] Mit den korrigierten Werten soll auch dieses Assay auf Internationale Units normiert werden können. In diese korrigierten Koeffizienten fließt jedoch das Verhältnis aus Catecholase- und Phenolase-Aktivität ein. Ob das Catecholase-/Phenolase-Verhältnis wirklich unabhängig von der Art der Präparation ist, kann aber bezweifelt werden. Besser wäre es meiner Meinung, photometrisch die Dopachrom-Konzentration (bei 475 oder 305 nm) zu bestimmen, und beide Enzymaktivitäten gemeinsam zu quantifizieren. Nach dem Stand der Kenntnis darf davon ausgegangen werden, dass die Phenolase-Aktivität stets geschwindigkeitsbestimmend ist. Nach einer solchen Definition würde eine Unit aus L-Tyrosin bei optimalem pH in einer Minute 1 μmol Dopachrom erzeugen.

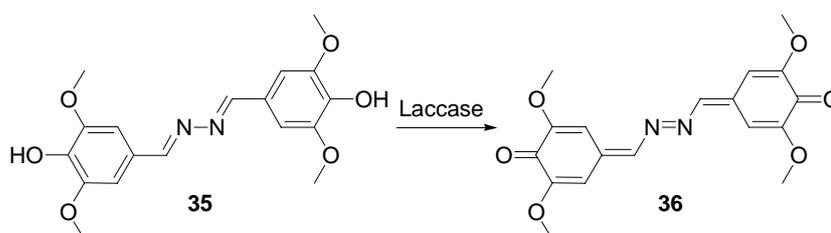
welchem Mechanismus die Phenylhydrazidspaltung abläuft, also welche der beiden Enzymaktivitäten dafür bestimmend ist.

Nach anfänglicher Arbeit mit dem Dopachrom-Assay, um mit den Ergebnissen von Gernot Müller vergleichen zu können, wurde deswegen dem Tyrosin-Assay der Vorzug gegeben. Alle in dieser Arbeit niedergelegten Daten werden ausschließlich auf dieses Assay bezogen.

4.2.2.3 Bestimmung des Laccasegehalts – Syringaldazin-Assay

Champignons exprimieren *Laccase* nur in ganz geringem Maße, und zwar hauptsächlich im Myzel und im unteren Bereich der Stiele.^[22] Trotzdem gibt es ein Beispiel dafür, dass eine zunächst der Tyrosinase zugeschriebene Reaktion tatsächlich durch Laccase katalysiert wurde: Sie trat als Verunreinigung in verschiedenen kommerziellen Tyrosinasepräparationen aus Champignons auf.^{*[173]} In einem weiteren Fall, der Arylkupplung substituierter Phenole, ist nicht bekannt, ob das verwendete Enzym auf die Gegenwart von Laccase geprüft wurde.^[174]

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Reaktionen nicht auf Laccase zurückzuführen sind, wurden einige Bestimmungen mit Syringaldazin (**35**) durchgeführt. Syringaldazin ist ein auf den Syringaaldehyd zurückgehendes phenolisches Substrat, dessen *o*-Positionen allesamt durch Methoxygruppen blockiert sind. Somit kann es von Tyrosinase nicht oxidiert werden, wohl aber von Laccase (Schema 20). In diesem Assay ist eine Unit definiert als die Enzymmenge, die die Absorption bei 530 nm pro Minute um 0.001 erhöht.



Schema 20: Oxidation von Syringaldazin (**35**). Die Oxidation wird durch Laccase katalysiert, nicht jedoch durch Tyrosinase.

Als erstes wurden eine kommerziell erworbene Laccase und die isolierte Tyrosinase mit Syringaldazin und Sauerstoff behandelt und nach 1, 3 und 24 Stunden UV-Spektroskopisch charakterisiert (Abb. 19). Dabei bildete sich im Fall der Laccase der Chromophor **36** mit

* Bei der Reaktion handelt es sich um die Oxidation von 2,6-Dimethoxy-4-alkylphenolen zu den korrespondierenden Chinonmethiden. Eine solche Reaktion wäre für Tyrosinase ungewöhnlich, für Laccase dagegen wäre sie zu erwarten.

einem Maximum bei 530 nm (Abb. 19a, Pfeilmarkierung), im Fall der Tyrosinase (Abb. 19b) konnte auch nach 24 h kein solches Maximum, also keine Umsetzung beobachtet werden.

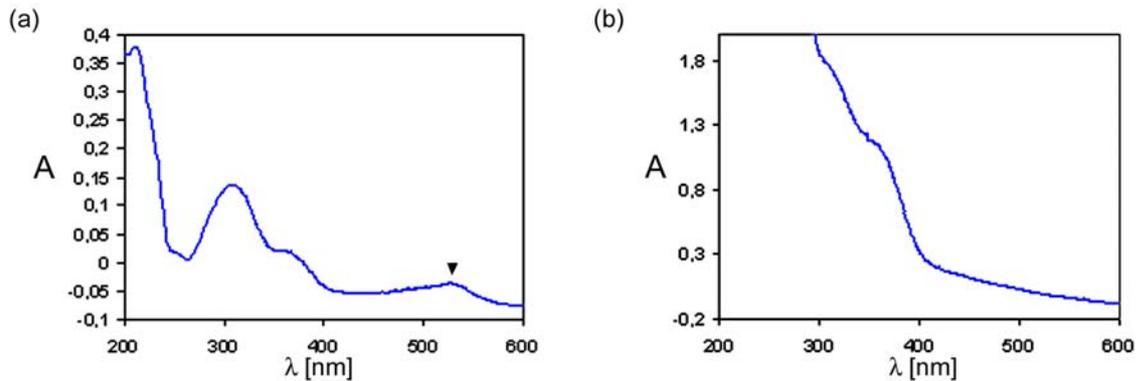


Abbildung 19: UV-Vis-Spektren von Syringaldazin mit Laccase (a) und Tyrosinase (b) nach jeweils 1 h.

Um ferner die Nachweisbarkeit auch kleiner Laccasemengen zu überprüfen, wurde die (Laccase-)Aktivität von Mischungen aus Tyrosinase und Laccase mit dem Syringaldazin-Assay bestimmt. Zu diesem Zweck wurden neben den reinen Enzymen auch Gemische in den Massenverhältnissen von 1:1, 1:4 und 1:20 (Laccase:Tyrosinase) untersucht (Abb. 20).*

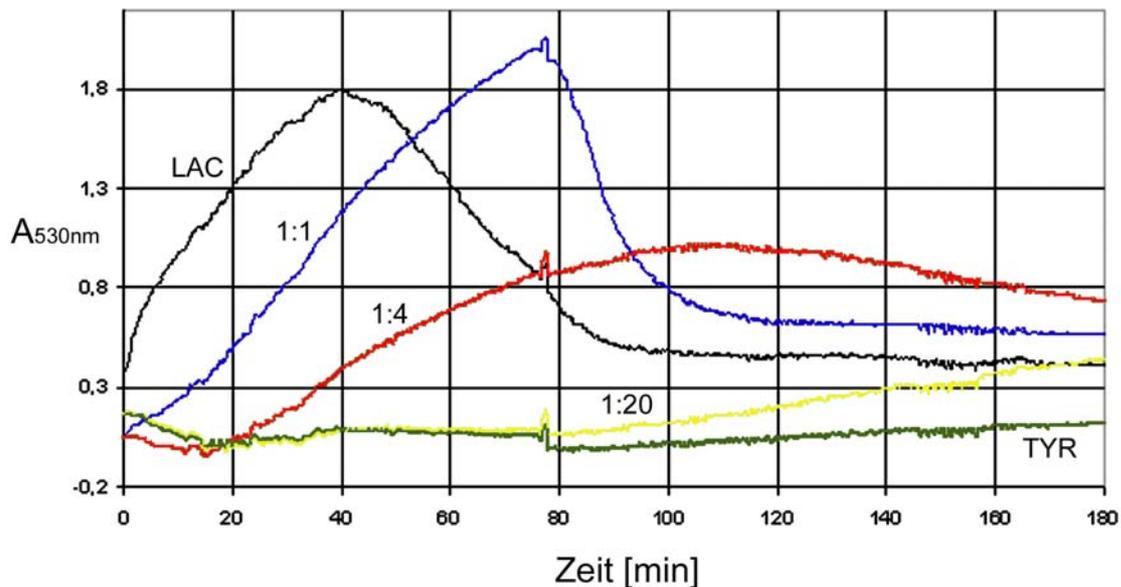


Abbildung 20: Absorptions-Zeitverläufe von Laccase (LAC), Tyrosinase (TYR) und dreier Gemische bei 530 nm. Der Ausschlag bei 77 Min. wurde durch zwischenzeitliches Öffnen des UV-Vis-Spektrometers verursacht.

* Bei diesem Vorgehen werden die unterschiedlichen Molmassen der Enzyme ignoriert. Da jedoch das Syringaldazin-Assay ohnehin keine quantifizierbare Unit-Definition verwendet und der Anteil des aktiven Proteins in beiden Präparationen unbekannt ist, erscheint diese Vereinfachung legitim und zweckmäßig.

Der erste Bereich der Kurven wird bestimmt durch das *allmähliche Anlaufen* der Enzymreaktion, und zwar desto später, je höher der Anteil der Tyrosinase ist* – bei der reinen Laccaseprobe ist dieser Bereich nicht zu sehen. Es folgt ein Punkt (oder Bereich) mit maximaler Steigung, an dem die Enzymaktivität ihren höchsten Wert erreicht; diese Steigung wird zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. Anschließend flachen die Kurven immer stärker ab und sinken schließlich wieder. Dieses Abflachen wird durch eine Kombination mehrerer Faktoren hervorgerufen: durch die Deaktivierung des Enzyms (möglicherweise durch Reaktion mit dem Produkt, aber auch durch eine unspezifische „Selbstmordaktivität“ der Laccase), durch Verarmen der Lösung an frischem Substrat und schließlich durch die begrenzte Lebensdauer der detektierten Spezies: sie kann als reaktives Chinonmethid nicht nur mit dem Enzym, sondern auch mit dem Lösungsmittel reagieren.

Jede der Proben wurde nach der Messung nochmals UV-VIS-spektroskopisch charakterisiert; bei allen Gemischen konnte die Bande bei 530 nm beobachtet werden, nicht jedoch bei der Probe mit reiner Tyrosinase.

Die maximale Steigung der Kurven, also *per definitionem* die Enzymaktivität, korreliert ungefähr mit der Menge der zugesetzten Tyrosinase: Die Aktivität der 1:1-Mischung ist etwa halb so groß wie die der reinen Laccase usw. Anscheinend gibt es eine Konkurrenz zwischen Tyrosinase und Laccase um die Bindung des Syringaldazins, Tyrosinase kann aber – wie gezeigt – das Substrat nicht umsetzen. Ähnlich, wie der Komplex der Phenole mit der Ruheform der Tyrosinase eine Sackgasse darstellt (vgl. Schema 1), scheint Tyrosinase bei der Laccase eine Latenzperiode zu induzieren. Einen entscheidenden Unterschied gibt es jedoch: Bei der Latenzzeit der Tyrosinase wird das Enzym *selbst* inhibiert, hier inhibiert Tyrosinase aber offensichtlich die Laccase. Wie ist das zu verstehen?

Als Schlüssel zum Verständnis sollen hier vier Annahmen dienen:

- die Tyrosinase bindet sowohl Syringaldazin (**35**) als auch das Chinonmethid **36** – letzteres eventuell, aber nicht unbedingt, sogar mit höherer Affinität;
- das Chinonmethid **36** zeigt auch dann ein Maximum bei 530 nm, wenn es an Tyrosinase oder Laccase gebunden ist;
- das Substrat stellt den limitierenden Faktor dar;
- die Tyrosinase liegt im Überschuss gegenüber der Laccase vor.

* Ganz ähnlich verlaufen die Kurven, beobachtet man beispielsweise die Oxidation von Phenolen mit Tyrosinase. In diesem Fall ist die Induktionsperiode, also der Inhibitor-Komplex für das verzögerte Anspringen der Reaktion verantwortlich.

Unter diesen Annahmen kann die Latenzzeit folgendermaßen erklärt werden: zunächst wird die Hauptmenge des Syringaldazins (reversibel) an die Tyrosinase gebunden. Deshalb steht der Laccase zunächst weniger Substrat zur Verfügung, als sie umsetzen *könnte*; erst das freigesetzte Oxidationsprodukt verdrängt das Syringaldazin von der Tyrosinase, so dass die maximale Steigung erreicht wird. Die Geschwindigkeit nimmt dann wieder ab, weil das Syringaldazin schnell verbraucht wird.

Ob diese vier Annahmen plausibel sind, wird im Folgenden diskutiert.

Schwer oxidierbare Catechole, z.B. 4-Nitro-catechol (**37**), sind kompetitive Inhibitoren der Tyrosinase, 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (**38**) ist ein zumindest teilweise kompetitiver Inhibitor, ebenso die Koji-Säure (**39**), welche das Kupferzentrum chelatisiert, aber nicht prozessiert werden kann. Quercetin (**40**) ist ein starker Tyrosinaseinhibitor, dessen Funktionsweise noch nicht geklärt ist.^[13] Vergleicht man die Strukturen dieser *Inhibitoren* mit der des Syringaldazins (**35**), (Abb. 21) erscheint plausibel, dass es an das Enzym *bindet*. Zudem soll das Enzym eine oxidative C-C-Kupplung von Phenolen mit zwei *o*-Methoxysubstituenten katalysieren.^[174]

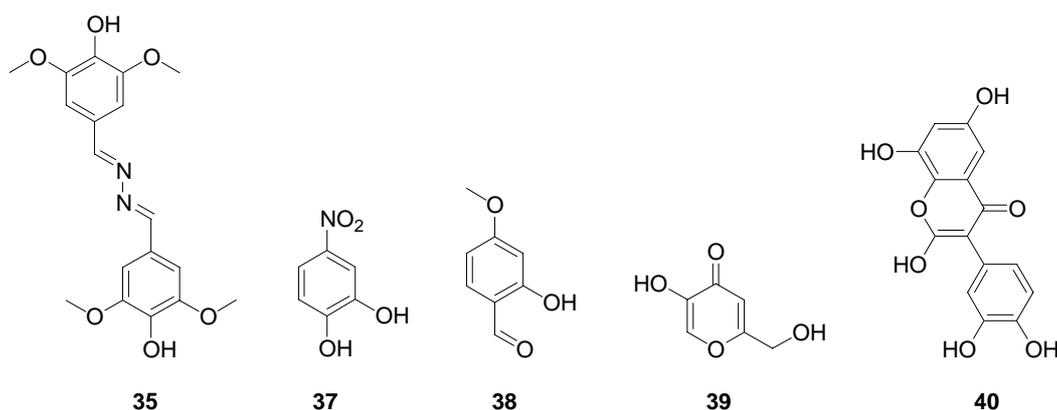


Abbildung 21: Syringaldazin und einige Inhibitoren der Tyrosinase.

Die zweite Annahme liegt eigentlich dem gesamten Laccase-Assay zugrunde, denn falsche Werte wären die Folge, zeigte gebundenes **36** *nicht* dieses Maximum. Darüber hinaus wären aber weitere Untersuchungen nötig, um diese Annahme zu beweisen.

Zur dritten Annahme sei hier ein Rechenbeispiel gegeben: die Konzentration des Syringaldazins im Assay beträgt 20 μM . Die Bestimmungen wurden so durchgeführt, dass in *jeder* Probe (außer der Blindprobe) 18 U Laccase eingesetzt wurden – dies entspricht 0.1 mg der kommerziellen Enzympräparation. Demnach hat die Mischung mit 20 Äquivalenten Tyrosinase eine Protein-Einwaage von 2.1 mg. Nimmt man für Tyrosinase eine Molmasse von 47 kDa an, läge allein die Konzentration der Tyrosinase bei über 14 μM ; der Überschuss des Substrates ist also nicht groß. Versuche, Syringaldazin (**35**) in höherer Konzentration

einzusetzen, scheiterten an seiner schlechten Löslichkeit im Puffer: es fällt während der Messung aus, wodurch es zu verfälschten Ergebnissen kommt. Messungen bei geringeren Enzymkonzentrationen (aber in den selben Enzymverhältnissen) wurden nicht durchgeführt, weil dann die Empfindlichkeit des Assays zu stark abfällt, besonders bei den Gemischen mit hohen Tyrosinaseüberschüssen.

Die letzte Annahme ist für die beiden tyrosinasereichen Gemische ohnehin selbstverständlich, aber auch im 1:1-Gemisch kann von einem Tyrosinaseüberschuß ausgegangen werden: für die Laccase aus *Rhus vernicifera* wurde eine Molmasse von 110 kDa beschrieben.^[43]

Insgesamt konnte durch diese Serie von Messungen gezeigt werden, dass die gemessene Laccaseaktivität umgekehrt proportional zu der zugesetzten Tyrosinase menge ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine „Laccasekontamination“ von unter fünf Prozent noch nachweisbar ist (1:20-Probe). Damit lässt sich in einer konservativen Schätzung der Laccasegehalt der verwendeten Tyrosinasepräparation auf weniger als 1-2 % abschätzen. Dieser geringe Anteil dürfte schwerlich substantiell zu den beobachteten Effekten beitragen.

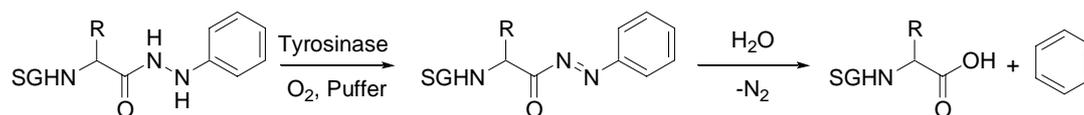
4.2.3 Entschützung von Phenylhydraziden mit Tyrosinase

4.2.3.1 Synthese der Substrate

Die in dieser Arbeit verwendeten Phenylhydrazide wurden nach den etablierten Methoden der organisch-chemischen Peptidsynthese aufgebaut. Di- und Oligopeptide wurden nach Entschützung durch Carbodiimid-vermittelte Kettenverlängerungen synthetisiert.^[80]

4.2.3.2 Screening-Experimente zur Entschützung von Aminosäuren und Peptiden

Um die Anwendungsbreite der Phenylhydrazidschutzgruppe zu untersuchen, wurden verschiedene Aminosäuren und Peptide zur Abspaltung des Phenylhydrazids im Maßstab von 50-100 mg in Phosphatpuffer und Cosolventien mit 0.2 Massenäquivalenten des Enzyms behandelt (Schema 21). Der Reaktionskolben wurde mit einem Septum verschlossen und ein Ballon mit Sauerstoff zur Begasung sowie eine 0.15 mm weite Entlüftungskanüle aufgesetzt.



Schema 21: Enzymatische Abspaltung der Phenylhydrazid-Schutzgruppe von geschützten Aminosäuren

Gernot Müller hatte bereits eine Reihe von Cosolventien auf ihre inhibierende Wirkung untersucht;^[78] darauf aufbauend wurden vor allem Acetonitril und Dioxan als Cosolventien verwendet. Einige Versuche mit zweiphasigen Systemen waren nicht erfolgreich: Chloroform

und Dichlormethan werden zu schnell vom Sauerstoff ausgetrieben, und auch iso-Octan führte zu schlechteren Ergebnissen als die homogenen Systeme. Nukleophile Lösungsmittel wie Methanol können aufgrund der möglichen Nebenreaktionen nicht eingesetzt werden. Der Cosolventienanteil wurde auf 20 % begrenzt, um das Enzym nicht zu sehr zu inhibieren.

Um eine autoxidative Abspaltung im Puffer auszuschließen, wurden alle Reaktionen gegen eine Blindprobe ohne Enzym getestet. Diese Hintergrundreaktion konnte für alle in dieser Arbeit untersuchten Aminosäurephenylhydrazide ausgeschlossen werden.

Die Umsatzgrade in den Tabellen 3 und 4 wurden anhand des zurückisolierten Edukts berechnet, die Ausbeuten sind bezogen auf das verbrauchte Edukt. Ein Rechenbeispiel zur Verdeutlichung: Können 20 % der Ausgangsverbindung zurückisoliert werden, beträgt der Umsatz 80 %. Bei 72 % isolierter Gesamtausbeute wäre die Ausbeute bezogen auf das umgesetzte Edukt 90 %. Durch die Verwendung größerer Mengen des Biokatalysators könnte der Umsatz pro Zeit gesteigert werden; für die Screening-Versuche wurde dies nicht als nötig erachtet.

Die Phenylhydrazidabspaltung von geschützten Aminosäuren ist in Tabelle 3 dargestellt. Alle Reaktionen wurden mit 10 % MeCN als Cosolvens durchgeführt.

Eintrag	Phenylhydrazid	Zeit [h]	Umsatz [%] ^a	Ausbeute [%] ^b
1	Boc-Gly 41	24	81	99
2	Boc-Ala 42	23	45	55
3	Boc-Leu 43	22	60	65
4	(Boc-Cys) ₂ 44	72	n.b.	0 ^c
5	Boc-Phe 45	15	60	87
6	Boc-Trp 46	24	58	75
7	Boc-His(Bzl) 47	42	30	13
8	Fmoc-Pro 48	192 ^d	22	58

Tabelle 3: Abspaltung der Phenylhydrazide von geschützten Aminosäuren mit jeweils 0.2 Massenäquiv. des Enzyms und 10 % MeCN als Cosolvens bei RT; ^a Umsatz bezogen auf zurückisoliertes Substrat, ^b isolierte Ausbeute, bezogen auf verbrauchtes Substrat, ^c Bildung eines nicht charakterisierbaren Addukts, ^d nach ein und drei Tagen Zugabe von weiteren 0.1 Äquivalenten Enzym.

Die Auswahl der Substrate in Tabelle 3 erfolgte unter zwei Gesichtspunkten: Zum einen wurden Aminosäuren gewählt, die bereits untersucht worden waren (Einträge 1-3, 5 und 8); diese Auswahl diente dazu, das hier durchgeführte Screening mit den optimierten Reaktionen zu vergleichen. Die Cystinverbindung **44** (Eintrag 4) wurde ausgewählt, um zu untersuchen,

wie sich das Disulfid unter den Abspaltungsbedingungen verhält; mit Boc-Trp-NHNHPh (**46**) und Benzylgeschütztem Boc-His(Bzl)-NHNHPh (**47**, Einträge 6 & 7) wurden zwei weitere unpolare Aminosäuren mit neuen funktionellen Gruppen eingebracht.

Mit dieser Auswahl wurde erstens überprüft, ob die Funktionalitäten der Seitenketten toleriert werden, und zweitens, wie sich die Polarität der Substrate auswirkt. Unter anderem sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Entschützung von Fmoc-Pro-NHNHPh (**48**) wegen seiner schlechten Löslichkeit scheiterte, oder ob bei der Reaktion andere Faktoren eine Rolle spielen. Tryptophan wiederum neigt bei anderen Oxidationsmethoden zu Nebenreaktionen, z.B. kann sein Hydrazid nicht mit NBS zum Acyldiazon oxidiert werden.^[175, 176]

Diese Versuche zur Entschützung von Aminosäurephenylhydraziden führten zu folgenden Ergebnissen:

Insgesamt konnten die Screening-Bedingungen validiert werden. Die Versuche geben verlässliche Informationen, ob sich Substrate entschützen lassen. Die gefundenen Werte für die Ausbeuten reichen zwar nicht ganz an die optimierten Werte heran, für einen orientierenden Überblick ist ihre Aussagekraft aber durchaus gut.

Alle eingesetzten Substrate konnten entschützt werden, die einzige Ausnahme bildet das Boc-Cystin-NHNHPh (**44**). Dieses wurde zwar (langsam) verbraucht, die resultierende Verbindung konnte jedoch nicht eindeutig charakterisiert werden. Ihr NMR-Spektrum weist aromatische Signale auf; das charakteristische Muster der Phenylhydrazidgruppe ist jedoch verschwunden. Offenbar ist das Disulfid *nicht* mit der oxidativen Abspaltung kompatibel. Erfreulich war dagegen, dass am Tryptophan **46** keine unerwünschten Oxidationsreaktionen beobachtet werden konnten.

Von besonderem Interesse war die Betrachtung der unpolaren Substrate (Einträge 5-8). Boc-Phe und Boc-Trp (5 und 6) verhielten sich sowohl von ihren Umsätzen als auch von der benötigten Reaktionszeit ähnlich wie die polareren aliphatischen Aminosäuren. Die besonders schlecht löslichen Substrate Boc-His(Bzl)-NHNHPh (**47**) und Fmoc-Pro-NHNHPh (**48**) konnten dagegen nur unter Schwierigkeiten zur Reaktion gebracht werden. Sie benötigten längere Reaktionszeiten und lieferten nur geringe Umsätze und Ausbeuten.

Trotzdem ist es bemerkenswert, dass unter forcierten Bedingungen auch Fmoc-Prolin entschützt werden konnte: nach extrem langsamer Reaktion unter Zugabe zweier weiterer Enzymportionen von 0.1 Massenäquivalenten konnte tatsächlich das freie Fmoc-Prolin isoliert werden.

Nachdem verlässliche und handhabbare Testbedingungen etabliert waren, wurden nun Dipeptide ausgewählt, mit denen die Anwendungsbreite der Reaktion für die Peptidsynthese überprüft werden sollte (Tabelle 4).

Eintrag	Phenylhydrazid	Zeit [h]	Massen- Äq. Enzym	Umsatz [%] ^a	Ausbeute [%] ^b
1	Boc-Leu-Pro 49	19	0.2	32	48
2	Boc-Gly-Val 50	19	0.2	80	96
3	Boc-Gly-Leu 51	55	0.2	90	83
4	Boc-Met-Gly 52	17	0.3	75	89
5	(Boc-Gly-Cys) ₂ 53	55	0.4	78	0 ^c
6	Boc-Trp-Trp 54	197	0.45	18	85
7	Boc-Trp(Bzl)-Gly 55	108	0.33	40	55
8	Boc-Phe-Phe 56	108	0.33	33	80
9	Fmoc-Phe-Phe 57	108	0.33	56	17
10	Fmoc-Phe-Thr(Bzl) 58	110	0.2	23	70

Tabelle 4: Phenylhydrazid-Abspaltung von Dipeptiden; ^a Umsatz bezogen auf zurückisoliertes Substrat, ^b isolierte Ausbeute, bezogen auf verbrauchtes Substrat, ^c Bildung eines nicht charakterisierbaren Addukts.

Als erste Gruppe wurden relativ polare Dipeptide ausgewählt, für die eine problemlose Entschützung erwartet wurde (Einträge 1-4). Allerdings stand zu befürchten, dass der Thioether des Methionins von Boc-Met-Gly-NHNHPh (**52**, Eintrag 4) unter den Reaktionsbedingungen zum Sulfoxid oxidiert werden könnte; dies ist eine häufig beobachtete Nebenreaktion in der Synthese methioninhaltiger Peptidsequenzen.^[177] Daneben wurde mit (Boc-Gly-Cys-NHNHPh)₂ (**53**, Eintrag 5) ein weiteres Disulfid eingesetzt, um das Ergebnis des Cystins **44** abzusichern. Schließlich wurden einige „schwierige“ unpolare Peptide untersucht (Einträge 6-10); hier wurden neben den beiden Trp-Peptiden (**54** und **55**, Einträge 6 und 7) auch zwei Peptide mit Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt, um die Stabilität der Fmoc-Gruppe unter den Reaktionsbedingungen zu bestätigen. Alle Versuche wurden mit 10 Vol.-% MeCN als Cosolvens durchgeführt. Auch für die Dipeptide wurde in Blindversuchen ausgeschlossen, dass die Hintergrundreaktion ohne Enzym von Bedeutung ist.

Wie schon das Boc-Cystin-NHNHPh **44** konnte auch das Cystin-Derivat **53** (Eintrag 5) nicht deblockiert werden; das Dipeptid wurde unter den Reaktionsbedingungen zerstört.

Alle anderen Dipeptide konnten dagegen erfolgreich deblockiert werden. Dies unterstreicht die große Anwendungsbreite der enzymvermittelten Phenylhydrazidspaltung. Bei der Entschützung der Dipeptide **50-52** (Einträge 2-4) wurden bereits nach kurzen Reaktionszeiten

hervorragende Umsätze und hohe Ausbeuten erzielt. Die Umsetzung des Leu-Pro-Dipeptids **49** (Eintrag 1) verlief etwas langsamer, durch Schwierigkeiten bei der Isolierung liegt die Ausbeute in diesem Fall nur bei 48 %.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass bei Boc-Met-Gly-NHNHPh **52** die befürchtete Oxidation des Methionins ausblieb. Die enzymatische Phenylhydrazidoxidation stellt somit eine sehr milde und selektive Methode dar.

Die unpolaren Peptide **54-58** benötigten auch in dieser Versuchsreihe mehr Zeit. Dass trotzdem die Ausbeuten bezogen auf das verbrauchte Edukt teilweise recht hoch liegen (Einträge 6, 8, 10), kann als Hinweis aufgefasst werden, dass weniger chemische Gründe dafür eine Rolle spielen als vielmehr die mangelhafte Zugänglichkeit des Enzyms für die kaum in Puffer löslichen Substrate.

Für die Planung einer Synthese mit der Phenylhydrazid-Schutzgruppe zeigen die hier dargestellten Versuche, dass alle gängigen Carbamatschutzgruppen mit der Phenylhydrazidgruppe kombiniert werden können. Allerdings sollte Boc- und Z-Gruppen der Vorzug vor der deutlich unpolaren und schlechter löslichen Fmoc-Gruppe gegeben werden, wann immer die gewählte Synthesestrategie dies erlaubt.

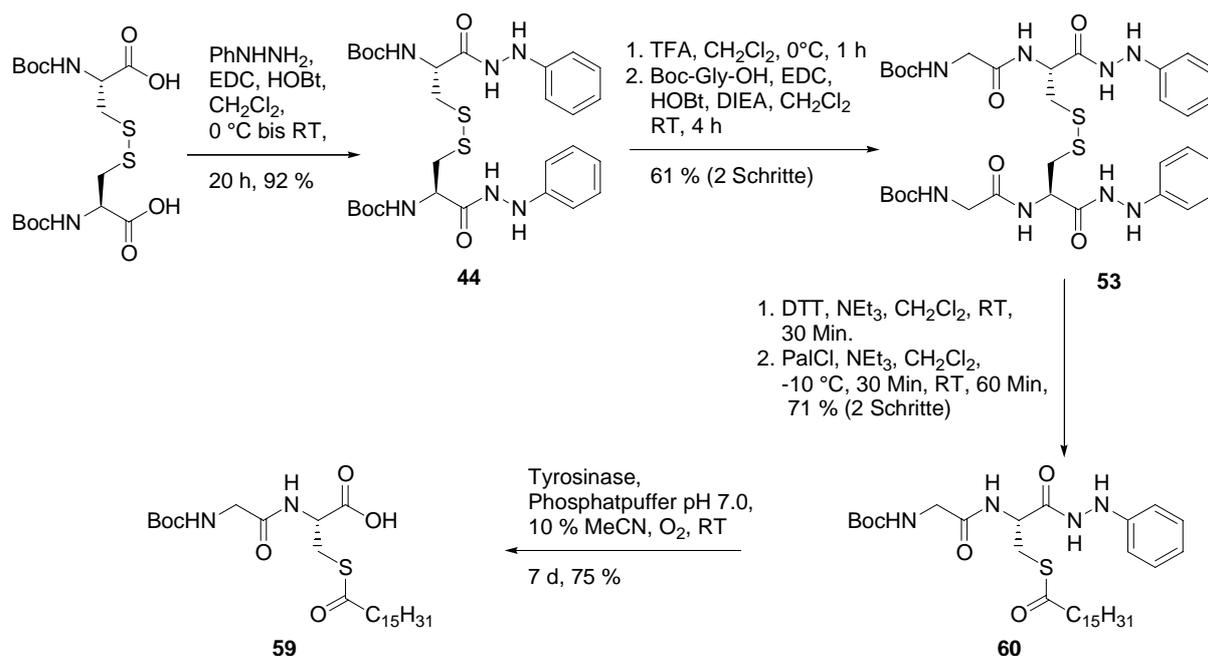
Disulfidgruppen sind dagegen mit der enzymatischen Phenylhydrazidsplaltung nicht kompatibel, sondern werden unter den Reaktionsbedingungen zersetzt. Mit dieser Einschränkung ist die enzymatische Phenylhydrazid-Abspaltung eine vielseitige und chemoselektive Methode. Sie ist kompatibel zu verschiedensten Aminosäuren, darunter Prolin, Tryptophan und sogar Methionin.

4.2.3.3 Einige Anwendungen der Phenylhydrazidentschätzung

An einigen präparativen Anwendungen wurde als nächstes die Eignung der Methodik in der Praxis auf die Probe gestellt. Hierzu wurde erstens untersucht, ob sich Phenylhydrazide in der Synthese basenlabiler Peptidkonjugate einsetzen lassen, ob zweitens die enzymatische Reaktion in präparativen Maßstäben handhabbar ist, und drittens, wie sich die Methode in mehrstufigen Synthesen von Tetra- und Hexapeptiden bewährt.

Als Beispiel für ein Peptidkonjugat wurde das palmitoylierte Dipeptid Boc-Gly-Cys(Pal)-OH (**59**) gewählt. Dieser Baustein wird zur Synthese des C-terminalen palmitoylierten N-Ras-Peptids* nach K. KUHN et al.^[148] benötigt. Seine Synthese ist in Schema 22 dargestellt:

* Dieses Peptid hat dieselbe Sequenz wie beispielsweise das in dieser Arbeit hergestellte, hier aber D-konfigurierte Peptid **22**; der Palmitoylrest ist an der Palmitoylierungsstelle aber bereits eingeführt.



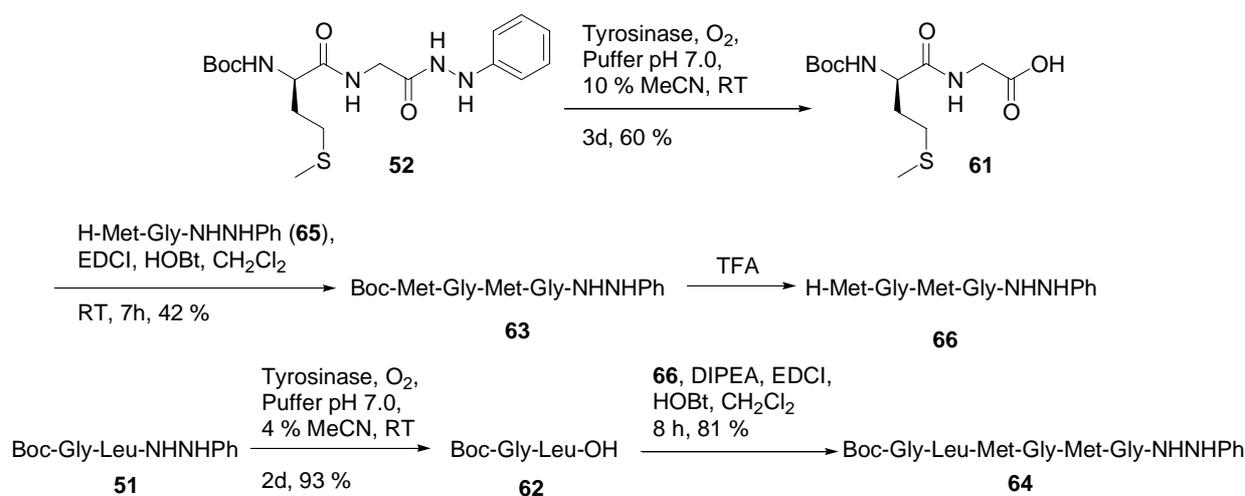
Schema 22: Synthese und enzymatische Entschützung des palmitoylierten Boc-Gly-Cys-Bausteins **59**.

Als erstes wurde Boc-L-Cystin unter Aktivierung mit EDC und HOBT in sein Phenylhydrazid **44** überführt; durch *N*-terminale Entschützung und Verlängerung mit Boc-Glycin wurde das Dipeptid **53** erhalten. Als nächstes wurde das Disulfid mit Dithiothreitol reduziert und das freie Thiol bei -10°C mit Palmitoylchlorid acyliert. Hierbei war es wichtig, die Temperatur einzuhalten, weil bei höheren Temperaturen die zusätzliche Acylierung eines Phenylhydrazidstickstoffs auftrat. Die enzymatische Phenylhydrazid-Spaltung gelang mit 0.5 Massenäquivalenten Tyrosinase in 7 Tagen mit 10 % MeCN als Cosolvens in 75 % Ausbeute, ohne dass β -Eliminierung oder Hydrolyse des labilen Thioesters festgestellt werden konnten. Mit dieser Sequenz wurde somit das palmitoylierte Dipeptid **59** in 31 % Gesamtausbeute hergestellt. Dies ist die erste Synthese eines Peptidkonjugats unter Verwendung einer enzymatisch spaltbaren oxidationslabilen Schutzgruppe. Damit eröffnet die enzymatische Abspaltung der Phenylhydrazide einen neuen Weg zur Darstellung von Peptidkonjugaten.

Die alternative Route ausgehend von (Tos-H*Cys-OAll)₂ liefert eine etwas höhere Gesamtausbeute von 50 %, ^[148] der Bis-(allyl)ester als Ausgangsverbindung ist jedoch um Größenordnungen teurer, so dass beide Methoden durchaus konkurrieren können.

Als nächstes wurden zwei Dipeptidbausteine im präparativen Maßstab entschützt; diese Bausteine sollten anschließend *C*-terminal zu Tetra- und Hexapeptiden verlängert werden. Zum ersten wurden 200 mg (0.53 mmol) Boc-Gly-Leu-NHNHPh (**51**) mit 70 mg (0.35 Massen-Äq.) Tyrosinase deblockiert. Aufgrund der recht guten Löslichkeit des Peptids konnte

die Reaktion mit lediglich 4 Vol.-% MeCN als Cosolvens durchgeführt werden. Nach zwei Tagen konnte die freie Carbonsäure in der exzellenten Ausbeute von 93 % isoliert werden. Die Freisetzung von Boc-Met-Gly-OH (**61**) aus 660 mg (1.66 mmol) Hydrazid **52** benötigte dagegen 10 Vol.-% MeCN und 0.45 Äq. (200 mg) Tyrosinase, um in drei Tagen mit 60 % Ausbeute zufriedenstellend zu verlaufen. Wie schon bei den Screening-Versuchen war auch dieses Mal keine Oxidation des Methionins zu beobachten. Mit diesen Experimenten konnte somit bestätigt werden, dass die Durchführung der Reaktion auch im präparativen Maßstab gelingt. Allerdings soll nicht verschwiegen werden, dass sich aus der Löslichkeit der Substrate praktische Probleme ergeben: in beiden Fällen wurde die Reaktion in etwa 250 mL Lösung durchgeführt - größere Ansätze bedürften entweder größerer Volumina oder höherer Cosolvensanteile, um die Substrate in ausreichendem Maße gelöst zu halten. Bei noch größeren Volumina wird die Aufarbeitung aufwendig, andererseits wird die Reaktion wegen der Inhibierung des Enzyms langsamer, wenn mehr Cosolvens verwendet wird. Außerdem muss sichergestellt werden, dass in Systemen mit hoher Substratkonzentration der pH-Wert stabil bleibt, dass also die Pufferwirkung ausreicht; sonst wird die Reaktionsmischung durch die freigesetzte Carbonsäure zu sauer. Alle diese Probleme können freilich gelöst werden: z.B. bliebe die Substratkonzentration geringer, wenn das Substrat langsam zudosiert wird, und der pH-Wert ließe sich durch Zudosierung von Base konstant halten. Mit den beiden Bausteinen Boc-Met-Gly-OH (**61**) und Boc-Gly-Leu-OH (**62**) wurden die Peptide Boc-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (**63**) und Boc-Gly-Leu-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (**64**) dargestellt, um die Anwendbarkeit der Methode auch in mehrstufigen Synthesen unter Beweis zu stellen (Schema 23).



Schema 23: Darstellung von **63** und **64** aus Bausteinen mit Phenylhydrazidschutzgruppe.

Das freie Methionin **61** wurde mit dem *N*-terminal entschützten Phenylhydrazid **65** C-terminal verlängert. Die Kondensation führt zum geschützten Tetrapeptid Boc-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (**63**), welches nach Boc-Abspaltung mit Boc-Gly-Leu-OH (**62**) EDC-vermittelt zum Hexapeptid **64** verlängert werden konnte. Das Hexapeptid wurde auf diese Weise in 21% Gesamtausbeute erhalten.

Analog wurde aus **61** und H-Leu-Pro-NHNHPh (**67**) das Tetrapeptid Boc-Met-Gly-Leu-Pro-NHNHPh (**68**) aufgebaut. Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-Met-Gly-NHNHPh (**69**) wurde dagegen durch Ankupplung von Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-OH (**70**) an das Phenylhydrazid **65** erhalten. Damit standen vier Phenylhydrazid-geschützte Oligopeptide zur Verfügung, die wiederum der enzymatischen Abspaltung unterworfen wurden (Tabelle 5).

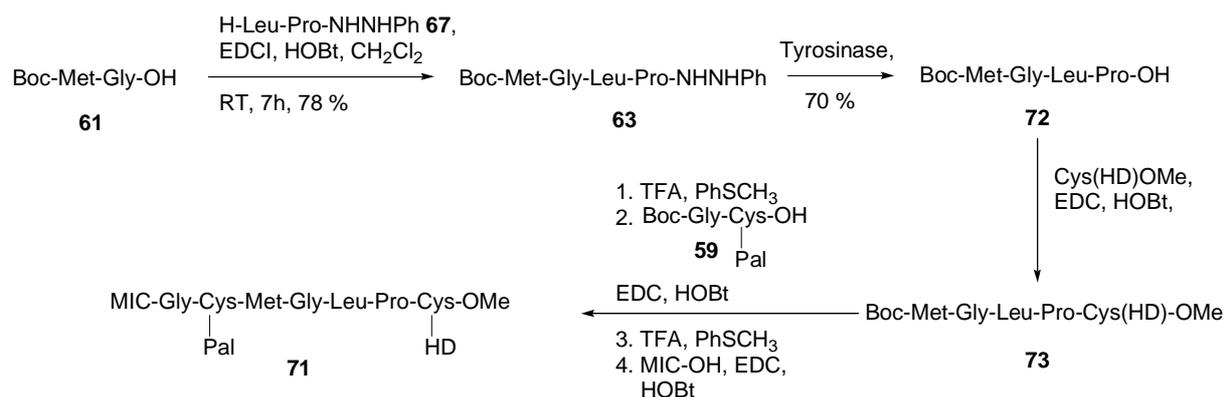
Eintrag	Phenylhydrazid	MeCN -Anteil	Zeit [d]	Massen-Äq. Enzym	Ausb. [%]	Reisol. Edukt [%]
1	Boc-Met-Gly-Leu-Pro (68)	10 %	1	0.8	70	18
2	Boc-Met-Gly-Met-Gly (63)	10 %	1	0.55	81	10
3	Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-Met-Gly (69)	10 %	4	0.5	16	61
4	Boc-Gly-Leu-Met-Gly-Met-Gly (64)	4 %	1	0.88	57	22

Tabelle 5: Enzymatische Freisetzung von Tetra- und Hexapeptiden.

Auch die Entschützung dieser Peptide verlief erfolgreich, die beiden Boc-Tetrapeptide **68** und **63** wurden nach 24 h Reaktionszeit in 70-80 % Ausbeute isoliert. Ähnlich stellt sich die Situation beim Boc-Hexapeptid **64** dar, das in 57 % Ausbeute isoliert werden konnte. Das Fmoc-Peptid **69** dagegen wurde auch in 4 Tagen nur in geringem Maße umgesetzt.

Für alle vier untersuchten Peptide wurden keine unerwünschten Nebenreaktionen wie Methionin-Oxidation, Abspaltung der *N*-terminalen Boc- bzw. Fmoc-gruppe oder Angriff peptidischer Bindungen beobachtet. Die Abspaltung der Phenylhydrazidgruppe erfolgt mit hervorragender Chemoselektivität. Diese Schutzgruppe ist somit sehr gut zur Synthese von Oligopeptiden aus Dipeptidbausteinen geeignet.

Formal kann mit den hier hergestellten Verbindungen nach K. KUHN et al.^[148] ein palmitoyliertes und hexadecyliertes N-Ras-Heptapeptid (**71**) dargestellt werden (Schema 24):



Schema 24: Formale Synthese des palmitoylierten und hexadecylierten C-terminalen N-Ras-Peptids **71** nach K. Kuhn ^[148] unter Verwendung der enzymlabilen Phenylhydrazidabspaltung.

Allerdings kann der zentrale Baustein **72** mit konventionellen Schutzgruppen schneller und effektiver aufgebaut werden.

Wollte man diese Strategie anwenden, um photoaktivierbare Peptide ähnlich den Peptiden aus dem ersten Teil darzustellen, müsste statt **72** ein Fmoc-geschützter Baustein eingesetzt werden: die saure Boc-Abspaltung ist nicht mit den Isoprenoiden kompatibel. Prinzipiell erscheint dieser Weg gangbar, allerdings werden hier die Nachteile der unpolaren Fmoc-gruppen zum Tragen kommen. Somit wäre hier der Einsatz der enzymlabilen Schutzgruppe zwar prinzipiell möglich, zwingend notwendig ist er chemisch aber nicht.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung der Phenylhydrazidgruppe im präparativen Maßstab möglich ist. Die entschützten Peptide konnten erfolgreich in Peptidkupplungen eingesetzt und so zu Tetra- und Hexapeptiden verlängert werden. Ferner ist es gelungen, ein palmitoyliertes Peptid aufzubauen und ohne β -Eliminierung oder Hydrolyse des extrem basenlabilen Thioesters enzymatisch zu entschützen. Alle untersuchten Entschützung verliefen ohne Nebenreaktionen. Amide, Carbamate und Seitenkettenfunktionalitäten wie Methionin und Cystein verblieben stets intakt.

Viele synthetisch arbeitende Chemiker stehen enzymatischen Transformationen reserviert gegenüber, manche empfinden sie gar als „Voodoo-Chemie“. Sie mögen dafür gute Gründe haben – als biologische Produkte sind Enzyme oft von schwankender Qualität, gelten als empfindlich, teuer und schwer zu isolieren. Wirklich eingesetzt werden fast nur Enzyme, die industriell im großen Stil hergestellt werden, Bäckerhefe oder Lipasen beispielsweise; auch dann ist der enzymatische Weg oft der letzte Ausweg, wenn alle chemischen Methoden versagt haben. Die anderen Enzyme sind für Chemiker schlicht zu teuer, wenn es sie überhaupt zu kaufen gibt - und um sie selbst zu isolieren, fehlen Know-how, Gerätschaften und Geduld.

Deshalb stehen Enzymreaktionen in der organischen Synthese in einer Nische: sie werden dann angewendet, wenn es anders nicht geht, z.B. weil die Produkte labil sind,^[178-182] oder aber sie werden für (jeweils) eine bestimmte industrielle Anwendung optimiert – dann aber übertreffen Fermentation und enzymatische Synthese nicht selten jedes chemische Verfahren in der Wirtschaftlichkeit.^[180, 183, 184] Dieser Wirklichkeit wird sich in Zukunft auch die Tyrosinase-Abspaltung der Phenylhydrazidgruppe stellen müssen.

Tyrosinase ist bei Sigma erhältlich, ihr Preis allerdings ist exorbitant. Die Isolierung des Enzyms aus Champignons ist dagegen vergleichsweise einfach; lediglich ein Kühlraum, eine Zentrifuge* und Dialyseschlauch sind Dinge, die nicht in jedem chemischen Laboratorium vorhanden sind. Sofern ihre Isolierung bei 0-4 °C durchgeführt wird, ist Tyrosinase ein robustes Enzym, sie verträgt Cosolventien recht gut und kann als Lyophilisat bei -30 °C über mindestens ein Jahr gelagert werden, ohne allzu viel an Aktivität einzubüßen.

Von den Anwendungen in der organischen Synthese wird sich Phenylhydrazid – wie alle Enzymschutzgruppen – besonders dort anbieten, wo es wegen der Labilität der Substrate wenige Alternativen gibt, z.B. in der Darstellung von Peptidkonjugaten. Eine Einschränkung besteht darin, dass die Substrate im Puffer löslich sein müssen, in der Synthese von Lipopeptiden wäre die Phenylhydrazidgruppe deshalb sicher nicht die erste Wahl. Mit den extrem säurelabilen Schutzgruppen auf der Basis von Tritylverbindungen konnte gerade auf diesem Gebiet in jüngerer Zeit ein Durchbruch erzielt werden,^[185] der es der Tyrosinase-vermittelten Phenylhydrazidspaltung hier zusätzlich schwer machen wird. Doch beispielsweise in der Synthese von Glyko- oder Nukleopeptiden, Anwendungen also, bei denen es um die Darstellung säure- und basenlabiler Verbindungen geht, dürfte diese neue Methode eine willkommene Erweiterung des beschränkten Repertoires möglicher Schutzgruppen darstellen.

4.2.4 Mechanistische Untersuchungen

Nach der erfolgreichen *Anwendung* der enzymatischen Phenylhydrazidspaltung stellte sich die Frage, *wie* das Enzym diese Oxidation bewerkstelligt; immerhin steht die Substitutionsgeometrie der „natürlichen“ Tyrosinase-Substrate im Kontrast zur Geometrie der Phenylhydrazide.

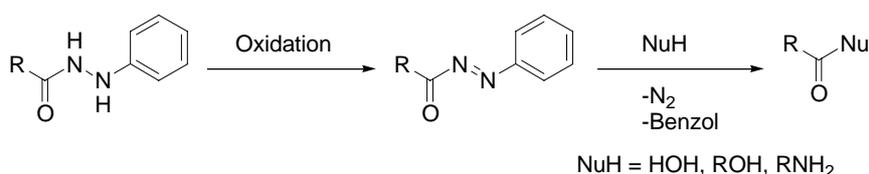
Generell werden von Tyrosinase Phenole (nicht aber Resorcine) in großer Bandbreite umgesetzt; Alkyl-substituenten in *m*- oder *p*-Stellung stören die *o*-Hydroxylierung nicht, als

* gemeint ist hier eine kühlbare Zentrifuge mit einer Kapazität von mindestens 600 mL.

o-Substituenten werden jedoch nur Hydroxylgruppen toleriert. Phenole, bei denen beide *o*-Positionen blockiert sind, sollen unter oxidativer C-C-Kupplung reagieren.^[174] Tyrosinase ist durchaus in der Lage, Tyrosinreste von Peptiden und gar Proteinen zu oxidieren, ein Indiz dafür, dass die aktive Tasche recht ungehindert zugänglich sein muss.^[50] Phenolether werden dagegen generell nicht umgesetzt.

Im Gegensatz dazu ist bei den Phenylhydraziden das Hydrazid gerade über die reaktive Stelle an den Acylsubstituenten angebunden, der sterische Anspruch also geradezu „umgekehrt“ wie bei den „natürlichen“ Substraten.

Generell erfolgt die oxidative Abspaltung der Carbonsäurephenylhydrazide in einem zweistufigen Prozess (Schema 25).^[68, 70] Im ersten Schritt wird das Phenylhydrazid zum Acyldiazon oxidiert, im zweiten zerfällt dieses nach der Reaktion mit einem Nukleophil unter Abspaltung von Benzol und Stickstoff; mit Wasser, Alkoholen und Aminen entstehen so Carbonsäuren, Ester oder Amide.

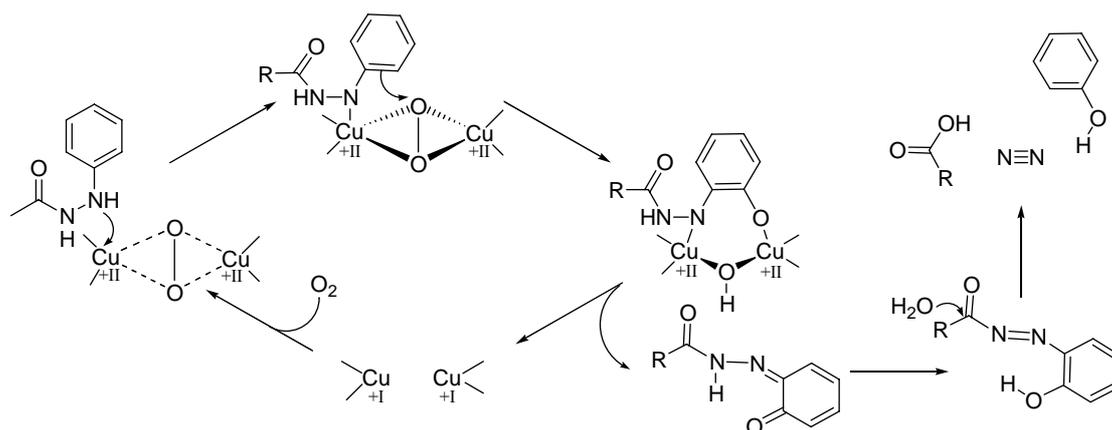


Schema 25: Oxidative Abspaltung der Phenylhydrazidgruppe in zwei Schritten

Anders als bei der Oxidation mit Mn(IV)-^[68], Cu(II)-^[67, 186], Cer(IV)-^[187] oder Fe(III)-Verbindungen gelingt es bei der Oxidation mit *N*-Brom-Succinimid in inerten Lösungsmitteln, die Reaktion auf der Stufe des Acyldiazons anzuhalten.^[70]

Als erste Arbeitshypothese wurde angenommen, dass sich die Oxidation der Phenylhydrazide nach einem Mechanismus abspielt, der an die katalytische Oxidation der Phenole angelehnt ist (vgl. Schema 1). Dieser hypothetische Mechanismus ist in Schema 26 dargestellt.

Demnach würde im ersten Schritt das Phenylhydrazid über den phenylsubstituierten Stickstoff an ein Kupferatom des *oxo*-Komplexes gebunden. Anschließend würde in *o*-Position eine Hydroxylgruppe eingeführt, und ein hypothetisches Iminodienon abgespalten, das wahrscheinlich rasch zum hydroxylierten Acyldiazon umlagern würde. Dieses würde nukleophil von H₂O angegriffen und unter Stickstoffabspaltung zur freien Säure und Phenol umgesetzt. Das Enzym stünde nach Reoxidation mit Sauerstoff für den nächsten *turn-over* zur Verfügung. Eine Konsequenz dieses hypothetischen Mechanismus ist, dass Phenol freigesetzt würde – daraus würden enzymatisch reaktive *o*-Chinone gebildet, die zu Nebenreaktionen führen könnten.



Schema 26: Erste Modellvorstellung zum Mechanismus der enzymatischen Phenylhydrazidspaltung.

Diese Arbeitshypothese war im folgenden zu überprüfen. Dazu wurden zwei Wege besprochen: erstens wurde in einem groben Screening versucht, die Substratbreite der Reaktion zu beleuchten, zweitens wurden Abfangversuche mit Acrylsäurederivaten unternommen, um die postulierten chinoiden Zwischenverbindungen nachzuweisen und damit den beschriebenen Mechanismus zu unterstützen.

4.2.4.1 Untersuchung der Substratbreite

Die Substratbreite der Tyrosinasereaktion wurden mit folgenden Tests untersucht: Zu Tyrosinase in Phosphatpuffer und Cosolventien wurden verschiedene Substrate (Abb. 22) gegeben und der Ansatz bei RT mit Sauerstoff aus einem Ballon belüftet. Die Reaktionen wurden in regelmäßigen Abständen dünnschichtchromatographisch verfolgt. Sofern nach 72 h keine Umsetzung zu beobachten war, wurden die Reaktionen abgebrochen.

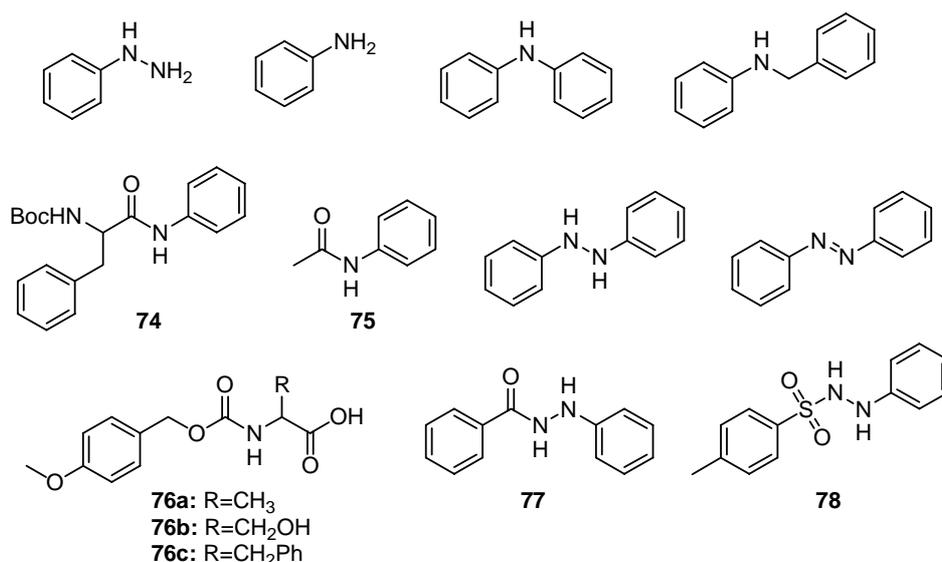


Abbildung 22: Substanzen, die im Substrat-Screening eingesetzt wurden.

Bei Phenylhydrazin, Anilin, Diphenylamin und Benzylphenylamin konnten keine Reaktionsprodukte isoliert werden, obwohl sich bei den ersten beiden Substraten die Reaktionsmischung braun färbte. Ob diese Färbung tatsächlich auf die Wirkung des Enzyms zurückzuführen ist oder eine unspezifische Reaktion der oxidationsempfindlichen Substrate darstellt, konnte nicht geklärt werden.

Um zu untersuchen, ob sich ggf. auch Phenylamide in der Reaktion einsetzen ließen, wurden Boc-Phe-Anilid (**74**) und Acetanilid (**75**) hergestellt und den Abspaltungsbedingungen unterworfen; beide Substrate verhielten sich aber inert. Für das Phenylalanin-Anilid **74** wurde durch Einsatz verschiedener Cosolventien ausgeschlossen, dass dies auf Lösungsmittelleffekte zurückzuführen wäre: **74** wurde mit jeweils 10 Vol.-% Methylenchlorid, Chloroform, Cyclohexan, Toluol, DMF und Acetonitril solubilisiert und nach Zugabe der Tyrosinase über 40 h mit Sauerstoff behandelt. Unter keinen dieser Bedingungen wurde eine Umsetzung festgestellt.

Ferner wurden Hydrazobenzol sowie Azobenzol den Abspaltbedingungen unterworfen, um die Rolle des Acylsubstituenten des Phenylhydrazins zu beleuchten. Beobachtet wurde aber binnen drei Tagen weder eine Spaltung von Azobenzol noch eine Oxidation von Hydrazobenzol zum Azobenzol.

Basierend auf einer weiteren Idee für eine oxidationslabile Carbamatschutzgruppe wurde untersucht, ob sich möglicherweise *p*-Methoxy-benzyloxycarbamate (MOZ) **76a-c** mit Tyrosinase, Laccase oder Merrettich-Peroxidase abspalten ließen. Hierzu wurden MOZ-geschütztes Alanin (**76a**), Serin (**76b**) und Phenylalanin (**76c**) hergestellt und über sieben Tage mit den Enzymen und Sauerstoff behandelt; Alanin und Serin ließen sich sogar ganz ohne Cosolventien lösen. Alle diese Versuche führten aber nicht zur Abspaltung der Carbamatschutzgruppe.

Die einzigen positiv getesteten Substrate sind die Phenylhydrazide selbst, deren Acylgruppe unverzichtbar scheint. Dabei bestimmt offenbar die Natur der Acylsubstituenten am Stickstoff die elektronischen Eigenschaften der Hydrazide, und damit die Lage der Redoxpotentiale: elektronenreiche Phenylhydrazide wurden besonders leicht oxidiert. Benzoesäurephenylhydrazid (**77**) wurde bereits ohne Enzym in Puffer binnen vier Stunden vollständig hydrolysiert, wenn Sauerstoff durch die Lösung geleitet wurde; die Zugabe von Tyrosinase beschleunigte die Reaktion noch weiter. Das noch elektronenreichere *p*-Toluolsulfonsäurehydrazid (**78**) wurde sogar in kürzester Zeit hydrolysiert, ohne dass eine Begasung der Lösung mit Sauerstoff nötig gewesen wäre. Aminosäurephenylhydrazide

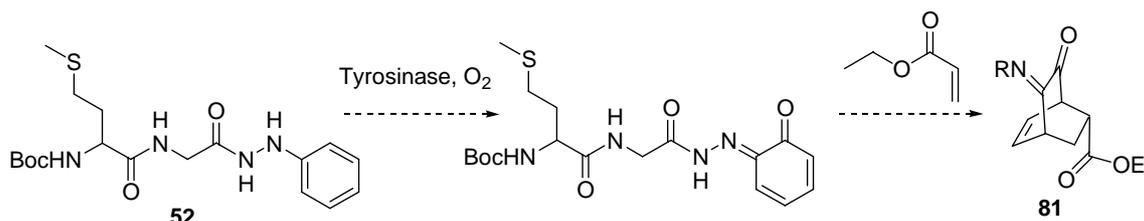
dagegen werden ohne die Tyrosinase nicht oxidiert – das hatte die Blindprobe aller in dieser Arbeit deblockierten Hydrazide ergeben. Bei ihnen ist die Hintergrundreaktion sehr langsam.

Aus diesen Experimenten wurden folgende Schlüsse gezogen:

- Die Abspaltung ist strikt auf Phenylhydrazide beschränkt – Substrate ohne Acylgruppe werden ebenso wenig von Tyrosinase angegriffen wie die Phenylamide, denen die oxidierbare *N-N*-Bindung fehlt;
- die Aryl-NH-Einheit alleine ist demnach *kein* Substratmotiv für eine Hydroxylierung durch die Tyrosinase;
- elektronenreichere Hydrazide werden leichter oxidiert als elektronenärmere.

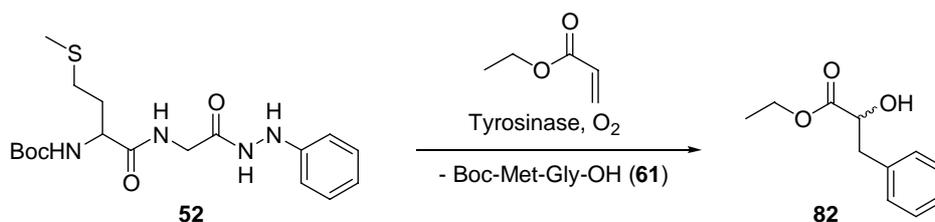
4.2.4.2 Abfangexperimente

Da sich aus der Untersuchung der Substratbreite keine Hinweise auf den Mechanismus der enzymatischen Oxidation ergaben, wurden als nächstes Abfangexperimente durchgeführt. Hierzu wurde ausgehend vom hypothetischen Mechanismus (vgl. Schema 26) versucht, die intermediär entstehenden Iminodienone in einer Diels-Alder-Reaktion mit Acrylestern als Dienophilen abzufangen (Schema 27).



Schema 27: Erwartete Abfangreaktion bei der enzymatischen Oxidation in Gegenwart von Ethylacrylat

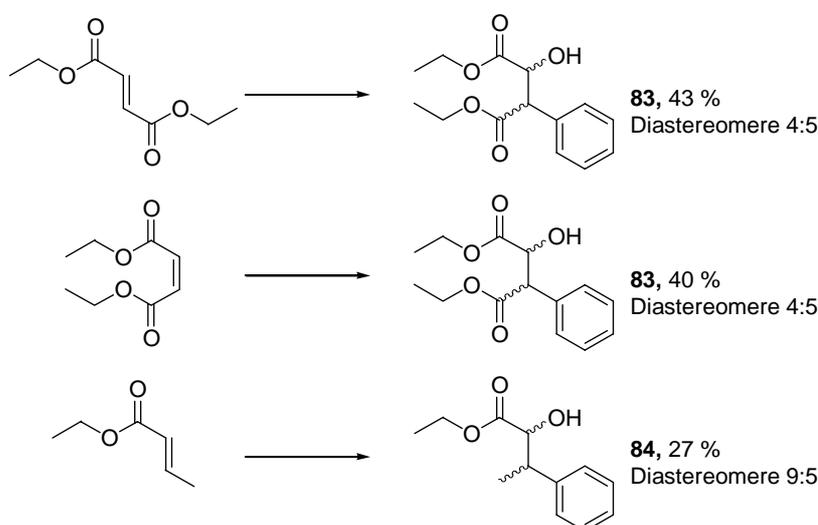
Die Deblockierung des bekannt guten Substrats Boc-Met-Gly-NHNHPh (**52**) in Gegenwart von Acrylsäure-ethylester führte tatsächlich zu einem neuen Addukt - dieses war jedoch keineswegs das Diels-Alder-Addukt **81** oder eines seiner Isomere; stattdessen hatte die Addition eines Phenyl- und eines Hydroxylrestes an die Doppelbindung stattgefunden (Schema 28). Das Produkt **82** wurde in 39 % Ausbeute gebildet; daneben wurden 58 % der freien Säure **61** isoliert.



Schema 28: Bildung von **82** bei der Oxidation von Boc-Met-Gly-NHNHPh (**52**) in Gegenwart von Ethylacrylat.

Versuche, bei denen Ethylacrylat erst nach 30, 60 und 90 Minuten zu der Reaktionslösung hinzugegeben wurde, führten zu einer geringeren Ausbeute an **82**. Zur Kontrolle wurden die Experimente auch ohne Enzym und ohne Substrat (**52**) durchgeführt; in beiden Fällen wurde kein Addukt gebildet. Es wurden keine weiteren Addukte beobachtet, insbesondere keine, die auf *phenolische* Spezies hinweisen.

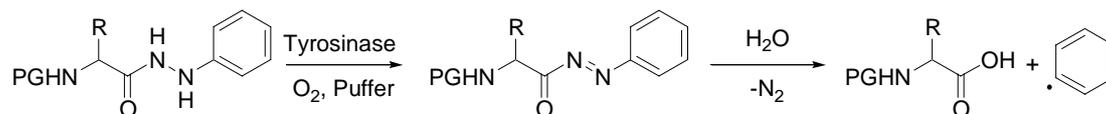
Auch aus Fumarsäurediethylester, Maleinsäurediethylester und Crotonsäureethylester bildeten sich analoge Addukte (Schema 29), und zwar jeweils zwei Diastereomere. Aus Fumarat und Maleat entstand jeweils das Produkt **83**, das Verhältnis der Diastereomere war für diese Verbindung unabhängig von der Geometrie der eingesetzten Doppelbindung identisch. Vinylacetat dagegen wurde nicht angegriffen.



Schema 29: Abfangexperimente mit Acrylsäurederivaten

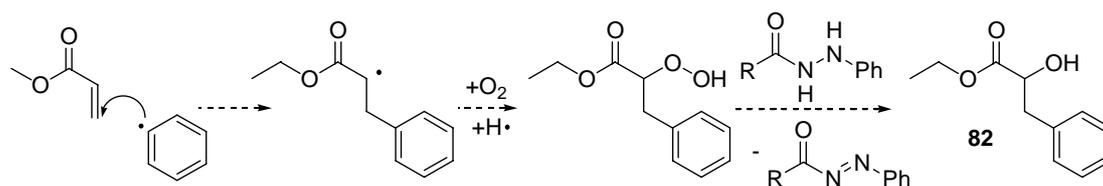
Gerade in Anbetracht der substantiellen Ausbeute an Addukten **82-84** erschien es wahrscheinlich, dass die Abfangexperimente Rückschlüsse auf den tatsächlich durchlaufenen Mechanismus erlauben. Die Arbeitshypothese nach Schema 24 wurde somit verworfen; offensichtlich tritt *keine* enzymatische Hydroxylierung auf.

Stattdessen wurde eine „alte“, neue Vorstellung formuliert (Schema 30); sie bedeutet im Prinzip eine Rückkehr zum zweistufigen Mechanismus der Hydrazidabspaltung (*vide supra*), der auch bei den chemischen Oxidationen der Phenylhydrazide durchlaufen wird.



Schema 30: Zweistufiger Abspaltungsmechanismus der Phenylhydrazide

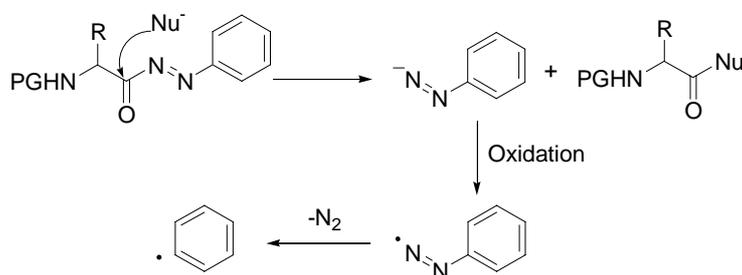
Nach dieser Vorstellung würde das Enzym in einem ersten Schritt die Oxidation des Hydrazids zum Acyldiazen herbeiführen – wie diese Oxidation abliefe, bliebe noch zu untersuchen. Der Phenylrest und die Hydroxylgruppe würden nach einem radikalischen Mechanismus an die Acrylderivate addiert (Schema 31), was sowohl der Addition entgegen der Regel von MARKOWNIKOW als auch der fehlenden Diastereoselektivität Rechnung trüge. Das sehr reaktive Addukt aus der Addition des Phenylradikals würde vermutlich zunächst durch Bildung des Hydroperoxids (aus reichlich vorhandenem Sauerstoff) stabilisiert. Das Hydroperoxid selbst könnte unter Oxidation des Phenylhydrazids zum Acyldiazen zerfallen, wodurch der gesamte Prozess autokatalytisch abliefe.



Schema 31: Bildung des Addukts **82** durch Angriff eines Phenylradikals

Die Quelle der Phenylradikale wäre in dem – nicht enzymatischen – Zerfall des Acyldiazens nach nukleophilem Angriff zu suchen (Schema 32). Mit einem solchen Mechanismus wird von W.R. BOWMAN et al. die sogenannte „infektiöse“ photographische Entwicklung erklärt.^[188]

Bei der *konventionellen* photographischen Entwicklung werden stabile Ag(I)-Cluster, die sich an den belichteten Stellen des Films gebildet haben, zu Ag(0) reduziert. Setzt man dem Entwickler bestimmte Arylhydrazide zu, werden in der Nähe dieser belichteten Cluster starke Reduktionsmittel gebildet, die benachbarte Silberhalogenidkristalle „infizieren“ – und zwar unabhängig davon, ob diese belichtet waren oder nicht. Eine solche „infektiöse“ Entwicklung steigert den Kontrast des Films erheblich.



Schema 32: Nicht-enzymatischer Zerfall des Acyldiazens nach nukleophilem Angriff, adaptiert nach BOWMAN et al.^[188]

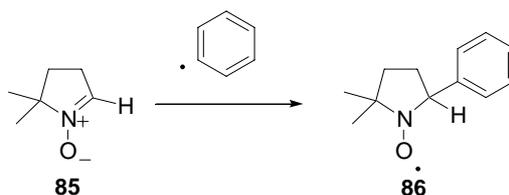
Nun wurde nach Wegen gesucht, diesen Vorschlag, also den radikalischen Zerfall des Acyldiazens zu belegen.

4.2.4.3 ESR-spektroskopische Messungen

Als Nachweismethode für Radikale bietet sich naturgemäß die ESR-Spektroskopie an. Sie nutzt – analog zur NMR-Spektroskopie – die magnetische Resonanz der Elektronen aus.^[189] Da nur die Spins ungepaarter Elektronen angeregt werden, beschränkt sich die ESR-Spektroskopie organischer Verbindung zwar weitgehend auf Radikale, trotzdem kann ihr Nutzen zum Verständnis radikalischer Reaktionen gar nicht hoch genug eingeschätzt werden: schon früh wurde die ESR-Spektroskopie auch als Methode zur Untersuchung biochemischer Fragestellungen entdeckt.^[190]

Die Versuche zur ESR-Spektroskopie der Tyrosinase-Reaktion wurden gemeinsam mit Prof. Dr. Manfred Lehnig an der Universität Dortmund durchgeführt. Erste Versuche, bei der enzymatischen Reaktion gebildete Radikale direkt zu vermessen, verliefen erfolglos: die Konzentration dieser Radikale war einfach zu gering. Einen Ausweg aus diesem Dilemma bot das „*spin-trapping*“, eine bewährte Methode zur Anreicherung von Radikalen.^[190] Hierbei werden Substanzen als „Fänger“ zugegeben, die mit dem zuerst gebildeten Radikal reagieren und ein stabileres sekundäres Radikal bilden. Solche *spin traps* sind zum Beispiel Nitrosoverbindungen und Nitrone.

Aus den vielen bisher beschriebenen Fängern wurde Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO) ausgewählt, weil es aufgrund seiner vergleichsweise hohen Polarität besser in wässrigen Puffersystemen löslich zu sein versprach als z.B. α -Phenyl-*tert*-butyl-nitron (PBN), ein ebenfalls gerne verwendetes *spin trap*. Zudem ist DMPO bereits erfolgreich zum Nachweis von Phenylradikalen eingesetzt worden (Schema 33); als Halbwertszeit des Addukts **86** wurden Werte von 10 Minuten gefunden.^[191]



Schema 33: Reaktion von DMPO (**85**) mit dem Phenylradikal

Die ESR-Versuche wurden in 300 μ L Phosphatpuffer mit 2350 U Tyrosinase durchgeführt. Das *spin trap* **85** wurde in einer Konzentration von 90 mM eingesetzt. Als Substrat diente 35 mM H₂N-Met-Gly-NHNHPh*TFA (**64**), denn Boc-geschützt ist das Dipeptid **52** im Puffer ohne Cosolvens nicht ausreichend löslich. Die Probe wurde vor der Messung für 7 Minuten mit Sauerstoff begast, um eine ausreichende Sättigung zu gewährleisten.

Bei diesem Experiment wurde ein ESR-Spektrum mit sechs Linien erhalten (Abb. 23), das gut mit dem Spektrum des DMPO-Phenyladduktradikals übereinstimmt.^[191]



Abbildung 23: ESR-spektrum des Reaktionsgemisches (2350 U Tyrosinase, 33 mM Met-Gly-NHNHPh * TFA (**64**), 90 mM DMPO (**85**), 7 Min. O₂) nach 60 Min.

Das beobachtete Aufspaltungsmuster entspricht einem 1:1:1-Triplett wegen der Kopplung des Elektrons mit dem I=1-Kern Stickstoff ($a_N=15.83$ G) und einem Dublett aufgrund der Kopplung mit dem Proton ($a_H=24.55$ G); der g-Wert des Radikals beträgt 2.0054. Die gefundenen Werte stimmen recht gut mit zwei Literaturberichten überein: RESZKA und CHIGNELL geben für a_N 15.40 G und für a_H 24.60 G an,^[191] MAZUMDAR et al. finden für a_N 15.9 G und für a_H 24.8 G.^[192]

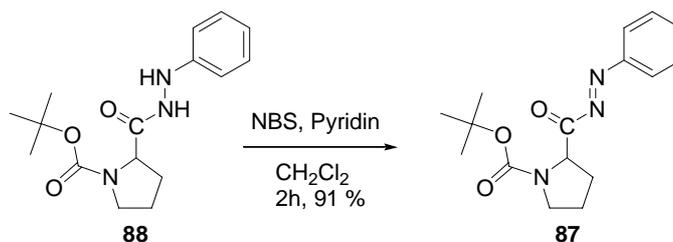
Das Adduktradikal **86** konnte für mehr als 20 h beobachtet werden, sein Signal baute sich innerhalb einer Stunde auf, blieb dann mehrere Stunden konstant und verschwand anschließend mit einer Halbwertszeit von etwa 4 h. Diese Halbwertszeit ist natürlich nicht mit der Lebenszeit des Radikals gleichzusetzen, vielmehr handelt es sich um ein dynamisches Gleichgewicht aus Radikalbildung und Zerfall, bei dem die Radikalbildungsrate allmählich abnimmt, sei es, weil Substrat oder Sauerstoff verbraucht werden, sei es wegen einer zunehmenden Inhibierung des Enzyms.

Eine ansonsten identische Blindprobe ohne Tyrosinase wies über einen Zeitraum von 10 h keinerlei Radikalbildung auf (Abb. 24a). Auch andere Oxidationsmethoden lieferten dasselbe ESR-Spektrum, so Cu(II) in katalytischen (Abb. 24b) und Cer(IV) in stöchiometrischen Mengen (Abb. 24c). In beiden Fällen wurde dasselbe Radikal-Addukt **86** gebildet, die Signale wiesen jeweils eine Halbwertszeit von ca. 30 Minuten auf. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatischen Oxidationsmethoden nach demselben Mechanismus ablaufen.



Abbildung 24: ESR-Spektren von 35 mM Met-Gly-NHNHPh * TFA (**64**) in Gegenwart von 68 mM DMPO nach 1h, a) als Blindprobe mit O₂-Behandlung, doch ohne Tyrosinase; b) mit 0.3 mM Cu(OAc)₂ und 3 mM Pyridin unter O₂-Behandlung; c) mit 33 mM (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ ohne O₂-Behandlung.

Um diese Hypothese weiter zu stützen, wurde Boc-Pro-N=N-Ph (**87**) durch Oxidation von **88** mit NBS hergestellt (Schema 34).^[70] Unter inerten Bedingungen ist dieses Acyldiazen relativ stabil, es kann gekühlt unter Feuchtigkeitsausschluss über mehrere Tage aufbewahrt werden. In Gegenwart von Wasser als Nukleophil zerfällt es rasch unter Gasentwicklung. Seine Darstellung gelang in 91 % Ausbeute nach extraktiver Aufarbeitung.



Schema 34: Darstellung des Acyldiazens **87** aus Boc-Pro-NHNHPh (**88**).

Hier war die vorherige Abspaltung der Boc-Gruppe nicht möglich, weil das freie Amin sonst selbst das Acyldiazen angreifen würde. Daher wurde eine Lösung des Acyldiazens **87** in trockenem Dioxan mit Puffer und DMPO versetzt; hierbei wurde eine spontane Gasentwicklung und ein starkes ESR-Spektrum nach 10 Minuten beobachtet (Abb. 25a), wiederum das des Radikal-Adduktes **86**. Dieses Signal war zehn Mal stärker als alle bisher beobachteten. In Gegenwart des Enzyms (Abb. 25b) trat der Zerfall verzögert ein, hier wurde dieselbe Signalintensität erst nach 90 Minuten beobachtet. Möglicherweise wird das

hydrophobe Substrat durch Bindung an das Enzym vor dem Angriff durch das Wasser geschützt. Auch bei Zugabe von Methanol statt des Puffers wurde das Addukt **86** gebildet (Spektrum nicht abgebildet).

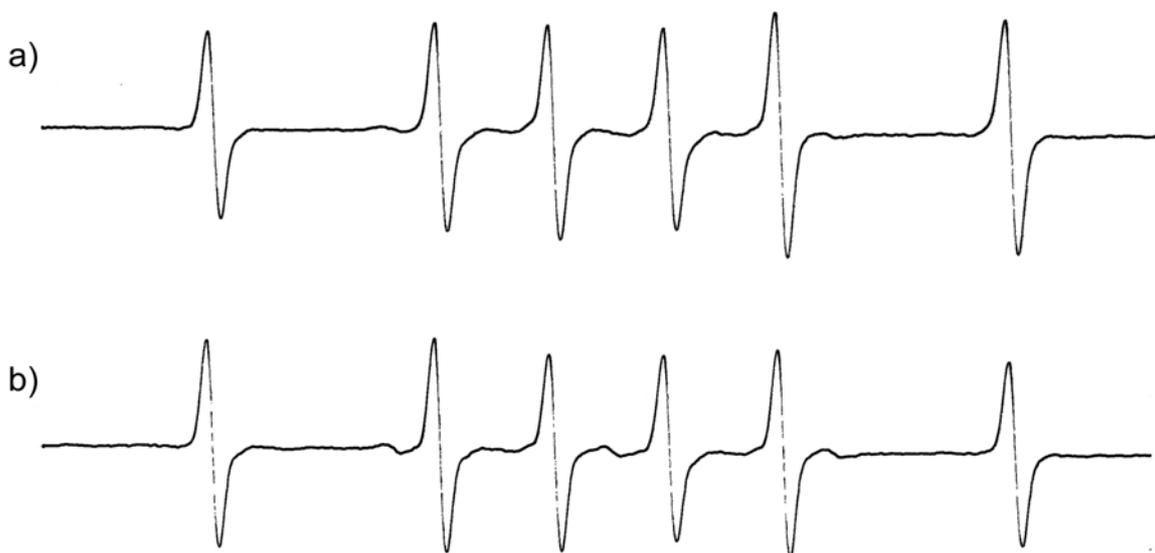


Abbildung 25: Hydrolytischer Zerfall von **87** in Dioxan/Phosphatpuffer mit DMPO: a) ohne Tyrosinase nach 10 Min.; b) in Gegenwart von Tyrosinase nach 90 Min.

Also werden bei der Hydrolyse des Acyldiazens tatsächlich Phenylradikale freigesetzt. Die ESR-spektroskopischen Messungen unterstützen die Hypothese einer zweistufigen Hydrazidabspaltung.

Daraus ergibt sich die Frage, ob der Prozess ein *homolytischer* Prozess ist, oder ob das Anion aus dem Angriff des Nukleophils zum Radikal oxidiert wird, wie in Schema 32 skizziert.

Gegen einen homolytischen Prozess spricht zunächst die relativ hohe Stabilität des Acyldiazens – bei einem homolytischen Zerfall müsste die treibende Kraft ja gerade die Instabilität der Bindung sein. Acyldiazene reagieren glatt mit Nukleophilen, z.B. mit Wasser, Alkoholen oder Aminen; dies wurde hier bereits gezeigt, ist aber auch seit längerer Zeit bekannt.^[70] Carsten Peters konnte feststellen, dass sich dagegen Thiole und Azide *nicht* als Nukleophile einsetzen lassen^[193] – diese werden möglicherweise vor dem nukleophilen Angriff oxidiert, jene könnten mit dem Diazen in einer dipolaren Cycloaddition zum (instabilen) Pentazol reagieren.

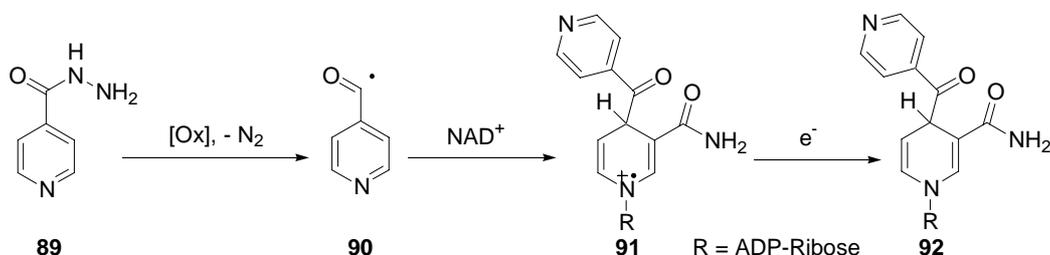
Als weiteres Indiz wurde aufgefasst, dass beim homolytischen Zerfall auch ein Acylradikal gebildet werden müsste, das ebenfalls mit dem *spin trap* reagieren könnte – ein solches Addukt aber konnte nie beobachtet werden. Natürlich bedeutet das Fehlen eines ESR-Signals keineswegs, dass ein solches Addukt nicht gebildet werden *könnte*; immerhin wäre es

reaktiver und weniger stabil als das Phenylradikal. Doch gewahr dieser Einschränkung wurden weitere Experimente zur ESR-Spektroskopie von Acylradikalen durchgeführt.

Dass Hydrazide als Quelle für Acylradikale benutzt werden können, ist in der Literatur beschrieben.^[194-196] Auch sind bereits Addukte von Acylradikalen mit verschiedenen *spin traps* untersucht worden, darunter auch DMPO.^[197]

Ziel weitergehender Untersuchungen war es nun, Hinweise dafür zu finden, ob Acylradikale in die enzymatische Phenylhydrazidspaltung involviert sind oder nicht. Hierzu wurde ein System untersucht, von dem erwartet wurde, dass es bei ähnlichen Bedingungen wie oben unter Bildung von Acylradikalen reagieren sollte, um sicherzustellen, dass deren Addukte mit DMPO spektroskopisch nachgewiesen werden können.

Als solche Testverbindung wurde Isoniazid (Isonicotinsäurehydrazid **89**) gewählt (Schema 35).



Schema 35: Bildung der inhibierenden Spezies **92** aus Isoniazid (**89**) und NAD^+ ; dargestellt nach WILMING und JOHNSON.^[198]

Obwohl Isoniazid seit rund 50 Jahren das wichtigste Medikament zur Bekämpfung des Tuberkulose-Erregers *Mycobacterium tuberculosis* ist, war sein Wirkmechanismus noch vor kurzem nur wenig verstanden. Inzwischen weiß man aber, dass Isoniazid selbst nur den Vorläufer des eigentlichen Wirkstoffs darstellt, der die Katalase G (Kat G) des *Mycobacteriums* inhibiert.^[198, 199] Dieser eigentliche Inhibitor **92** scheint gebildet zu werden, indem Isoniazid durch Kat G zum Isonicotinoylradikal (**90**) oxidiert wird, und dieses sich spontan an NAD^+ anlagert (Schema 35). Unlängst sind Belege für die Bildung des Radikals **91** gefunden worden.^[200, 201] Vor diesem Hintergrund erscheint Isoniazid tatsächlich als ein geeignetes Testsystem.

In einer Arbeit aus dem Jahr 1983 wird die Oxidation von Isoniazid mit Meerrettichperoxidase und H_2O_2 beschrieben und die Reaktionsprodukte ESR-spektroskopisch untersucht.^[194] Neben dem H-Radikal-Addukt des DMPO werden zwei weitere Kohlenstoff-zentrierte Radikale beobachtet, die den Addukten des Acyl- und Pyridylradikals zugeschrieben wurden. Bei Inkubation mit Microsomen in Gegenwart von Arachidonsäure verschwindet dagegen das Acyladdukt, dafür wird das OH-Radikaladdukt beobachtet. Für das

mutmaßliche Isonicotinoyl-Addukt werden die Kopplungskonstanten $a_N = 15.6$ G und $a_H = 18.8$ G angegeben, die Zuordnung ist jedoch nicht ganz sicher.

Zunächst wurde versucht, die Oxidation des Isoniazids enzymatisch mit Tyrosinase unter denselben Bedingungen wie bei den Phenylhydraziden durchzuführen. Ferner wurden Oxidationsversuche mit Meerrettich-Peroxidase* und Laccase unternommen. Die Bildung von Radikalen konnte aber bei keinem der enzymatischen Oxidationsversuche beobachtet werden. Dagegen wurde bei der Oxidation mit $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ ein neues Radikal-Addukt erhalten, dessen ESR-Spektrum 4 Signale mit der Intensitätsverteilung 1:2:2:1 aufwies (Abb. 26). Erklärt werden kann ein solches Spektrum als Dublett zweier Triplets mit derselben Kopplungskonstante $a_N = a_H = 15.0$ G, $g = 2.0059$.



Abbildung 26: ESR-Spektrum des Produkts aus der Isoniazid-oxidation mit Ce(IV) (35 mM Isoniazid, 88 mM DMPO, 33 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$).

Dieses Spektrum kann durch Vergleich mit Literaturwerten mit großer Sicherheit dem Hydroxyladdukt des DMPOs zugeordnet werden:^[202] Für die Kopplungskonstanten a_N und a_H dieses Addukts werden jeweils gleiche Werte zwischen 14.9 und 15.1 G angegeben. Über die Herkunft des Hydroxylradikals kann nur spekuliert werden; ein etwaiges Addukt des Isonicotinoylradikals **90** konnte dagegen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das bei der Oxidation von Isoniazid beobachtete Spektrum nicht auf das Isonicotinoylradikal zurückzuführen ist. An dieser Stelle wurden die Untersuchungen nicht mehr weitergeführt: das Ergebnis, dass Acylradikale mit DMPO prinzipiell nachgewiesen werden können, bei den Versuchen hier aber in keinem Fall Addukte solcher Acylradikale detektiert wurden, wurde als ausreichend eingeschätzt, um einen homolytischen Mechanismus fast sicher auszuschließen.

Ein abschließendes Experiment mit der Ce(IV)-Oxidation des Isoniazids wurde aber noch durchgeführt: die Oxidation wurde in Gegenwart von NAD^+ wiederholt. Von diesem Experiment wurde Aufschluss über die mögliche Bildung des Radikal-Addukts **91** (Schema 33) erhofft. Tatsächlich konnte bei diesem Experiment ein neues Radikal-Addukt beobachtet werden (Abb. 27).

* jedoch nicht in Gegenwart von H_2O_2 , sondern nur unter Behandlung mit O_2 .



Abbildung 27: ESR-Spektrum bei Oxidation von Isoniazid mit Cer(IV) in Gegenwart von NAD^+ (26 mM INH, 26 mM NAD^+ , 28 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, 66 mM DMPO).

Dieses Spektrum ist konsistent mit einem dtf-Spektrum eines N-zentrierten Radikals mit den Kopplungskonstanten $a_{\text{N}} = 15.4 \text{ G}$, $a_{\text{H}}^{\beta} = 20.6 \text{ G}$, $a_{\text{N}}^{\beta} = 2.6 \text{ G}$. Wurde die Oxidation dagegen ohne Isoniazid, d.h. nur mit Cer-Ammonium-Nitrat, NAD^+ und DMPO durchgeführt, konnte lediglich das Radikaladdukt aus der Oxidation des DMPO beobachtet werden. Das beobachtete Radikal könnte möglicherweise mit dem postulierten^[198] und indirekt (über Cyclisierungsprodukte) nachgewiesenen^[200, 201] Addukt-Radikal **91** im Zusammenhang stehen. Um hier gesicherte Aussagen treffen zu können, wären aber weitere Experimente nötig, die den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten. Von besonderem Interesse wäre es natürlich, die Oxidation mit rekombinanter Katalase G aus *M. tuberculosis* durchzuführen; diese war jedoch leider nicht zugänglich.^[203]

Bewertet man die hier gewonnenen Erkenntnisse über die oxidative Phenylhydrazidspaltung, können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- die enzymatische Oxidation verläuft – wie die chemischen Methoden auch – offenbar über das Acyldiazen;
- beim Zerfall des Acyldiazens werden Phenylradikale generiert;
- wahrscheinlich wird dieser Zerfall nicht durch Homolyse, sondern durch den Angriff eines Nucleophils ausgelöst; demnach dürften *keine* Acylradikale entstehen.

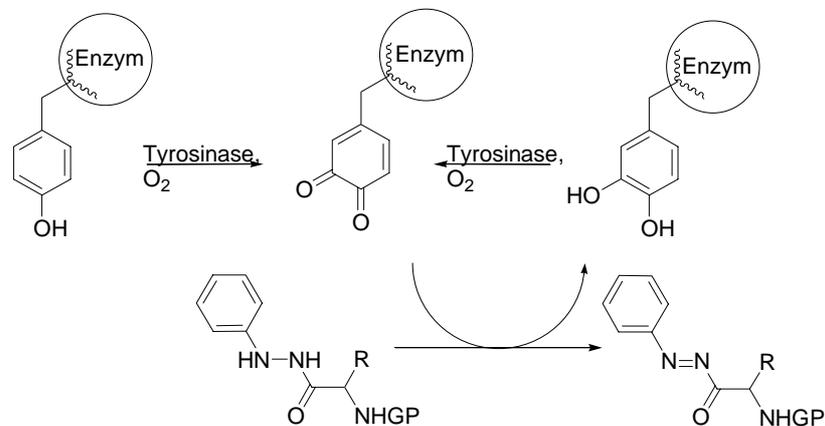
4.2.4.4 Entwicklung einer Modellvorstellung für den Oxidationsschritt

Die ESR-Untersuchungen ermöglichten nur Einblicke in den *zweiten* Schritt, also die Reaktion des Acyldiazens; somit blieb weiterhin die Frage unbeantwortet, *wie* eigentlich das Enzym die Oxidation des Hydrazids zum Acyldiazen bewerkstelligt.

Aus dem Vergleich mit der Kristallstruktur der Catecholoxidase ergaben sich gewisse Zweifel, dass das aktive Zentrum der Tyrosinase überhaupt genug Platz aufweist, um das Phenylhydrazid binden zu können: Koordiniert ein Hydrazid-Stickstoff eines der Kupferatome des aktiven Zentrums, müsste der Phenylrest *hinter* der aktiven Tasche zu liegen kommen! Zwar ist das aktive Zentrum der Catecholoxidase weniger zugänglich als das der Tyrosinase, aber dieser gehinderte Zugang wird durch ein Phenylalanin verursacht, das bereits

vor der aktiven Tasche liegt und den Zugang des Substrats an das zweite Kupferatom behindert. Hinter der Koordinationssphäre des Kupfers mit den je drei Histidinliganden wird aber bei beiden Enzymen schwerlich genug freier Platz vorhanden sein.

Angestoßen durch einen Hinweis von Dr. Hubert Wojtasek^[204] wurde auch für den Oxidationsschritt eine Modellvorstellung entwickelt: demnach erfolgt die Oxidation des Phenylhydrazids gar nicht direkt durch das Enzym, sondern in einer indirekten Reaktion. Tyrosinase weist selbst einen Tyrosingehalt von etwa 4 % auf.^[26] Diese Tyrosine können enzymatisch zum *o*-Chinon oxidiert werden. Die Oxidation des Phenylhydrazids würde dann *indirekt* unter Reduktion des Chinons bewerkstelligt, welches wiederum enzymatisch oxidiert werden könnte (Schema 36). Dass Tyrosinase in der Lage ist, Tyrosin in Peptiden und Proteinen zu oxidieren, ist bekannt.^[50]



Schema 36: Modellvorstellung für den enzymatischen Oxidationsschritt der Phenylhydrazidabspaltung.

Diese Erklärung ist konsistent mit der Beobachtung einer Latenzperiode für die Phenylhydrazidspaltung.^[78] Durch Zugabe von Catechol konnte diese ausgelöscht werden. Genau solch ein Verhalten wäre für die Oxidation der Tyrosinseitenketten zu erwarten, da die *o*-Hydroxylierung nicht aus der *met*-Ruheform des Enzyms erfolgen kann und ohnehin langsamer ist.

Den hier vorgeschlagenen Mechanismus zweifelsfrei zu beweisen – dies wäre ein Unterfangen, das die Möglichkeiten dieser Arbeit überstiege. Einen ersten Hinweis gäbe die Analyse des Enzyms nach der Oxidationsreaktion: nach Abbau des Peptidrückgrats müssten signifikante Anteile des Tyrosins zu L-Dopa umgesetzt sein. Diese Oxidation könnte jedoch auch unabhängig von der eigentlichen Katalyse erfolgen und wäre somit kein zwingender Beweis.

Hier wurde deshalb nur noch eine Plausibilitätsabschätzung vorgenommen. Für das Oxidationspotential von Phenylhydraziden wurden von H. Wojtasek sehr niedrige Werte von

-0.78 V gemessen.^[204] Dies bedeutet, dass tatsächlich eine Oxidation durch Typ-3-Kupferproteine und Chinone möglich sein müsste: die Reduktionspotentiale der Proteine liegen um +0.25 - +0.75 V^[205], das des *o*-Chinons bei +0.20 - +0.28 V^[204]. Tatsächlich bewirkte die Zugabe von Boc-Gly-NHNHPh (**41**) zu 4-*tert*-Butylbenzochinon das Verschwinden des Chinons.^[204]

Ist dies tatsächlich der Fall, so sollte es auch möglich sein, die Phenylhydrazidgruppe elektrochemisch zu oxidieren. Als abschließendes Experiment wurde deshalb eine elektrochemische Phenylhydrazidspaltung durchgeführt. Hierzu wurde Boc-Leu-NHNHPh (**43**) in Phosphatpuffer und Dioxan in Gegenwart von 20 mol-% Catechol elektrolysiert. Anders als bei den enzymatischen Versuchen wurde hier die Lösung nicht mit Sauerstoff behandelt. Tatsächlich konnte in diesem Versuch freies Leucin-OH isoliert werden, doch es wurde auch die Abspaltung der Boc-Gruppe beobachtet; ob diese Boc-Abspaltung auf die Elektrolyse oder auf die anschließende Aufarbeitung zurückzuführen ist, konnte nicht sicher geklärt werden. Ohne den Catecholzusatz dagegen wurde keine Säure freigesetzt.

Dieses erfolgreiche Experiment ist ein starkes Indiz für den vorgeschlagenen Mechanismus einer Phenylhydrazidoxidation durch *o*-Chinon. Unabhängig von der weiteren Untersuchung der enzymvermittelten Abspaltung könnte dieser Befund als Anlass genommen werden, die elektrolytische Abspaltung der Schutzgruppe eingehender zu untersuchen. Immerhin böte die Elektrolyse gegenüber der enzymatischen Abspaltung den Vorteil, dass keine Beschränkungen hinsichtlich des Lösungsmittels bestehen, solange nur die Leitfähigkeit der Lösung ausreicht. Auch kann auf die Behandlung der Lösung mit O₂ verzichtet werden.

Von besonderem Interesse wäre die Frage, ob sich in der Elektrolyse womöglich Disulfide erfolgreich entschützen ließen, die bei der enzymatischen Abspaltung eine Nebenreaktion gegeben hatten. Die als Redox-Mediator eingesetzten *o*-Chinone können andererseits als reaktive Intermediate auch zu unerwünschten Nebenreaktionen führen, die Suche nach Alternativen böte möglicherweise noch mildere Reaktionsbedingungen. Interessant könnte es ferner sein, die Methodik auf die feste Phase zu übertragen und Versuche mit dem Ziel anzustellen, den Phenylhydrazidlinker elektrolytisch zu spalten.

Die mechanistischen Untersuchungen zur enzymatischen Phenylhydrazidspaltung werden von der Gruppe von Dr. H. Wojtasek an der Universität Opole, Polen fortgeführt. Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnis sprechen die bisherigen Befunde für den vorgeschlagenen Mechanismus, für eine abschließende Bewertung ist die Datenlage jedoch noch nicht ausreichend.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war zum einen die Synthese und Untersuchung photoaffinitätsmarkierter menschlicher N-Ras-Peptide und -Proteine, zum anderen die eingehende Untersuchung der enzymatischen Abspaltung von Phenylhydraziden durch Tyrosinase aus Champignons.

Ziel des Photolabelling-Projekts war es, maßgeschneiderte „Sonden“ für die Untersuchung der Ras-Proteine zu entwickeln. Mit diesen Werkzeugen sollten offene Fragen in der posttranslationalen Modifikation (v.a. der Palmitoylierung) der Proteine adressiert werden; darüber hinaus sollte auch die gezielte Untersuchung der Wechselwirkung von Ras mit seinen identifizierten und noch unbekanntem Effektoren *in vitro* und *in vivo* ermöglicht werden.

Für die Darstellung der photoaktivierbaren Peptide wurde ein „Baukasten“-Konzept entwickelt (Abb. 28). Diese Methodik ermöglicht es, unterschiedlich modifizierte Peptide für die biologische Untersuchung von Ras-Proteinen konvergent aufzubauen, wobei sie nicht auf photoaktivierbare Peptide beschränkt, sondern generell einsetzbar ist.

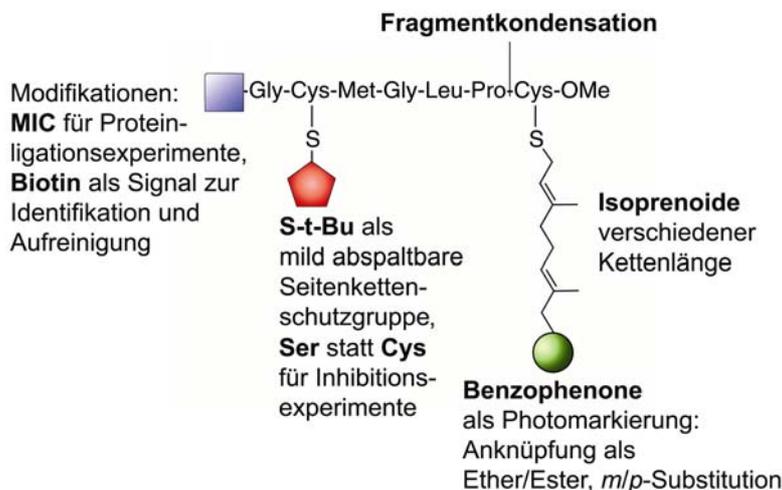
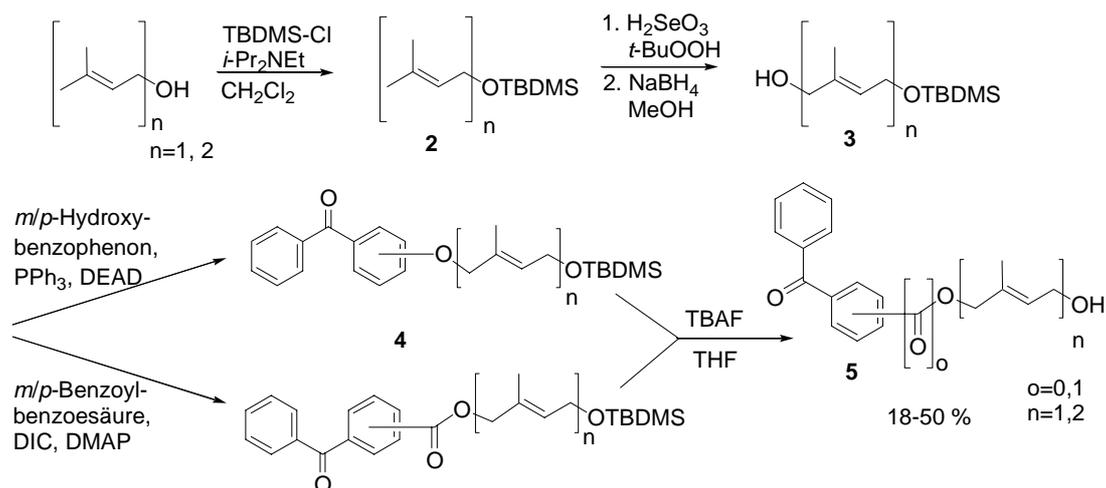


Abbildung 28: „Baukasten“-Konzept zur Darstellung verschieden substituiertes BP-markierter Peptide.

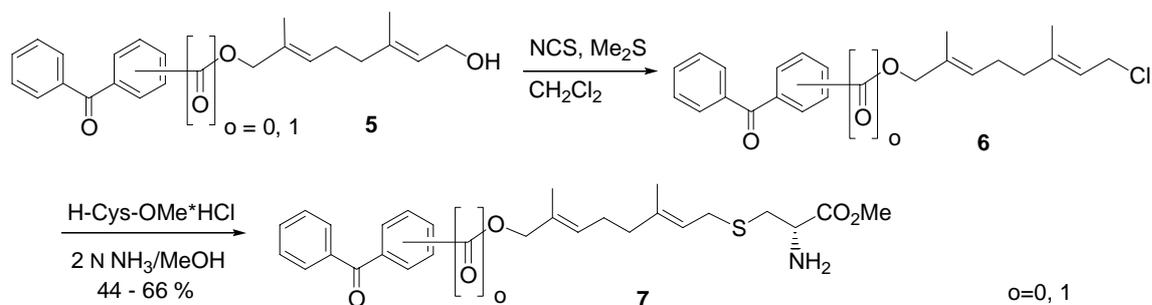
Als Photophor wurde Benzophenon (BP) gewählt, das bei 350 nm aktiviert wird und bevorzugt in CH-Bindungen inseriert. Der Schlüsselschritt der Strategie ist die Kondensation von photomarkierten, farnesylierten Cysteinfragmenten mit N-terminalen Hexapeptiden, die an der festen Phase aufgebaut werden.

Zunächst wurde nach Optimierung der Schutzgruppenstrategie die Synthese unterschiedlich substituiertes Farnesylanaloga entwickelt (Schema 37). Die entsprechenden Alkohole **5** konnten in guten Gesamtausbeuten erhalten werden.



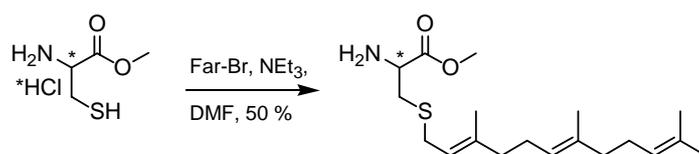
Schema 37: Synthese von acht unterschiedlichen BP-modifizierten Isoprenylalkoholen **5**

Durch Überführung der Alkohole **5** in ihre Chloride **6** und Alkylierung von Cysteinmethylester wurde die Synthese der BP-markierten Bausteine **7** abgeschlossen (Schema 38).



Schema 38: Anknüpfung der BP-markierten Farnesylnaloga **5** an Cysteinmethylester.

Für weitere biologische Untersuchungen wurden auch L- und D-Farnesyl-Cysteinmethylester in jeweils 50 % Ausbeute hergestellt (Schema 39).



Schema 39: Synthese von L- und D-Cys(Far)-OMe **16** und **21**.

Die Peptidfragmente konnten an der festen Phase unter Verwendung des 2-Chlortrityllinkers in hohen Ausbeuten dargestellt werden (Schema 40). Daneben wurden für weitere biologische Untersuchungen auch Peptide hergestellt, die anstelle des *in vivo* palmitoylierbaren Cysteins ein Serin aufwiesen, ferner ein Peptid, bei dem alle L-konfigurierten Aminosäuren durch ihr D-Enantiomer ersetzt waren.

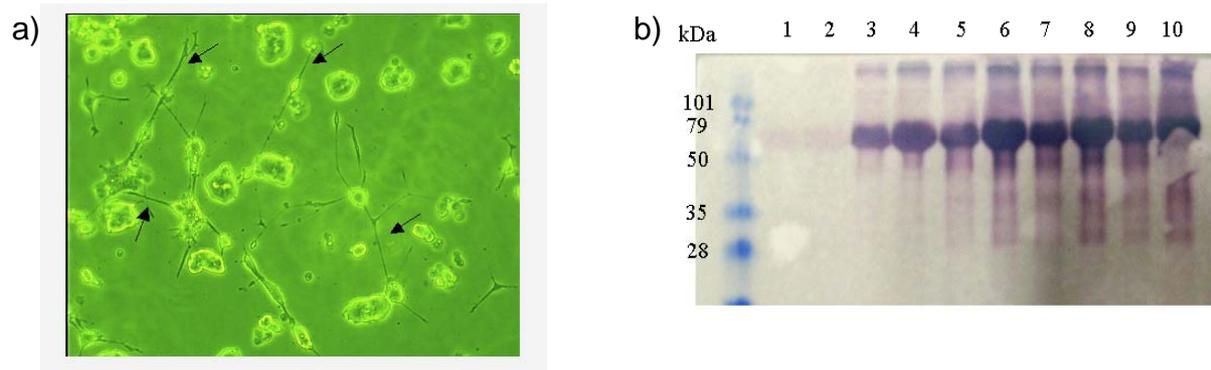


Abbildung 29: a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von PC12-Zellen drei Tage nach der Mikroinjektion von onkogenem Ras. Deutlich erkennbar ist die Ausbildung von Neuriten (schwarze Pfeile). b) Western Blot (Streptavidin/alkalische Phosphatase) der UV-induzierten Kopplungsreaktion von **11bpt** mit BSA. Proben wurden vor der Bestrahlung (Spuren 1 & 2) sowie nach 5, 15, 30 und 60 Min. entnommen.

Parallel zu den Photoaffinitätssonden wurden auch einige Peptide mit Serin statt des palmitoylierbaren Cysteins als mögliche Inhibitoren der Ras-Prozessierung sowie verschiedene D-konfigurierte Peptide dargestellt und von Melanie Wagner (Arbeitsgruppe Dr. J. Kuhlmann, MPI Dortmund) biologisch untersucht (Abb. 30).

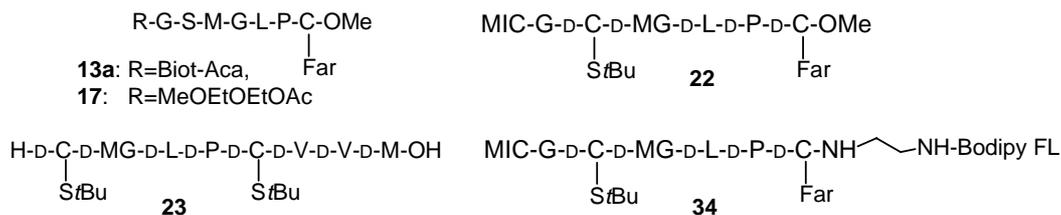
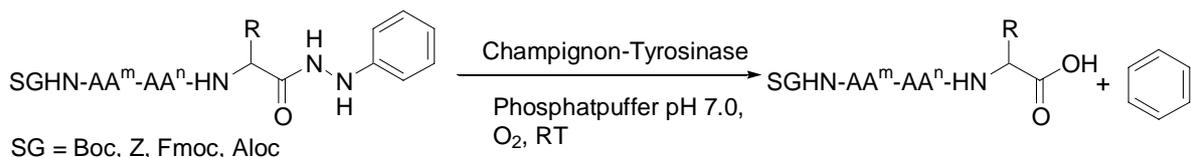


Abbildung 30: Dargestellte Serinanaloga und D-konfigurierte Peptide.

Das Ligationsprodukt aus dem D-konfigurierten, palmitoylierbaren MIC-Peptid **22** und $^{1-181}$ RasG12V wies in den Mikroinjektionsstudien dieselbe Aktivität auf wie Volllängen-RasG12V. Diese Beobachtung spricht *gegen* eine spezifische Erkennung von Ras über seinen C-terminalen Bereich.

Das zweite Ziel der Arbeit war, die enzymatische Phenylhydrazidspaltung mit Tyrosinase in der Peptidsynthese zu etablieren (Schema 42).

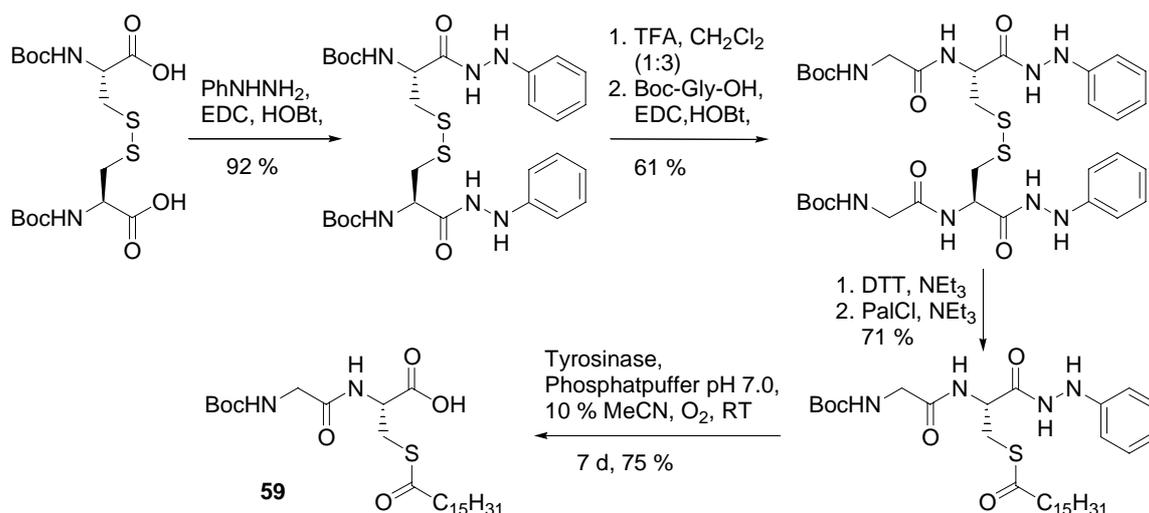


Schema 42: Tyrosinase-katalysierte Phenylhydrazidspaltung.

Hierzu wurden in orientierenden Versuchen 18 verschiedene Aminosäuren und Dipeptide eingesetzt, um die Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen in den Seitenketten sowie die Rolle der Polarität der Substrate zu untersuchen.

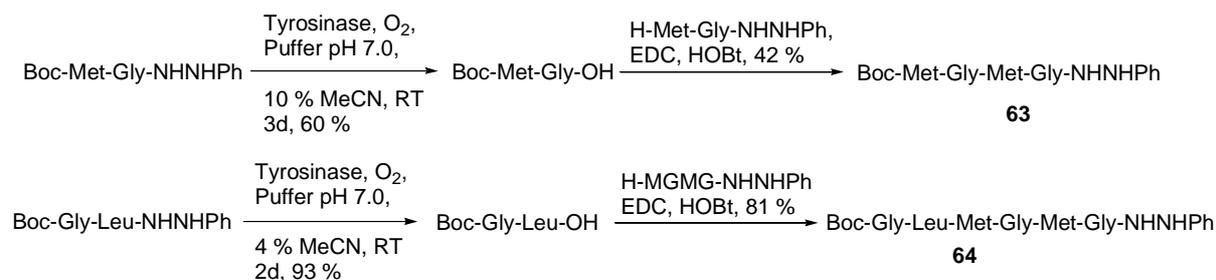
Die enzymatische Phenylhydrazidspaltung erwies sich dabei als breit anwendbare Methode, deren limitierender Faktor weniger die chemische Zusammensetzung der Substrate als vielmehr ihre Löslichkeit im Puffer ist. Für schlechter lösliche Substrate (z.B. Fmoc-Phe-Phe-NHNHPh) konnten zwar bis zu 20 Vol.-% organischer Cosolventien zugesetzt werden, dennoch waren deutlich mehr Zeit und Biokatalysator notwendig. Die Selektivität des Enzyms für die Phenylhydrazidgruppe ist hoch, ein Angriff auf Amidbindungen oder Carbamatschutzgruppen wurde nicht beobachtet.

Der Wert dieser Abspaltmethode konnte an ausgewählten Anwendungen gezeigt werden: So gelang mit der Darstellung des palmitoylierten Dipeptids **59** in 31 % Ausbeute über vier Stufen die erste Synthese eines basenlabilen Peptidkonjugats unter Verwendung einer oxidativ entfernbaren enzymlabilen Schutzgruppe (Schema 43).



Schema 43: Chemoenzymatische Darstellung des Dipeptidbausteins Boc-Gly-Cys(Pal)-OH (**59**).

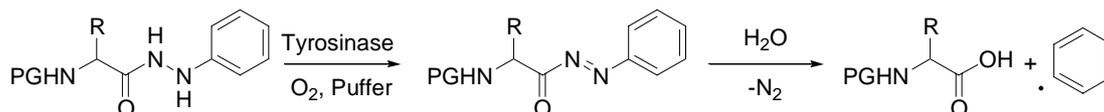
Daneben gelangen Entschützungen im präparativen Maßstab. Die freigesetzten Peptide ließen sich C-terminal zu den Tetra- und Hexapeptiden **63** und **64** verlängern (Schema 44).



Schema 44: Chemoenzymatische Darstellung der Peptide **63** und **64**.

Diese konnten ihrerseits in 81 bzw. 57 % isolierter Ausbeute enzymatisch deblockiert werden. Auch für präparative Anwendungen in repetitiven Synthesesequenzen ist die Abspaltmethode somit geeignet.

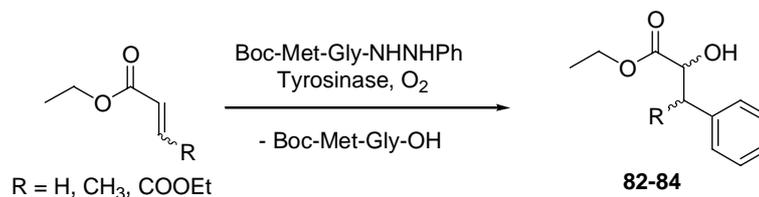
Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass die enzymatische Phenylhydrazidspaltung ein zweistufiger Prozess ist (Schema 45). Der erste Schritt, die Oxidation des Hydrazids zum Acyldiazen, wird durch die Tyrosinase katalysiert; der zweite, die Hydrolyse des Acyldiazens, verläuft spontan.



Schema 45: Zweistufiger Abspaltungsmechanismus der Phenylhydrazide.

Nach welchem Mechanismus der Oxidationsschritt abläuft, konnte nicht bestimmt werden; das niedrige Redoxpotential der Hydrazide und ein Versuch zur elektrolytischen Phenylhydrazidspaltung in Gegenwart von Catechol deuten darauf hin, dass eine *indirekte* Oxidation durch Dopachinon möglich ist. Dieses könnte enzymatisch aus Tyrosinresten der Tyrosinase selbst gebildet werden.

Der zweite Schritt, der Zerfall des Acyldiazens, erfolgt spontan. Abfangexperimente mit Acrylestern ließen darauf schließen, dass bei der enzymatischen Reaktion Phenylradikale freigesetzt werden (Schema 46).



Schema 46: Enzymatische Oxidation von Boc-Met-Gly-NHNHPh in Gegenwart von Acrylderivaten.

ESR-Experimente mit DMPO als *spin trap* bestätigten diese Vermutung: sowohl bei der enzymatischen wie auch bei nicht-enzymatischen Oxidationsmethoden konnten Phenylradikale beobachtet werden. Die Hydrolyse von isoliertem Acyldiazen ergab, dass die Phenylradikale tatsächlich im Hydrolyseschritt frei werden. Weitere Experimente sprechen dafür, dass der Zerfall des Acyldiazens durch den Angriff eines Nukleophils ausgelöst wird. Insgesamt wurde in dieser Arbeit ein qualitatives Modell zum Verständnis der Reaktion entwickelt, das die experimentellen Befunde zu erklären vermag. Die enzymatische Oxidation der Phenylhydrazidgruppe konnte als schonende, vielseitige und hoch selektive Methode mit breiter Substrattoleranz in der Peptidsynthese etabliert werden.

5.2 Ausblick

Mit ihren milden Reaktionsbedingungen und der hohen Substrattoleranz bietet die Tyrosinase-vermittelte Abspaltung der Phenylhydrazidgruppe eine neue Schutzgruppenalternative, die zu den gängigen Carbamatschutzgruppen orthogonal ist. Besonders in der Synthese empfindlicher Peptidkonjugate dürfte diese Methode eine willkommene Ergänzung des beschränkten existierenden Repertoires darstellen. Eine besondere Rolle könnte dabei der Tatsache zukommen, dass es sich bei Tyrosinase um eine Oxidase handelt, wohingegen die bisher etablierten enzymlabilen Schutzgruppen durch Hydrolasen gespalten werden. Deshalb erscheint der Einsatz zweier orthogonaler Enzymschutzgruppen verhältnismäßig einfach möglich, beispielsweise könnte die Phenylhydrazidgruppe mit Lipase-lablen Urethanen wie AcOZ kombiniert werden.

Auch die Abspaltung der Schutzgruppe durch Elektrolyse bietet vielversprechende Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. Darüber hinaus ist die mechanistische Untersuchung des enzymatischen Oxidationsschritts enzymologisch interessant.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Baukastenmethodik ist ein genereller Zugang zu verschiedensten „Sonden“ eröffnet worden, beispielsweise können verschiedenste photoaktivierbare, fluoreszenzmarkierte oder D-konfigurierte Peptide für biologische Untersuchungen maßgeschneidert hergestellt werden. Von weiteren Untersuchungen der hier dargestellten Verbindungen sind interessante Ergebnisse zu erwarten.

Die photoaktivierbaren Sonden eröffnen vollkommen neue Möglichkeiten, eventuelle Ras-Wechselwirkungspartner eingehend zu untersuchen. Beispielsweise können durch Photomarkierung und anschließende Abbaureaktionen Kartierungen der Bindungsstellen vorgenommen werden. Einen ersten Eindruck, welches Potential BP-markierte Sonden hier besitzen, gibt die selektive Kupplung von Ras mit seinem Effektor hSos1. So können die hier dargestellten Verbindungen *in vitro* wertvolle Rückschlüsse auf strukturelle Details der Ras-Wechselwirkungspartner erlauben.

Auch in Zukunft bleibt die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Ras-Prozessierung ein dringendes Thema, denn die Identifizierung einer spezifischen Palmitoyltransferase oder eines Ras-Rezeptors in der Plasmamembran könnte zu neuen Wirkstoffen zur Krebsbehandlung führen. Zu dieser Suche können die in dieser Arbeit dargestellten photoaktivierbaren oder D-konfigurierten Verbindungen als wertvolle Werkzeuge beitragen.

Vor dem Einsatz der photoaktivierbaren Peptide in der Suche nach Ras-Wechselwirkungspartnern *in vivo* sind noch weitere Untersuchungen nötig; beispielsweise ist noch nicht geklärt, ob die Peptide bei Applikation über das Medium von der Zelle aufgenommen werden. Ein gravierendes Problem wird zudem die Frage der Spezifität der Bindung aufwerfen, denn in der Zelle ist eine Vielzahl hydrophober Proteine präsent, die nicht in die Prozessierung der Ras-Proteine involviert sind. Ein Ausweg mag sein, Zellextrakte statt lebender Zellen zu untersuchen, doch wird dies gerade bei membranassoziierten Proteinen kein triviales Unterfangen sein.

Bis die Prozessierung der Ras-Proteine aufgeklärt ist, sind also noch viele praktische Probleme zu lösen. Diese Arbeit ist nur ein Schritt auf einem langen Weg – und doch hat sie mit den photoaktivierbaren Peptiden den Biologen ein neues Werkzeug in die Hand gegeben, dessen Wert derzeit allenfalls zu erraten ist. Umgekehrt konnte sich die Chemie ein Enzym zunutze machen, das die Natur seit Jahrtausenden produziert, und sie konnte sich ein ungefähres Bild davon machen, welche Vorgänge bei dieser Reaktion ablaufen. In diesem Geben und Nehmen spiegelt sich wieder, was die Chemie eigentlich ist – Grundlage des Lebens.

6 Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

NMR-Spektroskopie

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

Bruker AMX 400 400 MHz (^1H -NMR), 100.6 MHz (^{13}C -NMR)

Varian Mercury 400 400 MHz (^1H -NMR), 100.6 MHz (^{13}C -NMR)

Bruker DRX 500 500 MHz (^1H -NMR), 125.7 MHz (^{13}C -NMR)

Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und sind auf Tetramethylsilan, CHCl_3 , MeOH oder H_2O als interne Standards kalibriert. Sofern nicht anders vermerkt, wurde CDCl_3 als Lösungsmittel verwendet. Die Multiplizitäten werden angegeben als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quadruplett (q), breit (b); dt bezeichnet dann das Dublett eines Triplets usw. Mit (x) werden austauschbare Protonen bezeichnet. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die ^{13}C -H-Substitution wurde mit der DEPT-135 Pulsfolge bestimmt, die die Signale der Methyl- and Methinkohlenstoffe, die „aufwärts“ zeigen (+) von denen der Methylenkohlenstoffe, die „abwärts“ zeigen (-) und signallosen (o) quartären Kohlenstoffen differenziert.

ESR-Spektroskopie

Die ESR-spektren wurden mit einem Varian E-109 Spektrometer mit Frequenzzähler (Hewlett Packard 5246 L) und Frequenzkonverter (HP 5255 A) bei 8.980788 GHz und den folgenden Einstellungen gemessen: Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 G, Leistung 5 mW, Sweepzeit 15 Min., Zeitkonstante 1 s. Der g-Wert wurde mit 2,2-Di-(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl Radikal (DPPH) als Referenz ($g = 2.0037$) bestimmt.

UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektren wurden auf einem Cary 50 UV-Vis-Spektrometer der Firma Varian gemessen. Angegeben werden die Anregungsmaxima (λ) in nm.

Massenspektrometrie

GC-MS Spektren wurden auf einem HP 6890 Spektrometer mit einem HP 5973 Massendetektor mit einer Macherey&Nagel Optima 1 (0.2 mm \times 25 m) Kapillarsäule und dem folgenden Temperaturprogramm aufgenommen: Injektor: 150 °C, Ofen: 100 °C (0 Min.), 100 °C (2 Min.), 300 °C (12 Min.), 300 °C (25 Min.). HPLC-ESI-MS Spektren wurden mit einer Hewlett-Packard 1100 HPLC und einem Finnegan LCQ Massenspektrometer aufgenommen, als Säulen dienten analytische Nucleosil C4, C18HD oder C18-Nautilus-

säulen von Macherey&Nagel. Folgende Gradientenprogramme wurden verwendet: Fluss: 1 mL/Min., Solvens A: 0.1% HCOOH in H₂O, Solvens B: 0.1% HCOOH in MeCN, Programm P45: A/B 80/20 (0 Min.), 50/50 (20 Min.), 10/90 (30 Min.), 0/100 (40 Min.), 80/20 (41 Min.), 80/20 (45 Min.). Programm P15: A/B 90/10 (0 Min.), 90/10 (1 Min.), 0/100 (10 Min.), 0/100 (12 Min.), 90/10 (12.1 Min.), 90/10 (15 Min).

Zur Bestimmung der HPLC-Reinheit wurde die Spur bei 210 nm herangezogen.

Hochaufgelöste FAB- und EI-Massenspektren wurden auf einem Finnegan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrices wurden für die FAB-MS *m*-Nitrobenzylalkohol (NBA) und Glycerin, ggf. unter Zusatz von TFA verwendet. Signale werden in folgendem Format angegeben: m/z, relative Intensität, Addukt.

Schmelzpunkte

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

Optische Rotation

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

Chromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) durchgeführt. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm, 366 nm und zur Anfärbung nachfolgende Reagenzien verwendet:

Reagenz A: 9 g Kaliumpermanganat, 60 g K₂CO₃ und 15 mL 5%ige wässrige NeOH auf 900 mL Wasser; Reagenz B: 2.5 g Molybdatphosphorsäure, 1g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml 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 und als Laufmittel CHCl₃:MeOH (1:1, v:v) 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.

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1: Synthese und Evaluierung menschlicher N-Ras-Peptide

6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2: Synthese photoaktivierbarer N-Ras-Peptide und ihr Einsatz in biologischen Experimenten

6.2.1.1 Optimierung der Schutzgruppenstrategie zur Synthese BP-markierter Geraniole

Die Synthese der Silylanaloga ist in Kap. 6.2.1.2: Synthese der Analoga 5xxx beschrieben.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur allylischen Oxidation (Darstellung von 3a und 3b)

Zu einer Mischung von SeO_2 (0.05 Äquivalente), Salicylsäure (0.1 Äquivalente) und *t*-Butylhydroperoxid (3.5 Äquivalente, als 80%-ige Lösung in $(t\text{-BuO})_2\text{-H}_2\text{O}$, 3:2 v/v) in CH_2Cl_2 (1 ml/mmol) wird 1.0 Äquivalent des geschützten Isoprenylalkohols **2** getropft und 12 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mehrere Male mit einer wässrigen Lösung von Fe_2SO_4 gewaschen und zur Trockne eingedampft, der Rückstand wird mit Ether aufgenommen, mit gesättigten wässrigen Lösungen von NaHCO_3 und NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und erneut im Vakuum aufkonzentriert. Der Rückstand wird in MeOH (2 mL/mmol) gelöst, auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und portionsweise mit 0.2 Äquivalenten NaBH_4 versetzt. Nach Zugabe von Aceton wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit gesättigten wässrigen Lösungen von NH_4Cl und NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Steglich-Veresterung (Darstellung der Verbindungen 4xxs)

Eine Lösung des Alkohols **3** (1.0 Äq.) in CH_2Cl_2 (10-20 mL/mmol) wird mit 1.0 Äq. *m*- bzw. *p*-Benzoylbenzoesäure, 1.1 Äq. DIC und 0.8 Äq. DMAP für 4-8 h bei RT gerührt. Nach Waschen mit gesättigten wässrigen Lösungen von NH_4Cl , NaHCO_3 und NaCl wird die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Darstellung von Tetrahydropyranylgeraniol

Zu einer Lösung von 1.885 g Pyridinium-*p*-Toluolsulfonat (7.5 mmol, 0.06 Äq) in 15 mL DMF werden 19.3 mL Dihydropyran (225 mmol, 18.9 g, 1.875 Äq.) und 21 mL Geraniol (120 mmol, 18.5 g) gegeben und bei RT 24 h gerührt. Der Ansatz wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 28.7 g (120 mmol, quant.) eines farblosen Öls. Die NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[206]

C₁₅H₂₆O₂ (238.4). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.40-1.52 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.61 (s, 6H), 1.63-1.69 (m, 1H), 1.73-1.80 (m, 1H), 1.95-2.06 (m, 4H), 3.41-3.47 (m, 1H), 3.80-3.86 (m, 1H), 3.96 (dd, 1H, *J* = 12.0, 7.5 Hz), 4.16 (dd, 1H, *J* = 12.0, 6.3 Hz), 4.56 (dd, 1H, *J* = 4.2, 3.0 Hz), 5.02 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz), 5.30 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz); ¹³C-NMR (100 MHz): 16.4, 17.7 (beide +), 19.6, 25.5 (beide -), 25.7 (+), 26.3, 30.7, 39.6, 62.3, 63.6 (alle -), 97.7, 120.5, 124.0 (alle +), 131.6, 140.2 (beide o).

Darstellung von 8-Hydroxy-1-Tetrahydropyranylgeraniol

Die allylische Oxidation wurde im Maßstab von 39.3 mmol nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift durchgeführt. Ausbeute: 2.9 g (11.5 mmol, 28 %) eines farblosen Öls. Die NMR-Daten stimmen mit Literaturwerten überein.^[153]

C₁₅H₂₆O₃ (254.4). R_f = 0.35 (Cyclohexan/EtOAc 5:1); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44-1.71 (m, 5H), 1.63 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.73-1.82 (m, 1H), 1.87 (bs, 1H), 2.01-2.15 (m, 4H), 3.44-3.48 (m, 1H), 3.81-3.86 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.97 (dd, 1H, *J* = 11.9, 7.5 Hz), 4.19 (dd, 1H, *J* = 11.9, 6.5 Hz), 4.56-4.60 (m, 1H), 5.29-5.33 (m, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz): 13.6, 16.3 (beide +), 19.5, 25.4, 25.6, 30.6, 39.1, 62.2, 63.6, 68.8 (alle -), 97.7, 120.8, 125.4 (alle +), 135.0, 139.7 (beide o).

Darstellung von 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-1-Tetrahydropyranylgeraniol

Die Veresterung wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift im Maßstab von 2 mmol durchgeführt, eine säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts war jedoch nicht notwendig. Ausbeute: 869 mg (1.87 mmol, 93 %) eines gelblichen Öls.

C₂₉H₃₄O₅ (462.6). R_f = 0.31 (Cyclohexan/EtOAc 10:1); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.47-1.70 (m, 5H), 1.58 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.78-1.82 (m, 1H), 2.07-2.23 (m, 4H), 3.46-3.50 (m, 1H), 3.83-3.88 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.98 (dd, 1H, *J* = 12.0, 7.5 Hz), 4.21 (dd, 1H, *J* = 11.8, 6.3 Hz), 4.45 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 5.53 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz), 7.46 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.56-

7.61 (m, 1H), 7.73-7.82 (m, 4H), 8.10-8.15 (m, 2H); ^{13}C -NMR (100 MHz): 14.0, 16.4 (beide +), 19.6, 25.4, 26.0, 30.7, 38.9, 62.3, 63.6, 71.1 (alle -), 97.9, 121.0, 128.4 (2C), 129.5 (2C), 129.6 (2C), 129.7 (2C), 132.9 (alle +), 133.5, 136.9, 139.5, 141.2, 165.6, 196.0 (alle o). GC-MS: t_{R} =19.13 Min, Reinheit 90 %, 462 (1) $[\text{M-H}]^+$, 209 (100) $[\text{BP}]^+$, 152 (15), 105 (20), 85 (80).

Abspaltung der THP-Gruppe: Darstellung von 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geraniol (5bps)

Eine Lösung von 869 mg 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-1-Tetrahydropyranylgeraniol (1.87 mmol) in 20 mL Ethanol wurde mit 1.416 g PPTS (5.6 mmol, 3 Äq.) 6 h refluxiert. Das Gemisch wird mit 250 mL Diethylether verdünnt, 3 Mal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (2:1, v:v) gereinigt. Ausbeute: 280 mg **5bps** (0.74 mmol, 30 %) als gelbliches Öl. R_{f} -Wert und NMR-Spektren stimmen mit denen von **5bps** überein (vgl. Kap. 6.2.1.2: Synthese der Analoga 5xxx)

Darstellung von 2-Chloroacetoxygeraniol

Zu 1.755 mL Geraniol (10 mmol, 1.543 g) in 10 mL DMF werden 2.565 g Chloressigsäureanhydrid (15 mmol, 1.5 Äq.), 0.122 g DMAP (1 mmol, 0.1 Äq.) und 2 mL Pyridin gegeben und für 30 Minuten bei RT gerührt. Der Rückstand nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird durch Flashchromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v:v) gereinigt. Ausbeute: 2.40 g (9.8 mmol, 98 %) eines farblosen Öls. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[142]

$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClO}_2$ (244.8). R_{f} = 0.65 (Cyclohexan/EtOAc 2:1); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 1.57 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.98-2.09 (m, 4H), 4.03 (s, 2H), 4.67 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 5.04 (t, 1H, J = 6.5 Hz), 5.32 (t, 1H, 7.0 Hz); ^{13}C -NMR (100.6 MHz): δ = 16.5, 17.6, 25.6 (alle +), 26.1, 39.4, 40.9, 63.0 (alle -), 117.3, 123.5 (beide +), 131.9, 143.6, 167.3 (alle o).

Darstellung von 8-Hydroxy-2-Chloroacetoxygeraniol

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.39 g 2-Chloroacetoxygeraniol (9.78 mmol) oxidiert. Erhalten werden 1.045 g 8-Hydroxy-2-Chloroacetoxygeraniol (4.0 mmol, 41 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[142]

$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClO}_3$ (260.8). R_{f} = 0.38 (Cyclohexan/EtOAc 2:1); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 1.51 (bs, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 2.05-2.17 (m, 4H), 3.97 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.68 (d, 2H,

$J= 7.3$ Hz), 5.33 (t, 1H, $J= 6.0$ Hz), 5.34 (t, 1H, 7.0 Hz); ^{13}C -NMR (100.6 MHz): $\delta= 14.1$, 16.9 (beide +), 26.0, 39.4, 41.4, 63.4, 69.2 (alle -), 118.1, 125.4 (beide +), 135.7, 143.5, 167.7 (alle o).

Darstellung von 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-2-Chloroacetoxygeraniol

Die Veresterung wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift im Maßstab von 1 mmol durchgeführt, die säulenchromatographische Aufreinigung mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v:v) lieferte 238 mg 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-2-Chloroacetoxygeraniol (0.51 mmol, 51 %) als gelbliches Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[142]

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClO}_5$ (469.0). $R_f= 0.41$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1); ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta= 1.61$ (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.98-2.13 (m, 4H), 3.92 (s, 2H), 4.57 (d, 2H, $J= 7.0$ Hz), 4.62 (s, 2H), 5.24 (t, 1H, $J= 7.3$ Hz), 5.41 (t, 1H, 6.8 Hz), 7.37 (t, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.47-7.52 (m, 1H), 7.66-7.72 (m, 4H), 8.00-8.06 (m, 2H) ; ^{13}C -NMR (100.6 MHz): $\delta= 14.1$, 16.9 (beide +), 26.0, 39.4, 41.4, 63.4, 69.2 (alle -), 118.1, 125.4 (beide +), 135.7, 143.5, 167.7 (alle o).

Abspaltung der 2-Chloroacetat-Gruppe: Darstellung von 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geraniol (5bps)

Zur Entschützung werden 235 mg 8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-2-Chloroacetoxygeraniol (0.50 mmol) bei RT 1 h in 0.5 mL 0.1 N NH_3 und 4.5 mL MeOH gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 25 mL EtOAc verdünnt, mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/EtOAc 2:1, v:v) gereinigt. Ausbeute: 76 mg **5bps** (0.20 mmol, 40 %). R_f -Wert und NMR-Spektren stimmen mit denen von **5bps** überein (vgl. Kap. 6.2.1.2: Synthese der Analoga 5xxx)

6.2.1.2 Synthese der Analoga 5xxx

Die allgemeinen Arbeitsvorschriften zur allylischen Oxidation und zur Veresterung befinden sich in Kap. 6.2.1.1: Optimierung der Schutzgruppenstrategie zur Synthese BP-markierter Geraniole

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Einführung der TBDMS-Gruppe

Eine Mischung des Isoprenylalkohols **1** (1.0 Äquivalente), *t*-Butyldimethylsilylchlorid (1.2 Äquivalente) und *i*PrNEt (2.0 Äquivalente) in CH_2Cl_2 (1 mL/mmol) wird bei RT für 3-6 h

gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit gesättigten wässrigen Lösungen von NH_4Cl , NaHCO_3 und NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Mitsunobu-Veretherung (Darstellung der Verbindungen 4xxt)

Der Alkohol **3** (1.0 Äquivalent) wird mit 1.2 Äq. *m*- bzw. *p*-Hydroxybenzophenon, 1.5 Äq. Triphenylphosphin und 1.5 Äq. Diethylazodicarboxylat (DEAD) in abs. THF (1-2 mL/mmol) gelöst und 4-8 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von EtOAc wird die Reaktionsmischung mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Abspaltung der TBDMS-Gruppe (Darstellung der Verbindungen 5xxx)

Der Silylether **4** (1.0 Äq.) wird mit 1.2 Äq. TBAF in THF (5 mL/mmol) 1 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von EtOAc wird die Mischung mit ges. wässriger NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Prenyl-OTBDMS (*t*-Butyldimethylsilyl 3-methylbut-(2)-enyl ether, 2a)

Prenyl-OTBDMS (**2a**) wurde im 50 mmol-Maßstab hergestellt und mit Cyclohexan-EtOAc (10:1 v:v) als Laufmittel aufgereinigt. Ausbeute: 10 g, (100%) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{OSi}$ (200.4). $R_f = 0.75$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.07$ (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.60 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 4.22 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 5.30 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): $\delta = -4.7$ (2C), 18.2 (beide +), 18.8 (o), 26.1 (+), 26.4 (+, 3C), 60.6 (-), 124.9 (+), 133.9 (o). GC-MS: $t_R = 2.70$ min, 200 (5) $[\text{M}]^+$, 143 (35), 75 (100).

Geranyl-OTBDMS (Geranyl-*t*-butyldimethylsilyl ether, 2b)

Geranyl-OTBDMS (**2b**) wurde im 120 mmol-Maßstab hergestellt und mit Cyclohexan-EtOAc (10:1 v:v) als Laufmittel aufgereinigt. Ausbeute: 32.1 g, (100%) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{OSi}$ (268.5). $R_f = 0.70$ (Cyclohexan/EtOAc 2:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.05$ (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.57 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.96-2.08 (m, 4H), 4.17 (d, 2H,

$J=6.2\text{Hz}$), 5.09 (tt, 1H, $J=6.8, 1.4\text{ Hz}$), 5.24 (tq, 1H, $J=6.2, 1.3\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 16.3, 17.6 (alle +), 18.4 (o), 25.7 (+), 26.0 (+, 3C), 26.3, 39.5, 60.3 (alle -), 124.1, 124.4 (beide +), 131.4, 136.8 (beide o).

HO-Prenyl-OTBDMS (4-Hydroxy-prenyl-*t*-butyldimethylsilylether 3a)

Prenyl-OTBDMS (**2b**) wurde im 15 mmolaren Maßstab hydroxyliert und mit Cyclohexan/EtOAc (6:1 v/v) als Eluent gereinigt. Ausbeute: 2.2 g **3a** (69% über 2 Stufen) als farbloses Öl.

$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Si}$ (216.4). $R_f = 0.20$ (Cyclohexan/EtOAc 10:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.06$ (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.65 (s, 3H), 3.99 (s, 2H), 4.22 (d, 2H, $J=6.3\text{ Hz}$), 5.55 (t, 1H, $J=6.3\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 13.8 (beide +), 18.5 (o), 26.0 (+, 3C), 60.0, 68.1 (beide -), 125.1 (+), 136.3 (o). GC-MS: $t_R = 3.66\text{ min}$, 215 (2) $[\text{M}]^+$, 159 (26), 141 (22), 75 (100).

HO-Geranyl-OTBDMS (8-Hydroxy-geranyl-*t*-butyldimethylsilylether 3b)

Geranyl-OTBDMS (**2b**) wurde im 120 mmolaren Maßstab hydroxyliert und mit Cyclohexan/EtOAc (5:1 v/v) als Eluent gereinigt. Ausbeute: 17 g **3b** (50 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Si}$ (284.5). $R_f = 0.32$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.06$ (s, 6H), 0.83 (s, 9H), 1.56 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.95-2.05 (m, 4H), 3.91 (s, 2H), 4.12 (d, 2H, $J=6.3\text{ Hz}$), 5.23 (t, 1H, $J=6.2\text{ Hz}$), 5.31 (t, 1H, $J=6.3\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 13.7, 16.3 (alle +), 18.4 (o), 25.8 (-), 26.0 (+, 3C), 39.0, 60.3, 68.9 (alle -), 124.6, 125.7 (beide +), 135.0, 136.5 (beide o).

4-(3-Benzoylphenoxy)-prenyl-OTBDMS (4amt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 3.8 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (9:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.28 g **4amt** (85 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$ (396.6). $R_f = 0.55$ (Cyclohexan/EtOAc 4:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.07$ (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.74 (s, 3H), 4.27 (d, 2H, $J=6.1\text{ Hz}$), 4.44 (s, 2H), 5.70 (tq, 1H, $J=6.0, 1.2\text{ Hz}$), 7.14 (dt, 2H, $J=7.5, 2.5\text{ Hz}$), 7.39-7.32 (m, 3H), 7.48 (t, 2H, $J=7.5\text{ Hz}$), 7.58 (tt, 1H, $J=6.8, 1.3\text{ Hz}$), 7.80 (dd, 2H, $J=8.0, 1.5\text{ Hz}$), 7.81 (d, 2H, $J=8.9\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 14.2 (beide +), 18.5 (o), 26.0 (+, 3C), 59.9, 73.5 (beide -), 115.6, 119.6, 123.0, 128.3 (2C), 128.5, 129.3, 130.1 (2C, alle +), 131.8 (o), 132.5 (+), 137.7, 138.9, 158.8, 196.6 (alle o).

4-(4-Benzoylphenyloxy)-prenyl-OTBDMS (4apt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.9 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (9:1, v/v) als Laufmittel ergab 614 mg **4apt** (82 %) als farbloses Öl.

$C_{24}H_{32}O_3Si$ (396.6). $R_f = 0.45$ (Cyclohexan/EtOAc 6:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.08$ (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.75 (s, 3H), 4.28 (d, 2H, $J=6.0$ Hz), 4.48 (s, 2H), 5.72 (t, 1H, $J=6.0$ Hz), 6.97 (d, 2H, $J=8.9$ Hz), 7.46 (dd, 2H, $J=8.0, 7.3$ Hz), 7.56 (tt, 1H, $J=7.3, 1.2$ Hz), 7.75 (dd, 2H, $J=8.0, 1.2$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J=8.9$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : -5.1(2C), 14.1 (beide +), 18.4 (o), 26.0 (+, 3C), 59.9, 73.4 (beide -), 114.4 (2C), 128.2 (2C), 128.8, 129.8 (2C, alle +), 131.5(o), 131.9 (+), 132.1 (o) 132.6 (+, 2C), 138.3, 162.5, 195.7 (alle o).

8-(3-Benzoylphenyloxy)-geranyl-OTBDMS (4bmt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 5.0 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (10:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.48 g **4bmt** (75 %) als gelbliches Öl.

$C_{29}H_{40}O_3Si$ (464.7). $R_f = 0.54$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.05$ (s, 6H), 0.97 (s., 9H), 1.60 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 2.00-2.07 (m, 2H), 2.13-2.20 (m, 2H), 4.17 (d, 2H, $J=6.3$ Hz), 4.40 (s, 2H), 5.29 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 5.52 (t, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.10 (m, 2H), 7.29-7.36 (m, 2H), 7.42-7.58 (m, 3H), 7.72-7.80 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 13.9, 16.3 (alle +) 18.4 (o), 26.0 (+, 3C), 36.8, 38.9, 60.3, 74.2 (alle -), 115.5, 119.5, 122.7, 124.7, 128.2 (2C), 128.9, 129.1, 130.0 (2C, alle +), 130.7 (o), 132.4 (+), 136.3, 137.6, 138.7, 158.8, 196.5 (alle o).

8-(4-Benzoylphenyloxy)-geranyl-OTBDMS (4bpt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 5.0 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (10:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.61 g **4bpt** (81 %) als farbloses Öl.

$C_{29}H_{40}O_3Si$ (464.7). $R_f = 0.50$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.06$ (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 1.63 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 2.04-2.09 (m, 2H), 2.15-2.23 (m, 2H) 4.17 (d, 2H, $J=6.3$ Hz), 4.44 (s, 2H), 5.30 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 5.55 (t, 1H, $J=6.3$), 6.90-6.98 (m, 2H), 7.39-7.42 (m, 2H), 7.52-7.56 (m, 1H), 7.70-7.85 (m, 4H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : -5.3 (2C), 13.7, 16.0 (alle +), 18.0 (o), 25.3 (-), 25.6 (+, 3C), 38.5, 59.9, 73.8 (alle -), 114.0 (+, 2C), 119.0 (o), 124.5, 127.8 (2C), 129.4, 129.7 (2C, alle +), 130.1 (o), 131.5(+), 131.9 (+, 2C), 136.0, 138.0, 162.3, 195.2 (alle o).

4-(3-Benzoylbenzoyloxy)-prenyl-OTBDMS (4ams)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.75 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (6:1, v/v) als Laufmittel ergab 667 mg **4ams** (93 %) als farbloses Öl.

$C_{25}H_{32}O_4Si$ (424.6). $R_f = 0.40$ (Cyclohexan/EtOAc 6:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.06$ (s, 6H), 0.89 (s., 9H), 1.73 (s, 3H), 4.25 (d, 2H, $J=6.0$ Hz), 4.73 (s, 2H), 5.68 (t, 1H, $J=6.0$ Hz), 7.48 (t, 2H, $J=7.9$ Hz), 7.52-7.63 (m, 2H), 7.79 (dd, 2H, $J=7.9, 1.2$ Hz), 7.99 (dd, 2H, $J=7.5, 1.5$ Hz), 8.26 (dt, 1H, $J=7.8, 1.5$ Hz), 8.39-8.46 (t, 1H, $J=1.5$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 14.2 (beide +), 18.3 (o), 26.0 (+, 3C), 59.8, 70.1 (beide -), 128.5 (o), 128.6 (2C), 129.1, 130.1 (2C, alle +), 130.5, 131.00 (beide o), 131.05, 132.8, 133.2, 134.1 (alle +), 137.0, 137.9, 165.5, 195.7 (alle o).

4-(4-Benzoylbenzoyloxy)-prenyl-OTBDMS (4aps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.74 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (6:1, v/v) als Laufmittel ergab 671 mg **4aps** (93 %) als farbloses Öl.

$C_{25}H_{32}O_4Si$ (424.6). $R_f = 0.40$ (Cyclohexan/EtOAc 6:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.07$ (s, 6H), 0.90 (s, 9H), 1.75 (s, 3H), 4.27 (d, 2H, $J=6.8$ Hz), 4.75 (s, 2H), 5.71 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.49 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.60 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.79 (d, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.82 (d, 2H, $J=8.0$ Hz), 8.15 (d, 2H, $J=8.0$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = -4.7$ (2C), 14.7 (beide +), 18.8 (o), 26.3 (+, 3C), 60.2, 70.6 (beide -), 128.2 (2C), 129.4, 129.9 (2C), 130.2 (2C), 130.5 (2C, alle +), 131.3 (o), 133.3 (+), 133.7, 137.3, 141.7, 165.9, 195.7 (alle o).

8-(3-Benzoylbenzoyloxy)-geranyl-OTBDMS (4bms)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 5.0 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (10:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.42 g **4bms** (69 %) als farbloses Öl.

$C_{30}H_{40}O_4Si$ (492.7). $R_f = 0.62$ (Cyclohexan/EtOAc 5:1) 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.02$ (s, 6H), 0.83 (s, 9H), 1.57 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.98-2.15 (m, 4H), 4.13 (d, 2H, $J=6.1$ Hz), 4.65 (s, 2H), 5.26 (dt, 1H, $J=1.2, 6.5$ Hz), 5.48 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 7.42 (t, 2H, $J=7.9$ Hz), 7.49-7.55 (m, 2H), 7.73 (d, 2H, $J=7.1$ Hz), 7.92 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 8.18-8.22 (m, 1H), 8.38-8.43 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = -5.1$ (2C), 14.0, 16.4 (alle +), 18.3 (o), 25.9 (+, 3C), 60.1, 70.9 (beide -), 124.7 (+), 128.3 (+, 2C), 128.4 (o), 129.5, 129.8, 129.9 (2C, alle +), 130.6, 135.9 (beide o), 132.6, 133.0, 133.8, 134.1 (alle +), 136.9, 137.8, 165.4, 195.5 (alle o)

8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geranyl-OTBDMS (4bps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 5.0 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (10:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.41 g **4bps** (68 %) als farbloses Öl.

$C_{30}H_{40}O_4Si$ (492.7). $R_f = 0.56$ (Cyclohexan:EtOAc 5:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.06$ (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 1.63 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 2.05-2.21 (m, 4H), 4.19 (d, 2H, $J=6.2$ Hz), 4.73 (s, 2H), 5.34 (t, 1H, $J=6.3$ Hz), 5.57 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.46 (t, 2H, $J=6.9$ Hz), 7.56-7.60 (m, 1H), 7.76-7.81 (m, 4H), 8.15 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = -4.7$ (2C), 14.0, 16.3 (alle +), 18.3 (o), 24.7(+), 26.0 (+, 3C), 26.1, 38.8, 60.2, 71.0 (alle -), 124.8, 128.4 (2C), 129.4 (2C), 129.6, 129.7 (2C), 130.1 (2C), 132.8 (alle +), 133.4, 136.1, 136.9, 141.2, 165.4, 195.7 (alle o).

4-(3-Benzoylphenyloxy)-prenol (5amt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.07 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (7:3, v/v) als Laufmittel ergab 236 mg **5amt** (78 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[143]

$C_{18}H_{18}O_3$ (282.3). $R_f = 0.12$ (Cyclohexan/EtOAc 6:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.75$ (s, 3H), 4.22 (d, 2H, $J=6.5$ Hz), 4.44 (s, 2H), 5.77 (t, 1H, $J=6.5$ Hz), 7.12 (dt, 2H, $J=8.0, 2.0$ Hz), 7.28-7.38 (m, 3H), 7.46 (t, 2H, $J=8.0$ Hz), 7.57 (t, 1H, $J=7.3, 1.2$ Hz), 7.78 (dd, 2H, $J=8.0, 1.9$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 13.9$ (+), 58.8, 73.1 (beide -), 115.3, 119.6, 123.0, 127.6, 128.3 (2C), 129.3, 130.0 (2C, alle +), 132.5 (+), 133.5, 137.5, 138.8, 158.6, 196.6 (alle o).

4-(4-Benzoylphenyloxy)-prenol (5apt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.73 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (7:3, v/v) als Laufmittel ergab 434 mg **5apt** (89 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[143]

$C_{18}H_{18}O_3$ (282.3). $R_f = 0.30$ (Cyclohexan/EtOAc 4:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.78$ (s, 3H), 4.26 (d, 2H, $J=6.5$ Hz), 4.48 (s, 2H), 5.79 (t, 1H, $J=6.5$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J=6.5$ Hz), 7.48 (dd, 2H, $J=8.0, 7.5$ Hz), 7.56 (tt, 1H, $J=7.5, 1.2$ Hz), 7.74 (dd, 2H, $J=8.5, 1.5$ Hz), 7.80 (d, 2H, $J=9.0$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 14.4$ (+), 59.3, 73.4 (beide -), 114.4 (2C), 127.7, 128.6 (2C), 130.1 (alle +), 130.6 (o), 132.3, 132.9 (2C, beide +), 133.8, 138.6, 162.7, 196.0 (alle o).

8-(3-Benzoylphenyloxy)-geraniol (5bmt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 2.75 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v/v) als Laufmittel ergab 0.72 g **5bmt** (78 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[143]

$C_{23}H_{26}O_3$ (350.4). $R_f = 0.41$ (Cyclohexan/EtOAc 1:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.58$ (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 1.97-2.11 (m, 4H), 4.10 (d, 2H, $J=6.3$ Hz), 4.40 (s, 2H), 5.29 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 5.52 (t, 1H, $J=7.0$ Hz), 7.10 (m, 2H), 7.29-7.36 (m, 2H), 7.42-7.58 (m, 3H), 7.72-7.80 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 13.5, 15.8$ (beide +) 25.5, 38.4, 58.9, 73.8 (alle -), 115.5, 119.3, 122.5, 123.4, 127.8 (2C), 128.3, 128.7, 129.6 (2C, alle +), 130.5 (o), 132.0 (+), 137.1, 138.3, 138.5, 158.5, 196.2 (alle o).

8-(4-Benzoylphenyloxy)-geraniol (5bpt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 4.8 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.7 g **5bpt** (97 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[143]

$C_{23}H_{26}O_3$ (350.4). $R_f = 0.35$ (Cyclohexan/EtOAc 1:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.60$ (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.96-2.07 (m, 2H), 2.10-2.18 (m, 2H), 4.08 (d, 2H, $J=6.2$ Hz), 4.37 (s, 2H), 5.31 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 5.45 (t, 1H, $J=7.0$ Hz), 6.85-6.90 (m, 2H), 7.33-7.40 (m, 2H), 7.44-7.46 (m, 1H), 7.62-7.78 (m, 4H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 14.3, 16.6$ (beide +) 26.3, 39.2, 59.7, 74.5 (alle -), 114.7 (2C), 124.2, 128.6 (2C), 129.3, 130.1 (2C, alle +), 130.2, 130.7 (beide o), 132.3, 132.9 (2C, beide +), 138.4, 139.1, 163.2, 196.3 (alle o).

4-(3-Benzoylbenzoyloxy)-prenol (5ams)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.46 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (2:1, v/v) als Laufmittel ergab 284 mg **5ams** (65 %) als farbloses Öl.

$C_{19}H_{18}O_4$ (310.3). $R_f = 0.11$ (Cyclohexan/EtOAc 2:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.73$ (s, 3H), 4.21 (d, 2H, $J=6.5$ Hz), 4.72 (s, 2H), 5.74 (t, 1H, $J=6.5$ Hz), 7.46 (t, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.51-7.63 (m, 2H), 7.77 (d, 2H, $J=7.0$ Hz), 7.96 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.24 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.47 (s, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 14.1$ (+), 58.8, 69.8 (beide -), 127.5, 128.4 (2C, alle +), 128.5 (o), 128.6, 130.0 (2C, alle +), 130.4 (o), 131.0, 132.9, 133.2, 134.2 (alle +), 136.9, 137.9, 165.5, 195.8 (alle o).

4-(4-Benzoylbenzoyloxy)-prenol (5aps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 1.46 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (7:3, v/v) als Laufmittel ergab 273 mg **5aps** (63 %) als farbloses Öl.

$C_{19}H_{18}O_4$ (310.3). $R_f = 0.12$ (Cyclohexan/EtOAc 2:1). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.78$ (s, 3H), 4.25 (d, 2H, $J=6.8$ Hz), 4.76 (s, 2H), 5.78 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.48 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.60 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.78 (d, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.82 (d, 2H, $J=8.0$ Hz), 8.15 (d, 2H, $J=8.0$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 14.2$ (+), 58.9, 69.8 (beide -), 127.4, 128.5 (2C), 129.6 (2C), 129.9 (2C), 130.1 (2C), 132.9 (alle +), 133.0, 133.2, 136.7, 141.4, 165.5, 196.1 (alle o).

8-(3-benzoylbenzoyloxy)-geraniol (5bms)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 2.75 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v/v) als Laufmittel ergab 0.72 g **5bms** (72 %) als gelbliches Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[142]

$C_{24}H_{26}O_4$ (378.5). $R_f = 0.40$ (Cyclohexan/EtOAc 1:1) 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.57$ (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.94-2.02 (m, 2H), 2.08-2.16 (m, 2H), 4.05 (d, 2H, $J=6.8$ Hz), 4.35 (s, 2H), 5.32 (td, 1H, $J=6.8, 1.2$ Hz), 5.45 (td, 1H, $J=6.8, 1.2$ Hz), 7.04-7.08 (m, 2H), 7.24-7.32 (m, 2H), 7.37 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 7.48 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.70-7.74 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 13.7, 16.1$ (alle +), 25.8, 37.7, 59.0, 74.0 (alle -), 115.3, 119.5, 122.6, 123.8, 128.1 (2C), 128.5, 129.0, 129.8 (2C, alle +), 130.7 (o), 132.3 (+), 137.4, 138.3, 138.6, 158.7, 196.7 (alle o).

8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geraniol (5bps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 4.8 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (5:1, v/v) als Laufmittel ergab 1.7 g **5bps** (97 %) als farbloses Öl. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[142]

$C_{24}H_{26}O_4$ (378.5). $R_f = 0.35$ (Cyclohexan/EtOAc 1:1) 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.58$ (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 1.94-2.02 (m, 2H), 2.10-2.16 (m, 2H), 4.04 (d, 2H, $J=6.3$ Hz), 4.32 (s, 2H), 5.32 (t, 1H, $J=6.2$ Hz), 5.46 (t, 1H, $J=6.3$ Hz), 7.05 (dt, 2H, $J=7.5, 2.3$ Hz), 7.29-7.32 (m, 2H), 7.37 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 7.48 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.72 (d, 2H, $J=7.9$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz): $\delta = 13.6, 17.8$ (alle +), 26.5, 38.4, 59.9, 70.6 (alle -), 123.4, 128.0 (2C), 129.1 (2C), 129.4 (2C), 129.6, 129.7 (2C), 130.1 132.6 (alle +), 133.0, 136.5, 140.9, 141.3, 165.2, 195.6 (alle o).

6.2.1.3 Synthese der Cysteinbausteine 7bxx

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Anknüpfung der BP-markierten Isoprenole an Cysteinmethylester (Darstellung von 7bxx)

Zur Lösung von 1.1 Äq. *N*-Chlor-succinimid in CH₂Cl₂ (2-5 ml/mmol) wird bei -40 °C Me₂S (2.0 Äq.) tropfenweise zugegeben und für 5 Minuten auf 0 °C erwärmt. Nach erneutem Abkühlen auf -40 °C wird eine Lösung von **5xxx** in CH₂Cl₂ (5 mL/mmol) zugetropft, das Gemisch binnen 60 Minuten auf 0 °C erwärmt und noch 60 Min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird mit Cyclohexan verdünnt, zwei Mal mit eiskalter gesättigter wässriger NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung in MeOH gelöst und bei 0°C zu einer Lösung von L-Cysteinmethylester-Hydrochlorid (1.1 Äq) in 2N NH₃ in MeOH getropft. Nach 1 h wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, nach einer weiteren Stunde mit CH₂Cl₂ versetzt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach sorgfältiger Rückextraktion werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

S-[8-(3-Benzoylphenoxy)-geranyl]-cysteinmethylester (7bmt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 0.51 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v/v) als Laufmittel ergab 123 mg **7bmt** (51 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

C₂₇H₃₃NO₄S (467.6). R_f = 0.14 (Cyclohexan:EtOAc 1:1). [α]_D²⁰ = -7.2° (c=2.5, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.65 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 2.03-2.18 (m, 4H), 2.77 (dd, 1H, J=13.7, 7.2Hz), 2.93 (dd, 1H, J=13.7, 4.5Hz), 3.12-3.20 (m, 2H), 3.70-3.77 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.40 (s, 2H), 5.20 (t, 1H, J=7.8 Hz), 5.51 (t, 1H, J=5.8 Hz), 7.10-7.13 (m, 2H), 7.30-7.37 (m, 3H), 7.46 (t, 2H, J=7.6Hz), 7.57 (t, 1H, J=7.4Hz), 7.79 (d, 2H, J=7.6Hz). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 14.0, 16.1 (beide +), 25.9, 29.4, 36.2, 38.7 (alle -), 52.3, 54.4 (beide +), 74.0 (-), 115.4, 119.6, 120.3, 123.1, 127.2, 128.4 (2C), 129.4, 130.1 (2C, alle +), 130.7 (o), 132.6 (+), 133.8, 137.6, 138.9, 158.7, 171.7, 196.6 (alle o). HR-MS (FAB, NBA): ber. für C₂₇H₃₃NO₄S 467.2130, gef. 467.2139.

S-[8-(4-Benzoylphenyloxy)-geranyl]-cysteinmethylester (7bpt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 0.22 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v/v) als Laufmittel ergab 60 mg **7bpt** (58 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

$C_{27}H_{33}NO_4S$ (467.6). $R_f = 0.14$ (Cyclohexan:EtOAc 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -12.1^\circ$ ($c=0.40$, $CHCl_3$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.67 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 2.05-2.12 (m, 2H), 2.16-2.25 (m, 2H), 2.69 (dd, 1H, $J=13.6, 7.6$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J=13.6, 4.7$ Hz), 3.12-3.17 (m, 2H), 3.65 (dd, 1H, $J=7.6, 4.7$ Hz), 3.72 (s, 3H), 4.46 (s, 2H), 5.23 (dt, 1H, $J=1.3$ Hz, 7.2 Hz), 5.53 (dt, 1H, $J=1.3, 7.2$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J=6.8$ Hz), 7.45 (t, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.50-7.56 (m, 1H), 7.74 (d, 2H, $J=7.0$ Hz), 7.81 (d, 2H, $J=8.8$ Hz). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 13.8, 16.0$ (beide +), 25.9, 29.8, 36.2, 38.9 (alle -), 52.1, 54.1 (beide +), 74.0 (-), 114.6 (2C), 120.3, 128.1 (2C), 128.7, 129.6 (2C, alle +), 130.0, 130.7 (beide o), 131.8, 132.4 (2C, alle +), 138.2, 138.8, 162.5, 174.2, 195.4 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 22,98$, Reinheit: 90 %, 468.1 $[M+H]^+$. HR-MS (FAB, NBA): ber. für $C_{27}H_{33}NO_4S$ 467.2130, gef. 467.2137.

S-[8-(3-Benzoylbenzoyloxy)-geranyl]-cysteinmethylester (7bms)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 0.51 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v/v) als Laufmittel ergab 126 mg **7bms** (44 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

$C_{28}H_{33}NO_5S$ (495.6). $R_f = 0.17$ (Cyclohexan:EtOAc 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -1.9^\circ$ ($c=0.26$, $CHCl_3$). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.68$ (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.06-2.21 (m, 4H), 2.77 (dd, 1H, $J=11.0, 4.9$ Hz), 3.11 (dd, 1H, $J=11.0, 7.2$ Hz), 3.12-3.21 (m, 2H), 3.70 (dd, 1H, $J=7.2, 4.9$ Hz), 3.74 (s, 3H), 4.72 (s, 2H), 5.23 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 5.52 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 7.50 (t, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.55-7.63 (m, 2H), 7.79 (d, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.96 (d, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.23-8.28 (m, 1H), 8.45 (s, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 14.3, 16.4$ (beide +), 26.4, 30.1, 35.9, 39.1 (alle -), 52.6, 54.2 (beide +), 71.1 (-), 120.5, 128.7 (2C, beide +), 128.8 (o), 129.5, 130.3 (2C, alle +), 130.4 (o), 131.2, 133.3, 133.4, 134.2 (alle +), 137.2 (o), 138.1, 139.3, 165.8, 174.8, 196.0 (alle o). HR-MS (FAB, NBA): ber. für $C_{28}H_{33}NO_5S$ 495.2079, gef. 495.2076.

S-[8-(4-Benzoylbenzoyloxy)-geranyl]-cysteinmethylester (7bps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 0.62 mmol durchgeführt. Chromatographie mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v/v) als Laufmittel ergab 161 mg **7amt** (52 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

$C_{28}H_{33}NO_5S$ (495.6). $R_f = 0.15$ (Cyclohexan:EtOAc 1:1). $[\alpha]_D^{20} = -10.7^\circ$ ($c=0.375$, MeOH). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.62$ (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 2.02-2.07 (m, 2H), 2.09-2.18 (m, 2H), 2.88-2.95 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 1H), 3.12-3.22 (m, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.68 (s, 2H), 5.18 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 5.42-5.50 (m, 1H), 7.40-7.48 (m, 2H), 7.50-7.56 (m, 1H), 7.70-7.82 (m, 4H), 8.04-8.12 (m, 2H). HR-MS (FAB, NBA): ber. für $C_{28}H_{33}NO_5S$ 495.2079, gef. 495.2073.

6.2.1.4 Versuche zu Kapitel 4.1.2.2: Festphasengestützte Synthese der Peptidfragmente Festphasengestützte Synthese von H-GC(S-*t*Bu)MGLP (8).

Die Beladung von 2-Chlorotriethylchlorid-Polystyrolharz (Cl-Beladung 1.08 mmol/g) erfolgte durch Schütteln mit 1.2 Äq. Fmoc-Prolin und 4.8 Äq. DIEA in 5 mL abs. CH_2Cl_2 im ausgeheizten Schüttelreaktor. Unreagierte Chlorfunktionalitäten wurden durch anschließende 30-minütige Behandlung mit MeOH und DIEA in CH_2Cl_2 blockiert. Die Beladung des Harzes wurde anschließend zu 0.25 mmol/g bestimmt. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte die *N*-terminale Verlängerung zum Peptid **8** mit dem folgenden Protokoll:

Ankuppung der Fmoc-Aminosäuren (4.0 Äq.) mit 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBt, 8 Äq. DIEA in DMF für 90 Min. nach 5-minütiger Voraktivierung unter Argon; Capping durch zweimaliges Behandeln mit 10 Vol.-% Acetanhydrid in Pyridin für jeweils 5 Minuten; Abspaltung der Fmoc-Gruppen durch zweimaliges Behandeln mit 20 Vol.-% Piperidin in DMF für jeweils 10 Minuten. Zwischen allen Schritten wurde das Harz jeweils gründlich mit DMF gewaschen.

Die Qualität des Produkts wurde durch HPLC-ESI-MS-Analyse einer Probe überprüft, die mit 10 Vol.-% TFA in CH_2Cl_2 vom Harz abgespalten wurde.

$C_{42}H_{58}N_6O_9S_3$ (886.3). HPLC-ESI-MS (C4, P45) $t_R=16.57$ min, Reinheit 90%, 885.2 [M-H].

Synthese von Biot-Aca-GC(S-*t*Bu)MGLP (9)

Für die Biotinylierung wurden 4.0 Äq. Biotinylaminocaprinsäure mit 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBt und 16 Äq. DIEA in 10 mL DMF 10 Minuten voraktiviert und 2 h mit dem vorgequollenen, mit **8** beladenen Harz geschüttelt. Nach gründlichem Waschen mit CH_2Cl_2 wurde **9** durch zweimaliges Schütteln mit 10 Vol.-% TFA in CH_2Cl_2 für 5 Minuten vom Harz abgespalten. Die vereinigten Abspalllösungen wurden mit Toluol versetzt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Aufreinigung war nicht erforderlich. Ausbeute: 394

mg **9** als farbloses Öl (87 % bezogen auf Prolin-beladenes Harz). Die Zuordnung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde durch H-H-COSY-Spektren bewerkstelligt.

$\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_4$ (1004.4). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27.0^\circ$ ($c=1.08$, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): $\delta=$ 0.96 (dd, 6H, $J=10.0, 6.5$ Hz, δ -Leu), 1.26 (s, 9H, *t*-Bu), 1.21-1.73 (m, 15H, 6* CH_2 -chain, β -, γ -Leu), 2.00 (s, 3H, CH_3 -Met), 1.85-2.05 (m, 4H, γ -Pro, γ -Met), 2.07-2.20 (m, 6H, 2* $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ Biot-Aca, β -Pro), 2.40-2.58 (m, 2H, δ -Pro), 2.60-2.65 (m, 2H, S- CH_2 -biot), 2.82-2.87 (m, 1H, S-CH-biot), 2.93 (dd, 1H, $J=7.7, 13.6$ Hz, β -Cys), 3.04-3.14 (m, 3H, N- CH_2 Aca, β' -Cys), 3.65-3.90 (m, 4H, 2* α -Gly), 4.20-4.24 (m, 2H, N-CH-biot, α -Pro), 4.32-4.36 (m, 1H, α -Met), 4.39-4.43 (m, 1H, N-CH-biot), 4.53 (dd, 1H, $J=7.7, 5.7$ Hz, α -Cys), 4.61 (dd, 1H, $J=10.3, 4.3$ Hz, α -Leu). HPLC-ESI-MS (C18, P45): $t_{\text{R}}=13.79$ min, Reinheit 85 %, 1004.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1027.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MS: ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1004.444, gef. 1004.446.

Darstellung von MIC-GC(S-*t*Bu)MGLP (**10**)

MIC-OH (4 Äq.) wurde für 10 Min mit 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBT and 8 Äq. DIEA in 10 mL DMF aktiviert und 90 Minuten mit dem vorgequollenen, mit **8** beladenen Harz geschüttelt. Nach gründlichem Waschen mit CH_2Cl_2 wurde **10** durch zweimaliges Schütteln mit 10 Vol.-% TFA in CH_2Cl_2 für 5 Minuten vom Harz abgespalten. Die vereinigten Abspalllösungen wurden mit Toluol versetzt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit EtOAc/MeOH 10:1 als Laufmittel gereinigt. Ausbeute: 376 mg **10** als farbloses Öl (70 % bezogen auf Prolin-beladenes Harz). Die Zuordnung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde durch H-H-COSY-Spektren bewerkstelligt.

$\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_3$ (858.1). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43.5^\circ$ ($c=2.67$, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=$ 0.73-0.98 (m, 6H, δ -Leu), 1.12-1.37 (m, 11H, CH_2 MIC, *t*-Bu), 1.39-1.73 (m, 7H, 2* CH_2 MIC, β -, γ -Leu) 1.98-2.19 (m, 7H, β' -Met, β' -Pro, γ -Pro, CH_3 -Met), 2.20-2.41 (m, 4H, α - CH_2 MIC, β -Met, β -Pro), 2.47-2.74 (m, 2H, γ -Met), 2.98-3.19 (m, 2H, β -Cys), 3.42-3.57 (m, 2H, N- CH_2 MIC), 3.58-3.69 (m, 1H, δ' -Pro), 3.77-4.04 (m, 5H, 2* α -Gly, δ -Pro), 4.09-4.23 (m, 1H, α -Pro), 4.24-4.56 (m, 2H, α -Met, α -Cys), 4.62-4.79 (m, 1H, α -Leu), 6.69 (s, 2H, HC=CH). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_{\text{R}}=11.11$ min, Reinheit >90 %, 858.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 880.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MS: ber. für $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_3$ 857.3536, gef. 857.3464.

6.2.1.5 Versuche zu Kapitel 4.1.2.3: Fragmentkondensation

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Fragmentkondensation der BP-markierten Cysteinfragmente **7bxx** mit dem biotinylierten Peptid **9**

Zur Fragmentkondensation wird eine Lösung von 1.0 Äq. des biotinylierten Peptids **9**, 1.0 Äq. **7bxx**, 1.3 Äq. EDC und 1.5 Äq. HOBt in CH₂Cl₂ mit 5 Vol.-% 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) mit für 16-24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von EtOAc wird die Lösung je drei Mal mit 0.5 N wässriger HCl, ges. wässrigen NaHCO₃ und NaCl-Lösungen gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Fragmentkondensation der BP-markierten Cysteinfragmente **7bxx** mit dem MIC-Peptid **10**

Zur Fragmentkondensation wird eine Lösung von 1.0 Äq. des MIC-Peptids **10**, 1.0 Äq. **7bxx**, 1.3 Äq. EDC und 1.5 Äq. HOBt in CH₂Cl₂ für 16-24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von EtOAc wird die Lösung je drei Mal mit 0.5 N wässriger HCl, ges. wässrigen NaHCO₃ und NaCl-Lösungen gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Biot-Aca-GC(S^tBu)MGLPC(8-(3-benzoylphenyloxy)-geranyl)-OMe (11bmt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 90 µmol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 5:1 (v/v) als Laufmittel ergab 50.4 mg **11bmt** (55 %) als grünlich-braunes Öl. C₇₀H₁₀₄N₁₀O₁₃S₅ (1454.0). $[\alpha]_D^{20} = -29.7^\circ$ ($c=1.18$, CHCl₃). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ= 0.83-0.96 (m, 6H), 1.20-1.75 (m, 17H), 1.34 (s, 9H), 1.66 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.00-2.28 (m, 14H), 2.81-3.23 (m, 13H), 3.50-3.70 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.84-4.04 (m, 2H), 4.06-4.16 (m, 1H), 4.18-4.27 (m, 1H), 4.33-4.40 (m, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.52-4.68 (m, 3H), 4.69-4.81 (m, 1H), 5.19 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 5.53 (m, 1H), 6.96 (d, 2H, $J=7.1$ Hz), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.80 (d, 2H, $J=7.1$ Hz). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=27.05$ min, Reinheit >90 %, 1453.4 [M+H]⁺, 1476.6 [M+Na]⁺, MALDI-MS (DHB) ber. für C₇₀H₁₀₄N₁₀O₁₃S₅Na⁺: 1475.629, gef. 1475.605.

Biot-Aca-GC(S^tBu)MGLPC(8-(4-benzoylphenyloxy)-geranyl)-OMe (11bpt).

Die Reaktion wurde im Maßstab von 62.7 µmol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 5:1 (v/v) als Laufmittel ergab 40 mg **11bpt** (43%) als leicht bräunliches Öl.

$C_{70}H_{104}N_{10}O_{13}S_5$ (1454.0). $[\alpha]_D^{20} = -38.5^\circ$ ($c=1.13$, $CHCl_3$). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta=$ 0.89-0.98 (m, 6H), 1.20-1.75 (m, 17H), 1.28 (s, 9H), 1.68 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.01-2.40 (m, 14H), 2.50-2.68 (m, 4H), 2.72-3.23 (m, 10H), 3.50-3.70 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.80-4.02 (m, 2H), 4.20-4.36 (m, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.52-4.63 (m, 2H), 4.64-4.80 (m, 3H), 5.17 (t, 1H, $J=7.2$ Hz), 5.50 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.14 (m, 1H), 7.30-7.40 (m, 3H), 7.40-7.52 (m, 2H), 7.52-7.60 (m, 1H), 7.76-7.82 (d, 2H, $J=8.2$ Hz). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=26.01$ min, Reinheit >90 %, 1453.4 $[M+H]^+$, 1476.4 $[M+Na]^+$, MALDI-MS (DHB) ber. für $C_{70}H_{104}N_{10}O_{13}S_5Na^+$: 1475.629, gef. 1475.626.

Biot-Aca-GC(S^tBu)MGLPC(8-(3-benzoylbenzoyloxy)-geranyl)-OMe (11bms)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 84 μ mol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 5:1 (v/v) als Laufmittel ergab 69.5 mg **11bms** (76%) als rötlich-braunes Öl.

$C_{71}H_{104}N_{10}O_{14}S_5$ (1482.0). $[\alpha]_D^{20} = -20.7^\circ$ ($c=2.38$, $CHCl_3$). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta=$ 0.92 (dd, 6H, $J=9.2$, 5.2 Hz), 1.20-1.80 (m, 17H), 1.31 (s, 9H), 1.67 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.00-2.40 (m, 14H), 2.70-3.35 (m, 13H), 3.54-3.69 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.84-4.00 (m, 2H), 4.20-4.40 (m, 3H), 4.73 (s, 2H), 4.50-4.80 (m, 4H), 5.19 (t, 1H, $J=7.2$ Hz), 5.53 (t, 1H, $J=7.3$ Hz), 7.49 (t, 2H, $J=7.6$ Hz), 7.61 (m, 1H), 7.77-7.86 (m, 4H), 8.14 (d, 2H, $J=7.6$ Hz). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=27.01$ min, Reinheit >90 %, 1481.3 $[M+H]^+$, 1503.4 $[M+Na]^+$, MALDI-MS (DHB) ber. für $C_{71}H_{104}N_{10}O_{14}S_5Na^+$: 1503.633, gef. 1503.683.

Biot-Aca-GC(S^tBu)MGLPC(8-(4-benzoylbenzoyloxy)-geranyl)-OMe (11bps)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 40 μ mol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 5:1 (v/v) als Laufmittel ergab 26 mg **11bps** (44%) als leicht bräunliches Öl.

$[\alpha]_D^{20} = -42.0^\circ$ ($c=0.41$, $CHCl_3$). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta=$ 0.83-0.95 (m, 6H), 1.20-1.75 (m, 17H), 1.32 (s, 9H), 1.66 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.00-2.40 (m, 14H), 2.50-2.68 (m, 4H), 2.80-3.30 (m, 10H), 3.53-3.67 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.80-4.02 (m, 2H), 4.20-4.36 (m, 2H), 4.40-4.63 (m, 2H), 4.64-4.80 (m, 3H), 4.73 (s, 2H), 5.17 (t, 1H, $J=7.0$ Hz), 5.48-5.55 (m, 1H), 7.49 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.50-7.62 (m, 2H), 7.75 (d, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.90-8.08 (m, 2H), 8.10-8.22 (m, 1H). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=26.97$ min, Reinheit >90 %, 1481.3 $[M+H]^+$, 1503.4 $[M+Na]^+$, MALDI-MS (DHB, calibrated) ber. für $C_{71}H_{104}N_{10}O_{14}S_5Na^+$: 1503.633, gef. 1503.677.

MIC-GC(S^tBu)MGLPC(8-(3-benzoylphenoxy)-geranyl)-OMe (12bmt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 43.8 µmol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 10:1 (v/v) als Laufmittel ergab 12.8 mg **12bmt** (23 %) als leicht bräunliches Öl.

C₆₄H₉₀N₈O₁₃S₄ (1307.7). $[\alpha]_D^{20} -10.8^\circ$ ($c=0.13$, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ= 0.84-0.98 (m, 6H), 1.15-1.37 (m, 11H), 1.39-1.73 (m, 7H), 1.67 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.98-2.04 (m, 2H), 2.05-2.34 (m, 12H), 2.40-2.74 (m, 2H), 2.90-3.03 (m, 1H), 3.04-3.19 (m, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.34-4.07 (m, 8H), 4.09-4.19 (m, 1H), 4.33-4.47 (m, 2H), 4.48-4.61 (m, 2H), 4.61-4.67 (m, 1H), 5.13-5.22 (m, 1H), 5.58-5.64 (m, 1H), 6.68 (s, 2H), 7.18 (d, 1H, $J=7.4\text{Hz}$), 7.26 (d, 1H, $J=7.4\text{Hz}$), 7.27 (s, 1H), 7.39 (t, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.49 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.60 (t, 1H, $J=7.4\text{Hz}$), 7.72 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.74 (d, 2H, $J=8.6\text{Hz}$). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=24.88$ min, Reinheit >90 %, 1307.0 [M+H]⁺, 1329.4 [M+Na]⁺, MALDI-MS (DHB): 1329.54 [M+Na]⁺, 1346.54 [M+K]⁺.

MIC-GC(S^tBu)MGLPC(4-(4-benzoylphenoxy)-prenyl)-OMe (12bpt)

Die Reaktion wurde im Maßstab von 51 µmol durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc/MeOH, 10:1 (v/v) als Laufmittel ergab 36 mg **12bpt** (55%) als leicht bräunliches Öl.

C₆₄H₉₀N₈O₁₃S₄ (1307.7). $[\alpha]_D^{20} = -28.6^\circ$ ($c=0.21$, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ= 0.93 (dd, 6H, $J=8.0, 6.4$ Hz), 1.20-1.37 (m, 11H), 1.55-1.80 (m, 7H), 1.67 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.98-2.34 (m, 12H), 2.08 (s, 3H), 2.55-2.75 (m, 2H), 2.90-3.20 (m, 4H), 3.34-3.95 (m, 8H), 3.74 (s, 3H), 4.09-4.13, (m, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.52-4.88 (m, 4H), 5.14-5.21 (m, 1H), 5.50-5.56 (m, 1H), 6.68 (s, 2H), 6.96 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.47 (t, 2H, $J=8.2\text{Hz}$), 7.57 (t, 1H, $J=7.4\text{Hz}$), 7.75 (d, 2H, $J=8.2\text{Hz}$), 7.81 (d, 2H, $J=8.6\text{Hz}$). HPLC-ESI-MS (P45): $t_R=27.77$ min, Reinheit >90 %, 1307.2 [M+H]⁺, 1329.3 [M+Na]⁺, MALDI-MS (DHB) m/z : 1329.60 [M+Na]⁺, 1345.57 [M+K]⁺.

6.2.1.6 Versuche zu Kapitel 4.1.2.4: Biologische Untersuchung der BP-markierten Peptide 11 und 12**Photoinduzierte Kopplung des biotinylierten Lipopeptids 11bpt an BSA**

Eine 8µM Lösung von Rinderserum-Albumin (BSA) mit 1.6 µM **11bpt** in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 5 mM MgCl₂ wurde in einer Quartzküvette (d = 1 cm, 3 mL) bei RT mit gefiltertem UV-Licht (300-400 nm) bestrahlt. Vor der Bestrahlung sowie nach 5, 15, 30 und

60 Min wurden Proben entnommen und durch SDS-PAGE sowie Western Blot mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase (von Promega) analysiert.

Kopplung von 12bpt an N-Ras

Vor der Ligation wurde das $^{1-181}\text{N-Ras}$ -Protein über eine HiTrap Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben, um Salze und DTE (für die Lagerung des Proteins) zu entfernen. Während aller Schritte wurden alle Protein-haltigen Proben bei unter 4 °C gehandhabt, sofern nicht anders angegeben.

Zu einer Lösung des Peptids in 50 μL MeOH wurde in einem 2 mL-Eppendorf Tube 1 mL Ligationspuffer (11 % Triton-X114 (Fluka) mit 30mM Tris/HCl und 100 mM NaCl) zugesetzt. Das Gemisch wurde 15 Min mit Ultraschall behandelt, bis eine leicht trübe homogene Lösung entstanden war. Die Detergenlösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 10 mg Ras-Protein (1.0 Äq.) in 1 mL Puffer (20 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7.4) versetzt, mit Argon überspült und bei 4 °C 16 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein Zentrifugengläschen (15 mL) überführt, mit 3 mL Puffer verdünnt und auf 37 °C erwärmt. Nach erfolgter Phasentrennung und Zentrifugation wurde die Detergenphase abgetrennt und die wässrige Phase noch zwei Mal mit je 1 mL einer 11 %igen Triton-X114-Lösung extrahiert. Die Detergenphasen wurden vereinigt und 3 Mal mit je 7 mL Ligationspuffer gewaschen, mit frischem Puffer auf einen Detergengehalt von 2 % verdünnt und über eine Säule von DEAE-Sepharose gereinigt. Nach Waschen mit 20 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTE, pH 7.4 wurde das Protein mit einem NaCl-gradienten (0-1 M) eluiert und aufkonzentriert.

Das Produkt wurde mit ESI-MS und SDS-PAGE analysiert. Enzymatischer Verdau des Proteins wurde mit Trypsin und Chymotrypsin für 4 bzw. 8 Stunden bei RT durchgeführt, hierfür wurden 100 μg Lipoprotein mit 0.4 μg Protease in 40 μL 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl_2 und 1 mM DTE inkubiert. Die Lösung wurde durch ESI-MS und MALDI-TOF-MS analysiert. Die ESI-MS-Proben wurden durch Gelfiltration entsalzt und in Methanol/Wasser 1:1 auf eine Proteinkonzentration von 20-50 μM verdünnt.

Transformationsassay

PC12-Zellkultur und Mikroinjektionen wurden durchgeführt wie beschrieben.^[162, 207, 208] Als transformiert wurden Zellen gewertet, deren neuritenartige Ausläufer eine Länge von mindestens drei Zelldurchmessern aufwiesen.

6.2.1.7 Versuche zu Kapitel 4.1.2.5: Inhibitionsexperimente mit Serin-Peptiden

Festphasengestützte Synthese von H-GS(Trt)MGLP (14).

Das Serin-Analogon **14** wurde in 62 % Ausbeute (560 mg) nach demselben Protokoll wie das Peptid **8** aufgebaut (vgl. Kap. 6.2.1.4: Versuche zu Kapitel 4.1.2.2: Festphasengestützte Synthese der Peptidfragmente)

Die Qualitätskontrolle des Produktes erfolgte durch MALDI-TOF-MS-Analyse einer Probe, die mit 10 Vol.-% TFA in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten wurde: M ber. für C₂₃H₄₀N₆O₈S 560.26, gef. 561.69 [M+H]⁺, 583.70 [M+Na]⁺. Signale der berechneten Abbruchsequenzen wurden nicht beobachtet.

Synthese von Biot-Aca-GSMGLP (15)

Für die Biotinylierung wurden 4.0 Äq. Biotinylaminocaprinsäure mit 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBt und 16 Äq. DIEA in DMF 10 Minuten voraktiviert und 2 h mit dem vorgequollenen, mit **14** beladenen Harz geschüttelt. Nach gründlichem Waschen mit CH₂Cl₂ wurde **15** durch zweimaliges Schütteln mit 10 Vol.-% TFA und 5 Vol.-% Triisopropylsilan (TIS) in CH₂Cl₂ für 5 Minuten vom Harz abgespalten. Die vereinigten Abspalllösungen wurden mit Toluol versetzt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Flash-Chromatographie über Kieselgel mit EtOAc/MeOH (5:1, v/v) lieferte 560 mg **15** (62 % bezogen auf Prolin-beladenes Harz). Die Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum wurde durch H-H-COSY-Spektren bewerkstelligt.

C₃₉H₆₅N₉O₁₁S₂ (900.1). ¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ= 0.95 (dd, 6H, J=10.0, 6.5 Hz, δ-Leu), 1.07-1.12 (m, 3H, β-, γ-Leu), 1.37-1.75 (m, 12H, 6*CH₂-Kette), 2.05-2.12 (m, 4H, γ-Pro, γ-Met), 2.10 (s, 3H, CH₃-Met), 2.17-2.33 (m, 6H, 2*CH₂C=O Biot-Aca, β-Pro), 2.48-2.65 (m, 2H, δ-Pro), 2.73 (d, 1H, J= 12.7 Hz, S-CH₂-biot), 2.95 (dd, 1H, J= 12.7, 5.1 Hz, S-CH₂-biot), 3.15-3.26 (m, 3H, S-CH-biot, N-CH₂ Aca), 3.60-3.68 (m, 1H, β-Ser), 3.75-3.84 (m, 2H, α-Gly), 3.85-3.98 (m, 4H, α-Gly, β'-Ser), 4.24 (dd, 1H, J=7.6, 4.5 Hz, N-CH-biot), 4.30-4.38 (m, 3H, α-Ser, α-Pro, N-CH-biot), 4.42 (dd, 1H, J= 7.4, 5.0 Hz, α-Met), 4.63 (dd, 1H, J=9.8, 4.2 Hz, α-Leu); HPLC (C18, P45): t_R=20.79 min, Reinheit > 95 %; MALDI-TOF-MS: 923.03 [M+Na]⁺; HR-FAB-MS: ber. für C₃₉H₆₆N₉O₁₁S₂ [M+H]⁺ 900.4323, gef. 900.4323.

Darstellung von S-Farnesyl-Cysteinmethylester (16)

Zu 330 mg Cysteinmethylester-hydrochlorid (2 mmol) in 5 mL abs. DMF werden unter Eiskühlung 500 mg Farnesylbromid (2 mmol, 1.0 Äq.) und 1.05 mL DIEA (6 mmol, 780 mg, 3 Äq.) getropft und 30 Min bei 0°C gerührt. Die Lösung wird mit 20 mL EtOAc verdünnt, 3 Mal mit NaHCO₃ gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v:v) gereinigt. Ausbeute: 341 mg (1.0 mmol, 50 %) eines klaren, farblosen Öls. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[148]

C₂₀H₃₅NO₂S (353.6) .R_f=0.22 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, v:v); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.59 (s, 6H), 1.665 (s, 3H), 1.674 (s, 3H), 1.83 (bs, 3H), 1.94-2.01 (m, 8H), 2.68 (dd, 1H, J= 13.6, 7.7 Hz), 2.89 (dd, 1H, J= 13.6, 4.5 Hz), 3.14-3.20 (m, 2H), 3.65 (dd, 1H, J= 7.7, 4.5 Hz), 3.74 (s, 3H), 5.05-5.11 (m, 2H), 5.23 (t, 1H, J= 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100.6 MHz): δ= 16.3, 16.4, 17.9, 25.9 (alle +), 26.6, 26.9, 30.1, 36.5, 39.9 (alle -), 52.4, 54.5, 120.1, 124.0, 124.5 (alle +), 131.6, 135.6, 139.9, 174.7 (alle o).

Darstellung von Biot-Aca-GSMGLPC(Far)-OMe (13a)

Die Fragmentkondensation von 52.5 mg **15** (58.2 µmol) mit 21.8 mg Cys(Far)-OMe (**16**, 64 µmol, 1.1 Äq.) wurde durchgeführt wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben (vgl. Kap. 6.2.1.5: Versuche zu Kapitel 4.1.2.3: Fragmentkondensation). Nach extraktiver Aufarbeitung wurde das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/MeOH (10:1, v:v) aufgereinigt. Ausbeute: 42 mg **13a** (34.3 µmol, 60 %) als amorphes, farbloses Wachs. Die Zuordnung der Signale im ¹H-Spektrum erfolgte durch H-H-COSY-Spektroskopie.

C₅₈H₉₆N₁₀O₁₂S₃ (1221.6). R_f = 0.15 (EtOAc:MeOH 5:1); [α]_D²⁰ = -36.5° (c=4.03, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, MeOD): 0.85-0.89 (m, 6H, δ-Leu), 1.25-1.65 (m, 17H, 3*CH₂-Aca, 3*CH₂-Biot, β-, γ-Leu, γ-Pro), 1.50 (s, 3H, CH₃-Far), 1.51 (s, 3H, CH₃-Far), 1.57 (s, 3H, CH₃-Far), 1.59 (s, 3H, CH₃-Far), 1.85-2.22 (m, 18H, 4*CH₂-Far, 2* CH₂CO, β-Pro, β-, γ-, Met,), 2.02 (s, 3H, CH₃-Met), 2.39-2.45 (m, 1H, δ-Pro), 2.46-2.56 (m, 1H, δ'-Pro), 2.62-2.65 (m, 1H, SCH₂-Biot), 2.67 (dd, 1H, J= 13.8, 8.0 Hz, β-Cys), 2.81-2.87 (m, 2H, SCH₂'-Biot, β'-Cys), 3.01-3.17 (m, 5H, N-CH₂-Aca, S-CH-Biot, S-CH₂-Far), 3.52-3.57 (m, 1H, NH-Biot), 3.60-3.90 (m, 7H, β-Ser, 2*α-Gly, NH'-Biot), 3.64 (s, 3H, OMe), 4.23 (dd, 1H, J= 7.8, 4.5 Hz, CH-N-Biot), 3.28-4.33 (m, 2H, α-Ser, α-Pro), 4.38-4.49 (m, 3H, CH-N-Biot, α-Cys, α-Met), 4.61 (dd, 1H, J=10.3, 4.0 Hz, α-Leu), 4.98-5.03 (m, 2H, 2*=CH-Far), 5.11 (t, 1H, J= 8.1 Hz,

=CH-Far); HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R = 23.07 Min, Reinheit 97 %, 1221.4 [M+H]⁺; HR-FAB-MS (NBA): ber. für C₅₈H₉₆O₁₂N₁₀S₃Na [M+Na]⁺ 1243.6269, gef. 1243.6202.

Darstellung von Biot-Aca-GSMGLPC(8-(4-benzoylphenoxy)-geranyl)-OMe (13bpt)

Die Fragmentkondensation von 50.8 mg **15** (56.5 μmol) mit 26.4 mg **7bpt** (56.5 μmol, 1.0 Äq.) wurde durchgeführt wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben (vgl. Kap. 6.2.1.5: Versuche zu Kapitel 4.1.2.3: Fragmentkondensation). Nach extraktiver Aufarbeitung wurde das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie mit EtOAc/MeOH (5:1, v:v) aufgereinigt. Ausbeute: 44 mg **13bpt** (32.6 μmol, 58 %) als amorphes, farbloses Wachs.

C₆₆H₉₆N₁₀O₁₄S₃ (1349.7). R_f = 0.15 (EtOAc:MeOH 5:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -36.0° (c=2.16, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, MeOD), δ = 0.94 (dd, 6H, J = 5.8, 5.5 Hz); 1.33-1.76 (m, 13H), 1.69 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.95-2.28 (m, 12H), 2.07 (s, 3H), 2.44-2.64 (m, 2H), 2.67-2.73 (m, 1H), 2.85-2.93 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 4H), 3.59-3.94 (m, 5H), 3.70 (s, 3H), 3.87 (s, 2H), 4.29 (dd, 1H, J = 8.9, 4.5 Hz), 4.36-4.43 (m, 2H), 4.45-4.56 (m, 4H), 4.67-4.73 (m, 1H), 5.21 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 5.57 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 7.03 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.51 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 7.59-7.63 (m, 1H), 7.70-7.79 (m, 4H), 8.20-8.40 (m, 2H); HPLC-ESI-MS (P45): t_R = 25.72 Min, Reinheit 99 %, 1349.5 [M+H]⁺; HR-FAB-MS (NBA): ber. für C₆₆H₉₆O₁₄N₁₀S₃ [M]⁺ 1348.6270, gef. 1348.6260.

Darstellung von Methoxyethoxyethoxyacetyl-GSMGLP-OH (18)

Die Anknüpfung der Ethylenglykolkette wird durch Kupplung des mit **14** beladenen Harzes mit 4.0 Äq. Methoxyethoxyethoxyessigsäure, 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBt und 16 Äq. DIEA in DMF für 2 h bewerkstelligt. Nach gründlichem Waschen mit CH₂Cl₂ wird **18** durch zweimaliges Schütteln mit 10 Vol.-% TFA in CH₂Cl₂ für 5 Minuten vom Harz abgespalten. Die vereinigten Abspalllösungen werden mit Toluol versetzt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird auf eine mit MeOH gewaschene, mit Wasser vorkonditionierte C18-funktionalisierte Sep-Pac-Kartusche gegeben und mit Wasser und 10% MeCN in Wasser eluiert. Erhalten werden 118 mg (61 %) eines weißen, wachsartigen Feststoffs. Die Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum wurde durch H-H-COSY-Spektren bewerkstelligt. Eine Quantifizierung der Reinheit war nicht möglich, da die Substanz nur eine sehr schwache Absorption im Messbereich des PDA-Detektors aufweist.

C₃₀H₅₂N₆O₁₂S (720.8). R_f = 0.19 (EtOAc:MeOH 2:1); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.92 (dd, 6H, J = 6.4, 2.4 Hz, δ-Leu), 1.40-1.47 (m, 1H, β-Leu), 1.60-1.72 (m, 2H, β', γ-Leu), 2.03-

2.10 (m, 7H, β -Pro, β -, γ -, δ -Met), 2.14-2.22 (m, 1H, β' -Pro), 2.25-2.31 (m, 1H, β' -Met), 2.39-2.57 (m, 2H, γ -Pro), 2.90-3.05 (m, 2H, δ -Pro), 3.37 (s, 2H, O-CH₂C=O), 3.42-3.50 (m, 2H, β -Ser), 3.58 (s, 3H, OMe), 3.62-3.85 (m, 8H, 2* α -Gly, 3*O-CH₂), 3.92-3.96 (m, 1H, α -Ser), 3.98-4.07 (m, 5H, δ' -Leu, 2* α' -Gly, O-CH₂), 4.33-4.39 (m, 1H, α -Met), 4.42-4.48 (m, 1H, α -Pro), 4.67-4.72 (m, 1H, α -Leu), 7.48-7.62 (m, 1H, NH-Leu), 7.68-7.80 (m, 2H, 2*NH-Gly), 7.86-8.07 (m, NH-Met, -Pro, -Ser). HPLC-ESI-MS (C18, P45): t_R =4.0-9.0 min, 721.2 [M+H]⁺, 743.4 [M+Na]⁺.

Darstellung von Methoxyethoxyethoxyacetyl-GSMGLPC(Far)-OMe (17)

Zur Kupplung werden 36.4 mg **18** (50 μ mol) über Nacht mit 12.5 mg EDC (65 μ mol, 1.3 Äq.), 11.5 mg HOBT (75 μ mol, 1.5 Äq.) und 15.7 mg **16** (75 μ mol, 1.5 Äq.) in 2 mL CH₂Cl₂ gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt in wenig Wasser auf eine mit MeOH gewaschene, mit Wasser vorkonditionierte C18-funktionalisierte Sep-Pac-Kartusche gegeben und mit 5 mL Wasser gewaschen um nicht umgesetztes Edukt abzutrennen. Durch Steigerung des MeCN-Anteils in 10-Vol.-%-Schritten wurde das Produkt schrittweise eluiert, dabei wurden Fraktionen von 3 mL gesammelt. Das Produkt wurde bei einem MeCN-Anteil von 40 % erhalten. Erhalten wurden 11 mg **17** (10.5 μ mol, 21 %) als farbloses Öl. Die Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum wurde durch H-H-COSY-Spektren bewerkstelligt.

C₄₉H₈₃N₇O₁₃S₂ (1042.4). R_f = 0.57 (EtOAc:MeOH 2:1); $[\alpha]_D^{20}$ = -51.3° (c =3.83, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): δ = 0.94 (dd, 6H, J =10.0, 4.6 Hz, δ -Leu), 1.43-1.51 (m, 1H, β -Leu), 1.61 (s, 6H, 2*CH₃-Far), 1.68 (s, 6H, 2*CH₃-Far), 1.60-1.75 (m, 2H, β' -, γ -Leu), 1.92-2.13 (m, 15H, 4*CH₂-Far, β -Pro, β -, γ -, δ -Met), 2.16-2.38 (m, 4H, β' -Pro, β' -Met, γ -Pro), 2.55 (s, 2H, SCH₂), 2.74 (dd, 1H, J = 13.7, 6.8 Hz, β -Cys), 2.96 (dd, 1H, J = 13.7, 4.5 Hz, β' -Cys), 3.09 (dd, 1H, J = 13.7, 7.6 Hz, δ -Pro), 3.20 (dd, 1H, J = 13.7, 8.6 Hz, δ' -Pro), 3.32 (s, 2H, O-CH₂C=O), 3.50-3.54 (m, 2H, OCH₂), 3.57-3.72 (m, 11H, β -Ser, 3*OCH₂, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.85-4.03 (m, 4H, 2* α -Gly), 4.25-4.35 (m, 2H, α -Ser, α -Pro), 4.48-4.51 (m, 1H, α -Met), 4.52-4.58 (m, 1H, α -Cys), 4.67-4.75 (m, 1H, α -Leu), 5.08-5.15 (m, 2H, 2*=CH), 5.21 (t, 1H, J = 7.2 Hz, =CH), 7.10-7.22 (m, 1H, NH-Leu), 7.28-7.32 (m, 1H, NH-Cys), 7.40-7.45 (m, 3H, NH-Met, -Gly, -Ser), 7.81-7.92 (m, 2H, NH-Gly, -Pro); HPLC-ESI-MS (C18, P45): t_R =26.47 min, Reinheit 52%, 1042.2 [M+H]⁺, 1064.7 [M+Na]⁺ neben 21 % oxidiertem Material (t_R = 25.22, M+16) und 16 % doppelt oxidiertem Material (t_R = 23.69, M+32). HR-FAB-MS (NBA): ber. für C₄₉H₈₄O₁₃N₇S₂ [M+H]⁺ 1042.5568, gef. 1042.5581.

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3: Synthese und Untersuchung von *N-Ras-D-Peptiden*

Darstellung von MIC-G-D-C-D-MG-D-L-D-P-OH (20)

Die Darstellung des D-konfigurierten Peptids **20** erfolgte analog der des L-Enantiomers **8** (vgl. Kap. 6.2.1.4: Versuche zu Kapitel 4.1.2.2: Festphasengestützte Synthese der Peptidfragmente). Nach flashchromatographischer Reinigung mit EtOAc:MeOH (5:1, v:v) wurden 108 mg **20** (25 %) erhalten.

C₃₇H₅₉N₇O₁₀S₃ (858.1). R_f= 0.08 (EtOAc:MeOH 5:1, v:v); [α]_D²⁰ = +7.7° (c=7.53, MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.84-0.92 (m, 6H), 1.10-1.35 (m, 11H), 1.35-1.65, (m, 7H), 1.90-2.28 (m, 11H), 2.40-2.51 (m, 2H), 3.05-3.13 (m, 2H), 3.42-3.47 (m, 2H), 3.56-3.64 (m, 2H), 3.70-4.10 (m, 5H), 4.30-4.40 (m, 2H), 4.81-4.88 (m, 1H), 6.62 (s, 2H); HPLC-ESI-MS (C18, P45): t_R= 19.87 Min, Reinheit 92 %, 858.2 [M+H]⁺, 880.2 [M+Na]⁺.

Darstellung von S-Farnesyl-D-Cysteinmethylester (21)

Zu 219 mg D-Cysteinmethylester-hydrochlorid (1.25 mmol, 1.25 Äq.) in 5 mL abs. DMF werden unter Eiskühlung 248 mg Farnesylbromid (1 mmol, 1.0 Äq.) und 0.58 mL DIEA (3 mmol, 390 mg, 3 Äq.) getropft und 30 Min bei 0°C gerührt. Die Lösung wird mit 20 mL EtOAc verdünnt, 3 Mal mit NaHCO₃ gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit Cyclohexan/EtOAc (1:1, v:v) gereinigt. Ausbeute: 170 mg (0.5 mmol, 50 %) eines klaren, farblosen Öls.

C₂₀H₃₅NO₂S (353.6). R_f=0.22 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, v:v); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.59 (s, 6H), 1.656 (s, 3H), 1.659 (s, 3H), 1.72 (bs, 3H), 1.94-2.10 (m, 8H), 2.67 (dd, 1H, J= 13.6, 7.6 Hz), 2.89 (dd, 1H, J= 13.6, 4.8 Hz), 3.11-3.24 (m, 2H), 3.62 (dd, 1H, J= 7.6, 4.8 Hz), 3.73 (s, 3H), 5.05-5.11 (m, 2H), 5.22 (t, 1H, J= 7.6 Hz); ¹³C-NMR (100.6 MHz): δ= 16.2, 16.3, 17.9, 25.9 (alle +), 26.6, 26.9, 30.1, 36.6, 39.9 (alle -), 52.4, 54.5, 120.2, 124.0, 124.5 (alle +), 131.5, 135.6, 139.8, 174.7 (alle o).

Darstellung von MIC-G-D-C-D-MG-D-L-D-P-DC(Far)-OMe (22)

Die Fragmentkondensation wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift mit 25.4 mg **20** (30 μmol), 12.6 mg **21** (37 μmol, 1.25Äq.), 7.5 mg EDC (39 μmol, 1.3 Äq.) und 7.5 mg HOBt (48 μmol, 1.6 Äq.) durchgeführt. Chromatographie mit EtOAc:MeOH (5:1, v:v) ergab 16.7

mg **22** (14.1 μmol , 47 %) als farbloses Öl. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch H-H-COSY-Spektren.

$\text{C}_{56}\text{H}_{90}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_4$ (1179.6) $R_f = 0.19$ (EtOAc:MeOH 5:1, $v:v$); $[\alpha]_D^{20} = +48.1^\circ$ ($c=1.53$, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.85\text{-}0.90$ (m, 6H, δ -Leu), 1.05 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-MIC}$), 1.26 (s, 9H, $t\text{-Bu}$), 1.35-1.70 (m, 9H, γ -Pro, β -, γ -Leu, $2^*\text{CH}_2\text{-MIC}$), 1.53 (s, 6H, $2^*\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.59 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.61 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Far}$), 1.86-2.03 (m, 16H, $4^*\text{CH}_2\text{-Far}$, β -, γ -, $\text{CH}_3\text{-Met}$, β -Pro), 2.12-2.21 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CO}$, β' -Pro), 2.45-2.63 (m, 3H, β -Cys, $\beta\text{-Cys}'$), 2.80-3.02 (m, 3H, S-CH_2 , β' -Cys, δ -Pro), 2.06-3.14 (m, 1H, δ' -Pro), 3.42-3.46 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-MIC}$), 3.50-3.89 (m, 7H, OCH_3 , $2^*\alpha\text{-Gly}$), 4.20-4.28 (m, 2H, $\alpha\text{-Met}$, $\alpha\text{-Cys}$), 4.50-4.75 (m, 3H, $\alpha\text{-Pro}$, $\alpha\text{-Cys}'$, $\alpha\text{-Leu}$), 4.97-5.03 (m, 2H, $2^*=\text{CH-Far}$), 5.11 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, $=\text{CH-Far}$), 6.20 (s, 2H, $=\text{CH-MIC}$); HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 30.91$ Min, Reinheit 85 %, 1179.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1201.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Darstellung von H-D-C(*StBu*)-D-MG-D-L-D-P-D-C(*StBu*)-D-V-D-V-D-M-OH(23)

Die Beladung von 2-Chlorotrylchlorid-Polystyrolharz (Cl-Beladung 1.08 mmol/g) erfolgte durch Schütteln mit 1.2 Äq. Fmoc-Methionin und 4.8 Äq. DIEA in 5 mL abs. CH_2Cl_2 im ausgeheizten Schüttelreaktor. Unreagierte Chlorfunktionalitäten wurden durch anschließende 30-minütige Behandlung mit MeOH und DIEA in CH_2Cl_2 blockiert. Die Beladung des Harzes wurde anschließend zu 0.6 mmol/g bestimmt. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte die *N*-terminale Verlängerung zum Peptid **23** mit dem folgenden Protokoll:

Ankupplung der Fmoc-Aminosäuren (4.0 Äq.) mit 3.6 Äq. HBTU, 4.8 Äq. HOBT, 8 Äq. DIEA in DMF für 90 Min. nach 5-minütiger Voraktivierung unter Argon; Capping durch zweimaliges Behandeln mit 10 Vol.-% Acetanhydrid in Pyridin für jeweils 5 Minuten; Abspaltung der Fmoc-Gruppen durch zweimaliges Behandeln mit 20 Vol.-% Piperidin in DMF für jeweils 10 Minuten. Zwischen allen Schritten wurde das Harz jeweils gründlich mit DMF gewaschen.

Das Endprodukt wurde mit 10 Vol.-% TFA in CH_2Cl_2 vom Harz abgespalten, mit Toluol coevaporiert und über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 gereinigt. Erhalten wurden 46.5 mg (30 %) eines weißen Feststoffs.

$\text{C}_{47}\text{H}_{85}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_6$ (1128.6). $[\alpha]_D^{20} = +84.6^\circ$ ($c=2.65$, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 0.75-0.84 (m, 18H), 1.12-1.36 (m, 5H), 1.20 (s, 9H), 1.24 (s, 9H), 1.46-1.58 (m, 2H), 1.65-1.77 (m, 1H), 1.8-2.2 (m, 11H), 2.34-2.56 (m, 4H), 2.96-3.12 (m, 4H), 3.90-4.06 (m, 4H), 4.13-4.21 (m, 2H), 4.25-4.45 (m, 4H), 4.53-4.76 (m, 3H); HPLC-ESI-MS (C18, P15): $t_R =$

7.04 min, Reinheit 90 %, 1128.3 $[M+H]^+$. HR-FAB-MS (NBA): ber. für $C_{47}H_{86}O_{10}N_9S_6$ $[M+H]^+$ 1128.4822, gef. 1128.4823.

6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4: Fluoreszierende Peptide

6.2.3.1 Versuche zu Kapitel 4.1.4.1: Synthese von Fmoc-D-Cys(Far)OH und BODIPY FL Darstellung von Fmoc-D-Cys(Far)-OH (25)

Zur Suspension von 685 mg Fmoc-D-Cystin (1 mmol) und 771 mg DTT (5 mmol, 5 Äq.) in CH_2Cl_2 wird unter Eiskühlung 279 μL NEt_3 (2.1 mmol, 292 mg, 2.1 Äq.) zugegeben und 45 Min. bei RT gerührt. Nach dreimaligem Waschen mit 1N HCl wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 15 mL 2N NH_3 in MeOH aufgenommen und tropfenweise mit 496 mg Farnesylbromid (2 mmol, 2 Äq.) versetzt. Nach 1.5 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Flash-chromatographie gereinigt. Ausbeute: 493 mg (0.90 mmol, 45 %) eines farblosen Öls. Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.^[153]

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.50 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.86-2.01 (m, 8H), 2.83-2.95 (m, 2H), 3.08-3.16 (m, 2H), 3.63-3.68 (m, 1H), 4.14 (t, 7.0 Hz), 4.28-4.33 (m, 2H), 4.98-5.03 (m, 2H), 5.11-5.15 (m, 1H), 7.14-7.30 (m, 4H), 7.48-7.52 (m, 2H), 7.65-7.69 (m, 2H).

Darstellung von 3-(1H-Pyrrol-2-yl)-acrylsäuremethylester (28)

Zu einer Lösung von 6.69 g (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (**27**, 0.020 mol; 2 Äq.) in 30 ml abs. CH_2Cl_2 werden bei Raumtemperatur 0.95 g 1H-Pyrrol-2-carbaldehyd (0.010 mol; 1 Äq.) in 25 ml abs. CH_2Cl_2 zugegeben und über Nacht gerührt. Der Ansatz wird zwischen je 50 ml Wasser und Ether verteilt und die organische Phase dreimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 ml Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) digeriert, der ausgefallene weiße Feststoff abfiltriert und das Filtrat aufkonzentriert und durch Flash-Chromatographie an SiO_2 gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v)). Ausbeute: 1.28 g (0.085 mol, 85%) eines farblosen Öls.

$C_8H_9NO_2$ (151.2). $R_f = 0.5$ (Cyclohexan/EtOAc = 4:1(v/v)); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.55$ (d, $J = 16$ Hz, 1H, $CH=CHCO_2Me$), 6.91 (m, 1H, C_5 -Pyrrol-H), 6.56 (m, 1H, C_4 -Pyrrol-H), 6.28 (m, 1H, C_3 -Pyrrol-H), 5.99 (d, $J = 16$ Hz, 1H, $CH=CHCO_2Me$), 3.77 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C -NMR (100.6 MHz): $\delta = 167.8$ (C=O, Ester), 134.2 ($CH=CHCO_2Me$), 128.2 ($CH=CHCO_2Me$),

122.3 ($C_{\text{Pyrrol-CH=CH}}$), 114.4 ($C_5\text{-Pyrrol}$), 110.9 ($C_4\text{-Pyrrol}$), 110.7 ($C_3\text{-Pyrrol}$). HR-FAB-MS (NBA): ber. für $C_8H_9NO_2$: 152.0712 $[M+H]^+$, gef.: 152.0683.

Darstellung von 3-(*1H*-Pyrrol-2-yl)-propionsäuremethylester (**29**)

Zu 1.0 g **28** (6.6 mmol) in 50 ml Methanol werden 0.5 ml Eisessig und eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (10%) zugesetzt und die resultierende Suspension unter einer Wasserstoffatmosphäre für 2 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Danach wird der Katalysator über Celite abfiltriert, mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.01 g **29** (6.6 mmol, 99%) als braunes Öl.

$C_8H_{11}NO_2$ (153.2). R_f -Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v)); 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.67 (m, 1H, $C_5\text{-Pyrrol-H}$), 6.11 (m, 1H, $C_4\text{-Pyrrol-H}$), 5.93 (m, 1H, $C_3\text{-Pyrrol-H}$), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.93 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}$), 2.65 ppm (t, $J=6.7$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}$); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 174.2 (C=O, Ester), 130.7 ($C_2\text{-Pyrrol}$), 116.6 ($C_5\text{-Pyrrol}$), 107.9 ($C_4\text{-Pyrrol}$), 105.3 ($C_3\text{-Pyrrol}$), 51.8 (OCH_3), 34.4 ($\alpha\text{-CH}_2$), 22.6 ($\beta\text{-CH}_2$).

Darstellung von 3,5-Dimethyl-*1H*-pyrrol-2-carbaldehyd (**31**)

Unter Eiskühlung werden zu 1.75 g eiskaltem DMF (1.85 ml; 0.024 mol; 1.1 Äq.) 3.68 g Phosphoroxychlorid (2.20 ml; 0.024 mol; 1.1 Äq.) gegeben und bei 0°C für fünf Minuten gerührt. Diese Lösung wird mit 12 ml 1,2-Dichlorethan verdünnt, unter Eiskühlung innerhalb von 30 Minuten tropfenweise mit einer Lösung von 2 g 2,4-Dimethylpyrrol (**30**, 2.16 ml; 0.022 mol, 1 Äq.) in 15 ml 1,2-Dichlorethan versetzt und für 15 Minuten refluxiert. Nach Abkühlen auf RT wird eine Lösung von 11.4 g (0.139 mol; 6.3 Äq.) Natriumacetat in 40 ml H_2O zugesetzt und erneut für 15 Minuten refluxiert. Nach Abkühlen auf RT wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen und über über $MgSO_4$ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte 2.65 g **31** (0.021 mol, 98 %) als grauschwarzen Feststoff. Die NMR-Spektren stimmen mit denen des gekauften Produkts (Maybridge) überein.

C_7H_9NO (125.2). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.45 (s, 1H, CHO), 5.85 (s, 1H, CH), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.31 ppm (s, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.6 (CHO), 138.7 ($C_5\text{-Pyrrol}$), 134.8 ($C_3\text{-Pyrrol}$), 128.5 ($C_2\text{-Pyrrol}$), 111.9 ($C_4\text{-Pyrrol}$), 13.2 ($C_5\text{-CH}_3$), 10.7 ($C_3\text{-CH}_3$).

Darstellung von 3-[5-(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethyl-en)-5H-pyrrol-2-yl]-propionsäuremethylester-hydrobromid (32)

Zu einer Lösung von 0.5 g 3-(1H-Pyrrol-2-yl)-propionsäure-methylester **29** (3.3 mmol) und 0.41 g 3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-carbaldehyd **31** (3.3 mmol; 1 Äq.) in 30 ml Ethanol wird unter Eiskühlung und kräftigem Rühren 48 %ige HBr-Lösung (5.3 mmol; 1.6 Äq.) zugesetzt. Nach 5 min wird der ausgefallene leuchtend rote Feststoff abfiltriert und im Feinvakuum getrocknet. Aus der Mutterlauge wird durch Stehen über Nacht im Kühlschrank ein zweites Kristallinat erhalten. Ausbeute: 0.72 g (2.1 mmol, 65 %) eines roten Feststoffs.

$C_{15}H_{19}BrN_2O_2$ (339.2). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.10 (s, 1H, $C_{3'}$ -Pyrrol-H), 7.07-7.05 (m, 1H, C_{Pyrrol} -H), 6.39-6.38 (m, 1H, C_{Pyrrol} -H), 6.23 (s, 1H, Methylen-H), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.40 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, β -CH), 2.92 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, α -CH), 2.73 (s, 1H, CH_3), 2.36 ppm (s, 1H, CH_3); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.2 (C=O, Ester), 158.8 (C-Pyrrol), 156.4 (C-Pyrrol), 148.2 (Methylen), 134.2 (C-Pyrrol), 128.2 (C-Pyrrol), 127.3 (C-Pyrrol), 124.4 (C-Pyrrol), 118.7 (C-Pyrrol), 115.5 (C-Pyrrol), 51.8 (OCH_3), 33.2 (α - CH_2), 23.8 (β - CH_2), 14.9 (CH_3), 12.3 ppm (CH_3). HR-FAB-MS (NBA): ber. für $C_{15}H_{18}N_2O_2$ $[M-HBr]^+$: 258.1368, gef.: 258.1375.

Darstellung von BODIPY FL Methylester (33)

Unter Argonatmosphäre werden 100 mg **32** (0.3 mmol) in 20 ml abs. Toluol suspendiert und bei Raumtemperatur mit 137 mg DBU (0.9 mmol; 3 Äq.) und 213 mg Bortrifluorid-etherat (188 μ L, 1.5 mmol, 5 Äq.) versetzt. Der Reaktionskolben wird für 15 Min in einem vorgeheizten Ölbad auf 90°C erhitzt. Nach Entfernen des Ölbad wird das Reaktionsgemisch vorsichtig mit 20 ml Wasser hydrolysiert, mit 100 ml Chloroform versetzt und die organische Phase fünfmal mit Wasser gewaschen. Nach dreimaliger Rückextraktion der wässrigen Phasen mit Chloroform und Trocknung über $MgSO_4$ getrocknet wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird flash-chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1 (v/v)). Ausbeute: 59 mg (0.2 mmol, 61 %) eines roten Feststoffs, dessen verdünnte Lösungen leuchtend grün fluoreszieren.

$C_{15}H_{17}BF_2N_2O_2$ (306.12). R_f = 0.52 (Cyclohexan/EtOAc = 4:1 (v/v)), 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.08 (s, 1H, $C_{3'}$ -Pyrrol-H), 6.89-6.87 (m, 1H, C_{Pyrrol} -H), 6.27-6.25 (m, 1H, C_{Pyrrol} -H), 6.11 (s, 1H, Methylen-H), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.30 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, β -CH), 2.77 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, β -CH), 2.57 (s, 1H, CH_3), 2.25 ppm (s, 1H, CH_3); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.7 (C=O, Ester), 160.2 (C-Pyrrol), 156.8 (C-Pyrrol), 143.7 (Methylen), 135.1

(C-Pyrrol), 133.1 (C-Pyrrol), 127.9 (C-Pyrrol), 123.7 (C-Pyrrol), 120.3 (C-Pyrrol), 116.5 (C-Pyrrol), 51.7 (OCH₃), 33.3 (α-CH₂), 24.1 (β-CH₂), 15.1 (CH₃), 11.4 ppm (CH₃).

Darstellung von BODIPY FLTM (34)

Zur Verseifung werden 0.24 g **33** (0.8 mmol) in 200 ml Methanol gelöst und mit 0.22 g Kaliumcarbonat (1.6 mmol; 2eq) in 50 ml Wasser versetzt. Nach 3 Tagen (dünnenschichtchromatographische Kontrolle in Dichlormethan/Methanol = 10:1 (v/v)) wird der Ansatz zwischen 100 ml Chloroform und 100 ml Wasser verteilt und die wässrige Phase fünfmal mit 100 ml Chloroform gewaschen, um nicht umgesetzten Methylester zu entfernen. Die wässrige Phase wird unter Eiskühlung durch tropfenweise Zugabe von 0.1 N HCl auf pH 3 angesäuert und fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Flashchromatographische Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH: 20:1 (v/v)) lieferte 0.18 g **34** (0.64 mmol; 80 %) als dunkelgrüne, metallisch schimmernde Kristalle.

C₁₄H₁₅BF₂N₂O₂ (292.1). R_f= 0.53 (10 Vol.-% CH₂Cl₂ in MeOH), ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.09 (s, 1H, C_{3'}-Pyrrol-H), 6.89-6.87 (m, 1H, C_{Pyrrol}-H), 6.29-6.28 (m, 1H, C_{Pyrrol}-H), 6.12 (s, 1H, Methylen-H), 3.31 (t, ³J=7.4 Hz, 2H, β-CH), 2.83 (t, ³J=7.4 Hz, 2H, β-CH), 2.57 (s, 1H, CH₃), 2.26 ppm (s, 1H, CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 174.9 (COOH), 160.1 (C-Pyrrol), 157.1 (C-Pyrrol), 147.5 (C-Pyrrol), 144.5 (Methylen), 135.3 (C-Pyrrol), 128.3 (C-Pyrrol), 128.4 (C-Pyrrol), 124.6 (C-Pyrrol), 120.1 (C-Pyrrol), 116.5 (C-Pyrrol), 51.7 (OCH₃), 33.0 (α-CH₂), 24.0 (β-CH₂), 13.9 (CH₃), 10.3 (CH₃); HR-EI-MS: ber. für C₁₄H₁₅BF₂N₂O₂: 292.0890 [M]⁺, gef.: 292.1171.

6.2.3.2 Versuche zu Kapitel 4.1.4.2: Synthese des BODIPY-markierten farnesylierten D-Peptids 24

Synthese von MIC-G-D-C(S^tBu)-D-MG-D-L-D-P-D-C(Far)HNC₂H₄NH₂ (34)

Die Darstellung des Peptids erfolgte ausgehend von Ethylen-diamin-funktionalisiertem Methyltritylharz der Beladung 0.6 mmol/g. Die Ankupplung der Fmoc-Aminosäuren (4.0 Äq.) erfolgte mit 3.6 Äq HBTU, 4.8 Äq. HOBt, 8 Äq. DIEA in DMF für 90 Min. nach 5-minütiger Voraktivierung unter Argon; Abspaltung der Fmoc-Gruppen durch zweimaliges Behandeln mit 20 Vol.-% Piperidin in DMF für jeweils 10 Minuten. Zwischen allen Schritten wurde das Harz jeweils gründlich mit DMF gewaschen.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch Behandeln mit 1 Vol.-% TFA in CH₂Cl₂ für 10 Min., nach Coevaporieren mit TFA wurden 109 mg **34** (38 %) erhalten, das in die nachfolgende Veresterung roh eingesetzt wurde. C₅₇H₉₄N₁₀O₁₀S₄ (1207.7). $[\alpha]_D^{20} = +48.1^\circ$ ($c=1.53$, MeOH), HR-FAB-MS (NBA): ber. für C₅₇H₉₅O₁₀N₁₀S₄ 1207.6116, gef. 1207.6133.

Synthese von MIC-G-D-C(*S*/Bu)-D-MG-D-L-D-P-D-C(Far)HNC₂H₄NH-BODIPY FL (**24**)

Die Ankupplung von 9.2 mg BODIPY FL (31.5 μmol, 2.0 Äq.) an 19 mg **34** (15.7 μmol) erfolgte unter Aktivierung mit 40.9 μmol EDC (2.6 Äq.) und 47.2 μmol HOBt (3.0 Äq.). Nach 6 Tagen wurde die Reaktionsmischung mit CH₂Cl₂ verdünnt, mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte über Flashchromatographie und präparative HPLC. Erhalten wurden 6.0 mg **24** (4.05 μmol, 26 %) als tiefroter Feststoff.

C₇₁H₁₀₇BF₂N₁₂O₁₁S₄ (1481.7). R_f = 0.39 (EtOAc/MeOH 10:1); 0.86-0.90 (m, 6H), 1.18-1.40 (m, 15H, 3*CH₂-MIC, *t*-Bu), 1.45-1.63 (m, 19H, 4*CH₃-Far, β-,γ-Leu), 1.86-2.20 (m, 19H, β-,γ-Pro, γ-, CH₃-Met, CH₂CO-MIC, 4*CH₂-Far), 2.28-2.32 (m, 2H, CH₂-BODIPY), 2.47 (s, 3H, CH₃-BODIPY), 2.56 (s, 3H, CH₃-BODIPY), 2.80-2.85 (m, 2H, SCH₂), 3.05-3.60 (m, 16H, 2*β-CH₂ Cys, CH₂ BODIPY FL, NH-CH₂-CH₂NH, 2*α-Gly, δ-Pro), 4.20-4.60 (m, 5H, 2*α-Cys, α-Met, α-Pro, α-Leu), 4.97-5.04 (m, 2H, =CH-Far), 5.18-5.22 (m, 1H, =CH-Far), 6.08 (s, 1H, H_{Pyrrrol}), 6.23 (m, 1H, H_{Pyrrrol}), 6.65 (s, 2H, =CH-MIC), 6.82-6.87 (m, 1H, H_{Pyrrrol}), 7.09 (s, 1H, H_{Pyrrrol}); HPLC-ESI-MS (C4, P15): t_R = 10.30 min, Reinheit 85 %, 1481.5 [M+H]⁺.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.2: Enzymatische Entschüttung von Phenylhydraziden

6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1: Isolierung und Aufreinigung der Tyrosinase

2 kg Champignons (Kappen noch geschlossen) werden geviertelt, in flüssigem N₂ eingefroren und in einem Waring Blender in insgesamt 3 L Aceton homogenisiert. Das Pellet nach Zentrifugation (GSA-Rotor, 7000 U/min, 20 min) wird erneut in fl. N₂ tiefgefroren und in 1.5 L Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, vor der Benutzung für 1 h mit 15 g PVPP behandelt), suspendiert. Über Nacht wird bei 2 °C gerührt und N₂ durch die Lösung geleitet, um verbliebenes Aceton auszutreiben.

Der Überstand nach Abzentrifugieren (10000 U, 40 Min) wird bei 2 °C mit 236 g (NH₄)₂SO₄ 30 Min gerührt, erneut 40 Min zentrifugiert (10000 U) und das Pellet verworfen. Der Überstand wird mit weiteren 268 g (NH₄)₂SO₄ versetzt und 30 Min gerührt, das ausgefallene Enzym wird abzentrifugiert (8000 U, 40 Min), in 150 mL Wasser gelöst und über Nacht bei 2 °C gegen Wasser dialysiert. Das Rohenzym wird lyophilisiert.

Erhalten werden 5.37 g Lyophilisat mit einer Aktivität von 420 U /mg.

6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2: Charakterisierung der Enzympräparation

6.3.2.1 Verwendete Assays

Dopachrom-Assay

Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die in einer 10 mM Lösung von L-Dopa in 50 mM Phosphatpuffer in 1 Minute 1 µmol Dopachrom erzeugt. Die Aktivität wird bestimmt durch Beobachtung der Absorptionzunahme bei 475 nm ($\epsilon_{475\text{nm}} = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Tyrosin-Assay

Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die in einer Tyrosin-Lösung bei pH 6.5 pro Minute eine Absorptionzunahme bei 280 nm um 0.001 bewirkt.

Zunächst wird die Reaktionslösung aus 9.0 mL bidest. H₂O, 10 mL 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 und 10 mL 1 mM L-Tyrosin in bidest. H₂O hergestellt. Zur Aktivitätsbestimmung werden 2.90 mL Reaktionslösung 5 Min. mit O₂ equilibriert und in einer Quartz-Küvette mit 0.1 mL Tyrosinase-Lösung (500-1000 U/mL in Phosphatpuffer) gemischt. Anschließend wird A_{280nm} für 10 Minuten beobachtet. Zur Bestimmung wird der maximale $\Delta A_{280\text{nm}}/\text{min}$

herangezogen. Die tatsächlichen Konzentrationen im Assay sind: Phosphat: 18 mM, Tyrosin: 0.3 mM, Tyrosinase: 50-100 U.

Syringaldazin-Assay

Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die in einer Syringaldazin-Lösung bei pH 6.5 pro Minute eine Absorptionszunahme bei 530 nm um 0.001 bewirkt.

Zur Aktivitätsbestimmung werden 2.20 mL 100 mM Phosphatpuffer mit 0.5 mL Laccaselösung (25-50 U/mL in bidest. H₂O) gemischt und im Spektrometer equilibriert. Anschließend werden 0.3 mL einer 0.216 mM Lösung von Syringaldazin in abs. MeOH zugegeben, geschüttelt und A_{530nm} für 10 Minuten beobachtet. Zur Bestimmung wird der maximale $\Delta A_{530nm}/min$ herangezogen. Die tatsächlichen Konzentrationen im Assay sind: Phosphat: 0.73 mM, Syringaldazin: 0.02 mM, Methanol: 10Vol.-%, Laccase: 12.5-25 U.

6.3.2.2 Versuche zu Kapitel 4.2.2.3: Bestimmung des Laccasegehalts

Bestimmung der Laccase-Aktivität

Das Syringaldazin-Assay wird für kommerzielle Laccase als positiv-Kontrolle und für die Tyrosinasepräparation durchgeführt. Für die Tyrosinaseprobe wird kein Anstieg der Absorption beobachtet. Zudem werden nach 1h, 3h und 24 h UV-Spektren gemessen; die Tyrosinase-Probe zeigte in keinem Fall das Absorptionsmaximum bei 530 nm.

Quantifizierung der Assay-Empfindlichkeit

Puffer: 100 mM Phosphatpuffer pH 6.5

Laccase: 1.08 mg Laccase in 1 mL Puffer

Tyrosinase A: 1.39 mg Tyrosinase in 1 mL Puffer

Tyrosinase B: 5.24 mg Tyrosinase in 1 mL Puffer

Substrat: 0.216 mM Syringaldazin in MeOH

	Neg.-Kontrolle	LAC	1:1	1:4	1:20	TYR
Puffer	2.7 mL	2.2mL	2.2 mL	2.2 mL	2.2 mL	2.2 mL
Laccase	-	0.5 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	-
Tyrosinase	-	-	0.1 mL A	0.4 mL A	0.4 mL B	0.5 mL B
Subtrat	0.3 mL	0.3 mL	0.3 mL	0.3 mL	0.3 mL	0.3 mL
t _{max}	-	0 Min	35 Min	42 Min	120 Min	120-180 Min

Die Proben wurden über 3 h UV-spektroskopisch vermessen, Abbildung siehe vorne.

6.3.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3: Entschützung von Phenylhydraziden mit Tyrosinase

6.3.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.3.1: Synthese der Substrate

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese *N*-terminal geschützter Phenylhydrazide

Phenylhydrazin (1.1 Äq., bei Fmoc-Aminosäuren 0.9 Äq.) wird bei 0 °C zu einer Lösung von 1.0 Äq. der Aminosäure, 1.2 Äq. Carbodiimid und 1.4 Äq. HOBt in CH₂Cl₂ (5 mL/mmol) gegeben. Nach 1 h wird die Mischung auf RT erwärmt und unter DC-Kontrolle gerührt, bis die Umsetzung vollständig ist. Die Lösung wird je drei Mal mit 1 N HCl, ges. wässriger NaHCO₃ und NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung von Dipeptid-Phenylhydraziden

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt durch Rühren mit TFA für 30 Min. Überschüssige TFA wird im Vakuum entfernt. Die so gebildeten TFA-Salze werden direkt weiter eingesetzt. Das TFA-Salz wird mit 1.5 Äq. DIEA in CH₂Cl₂ (3-5 mL/mmol) gelöst und bei 0 °C zu 1.0 Äq. der freien Carbonsäure, 1.2 Äq. Carbodiimid und 1.4 Äq. HOBt in CH₂Cl₂ (5-10 mL/mmol) gegeben. Nach 1 h wird das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und gerührt, bis die Reaktion vollständig ist (DC-Kontrolle). Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung je drei Mal mit 1N HCl, ges. wässriger NaHCO₃ und NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Darstellung von Boc-Gly-NHNHPh (41)

Ausgehend von 5.0 mmol Boc-Gly-OH wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben. Flash-Chromatographie (Cyclohexan/EtOAc 7:3) ergab 1.12 g **41** (4.2 mmol, 84%) als weißen Feststoff.

C₁₃H₁₉N₃O₃ (265.3). F: 121 °C, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) 1.44 (s, 9H), 3.82 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.68-7.26 (m, 5H), 8.57 (s, 1H), ¹³C-NMR (100 MHz) 28.3 (+, 3C), 43.1 (-), 80.5 (o), 113.4 (+, 2C), 121.0 (+), 129.1 (+, 2C), 147.6, 156.4, 170.1 (alle o). M ber. für C₁₃H₁₉N₃O₃ 265.1426, gef. 265.1418.

Darstellung von Boc-Ala-NHNHPh (42)

Ausgehend von 15.8 mmol Boc-Ala-OH. Durch Umkristallisation aus Aceton werden 2.6 g **42** (9.3 mmol, 60%), als weißer Feststoff erhalten.

$C_{14}H_{21}N_3O_3$ (279.3). F: 142 °C, $[\alpha]_D^{25} = -50.4$ (c=1, MeOH), 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 1.35 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 4.30 (m, 1H), 5.30 (d, 1H), 6.19 (d, 1H), 6.72-6.78 (m, 2H), 6.82-6.89 (m, 1H), 7.16-7.23 (m, 2H), 8.63 (s, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 18.0 (+), 28.3 (+, 3C), 48.6 (+), 80.4 (o), 113.4 (+, 2C), 121.0 (+), 129.4 (+, 2C), 147.8, 155.8, 173.0 (alle o). M ber. für $C_{14}H_{21}N_3O_3$ 279.1582, gef. 279.1573.

Darstellung von Boc-Leu-NHNHPh (43)

Ausgehend von 3.4 mmol Boc-Leu-OH. Flash-Chromatographie (Cyclohexan/ EtOAc 8:2) ergab 980 mg **43** (3.05 mmol, 90%) als weißen Feststoff.

$C_{17}H_{27}N_3O_3$ (321.4). F: 130-132 °C, $[\alpha]_D^{20} = -37.2$ (c=1, MeOH), 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 0.84-0.97 (m, 6H), 1.31-1.51 (m, 10H), 1.60-1.70 (m, 2H), 4.26 (m, 1H), 5.16 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 6.75 (m, 2H), 6.84-6.91 (m, 1H), 7.15-7.25 (m, 2H), 8.63 (s, 1H), ^{13}C -NMR (125.8 MHz): 22.1, 22.8, 24.7 (alle +), 28.3 (+, 3C), 40.7 (-), 51.5 (+), 80.4 (o), 113.5 (+, 2C), 121.0 (+), 129.1 (+, 2C), 147.9, 156.0, 172.8 alle (o) M ber. für $C_{17}H_{27}N_3O_3$ 321.2052, gef. 321.2037.

Darstellung von *N,N'*-Bis-*tert*-butyloxycarbonyl-L-Cystin-bis-Phenylhydrazid (44)

Ausgehend von 4.2 mmol (1.85 g) Boc-(L)-Cystin. Flash-Chromatographie (Cyclohexan/EtOAc 5:1) ergab 3.87 mmol **44** (2.40 g, 92 %) als elfenbeinfarbenen Feststoff.

$C_{28}H_{40}N_6O_6S_2$ (620.8). F: 150-160 °C (Zers.). 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 1.43 (s, 18H), 2.99 (dd, $J=10.2, 14.5$ Hz, 2H), 3.11 (dd, $J=4.3, 14.5$ Hz, 2H), 5.08 (bs, 2H) 5.6 (bs, 2H) 6.85-6.93 (m, 6H), 7.20-7.26 (m, 4H), 9.6 (bs, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 28.3 (+, 3C), 46.8 (-), 53.5 (+), 81.0 (o), 113.8 (+, 2C), 121.2 (+), 129.2 (+, 2C), 148.1 (o), 156.2 (o), 170.3 (o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R=25.78$ min, Reinheit 93 %, M = 643.2 $[M+Na]^+$; 1263.0 $[2M+Na]^+$. M für $C_{28}H_{39}N_6O_6S_2Na$ $[M+Na]^+$ ber. 642.2270, gef. 642.2289.

Darstellung von Boc-Phe-NHNHPh (45)

Ausgehend von 5.6 mmol Boc-Phe-OH. Flash-Chromatographie (Cyclohexan/EtOAc 8:2) ergab 1.5 g **45** (4.2 mmol, 74%) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{25}N_3O_3$ (355.4). F: 63 °C, $[\alpha]_D^{20} = -21.5$ (c=1, MeOH), 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 1.4 (m, 9H), 3.00-3.08 (m, 2H), 4.50 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 5.28 (bs, 1H), 6.52 (bs, 2H), 6.82-6.87 (m, 1H), 7.11 (m, 2H), 7.16-7.17 (m, 2H), 7.24-7.28 (m, 3H), 8.27 (s, 1H). ^{13}C -NMR (125.8 MHz) 28.3 (+, 3C), 38.3 (-), 54.4 (+), 80.5 (o), 113.5 (2C), 121.0, 127.0, 128.7 (2C), 129.0 (2C), 129.4 (2C, alle +), 136.3, 147.4, 155.6, 171.6 (alle o). M ber. für $C_{20}H_{25}N_3O_3$ 355.1896, gef. 355.1880.

Darstellung von Boc-Trp-NHNHPh (46)

Ausgehend von 5.0 mmol Boc-Trp-OH. Umkristallisation aus Cyclohexan/EtOAc ergab 1.45 g **46** (3.7 mmol, 74%) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{26}N_4O_3$ (394.5). F: 159-163°C, 1H -NMR (DMSO, 400 MHz) 1.34 (s, 9H), 2.94 (dd, $J=9.0, 14.2$ Hz, 1H), 3.09 (dd, $J=5.6, 14.4$ Hz, 1H), 4.27-4.32 (m, 1H), 6.58-6.66 (m, 3H), 6.95-7.10 (m, 5H), 7.16-7.19 (m, 1H), 7.32-7.35 (m, 1H), 7.62-7.70 (m, 3H), 9.78 (bs, 1H), 10.83 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 28.3 (+, 3C), 34.4 (-), 54.4 (+), 78.7 (o), 110.6 (o), 112.0, 112.1, 112.9 (2C), 118.9, 119.2, 121.6, 124.6 (alle +), 127.9 (o), 129.2 (+, 2C), 136.8, 149.9, 156.0, 172.7 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 25.26$ min, Reinheit >99 %, M = 393.0 [M]. M ber. für $C_{22}H_{26}N_4O_3$ 394.2004, gef. 394.2000.

Darstellung von Boc-His(Bzl)-NHNHPh (47)

Ausgehend von 5.0 mmol Boc-His(Bzl)-OH. Umkristallisation aus Cyclohexan/EtOAc ergab 1.73 g **47** (4.0 mmol, 80%) als elfenbeinfarbenen Feststoff.

$C_{24}H_{29}N_5O_3$ (435.5). F: 71-73 °C, 1H -NMR (DMSO, 400 MHz) 1.35 (s, 9H), 2.75 (dd, $J=8.2, 14.7$ Hz, 1H), 2.81 (dd, $J=5.8, 14.7$ Hz, 1H), 4.20-4.28 (m, 1H), 5.12 (bs, 2H), 6.58-6.66 (m, 3H), 6.90 (bs, 1H), 6.95-7.06 (m, 3H), 7.20-7.35 (m, 5H), 7.62-7.68 (m, 2H), 9.66 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 28.3 (+, 3C), 31.2 (-), 50.2 (-), 60.4 (+), 78.8 (o), 112.8 (2C), 117.2, 126.4, 128.2 (2C), 128.4, 129.1 (2C), 129.3 (2C, alle +), 135.7, 138.4 (beide o), 138.5 (+), 142.5, 150.8, 170.2 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R=13.39$ min, Reinheit 92 %, M=458.2 [M+Na]⁺. M ber. für $C_{24}H_{29}N_5O_3$ 435.2270, gef. 435.2262.

Darstellung von Fmoc-Pro-NHNHPh (48)

Ausgehend von 3.0 mmol Fmoc-Pro-OH. Umkristallisation aus MeOH ergab 860 mg **48** (2.02 mmol, 71%) als weißen Feststoff.

$C_{26}H_{25}N_3O_3$ (428.5). F: 157 °C, $[\alpha]_D^{20} = -63.5$ (c=1, $CHCl_3$), 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, 40°C) 1.91-2.14 (m, 4H), 3.46-3.56 (m, 2H), 4.23-4.51 (m, 4H), 6.71-6.89 (m, 3H), 7.08-7.15 (m, 2H), 7.28-7.32 (m, 2H), 7.37-7.40 (m, 2H), 7.58-7.64 (m, 2H), 7.75-7.77 (m, 2H), ^{13}C -NMR (100 MHz, 40°C) 24.6, 29.7, 47.5 (alle -), 47.6, 59.6 (beide +), 67.9 (-), 113.7 (2C), 120.2 (2C), 121.0, 125.1 (2C), 127.3 (2C), 128.0 (2C), 129.2 (2C, alle +), 141.6 (2C), 144.1 (2C), 148.2, 148.3, 172.8 (alle o). HR-MS ber. für $C_{26}H_{25}N_3O_3$ 428.1974, gef. 428.1958.

Darstellung von Boc-Leu-Pro-NHNHPh (49)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 3.24 mmol Boc-Leu-OH und 3.24 mmol H-Pro-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (5 % MeOH in CH_2Cl_2) 1.08 g **49** (2.58 mmol, 80 %) als elfenbeinfarbener Feststoff dargestellt.

$C_{22}H_{34}N_4O_4$ (418.5) F: 71-72 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 0.91-0.97 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.48-1.53 (m, 1H), 1.69-1.78 (m, 1H), 1.84-2.05 (m, 2H), 2.10-2.21 (m, 1H), 2.34-2.42 (m, 1H), 3.49-3.55 (m, 1H), 3.68-3.76 (m, 1H), 4.45-4.52 (m, 1H), 4.66 (dd, $J = 2.3, 8.0$ Hz, 1H), 5.22 (bs, 1H), 6.75-6.90 (m, 3H), 7.13-7.21 (m, 2H), 8.89 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 21.5, 23.4, 24.6 (alle +), 25.3 (-), 26.7 (-), 28.3 (+, 3C), 42.3 (-), 47.2 (-), 50.4 (+), 58.1 (+), 79.8 (o), 113.7 (+, 2C), 121.3 (+), 129.1 (+, 2C), 140.4, 155.7, 170.8, 173.7 alle (o). M ber. für $C_{22}H_{35}N_4O_4$ $[M+H]^+$ 419.2659, gef. 419.2674.

Darstellung von Boc-Gly-Leu-NHNHPh (51)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 1.7 mmol Boc-Gly-OH und 1.7 mmol H-Leu-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (5 % MeOH in CH_2Cl_2) 0.51 g **51** (1.37 mmol, 81 %), als elfenbeinfarbener Feststoff dargestellt.

$C_{19}H_{30}N_4O_4$ (378.7). F: 90 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 0.86-0.90 (m, 6H), 1.39 (s, 9H), 1.50-1.70 (m, 3H), 3.60-3.85 (m, 2H), 4.52-4.62 (m, 1H), 5.44 (bs, 1H), 6.28 (bs, 1H), 6.71-6.88 (m, 3H), 7.00-7.04 (bd, 1H), 7.13-7.20 (m, 2H), 8.90 (bs, 1H), ^{13}C -NMR (100 MHz): 22.1, 23.0, 24.9 (alle +), 28.5 (+, 3C), 40.8 (-), 44.4 (-), 50.6 (+), 80.6 (o), 113.7 (+, 2C), 121.2 (+), 129.4 (+, 2C), 147.9, 156.4, 170.7, 172.6 alle (o). M ber. für $C_{19}H_{30}N_4O_4$ 378.2267, gef. 378.2263.

Darstellung von Boc-Met-Gly-NHNHPh (52)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 10 mmol Boc-Met-OH und 10 mmol H-Gly-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (10 % MeOH in CH₂Cl₂) 3.29 g **52** (8.29 mmol, 83 %), als gelblicher Feststoff dargestellt.

C₁₈H₂₈N₄O₄S (396.5). F: 108-111 °C, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) 1.37 (s, 9H), 1.78-1.87 (m, 1H), 1.96-2.08 (m, 4H), 2.40-2.48 (m, 2H), 3.98-4.15 (m, 2H), 4.20-4.25 (m, 1H), 5.53 (bd, 1H), 6.35 (bs, 1H), 6.62-6.85 (m, 3H), 7.07-7.20 (m, 2H), 7.38 (bs, 1H), 8.83 (bs, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz): 15.3 (+), 28.3 (+, 3C), 30.5, 31.7, 42.5 (alle -), 54.4 (+), 81.1 (o), 113.8 (+, 2C), 121.3 (+), 129.5 (+, 2C), 148.1, 156.5, 169.8, 173.3 alle (o). M ber. für C₁₈H₂₉N₄O₄S [M+H]⁺ 397.1909, gef. 397.1906.

Darstellung von (Boc-Gly-Cys-NHNHPh)₂ (53)

Zu 2.0 mmol **44** in 20 mL CH₂Cl₂ werden unter Eiskühlung 4 mL TFA gegeben und nach 1 h das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 20 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und bei 0 °C mit 4.2 mmol Boc-Gly-OH (736 mg, 1.05 Äq.), 4.5 mmol EDCI (863 mg, 1.15 Äq.), 5.0 mmol HOBt (766 mg, 1.25 Äq.) und 4.0 mmol DIPEA (0.68mL, 1.0 Äq.) in 10 mL CH₂Cl₂ versetzt. Nach 1 h wird der Ansatz auf RT erwärmt und weitere 4 h gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung je drei Mal mit 1 N HCl, ges. wässriger NaHCO₃ und NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel mit 5 Vol.-% MeOH in CH₂Cl₂ als Laufmittel gereinigt. Ausbeute: 898 mg **53** (1.22 mmol, 61 %) als elfenbeinfarbener Feststoff.

C₃₂H₄₆N₈O₈S₂ (734.9). F: 117-119 °C (Zers.). ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz): 1.42 (s, 18H), 3.02 (dd, *J*=8.0, 14.1 Hz, 2H), 3.11 (dd, *J*=5.8, 14.1 Hz, 2H), 3.67-3.82 (m, 4H) 4.88-5.02 (m, 2H), 6.74-6.85 (m, 6H), 7.11-7.19 (m, 4H). ¹³C-NMR(100 MHz): 28.4 (+, 3C), 44.2 (-), 51.6 (-), 59.3(+), 79.5 (o), 113.7 (+, 2C), 121.2 (+), 129.3 (+, 2C), 141.6(o), 148.1 (o), 167.8 (o), 172.2 (o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R=23.09 min, Reinheit 88 %. M = 757.2 [M+Na]⁺, 735.0 [M+H]⁺, 679.0 [M-tBu]⁺, 635.1 [M-Boc]⁺, 579.0 [M-Boc-tBu]⁺, 535.1 [M-2Boc]⁺, M ber. für C₃₂H₄₆N₈O₈S₂ 734.2880, gef. 734.2884.

Darstellung von Boc-Trp-Trp-NHNHPh (54)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 2.0 mmol Boc-Trp-OH und 2.0 mmol H-Trp-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (5 % MeOH in CH₂Cl₂) 680 mg **54** (1.18 mmol, 59 %) als gelblicher Feststoff dargestellt.

$C_{33}H_{36}N_6O_4$ (580.7). F: 133-136 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 1.13 (s, 9H), 2.65-2.71 (m, 1H), 3.02-3.10 (m, 1H), 3.20-3.34 (m, 2H), 4.34-4.39 (m, 1H), 4.79-4.86 (m, 1H), 5.09 (bs, 1H), 5.78 (bs, 1H), 6.40-6.46 (m, 2H), 6.57-6.64 (m, 2H), 6.75-6.85 (m, 3H), 7.0-7.3 (m, 8H), 7.58-7.60 (m, 1H), 8.30 (bs, 1H), 8.51 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 26.6, 27.7 (beide -), 28.3 (+, 3C), 53.2, 55.9 (beide +), 80.9, 109.3, 109.8 (alle o), 111.7, 111.9, 113.8 (2C), 118.3, 118.0, 119.9, 120.1, 120.9, 122.4, 122.7, 123.7, 124.1, (alle +), 127.5, 127.6 (beide o), 129.2 (+, 2C), 136.4, 136.6, 147.9, 156.2, 171.4, 172.4 alle (o). M ber. für $C_{33}H_{37}N_6O_4$ 581.2876, gef. 581.2803.

Darstellung von Boc-Trp(Bzl)-Gly-NHNHPh (55)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 2.0 mmol Boc-Trp(Bzl)-OH und 2.0 mmol H-Gly-NHNHPh * TFA nach extraktiver Aufarbeitung 1.02 g **55** (1.88 mmol, 92 %) als elfenbeinfarbener Feststoff dargestellt.

$C_{31}H_{35}N_5O_4$ (541.6). F: 118-120 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.27 (s, 9H), 2.81 (dd, $J=7.4$, 13.6 Hz, 1H), 2.94 (dd, $J=6.9$, 13.7 Hz, 1H), 3.6-3.9 (m, 2H), 4.17 (dd, $J=7.0$, 7.4 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 6.68-6.83 (m, 5H), 7.00-7.15 (m, 4H), 7.21-7.34 (m, 6H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 27.7 (+, 3C), 36.7, 41.4 (beide -), 56.4 (+), 69.7 (-), 80.1 (o), 112.2, 113.0 (2C), 114.6 (2C), 120.4, 120.7, 127.1 (2C), 127.6, 128.1 (2C), 128.4, 128.7, 129.0, 130.0 (alle +), 132.9, 133.4, 136.6, 147.4, 157.5, 169.3, 173.0 (alle o).

Darstellung von Boc-Phe-Phe-NHNHPh (56)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 1.2 mmol Boc-Phe-OH und 1.2 mmol H-Phe-NHNHPh * TFA nach extraktiver Aufarbeitung 531 mg **56** (1.06 mmol, 88 %) als weißer Feststoff dargestellt.

$C_{29}H_{34}N_4O_4$ (502.6). F: 192-195 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.27 (s, 9H), 2.76-2.83 (m, 1H), 2.93-3.00 (m, 3H), 4.21-4.28 (m, 1H), 4.58-4.63 (m, 1H), 6.44-6.49 (m, 2H), 6.73-6.78 (m, 1H), 7.03-7.21 (m, 12H). M ber. für $C_{29}H_{34}N_4O_4Na$ $[M+Na]^+$ 525.2494, gef. 525.2486.

Darstellung von Fmoc-Phe-Phe-NHNHPh (57)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 1.2 mmol Fmoc-Phe-OH und 1.2 mmol H-Phe-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (3 % MeOH in CH_2Cl_2) 633 mg **57** (1.02 mmol, 85 %) als grau-weißer Feststoff dargestellt.

$C_{39}H_{36}N_4O_4$ (624.7). F: 166-169 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 2.84-3.09 (m, 4H), 4.07-4.13 (m, 1H), 4.15-4.23 (m, 1H), 4.31-4.43 (m, 2H), 4.61-4.67 (m, 1H), 6.44-6.51 (m, 2H), 6.76-6.82 (m, 1H), 7.04-7.29 (m, 14H), 7.34-7.40 (m, 2H), 7.45-7.56 (m, 2H), 7.71-7.76 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 37.4, 37.7 (beide -), 46.6, 52.8, 55.9 (alle +), 66.6 (-), 112.9 (2C), 119.5 (2C), 120.3, 124.6, 124.7, 126.6, 126.7 (2C), 127.3 (2C), 127.8, 128.1 (2C), 128.2 (2C), 128.5, 128.8 (2C), 128.9 (2C), 129.1, 130.0 (alle +), 135.8, 136.0, 140.9 (2C), 143.3 (2C), 156.9, 168.4, 170.7 (alle o). M ber. für $C_{39}H_{36}N_4O_4Na$ 647.2634, gef. 647.2627.

Darstellung von Fmoc-Phe-Thr(Bzl)-NHNHPh (58)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift werden aus 2.0 mmol Fmoc-Phe-OH und 2.0 mmol H-Phe-NHNHPh * TFA nach Flash-Chromatographie (3 % MeOH in CH_2Cl_2) 1.01 g **58** (1.51 mmol, 76 %) als weißer Feststoff dargestellt.

$C_{41}H_{40}N_4O_5$ (668.8). F: 192-198 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.05-1.25 (m, 3H), 2.96-3.13 (m, 2H), 4.30-4.68 (m, 6H), 5.30 (bs, 2H), 6.69-6.82 (m, 3H), 7.08-7.47 (m, 18H), 7.70-7.76 (m, 2H). M ber. für $C_{41}H_{41}N_4O_5 [M+H]^+$ 669.3077, gef. 669.3085.

6.3.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.3.2: Screening-Experimente zur Entschützung von Aminosäuren und Peptiden

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die enzymatische Phenylhydrazidspaltung

Das Phenylhadrazid wird mit der benötigten Menge Cosolvens in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50-100 mM, 50-200 mL/mmol) gelöst und mit Tyrosinase versetzt. Sauerstoff aus einem Ballon wird durch die Lösung geblasen, bis das Edukt verbraucht ist (DC-Kontrolle).

Aufarbeitung A: Das Cosolvens wird im Vakuum entfernt, die verbleibende wässrige Lösung wird mit fl. N_2 tiefgefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in 20 mL MeOH suspendiert, 5 Min. mit Ultraschall behandelt und über Celite abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

Aufarbeitung B: Das Reaktionsgemisch wird mit EtOAc gewaschen, um unreaktiertes Ausgangsmaterial abzutrennen, die wässrige Phase wird durch Zugabe von 1N HCl auf pH 2-3 angesäuert und mehrmals mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

C-terminale Entschützung von Boc-Gly-NHNHPh (41)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 120 mg (0.46 mmol) **41** mit 24 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung B nach 17 h lieferte 65 mg Boc-Gly-OH (0.37 mmol, 80 %) als farblosen Feststoff neben 23 mg **41** (0.08 mmol, 19 %)

$C_7H_{13}NO_4$ (175.2). F: 84°C, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 1.42 (s, 9H), 3.82 (s, 2H); ^{13}C -NMR (100 MHz) 27.9 (+, 3C), 41.8 (-), 79.8, 156.2, 172.2 (alle o).

C-terminale Entschützung von Boc-Ala-NHNHPh (42)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.215 mmol) **42** mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung B lieferte nach 23 h 18 mg Boc-Ala-OH (0.10 mmol, 44 %) neben 24 mg **42** (0.086 mmol, 40 %).

$C_8H_{15}NO_4$ (189.2). F: 78 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 1.44 (d, 3H), 1.46 (s, 9H), 4.30 (m, 1H), 5.08 (bs, 1H), 9.97 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 18.6, 28.4 (3C), 49.2 (alle +), 80.2, 155.8, 175.6 (alle o). HPLC-ESI-MS (C18, P45): t_R = 7.55 Min, Reinheit 78 %, 188.0 [M-H]⁻.

C-terminale Entschützung von Boc-Leu-NHNHPh (43)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 100 mg (0.36 mmol) **43** in 16 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 59.4 mg Boc-Leu-OH (0.28 mmol, 89%).

$C_{11}H_{21}NO_4$ (231.3). F: 77°C, $[\alpha]_D^{20} = -26.6^\circ$ (c=1, AcOH). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0.96 (d, 6H), 1.32-1.76 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 4.29-4.34 (m, 1H), 4.93 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.4 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 21.8, 22.8, 24.8 (alle +), 28.2 (+, 3C), 41.4 (-), 52.0 (+), 80.2, 155.2, 178.1 (alle o). M ber. für $C_{11}H_{22}O_4N$ [M+H]⁺ 232.1549, gef. 232.1465.

C-terminale Entschützung von (Boc-Cys-NHNHPh)₂ (44)

45 mg (0.102 mmol) **44** wurden mit 12 mg Tyrosinase den Standard-Abspaltbedingungen unterworfen. Aufarbeitung B lieferte nach 72 h keine freie Säure.

C-terminale Entschützung von Boc-Phe-NHNHPh (45)

Nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 180 mg (0.50 mmol) **45** in 15 h mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung B ergab 71 mg Boc-Phe-OH (0.27 mmol, 53 %) als weißen Feststoff neben 72 mg **45** (0.20 mmol, 40 %).

$C_{14}H_{19}NO_4$ (265.3). F: 52 °C, $[\alpha]_D^{25} = -26.8$ (c=1, $CHCl_3$). 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.35 (s, 9H), 3.00 (dd, $J=6.3, 13.6$ Hz, 1H), 3.13 (dd, 5.2, 13.6 Hz, 1H), 4.45-4.50 (m, 1H), 7.11-7.27 (m, 5H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 28.4 (+, 3C), 38.1 (-), 54.4 (+), 80.5 (o), 127.1 (+), 128.6 (+, 2C), 129.6 (+, 2C), 136.5, 155.6, 174.1 (alle o). M ber. für $C_{14}H_{19}O_4N$ 265.1314, gef. 265.1299.

C-terminale Entschützung von Boc-Trp-NHNHPh (46)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.152 mmol) **46** in 24 h mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung B ergab 22 mg Boc-Trp-OH (0.066 mmol, 43 %) neben 25 mg reisolierem **46** (0.063 mmol, 42 %).

$C_{16}H_{20}N_2O_4$ (304.3). F: 118 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.32 (s, 9H), 3.12-3.28 (m, 2H), 4.42-4.47 (m, 1H), 6.96-7.09 (m, 3H), 7.25-7.31 (m, 2H), 7.51-7.55 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 28.3 (+, 3C), 30.3 (-), 54.4 (+), 79.5 (o), 111.2 (+), 111.3 (o), 118.8, 119.2, 121.8, 123.2 (alle +), 134.5, 135.6, 156.2, 163.9 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 17.05$ min, Reinheit 71 %, M = 303.0 [M]⁻, 629.3 [2M+Na]⁻. M ber. für $C_{16}H_{20}N_2O_4$ 304.1423, gef. 304.1430.

C-terminale Entschützung von Boc-His(Bzl)-NHNHPh (47)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.138 mmol) **47** in 3 Tagen mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung B ergab 5 mg Boc-His(Bzl)-OH (0.015 mmol, 11 %) neben 43 mg reisolierem **47** (0.099 mmol, 72 %).

$C_{18}H_{23}N_3O_4$ (345.4). 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.38 (s, 9H), 3.02 (dd, $J=7.3, 15.4$ Hz, 1H), 3.16 (dd, $J=5.6, 15.4$ Hz, 1H), 4.34-4.38 (m, 1H), 5.25 (s, 2H), 7.09 (bs, 1H), 7.26-7.31 (m, 2H), 7.36-7.41 (m, 3H). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 10.93$ min, Reinheit 96 %, 344.0 [M-H]⁻, 711.2 [2M+Na]⁻.

C-terminale Entschützung von Fmoc-Pro-NHNHPh (48)

Analog zu der Allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden zu 71 mg (0.166 mmol) **48** 15 mg Tyrosinase gegeben und die Lösung mit Sauerstoff begast. Nach 24 und 48 h wurden jeweils 10 mg Tyrosinase hinzugefügt. Nach 192 h ergab Aufarbeitung B neben 55 mg **48** (0.129 mmol, 78 %) 7.3 mg (0.022 mmol, 13%) Fmoc-Pro-OH.

$C_{20}H_{19}NO_4$ (337.4). F: 109 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.84-2.09 (m, 2H), 2.22-2.30 (m, 2H), 3.40-3.62 (m, 2H), 4.00-4.37 (m, 4H), 7.22-7.36 (m, 4H), 7.50-7.58 (m, 2H), 7.66-7.73 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz) 24.2, 29.5, 46.6 (alle -), 47.0, 59.1 (beide +),

67.4 (-), 119.9 (2C), 124.7, 124.9, 126.9 (2C), 127.6 (2C, alle +), 141.2, 143.9, 155.0, 169.7 (alle o).

C-terminale Entschützung von Boc-Leu-Pro-NHNHPh (49)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 50 mg (0.12 mmol) **49** in 19 h mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 6 mg Boc-Leu-Pro-OH (0.018 mmol, 15 %) als bräunlicher Feststoff neben 34 mg reisolierem **49** (0.081 mmol, 68 %).

$C_{16}H_{28}N_2O_5$ (328.4). F: 58-60 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 0.86-0.92 (m, 6H), 1.36 (s, 9H), 1.38-1.44 (m, 1H), 1.64-1.74 (m, 1H), 1.94-2.05 (m, 3H), 2.11-2.20 (m, 1H), 3.51-3.57 (m, 1H), 3.70-3.75 (m, 1H), 4.35-4.44 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 22.2, 23.8, 25.1 (alle +), 25.4 (-), 28.8 (+, 3C), 29.4, 41.9, 47.5 (alle -), 50.9 (+), 59.5 (+), 80.4 (o), 158.3, 173.6, 174.2 alle (o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R = 15.71 min, Reinheit 90 %. $M = 327.2$ $[M-H]^-$. M ber. für $C_{16}H_{29}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 329.2077, gef. 329.2082.

C-terminale Entschützung von Boc-Gly-Val-NHNHPh (50)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 45 mg (0.123 mmol) **50** in 19 h mit 12 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 26 mg Boc-Gly-Val-OH (0.094 mmol, 77 %) als bräunliches Öl neben 9 mg reisolierem **50** (0.025 mmol, 20 %).

$C_{12}H_{22}N_2O_5$ (274.3). 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 0.90-0.96 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 2.14-2.24 (m, 1H), 3.68-3.83 (m, 2H), 4.41-4.44 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 17.0, 18.5, (beide +), 27.7 (+, 3C), 30.5 (+), 43.5 (-), 56.8 (+), 79.9, 161.6, 170.2, 173.2 alle (o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R = 9.17 min, Reinheit 93 %. $M = 273.1$ $[M-H]^-$, 547.1 $[2M-H]^-$. M ber. für $C_{12}H_{23}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 275.1607, gef. 275.1594.

C-terminale Entschützung von Boc-Gly-Leu-NHNHPh (51)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.159 mmol) **51** in 55 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 34 mg Boc-Gly-Leu-OH (0.118 mmol, 75 %) als farblose Kristalle neben 6 mg reisolierem **51** (0.025 mmol, 10 %).

$C_{13}H_{24}N_2O_5$ (288.3). F: 137-140°C. 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz): 0.88-0.92 (m, 6H) 1.41 (s, 9H), 1.52-1.68 (m, 3H), 3.66-3.82 (m, 2H), 4.46-4.52 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 21.3, 22.5, 24.6 (alle +), 27.9 (+, 3C), 40.7, 43.4 (beide -), 50.4 (+), 80.0 (o), 156.3, 170.0, 174.6 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R = 9.85 min, Reinheit 83%. $M = 287.1$ $[M-H]^-$, 575.1 $[2M-H]^-$. M ber. für $C_{13}H_{24}N_2O_5Na$ $[M+Na]^+$ 311.1583, gef. 311.1591.

C-terminale Entschützung von Boc-Met-Gly-NHNHPh (52)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.152 mmol) **52** in 17 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 31 mg Boc-Met-Gly-OH (0.100 mmol, 67 %) als bräunliches Öl neben 15 mg reisolierendem **52** (0.038 mmol, 25 %).

$C_{12}H_{22}N_2O_5S$ (306.4). 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz): 1.38 (s, 9H), 1.80-1.85 (m, 1H), 1.95-2.04 (m, 1H), 2.03 (s, 3H) 2.45-2.53 (m, 2H), 3.83-3.98 (m, 2H), 4.03-4.12 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 14.78 (+), 27.9 (+, 3C), 29.7, 31.7, 40.7 (alle -), 53.1 (+), 80.0 (o), 155.8, 171.1, 172.5 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R =9.25 min, Reinheit 87 %. $M = 305.0$ [$M-H$] $^-$, 611.0 [$2M-H$] $^-$, 231.1. M ber. für $C_{12}H_{23}N_2O_5S$ [$M+H$] $^+$ 307.1327, gef. 307.1339.

C-terminale Entschützung von (Boc-Gly-Cys-NHNHPh)₂ (53)

150 mg (0.204 mmol) **44** wurden mit 72 mg Tyrosinase den Standard-Abspaltbedingungen unterworfen. Aufarbeitung B lieferte nach 36 h keine freie Säure.

C-terminale Entschützung von Boc-Trp-Trp-NHNHPh (54)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 70 mg (0.120 mmol) **54** in 197 h mit 32 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 9 mg Boc-Trp-Trp-OH (0.018 mmol, 15 %) als gelblicher Feststoff neben 57 mg reisolierendem **54** (0.098 mmol, 82 %).

$C_{27}H_{30}N_4O_5$ (495.6). F: 158-160 °C, 1H -NMR (MeOD, 400 MHz) 1.40 (s, 9H), 3.10-3.27 (m, 4H), 4.11 (dd, $J=4.6, 8.5$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J=5.3, 7.2$ Hz, 1H), 7.00-7.15 (m, 8H), 7.31-7.38 (m, 2H).

C-terminale Entschützung von Boc-Trp(Bzl)-Gly-NHNHPh (55)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.111 mmol) **55** in 108 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 11 mg Boc-Trp(Bzl)-Gly-OH (0.024 mmol, 22 %) als elfenbeinfarbener Feststoff neben 36 mg reisolierendem **55** (0.066 mmol, 60 %).

$C_{25}H_{29}N_3O_5$ (451.5). F: 131-133 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.19 (s, 9H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.25-2.30 (m, 1H), 3.78-3.95 (m, 2H), 4.24-4.30 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 6.81-6.86 (m, 2H), 7.00-7.07 (m, 2H), 7.10-7.15 (m, 1H), 7.28-7.36 (m, 6H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 29.5 (3C), 33.9, 44.3, 54.1, 69.9, 80.1, 114.7, 114.8, 123.9, 125.5, 127.3 (2C), 127.8, 128.4 (2C), 130.2, 130.3, 132.4, 136.4, 143.2, 156.6, 170.2, 171.2. FAB-MS gef. 451.06 [$M+H$] $^+$.

C-terminale Entschützung von Boc-Phe-Phe-NHNHPh (56)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.120 mmol) **56** in 108 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 13 mg Boc-Phe-Phe-OH (0.032 mmol, 26 %) als gelblicher Feststoff neben 40 mg reisolierstem **56** (0.080 mmol, 66 %).

$C_{23}H_{28}N_2O_5$ (412.5). F: 135-138 °C (Zers.), 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.28 (s, 9H), 2.92-3.01 (m, 4H), 4.22-4.28 (m, 1H), 4.60-4.64 (m, 1H), 7.02-7.24 (m, 10H). M ber. für $C_{23}H_{29}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 413.2077, gef. 413.2072.

C-terminale Entschützung von Fmoc-Phe-Phe-NHNHPh (57)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.096 mmol) **57** in 108 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 5 mg Fmoc-Phe-Phe-OH (0.009 mmol, 10 %) als weißer Feststoff neben 26 mg reisolierstem **57** (0.041 mmol, 44 %).

$C_{33}H_{30}N_2O_5$ (534.6). F: 202 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 2.80-3.08 (m, 4H), 4.04-4.24 (m, 2H), 4.30-4.43 (m, 2H), 4.60-4.67 (m, 1H), 7.08-7.39 (m, 14H), 7.45-7.56 (m, 2H), 7.71-7.76 (m, 2H).

C-terminale Entschützung von Fmoc-Phe-Thr(Bzl)-NHNHPh (58)

Wie in der Allgemeinen Arbeitsvorschrift angegeben wurden 60 mg (0.089 mmol) **58** in 110 h mit 20 mg Tyrosinase entschützt. Aufarbeitung A ergab 8 mg Fmoc-Phe-Thr(Bzl)-OH (0.014 mmol, 16 %) als weißer Feststoff neben 46 mg reisolierstem **58** (0.069 mmol, 77 %).

$C_{35}H_{34}N_2O_6$ (578.6). F: 89-91 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 1.52-1.64 (m, 3H), 2.25-2.31 (m, 2H), 3.02-3.21 (m, 3H), 4.07-4.34 (m, 4H), 4.35-4.45 (m, 3H), 4.50-4.65 (m, 2H), 6.69-6.85 (m, 1H), 7.04-7.22 (m, 5H), 7.32-7.57 (m, 7H), 7.70-7.78 (m, 2H).

6.3.3.3 Versuche zu Kapitel 4.2.3.3: Einige Anwendungen der Phenylhydrazidentschützung**Darstellung von S-Palmitoyl-N-Boc-glycyl-(L)-Cysteinphenylhydrazid (60)**

Zu einer Lösung von 0.25 mmol **52** (184 mg) in 10 mL CH_2Cl_2 werden 1.25 mmol Dithiothreitol (193 mg, 5 Äq.) und 0.525 mmol NEt_3 (73 μ L, 2.1 Äq.) gegeben. Die Lösung wird 1 h bei RT gerührt, dreimal mit 1 N HCl gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Abkühlen auf 0°C werden 0.5 mmol Palmitoylchlorid (0.151 mL, 1.0 Äq.) und 0.5 mmol NEt_3 (0.070 mL, 1.0 Äq.) zugegeben. Nach 1 h werden die Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie gereinigt (SiO₂, 5 % MeOH in CH₂Cl₂). Ausbeute 216 mg **60** (0.36 mmol, 71%) als gelbliches Öl.

C₃₂H₅₄N₄O₅S (606.9). ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz): 0.88 (t, *J*=7.0 Hz, 3H), 1.2-1.3 (m, 24H), 1.42 (s, 9H), 1.62-1.69 (m, 2H), 2.76 (t, *J*=7.6 Hz, 2 H), 3.33-3.36 (m, 2H), 3.75-3.79 (m, 2H), 4.65-4.72 (m, 2H), 5.13 (bs, 1H), 6.02 (bd, *J*=4.3 Hz, 1H), 6.80-6.91 (m, 2H), 7.04-7.07 (m, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H), 8.63 (bs, 1H). ¹³C-NMR(100 MHz): 14.0 (+), 22.6 (-), 25.6 (-), 28.2 (+, 3C), 28.9-29.6 (alle -, 10C), 30.0, 31.9, 44.0, 45.6 (alle -), 55.0(+), 80.9 (o), 113.7 (+, 2C), 121.2 (+), 129.1 (+, 2C), 141.6, 148.1, 169.5, 170.3, 201.4 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R=32.35 min, Reinheit 86 %. M = 629.3 [M+Na]⁺, 573.3 [M+Na-tBu]⁺. M ber. für C₃₂H₅₄N₄O₅SNa [M+Na]⁺ 629.3713, gef. 629.3693.

Darstellung von *S*-Palmitoyl-*N*-*tert*-Butyloxycarbonylglycyl-(L)-Cystein (**59**)

Zur Entschützung werden 0.116 mmol **60** (70 mg) in 30 mL Phosphatpuffer und 4 mL MeCN 7 Tage mit 30 mg Tyrosinase unter ständiger Belüftung mit Sauerstoff behandelt. Aufarbeitung A ergab 45 mg **59** (0.087 mmol, 75 %) als gelblichen Feststoff sowie 17 mg (0.028 mmol, 24 %) **60**.

C₂₆H₄₈N₂O₆S (516.7). F: 137-139 °C. ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz): 0.81 (m, 3H), 1.1-1.3 (m, 24H), 1.37 (s, 9H), 1.48-1.56 (m, 2H), 2.21 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 3.30-3.39 (m, 2H), 3.58-3.80 (m, 2H), 4.20-4.36 (m, 1H). HPLC-ESI-MS (C4, P45):t_R=29.92 min, Reinheit 66 %. M = 515.3 [M-H]⁻, 1031.4 [2M-H]⁻. M ber. für C₂₆H₄₈N₂O₆SNa [M+Na]⁺ 539.3131, gef. 539.3108.

Darstellung von Boc-Gly-Leu-OH (**62**)

Die Entschützung von 0.53 mmol **51** (200 mg) wird wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben in 210 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0) und 9 mL MeCN mit 70 mg Tyrosinase durchgeführt. Nach 2 Tagen ergab Aufarbeitung B 142 mg **62** (0.49 mmol, 93 %) als farblose Kristalle sowie 10 mg **51** (0.027 mmol, 5 %).

C₁₃H₂₄N₂O₅ (288.3). F: 137-140°C. ¹H-NMR (CDCl₃ + MeOD, 400 MHz): 0.88-0.92 (m, 6H), 1.41 (s, 9H), 1.52-1.68 (m, 3H), 3.66-3.82 (m, 2H), 4.46-4.52 (m, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz): 21.3, 22.5, 24.6 (alle +), 27.9 (+, 3C), 40.7, 43.4 (beide -), 50.4 (+), 80.0 (o), 156.3, 170.0, 174.6 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R=9.85 min, Reinheit 83%. M = 287.1 [M-H]⁻, 575.1 [2M-H]⁻. M ber. für C₁₃H₂₄N₂O₅Na [M+Na]⁺ 311.1583, gef. 311.1591.

Darstellung von Boc-Met-Gly-OH (61)

Die Entschützung von 1.66 mmol **52** (657 mg) wird wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben in 250 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0) und 30 mL MeCN mit 290 mg Tyrosinase durchgeführt. Nach drei Tagen ergab Aufarbeitung B 305 mg **61** (1.00 mmol, 60 %) und 160 mg **52** (0.40 mmol, 24 %).

$C_{12}H_{22}N_2O_5S$ (306.4). 1H -NMR ($CDCl_3 + MeOD$, 400 MHz): 1.38 (s, 9H), 1.80-1.85 (m, 1H), 1.95-2.04 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.45-2.53 (m, 2H), 3.83-3.98 (m, 2H), 4.03-4.12 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 14.78 (+), 27.9 (+, 3C), 29.7, 31.7, 40.7 (alle -), 53.1 (+), 80.0 (o), 155.8, 171.1, 172.5 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R=9.25$ min, Reinheit 87 %. $M = 305.0 [M-H]^-$, 611.0 $[2M-H]^-$, 231.1. M ber. für $C_{12}H_{23}N_2O_5S$ 307.1327, gef. 307.1339.

Darstellung von Boc-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (63)

Eine Lösung von 1.06 mmol **52** (420 mg) in 10 mL CH_2Cl_2 wird bei 0 °C für 1 h mit 2 mL TFA gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt direkt in der Kupplung mit 0.98 mmol **61** (300 mg) unter den oben beschriebenen Standardbedingungen eingesetzt. Die Aufreinigung des Rohprodukts durch Flash-Chromatographie (SiO_2 , 3% MeOH in CH_2Cl_2) ergab 243 mg **63** (0.42 mmol, 42%) als gelblichen Feststoff.

$C_{25}H_{40}N_6O_6S_2$ (584.7). F: 136-138 °C (Zers.). 1H -NMR ($CDCl_3 + MeOD$, 400 MHz): 1.41 (s, 9H), 1.75-1.85 (m, 1H), 1.90-2.04 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.11-2.24 (m, 1H), 2.41-2.58 (m, 4H), 3.70-3.77 (m, 1H), 3.86-3.95 (m, 1H), 3.95-4.07 (m, 2H), 4.12 (dd, $J=5.5$, 8.4 Hz, 1H), 4.46 (dd, $J=5.4$, 8.7 Hz, 1H), 6.72-6.88 (m, 3H), 7.14-7.20 (m, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 14.79, 14.83 (beide +), 27.9 (+, 3C), 29.8, 29.9, 30.1, 30.9, 41.6, 42.7 (alle -), 52.8, 53.8 (beide +), 80.2 (o), 113.1 (+, 2C), 120.5 (+), 128.6 (+, 2C), 147.5, 156.2, 169.4, 170.3, 172.4, 173.6 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R=15.37$ min, Reinheit 91 %. $M = 583.1 [M-H]^-$. M ber. für $C_{25}H_{41}N_6O_6S_2 [M+H]^+$ 585.2529, gef. 585.2529.

Darstellung von Boc-Met-Gly-Leu-Pro-NHNHPh (68)

Die Synthese erfolgt ausgehend von 0.43 mmol **61** (132 mg) und 0.32 mmol H-Leu-Pro-NHNHPh * TFA (135 mg) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift. Ausbeute: 152 mg **68** (0.25 mmol, 78 %), als gelblicher Feststoff.

$C_{29}H_{46}N_6O_6S$ (606.78). F: 82-84 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) 0.92-0.98 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.54-1.71 (m, 3H), 1.81-1.90 (m, 2H), 1.96-2.08 (m, 6H), 2.12-2.23 (m, 2H), 2.42-2.49 (m, 2H), 3.63-3.71 (m, 1H), 3.80-3.94 (m, 1H), 3.96-4.04 (m, 1H), 4.15-4.35 (m, 2H), 4.58

(dd, $J=4.1, 7.6$ Hz, 1H), 4.87-4.95 (m, 1H), 5.27 (bd, 1H), 6.19 (bd, 1H), 6.76-6.90 (m, 3H), 7.14-7.20 (m, 2H), 7.96 (bd, 1H), 9.41 (bs, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 15.3, 22.0, 23.1, 24.6 (alle +), 25.0 (-), 28.3 (+, 3C), 28.8, 30.1, 32.0, 41.8, 42.9, 47.7 (alle -), 48.8, 53.5, 58.5 (alle +), 80.3 (o), 113.6 (+, 2C), 121.0 (+), 129.1 (+, 2C), 148.0, 155.4, 168.2, 171.4, 172.0, 172.2 alle (o). M ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ 607.3278, gef. 607.3289.

Darstellung von Boc-Gly-Leu-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (64)

Eine Lösung von 0.205 mmol **63** (120 mg) in 10 mL CH_2Cl_2 wird bei 0 °C für 1h mit 2 mL TFA gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt direct in der Kupplung mit 0.25 mmol **62** (95 mg) unter den oben beschriebenen Standardbedingungen eingesetzt. Die Aufreinigung des Rohprodukts durch Flash-Chromatographie (SiO_2 , 3% MeOH in CH_2Cl_2) ergab 125 mg **64** (0.165 mmol, 81%) als gelblichen Schaum.

$\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$ (755.0). F: 185-187 °C. ^1H -NMR (CDCl_3 + MeOD, 400 MHz): 0.80-0.91 (m, 6H), 1.41 (s, 9H), 1.44-1.61 (m, 3H), 1.95-2.15 (m, 10H), 2.46-2.58 (m, 4H), 3.58-3.89 (m, 6H), 4.13-4.26 (m, 2H), 4.48-4.54 (m, 1H), 6.76-6.83 (m, 3H), 7.14-7.18 (m, 2H). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_{\text{R}}=18.57$ min, Reinheit 81 %. $M = 755.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $M = 777.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $M = 655.1$ $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$. M ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 777.3404, gef. 777.3404.

Darstellung von Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-Met-Gly-NHNHPh (69)

Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-OH (128 mg, 0.20 mmol) wird mit 0.24 mmol H-Met-Gly-NHNHPh * TFA (vgl. Darstellung von **63**) wie in der allgemeinen Arbeitsvorschrift beschrieben C-terminal verlängert, Ausbeute: 135 mg **69** (0.15 mmol, 74 %) als gelblicher Feststoff.

$\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$ (917.2). F: 125-126 °C. ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) 0.81-0.90 (m, 6H), 1.23-1.30 (m, 1H), 1.41-1.47 (m, 2H), 1.90-1.98 (m, 2H), 2.00-2.18 (m, 12H), 2.23-2.33 (m, 1H), 2.45-2.60 (m, 3H), 3.50-3.64 (m, 2H), 3.70-3.90 (m, 3H), 4.05-4.25 (m, 4H), 4.31-4.37 (m, 1H), 4.40-4.60 (m, 4H), 5.85 (bd, 1H), 6.62-6.80 (m, 3H), 7.01 (bs, 1H), 7.14-7.20 (m, 2H), 7.27- 7.33 (m, 3H), 7.34-7.43 (m, 3H), 7.56-7.63 (m, 3H), 7.72-7.78 (m, 2H), 8.01 (bs, 1H), 8.62 (bs, 1H). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_{\text{R}}=25.13$ min, Reinheit 77 %, $M=917.3$ $[\text{M}]^+$.

C-terminale Entschützung von Boc-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (63)

Die Entschützung von 0.125 mmol **64** (73 mg) wurde unter den Standardbedingungen in 30 mL Phosphatpuffer und 3 mL MeCN mit 40 mg Tyrosinase durchgeführt. Nach 24 h ergab Aufarbeitung B 50 mg Boc-Met-Gly-Met-Gly-OH (0.101 mmol, 81 %) als bräunliches Öl und 7 mg **64** (0.012 mmol, 10 %).

$C_{19}H_{34}N_4O_7S_2$ (494.6). 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz): 1.39 (s, 9H), 1.79-1.95 (m, 2H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.06-2.14 (m, 1H), 2.44-2.56 (m, 4H), 3.73-3.80 (m, 1H), 3.89-3.93 (m, 2H), 3.95-4.03 (m, 1H), 4.20 (dd, $J=5.2, 8.3$ Hz, 1H), 4.57 (dd, $J=5.7, 8.2$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 15.00, 15.06 (beide +), 28.1 (+, 3C), 29.9, 30.0, 30.9, 31.5, 40.9, 42.7 (alle -), 52.1, 53.6 (beide +), 80.3, 156.0, 169.6, 171.5, 171.9, 173.0 (alle o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R=10.01$ min, Reinheit 81 %. $M = 493.1$ $[M-H]^-$. M ber. für $C_{19}H_{35}N_4O_7S_2$ $[M+H]^+$ 495.1947, gef. 495.1957.

C-terminale Entschützung von Boc-Met-Gly-Leu-Pro-NHNHPh (68)

Die Entschützung von 60 mg (0.099 mmol) **68** wurde unter den Standardbedingungen in 30 mL Phosphatpuffer und 3 mL MeCN mit 48 mg Tyrosinase durchgeführt. Aufarbeitung A ergab 36 mg Boc-Met-Gly-Leu-Pro-OH (0.070 mmol, 70 %) als elfenbeinfarbenen Feststoff und 11 mg (0.018 mmol, 18 %) **68**.

$C_{23}H_{40}N_4O_7S$ (516.7). F: 65-67 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 0.81-0.91 (m, 6H), 1.38 (s, 9H), 1.45-1.53 (m, 2H), 1.60-1.66 (m, 1H), 1.81-1.90 (m, 2H), 1.96-2.08 (m, 6H), 2.12-2.23 (m, 1H), 2.43-2.51 (m, 2H), 3.51-3.58 (m, 1H), 3.70-3.81 (m, 2H), 3.90-4.04 (m, 1H), 4.17-4.22 (m, 1H), 4.65-4.72 (m, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 15.4, 21.8, 23.3, 24.7 (alle +), 25.0 (-), 28.3 (+, 3C), 29.0, 30.3, 32.0, 41.0, 42.7, 47.3 (alle -), 50.0, 53.8, 59.3 (alle +), 80.4 (o), 156.4, 165.2, 169.3, 172.1, 173.8 alle (o). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 15.79$ min, Reinheit 70 %, $M = 515.0$ $[M]^-$. M ber. für $C_{23}H_{41}N_4O_7S$ $[M+H]^+$ 517.2695, gef. 517.2682.

C-terminale Entschützung von Boc-Gly-Leu-Met-Gly-Met-Gly-NHNHPh (64)

Die Entschützung von 0.106 mmol **64** (80 mg) wurde unter den Standardbedingungen in 210 mL Phosphatpuffer und 9 mL MeCN mit 70 mg Tyrosinase durchgeführt. Nach 15 h ergab Aufarbeitung B 40 mg Boc-Gly-Leu-Met-Gly-Met-Gly-OH (0.060 mmol, 57 %) und 18 mg **64** (0.024 mmol, 22 %).

$C_{27}H_{48}N_6O_9S_2$ (664.8). 1H -NMR (D_2O , 400 MHz): 0.72-0.83 (m, 6H) 1.30 (s, 9H), 1.44-1.56 (m, 3H), 1.85-2.09 (m, 6H), 2.13-2.26 (m, 1H), 2.37-2.54 (m, 2H), 2.59 (bs, 3H), 2.76-2.88 (m, 2H), 3.62-3.74 (m, 2H), 3.78-3.95 (m, 4H), 4.21-4.27 (m, 1H), 4.31-4.46 (m, 2H). HPLC-ESI-MS (C4, P45): $t_R = 14.08$ min, Reinheit 55 %. $M = 663.1$ $[M-H]^-$

C-terminale Entschützung von Fmoc-Met-Gly-Leu-Pro-Met-Gly-NHNHPh (69)

Die Entschützung von 80 mg (0.087 mmol) **69** wurde mit 40 mg Tyrosinase unter Standardbedingungen durchgeführt. Workup A ergab nach vier Tagen 11 mg Fmoc-Met-Gly-

Leu-Pro-Met-Gly-OH (0.013 mmol, 19 %) als bräunlicher Feststoff neben 49 mg (0.053 mmol, 61 %) **69**.

$C_{40}H_{54}N_6O_9S_2$ (827.0). F: 153-155 °C, 1H -NMR ($CDCl_3$ + MeOD, 400 MHz) 0.78-0.90 (m, 6H), 1.20-1.23 (m, 3H), 1.35-1.40 (m, 1H), 1.50-1.50 (m, 2H), 1.80-2.05 (m, 12H), 2.38-2.52 (m, 4H), 3.47-3.73 (m, 4H), 3.85-3.98 (m, 1H), 4.10-4.15 (m, 1H), 4.20-4.42 (m, 4H), 4.53-4.60 (m, 1H), 7.20- 7.24 (m, 2H), 7.28-7.34 (m, 2H), 7.50-7.55 (m, 2H), 7.64-7.70 (m, 2H). HPLC-ESI-MS (C4, P45): t_R =22.21 min, Reinheit 83 %, $M=827.2 [M]^+$.

6.3.4 Versuche zu Kapitel 4.2.4: Mechanistische Untersuchungen

6.3.4.1 Darstellung der Substrate

Darstellung von Boc-Phe-NHPh (74)

Zu einer Lösung von 2.65 g Boc-Phe-OH (10 mmol), 2.29 g EDC (12 mmol, 1.2 Äq.) und 2.29 g HOBt (15 mmol, 1.5 Äq.) in 60 mL CH_2Cl_2 und 1 mL TFE wird 1 mL Anilin (11 mmol, 1.024g, 1.1 Äq.) zugetropft. Nach 6 h Rühren bei RT wird 3 Mal mit 1N HCl extrahiert, die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 3.25 g (9.56 mmol 96 %) eines weißen Feststoffs.

$C_{20}H_{24}N_2O_3$ (340.4). 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 1.38 (s, 9H), 3.10 (dd, 1H, J = 13.5, 7.6 Hz), 3.16 (dd, J = 13.6, 7.0 Hz), 4.52-4.58 (m, 1H), 5.36-5.44 (m, 1H), 7.0-7.4 (m, 9H), 8.15-8.23 (m, 1H); ^{13}C -NMR (100.6 MHz): δ = 28.51 (3C), 38.8, 56.9, 120.3 (2C), 124.6, 127.2, 128.9 (2C), 129.1, 129.4 (2C), 129.6 (2C), 136.9, 137.6, 158.1, 170.1.

Darstellung von Acetanilid (75)

Unter Eiskühlung und heftigem Rühren werden 50 mmol Anilin (4.6 mL) tropfenweise mit 5 mL Acetanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit eiskaltem Wasser verdünnt, der ausgefallene farblose Feststoff abfiltriert, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wird aus EtOH umkristallisiert. Ausbeute: 5.2 g **75** als farbloser Feststoff, (38.5 mmol, 77 %).

C_8H_9NO (135.2). F= 114 °C; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.05 (s, 3H), 7.00-7.40 (m, 5H).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur MOZ-Schützung

Zu 1 mmol Aminosäure und 188 μL DIEA (1.1 mmol, 1.1 Äq.) in 5 mL Wasser wird 310 mg MOZ-ON (1 mmol, (4-Methoxybenzyloxycarbonyloxyimino)-Benzylcyanid) in 6 mL Dioxan gegeben und bei RT 3 h gerührt. Der Ansatz wird mit 20 mL Wasser verdünnt und drei Mal mit EtOAc gewaschen, auf pH 2.5 angesäuert und drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus EtOAc/Toluol aufgereinigt.

Darstellung von MOZ-Alanin (76a)

Ansatzgröße 1 mmol, Ausbeute 175 mg **76b** (0.69 mmol, 69 %) eines weißen Feststoffs.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ (253.2). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.45 (d, 3H, J = 5.6 Hz), 3.80 (s, 3H), 4.37-4.41 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 6.88 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 7.29 (d, 2H, J = 6.8 Hz); MALDI-TOF-MS: 273.38 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS (NBA): ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ 253.0950, gef. 253.0981.

Darstellung von MOZ-Serin (76b)

Ansatzgröße 1 mmol, Ausbeute 164 mg **76b** (0.61 mmol, 61 %) eines weißen Feststoffs.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_6$ (269.3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.72-3.86 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 4.25-4.29 (m, 1H), 5.03 (s, 2H), 6.88 (d, 2H, J = 7.0 Hz), 7.39 (d, 2H, J = 7.0 Hz); MALDI-TOF-MS: 292.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS (NBA): ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_6$ 269.0899, gef. 269.0907.

Darstellung von MOZ-Phenylalanin (76c)

Ansatzgröße 2 mmol, Ausbeute 318 mg **76b** (0.96 mmol, 48 %) eines weißen Feststoffs.

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (329.4). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.09 (dd, 1H, J = 13.9, 7.6 Hz), 3.19 (dd, 1H, J = 13.9, 5.2 Hz), 3.78 (s, 3H), 4.68 (dd, 1H, J = 7.6, 5.2 Hz), 5.02 (s, 2H), 5.21 (d, 1H, 8 Hz, x), 6.87 (d, 2H, J =8.6 Hz) 7.13-7.27 (m, 7 H), 7.94 (bs, 1H, x).

Darstellung von Benzoessäurephenylhydrazid (77)

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift ausgehend von 3 mmol Benzoessäure. Ausbeute: 629 mg **77** (2.98 mmol, 99 %).

$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ (212.2). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.15 (bs, 1H), 6.89-6.98 (m, 3H), 7.20-7.24 (m, 2H), 7.42-7.48 (m, 2H), 7.53-7.59 (m, 1H), 7.82-7.87 (m, 2H), 8.2 (bs, 1H);

^{13}C -NMR (100.6 MHz): 114.4 (2C), 122.1, 127.4 (2C), 129.0 (2C), 129.4 (2C, alle +), 132.3 (o), 132.5 (+), 147.6, 167.8 (beide o).

Darstellung von Toluolsulfonsäurephenylhydrazid (78)

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift ausgehend von 2 mmol Toluolsulfonsäure. Ausbeute: 400 mg **77** (1.52 mmol, 76 %).

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (262.4). ^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ = 2.33 (s, 3H), 6.65-6.80 (m, 3H), 7.22-7.40 (m, 4H), 7.80-7.87 (m, 2H).

6.3.4.2 Versuche zu Kapitel 4.2.4.1: Untersuchung der Substratbreite

Zu 1mg Tyrosinase in 2mL Phosphatpuffer und 5 % Cosolvens wurde jeweils 20 mg der verschiedenen Substrate gegeben. Die Lösung wurde bei RT mit Sauerstoff aus einem Ballon belüftet. Die Reaktionen wurden in regelmäßigen Abständen dünnschichtchromatographisch verfolgt. Sofern nach 72 h keine Umsetzung zu beobachten war, wurden die Reaktionen abgebrochen.

6.3.4.3 Versuche zu Kapitel 4.2.4.2: Abfangexperimente

Abfangexperiment mit Ethylacrylat – Bildung von **82**

Eine Lösung von 0.253 mmol **52** (100 mg) und 1.5 mmol Ethylacrylat (150 mg, 6 Äq.) in 50 mL Puffer und 3 mL MeCN wird für 12 h unter Belüftung mit O_2 mit 50 mg Tyrosinase behandelt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von wässriger NaHCO_3 -Lösung auf 8-9 eingestellt und die Mischung wird drei Mal mit je 50 mL EtOAc gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, im Vakuum aufkonzentriert und das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie gereinigt (SiO_2 , CH_2Cl_2 :EtOAc 95:5), Ausbeute 19 mg **82** (0.098 mmol, 39 %) als ein farbloses Öl. Die wässrige Phase wird mit 1 N HCl auf pH 2 angesäuert und drei Mal mit EtOAc extrahiert, wodurch 45 mg **61** (0.147 mmol, 58 %) erhalten werden.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (194.2). ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 1.26 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 2.78 (bd, $J=6$ Hz, 1H, x), 2.95 (dd, $J=6.9, 13.9$ Hz, 1H), 3.10 (dd, $J=4.5, 13.9$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.41 (bdd, $J=4.6, 6.7$ Hz, 1H), 7.18-7.30 (m, 5H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 14.39 (+), 40.80 (-), 61.93 (-), 71.46 (+), 127.1 (+), 128.6 (+, 2C), 129.8 (+, 2C), 136.6 (o), 174.4 (o). GC-MS: $t_{\text{R}} =$

7.331 min, Reinheit >99 %, M= 194 [M]⁺, 176 [M-H₂O]⁺, 91, 65. M ber. für C₁₁H₁₄O₃ 194.0943, gef. 194.0869.

Abfangexperiment mit Crotonsäureethylester - Bildung von **83**

Die Entschützung von 100 mg **52** (0.253 mmol) in Gegenwart von Crotonsäureethylester (150 mg, 1.31 mmol) wird durchgeführt, wie für **82** beschrieben. Nach 15 h werden 12 mg (0.058 mmol, 23 %) **83** als ein Diastereomerenmischung im Verhältnis 9:5.

C₁₂H₁₆O₃ (208.3). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 1.17 (t, *J*=7.1 Hz, 3H), 1.23 (d, *J*=7.2 Hz, 3H major diast.), 1.38 (d, *J*= 7.2 Hz, 3H minor diast.), 2.54 (bd, *J*= 6.1 Hz, 1H min.), 2.70 (bd, *J*=5.1 Hz, 1H maj.), 3.14 (dq, *J*=4.0, 7.1 Hz, 1H maj.), 3.19 (dq, *J*=3.8, 7.2 Hz, 1H min), 4.07 (q, *J*=7.1 Hz, 2H min.), 4.13 (q, *J*=7.2 Hz, 2H maj.) 4.20-4.26 (m, 1H), 7.12-7.30 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 14.1 (+, maj.), 14.2 (+, min.), 14.6 (+, maj.), 17.6 (+, min.), 43.4 (+), 61.5 (-, min.), 61.7 (-, maj.), 74.9 (+, min.), 75.0 (+, maj.), 126.8 (+, maj.), 127.0 (+, min.), 127.8 (+, 2C), 128.2 (+, 2C), 128.3 (+, 2C), 140.6 (o, min.), 142.6 (o, maj.) 174.2 (o). GC-MS: t_R=5.72 min, M=208 [M]⁺, 190 [M-H₂O]⁺, 148, 131, 121, 103, 91 (100), 77, 65.

Abfangexperimente mit Fumarsäurediethylester und Maleinsäurediethylester - Bildung von **84**

Ganz analog wurden aus Fumarsäurediethylester und Maleinsäurediethylester 18 mg (44 %) bzw. 16 mg (40 %) **84** erhalten. Beide Produkte gaben identische GC-MS- und NMR-Spektren, jeweils als Diastereomerenmischungen von 5:4.

C₁₄H₁₈O₅ (266.2). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 1.13 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, major diast.), 1.22 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, maj.), 1.22 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, minor diast.), 1.24 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, min.), 3.03 (bs, 1H, min.), 3.33 (bs, 1H, maj.), 4.02-4.24 (m, 5H), 4.54 (d, *J*=5.7 Hz, 1H, maj.), 4.90 (d, *J*=5.1 Hz, 1H, min.), 7.28-7.38 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 14.1 (+, maj.), 14.2 (+, min.), 14.3 (+, beide diast.), 55.0 (+, min.), 55.7 (+, maj.), 61.6 (-, beide), 61.9 (-, maj.), 62.2 (-, min.), 71.9 (+, min.), 73.4 (+, maj.), 128.1 (+, maj.), 128.2 (+, min.), 128.6 (+, 2C), 128.8 (+, 2C), 129.1 (+, 2C), 129.7 (+, 2C), 133.9 (o, min.), 135.1 (o, maj.) 171.5 (o, min.), 171.6 (o, maj.), 172.6 (o, min.), 172.9 (o, maj.). GC-MS: t_R (maj.) = 6.85 min, M= 248 [M-H₂O]⁺, 193, 164, 147, 136, 119, 91 (100), 77, 65; t_R (min.) = 6.91 min, M= 248 [M-H₂O]⁺, 193, 164 (100), 147, 136, 119, 91, 77, 65. M ber. für C₁₄H₁₈O₅ 266.1154, gef. 266.1164.

6.3.4.4 Versuche zu Kapitel 4.2.4.3: ESR-spektroskopische Messungen

Versuche zur Oxidation von Phenylhydrazid:

Puffer: 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.0.

Substratlösung: 20 mg **52** wurden 20 min. mit 1 mL TFA behandelt, die Säure im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 mL Phosphatpuffer aufgenommen. Die Konzentration der Lösung betrug somit 100 mM.

spin trap-Lösung: 15 mg DMPO in 0.5 mL Puffer, Konzentration 200 mM.

Enzym: 5.56 mg (2340 U)

Cu(OAc)₂-Lösung: 0.40 mg Cu(OAc)₂ und 16.2 µL Pyridin in 2 mL Puffer (Konzentrationen: 1 mM Cu²⁺, 10 mM Pyridin).

Cer-Ammonium-Nitrat-Lösung (CAN): 55 mg Cer-Ammonium-Nitrat in 1 mL Puffer (100 mM).

Direkt vor der Messung wurde das Enzym in 100 µL Puffer mit je 100 µL *spin trap*- und Substratlösung versetzt und 7 Minuten mit O₂ aus einem Ballon belüftet.

Zur Kupferoxidation wurden je 100 µL Kupferlösung, *spin trap* und Substrat 7 Min. mit O₂ behandelt. Die Cer-Oxidation erfolgte ebenfalls mit je 100 µL Cer-Lösung, *spin trap* und Substrat, jedoch ohne Behandlung mit Sauerstoff, diese Probe färbte sich sofort unter Gasentwicklung rotbraun. Als Blindproben wurden je 100 µL Puffer, *spin trap* und Substrat ohne Tyrosinase 7 Min. mit O₂ behandelt.

Darstellung von Boc-Pro-N=N-Ph (**88**)

Zu 0.51 mg Boc-Pro-NHNHPh (**87**, 1.70 mmol) und 143 µL abs. Pyridin (1.75 mmol, 1.03 Äq.) in 10 mL abs. CH₂Cl₂ werden unter Eiskühlung 311 mg NBS (1.75 mmol, 1.03 Äq.) gegeben und 2 h bei RT gerührt. Nach Waschen mit Wasser, 1N HCl, ges. NaHCO₃, Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurden 470 mg **88** (1.55 mmol, 91 %) als tiefrote Flüssigkeit erhalten.

C₁₆H₂₁N₃O₃ (303.4). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.40 (s, 9H), 1.91-2.10 (m, 2H), 2.18-2.39 (m, 2H), 3.50-3.59 (m, 2H), 4.72 (dd, 1H, *J*= 8.6, 4.9 Hz), 7.48-7.56 (m, 3H), 7.82-8.91 (m, 2H); ¹³C-NMR (100.6 MHz): δ= 24.1 (-), 28.5 (3C, +), 30.9, 46.7 (beide -), 60.4 (+), 80.8 (o), 123.8 (2C), 129.6 (2C), 133.9 (alle +), 152.0, 189.8 (beide o). EI-MS: 202 (8) [M-Boc]⁺, 170 (20), 114 (95), 91 (100), 70 (85), 57 (90).

Hydrolyse von 88

Diazen-Lösung: 60 mg 88 in 1 mL abs. Dioxan (200 mM).

Enzym: 1.31 mg (550 U)

Die Mischung aus 50 μ L Diazen-Lösung und 100 μ L *spin trap*-Lösung wurde sofort ESR-spektroskopisch vermessen (Dioxan:Puffer 1:2). Das Signal war 10fach stärker als bei den übrigen Experimenten. Ebenso wurden 100 μ L *spin trap*-Lösung und 50 μ L Diazen zum Enzym gegeben. Hier wurde dasselbe ESR-Spektrum beobachtet, das Radikaladdukt bildete sich aber langsamer. Bei beiden Proben war starke Gasentwicklung zu beobachten.

Analog wurden 100 μ L Diazenlösung mit 100 μ L DMPO in MeOH (124 mM) versetzt, auch dabei wurde dasselbe Addukt beobachtet.

Versuche zur Oxidation von Isoniazid:

Puffer: 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.0.

Isoniazidlösung: 29 mg Isoniazid in 2 mL Puffer (100 mM).

***spin trap*-Lösung:** 30 mg DMPO in 1 mL Puffer, Konzentration 200 mM.

NAD⁺-Lösung: 66 mg in 1 mL Puffer (100 mM)

Enzym: 0.62 mg (260 U)

Cer-Ammonium-Nitrat-Lösung (CAN): 55 mg Cer-Ammonium-Nitrat in 1 mL Puffer (100 mM).

Direkt vor der Messung wurde das Enzym mit je 100 μ L *spin trap*- und Isoniazidlösung versetzt und 7 Minuten mit O₂ aus einem Ballon belüftet. Hierbei konnte kein Radikal beobachtet werden.

Die CAN-Oxidation wurde mit je 100 μ L Isoniazid, *spin trap* und CAN-Lösung ohne Sauerstoffbelüftung durchgeführt. Hierbei wurde eine weiße Trübung und starke Gasentwicklung beobachtet. Diese Probe zeigte das vorne abgebildete 4-Linienspektrum des Hydroxyladdukts (Abb. 26).

Analog wurde das Experiment mit zusätzlich 100 μ L NAD⁺-Lösung durchgeführt, auch hierbei trat die weiße Trübung auf. Bei diesem Experiment wurde das *N*-zentrierte Radikaladdukt beobachtet (Abb. 27).

Blindproben aus je 100 μ L NAD⁺, CAN und *spin trap* bzw. nur aus CAN und *spin trap* zeigten beide das Spektrum des Oxidationsprodukts des DMPO, 2-oxo-5,5-dimethylpyrrolin-*N*-oxid, $a_{\text{H}}^{\text{CH}_2} = 4.0 \text{ G}$, $a_{\text{N}} = 7.3 \text{ G}$.

6.3.4.5 Versuche zu Kapitel 4.2.4.4: Entwicklung einer Modellvorstellung für den Oxidationsschritt

Elektrolytische Phenylhydrazid-entschützung

Eine Lösung von 0.125 mmol Boc-Leu-NHNHPh (**43**) und 0.025 mmol Catechol in 20 mL Phosphatpuffer pH 7.0 und 6 mL Dioxan wurde 6 h mit 0.05 A mit zwei Graphitelektroden elektrolysiert (0.3677 Ah). Der pH-Wert nach beendeter Reaktion betrug 6.0. Die Reaktionslösung wurde drei Mal mit EtOAc gewaschen, durch tropfenweise Zugabe von konz. HCl auf pH 1.5 angesäuert und drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Erhalten wurden 16.2 mg Rohprodukt, nach ¹H-NMR Leucin.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) 0.86 (m, 6H), 1.32-1.76 (m, 3H), 4.93 (d, *J*=8.4 Hz, 1H).

7 Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D^{20}$	Spezifischer Drehwert
Aca	6-Aminocapronsäure
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl-
BP	Benzophenon
BSA	Albumin aus Rinderserum
Da	Dalton
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DHP	Dihydropyran
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMPO	Dimethylpyrrolin-N-oxid
Dopa	3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin
DTT	threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EDC	N ¹ -(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPL	Expressed Protein Ligation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massensepektrometer
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
Et	Ethyl-
FAB	Fast Atom Bombardement
Far	Farnesyl-
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-
FPP	Farnesylpyrophosphat
Ftase	Farnesyl-Transferase
G	Gauss
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	Guanosin Nucleotide Exchange Factor

GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> - tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxy-1-H-benzotriazol Hydrat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDEPT	Melanocyte-directed Enzyme Prodrug Therapy
Me	Methyl-
MESA	2-Mercapto-ethansulfonsäure
MIC	Maleinimidocaproyl-
Mmt	4-Methoxy-triphenylmethyl-
MOZ	<i>p</i> -Methoxy-benzyloxycarbonyl-
NAD	β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBA	3-Nitrobenzoesäure
NBD	4-Nitrobenzofurazyl-
NBS	<i>N</i> -Brom-Succinimid S
NCS	<i>N</i> -Chlor-succinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidinon
NMR	Magnetische Kernresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PalTase	Palmitoyltransferase
PBN	α -Phenyl- <i>tert</i> -butyl-nitron
Ph	Phenyl-
PM	Plasmamembran
PPO	Polyphenol-Oxidase
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -Toluolsulfonat
R _f	Retention
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz

TBAF	Tetra- <i>n</i> -butyl-ammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl-
TIS	Triisopropylsilan
TPD	Trifluormethylphenyldiazirin
Trt	Trityl-
U	Unit
Z	Benzyloxycarbonyl-

8 Literaturverzeichnis

- [1] Elberfelder Bibel, rev. Fassung 1985/91, *Gen.* 9,20f.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [3] R. D. Hancock, R. Viola, *TIBTECH.* **2002**, 20, 299-305.
- [4] W. Bonrath, R. Karge, T. Netscher, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2002**, 19, 67-72.
- [5] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 716-780.
- [6] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, 1, 144-169.
- [7] C. Peters, M. Wagner, M. Völkert, H. Waldmann, *Naturwissenschaften* **2002**, 89, 381-390.
- [8] D. Strack, W. Schliemann, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3907-3911.
- [9] E. I. Solomon, M. J. Baldwin, M. D. Lowery, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 521.
- [10] W. Kaim, J. Rall, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 47-64.
- [11] S. G. Burton, *Catalysis Today* **1994**, 22, 459-487.
- [12] C. W. G. van Gelder, W. H. Flurkey, H. J. Wichers, *Phytochemistry* **1997**, 45, 1309-1323.
- [13] A. Rescigno, F. Sollai, B. Pisu, A. Rinaldi, E. Sanjust, *J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2002**, 17, 207-218.
- [14] G. M. Sapers, R. L. Miller, V. Pilizota, F. Kamp, *J. Food Sci.* **2001**, 66, 362-366.
- [15] L. C. Bouwens, Y. E. Bruggemann, *Organic Process Research & Development* **2002**, 6, 562-568.
- [16] J. L. Boyle, H. M. Haupt, J. B. Stern, H. A. B. Mulhaupt, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2002**, 126, 816-822.
- [17] A. M. Jordan, T. H. Khan, H. Malkin, H. M. I. Osborn, A. Photiou, P. A. Riley, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 1549-1558.
- [18] A. M. Jordan, T. H. Khan, H. M. I. Osborn, A. Photiou, P. A. Riley, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1775-1780.
- [19] C. F. Schoenbein, *Philosophical magazines* **1856**, 11, 137-141.
- [20] F. Kubowitz, *Biochem. Z.* **1938**, 299, 32-57.
- [21] S. Jolivet, N. Arpin, H. J. Wichers, G. Pellon, *Mycol. Res.* **1998**, 102, 1459-1483.
- [22] J. Sassoon, H. Mooibroek, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 56, 613-622.
- [23] W. D. Loomis, *Methods in Enzymology* **1974**, 31, 528-544.
- [24] K. Nishioka, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 85, 137.

- [25] R. L. Jolley, R. M. Nelson, D. A. Robb, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 3251-3257.
- [26] H. W. Duckworth, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1613-1625.
- [27] K. G. Strothkamp, R. L. Jolley, H. S. Mason, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1976**, *70*, 519-524.
- [28] S. Bouchilloux, P. McMahon, H. S. Mason, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 1699-1707.
- [29] R. L. Jolley, D. A. Robb, H. S. Mason, *J. Biol. Chem.* **1968**, *244*, 1593-1599.
- [30] H. J. Wichers, Y. A. M. Gerritsen, C. G. J. Chapelon, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 333-337.
- [31] K. Fujimoto, N. Okino, S. Kawabata, S. Iwanaga, E. Ohnishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7769-7773.
- [32] M. Jiménez, W. L. Maloy, V. J. Hearing, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3397-3404.
- [33] C. Gerdemann, C. Eicken, B. Krebs, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 183-191.
- [34] K. E. van Holde, K. I. Miller, H. Decker, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 15563-15566.
- [35] J. C. Espin, J. van Leeuwen, H. J. Wichers, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3509-3517.
- [36] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084-1090.
- [37] M. E. Cuff, K. I. Miller, K. E. van Holde, W. A. Hendrickson, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 855-870.
- [38] B. Hazes, K. A. Magnus, C. Bonaventura, J. Bonaventura, Z. Dauter, K. H. Kalk, W. G. J. Hol, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 597-619.
- [39] A. Volbeda, W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 249-279.
- [40] H. Decker, R. Dillinger, F. Tucek, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 1591-1597.
- [41] J. C. Espin, Varón R., L. G. Fenoll, M. A. Gilabert, P. A. García-Ruiz, J. Tudela, F. García-Cánovas, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1270-1279.
- [42] E. I. Solomon, P. Chen, M. Metz, S. K. Lee, A. E. Palmer, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 4570-4590.
- [43] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563-2605.
- [44] L. G. Fenoll, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Sevilla, P. A. Garcia-Ruiz, R. Varon, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.* **2001**, *1548*, 1-22.
- [45] L. G. Fenoll, J. N. Rodriguez-Lopez, R. Varon, P. A. Garcia-Ruiz, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 313-320.

- [46] J. N. Rodriguez-Lopez, L. G. Fenoll, M. J. Penalver, P. A. Garcia-Ruiz, R. Varon, F. Martinez-Ortiz, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.* **2001**, 1548, 238-256.
- [47] K. D. Karlin, J. C. Hayes, Y. Gultneh, R. W. Cruse, J. W. McKown, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2121-2128.
- [48] K. D. Karlin, M. S. Nasir, B. I. Cohen, R. W. Cruse, S. Kaderli, A. D. Zuberbuhler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1324-1336.
- [49] E. Pidcock, H. V. Obias, C. X. Zhang, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7841-7847.
- [50] S. W. Taylor, *Anal. Biochem.* **2002**, 302, 70-74.
- [51] H. Decker, F. Tucek, *TIBS* **2000**, 25, 392-397.
- [52] D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4015-4027.
- [53] A. Sánchez-Ferrer, J. N. Rodríguez-Lopez, F. García-Canovas, F. García-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.* **1995**, 1247, 1-11.
- [54] P. L. Holland, K. R. Rodgers, W. B. Tolman, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1999**, 38, 1139-1142.
- [55] W. B. Tolman, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 227-237.
- [56] N. Kitajima, Y. Morooka, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 737-757.
- [57] E. Atherton, D. A. Wellings, in: Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E 22a*, Thieme, Stuttgart, **2002**.
- [58] F. R. Naidier, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, 43, 3-14.
- [59] D. Kadereit, H. Waldmann, *Monatsh. Chem.* **2000**, 131, 571-584.
- [60] I. Heinemann, M. Völkert, H. Waldmann, in *Methods in Molecular Biology* (Band in Vorbereitung) (Hrsg.: C. Niemeyer), **2003**.
- [61] P. Mayerfligge, J. Volz, U. Kruger, E. Sturm, W. Gernandt, K. P. Schafer, M. Przybylski, *J. Pept. Sci.* **1998**, 4, 355-363.
- [62] B. Denis, E. Trifilieff, *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 372-377.
- [63] S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2444-2445.
- [64] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5954-5955.
- [65] E. Waldschmidt-Leitz, K. Kühn, *Chem. Ber.* **1951**, 84, 381 ff.
- [66] H. B. Milne, C. M. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 1742-1743.
- [67] H. B. Milne, J. E. Halver, D. S. Ho, M. S. Mason, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 637-639.

- [68] R. B. Kelly, *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 453-456.
- [69] H. B. Milne, W. D. Kilday, *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 67-&.
- [70] H. B. Milne, W. Kilday, *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 64-&.
- [71] H. B. Milne, C. F. Most, *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 169-&.
- [72] T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, *Lieb. Ann.* **1970**, 740, 31-47.
- [73] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7201-7204.
- [74] F. Stieber, U. Grether, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1142 ff.
- [75] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5677-5680.
- [76] A. N. Semenov, I. V. Lomonosova, V. I. Berezin, M. I. Titov, *Bioorg. Khim.* **1991**, 17, 1074-1076.
- [77] A. N. Semenov, I. V. Lomonosova, V. I. Berezin, M. I. Titov, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 1137-1141.
- [78] G. H. Müller, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), **1998**.
- [79] G. H. Müller, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3549-3552.
- [80] M. Völkert, S. Koul, G. H. Müller, M. Lehnig, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6902-6910.
- [81] nach: *Deutscher Krebsatlas online*, http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame4.htm, Heidelberg, **2003**.
- [82] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1-13.
- [83] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, 100, 57-70.
- [84] M. J. Renan, *Molecular Carcinogenesis* **1993**, 7, 139-146.
- [85] K. M. Dameron, O. V. Volpert, M. A. Tainsky, N. Bouck, *Science* **1994**, 265, 1582-1584.
- [86] A. Wittinghofer, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 933-937.
- [87] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, 39, 4193-4214.
- [88] R. C. Sears, J. R. Nevins, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 11617-11620.
- [89] T. Matozaki, H. Nakanishi, Y. Takai, *Cellular Signalling* **2000**, 12, 515-524.
- [90] M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 1133-1145.
- [91] C. C. Harris, *Carcinogenesis* **1996**, 17, 1187-1198.
- [92] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, 63, 133-139.
- [93] S. Yalovsky, M. Rodríguez-Concepción, W. Gruissem, *Trends in Plant Science* **1999**, 4, 439-445.
- [94] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, 34, 3813-3822.

- [95] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102-13109.
- [96] R. Haklai, M. Gana-Weisz, G. Elad, A. Paz, D. Marciano, Y. Egozi, G. Ben-Baruch, Y. Kloog, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1306-1314.
- [97] A. A. Siddiqui, J. R. Garland, M. B. Dalton, M. Sinensky, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3712-3717.
- [98] J. F. Hancock, K. A. Cadwallader, C. J. Marshall, *EMBO J.* **1991**, *10*, 641-646.
- [99] K. A. Cadwallader, H. Paterson, S. G. Macdonald, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 4722-4730.
- [100] J. Pei, N. V. Grishin, *TIBS* **2001**, *26*, 275-277.
- [101] Q. Dai, E. Choy, V. K. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Seitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15030-15034.
- [102] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*, 69-80.
- [103] A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2475-2487.
- [104] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23269-23276.
- [105] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3252.
- [106] S. Lobo, W. K. Greentree, M. E. Linder, R. J. Deschenes, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41268-41273.
- [107] B. M. Willumsen, A. D. Cox, P. A. Solski, C. J. Der, J. E. Buss, *Oncogene* **1996**, *13*, 1901-1909.
- [108] 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.
- [109] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [110] M. Sinensky, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 203-209.
- [111] Z. Luo, B. Diaz, M. S. Marshall, J. Avruch, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 46-53.
- [112] I. Rubio, U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward, R. Wetzker, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*, 70-82.
- [113] P. McGeady, E. Porfiri, H. Gelb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 145-150.
- [114] E. Porfiri, T. Evans, P. Chardin, J. F. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22672-22677.
- [115] K. Simons, G. van Meer, *Biochemistry* **1988**, *29*, 6197-6202.

- [116] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31-41.
- [117] T. Magee, C. Marshall, *Cell* **1999**, *98*, 9-12.
- [118] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock, R. G. Parton, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 98-105.
- [119] I. A. Prior, A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 368-375.
- [120] G. Milligan, M. Parenti, A. I. Magee, *TIBS* **1995**, *20*, 181-186.
- [121] J. T. Dunphy, M. E. Linder, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 245-261.
- [122] M. D. Resh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*, 1-16.
- [123] J. de Gunzburg, *Cell Biology and Toxicology* **1999**, *15*, 345-358.
- [124] G. J. Clark, J. K. Drugan, R. S. Terrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 1577-1581.
- [125] C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Möröy, O. Müller, *Oncogene* **1998**, *17*, 1769-1776.
- [126] G. Winde, K. W. Schmid, W. Schlegel, R. Fischer, H. Osswald, H. Bunte, *Dis. Colon Rectum* **1995**, *38*, 813-830.
- [127] M. R. Ahmadian, T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 7065-7070.
- [128] C. A. Rowell, J. J. Kowalczyk, M. D. Lewis, A. M. Garcia, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*.
- [129] P. F. Lebowitz, G. C. Prendergast, *Oncogene* **1998**, *17*, 1439-1445.
- [130] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006-3008.
- [131] H. Bayley, *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, **1983**.
- [132] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483-514.
- [133] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [134] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.
- [135] F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1391-1408.
- [136] G. Dormán, G. D. Prestwich, *TIBTECH* **2000**, *18*, 64-77.
- [137] G. B. Schuster, M. S. Platz, *Adv. Photochem.* **1992**, *17*, 69-143.
- [138] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- [139] M. P. Blanton, J. B. Cohen, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2859-2872.
- [140] W. Ying, L. Sepp-Lorenzino, K. Cai, P. Aloise, P. S. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 470-477.
- [141] I. Gaon, T. C. Turek, M. D. Distefano, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8833-8836.

- [142] I. Gaon, T. C. Turek, V. A. Weller, R. L. Edelstein, S. K. Singh, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7738-7745.
- [143] 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.
- [144] T. C. Turek, I. Gaon, D. Gamache, M. D. Distefano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2125-3130.
- [145] T. C. Turek, I. Gaon, M. D. Distefano, C. L. Strickland, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3253-3264.
- [146] T. A. Kale, C. Raab, N. Yu, D. C. Dean, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4373-4381.
- [147] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023-1035.
- [148] K. Kuhn, Dissertation, Universität Karlsruhe (TU), **1999**.
- [149] Y. Hatanaka, U. Kempin, P. Jong-Jip, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5639-5643.
- [150] T. Rühl, L. Hennig, Y. Hatanaka, K. Burger, P. Welzel, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4555-4558.
- [151] M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.*, zur Veröffentlichung angenommen.
- [152] D. J. Owen, K. Alexandrov, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1999**, *38*, 509-512.
- [153] R. Reents, Dissertation, Universität Dortmund, **2002**.
- [154] M. A. Umbreit, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526-5528.
- [155] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [156] E. J. Corey, M. Takeda, U. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4339-4342.
- [157] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176-3177.
- [158] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648-5649.
- [159] A. Tebbe, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, **2001**.
- [160] J. Kuhlmann, A. Tebbe, M. Völkert, M. Wagner, K. Uwai, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*, 2546-2550.
- [161] G. Schmidt, A. Wittinghofer, *FEBS Lett.* **2000**, *474*, 184-188.
- [162] M. Wagner, R. Reents, M. Völkert, P. R. Mruthunjaya, M. H. Gelb, H. Waldmann, J. Kuhlmann, *EMBO J.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

- [163] P. McGeady, S. Kuroda, K. Shimizu, Y. Takai, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26347-26351.
- [164] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, *394*, 337-343.
- [165] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8303-8304.
- [166] C. J. Noren, J. M. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 451-466.
- [167] I. Heinemann, Dissertation, Universität Dortmund, **2003**.
- [168] C. Peters, geplante Dissertation, Universität Dortmund, **2003**.
- [169] R. P. Haugland, H. C. Kang, *US-Patent No. 4774339*, Molecular Probes, Inc., USA, **1988**.
- [170] S. G. Burton, J. R. Duncan, P. T. Kaye, P. D. Rose, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 938-944.
- [171] L. G. Fenoll, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, *IUBMB Life* **2002**, *54*, 137-141.
- [172] nach der "Quality Control Test Procedure" für die Aktivität der Tyrosinase (EC 1.14.18.11) der Firma Sigma, rev. 22.12.1994.
- [173] E. S. Krol, J. L. Bolton, *Chem.-Biol. Intera.* **1997**, *104*, 11-27.
- [174] G. Pandey, C. Muralikrishna, U. T. Bhalearo, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3771-3774.
- [175] N. M. Alexander, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1973**, *54*, 614-621.
- [176] A. Anemura, H. Kitagawa, T. Harada, *J. Biochem.* **1975**, *77*, 575-578.
- [177] M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis* **1981**, 333-356.
- [178] H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911-937.
- [179] N. Wymer, E. J. Toone, *Curr. Opin. Chem. Biol* **2000**, *4*, 110-119.
- [180] S. M. Roberts, *J. Chem. Soc.-Perkin 1* **2001**, *9*, 1475-1499.
- [181] T. Pathak, H. Waldmann, *Curr. Opin. Chem. Biol* **1998**, *2*, 112-120.
- [182] D. Kadereit, H. Waldmann, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367-3396.
- [183] S. M. Roberts, *J. Chem. Soc.-Perkin 1* **1999**, *7*, 1ff.
- [184] K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [185] D. Kadereit, P. Deck, I. Heinemann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1184-1193.
- [186] J. Tsuji, T. Nagashima, N. T. Qui, H. Takayanagi, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1311-1315.
- [187] T.-L. Ho, C. H. Ho, C. M. Wong, *Synthesis* **1972**, 562-563.

- [188] W. R. Bowman, J. A. Forshaw, K. P. Hall, J. P. Kitchin, A. W. Mott, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3961-3972.
- [189] K. Scheffler, H. B. Stegmann, *Elektronenspinresonanz*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1970**.
- [190] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [191] K. J. Reszka, C. F. Chignell, *Chem.-Biol. Intera.* **1995**, *96*, 223-234.
- [192] A. Mazumdar, S. Adak, R. Chatterjee, R. K. Banerjee, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 713-719.
- [193] C. Peters, Persönliche Mitteilung, **2003**.
- [194] B. K. Sinha, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 796-801.
- [195] R. Braslau, M. O. Anderson, F. Rivera, A. Jimenez, T. Haddad, J. R. Axon, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5513-5523.
- [196] S. Bath, N. M. Laso, H. Lopez-Ruiz, B. Quiclet-Sire, S. Z. Zard, *Chem. Comm.* **2003**, 204-205.
- [197] E. G. Janzen, E. R. Davis, C. M. DuBose, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1995**, *33*, S166-S173.
- [198] M. Wilming, K. Johnsson, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2724-2727.
- [199] D. A. Rozwarski, G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs Jr., J. C. Sacchettini, *Science* **1998**, *279*, 98-102.
- [200] N. L. Wengenack, F. Rusnak, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8990-8996.
- [201] M. Nguyen, C. Claparols, J. Bernadou, B. Meunier, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 877-883.
- [202] A. R. Forrester, in *Landolt-Börnstein: Zahlenwerte und Funktionen aus Naturwissenschaften und Technik, Vol. 17d2* (Ed.: O. Madelung), Springer, Berlin, **1989**.
- [203] K. Johnsson, W. A. Froland, P. G. Schultz, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2834-2840.
- [204] H. Wojtasek, Persönliche Mitteilung, **2002**.
- [205] M. Fontecave, J. L. Pierre, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *170*, 125-140.
- [206] D. S. Brown, S. V. Ley, S. Vile, M. Thompson, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1329-1342.
- [207] D. Bar-Sagi, J. R. Feramisco, *Cell* **1985**, *42*, 841-848.
- [208] G. Schmidt, C. Lenzen, I. Simon, R. Deuter, R. H. Cool, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Oncogene* **1996**, *12*, 87-96.

Danksagungen

Diese Arbeit hätte nicht ohne vielerlei Hilfe auf allen Gebieten und von verschiedenen Seiten entstehen können. An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die reizvolle Aufgabenstellung, die freie Hand bei ihrer Bearbeitung und das Vertrauen, das er mir stets entgegengebracht hat.

Interdisziplinäre Projekte können nur in eng verzahnten Kooperationen gelingen, und so danke ich Herrn Dr. Jürgen Kuhlmann und seinen Mitarbeitern Andreas Tebbe, Boriانا Popkistrova und Melanie Wagner für die gute Zusammenarbeit und all das, was ich hier lernen durfte. Herrn Prof. Dr. Manfred Lehnig danke ich für die bereitwillige Übernahme des Coreferates und für seine Mitwirkung bei der ESR-spektroskopischen Untersuchung der Enzymreaktion. Besondere Erwähnung verdient ferner Herr Dr. Hubert Wojtasek für seine kritischen Anfragen, die den Anstoß zu den mechanistischen Untersuchungen gegeben haben. Für die gute Zusammenarbeit auf dem Benzophenon-Projekt schulde ich Dr. Koji Uwai besonderen Dank, und das Phenylhydrazid-Projekt wäre ohne die zweimonatige tatkräftige Mithilfe von Dr. Surrinder Koul nicht annähernd so weit gediehen. Ferner bin ich Carsten Peters für das gemeinsame Kochen auf unserer Seite verbunden, besonders bei der Synthese des BODIPY. Die kompetente Mitarbeit von Sasikala Thavam war mir ebenfalls eine große Hilfe. Schließlich danke ich auch Tatjana Domratcheva für ihre Geduld und Mühe – leider hat unser Projekt es nicht bis in diese Arbeit geschafft.

Rolf, Jantje, Ines, Reinhard, Lars und Carsten danke ich für zahllose hilfreiche Kommentare bei meinen Probevorträgen – daraus habe ich viel gelernt.

Das Labor D3.14 war stets ein Arbeits- und Lebensumfeld, in dem ich mich sehr wohl gefühlt habe, im einzelnen danke ich: Sasi für gute Gespräche über Gott und die Welt, Carsten nicht nur für „Käpt'n Ungeschickt“, Lars für seinen Optimismus und manchen lustigen Bock, Reinhard für die Gabe des *wishful thinking* und seine Diskussionsbereitschaft, Nici für ihre nette Art, Koul für unvergessliche *cakes*, Tatjana dafür, dass sie mir nie auf die Zehen getreten ist, obwohl es zu siebt wirklich eng wurde, zahlreichen Gästen für Ihren Besuch, und als besonderen D3.14-Ehrengästen Elisabeth und Catherine für ungezählte Kuchen.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts möchte ich mich bei Rolf Breinbauer, Lars Wittenberg, Carsten Peters, Svenja Röttger und Boriانا Popkistrova bedanken. Eine besondere Hilfe waren mir die Anregungen von Karsten Kuhn zu Beginn meiner Arbeit, Ines Heinemann und Rolf Breinbauer. Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für stete Diskussionsbereitschaft, für die Disziplin, wodurch das NMR mehr funktionierte als nicht, für TGIFs und DoWaBas, das Mitfeiern unserer Hochzeit und überhaupt.

Womit ich bei Uli angelangt wäre: ohne ihre Geduld, ihr Verständnis und ihr Mit-Tragen im Hintergrund hätte dies alles nicht gelingen können.

Ein Quell steter Heiterkeit war die „Besatzung“ des Labors A 3.14. Besonderer Dank gebührt dem Elefanten für die Begegnung mit ungehörten tonalen Systemen.

Lebenslauf

- Name: Rudolf Martin Völkert
- Geburtstag und -ort: 10.09.1974 in Mannheim
- Staatsangehörigkeit: österreichisch und finnisch
- Familienstand: verheiratet mit Ulrike Völkert, 13.07.2001
- Eltern: Dr. Emil Völkert, Chemiker, Irma Völkert, Hausfrau

SCHULBILDUNG

1980 - 1984	Wallstadtschule (Grundschule)	Mannheim
1984 - 1993	Karl-Friedrich-Gymnasium	Mannheim
11.05.1993	Abitur	

STUDIUM & PROMOTION

Studium der Chemie

1993 - 1999	Technische Universität Clausthal	Clausthal-Zellerfeld
26.02.1996	<i>Diplomvorprüfung</i>	
04/97 – 08/97	<i>Forschungspraktikum an der Universität Helsinki (Helsinki, Finnland), Betreuer: Dr. Vesa Nevalainen</i>	
10/98 – 08/99	<i>Diplomarbeit, Thema: „Zur Synthese eines bicyclischen Amidacetals – Modell eines Wirkstoffs“, Betreuer Prof. Dr. Dieter Kaufmann</i>	
13.08.1999	<i>Diplom</i>	

Doktorand in der Gruppe von Prof. Dr. Herbert Waldmann

10/99 - 07/03	MPI f. molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Dortmund	
	<i>Dissertation: Synthese und biologische Evaluierung photoaktivierbarer menschlicher N-Ras-Peptide und -Proteine</i>	
21.07.2003	<i>Tag der mündlichen Prüfung</i>	

BERUFSTÄTIGKEIT & WEITERBILDUNG

11/91 – 08/93	Aushilfe im Verkauf bei der Fachbuchhandlung Tobias Löffler in Mannheim; Beratung von Kunden, Vorbereitung von Bestellungen, Lagerarbeiten	
02/97 – 04/97	Industriepraktikum bei Boehringer Mannheim, Optimierungsversuche zu einem Betriebsverfahren	