

Synthese und biologische Evaluierung Sterolmodifizierter Hedgehog-Signalpeptide und Proteine

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

Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Carsten Peters
aus Werl / Westfalen

Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2003

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Institut für organische Chemie der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von November 1999 bis Juni 2003 angefertigt.

*Meinen Eltern
und
Nelli*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	2
2.1	Der Hedgehog Signalweg.....	2
2.2	Lipid Rafts.....	8
2.3	Bioorganische Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten/ Ligationsmöglichkeiten	10
2.3.1	Peptid-Synthese	11
2.3.2	MIC-Kopplung	12
2.3.3	Intein-vermittelte Verknüpfung von Polypeptiden	12
2.3.4	Staudinger-Ligation.....	14
2.4	Arrays kleiner Moleküle.....	16
3.	Ziel der Arbeit	19
4.	Spezieller Teil	21
4.1	Synthese der Hedgehog-Peptide.....	21
4.1.1	Allgemeine Vorüberlegungen	21
4.1.2	Versuche zur Synthese mittels des Hydrazinbenzoyllinkers.....	22
4.1.3	Alternative Route zur Synthese der Hedgehog-Peptide.....	25
4.1.4	Synthese der Proteinchimären	33
4.2	Biophysikalische Messungen	39
4.2.1	Intervesikeltransfer-Experimente mit Hedgehog-Peptiden und Hedgehogpeptid-Protein-Konstrukten	39
4.2.2	BIAcore [®] -Experimente mit Hedgehogpeptid-Protein-Konstrukten.....	47
4.2.3	Mikroinjektion der Peptid-Proteinkonstrukte.....	50
4.3	Untersuchungen zum Einbau in Lipid Rafts	52
4.3.1	Festphasensynthese unterschiedlich lipidierter Influenza-Peptide.....	52
4.3.2	Biokalorimetrische Experimente mit den Influenza-Peptiden	57
4.3.3	BODIPY-Synthese	61
4.4	Arrays kleiner Moleküle.....	63
4.4.1	Generelles Konzept	64
4.4.2	Synthese von Aziden	68
4.4.3	Abspaltung vom Harz als Azid	71
4.4.4	Erste Ergebnisse der Immobilisierung	74
5.	Zusammenfassung und Ausblick	76

6.	Experimenteller Teil.....	84
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel	84
6.2	Versuche zu Kapitel 4.1	87
6.2.1	Versuche zu Kapitel 4.1.2	89
6.2.2	Versuche zu Kapitel 4.1.3	95
6.2.3	Versuche zu Kapitel 4.1.4	115
6.3	Versuche zu Kapitel 4.2	116
6.3.1	Versuche zu Kapitel 4.2.1	116
6.4	Versuche zu Kapitel 4.3	118
6.4.1	Versuche zu Kapitel 4.3.1	118
6.4.2	Versuche zu Kapitel 4.3.2	121
6.4.3	Versuche zu Kapitel 4.3.3	122
6.5	Versuche zu Kapitel 4.4	127
6.5.1	Versuche zu Kapitel 4.4.1	127
6.5.2	Versuche zu Kapitel 4.4.2	129
6.5.3	Versuche zu Kapitel 4.4.3	136
7.	Literaturverzeichnis.....	140
8.	Anhang	146

1. Einleitung

Cholesterol wird gerade in den westlichen Industrieländern mit Herz-Kreislauf Beschwerden, insbesondere Arteriosklerose in Verbindung gebracht. Dies sorgt dafür, dass landläufig die Meinung vorherrscht, man solle nach Möglichkeit eine Nahrung zu sich nehmen, die weitgehend auf Fette und Cholesterol verzichtet. Dass Blut, Fett und Leber eines erwachsenen Menschen ständig etwa 300 g Cholesterol enthalten, wird dabei ebenso „vergessen“, wie die beiden Hauptfunktionen dieser Verbindung im Organismus: es ist im Darm an der Resorption der Fettsäuren beteiligt und es ist ein Bestandteil der Zellmembranen. In jüngster Zeit ist noch eine weitere wichtige Funktion entdeckt worden, denn es ist als posttranslationale Modifizierung zur Membranverankerung kovalent an ein Protein gebunden, das in Prozessen der Signaltransduktion während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt.^[1]

Die Untersuchung solcher Prozesse der Signaltransduktion kann mit Hilfe einer Kombination aus Chemie und Biologie erfolgen, bei der beide Disziplinen gewissermaßen eine Art Symbiose eingehen, welche zum Gebiet der „Chemischen Biologie“ geführt hat.^[2] In dieser ist ein wesentlicher Ansatz, durch Methoden der modernen präparativen organischen Chemie biologisch relevante Verbindungen darzustellen. Diese werden anschließend in biologischen Testsystemen auf ihre Wirkung hin untersucht. Dies geschieht sowohl an komplexen Systemen, wie zum Beispiel ganzen Zellen als auch einfacheren Modellen. Während erstere den Vorteil bieten, den Einfluss der synthetisierten Substanzen auf ganze Systeme zu erforschen, können bei Verwendung von vereinfachten Modellen bestimmte Parameter (wie zum Beispiel kinetische Daten) *en detail* bestimmt werden. Hierbei können Erkenntnisse gewonnen werden, die bei Anwendung konventioneller biologischer Techniken nur sehr schwer beziehungsweise gar nicht zugänglich wären. Neben dem Studium und der Aufklärung grundlegender molekularer Prozesse rückt inzwischen die Suche nach Substanzen in den Vordergrund, die bestimmte Abläufe gezielt inhibieren oder stimulieren. Ein wesentlicher Gegenstand dieser Untersuchungen ist die biologische Signaltransduktion, in der eine Vielzahl von zum Teil lipidmodifizierten Proteinen involviert ist. Hierbei sind die Lipidmodifizierungen essentiell für die korrekte Funktionsweise des jeweiligen Proteins.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Synthese sterolmodifizierter Peptide und entsprechender Peptid-Proteinkonjugate sowie ihre Untersuchung sowohl an Modellsystemen als auch unter *in vivo*- Bedingungen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Der Hedgehog Signalweg

*Er hatte wie alle Zyklopen nur ein einziges funkelndes Auge auf der Stirn,
Beine wie tausendjährige Eichenstämme und Arme und Hände,
groß und stark genug, um mit Granitblöcken Ball zu spielen.*

HOMER, IRRFAHRTEN DES ODYSSEUS

In früheren Zeiten zeichnete Homer das Bild von den einäugigen Zyklopen als erschreckende und schreckliche Monster. Wir wissen nicht, ob Homer eventuell durch die Beobachtung von fehlgebildeten Neugeborenen beim Verfassen seiner Epen inspiriert worden sein mag. In heutiger Zeit jedoch erkennen wir Neugeborene mit Zyklopie, einem einzelnen großen Auge auf der Stirn, als Opfer eines Fehlers während der Entwicklung des Vorderhirns.

Das Auftreten von Zyklopie und milderer Formen dieser Krankheit, die Holoprosenzephalie (HPE) genannt wird, ist zurückzuführen auf eine nicht korrekte Teilung des Vorderhirns während der Embryonalentwicklung. In milden Fällen ist der Phänotyp durch einen einzigen oberen mittleren Schneidezahn gekennzeichnet, extreme Fälle hingegen, sind zum Beispiel durch ein einziges Auge in der Mitte des Gesichts gekennzeichnet und nicht lebensfähig.

Die Ursache dieser Krankheit kann zum einen genetische Gründe haben, zum anderen aber auch durch bestimmte Teratogene hervorgerufen werden: so fanden in den sechziger Jahren KEELER und BINNS, dass HPE durch die Alkaloide Cyclopamin und Jervin (Abb. 1) induziert wird,^[3, 4] die Inhibitoren der Cholesterol-Biosynthese darstellen.

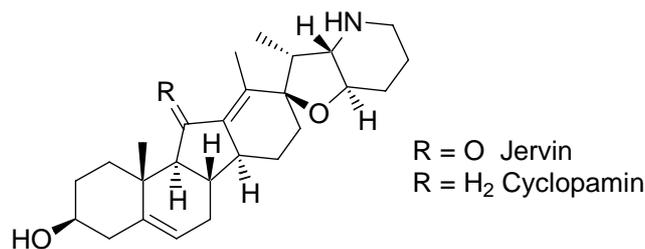


Abbildung 1: Struktur der Alkaloide Cyclopamin und Jervin.

Bei Lämmern von Mutterschafen, die während der Tragezeit *Veratrum californicum* gefressen hatten, traten Missbildungen auf (Abbildung 2), was auf das Vorhandensein der oben genannten Alkaloide in den Pflanzen zurückgeführt werden konnte.

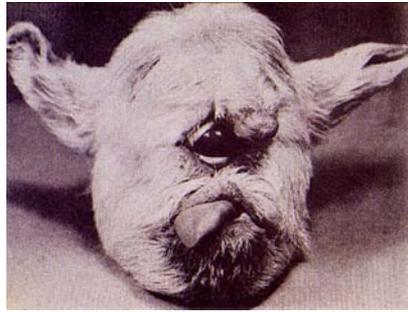
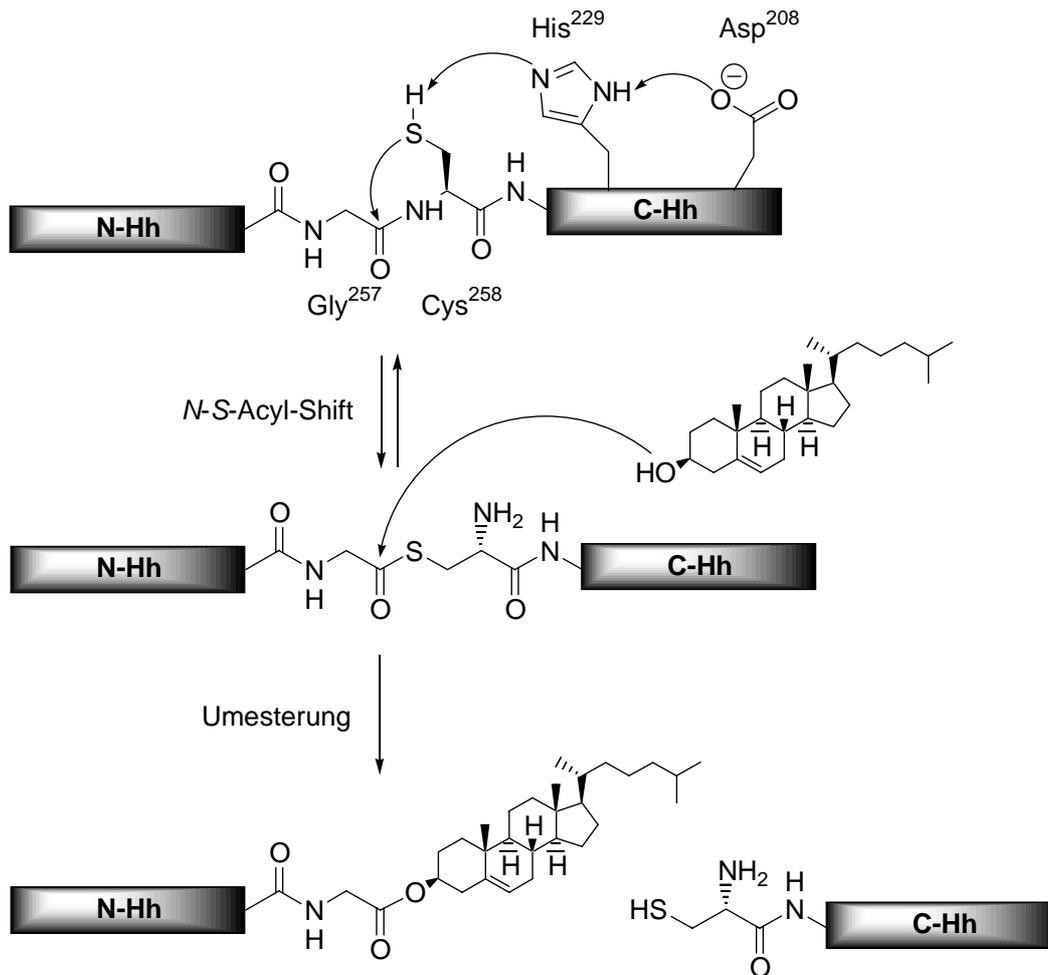


Abbildung 2: zyklopisches Lamm, bedingt durch *Veratrum californicum*.^[3, 4]

Ende der neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass neben ihrem Einfluss auf die Cholesterol-Biosynthese auch die Wirkung eines bestimmten Proteins durch diese Teratogene inhibiert wird.^[5] Bei diesem Protein handelt es sich um das Hedgehog-Protein, welches ein extrazelluläres Signalprotein darstellt und für eine ganze Reihe von Vorgängen während des Wachstums und der Differenzierung in Wirbeltieren und Wirbellosen verantwortlich ist.^[6] In der Fruchtfliege *Drosophila* liegt ein Homolog vor, wohingegen man in Mäusen drei Homologe findet: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh), wobei ersteres das am besten untersuchte Homolog darstellt. Es zeichnet unter anderem für die Morphogenese von Organen, wie Zähnen, Haaren und Bronchien sowie für die Differenzierung der Zellen von Gliedmaßen und Nervengewebe verantwortlich, so dass bei Unterbrechung oder Störung des Signalwegs die oben beschriebene HPE zu beobachten ist.

Mechanistische Basis der posttranslationalen Modifizierung des Hedgehog-Proteins

Komplexität ist auf jeder Stufe des Hedgehog-Signalwegs allgegenwärtig und beginnt bereits bei der Biosynthese des Proteins. Das Hedgehog-Protein wird exprimiert als ein ungefähr 45 kDa großer Vorläufer, der einen internen Spaltungsprozess erfährt, in dem ein etwa 19 kDa schweres *N*-terminales (N-Hh) Fragment und ein 25 kDa schweres *C*-terminales Fragment (C-Hh) prozessiert wird, wobei der *C*-Terminus von N-Hh mit Cholesterol verestert wird.^[1, 7] Dabei zeigt N-Hh alle bekannten Signalaktivitäten des Hedgehog-Proteins, während C-Hh für die Prozessierungsreaktion verantwortlich ist (Schema 1).^[8, 9]



Schema 1: Posttranslationale Einführung des Cholesterols; N-Hh: Hh-Signaldomäne, C-Hh: Hh-Autoprozessierungsdomäne.

Die Tatsache, dass aufgereinigtes Protein bakteriellen Ursprungs *in vitro* den Spaltungsprozess ausführen kann, ist ein Beleg für dessen autoproteolytischen Ablauf. Dass er zudem intramolekular abläuft, wird durch die konzentrationsunabhängige Kinetik dieses Schritts belegt.^[10] Durch Kristallstrukturanalysen und Mutageneseexperimente wurden die am Autoprozessierungsschritt beteiligten Reste der aktiven Tasche identifiziert.^[11] Weitere biochemische Analysen führten zu dem folgenden Modell eines Zwei-Schritt-Prozesses (Schema 1). Zunächst greift die Thiol-Gruppe des Cysteins²⁵⁸ in einem nucleophilen Angriff die Carbonyl-Gruppe des benachbarten Glycins²⁵⁷ an, woraus ein Thioester-Intermediat resultiert. Dieses wird in einem zweiten Schritt vermutlich durch die 3β-Hydroxygruppe des Cholesterols angegriffen, so dass eine C-terminal am Glycin²⁵⁷ mit Cholesterol veresterte Hedgehog-Signaldomäne (N-Hh^{chol}) und eine Hedgehog-Autoprozessierungsdomäne (C-Hh) entstehen.^[1, 12] Dieser zweite nucleophile Angriff des Cholesterols kann in zellfreien Systemen auch durch andere Nucleophile wie zum Beispiel DTT bewerkstelligt werden,

während es *in vivo* eine Spezifität für Cholesterol geben muss, da es bei Mangel an Cholesterol zu einer Blockierung des Autoprocessingsschrittes kommt.^[13] Der Ort dieser Autoprocessingung scheint früh im Signalweg zu liegen, entweder innerhalb des endoplasmatischen Retikulums oder kurz nach dem Eintritt in den Golgi-Komplex. Neben der C-terminalen Veresterung mit Cholesterol wurde kürzlich auch noch von einer zweiten Lipidmodifizierung berichtet, die in Form eines Palmitoylrestes an den N-Terminus der Hh-Signaldomäne eingefügt wird.^[14]

Eine Konsequenz der Cholesterol-Modifizierung ist die Membranassoziation von N-Hh^{chol}; so wurde nach Expression in Gewebe-Kulturen kaum frei diffundierendes N-Hh^{chol} im Medium gefunden, da der größte Teil des Proteins mit den Zellmembranen assoziiert ist.^[7, 8, 10] Durch Einbau eines Stop-Codons an der Spaltungstelle wurde ein unmodifiziertes Protein N-Hh^{unmod} generiert, das effizient von den Zellen sekretiert wird.^[7, 8, 10] Diese Resultate stellen einen scheinbaren Widerspruch zwischen der angenommen weitreichenden Aktivität von N-Hh^{chol} als Morphogen dar und brachten die Frage auf, welche Rolle der Cholesterol-Anker *in vivo* spielt. Im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung wurde die Bedeutung der Cholesterol-Modifizierung durch Expression des unmodifizierten Proteins N-Hh^{unmod} in *Drosophila* untersucht, wobei eine gesteigerte Aktivität mit ungewöhnlich weitreichendem Radius festgestellt wurde. Daher scheint es so, als ob Cholesterol zur räumlichen Lokalisierung des Signals erforderlich wäre. Obwohl ähnliche Experimente in Mäusen zu dem entgegengesetzten Ergebnis führten, ist ersichtlich, dass die Cholesterol-Modifizierung des Proteins absolut notwendig für dessen korrekte räumliche Verteilung nicht aber für dessen Signalaktivität ist.

Während gezeigt wurde, dass N-Hh^{chol} in Zellkultur-basierten Assays eine höhere Aktivität zeigt als N-Hh^{unmod}, ist nicht ersichtlich, ob dies ein direkter Effekt des Cholesteryl-Ankers ist oder eventuell durch die zweite Lipidmodifizierung in Form einer N-terminalen Palmitoylierung bedingt ist.^[14, 15] Dies liegt auch darin begründet, dass diese Steigerung der Aktivität nicht mit einer stärkeren Bindung an den Hedgehog-Rezeptor Patched (Ptc) einhergeht. Zusätzlich zur Steigerung der Aktivität können Palmitoylgruppen zur Unterstützung des Cholesterols bei der Membranverankerung des Hedgehog-Proteins dienen und eventuell seine Lokalisation in so genannten *lipid rafts* (siehe auch Abschnitt 2.2) steuern. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass palmitoyliertes N-Hh^{chol} stärker an Membranen bindet als unpalmitoyliertes,^[14] und darüber hinaus ist für die Assoziation mit *lipid rafts* eine doppelte Lipidmodifizierung erforderlich, während eine einfache nicht ausreichend ist.^[16]

Der Signalweg des Hedgehog-Proteins

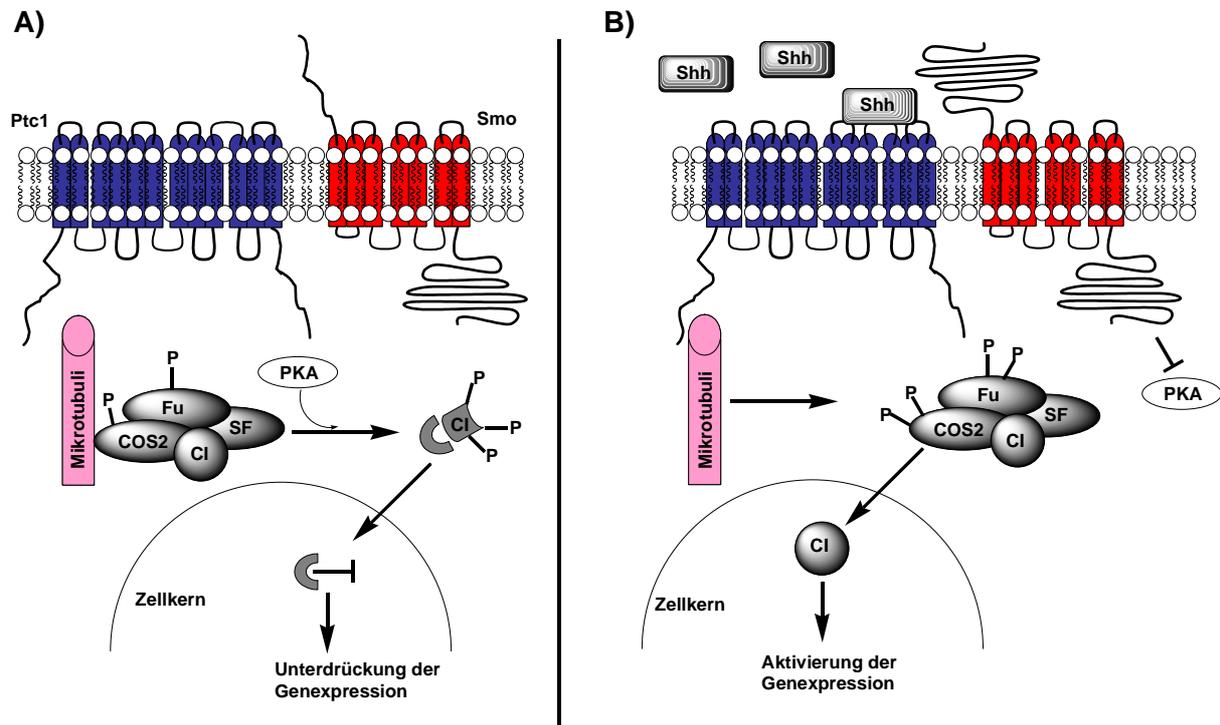


Abbildung 3: Modell des Hedgehog-Signalwegs: A) ohne Shh, B) mit Shh. Ptc1= Patched; Smo= Smoothened; PKA= Protein Kinase A; COS2= Costal 2; Fu= Fused; SF= Suppressor von Fused; CI= Cubitus interruptus; Shh= Sonic Hedgehog.

Die Erkennung des Hh-Signals an der Plasma-Membran der Empfängerzelle erfordert die Aktivität zweier Transmembranproteine (Abbildung 3): Patched (Ptc) enthält zwölf Transmembrandomänen und erinnert strukturell an einen Ionenkanal. Genetische Analysen in *Drosophila* haben ergeben, dass es sich bei diesem Protein um einen negativen Regulator des Hh-Signalwegs handelt, der für die Limitierung der Diffusion von Hh und zur Unterdrückung der Induktion der Hh-Zielgene erforderlich ist.^[17] Bei Wirbeltieren werden die zwei Homologen Ptc1 und Ptc2 gefunden, wobei Ptc2 mit dem Dhh-Signalweg assoziiert zu sein scheint.^[18] Als Antwort auf ein eintreffendes Hh-Signal werden die *ptc*- respektive *ptc1*-Transkripte hochreguliert und agieren somit als eine Art negative Rückkopplung zur Restriktion des Hh-Signals. Interessanterweise enthält Ptc eine für Sterole sensitive Domäne (SSD, *sterol sensitive domain*), welche auch in anderen Enzymen vorkommt, die Cholesterol metabolisieren.^[19] Daher wird angenommen, dass die teratogenen Alkaloide (*vide supra*) nicht die Sterol-Modifizierung während der Autoprozessierung inhibieren, sondern mit der SSD von Ptc1 interagieren und so die Signalweiterleitung unterbrechen.^[5, 20]

Das zweite Transmembranprotein ist Smoothened (Smo), das sieben Transmembrandomänen besitzt und als positiver Regulator des Signalwegs identifiziert wurde. Seine Struktur ist ähnlich den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und enthält vermutlich Phosphorylierungsstellen für die Protein Kinase A (PKA) an ihrem C-Terminus.^[21, 22] Das Smo-Protein bindet nicht an Shh^[23] und partizipiert auch nicht an dessen Bindung an Ptc1, welche auch in Abwesenheit von Smo stattfinden kann.^[22] Man kann sich das Zusammenspiel von Ptc1 und Smo so vorstellen, dass ohne Shh die Wirkung von Smo durch Ptc1 inhibiert wird und dass nach Bindung von Shh an Ptc1 dieses wahrscheinlich eine konformative Änderung durchläuft und so nicht mehr in der Lage ist Smo zu inhibieren. Nachgeschaltet wird in der Abwesenheit eines Hh-Signals Cubitus interruptus (Ci), welches im Cytoplasma als Komplex mit weiteren Proteinen vorliegt, proteolytisch zu einer Repressorform prozessiert und somit die Genexpression der Hh-Zielgene wie zum Beispiel *ptc* inhibiert.^[24] Anstelle der Zielgene kommt es zu einer Transkription der *hh*-Gene, so dass eine positive Rückkopplung erfolgt. Als Antwort auf eine Stimulation der Zelle mit Hh kommt es vermutlich zu einer Inhibition der PKA durch Smo, so dass der Spaltungsprozess von Ci blockiert wird und es zu einer Transkription der Hh-Zielgene kommt.^[25]

Nachdem nun beschrieben worden ist, welche Konsequenzen sich aus dem Eintreffen eines Hh-Signals in der Empfängerzelle ergeben, bleibt zu klären, wie ein solch lipophiles Protein in der Lage ist, aus der Plasmamembran herausgelöst zu werden, um mehrere Zelldurchmesser entfernt als *Morphogen* zu wirken.^[26] Dieser Prozess ist noch nicht vollständig verstanden, aber genetische Untersuchungen in *Drosophila* haben ein daran beteiligtes Protein identifiziert: es handelt sich um Dispatched (Disp), ein Transmembranprotein mit vermutlich 12 Transmembrandomänen und einer SSD.^[27] Es scheint bei der Sekretion von N-Hh^{chol} eine wichtige Rolle zu spielen, da in *Disp*-Mutanten N-Hh^{chol} nicht herausgelöst, sondern stattdessen in den produzierenden Zellen akkumuliert wird. Ferner werden Hedgehog-Proteine mit nicht-sterolischen Ankern, wie einer Transmembrandomäne (N-HhTM) oder Glycosylphosphatidylinositol (N-Hh^{GPI}), auch in der Anwesenheit von Disp nicht aus der Plasmamembran herausgelöst, sondern zeigen ihre Signalwirkung nur bei unmittelbar benachbarten Zellen.

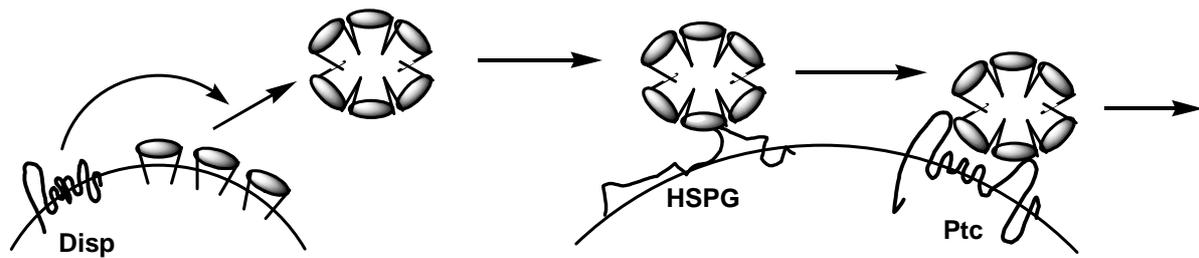


Abbildung 4: Herauslösen und Bewegung des lipidmodifizierten Hh.

Die Sekretion von N-Hh^{chol} (mit Palmitoylierung) benötigt Disp möglicherweise zur Überwindung der Membranaffinität der beiden Lipidanker (Abbildung 4). Kürzlich wurde beschrieben, dass N-Shh^{chol} in Lösung hexamerisiert, wobei die Lipidmodifizierungen nach innen gewandt sind und somit die Wasserlöslichkeit erhöht wird, was die Diffusion erleichtert.^[15] Einmal aus der Plasmamembran herausgelöst, bewegt sich N-Hh^{chol} von einer Zelle zur anderen entlang von *Heparansulfat-Proteoglycanen* (HSPG).^[28]

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Signaltransduktion des Hedgehog-Proteins und der Bildung von Konzentrationsgradienten weit entfernt ist von einfacher Diffusion. Durch eine Vielzahl von Interaktionen mit anderen Komponenten erreichen die cholesterolmodifizierten Hedgehog-Proteine ihr „Zielgebiet“ und wirken dort hochpräzise und durch unterschiedlichste Rückkopplungsprozesse gestützt. Bis zur genauen und lückenlosen Aufklärung des Signalwegs wird aber noch eine umfangreiche Forschungsarbeit zu leisten sein.

2.2 Lipid Rafts

Durch Studien der Zusammensetzung der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran wurde festgestellt, dass die verschiedenen Lipide unsymmetrisch zwischen der äußeren und inneren Schicht der Plasmamembran verteilt sind.^[29] Es finden sich kleine Bereiche in der äußeren Schicht der Plasmamembran, die aus Sphingolipiden und Cholesterol zusammengesetzt sind und mit in der inneren Schicht vorhandenen Phospholipiden und Cholesterol verbunden sind. Diese Bereiche nennt man *lipid rafts* und sie sind einerseits fluid, andererseits aber durch ihre laterale Organisation auch geordneter und enger gepackt als die umgebende Lipid-Doppelschicht. Der Unterschied in der Packungsform liegt darin begründet, dass die in den *rafts*-Strukturen vorkommenden Sphingo- und Phospholipide mehr gesättigte

Kohlenwasserstoffketten aufweisen als die Phospholipide in der flüssig-kristallinen Phase der übrigen Lipidschicht.^[30] Somit erweitert das Vorhandensein von Mikrodomänen höherer Ordnung das klassische Fluid-Mosaik-Modell der Membranen nach SINGER und NICHOLSON in ein komplexeres System, in dem Proteine und *lipid rafts* lateral innerhalb einer zweidimensionalen Flüssigkeit diffundieren. Eine der wichtigsten Eigenschaften der *lipid rafts* ist die Fähigkeit, Proteine in unterschiedlichem Maß ein- respektive auszuschließen und somit eine Selektivität zu erzeugen.

Das Cholesterol übernimmt die Funktion eines Abstandhalters zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Spingolipide und dient somit als eine Art dynamischer Klebstoff, welcher die *rafts* zusammenhält. Ein wichtiges Kriterium, ob ein Protein *raft*-assoziiert ist, ist die Assoziation mit Detergens-resistenten Membranen.^[31] Nach Solubilisierung der Membranen oder Zellen mit Triton X-100 oder CHAPS bei 4°C bleiben die *raft*-assoziierten Lipide und Proteine unlöslich. Wenn Cholesterol mit Hilfe von Cyclodextrin entfernt wird, werden die *raft*-assoziierten Proteine in den meisten Fällen detergenslöslich.

Die Synthese von Cholesterol und Ceramid, dem hydrophoben Rückgrat der Sphingolipide findet im endoplasmatischen Retikulum statt. Im Golgi-Komplex werden die Kopfgruppen der Sphingolipide auf die Ceramide gesetzt und auch die *lipid rafts* zusammengebaut.^[29] Diese bewegen sich vom Golgi-Komplex zur Plasma-Membran, wo es einerseits zu einer Aufkonzentrierung und andererseits zu einer Verteilung in „endocytotische Recycling-Wege“ kommt.^[32] Die Konzentrationen von Cholesterol und Sphingolipiden sind streng reguliert und limitieren somit den Nachschub von *lipid rafts* zu den Zellorganellen.

Caveolae

Ein Teil der *lipid rafts*, der in Einbuchtungen der Zelloberfläche gefunden wird, wird *caveolae* genannt. Hierbei handelt es sich um kolbenförmige Einbuchtungen, die von *lipid rafts* durch Polymerisation von Caveolin gebildet werden, einem palmitoylierten integralen Membranprotein, welches stark an Cholesterol bindet. Ähnlich den *lipid rafts* sind *caveolae* dynamische Strukturen, die gemeinhin an der Zelloberfläche befestigt sind. Sie dienen dazu, *raft*-Proteine zu lagern und herunterzuregulieren oder auch als Reservoir für *rafts*. Ein physiologisches Beispiel ist die Inaktivierung von eNOS: nach der Aktivierung wird dieses Enzym in die *caveolae* bewegt, wo es herunterreguliert wird.^[33]

Lipid rafts in der Signal-Weiterleitung

Die wichtigste Rolle, die den *lipid rafts* auf der Zelloberfläche zugeschrieben wird, ist ihre Funktion in der Signaltransduktion. Hierbei sollen sie sozusagen die Funktion von Reaktionsräumen übernehmen, in denen die Reaktionspartner in hoher Konzentration vorliegen: sie schaffen somit eine Mikroumgebung, in der Rezeptor und Ligand miteinander interagieren können und wo gleichzeitig der resultierende Signalkomplex nicht mit nicht-*raft* assoziierten Enzymen reagieren kann. So konnten *lipid rafts* bisher in einer Vielzahl von Signalprozessen identifiziert werden, wie zum Beispiel bei Immunglobulin E-^[34], T-Zell Rezeptor-^[35] und GDNF-^[36] und auch dem Ras-Signalweg^[37-39]. Des Weiteren werden auch die Hedgehog-Signalproteine mit *lipid rafts* in Verbindung gebracht.^[40] Wenn der Cholesterolrest durch einen GPI-Anker ersetzt wird, ist das Protein noch immer *raft*-assoziiert, wird aber nicht länger von der Oberfläche der Hedgehog exprimierenden Zellen freigesetzt.^[27] Das Vorhandensein von *lipid rafts* in diesem Signalprozess scheint im Vergleich mit den oben beschriebenen vollkommen verschieden zu sein und ist bis jetzt nicht endgültig geklärt.

2.3 Bioorganische Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten/ Ligationsmöglichkeiten

Die Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten stellt ein sehr wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung von Signaltransduktionswegen dar, das ermöglicht maßgeschneiderte Proteine darzustellen, die unter *in vivo* Bedingungen nicht oder schwer zugänglich sind.^[41] So können beispielsweise Lipidmodifizierungen gezielt eingeführt oder auch fluoreszenzmarkierte Proteine zugänglich gemacht werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Lipopeptide selbst als Hilfsmittel zur Aufklärung komplexer Prozesse der Signaltransduktion auf molekularer Ebene heranzuziehen. So konnten mit unterschiedlich modifizierten Peptiden mit der Sequenz der C-Termini von H- respektive N-Ras biophysikalische Daten zur Membranbindung gewonnen werden.^[42-45] Der folgende Abschnitt soll einen knappen Einblick geben, welche Möglichkeiten zur Synthese von Lipopeptiden und deren Verknüpfung mit Proteinen bestehen.

2.3.1 Peptid-Synthese

Es gibt zahlreiche Standardwerke, die sich mit generellen Prozeduren der Peptidchemie in Lösung und am polymeren Träger sowie mit geeigneten Schutzgruppenmustern beschäftigen.^[46] Daher soll im Folgenden nur kurz erläutert werden, wie lipidierte Peptide mit Hilfe der Festphasensynthese prinzipiell aufgebaut werden können, um in Ligationsreaktionen erfolgreich eingesetzt zu werden. Generell stehen bei der Festphasensynthese zwei unterschiedliche Ansätze zur Verfügung. Der erste Ansatz ist die komplette Synthese des Lipopeptids am polymeren Träger, die eine exakt aufeinander abgestimmte Schutzgruppenstrategie erfordert und bei der nach Abspaltung von der Festphase das Peptid in seiner finalen Form vorliegt. Zum Beispiel ist dabei zu beachten, dass die Einführung eines Palmitoylrestes einen basenlabilen Thioester erzeugt, wohingegen Prenylreste, die eine weitere häufig vorkommende Lipidmodifizierung darstellen, extrem säureempfindlich sind (Abbildung 5). Ferner kommt es bei Behandlung von cysteinischen Thioestern mit starken Basen zu Eliminierung, die in der Bildung von Dehydroalaninen mündet.

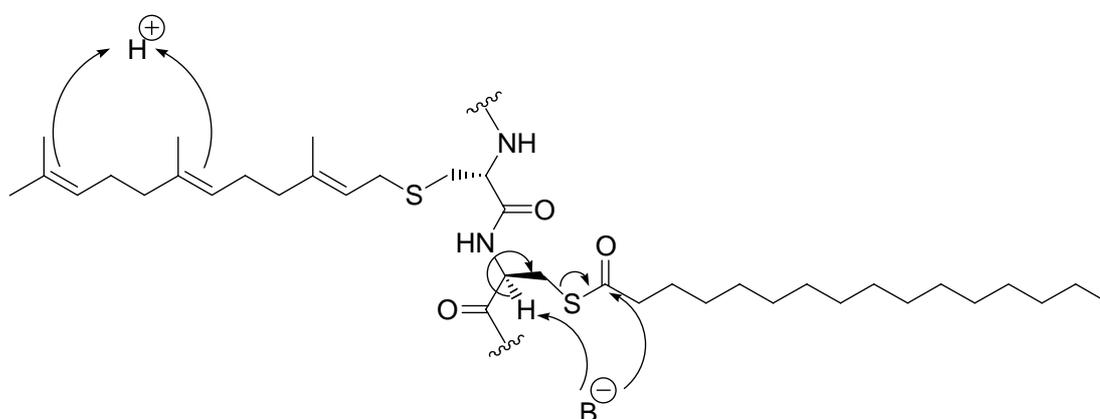


Abbildung 5: Basen- und Säurelabilität lipidmodifizierter Peptide.

Einen effizienten Zugang zu palmitoylierten und zugleich farnesylierten Peptidmethylestern ermöglicht die Verwendung des Hydrazinobenzoyllinkers.^[47] Gleichzeitig erlaubt dieser Linker die Synthese *N*-terminal Maleinimidcaproyl(MIC)-modifizierter Peptide (siehe Abschnitt 2.3.2), wohingegen die Generierung von Bausteinen für die *expressed protein ligation* (EPL) nicht möglich ist, da eine Synthese *N*-terminal freier Peptide nicht gelingt. Dies ist vermutlich auf eine Komplexierung des Oxidationsmittels $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ zurückzuführen. Der zweite Ansatz verfolgt die Strategie der partiellen Synthese am polymeren Träger. Hierbei werden nur zentrale unmodifizierte Bausteine mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese

erzeugt und nach Abspaltung in geschützter Form mit entsprechend lipidierten Bausteinen in Lösung verknüpft.^[48] Darüber hinaus ist es auch möglich diese entsprechenden Bausteine schon während der Festphasensynthese einzuführen.

In jüngster Zeit zeigten MUIR et al. die Synthese eines vierfach phosphorylierten Analogons des Typ I TGF β -Rezeptors durch Kombination von eukaryontischer Expression und organischer Festphasenpeptidsynthese.^[49] Das Peptid wurde mit Hilfe des Sulfamylbutyryl-Linkers^[50] aufgebaut, am Polymer phosphoryliert und anschließend als Benzylthioester abgespalten, um mit dem exprimierten Protein in einer EPL verknüpft zu werden.

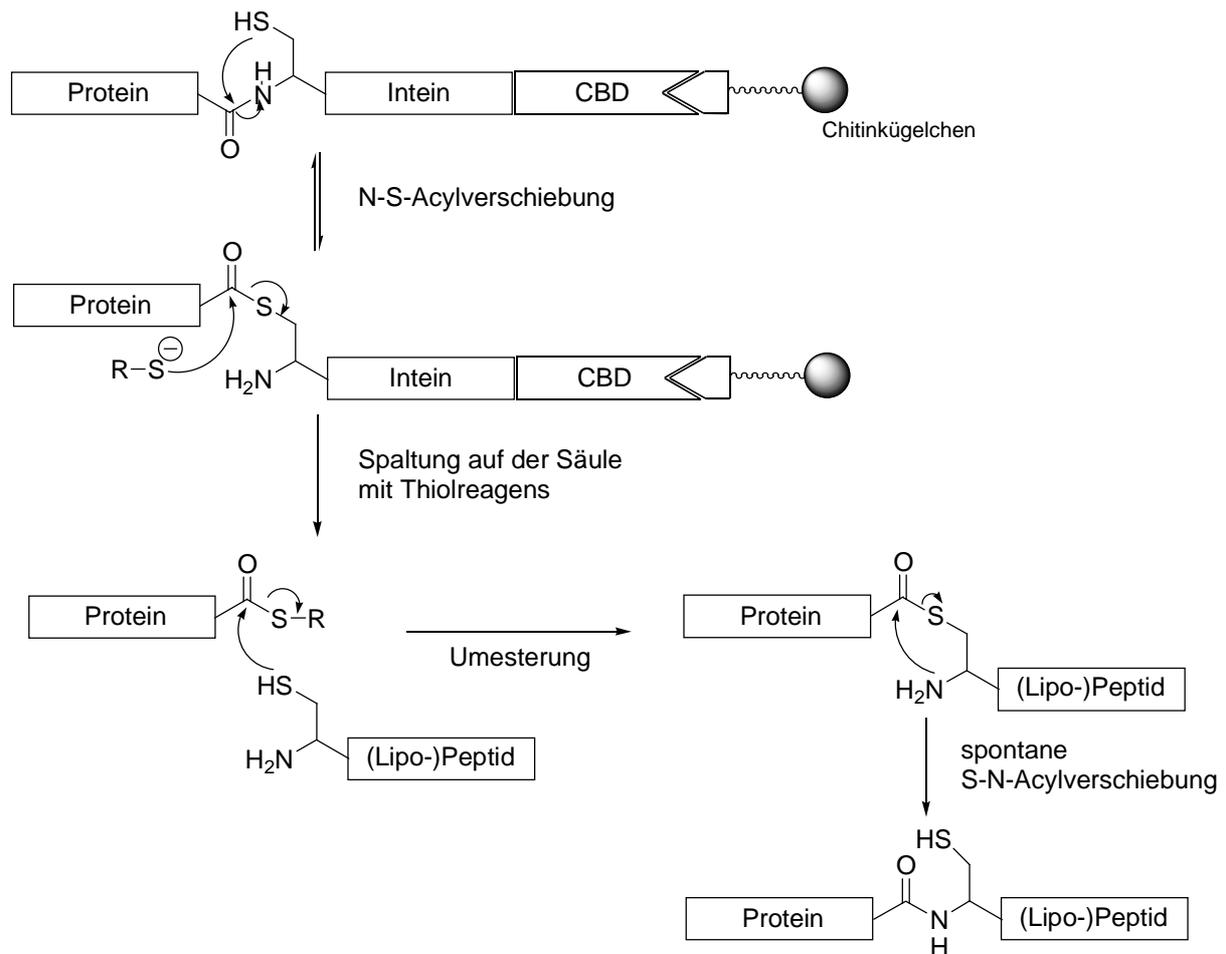
2.3.2 MIC-Kopplung

Bei der Verknüpfung von Lipopeptiden und Proteinen über eine Maleinimidocaproylgruppe (MIC) wird durch die Reaktion einer Thiol-Gruppe eines am Protein befindlichen Cysteins mit dem am Lipopeptid befindlichen MIC an der Ligationsstelle eine Thioetherbindung erzeugt.^[51] Der Einbau der Maleinimidocaproylmodifizierung in das Lipopeptid kann problemlos während der Synthese am polymeren Träger als auch in Lösung erfolgen und ist lediglich bei Verwendung Palladium(0)-labiler Schutzgruppen wie Alloc oder Allylestern nicht möglich, da die zur Abspaltung verwendeten Nucleophile mit dem doppelten Michael-Akzeptor-System des MIC in Reaktion treten würden. Dem gegenüber ist die Methode im Hinblick auf das Protein eingeschränkt, da gewährleistet sein muss, dass nur das endständige Kopplungscystein reagiert und weitere vorhandene Cysteine entweder als Disulfide vorliegen oder aufgrund ihrer räumlichen Anordnung nicht reagieren können. Ein erfolgreiches Beispiel für eine solche Ligation stellt die Synthese von Ras-Proteinen dar, die in hoher Reinheit im Multimilligramm-Maßstab erhalten werden konnten.^[52, 53] Die so erzeugten Proteine zeigten trotz der nicht nativen Verknüpfungsstelle eine biologische Aktivität, die mit der von natürlichen Proteinen übereinstimmte.

2.3.3 Intein-vermittelte Verknüpfung von Polypeptiden

Vor 15 Jahren wurden zwei bis dahin voneinander unabhängiger Forschungsfelder kombiniert, das Protein-Spleißen und die Protein-Semisynthese. Hieraus wurde eine neue Methode entwickelt, die als Intein-vermittelte Proteinverknüpfung (*intein-mediated protein ligation*, IPL)^[54, 55] respektive als Verknüpfung exprimierter Proteine (*expressed protein*

ligation, EPL)^[56-59] bezeichnet wurde. Nahezu zeitgleich wurde der Mechanismus des Protein-Spleißens aufgeklärt und ein Verfahren zur Protein-Semisynthese über native chemische Verknüpfung (*native chemical ligation, NCL*) entwickelt.^[60, 61] Bei dieser wird ein peptidischer Thioester mit einem zweiten Peptid, das *N*-terminal ein freies Cystein trägt, gemischt und in einer hochselektiven und äußerst effizienten Umlagerungsreaktion werden die beiden Bausteine über eine Peptidbindung verknüpft.



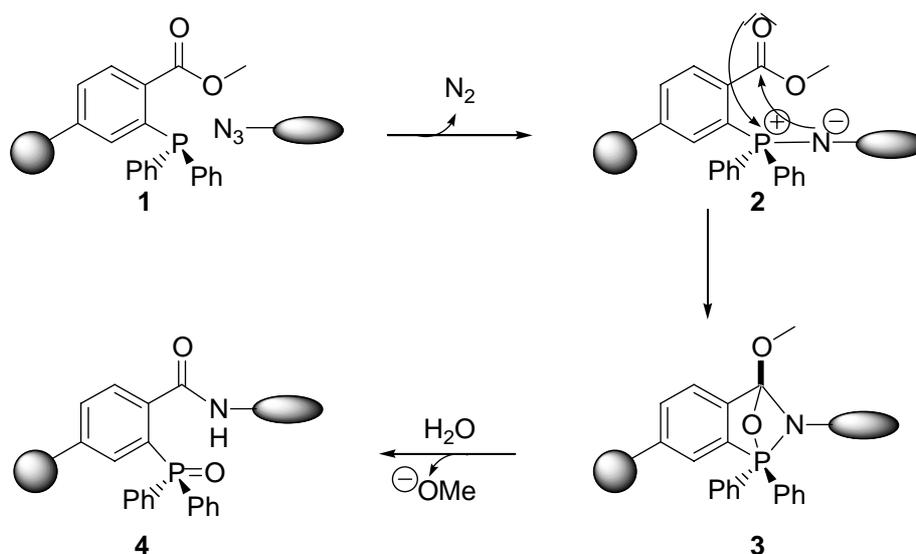
Schema 2: Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten mit Hilfe der Intein-vermittelten Verknüpfung; CBD-Chitinbindungsdomäne.

In Schema 2 ist das Prinzip gezeigt, das mit Hilfe des kommerziell erhältlichen IMPACT-Systems (*intein-mediated purification with an affinity chitin binding tag*; New England Biolabs) die Synthese von Peptid-Protein-Konjugaten ermöglicht. Zunächst wird durch bakterielle Expression ein Konstrukt aus Zielprotein, Intein und einer Chitinbindungsdomäne (CBD) fusioniert, das dann über eine Chitinsäule aufgereinigt wird. Bedingt durch das Fehlen des C-Exteins kommt es nicht zu einem Spleißvorgang auf der Säule, sondern es ist möglich,

dieses Konstrukt durch Zugabe von Thiolreagenzien wie Thiophenol, Dithiothreitol und ähnlichen gezielt zu spalten. Diese Spaltung liefert den entsprechenden Proteinthioester, wohingegen das Intein mit der CBD auf der Säule verbleibt. Durch Zugabe eines (Lipo-)Peptids mit *N*-terminal freiem Cystein kann nun eine native chemische Ligation zwischen Proteinthioester und (Lipo-)Peptid ablaufen, die zum gewünschten Peptid-Protein-Konjugat führt. Diese Strategie konnte erstmalig von HEINEMANN et al. in der Generierung von synthetischen Rab-Proteinen realisiert werden.^[62] Zu beachten ist bei diesem Prozess die Analogie zur Einführung der Cholesterol-Modifizierung während des Autoprocessingsschrittes des Hedgehog-Proteins (*vide supra*), da die Bildung des intermediären Thioesters auch durch eine Intein-ähnliche Struktur initiiert wird.

2.3.4 Staudinger-Ligation

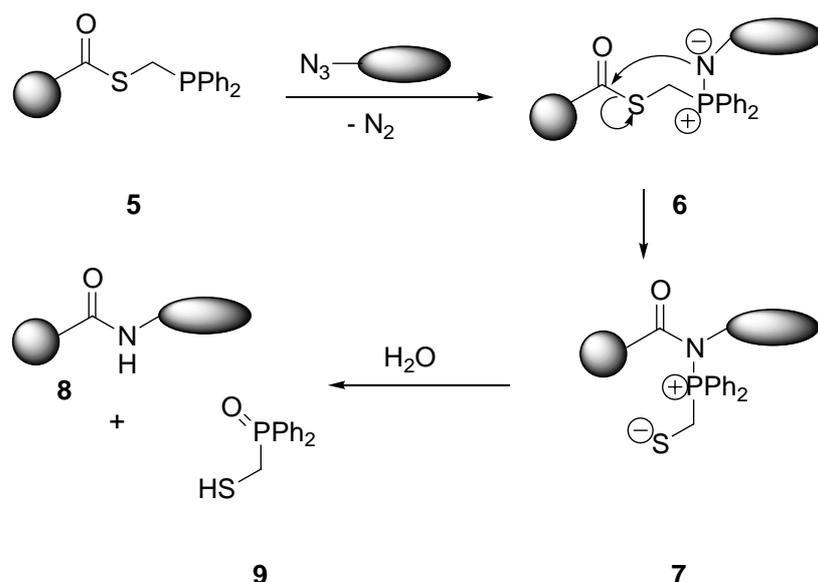
Die bisher vorgestellten Ligationmöglichkeiten benötigen unabhängig davon, ob eine artifizielle oder native Bindung erzeugt wird, ein Cystein an der Ligationsstelle (sei es nun *N*- oder *C*-terminal). Da Cystein allerdings relativ selten natürlich in Proteinen vorkommt (nur 1.7 % aller Aminosäuren sind Cysteine^[63]) besteht weiterhin der Bedarf, neue Ligationmöglichkeiten zu entwickeln. Eine solche Möglichkeit eröffnet die so genannte *Staudinger-Ligation*, die von einem Azid und einem substituierten Phosphin ausgeht (Schema 3) und als Weiterentwicklung der *Staudinger-Reduktion*^[64] anzusehen ist.



Schema 3: Prinzip der *Staudinger-Ligation* nach BERTOZZI et al.^[65]

BERTOZZI et al. benutzt diese Ligationsmethode, um den zellulären Metabolismus synthetischer Azidozucker zu untersuchen; hierbei wurden die Azidozucker nach Durchlaufen des Zellmetabolismus an der Plasmamembran durch die *Staudinger-Ligation* mit einem Biotinreagenz verknüpft.^[65, 66] Der Ligationsprozess verläuft unter sehr schonenden Bedingungen ohne Zugabe weiterer Reagenzien und wird durch einen nucleophilen Angriff des Phosphors auf das Azid initiiert, woraus nach Abspaltung von Stickstoff das Iminophosphorans **2** resultiert. Dieses Aza-Ylid ist unter den wässrigen Reaktionsbedingungen nicht stabil und würde normalerweise spontan hydrolysieren, was jedoch durch die Esterfunktion in *ortho*-Position unterdrückt wird. Dies fungiert als Falle für das Elektrophil und nach Angriff des Nucleophils am Carbonylkohlenstoff resultiert daraus der Bicyklus **3**. Durch nachfolgende Hydrolyse erfolgt die Spaltung dieses Ringes, wodurch ein Triphenylphosphinoxid-Derivat **4** gebildet wird, an das nun die am Azid befindliche Komponente über eine Amidbindung gebunden ist. Obwohl bei dieser Methode eine native Amidbindung geknüpft wird, ist der Nachteil der Verbleib des Ligationsauxiliars im Produkt, so dass man hier nicht von einer nativen Ligation sprechen kann.

Fast zeitgleich wurden von zwei Gruppen neue Ansätze vorgestellt, bei denen im Hydrolyseschritt der Ligation das Auxiliar aus dem Molekül abgespalten wird, so dass man von einer spurlosen *Staudinger-Ligation* sprechen kann.^[67, 68] Dies wird durch Verwendung von Phosphinothiolen erreicht, die als Thioester mit der Säure-Komponente verknüpft sind (Schema 4).



Schema 4: Spurlose Staudinger Ligation unter Verwendung eines Phosphinothiols.

Durch Angriff des Iminophosphoran-Stickstoffs an die Carbonylfunktion des Thioesters **6** wird eine Umlagerung eingeleitet, nach der ein Iminophosphoran **7** gebildet wird, bei dem prinzipiell schon eine Amidbindung vorliegt. Durch nachfolgende Hydrolyse spaltet sich das Iminophosphoran und es entsteht das Phosphinoxid **9** und der über eine Amidbindung verknüpfte Baustein **8**. Es wurden verschiedene Thioester getestet und mit ihnen Dipeptide in Ausbeuten bis zu 92 % generiert.^[69] In jüngster Zeit wurde die Stereochemie der beteiligten Bausteine während der Ligation untersucht und es konnte festgestellt werden, dass keine Racemisierung der Azidkomponente stattfindet.^[70] Prinzipiell handelt es sich bei der *Staudinger-Ligation* um eine hochspezifische und unter außerordentlich milden Bedingungen ablaufende Kupplung zweier Bausteine. Es muss allerdings noch gezeigt werden, ob eine universelle Anwendbarkeit für die spurlose Variante besteht, denn bislang wurden nur Dipeptide hergestellt. Eine Erweiterung dieses Prinzips auf Oligopeptide oder gar Proteine würde einen sehr wertvollen Beitrag zur Konstruktion von Peptid-Protein-Konjugaten darstellen.

2.4 Arrays kleiner Moleküle

Durch den Fortschritt in der kombinatorischen Chemie kommt es immer mehr zu einer Parallelisierung und Automation von Synthesen, wodurch rasch eine große Menge an Substanzen erhalten wird, die auf ihre pharmakologische Wirkung hin untersucht werden. Einen wichtigen Schritt in diesem Bereich stellt die Untersuchung von Bindungseigenschaften zwischen Wirkstoff und Zielprotein dar. Damit dieser Schritt nicht zur Engstelle in der Wirkstofffindung wird, wurden in den letzten Jahren Verfahren entwickelt, die ein schnelles Auffinden dieser Affinitäten erlauben. Hierzu zählen neben den so genannten DNA(RNA)- und Protein-Chips vor allem die Arrays, bei denen kleine Moleküle auf ihre Bindungseigenschaften an Rezeptoren hin untersucht werden. Die Vorgehensweise ist bei allen drei Chip-Arten generell die gleiche (Abbildung 6). Zunächst werden die Substrate durch Spotten oder räumlich adressierte Synthese auf einer planaren Oberfläche immobilisiert. Dann wird der Chip mit einer den Analyten enthaltenden Lösung überspült und anschließend intensiv gewaschen, um unspezifisch gebundenen Analyten zu entfernen. Im letzten Schritt erfolgt ein zweidimensionales Erkennen der gebundenen Substrate und darauf folgend eine Prozessierung der gewonnenen Daten.

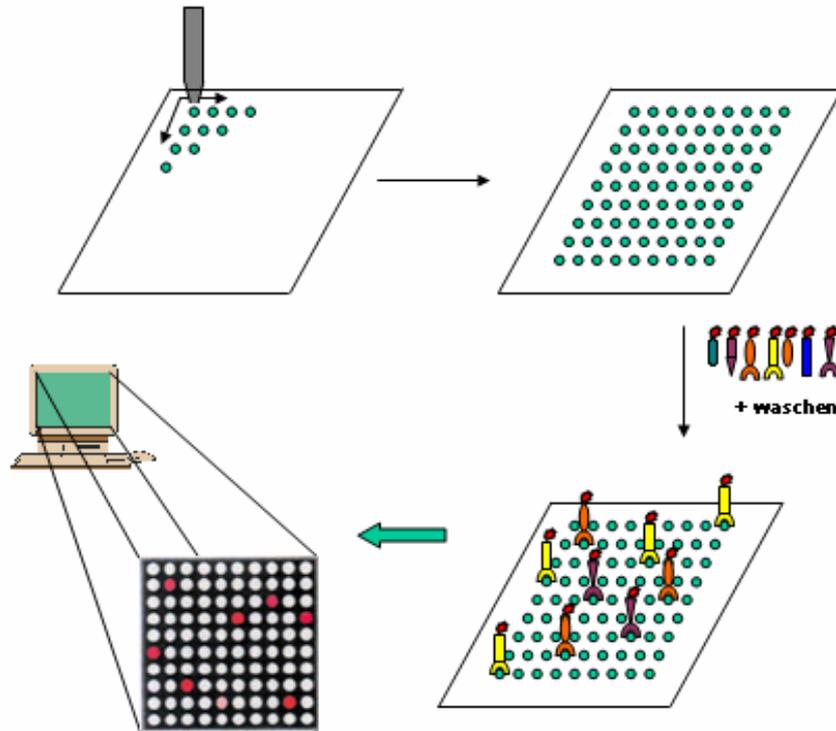


Abbildung 6: Prinzip der Generierung von Chips zur Detektion von Bindungsaffinitäten.

Die Entschlüsselung der Genomsequenzen des Menschen und vieler anderer Organismen erfordert zum Verständnis der Rolle der DNA bei den Vorgängen des Lebens als nächsten Schritt die Erforschung der Wirkungsweise von Genen. Hierzu bedarf es einer Analyse, welche Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert werden. Dies gelingt mit Hilfe der DNA-Mikroarrays, für die zahlreiche Anwendungen entwickelt wurden und die bereits einen Stand erreicht haben, auf dem sie nahezu als etabliert bezeichnet werden können.^[71-73] Begründet durch die ausgezeichneten Erfahrungen mit den DNA-Mikroarrays wird nun der Schwerpunkt auf die Entwicklung von weiteren Mikroarrays von Proteinen und kleinen Molekülen gelegt. Die Schwierigkeit bei den Proteinarrays besteht im Gegensatz zu den DNA-Mikroarrays darin, dass es hier nicht ausreicht, kleine Sequenzfragmente zu immobilisieren, denn das Protein muss als Ganzes unter nativen Bedingungen auf der Chipoberfläche angeheftet werden, um seine Wechselwirkung mit verschiedenen Partnern zu untersuchen. Ein beeindruckendes Beispiel berichten SNYDER et al..^[74] 6566 Proteinpräparationen, die 5800 verschiedene Hefeproteine repräsentieren, wurden über eine Hexahistidinsequenz auf Ni-beschichteten Glasoberflächen immobilisiert. Dieser Chip wurde in der Gegenwart von Calcium mit biotinyliertem Calmodulin behandelt und dann durch Applikation eines CY3-Streptavidin-Konjugates ausgelesen. Die Analyse der

Bindungspartner ergab, dass neben bekannten auch neue Bindungspartner identifiziert werden konnten, von denen viele ein gemeinsames Sequenzmotiv enthalten.

Einen *umgekehrten* Ansatz verfolgen Arrays, die auf kleinen Molekülen basieren: hierbei wird auf der Oberfläche ein potentieller Bindungspartner synthetisiert oder durch Spotten immobilisiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Protein ausgelesen. Die direkte Synthese der kleinen Moleküle auf der planaren Oberfläche wird im Bereich der DNA-Mikroarrays vielfach eingesetzt und eignet sich auch für die Synthese von linearen Bausteinen, wie Oligopeptiden, sehr gut.^[75] Dem gegenüber steht die Immobilisierung von kompletten Molekülen durch räumlich adressiertes Spotten auf den Glasträger. Die Gruppe von SCHREIBER war die erste, die diesen Weg beschritten hat.^[76] sie modifizierten einen gewöhnlichen Mikroskopieträger in der Art, dass sich an seiner Oberfläche Maleinimidfunktionalitäten befanden. Anschließend immobilisierten sie den Farbstoff Rhodamin sowie drei bekannte Proteinbindungspartner, die alle eine freie Thiol-Gruppe enthielten, durch Spotten auf die modifizierte Oberfläche. Im nächsten Schritt wurden auf den Chip die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Proteine appliziert und ausgelesen. Die Fluoreszenzintensität der erhaltenen Spots korrelierte ausgezeichnet mit den erwarteten Bindungsaffinitäten für die immobilisierten Verbindungen.

Einige Beispiele unterschiedlichster Art sind seitdem auf dem Gebiet der Molekül-Arrays beschrieben worden^[77-80] mit denen verschiedene Ansätze zur Lösung der grundlegenden experimentellen Probleme aufgezeigt wurden. Zur Weiterentwicklung dieses Ansatzes bedarf es unter anderem der Entwicklung einer Immobilisierungsschemie, die hochspezifisch und frei von Nebenreaktionen das Anbringen der kleinen Moleküle auf der Glasoberfläche erlaubt. Daneben muss die unspezifische Bindung von Proteinen verhindert werden, weil sie zu Fehlern in der Auslese potentieller Zielverbindungen führen würde. Sobald diese Probleme überwunden werden, steht der Wirkstoffforschung ein neues und schlagkräftiges Instrument zur Targetvalidierung zur Hand.

3. Ziel der Arbeit

Die Aufklärung komplexer Prozesse in der Signaltransduktion konnte in der Vergangenheit mit Hilfe von Lipopeptiden als wertvollen Hilfsmitteln bis auf die molekulare Ebene betrieben werden.^[81] Besonders durch unterschiedlich modifizierte Peptide mit der Sequenz der C-Termini von H- respektive N-Ras wurden biophysikalische Daten zur Membranbindung gewonnen.^[42-45] Daneben konnten durch die Generierung von beispielsweise fluoreszenzmarkierten Peptid-Protein-Konjugaten wichtige Rückschlüsse auf die Lokalisation und biologische Aktivität der entsprechenden Proteine *in vivo* gezogen werden.^[53, 82]

Motiviert durch diese Ergebnisse, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Synthese von Heptapeptiden entwickelt werden, die dem C-Terminus des Sonic Hedgehog-Proteins (Shh) entsprechen (Abb. 7). Die Synthese sollte dabei am polymeren Träger erfolgen und gleichzeitig die Möglichkeit eröffnen, neben dem nativ vorkommenden C-terminalen Cholesterolrest weitere Sterole einbauen zu können.

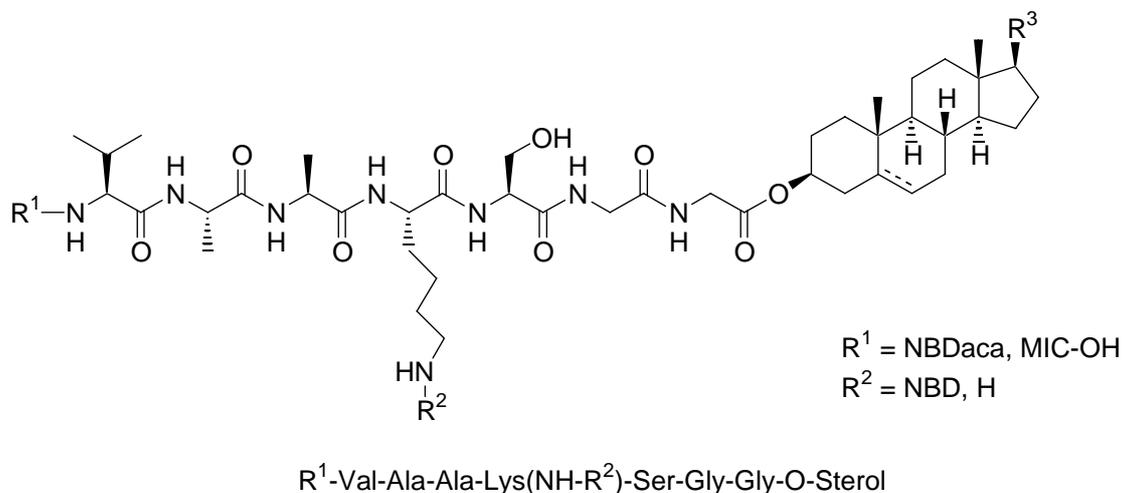


Abbildung 7: Sterolmodifizierte Shh-Heptapeptide.

Mit diesen Heptapeptiden sollten zunächst biophysikalische Untersuchungen zum Membraneinbau von unterschiedlich sterolmodifizierten Peptiden durchgeführt werden. In einem nächsten Schritt sollten diese Peptide dazu benutzt werden, Peptid-Protein-Konjugate durch *Expressed Protein Ligation* oder MIC-Kopplung darzustellen. Mit diesen Konjugaten sollte das Membranbindungsverhalten ganzer Proteine an Modellmembranen untersucht und mit den für die entsprechenden Peptide erhaltenen Werten verglichen werden. Daneben

sollten Untersuchungen zum Membraneinbau *in vivo* sowie zur biologischen Aktivität der Konjugate durchgeführt werden.

In einem zweiten Projekt dieser Arbeit sollte anhand von Modellsystemen die Präferenz unterschiedlich palmitoylierter Peptide für Membranmikrodomänen untersucht werden. Hierzu wurde die C-terminale Heptapeptidsequenz des Influenza-A-Virus Hämagglutinins ausgewählt, die in unterschiedlichen Palmitoylierungsmustern darzustellen war (Abb. 8).

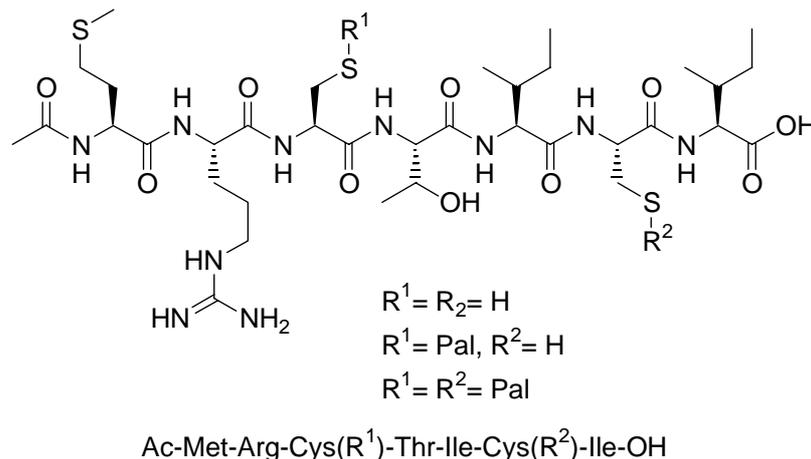


Abbildung 8: Unterschiedliche palmitoylierte Heptapeptide des Influenza-A-Virus Hämagglutinins.

Um einen raschen Zugang zu diesen Peptiden zu ermöglichen, sollte ihre Synthese ebenfalls am polymeren Träger erfolgen. Die Untersuchungen zur Präferenz des Einbaus in cholesterolareiche Membranen sollten mit Hilfe von biokalorimetrischen Methoden (DSC) ausgeführt werden, wobei besonderes Augenmerk auf dem Beitrag der Fettsäure-Reste zur Membranaffinität liegen sollte.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Realisierbarkeit von Arrays kleiner Moleküle geplant. Hierbei war es zunächst erforderlich, sich mit den grundlegenden Techniken zur Modifizierung kommerziell erhältlicher Mikroskopieträger vertraut zu machen und auf ihnen eine chemisch reaktive Oberfläche zu erzeugen. Im nächsten Schritt sollte eine Ligationsschemie entwickelt werden, die eine selektive Immobilisierung von Zielverbindungen ermöglicht. Im Rahmen dieses Konzeptes sollte evaluiert werden, in wieweit es möglich ist, nach Abschluss der Festphasensynthese eines Wirkstoff (-analogons) in aktivierter Form vom polymeren Träger abzuspalten, so dass es ohne weitere Modifizierung auf einer entsprechend behandelten Glasoberfläche mit Hilfe der Ligationsschemie immobilisiert werden kann.

4. Spezieller Teil

4.1 Synthese der Hedgehog-Peptide

4.1.1 Allgemeine Vorüberlegungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Heptapeptide hergestellt werden, deren Sequenz dem C-Terminus der Signaldomäne des *Sonic Hedgehog* (*Shh*) Proteins entspricht (Abb. 9).

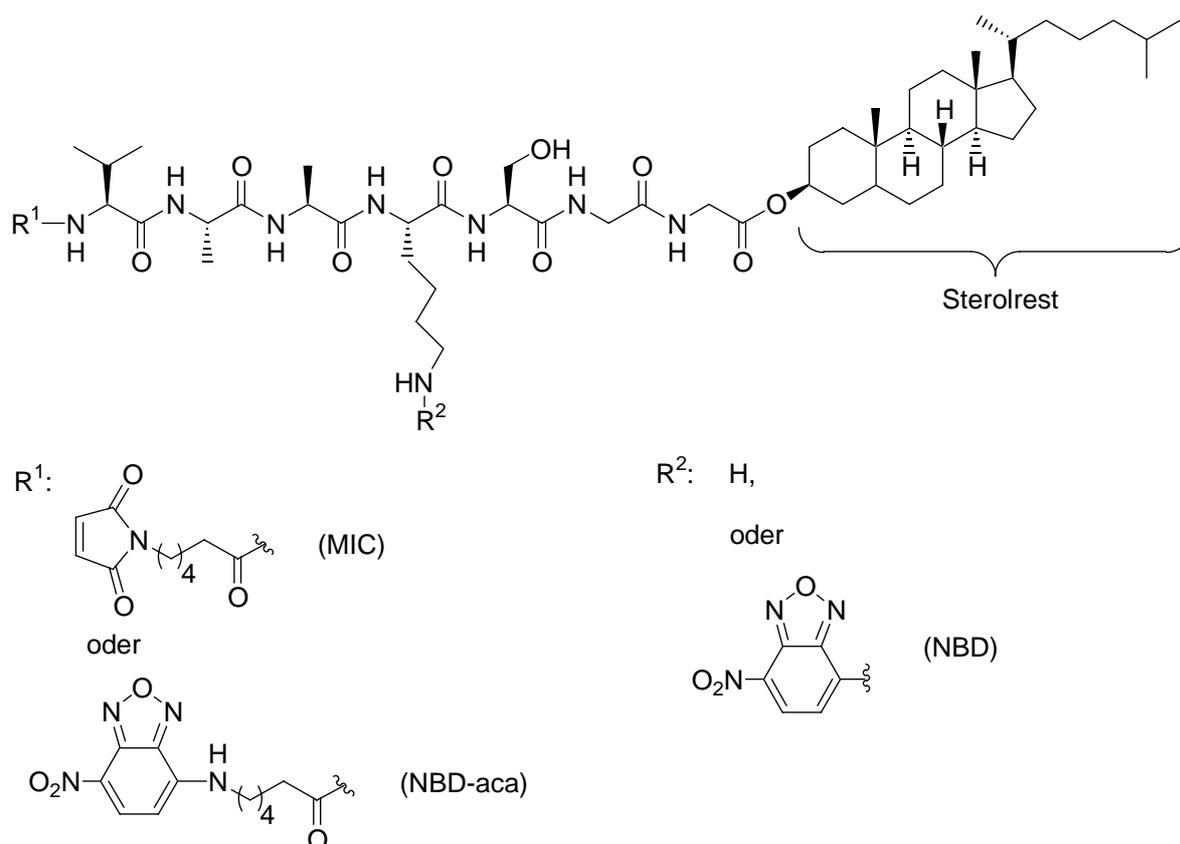


Abbildung 9: Sequenz des Sonic Hedgehog-Heptapeptids mit verschiedenen Modifikationen.

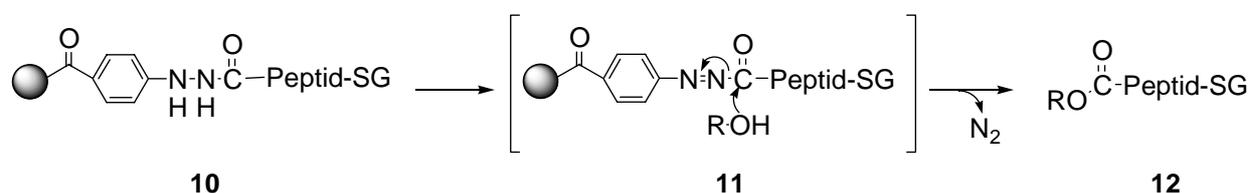
Um einen effizienten Zugang zu unterschiedlich modifizierten Hedgehog-Peptiden zu ermöglichen, musste eine Strategie gewählt werden, bei der ein leichter Einbau von verschiedenen Sterolderivaten am C-Terminus möglich ist. Zur Untersuchung der Membranbindung von Modellpeptiden *in vitro* war es zunächst erforderlich, N-terminal einen Fluoreszenzmarker einzufügen (Abb. 9: R¹=NBD-aca). Ferner waren für die Generierung von Peptid-Protein-Konstrukten zur *in vitro*- und *in vivo*- Untersuchung der Membranassoziation N-terminal eine Maleimimidocaproylgruppe beziehungsweise ein Cystein erforderlich (Abb. 9: R¹=MIC oder H-Cys(S-*t*-Bu)-). So reagiert die Maleimimidocaproylgruppe in einer Thio-

Michael-Addition mit verkürztem Ras zu einer Thioetherbindung, wohingegen bei Reaktion des peptidischen *N*-terminalen Cysteins mit verkürztem Ras-MESA-Thioester eine peptidische Bindung geknüpft wird. Die Synthese solcher Konstrukte implizierte ferner, dass eine Fluoreszenzmarkierung in den peptidischen Teil der Protein-Chimäre eingefügt wird (Abb. 9: $R^2=NBD$), um eine Identifizierung der Lokalisation der Konstrukte *in vivo* zu ermöglichen. Hierbei fiel die Wahl auf die Nitrobenzofurazan-Gruppe (NBD), da sie sich aufgrund ihrer Kompaktheit und Fluoreszenzeigenschaften als besonders geeignet für die Untersuchung biologischer Fragestellungen erwiesen hat.

4.1.2 Versuche zur Synthese mittels des Hydrazinobenzoyllinkers

Um einen leichten Zugang zu unterschiedlich sterolmodifizierten Hedgehog-Peptiden zu ermöglichen, war zunächst geplant die Peptide an der festen Phase mit Hilfe des Hydrazinobenzoyllinkers durch Standardmethoden für die *N*-terminale Verlängerung aufzubauen. Der Vorteil dieser Strategie ist, dass der gewünschte Sterylester erst anschließend während der Abspaltung vom polymeren Träger generiert werden würde, was die Möglichkeit eröffnen würde, rasch unterschiedlich sterolmodifizierte Peptide zu erhalten.

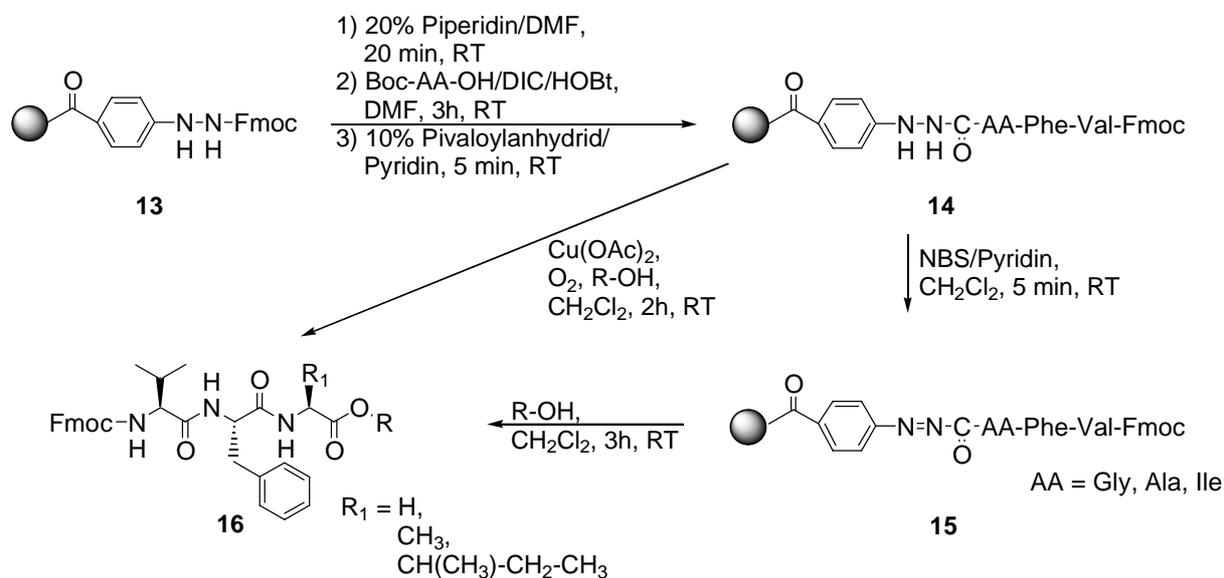
Der Hydrazinobenzoyllinker wurde von WIELAND et al. eingeführt und fand kürzlich Verwendung sowohl in der Synthese cyclischer Peptide über cyclisierende Abspaltung, als auch in der Festphasensynthese lipidierter Peptide.^{[83] [84] [47]} Dieser Linker wird unter oxidativen Bedingungen in Gegenwart von Nucleophilen (Schema 5) gespalten, wobei das intermediär gebildete Acyldiazen **11** vom Nucleophil abgefangen wird. Ist dieses Nucleophil ein Alkohol, so wird der entsprechende Ester erhalten.



Schema 5: Prinzip der Esterbildung unter Verwendung des Hydrazinobenzoyllinkers.

Die oxidative Spaltung kann entweder als Ein-Schritt-Prozess (Methode A) unter der Verwendung von Kupfer(II)-acetat in Gegenwart eines geeigneten Nucleophils erfolgen oder in einem Zwei-Schritt-Prozess (Methode B) mittels *N*-Bromsuccinimid und Pyridin^[85] gefolgt von der Zugabe eines Nucleophils nach Entfernung des überschüssigen Oxidationsmittels.

Um zu untersuchen, ob die Verwendung von Cholesterol als Nucleophil einen effektiven Zugang zu Peptiden eröffnet, wurde zunächst Modelltripeptide Fmoc-Val-Phe-Gly(Ala,Ile) am Hydrazinobenzoyllinker aufgebaut. Diese wurden durch Abspaltung mit verschiedenen Alkoholen in unterschiedliche Peptidester überführt.



Schema 6: Peptid-Synthese und oxidative Spaltung des Hydrazidlinkers.

Von kommerziell erhältlichem 4-Fmoc-Hydrazinobenzoylharz (Beladung: 0.67 mmol g⁻¹) wurde zunächst durch Behandlung mit 20 Vol.-% Piperidin in Dimethylformamid die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und anschließend das Tripeptid unter Standardbedingungen aufgebaut. Der Capping-Schritt wurde mit Pivaloylanhydrid anstelle von Essigsäureanhydrid durchgeführt, weil sonst die Stickstoffatome des Hydrazids acyliert werden. Nach Kupplung der letzten Fmoc-geschützten Aminosäure wurde die Harzbeladung UV-VIS-spektroskopisch bestimmt, um eine exakte Aussage über die Ausbeute des Abspaltungsschrittes zu erhalten.^[86]

#	Nucleophil	Zielpeptid	Oxidation A ¹⁾	Oxidation B ¹⁾
16a	Methanol	Fmoc-Val-Phe-Gly-OMe	55 %	64 %
16b	Allylalkohol	Fmoc-Val-Phe-Gly-OAll	58 %	-*
16c	2-Propanol	Fmoc-Val-Phe-Gly-OiPr	43 %	49 %
16d	1-Heptanol	Fmoc-Val-Phe-Ile-OHep	48 %	52 %
16e	Benzylalkohol	Fmoc-Val-Phe-Ala-OBzl	34 %	44 %
16f	Cyclohexanol	Fmoc-Val-Phe-Gly-OcHex	Säure ²⁾	43 %
16g	1-Decalol	Fmoc-Val-Phe-Gly-ODec	Säure ²⁾	39 %
16h	Cholesterol	Fmoc-Val-Phe-Gly-OChol	Säure ²⁾	Säure ²⁾

Tabelle 1: Gebildete Peptidester; ¹⁾ Ausbeute basierend auf Beladungsbestimmung nach letzter Kopplung, ²⁾ Säurespuren wurden über HPLC-ESI detektiert, * nicht bestimmt.

Besonders zu erwähnen ist, dass die gewünschten Produkte kaum durch Nebenprodukte verunreinigt sind, besonders beim zweistufigen Oxidationsprozess; hier ist das nach der NBS-Oxidation gebildete Acyldiazon stabil und alle Verunreinigungen und Reagenzien können durch einfaches Waschen entfernt werden. Im Falle der Kupfer-vermittelten Oxidation können die Schwermetallsalze mittels einer Festphasenextraktionskartusche oder durch Verwendung von Polyamin-Harzen als Kationen-Fänger einfach entfernt werden. Aus Tabelle 1 wird deutlich, dass diese Methode einen effektiven Weg zur Synthese von Peptidestern darstellt, wobei sowohl Ester primärer als auch sekundärer Alkohole in guten Ausbeuten gebildet werden. Die Alkohole können auch weitere Funktionalitäten wie Doppelbindungen beinhalten. Die Ausbeuten des Spaltungsprozesses korrelieren gut mit dem sterischen Anspruch des eingesetzten Nucleophils: so sind primäre Alkohole gute Nucleophile und erzielen Ausbeute zwischen 50-60 %. Für die meisten sekundären Alkohole ist die Ausbeute etwas geringer, aber noch immer im präparativ nutzbaren Bereich. Dabei werden in den mit NBS durchgeführten Abspaltungsprozessen generell höhere Ausbeuten erzielt, als bei der Kupfer-vermittelten Oxidation. Dies ist insbesondere bei den sterisch anspruchsvolleren Alkoholen wie Cyclohexanol und 1-Decalol der Fall und lässt sich dadurch erklären, dass es bei der Kupfer-vermittelten Oxidation eine Komplexbildung des Kupfers durch den Alkohol stattfindet und dies leichter bei einfachen primären Alkoholen möglich ist. Darüber hinaus ist allerdings zu erwähnen, dass im Fall von Cholesterol als Nucleophil unabhängig vom Oxidationsverfahren lediglich Spuren der Peptidsäure erhalten wurden. Dies ist vermutlich

auf den großen sterischen Anspruch dieses Nucleophils zurückzuführen. Auch eine Erhöhung der Nucleophilie durch eine *in situ* Erzeugung des Alkoholats durch Reaktion von Cholesterol-trimethylsilylether mit Tetrabutylammoniumfluorid in Gegenwart des Acyldiazens führte lediglich zur Generierung der Säure.

Daher wurde ein alternativer Aktivierungsansatz überprüft: hierbei erfolgt die Abspaltung nicht direkt mit einem aktivierten Cholesterol, sondern es sollte im Abspaltungsprozess primär ein Aktivester generiert werden, welcher dann durch Reaktion mit dem Cholesterol in Lösung zu dem gewünschten Peptidester führen würde. So erfolgten Testabspaltungen des Acyldiazens nach Aktivierung mit *N*-Bromsuccinimid mit den folgenden Nucleophilen: Pentafluorphenol, Thiophenol, Benzylmercaptan, 1-Hydroxybenzotriazol, HOAt, *N,N*-Dimethylaminopyridin und Imidazol. Die entsprechenden Abspaltungslösungen wurden ohne weitere Charakterisierung mit jeweils 5 Äquivalenten Benzylamin umgesetzt und mit Hilfe von HPLC-MS analysiert. Es konnte in keinem Fall die Bildung des Benzylamids beobachtet werden, das sich durch Aminolyse des durch Abspaltung entstandenen Aktivesters rasch bilden sollte.

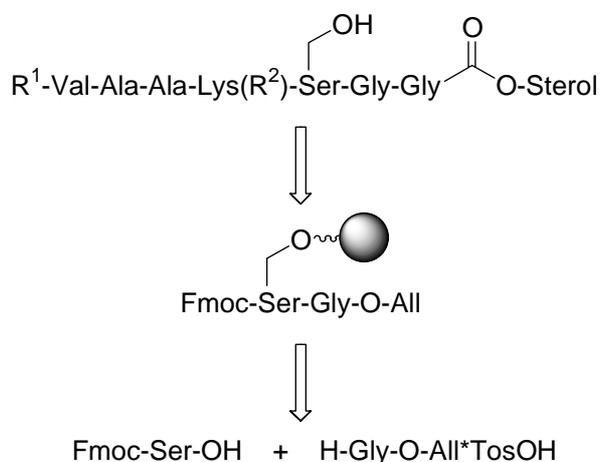
Da durch diese Strategie keine erfolgreiche Synthese der Hedgehog-Peptide möglich war, wurde diese Syntheseroute nicht weiterverfolgt, sondern ein Alternativweg erarbeitet, der die Festphasensynthese dieser sterolmodifizierten Peptide ermöglicht.

Allerdings muss hervorgehoben werden, dass sich dieser Linker hervorragend zur Festphasensynthese von *C*-terminal geschützten Peptiden eignet. So können auf diesem Weg Benzyl-, Allyl- und auch Heptylester eingeführt werden. Diese Carboxyschutzgruppen haben sich als sehr effiziente *C*-terminale Schutzgruppen in der Peptidsynthese und der organischen Synthese erwiesen und ihre Einführung mittels Festphasenpeptidsynthese eröffnet neue Möglichkeiten in der Synthese von Oligopeptiden durch Fragmentkondensation. Ein breites Spektrum verschiedener Schutzgruppen kann auf diesem Weg eingeführt werden, die das gesamte Repertoire an Orthogonalität aufweisen: Allylester werden Palladium(0)-vermittelt gespalten und Benzylester hydrogenolytisch^[87], wohingegen Heptylester enzymatisch durch Lipase aus *Apergillus niger* entfernt werden können.^[88, 89]

4.1.3 Alternative Route zur Synthese der Hedgehog-Peptide

Da die Synthese mit Hilfe des Hydrazinobenzoyl-Linkers sich als nicht erfolgreich erwies, wurde als Alternativweg eine konvergente Synthesestrategie entworfen, deren zentraler Schritt die Anknüpfung des Dipeptids Fmoc-Ser-Gly-OAll über die Hydroxyfunktion des

Serins an einen polymeren Träger darstellt (Schema 7). Das hierzu erforderliche Dipeptid muss zuvor in Lösung synthetisiert werden.

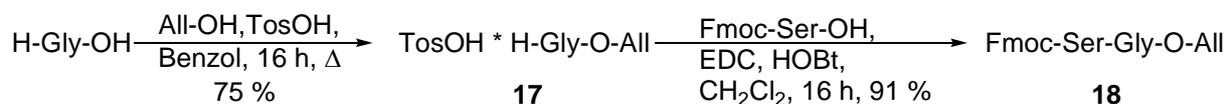


Schema 7: Retrosynthetische Betrachtung des Hedgehog-Peptids.

Die Anknüpfung an den polymeren Träger sollte mit Hilfe eines säurelabilen Linkers erfolgen. Dieser ist orthogonal zu den Bedingungen, unter denen der Aufbau des Peptids durchgeführt wird. Nach Anknüpfung des zentralen Dipeptids kann der C-Terminus durch Palladium(0)-vermittelte Spaltung des Allylesters freigesetzt und durch Anknüpfung des entsprechenden Glycinsterylesters verlängert werden. Im Anschluss daran kann die N-terminale Verlängerung des Peptids unter Standardbedingungen der Peptidsynthese erfolgen, wodurch die Möglichkeit eröffnet wird, die gewünschten Modifikationen, wie eine N-terminale MIC- oder NBDaca-Gruppe beziehungsweise eine NBD-Gruppe in der Lysinseitenkette einzuführen. Der entscheidende Vorteil dieser Strategie gegenüber einem konventionellen Aufbau in Lösung ist, dass alle Modifizierungen des Peptids am Harz durchgeführt werden, wodurch ein rascher Zugang zu unterschiedlichen Analoga eröffnet wird. Weiterhin müssen nach Abspaltung vom polymeren Träger keine weiteren Reaktionen in Lösung mehr durchgeführt werden.

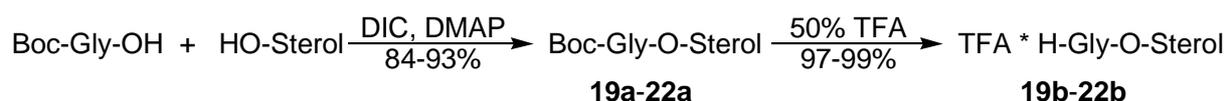
Die Synthese beginnt mit dem Aufbau der zentralen Bausteine in Lösung, wobei zunächst in einer zweistufigen Synthese ausgehend von Glycin das zentrale Dipeptid Fmoc-Ser-Gly-OAll **18** dargestellt wurde. Hierzu musste zuerst das Glycin C-terminal als Allylester (**17**) geschützt werden, was durch Reaktion mit Allylalkohol in Gegenwart von *para*-Toluolsulfonsäure unter wasserentziehenden Bedingungen in guter Ausbeute gelang.^[90] Die nachfolgende Umsetzung

mit Fmoc-Ser-OH verlief EDC/HOBt vermittelt problemlos in sehr guter Ausbeute, wobei sich eine Schützung der Hydroxyfunktion des Serins als nicht erforderlich erwies.



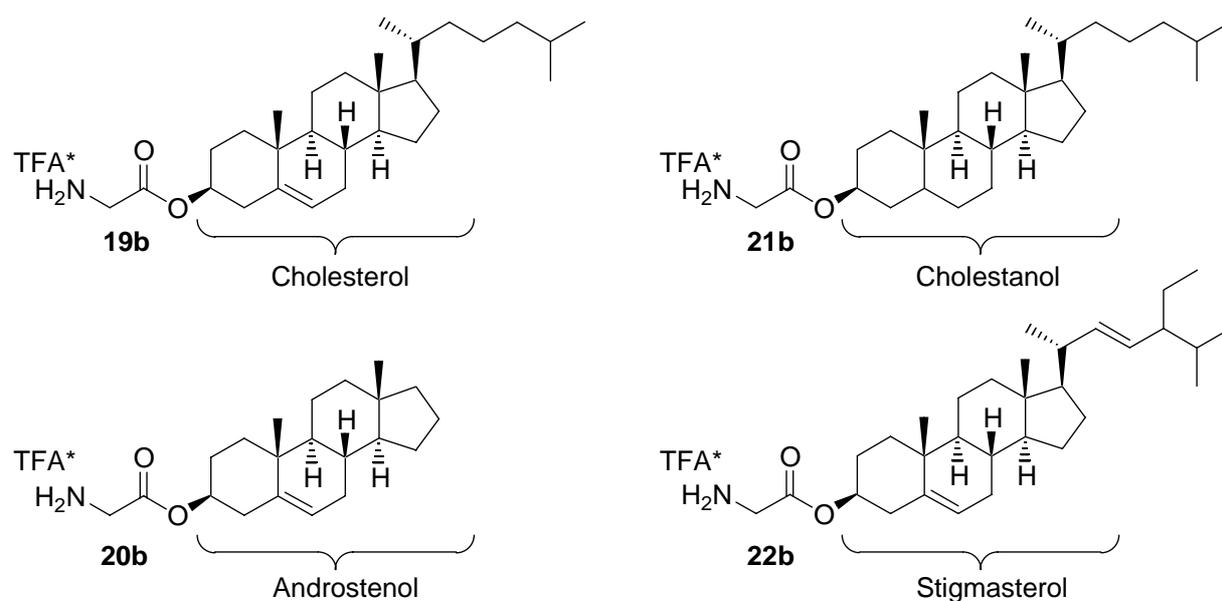
Schema 8: Synthese des zentralen Bausteins Fmoc-Ser-Gly-OAll **18**.

Die zur Einführung der verschiedenen Sterole benötigten Sterylester wurden in einer zweistufigen Reaktion ausgehend von Boc-geschütztem Glycin und dem entsprechenden Sterol dargestellt (Schema 9): zunächst erfolgte eine Veresterung unter Steglich-Bedingungen, die in guten Ausbeuten den Boc-geschützten Glycinsterylester lieferte.^[91, 92] Dieser wurde dann durch Behandlung mit 50 %iger TFA nahezu quantitativ in den entsprechenden Glycinsterylester überführt.



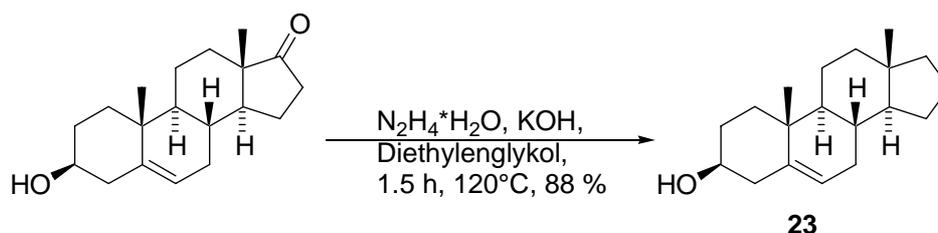
Schema 9: Synthese der Glycinsterylester.

Auf diese Weise konnten die folgenden Glycinsterylester erhalten werden (Schema 10):



Schema 10: Synthetisierte Glycinsterylester.

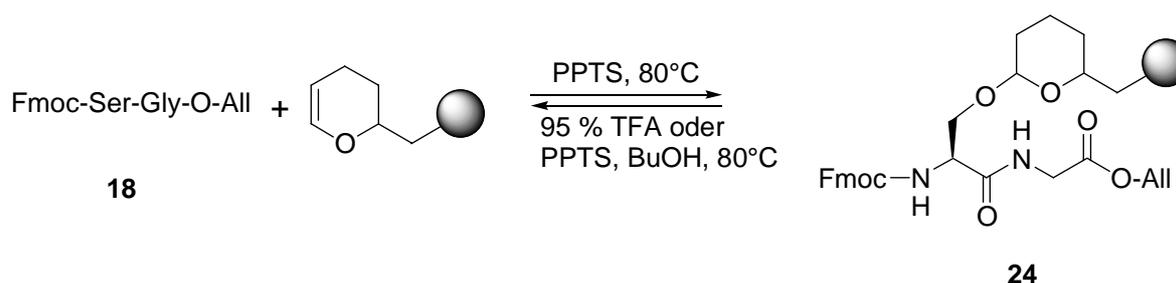
Besonderes Augenmerk verdient hierbei die Verbindung **20b**, da hier als Sterolkomponente 5-Androsten-3 β -ol Verwendung findet. Diese Substanz war Teil einer Studie von COOPER et al., in der untersucht wurde, inwieweit verschiedene Sterole in der Lage sind, *in vitro* die Autoprocessing des Hedgehog-Proteins zu initiieren.^[5, 93] Sie konnten zeigen, dass der Einfluss der Stereochemie der C3-Hydroxyfunktion erheblich ist, wohingegen Variationen in der Seitenkette weitgehend toleriert werden. Hierbei ist 5-Androsten-3 β -ol (**23**) das strukturell am weitesten vereinfachte Sterol, das den Autoprocessingsschritt zu initiieren vermag. Daher fiel die Wahl auf dieses Sterol, um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Membranbindung festzustellen sind im Vergleich mit Cholesterol oder verzweigten Sterolen, wie Stigmasterol (**22**). Um dieses Sterol **23** zu erhalten, wurde eine *Wolff-Kishner* Reduktion ausgehend von 3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on durchgeführt, welche in guter Ausbeute gelang (Schema 11).^[94]



Schema 11: Synthese von Androst-5-en-3 β -ol **23**.

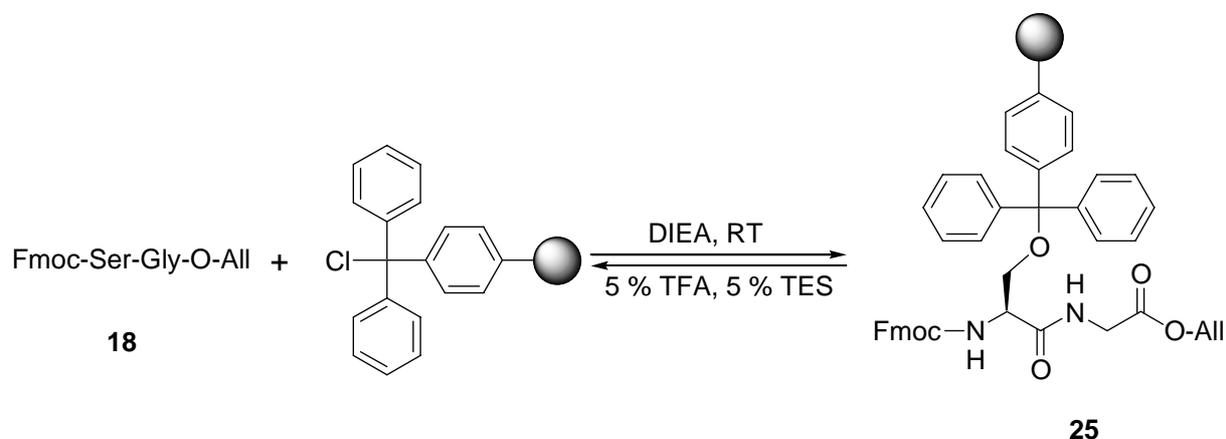
Immobilisierung des zentralen Dipeptids an der festen Phase

Prinzipiell standen zur Anknüpfung des zentralen Dipeptids Fmoc-Ser-Gly-OAll (**18**) an den polymeren Träger zwei verschiedene Linker zur Auswahl. Zum einen der Dihydropyranyl(DHP)-Linker, der von ELLMAN et al. in die organische Festphasensynthese eingeführt wurde^[95, 96] und zum anderen der Trityllinker, der auf der etablierten Triphenylmethyl-Schutzgruppe für Alkohole basiert und erstmalig von LEZNOFF und FRÉCHET zur Monoschutzung von Diolen verwendet wurde^[97, 98].



Schema 12: Anknüpfung des Dipeptids **18** an den Ellman-Linker.

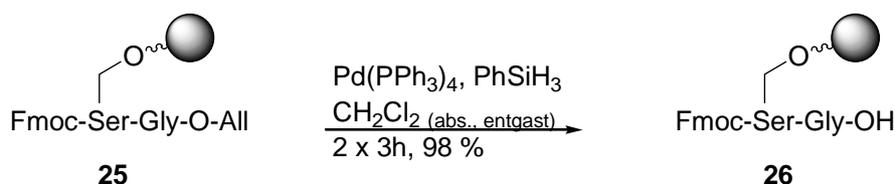
Die Anknüpfung des Alkohols erfolgt durch Pyridinium-*para*-toluolsulfonat-(PPTS) katalysierte Bildung des Tetrahydropyranylacetals (Schema 12). Die Abspaltung verläuft durch PPTS- katalysierte Acetalisierung durch Reaktion mit einem Konkurrenznuceophil (*n*-Butanol) oder durch Behandlung mit 95 %iger Trifluoressigsäure. Die Anknüpfung des Dipeptids gelang unter Literaturbedingungen (Verwendung von 5 Äquivalenten Alkohol, 2 Äquivalenten PPTS, 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel) mit einer maximalen Ausbeute von 49 % nach einer Reaktionszeit von 16 h. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu Dichlormethan sowie eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 20 h bei einer Temperatur von 40°C ermöglichte eine Anknüpfung in einer Ausbeute von 90 %. Da diese Anknüpfungsbedingungen aufgrund der langen Reaktionszeit als nicht praktikabel angesehen wurden und darüber hinaus die Abspaltung vom polymeren Träger sehr harsche Bedingungen erfordert, wurde der Trityllinker, der von BARLOS et al. in der Festphasenpeptidsynthese etabliert wurde^[99], als alternative Möglichkeit zur Anbindung untersucht.

**Schema 13:** Anknüpfung des Dipeptids **18** an den Trityllinker.

Die Anknüpfung des Dipeptids **18** gelang durch fünfstündige Reaktion bei Raumtemperatur in Gegenwart von DIEA in Ausbeuten im Bereich von 90 % (Schema 13).^[100] Dies führte in Kombination mit der Abspaltung unter sehr milden Bedingungen dazu, dass dieser Linker im Folgenden für die Synthese der Hedgehog-Peptide verwendet wurde.

Untersuchung der C-terminalen Verlängerung

Die Synthesestrategie zum Aufbau der Heptapeptide sieht vor, dass nach Anknüpfung des zentralen Bausteins an den polymeren Träger zunächst die Entschützung des C-terminalen Allylesters erfolgt (Schema 14). Dies ist erforderlich, da im Falle einer N-terminalen Entschützung des allylestergeschützten Dipeptids **25** die Möglichkeit zur Bildung von Diketopiperazinen besteht.



Schema 14: C-terminale Entschützung des polymergebundenen Dipeptids **25**; Bestimmung der Ausbeute nach Abspaltung von **26** mittels HPLC bei $\lambda = 210$ nm.

Dies gelang unter Verwendung von Phenylsilan als Nucleophil in nahezu quantitativer Ausbeute.^[101] Phenylsilan als Nucleophil wurde gewählt, weil es ein neutrales Reagenz ist, denn basische Nucleophile würden eventuell zu einer N-terminalen Entschützung und saure Nucleophile zu einer Abspaltung des zentralen Dipeptids vom polymeren Träger führen.

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die C-terminale Verlängerung wurde zunächst ein Modellsystem untersucht, indem das polymergebundene Dipeptid **25** unter obigen Bedingungen entschützt und anschließend durch Reaktion mit H-Gly-O-All **17** zum Tripeptid Fmoc-Ser-Gly-Gly-O-All verlängert wurde. Die verschiedenen Kupplungsbedingungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 2), wobei die Bestimmung der Ausbeute durch Analyse des Produktes nach Abspaltung mittels HPLC bei $\lambda = 210$ nm abgeschätzt wurde.

Kupplungsbedingungen	Ausbeute
5 eq. 17 , 5 eq. DIC, 6.2 eq. HOBt, 5 h	24 %
5 eq. 17 , 4.5 eq. HBTU, 6.2 eq. HOBt, 10 eq. DIEA, 5 h	40 %
5 eq. 17 , 4.5 eq. HATU, 6.2 eq. HOAt, 10 eq. DIEA, 5 h	70 %
5 eq. 17 , 5 eq. PyBOP, 10 eq. DIEA, 5 h	90 %

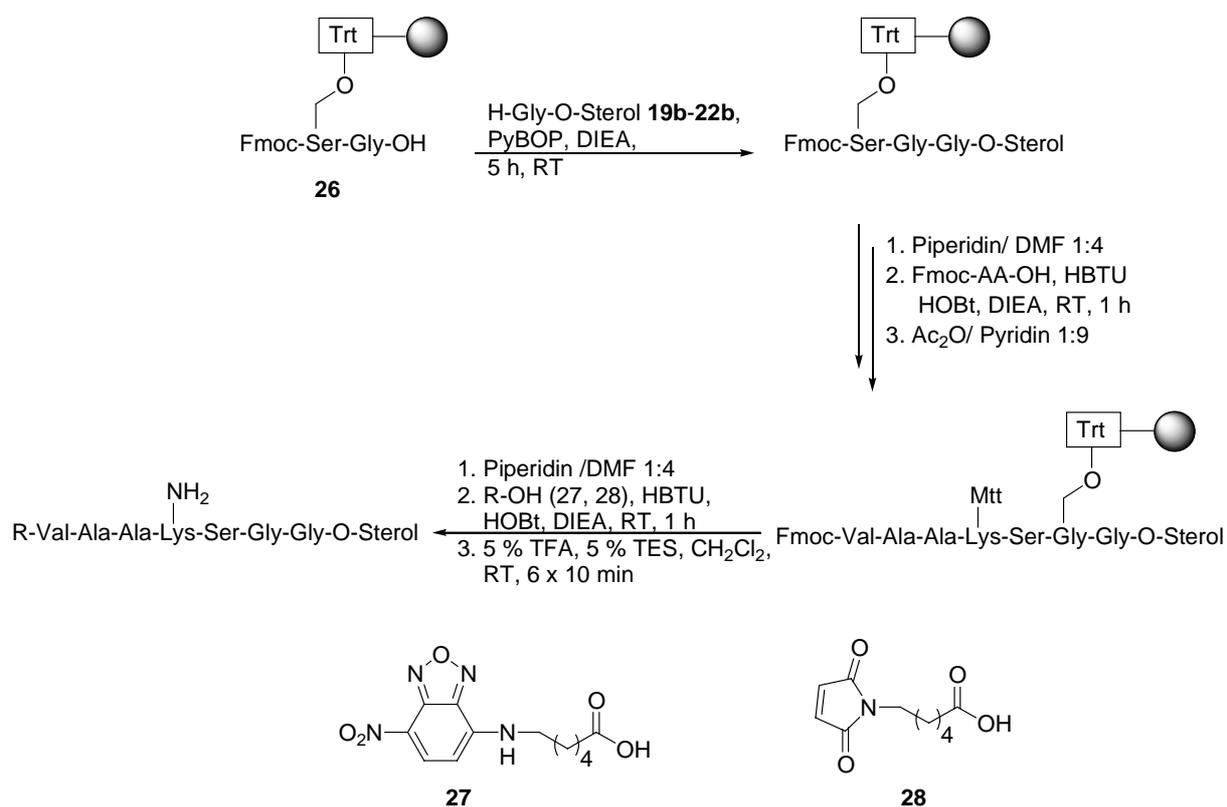
Tabelle 2: Ermittlung der optimalen Kupplungsbedingungen für die C-terminale Verlängerung.

Ein generelles Problem bei der C-terminalen Verlängerung von Peptiden ist, dass die Aktivierung des polymergebundenen C-Terminus zur Racemisierung der entsprechenden Aminosäure führen kann. Dies kann im vorliegenden Fall aufgrund des Glycins nicht

eintreten. Zu beachten ist, dass bei der Voraktivierung der Carbonsäurefunktion bei Verwendung von Carbodiimid-basierten Kupplungsreagenzien, wie DIC, HBTU und HATU die Bildung von guanidierten Nebenprodukten durch Reaktion mit der freien Aminfunktion auftreten kann, wodurch sich die geringeren Ausbeuten erklären lassen. Es ist zwar eine Steigerung der Kupplungseffizienz bei Verwendung von stärker aktivierenden Reagenzien wie HATU festzustellen, jedoch verläuft die C-terminale Verlängerung nur bei Verwendung des *in situ* Kupplungsreagenz PyBOP in zufrieden stellenden Ausbeuten.

Festphasensynthese der Hedgehog-Heptapeptide

Nach Anknüpfung des zentralen Dipeptids **18** und der C-terminalen Verlängerung mit verschiedenen Glycinsterylestern, erfolgte der N-terminale Aufbau des Heptapeptids. Dieser wurde gemäß einem Fmoc-basierten Standardprotokoll durchgeführt.

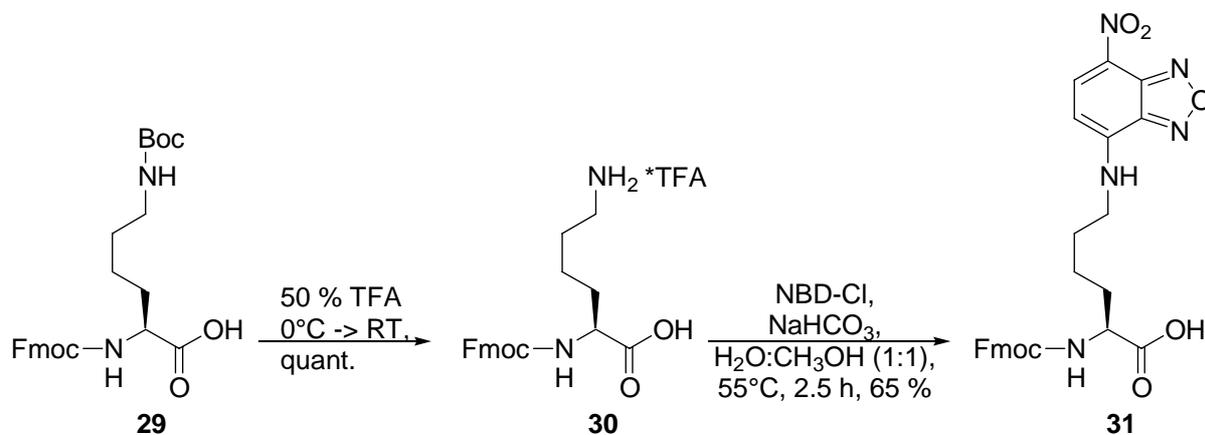


Schema 15: Syntheseroute zu NBD- und MIC-modifizierten Hedgehog-Heptapeptiden.

Die Entfernung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandlung des Polymers mit 20 % Piperidin in DMF, die Kettenverlängerung wurde unter Aktivierung mit HBTU und HOBt durchgeführt. Die nicht umgesetzten Aminofunktionen wurden nach Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäure durch Reaktion mit 10 % Essigsäureanhydrid in

Pyridin zur Vermeidung von Abbruchsequenzen blockiert. Nach Aufbau der Heptapeptidkette wurde durch Anknüpfung von NBD-Aminocaprinsäure (**27**) respektive Maleinimidocaprinsäure (MIC) (**28**) die gewünschte Modifizierung eingefügt. Die Abspaltung der Produkte vom polymeren Träger erfolgte mit 5 % Trifluoressigsäure und 5 % Triethylsilan als Scavenger in Dichlormethan und lieferte die Produkte in hohen Ausbeuten. Durch Verwendung der sehr säurelabilen 4-Methyltrityl-Schutzgruppe für die ϵ -Aminofunktion des Lysins wurde gewährleistet, dass diese während der Abspaltung vom Harz ebenfalls freigesetzt wurde. Die Aufreinigung der NBD-markierten Analoga erfolgte über präparative HPLC, wohingegen die MIC-modifizierten Peptide durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 gereinigt wurden.

Zur Synthese von fluoreszenzmarkierten Peptid-Protein-Konstrukten wurden sterolmodifizierte Heptapeptide benötigt, die neben der MIC-Modifizierung am *N*-Terminus einen Fluoreszenzmarker beinhalten. Als Anknüpfungspunkt hierfür wurde die ϵ -Aminofunktion des Lysins ausgewählt. Deshalb wurde die Synthese eines für die Festphasenpeptidsynthese geeigneten Bausteins angestrebt (Schema 16).



Schema 16: Synthese des fluoreszenzmarkierten Bausteins Fmoc-Lys(NBD)-OH (**31**).

Von Fmoc-Lys(Boc)-OH **29** wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe durch Behandeln mit 50 %iger Trifluoressigsäure in quantitativer Ausbeute entfernt. Durch nachfolgende Umsetzung mit NBD-Chlorid unter basischen Bedingungen konnte der fluoreszenzmarkierte Baustein **31** in hohen Ausbeuten erhalten werden.

Mit dieser Synthesestrategie wurden verschieden modifizierte Heptapeptide synthetisiert, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Sterol	Modifizierungen	Ausbeute	#
Cholesterol, 19b	R ¹ = NBDaca, R ² = H	30 %	32
	R ¹ = MIC, R ² = H	27 %	33
	R ¹ = MIC, R ² = NBD	23 %	34
	R ¹ = Ac, R ² = H	72 %	35
	R ¹ = Cys(S- <i>t</i> -Bu), R ² = NBD	74 %	36
Cholestanol, 21b	R ¹ = NBDaca, R ² = H	17 %	37
	R ¹ = MIC, R ² = NBD	21 %	38
Stigmasterol, 22b	R ¹ = NBDaca, R ² = H	18 %	39
	R ¹ = MIC, R ² = H	21 %	40
Androstenol, 20b	R ¹ = NBDaca, R ² = H	58 %	41
	R ¹ = MIC, R ² = H	45 %	42
	R ¹ = MIC, R ² = NBD	27 %	43

Tabelle 3: Synthetisierte Hedgehog-Peptide mit der Sequenz R¹-Val-Ala-Ala-Lys(NH-R²)-Ser-Gly-Gly-O-Sterol.

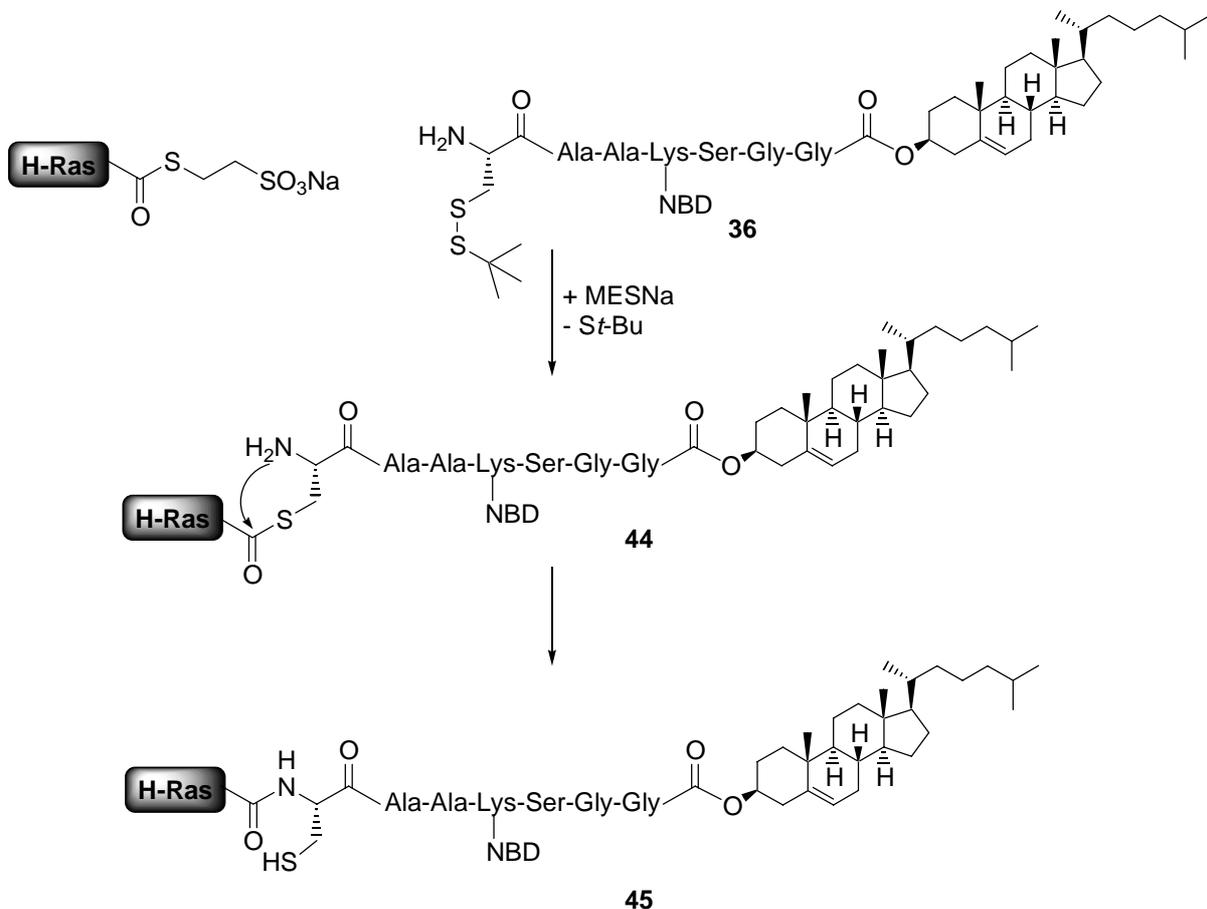
Die Ausbeuten liegen alle im hohen Bereich, was auf effiziente Kupplungen sowohl für die *N*-terminale als auch für die *C*-terminale Verlängerung schließen lässt.

4.1.4 Synthese der Proteinchimären

Zur Untersuchung der Membranbindung von Proteinen *in vitro* und *in vivo* sollten Konstrukte generiert werden, die aus *C*-terminalen sterolmodifizierten Hedgehog-Peptiden und trunkiertem Ras-Protein bestehen. Dabei übernimmt das Ras-Protein eine doppelte Funktion, denn einerseits dient es zur Erhöhung des Molekulargewichtes und damit zur besseren Simulation der natürlichen Situation, da natives, fluoreszenzmarkiertes Hedgehog-Protein nicht zugänglich war. Andererseits übernimmt es während der *in vivo* Untersuchungen die Funktion einer Sonde, da es nur bei erfolgreicher Membranassoziation seine Wirkung auf die Differenzierung der PC 12 Zellen ausüben kann.

Synthese der Proteinchimären durch Expressed Protein Ligation

Um zu untersuchen, ob auch eine Synthese der Proteinchimären mit natürlich vorkommender Amid-Bindung an der Ligationsstelle möglich ist, wurden der von Christine Nowak mittels IMPACT-Technologie (siehe Abschnitt 2.3.3) dargestellte H-Ras-MESA-Thioester mit dem fluoreszenzmarkierten *N*-terminal cysteininmodifizierten Lipopeptid **36** umgesetzt (Schema 17). Das Lipopeptid wurde *N*-terminal ungeschützt eingesetzt, wobei die Thiolfunktion des endständigen Cysteins als gemischtes Disulfid mit *tert.*-Butylmercaptan geschützt war. Diese Schutzgruppe wurde analog einem Protokoll von HEINEMANN et al.^[62] durch Behandlung der Reaktionsmischung mit großem Überschuss des Natriumsalzes von Mercaptoethansulfonsäure *in situ* abgespalten, wodurch es zur Umesterung des H-Ras-MESA-Thioesters mit dem Lipopeptid kam. Im nächsten Schritt erfolgte ein *S-N*-Acylylshift, der zur Bildung des Konjugats **45** mit natürlichem Peptidrückgrat führte.



Schema 17: Konstruktion der Proteinchimären aus Hedgehog-Peptid **36** und H-Ras-Protein über EPL.

Die Analyse des Reaktionsproduktes erwies sich als sehr schwierig, da es während der Reaktion (vermutlich bedingt durch Denaturierung) zu einem Ausfallen des Proteins kam. Nach Waschen des *pellets* mit organischen Lösungsmitteln zur Extraktion von nicht umgesetztem Lipopeptid, wurde das *pellet* mittels PAGE analysiert. Es zeigte eine fluoreszierende Bande, die im Massenbereich des gewünschten Produktes lag. Allerdings konnte kein Massenspektrum erhalten werden, da eine Resolubilisierung des *pellets* mit verschiedenen Detergenzien wie Triton[®] X-114, Cetyltrimethylammoniumhydrobromid (CTAB) oder 6 molares Guanidiniumhydrochlorid nicht gelang. Ein ähnliches Problem wurde auch schon von R. Reents in seiner Dissertation beschrieben,^[82] das augenscheinlich durch das Ras-Protein in Verbindung mit einem sehr lipophilen Peptid bedingt ist. Im Falle des Rab-Proteins konnte eine solche Verknüpfung erfolgreich durchgeführt werden, da zur Resolubilisierung des Rab-Proteins nach der Ligation das REP-Protein zugesetzt wurde. Dies bildet zusammen mit dem Rab-Protein einen stabilen Komplex und sorgt dafür, dass die Resolubilisierung gelingt. Im vorliegenden Fall könnte versucht werden, durch Zusatz von Interaktionspartnern wie Sos, eine Resolubilisierung des Ras-Proteins zu bewerkstelligen. Da dieser Weg der Generierung von Proteinchimären nicht erfolgreich war, wurde versucht, die gewünschten Konstrukte mit Hilfe der maleinimid-vermittelten Ligation zu erzeugen.

Maleinimid-vermittelte Peptid-Protein Ligation

Die Methode der Maleinimid-vermittelten Ligation wurde in den Arbeitsgruppen von WALDMANN und KUHLMANN zur Kopplung von verkürztem, bakteriell überexprimiertem H-Ras mit den entsprechenden C-terminalen Peptiden, die verschiedene Lipidierungsmuster und Fluoreszenzmarker trugen, benutzt.^[52, 53] Die Methode beruht darauf, dass Maleinimide rasch Alkylierungsreaktionen mit Thiol-Gruppen eingehen und dabei stabile Thioether-Bindungen bilden.^[51] Die Kopplung verläuft hochselektiv mit der Thiolfunktion des C-terminalen Cysteins 181, da dieses im wässrigen Puffer exponiert und damit frei zugänglich ist. In den Kopplungsexperimenten sollten Konstrukte generiert werden, die aus verkürztem N-Ras Protein und Hedgehog-Peptiden bestehen, wobei als Protein die G12V-Mutante Verwendung fand. Bei den Kopplungen, die in Zusammenarbeit mit Christine Nowak durchgeführt wurden, wurden verkürzte Proteine und das Peptid im äquimolaren Verhältnis eingesetzt.

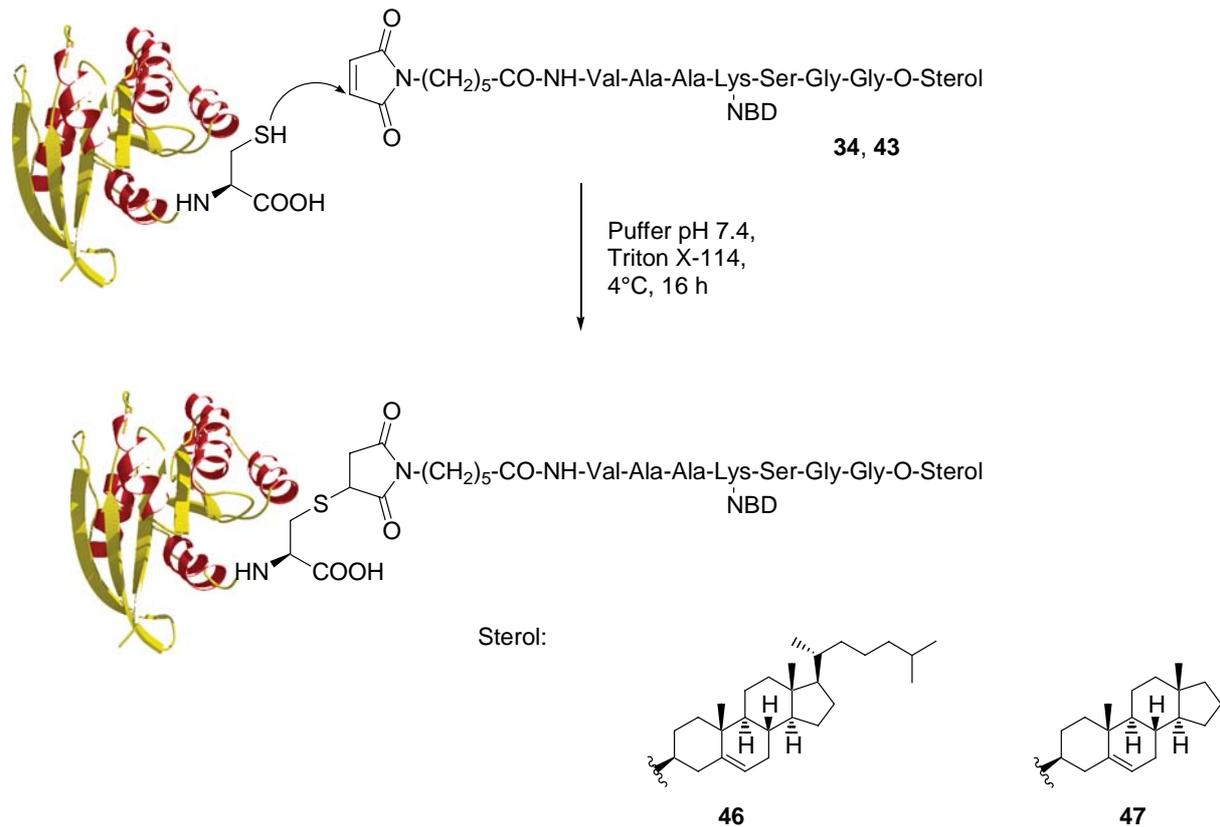


Abbildung 10: MIC-vermittelte Ligation von N-RasG12V(1-181) mit Hedgehog-Peptiden **34** und **43**.

Die Reaktionen fanden bei 4°C über Nacht in Tris-Puffer statt, der zur Solubilisierung der Lipopeptide **34** respektive **43** und des hydrophilen Proteins das nichtionische Detergens Triton® X-114 enthält, welches bei Temperaturen unter 30°C mit Wasser mischbar ist, sich aber bei Temperaturen von über 30°C von ihm separiert.^[102] Diese Trennung wird bei der Aufreinigung der lipophilen Peptid-Proteinkonstrukte ausgenutzt, da hierbei nicht umgesetztes verkürztes N-Ras in der wässrigen Phase verbleibt, wohingegen sich Lipoprotein und nicht umgesetztes Lipopeptid in der Triton® X-114-Phase befinden. Durch anschließende DEAE-Ionenaustauschchromatographie wurde das Lipoprotein vom Detergens und von nicht umgesetztem Lipopeptid befreit. Die Charakterisierung der Produkte **46** und **47** erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und ESI-/MALDI-Massenspektrometrie.

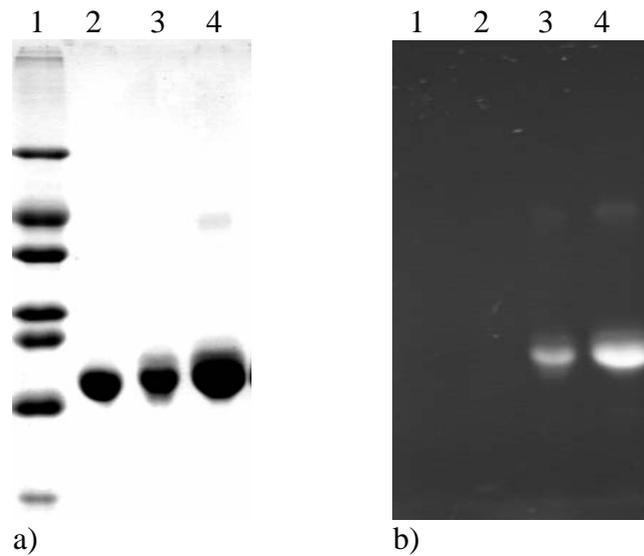


Abbildung 11: Gelelektrophoresebilder der Peptid-Protein-Konstrukte, a) nach Coomassie-Färbung, b) Fluoreszenzaufnahme; Spur 1: Größenstandard; Spur 2: N-RasG12V (1-181); Spur 3: N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Cholesterol (**46**); Spur 4: N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Androstenol (**47**).

In Abbildung 11 erkennt man im UV-Bild (b) die fluoreszenzmarkierten Peptid-Protein-Konjugate N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Cholesterol (**46**) (Spur 3) und N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Androstenol (**47**). Die Reinheit der Konjugate wird nach der Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar: auf Spur 2 ist das verkürzte N-Ras aufgetragen und man kann annähernd erkennen, dass die auf den Spuren 3 und 4 aufgetragenen Konjugate eine unterschiedliche Laufhöhe aufweisen. Die HPLC-Spektren der synthetisierten Protein-Chimären belegen, dass die Produkte sehr sauber sind. In Abbildung 12 ist repräsentativ das Spektrum für das Konjugat N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Cholesterol (**46**) abgebildet: bei $\lambda = 254$ nm absorbieren alle proteinischen und peptidischen Reste, wohingegen bei $\lambda = 468$ nm nur der NBD-Fluorophor absorbiert.

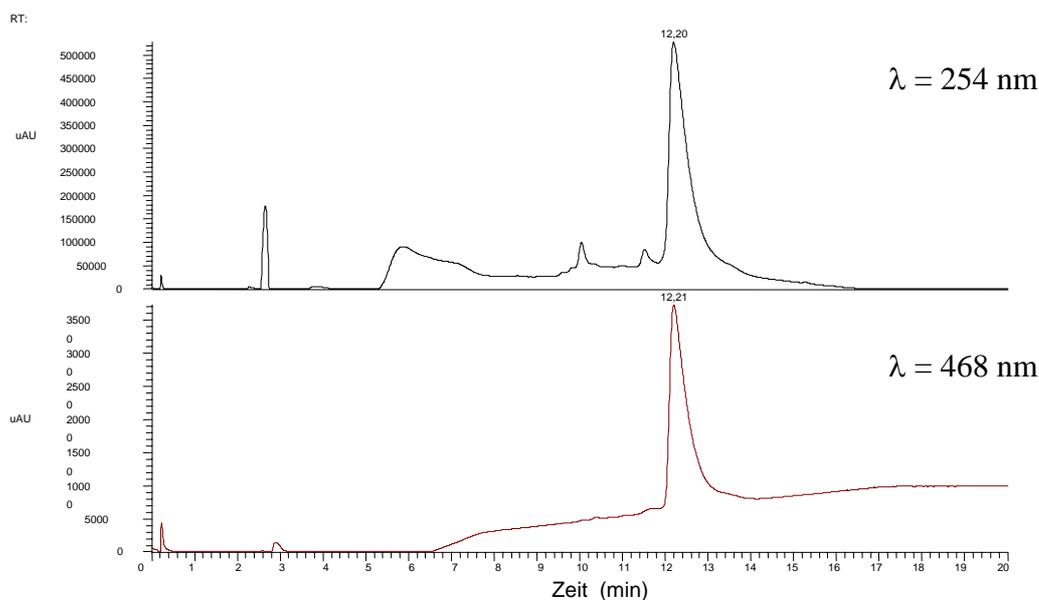


Abbildung 12: HPLC-Plot von **46**.

Die Massen der Konjugate wurden durch ESI-Massenspektrometrie nach Dekonvolution bestimmt, wobei eine sehr gute Übereinstimmung zwischen berechneten und tatsächlich gefundenen erkennbar ist (Tabelle 4). Die Bestimmung der Ausbeute wurde über die UV-Absorption der NBD-Gruppe durchgeführt,^[103] da es bei der Bestimmung des Proteingehalts der fluoreszenzmarkierten Analoga nach BRADFORD zur Präzipitation des Proteins kam.

Konjugat	Ausbeute	Masse, ber.	Masse, gef.
N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Cholesterol (46)	35 %	21753 D	21753 D
N-RasG12V(1-181)-Hh-O-Cholesterol (48)	-*	21590 D	21590 D
N-RasG12V(1-181)-Hh(NBD)-O-Androstenol (47)	46 %	21640 D	21641 D
N-RasG12V(1-181)-Hh-O-Androstenol (49)	-*	21477 D	21477 D

Tabelle 4: Massen der synthetisierten Protein-Peptid-Konjugate; * Bestimmung nicht möglich, da es bei BRADFORD-Assay zur Präzipitation des Proteins kam.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Anknüpfung der Maleinimidocaproyl-modifizierten Hedgehog-Peptide an verkürztes N-RasG12V in hohen Ausbeuten gelang, wobei die Konjugate ebenfalls in hohen Reinheiten erhalten werden konnten.

4.2 Biophysikalische Messungen

4.2.1 Intervesikeltransfer-Experimente mit Hedgehog-Peptiden und Hedgehogpeptid-Protein-Konstrukten

Die im Folgenden beschriebenen Messungen hatten als Ziel, den Einfluss verschiedener Sterole auf die Membranbindungseigenschaften der entsprechenden Lipopeptide zu untersuchen und wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biochem. Alexander Wolf (Abteilung I, Max-Planck-Institut) durchgeführt. Hierzu wurden die kinetischen Parameter mit Hilfe des Intervesikel-Austauschs bestimmt. Dieser Austausch basiert auf dem Prinzip, dass zunächst synthetische Lipidvesikel erzeugt werden, die neben dem fluoreszenzmarkierten Lipopeptid auch noch einen Fluoreszenzquencher tragen, der irreversibel in die Vesikel inkorporiert ist. Als Quencher wurde *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)-phosphatidyl-ethanolamin (Abb. 13) verwendet.

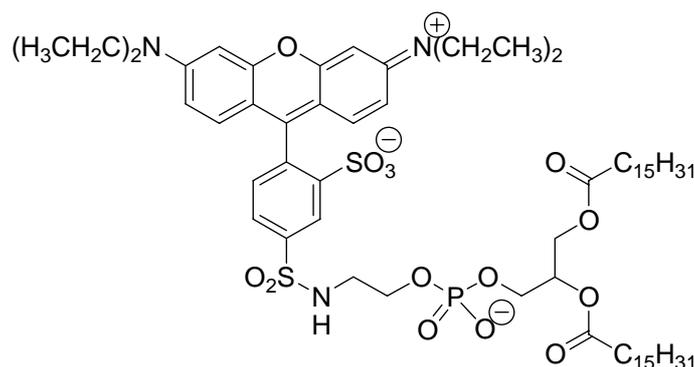


Abbildung 13: Struktur des verwendeten Fluoreszenzquenchers.

Dieser Quencher löscht die Fluoreszenz der NBD-Gruppe durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Befinden sich Quencher-molekül und NBD-markiertes Lipopeptid im gleichen Vesikel, so ist bei der Emissionswellenlänge des NBD kein Signal detektierbar.

Im nächsten Schritt wird nun ein großer Überschuss an unbeladenen Vesikeln zugegeben und die reversibel gebundenen Lipopeptide können in die quencherfreien Vesikel austauschen (Abb. 14). Damit ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer nicht mehr möglich und es kommt zum Anstieg der Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge des NBD-Fluorophors.

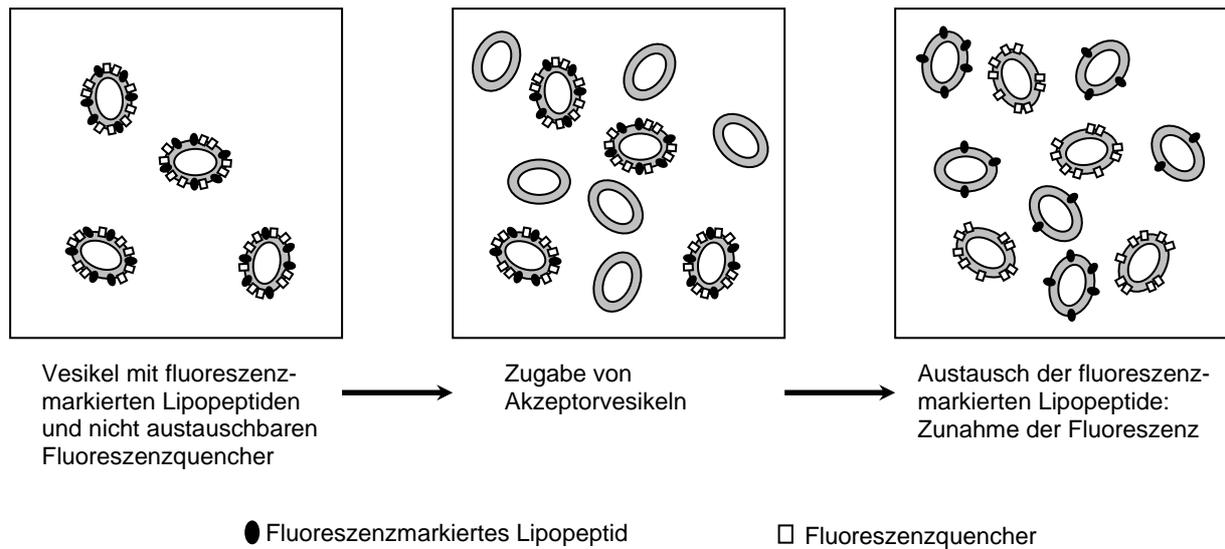


Abbildung 14: Prinzip des Intervesikeltransfers.

Die Messungen erfolgten an synthetischen Lipidvesikeln aus 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) als Modellmembran bei 20°C in HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 7 (Abb. 15).

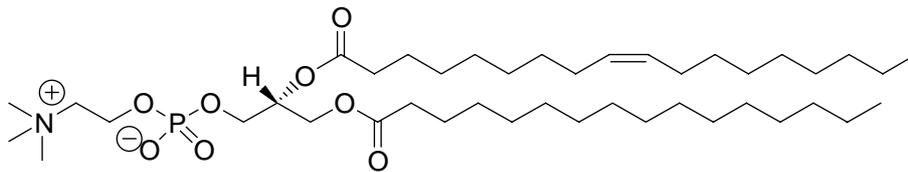


Abbildung 15: Struktur des Vesikel-Lipids 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC).

Während der Versuche fand die fluoreszenzspektroskopische Detektion der Lipopeptide bei der Emissionswellenlänge des NBD, 535 nm, statt. Zur Präparation der Vesikel wurden methanolische Stammlösungen von POPC und dem entsprechenden Lipopeptid gemischt, so dass Lipid und Peptid im Verhältnis von 100:1 vorlagen. Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels wurde ein Film erzeugt, der durch Zusatz von Puffer hydratisiert wurde. Zur Generierung der Vesikel wurde die resultierende Suspension fünfzig Frier-Tau-Schritten (-196°C → 60°C) unterworfen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind auf Seite 42 dargestellt.

Untersuchungen zum Flip-Flop-Austausch der Hedgehog-Peptide

In der Lipiddoppelschicht der Vesikel können die fluoreszenzmarkierten Lipopeptide sowohl an der Außenseite als auch an der Innenseite der Vesikel lokalisiert sein. Zwischen diesen

beiden Oberflächen findet ein ständiger Austausch lipidierter Peptide statt. Dieser Prozess wird Flip-Flop-Austausch genannt und muss bei der Bestimmung der kinetischen Daten berücksichtigt werden, da nur Lipopeptide auf der Außenseite des Vesikels in der Lage sind, direkt auf die Akzeptorvesikel überzugehen. Die im Innern der Vesikel gebundenen Peptide können erst nach Transfer der Doppelschicht durch Flip-Flop den Intervesikelaustausch vollziehen.^[104, 105] Daher ist es erforderlich, zunächst den Anteil des Flip-Flop Austausches am Gesamtprozess zu ermitteln. Hierfür wurden Vesikel generiert, die neben POPC als Lipidkomponente NBD-markiertes Lipopeptid im Verhältnis 1:100 beinhalten. Diese wurden dann mit einem Überschuss Natriumdithionit behandelt, das selektiv die Nitrogruppe des NBD-Fluorophors zur Aminogruppe reduziert und somit zur Zerstörung der Fluoreszenz führt.^[106, 107]

Bei beiden Proben war unmittelbar nach Zugabe der Dithionit-Lösung zu den beladenen Vesikeln ein starker Abfall der Fluoreszenzintensität zu beobachten, was auf die sofortige Reduktion der auf der Außenseite der Vesikel befindlichen NBD-Gruppen der Lipopeptide zurückzuführen ist. Die verbleibende Fluoreszenz nahm dann wesentlich langsamer ab, da die Lipopeptide im Innern der Vesikel erst über Flip-Flop-Transfer auf die Außenseite der Vesikel gelangen mussten.

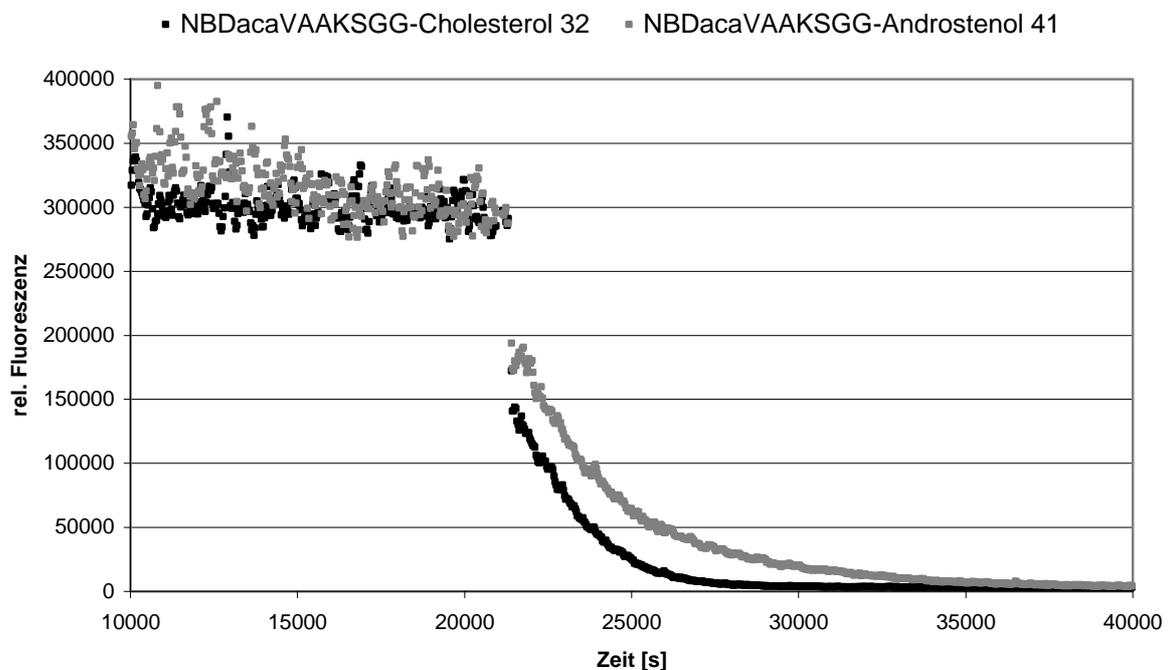


Abbildung 16: Fluoreszenzverläufe bei **32** und **41** nach Zugabe von Natriumdithionit-Lösung.

Aus Abbildung 16 wird erkennbar, dass im Fall des androstenol-modifizierten Hedgehog-Peptids **41** ein sofortiger Abfall der Fluoreszenz auf etwa 60 % des Ausgangswertes erfolgt. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Verteilung der Peptide zwischen Innen- und Außenseite der Lipiddoppelschicht etwa gleichmäßig vorliegt. Dies ist auch im Falle des Cholesterol-Membranankers **32** zu beobachten, da hier bei Dithionit-Zugabe ein sofortiger Abfall um etwa 50 % zu beobachten ist. Diese Gleichverteilung konnte auch bei einfach palmitoylierten Heptapeptiden beobachtet werden.^[108]

Betrachtet man den Flip-Flop Austausch als eine einfache Reaktion, so sollte sie einer Kinetik erster Ordnung folgen und der Bereich der langsamen Fluoreszenzabnahme durch eine einfache Exponentialfunktion angenähert werden können. Allerdings war es zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante erforderlich, einen linearen Anteil einzurechnen, was darauf hindeutet, dass der beobachtete Prozess deutlich komplexer ist.

Die Geschwindigkeitskonstante für den Flip-Flop-Austausch des androstenol-modifizierten Peptides **41** betrug $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit von 38.5 Minuten entspricht. Im Fall des cholesterol-modifizierten Peptides **32** ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von $5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, woraus eine Halbwertszeit von 23.1 Minuten resultiert. Vergleicht man diese Werte mit denen für monofarnesylierte und carboxymethylierte Peptide, so fällt auf, dass sie in der gleichen Größenordnung liegen, wobei die isoprenylierten Peptide eine etwas größere Geschwindigkeitskonstante ($k = 8.3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) besitzen.^[43] Berücksichtigt man die bei dieser Messung vorherrschende Temperatur von 15°C, so ist anzunehmen, dass unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ein deutlich erhöhter Flip-Flop-Austausch für die isoprenylierten Peptide stattfindet. Dies könnte in der im Vergleich zu den Sterolresten geringeren Hydrophobizität der Farnesylgruppe begründet liegen.

Intervesikeltransferexperimente

Zur Bestimmung des Intervesikeltransfers wurden die doppelt beladenen Vesikel vorgelegt und dann mit einem Überschuss von Akzeptorvesikeln umgesetzt wobei die zeitliche Änderung der Fluoreszenz beobachtet wurde. Aus orientierenden Experimenten war ersichtlich geworden, dass ein 12facher Überschuss an Akzeptorvesikeln einen ausreichend großen Überschuss darstellt, um den Einfluss des Rücktransfers auf die quencherbeladenen Vesikel zu minimieren. So konnte bei Verwendung von 20 Äquivalenten keine Änderung des Maximalwertes der Fluoreszenz festgestellt werden. Die Ergebnisse der

Intervesikeltransferexperimente der Lipopeptide **32** und **41** mit einem 12fachen Überschuss an Akzeptorvesikeln sind in Abbildung 17 dargestellt.

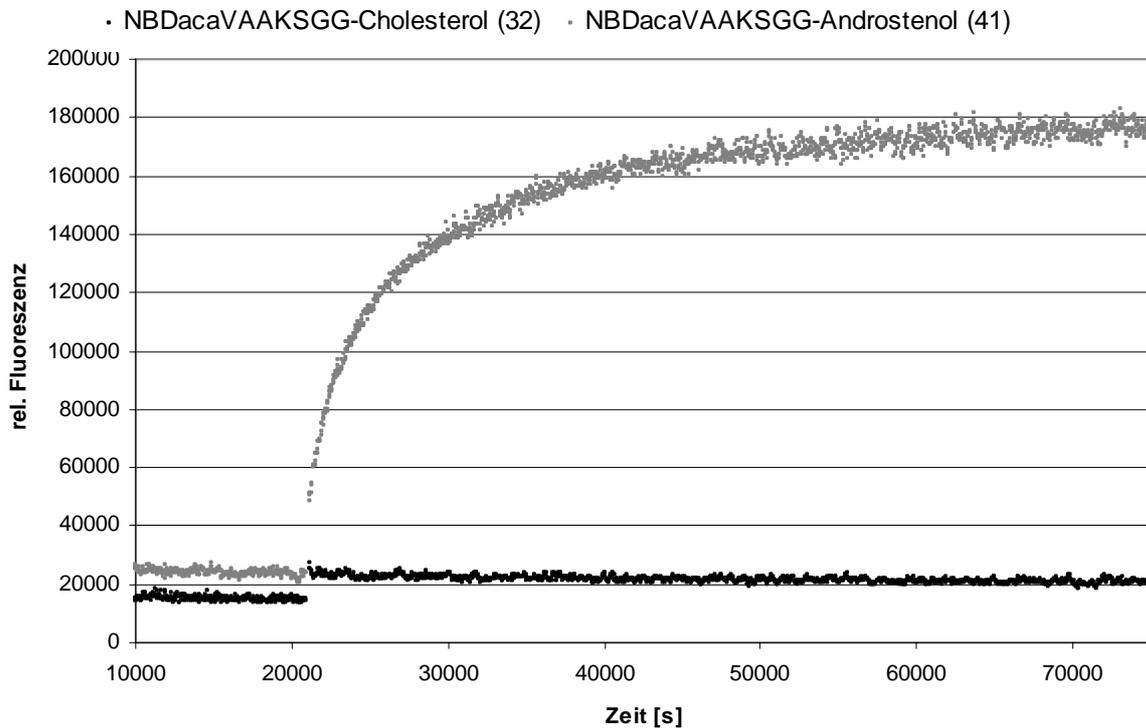


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei den Intervesikeltransferexperimenten von **32** und **41** bei 12fachem Akzeptorvesikelüberschuss.

Man erkennt für das androstenol-modifizierte Hedgehog-Peptid **41** einen Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der Akzeptorvesikel. Unter Annahme einer einfachen Transferreaktion konnte dieser Prozess durch eine einfach exponentielle Reaktion angenähert werden, die um einen linearen Anteil erweitert wurde. Dieser berücksichtigt den Transfer des Lipopeptids über den Flip-Flop-Mechanismus. Es ergab sich somit für den Gesamtprozess eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{diss}} = 2.55 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Im Fall des cholesterol-modifizierten Peptides **32** ist kein Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der Akzeptorvesikel zu erkennen. Die stufenartige Änderung der Fluoreszenz ist auf eine Erhöhung des Streulichtanteils zurückzuführen. Daher kann gefolgert werden, dass ein C-terminaler Cholesterolrest das Peptid **32** bei 20°C irreversibel in die Modellmembran inkorporiert.

Dieser Befund ist überraschend, da bisher noch nie beobachtet wurde, dass eine einzige Lipidmodifizierung die Hydrophobizität der Peptide so stark erhöht, dass daraus eine irreversible Membraninsertion resultiert. Bislang stellte ein Palmitoylrest die stärkste Membranbindung dar, die durch einen einzigen Lipidrest hervorgerufen wird und führt zu

einer fünfmal stärkeren Membranassoziation als eine Geranylgeranyl-Modifizierung.^[109] Eine stabile und unter physiologischen Bedingungen als irreversibel anzusehende Membraninsertion von Peptiden wurde nur für doppelt lipidmodifizierte Peptide gefunden. So wurden für Peptide, die doppelt *S*-geranylgeranyliert sind und *C*-terminal einen Methylester aufweisen Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{Diss}} = 1.6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ gefunden, was einer Halbwertszeit von 117 h entspricht.^[109] Eine vergleichbar starke Membranbindung wurde mit $k_{\text{Diss}} = 2.34 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Halbwertszeit $t_{1/2} = 82 \text{ h}$) für *S*-palmitoylierte, *S*-farnesylierte und *C*-terminal carboxymethylierte Peptide bestimmt. Es muss allerdings erwähnt werden, dass diese Werte an einem modifizierten Lipidsystem [Phosphatidylcholin (aus Eigelb)/ Phosphatidylglycerol (aus Phosphatidylcholin durch Transphosphatidylierung)/ 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamin 70:20:10] bestimmt wurden. Darüber hinaus betrug die Temperatur während der Messungen 37°C, was im Vergleich mit den bei 20°C bestimmten Geschwindigkeitskonstanten zu etwa vierfach höheren Werten führt.^[110] Doppelt *S*-palmitoylierte Peptide zeigten bei 20°C eine irreversible Inkorporation in POPC-Vesikel.^[111] Unter Berücksichtigung der variierten Versuchsbedingungen zeigt sich, dass Cholesterol als Membrananker in gleichem Maße zur irreversiblen Membraninkorporation führt, wie dies für oben angeführte doppelte Lipidmodifizierungen der Fall ist. Besonderes Augenmerk ist in diesem Zusammenhang auf den Androstenol-Anker zu legen, der dazu beiträgt, dass das Peptid um den Faktor 10 stärker an die Membran gebunden wird, als dies für monopalmitoylierte Peptide der Fall ist.^[111] Der Unterschied zum Cholesterol-Anker, der zu einem irreversiblen Membraneinbau führt, liegt in der verzweigten C-8-Kette, die am D-Ring des Steran-Grundgerüsts angehängt ist. Man kann also annehmen, dass diese verzweigte Alkylkette wie eine *zweite* Lipidmodifizierung wirkt, durch welche die Irreversibilität des Membraneinbaus bedingt wird. Warum Cholesterol alleine eine derart starke Membranaffinität bewirkt, ist eventuell durch seine Struktur erklärbar: die flachen und starren Ringe des Steran-Grundgerüsts können besonders gut mit den Fettsäureresten der Lipide in Wechselwirkung treten, während die polaren Kopfgruppen dieser Lipide mit der Esterfunktion am C-3-Atom des Cholesterol interagieren können.

Bislang wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt, die einen direkten Vergleich der Membranverankerung eines Peptids mit einem Protein erlauben. Dies liegt vor allem darin begründet, dass entsprechend lipid- und fluoreszenz-modifizierte Proteine nicht zugänglich waren. In Arbeiten von SILVIUS et al. wurden daher als Annäherung an proteinischen Systeme Konstrukte verwendet, die aus einem Lipopeptidteil und einer Polyethylenglykol-Einheit

genau definierter Größe bestehen, welche aufgrund ihres hydrophilen Charakters eine Näherung für Lipoproteine darstellen.^[109] Da durch die Methode der MIC-Ligation nun entsprechende semi-synthetische Proteine zugänglich sind, konnte nun erstmalig ein direkter Vergleich der Werte der Modellpeptide mit denen für Proteine erfolgen. Dazu wurden Intervesikeltransfer-Experimente mit den Peptid-Protein-Konstrukten **46** und **47** durchgeführt. Hierbei war es allerdings nicht möglich, die Vesikel analog zu den Peptid-Experimenten zu erzeugen, da dies zu einer Denaturierung des Proteins geführt hätte. Daher wurde zur Darstellung proteinhaltiger Vesikel ein alternativer Weg gewählt: in der Küvette wurde zum Messpuffer zunächst das fluoreszenzmarkierte Peptid-Konstrukt gegeben und anschließend quencherbeladene Vesikel hinzugefügt. Hierbei wurde das gleiche Fluorophor-Quencher-Verhältnis wie bei den Peptidexperimenten verwendet. Nach Aufnahme einer Basislinie wurde dann jeweils ein 12facher Überschuss an Akzeptorvesikeln zu der Lösung gegeben und der Verlauf der Fluoreszenzänderung verfolgt. Für die cholesterol- und androstenol-modifizierten Proteine **46** und **47** wurden die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse erhalten. Neben den beiden lipidmodifizierten Konstrukten wurde als Kontrollexperiment NBD-markiertes Ras-Protein vermessen, das keinen Lipidanker besitzt und somit auch keine Membraninsertion zeigen kann. Somit konnte sichergestellt werden, dass die beobachtete Änderung der Fluoreszenz eindeutig auf eine Einlagerung des entsprechenden Peptid-Proteinkonjugats in die Membran zurückzuführen ist.

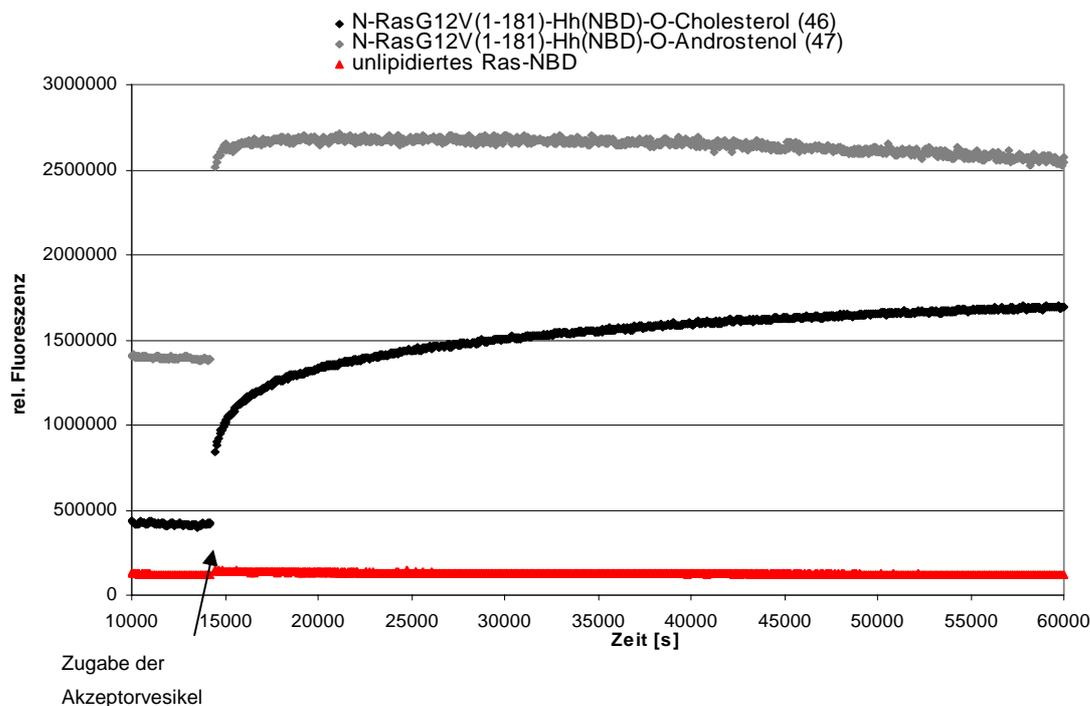


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei den Intervesikeltransferexperimenten mit Protein-Peptid-Konstrukten **46** und **47** bei 12fachem Akzeptorvesikelüberschuss.

Aus den Kurvenverläufen ist erkennbar, dass bei beiden Konstrukten ein Austausch stattfindet. Im Fall des Cholesterol-Ankers verläuft die Dissoziation signifikant langsamer als beim Androstenol-Anker. Für das cholesterol-modifizierte Protein **46** konnte der Verlauf durch eine mit einem linearen Anteil versehene Exponentialfunktion angenähert werden, wobei sich ein Wert für $k_{\text{Diss}} = 7.45 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ergab. Der Austausch des androstenol-modifizierten Proteins **47** konnte auf Grund der hohen Geschwindigkeit nicht mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie quantifiziert werden, sondern es waren Messungen in einer *stopped-flow*-Anordnung erforderlich. Hieraus konnte ein Wert für $k_{\text{Diss}} = 9.20 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so ist Cholesterol als Membrananker in der Lage, Peptide irreversibel in der Modellmembran zu immobilisieren, ist es jedoch proteingebunden, so wird aus dem irreversiblen ein reversibler Einbau in die Membran mit einer Dissoziationskonstante von $k_{\text{Diss}} = 7.45 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit von 2.6 h entspricht. Androstenol ist ein schwächerer Membrananker, was bedeutet, dass die Membranverankerung von Modellpeptiden mit einer Halbwertszeit von 45.3 Minuten und die Immobilisierung von Proteinen in Membranen mit einer Halbwertszeit von 0.013 Minuten erfolgt und damit sehr stark reversibel ist. Ein Vergleich der Messwerte zeigt, dass die für das cholesterol-modifizierte Konstrukt erhaltenen Werte etwa in der gleichen Größenordnung liegen, die SILVIUS für das Konstrukt aus doppelt *S*-geranylgeranyliertem und *C*-terminal carboxymethyliertem Peptid und PEG 2000 ermittelt hat ($k_{\text{Diss}} = 1.34 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $t_{1/2} = 14.4 \text{ h}$). Hierbei muss allerdings wiederum darauf hingewiesen werden, dass die Messungen an einem anderen Lipidsystem sowie bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt wurden. Die Fähigkeit des Cholesterols als Membrananker für Proteine zu fungieren ist also vergleichbar mit der von SILVIUS für doppelt *S*-geranylgeranylierte- oder *S*-palmitoylierte, *S*-farnesylierte und *C*-terminal carboxymethylierte Proteine vorhergesagten.^[109]

Weiterhin muss festgehalten werden, dass eine einfache Übertragung der für die Membranassoziation von Modellpeptiden erhaltenen Ergebnisse auf die entsprechenden Proteine nicht möglich ist. Es können nur Trends und relative Stabilitäten des Membraneinbaus für verschiedene Membrananker festgestellt werden, eine Bestimmung absoluter Werte für die Proteine aus ihren Membranlokalisationssequenzen allein ist nicht möglich.

4.2.2 BIAcore[®]-Experimente mit Hedgehogpeptid-Protein-Konstrukten

Die vorstehend geschilderten Untersuchungen mit den sterolmodifizierten Proteinen fanden an Liposomen statt, die aufgrund ihrer Natur eine stark gekrümmte Oberfläche besitzen. Um die natürliche Situation besser nachempfinden zu können, wurde der Membraneinbau an planaren Oberflächen mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) an einem BIAcore[®]-System untersucht. Das BIAcore[®]-System ist ein Fließinjektionssystem, bei dem durch das Andocken eines Sensorchips an ein Fließsystem vier Flusszellen entstehen, die über pneumatische Ventile einzeln angesteuert werden. Der Sensorchip besteht aus einer Glasschicht mit einem aufgedampften etwa 50 nm dicken Goldfilm und einer über einen Linker daran kovalent gebundenen Dextranmatrix. Das Detektionsprinzip beruht dabei auf der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR), einem optischen Phänomen, das auftritt, wenn Licht unter bestimmten Bedingungen auf einen dünnen leitenden Film einstrahlt. Vereinfacht kann eine Oberflächenplasmonschwingung ähnlich einem elektrischen Leiter als Oszillation von Elektronen auf der Oberfläche verstanden werden.^[112] Wird an der Rückseite (Dextranmatrix) dieser dünnen Oberfläche eine Modifizierung durchgeführt, so ändert sich auch das Oszillationsverhalten der Elektronen. Die dadurch geänderten Interferenzbedingungen lassen Rückschlüsse auf den Brechungsindex zu. Die Messungen begannen mit der Beschichtung des Sensorchips mit POPC als Modellmembran (Abb. 15) bei einer Temperatur von 20°C. Anschließend wurde durch Überspülen der entsprechenden Proteinlösung das Protein in die Membran inkorporiert. Durch weiteres Spülen mit reinem Puffer kann die Desorption des Proteins aus der Modellmembran verfolgt werden (Abb. 19).

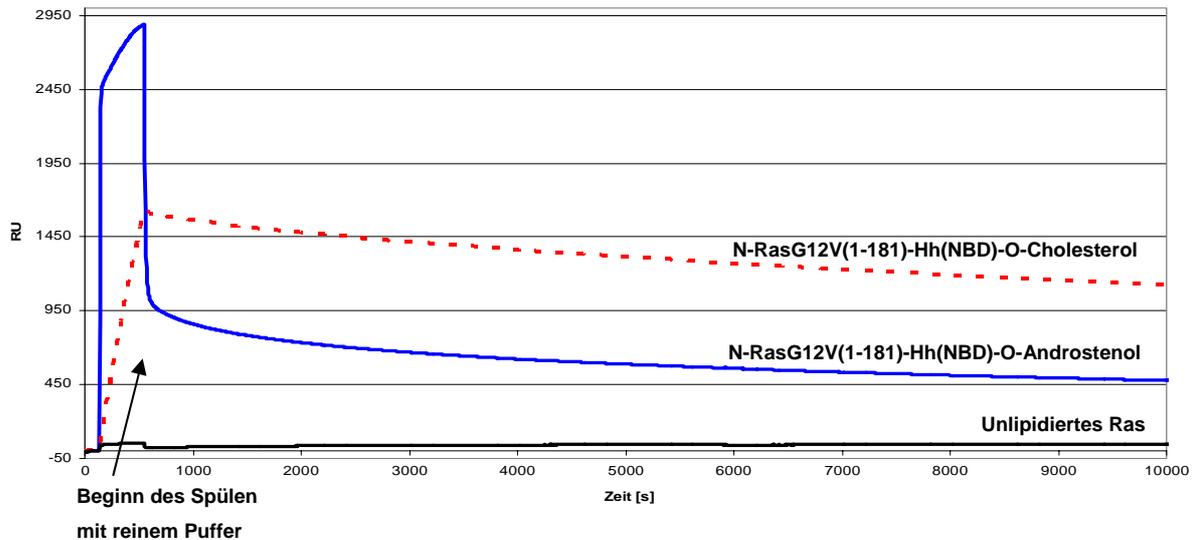


Abbildung 19: BIAcore-Läufe der verschiedenen Protein-Konstrukte.

Es konnte festgestellt werden, dass sich das androstenol-modifizierte Konjugat **47** im Vergleich mit dem cholesterol-modifizierten Konstrukt **46** schneller in die Membran einlagert und schneller wieder heraus diffundiert. Die Diffusion des Konstruktes **47** vollzieht sich sehr langsam, was auf einen sehr stabilen Einbau des Proteins in die Membran hindeutet. Für diese Dissoziation lässt sich eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{Diss}} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Halbwertszeit: 3.21 h) bestimmen, so dass für die Diffusion aus planaren Membranen ein Wert erhalten wird, der nur geringfügig kleiner ist als jener, der für den Intervesikeltransfer von **46** bestimmt wurde. Dieser nicht so gravierende Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Lipoproteine im vorliegenden Fall nur über *einen* Lipidanker verfügen, der sich leichter in sphärische Lipiddoppelschichten einlagern kann, als dies zum Beispiel für zwei Lipidanker der Fall ist.

Um zu zeigen, dass der Einbau der Peptid-Protein Konstrukte spezifisch über die Sterolfunktion erfolgt, wurde anstelle der Konstrukte **46** und **47** ein MIC-ligiertes Konjugat bestehend aus dem verkürzten Ras-Wildtyp (1-181) und dem Peptid **34** verwendet. In diesem besteht der Proteinteil nicht aus der G12V-mutierten Form, wodurch bei korrektem Membraneinbau die Möglichkeit der Interaktion mit Proteinen aus dem Ras-Signalweg besteht. Nach Immobilisierung des Konstruktes auf der Membran konnte bei Applikation einer Sos-Protein Lösung eine Bindung beobachtet werden (Abbildung 20).

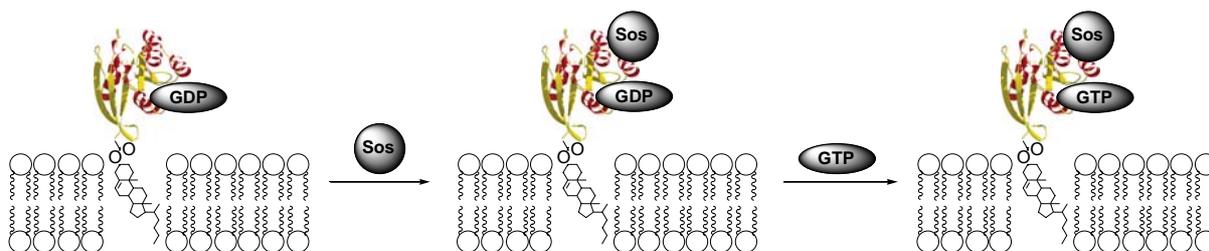


Abbildung 20: Interaktion des membrangebundenen, cholesterolmodifizierten Ras-Wildtyp(1-181) mit dem Sos-Protein und GTP.

Diese Bindung kann durch Spülen mit Guanosin-triphosphat (GTP) wieder rückgängig gemacht werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte selektiv über die Sterolfunktion in die Membranen eingebaut und darüber hinaus nicht denaturiert sind.

Die aus den biophysikalischen Experimenten gewonnenen Daten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

	Geschwindigkeitskonstante	Halbwertszeit
cholesterolmod. Peptid 34	irreversibel	-
androstamolmod. Peptid 43	$k_{\text{Diss}} = 2.55 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	45.3 min
cholesterolmod. Protein 46	$k_{\text{Diss}} = 7.45 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	155 min (2.58 h)
	$k_{\text{Diss}} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [BIACore]	193 min (3.21 h) [BIACore]
androstamolmod. Protein 47	$k_{\text{Diss}} = 9.20 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	0.013 min
	$k_{\text{Diss}} = 8.6 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ [BIACore]	0.013 min [BIACore]

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der biophysikalischen Experimente.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass Cholesterol in der Lage ist, Peptide irreversibel in der Modellmembran zu inkorporieren, wohingegen Proteine mit einer Halbwertszeit von etwa 3 h eingebaut werden. Damit ist der Cholesterol-Anker ungefähr mit einer doppelten Lipidmodifizierung wie zum Beispiel einem doppelten Geranylgeranylrest oder auch der Kombination eines Palmitoyl- und eines Farnesylrestes gleichzusetzen. Im Gegensatz dazu werden androstamol-modifizierte Peptide um eine Größenordnung stärker in die Membran eingebaut als monopalmitoylierte, während dieser Anker nicht in der Lage ist, entsprechende Proteine mit einer unter physiologischen Gesichtspunkten signifikanten Halbwertszeit an die Modellmembran zu binden.

Überträgt man die für das Cholesterol als Membrananker gewonnenen Ergebnisse auf die Situation im Signalweg des Hedgehog-Proteins, so bleibt folgendes festzuhalten: durch den N-terminalen Palmitoylrest und das C-terminale Cholesterol besitzt das Hedgehog-Protein zwei starke Membrananker. Da Cholesterol alleine schon zu einer sehr starken Bindung von Proteinen an die Membran führt, ist zur Ausschleusung des Proteins aus dieser eine Unterstützung in Form des Dispatched-Protein essentiell (*vide supra*). Insgesamt gibt es also klare biophysikalische Hinweise, warum die Natur an dieser Stelle einen *Release-Mechanismus* installiert hat.

4.2.3 Mikroinjektion der Peptid-Proteinkonstrukte

Nachdem die biophysikalischen Parameter zur Membraninsertion der Protein-Konjugate **46** und **47** sowohl an stark gekrümmten als auch an planaren Oberflächen bestimmt worden sind, sollte evaluiert werden, inwieweit diese Konjugate eine biologische Aktivität zeigen. Hierzu wurde von Dipl.-Biochem. Melanie Wagner (Abteilung I, Max-Planck-Institut) ein Differenzierungsassay mit PC12-Zellen durchgeführt. Durch konfokale Mikroskopie konnte ferner die Lokalisation in MDCK-Zellen beobachtet werden.

Bei den PC12-Zellen handelt es sich um neuronale Vorläuferzellen, die die Eigenschaft besitzen, nach Mikroinjektion von onkogenem Ras unter Ausbildung von neuritenartigen Ausläufern zu differenzieren.^[113, 114] Es ist hierbei essentiell, dass das Ras-Protein in der Plasmamembran lokalisiert ist und nicht cytosolisch vorliegt, da sonst keine Initiierung der Differenzierung stattfindet. Somit findet hier ein Testsystem Verwendung, bei dem das Ras-Protein die Funktion einer Sonde übernimmt und in dem unterschiedliche Membrananker auf ihre Fähigkeiten zur Membranbindung *in vivo* untersucht werden können. Die Protein-Konjugate wurden in einer Konzentration von 60 μM mikroinjiziert, wobei im Fall des Konjugats **46** die tatsächliche Konzentration geringer ist, da es zum Ausfall des Peptid-Protein-Konjugats kam. Hierbei wurden für jeden Datenpunkt vier unabhängige Messungen mit jeweils mindestens 15 injizierten Zellen durchgeführt.

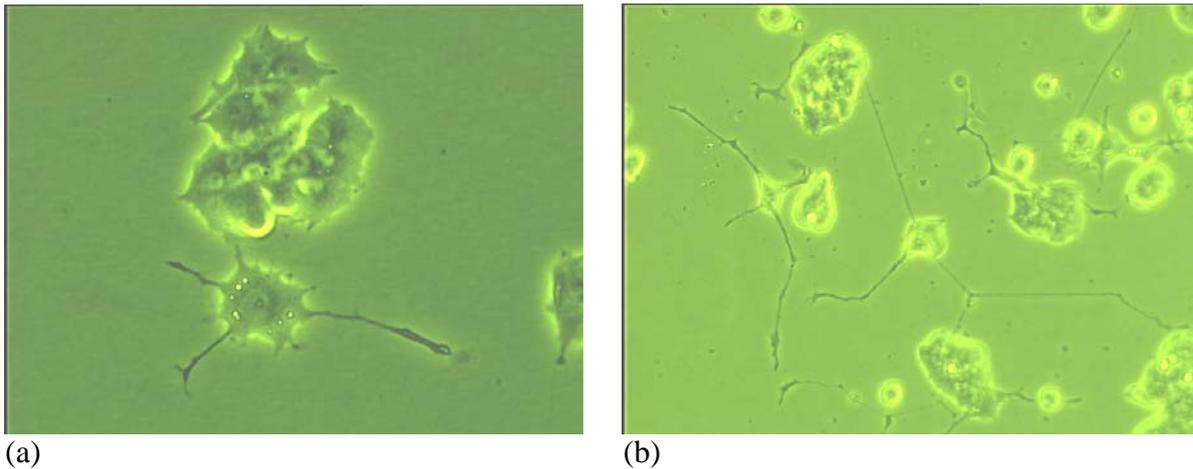


Abbildung 21: Transformation von PC12-Zellen nach Mikroinjektion der Hedghog-Ras-Konstrukte **47(a)** und **46(b)**.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Mikroinjektion exemplarisch dargestellt: es ist in (b) ein deutliches Neuritenwachstum erkennbar, wohingegen für das androstenol-modifizierte Konjugat (a) eine schwächere Ausbildung der Neuriten festzustellen ist. Die Auszählung aller Zellen ergab, dass bei Mikroinjektion von **46** 56.1 ± 4.1 % respektive bei **47** 27.1 ± 6.9 % der Zellen Neuriten ausbilden. Diese Werte spiegeln die Tendenz wieder, die für die Konstrukte *in vitro* bestimmt worden sind. Sehr überraschend ist, dass die Werte für das cholesterol-modifizierte **46** annähernd in der Größenordnung von Volllängen-Ras (Transformationsrate: 79 ± 14 %^[52]) liegen, welches nach Mikroinjektion in die PC12 Zellen zum doppelt lipidierten Protein post-translational modifiziert wird. Offensichtlich genügt die Cholesterolfunktion alleine, um das Protein *in vivo* stabil in die Membran einzubauen. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass das PC12-Testsystem universell einsetzbar ist, um die *in vivo* Aktivität verschiedener Lipidmodifizierungen abzuschätzen.

Nach Untersuchung der biologischen Aktivität im PC12-Differenzierungsassay wurde die Lokalisation der Konstrukte nach Mikroinjektion in MDCK-Zellen evaluiert. Für Volllängen-Ras-Proteine konnte in diesem Assay eine Anreicherung im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran gefunden werden. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Lokalisationstudien für die Hedghog-Ras-Konstrukte **46** (cholesterol-modifiziert) und **47** (androstenol-modifiziert) abgebildet.

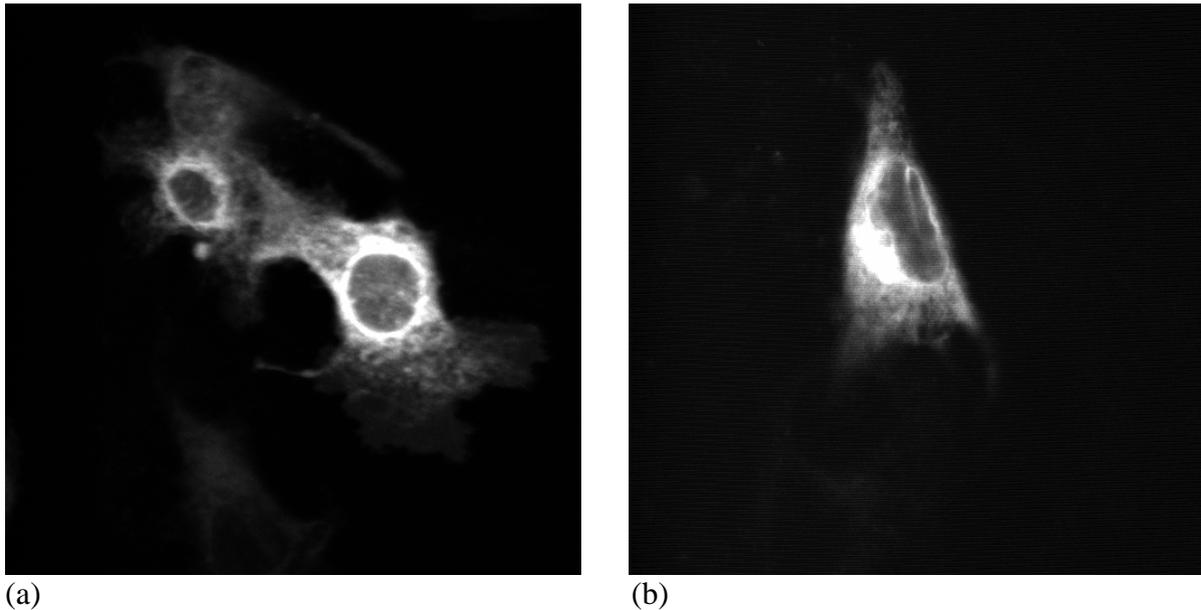


Abbildung 22: *In vivo* Lokalisierung nach Mikroinjektion von Hedgehog-Ras-Konstrukten **47(a)** und **46(b)** in MDCK-Zellen.

Für diese Konstrukte scheint eine Anreicherung nur im Golgi-Apparat und Endomembran-System stattzufinden. Daneben kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob ein Einbau in die Plasmamembran zu einem signifikanten Teil erfolgt, wie es aus den Ergebnissen des PC12-Assay gefolgert werden müsste. Aufgrund der sehr starken Fluoreszenz im Bereich des Endomembran-Systems kommt es zu einer Sättigung des Signals, die keine eindeutige Differenzierung zur Plasmamembran mehr erlaubt. In weiteren Untersuchungen, die zurzeit durchgeführt werden, werden verschiedene Konzentrationen an Konstrukt appliziert, die eine genauere Analyse erlauben sollten.

4.3 Untersuchungen zum Einbau in Lipid Rafts

4.3.1 Festphasensynthese unterschiedlich lipidiertes Influenza-Peptide

In der Lipiddoppelschicht komplexer Viren sind Glycoproteine eingelagert, die Palmitoyl-Reste tragen. Diese Palmitoylreste sind als Thioester an Cysteine gebunden, die sich nahe dem Transmembran-Bereich und dem cytoplasmatischen Fortsatz befinden.^[115] Einer der prominentesten Vertreter dieser Klasse von Proteinen ist das Hämagglutinin des Influenza-Virus A.^[116-118] Die glycosylierten Anteile des Proteins, die sich außerhalb der Viren-

Membran befinden, binden selektiv an die Sialinsäure-Rezeptoren der Wirtszelle, wodurch eine Infektion eingeleitet wird.^[119, 120]

Die gebundenen Palmitoyl-Reste sind ebenfalls an den entscheidenden Schritten einer Virus-Infektion beteiligt: so sind sie nach dem Eintritt des Virus in die Zelle zur Initiierung und Kontrolle von Prozessen zur Membran-Fusion zwischen Endosom und Virus-Hülle notwendig. Weiterhin ermöglichen diese Lipidmodifizierungen die Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und dem freien Capsid bei der Ausknospung von Nachkommen des Virus.^[121, 122] Darüber hinaus wurde gefunden, dass diese Lipidmodifizierungen eine wichtige Rolle bei der Assoziation des Hämagglutinins mit *lipid rafts* (siehe auch Kapitel 2.2) spielen.^[123]

Daher sollte im Rahmen eines Teilprojektes dieser Arbeit der C-Terminus des Hämagglutinins des Influenza-Virus A in Form eines unterschiedlich palmitoylierten Heptapeptids synthetisiert werden (Abb. 23).

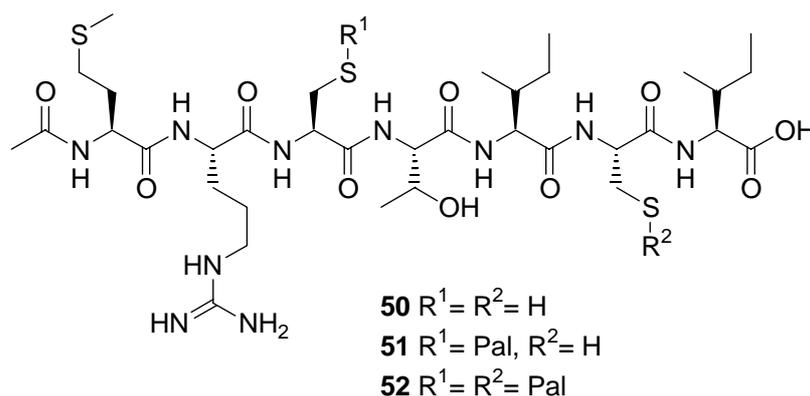


Abbildung 23: C-terminale Heptapeptidsequenz des Influenza-Virus A Hämagglutinins.

Das doppelt palmitoylierte Peptid wurde in *N*-terminal fluoreszenzmarkierter Form von EISELE im Rahmen seiner Dissertation unter Verwendung der *para*-Phenylacetoxybenzylester (PAOB-Ester)-Schutzgruppe in Lösung dargestellt.^[108, 111]

Um einen effektiven und raschen Zugang zu den unterschiedlichen Heptapeptiden zu ermöglichen, wurde beschlossen, die Synthese am polymeren Träger durchzuführen. Dies eröffnet zwei mögliche Wege zum Aufbau der Peptide:

- der Einbau der Palmitoyl-Reste während der Synthese würde aufgrund der Basenlabilität der Thioester bedeuten, dass als temporäre Schutzgruppe für den *N*-Terminus die Boc-Gruppe verwendet wird. Ferner kommt als Verbindung zum polymeren Träger nur der HYCRON-Linker in Betracht, da dieser Palladium(0)-

vermittelt unter neutralen oder schwach sauren Bedingungen und somit orthogonal zu den vorhandenen Funktionalitäten gespalten werden kann. ^[124]

- b) der Aufbau des zentralen Peptides mittels Fmoc-Strategie und Einführung der Palmitoyl-Reste am polymeren Träger nach Abschluss der Synthese. Hierbei erfolgen die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen unter sauren Bedingungen. Dieser Weg benötigt eine gut abgestimmte Wahl der Schutzgruppen für die Thiol-Funktionen der Cysteine, um eine selektive Entschützung zur Generierung der unterschiedlichen Lipidierungsmuster zu gewährleisten.

Der Aufbau der drei verschiedenen Heptapeptide sollte mit der Strategie b) erfolgen, da diese den Vorteil bietet, den Verlauf der Synthese am polymeren Träger über Beladungsbestimmungen mittels Fmoc-Abspaltung zu verfolgen. Darüber hinaus erfolgt die Abspaltung im letzten Schritt nur durch Säure, so dass ein aufwendiges Entfernen von Palladiumspuren aus der Abspalllösung für die anschließenden biophysikalischen Messungen nicht erforderlich ist.

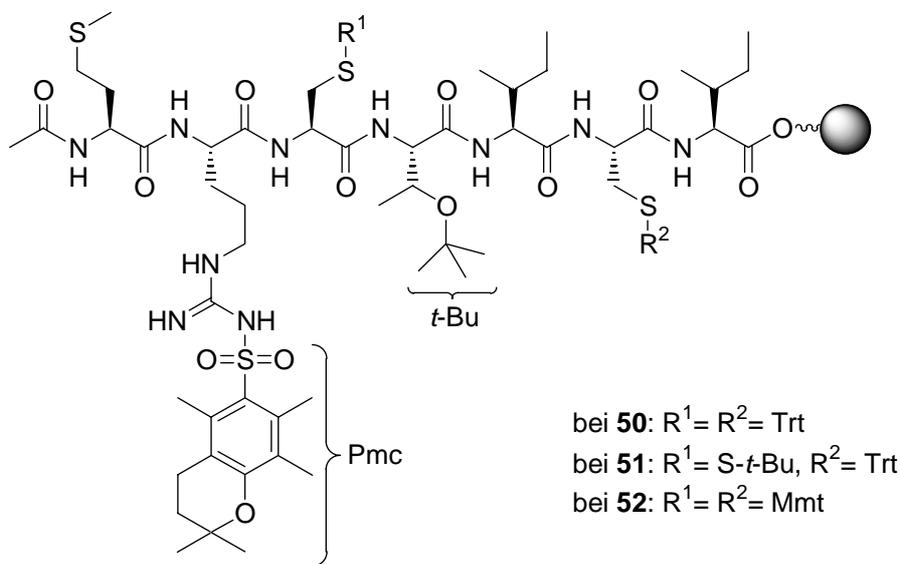
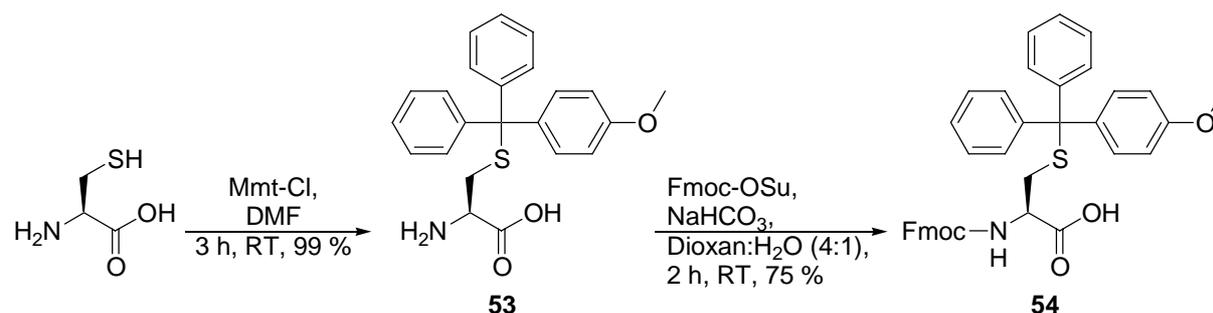


Abbildung 24: Schutzgruppenstrategie bei der Synthese der Influenza-Virus A- Heptapeptide.

Die Hydroxyfunktion der Threoninseitenkette wurde als *tert.*-Butylether geschützt, der während der finalen Abspaltung vom polymeren Träger entfernt wird. Die Guanidinium-Einheit des Arginins ist sehr nucleophil und damit anfällig für Acylierungen, sie wird daher als Pentamethylchromansulfonamid (PMC) geschützt, wodurch die Elektronendichte der Guanidinium-Einheit herabgesetzt wird. ^[125] Diese Schutzgruppe kann ebenfalls durch

Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt werden. Besonderes Augenmerk richtet sich auf die Schutzgruppen der Thiol-Funktionen der Cysteine, da dort die Palmitoylmodifizierungen eingefügt werden sollen: im Falle des nicht lipidierten Heptapeptids **50** werden diese Seitenketten als Tritylthioether geschützt. Sie werden nach Abschluss der Synthese während der Abspaltung vom Harz ebenfalls gespalten. Zur Synthese des monolipidierten Peptids **52** wurden zwei unterschiedliche Thiol-Schutzgruppen eingesetzt: das unpalmitoylierte Cystein wurde wiederum als Tritylthioether geschützt, während das zu lipidierende Cystein als gemischtes Disulfid mit *tert.*-Butylmercaptan geschützt wurde. Somit ist eine selektive Entschützung unter reduktiven Bedingungen und eine selektive Monopalmitoylierung am polymeren Träger möglich. Zur Generierung der doppelt palmitoylierten Heptapeptide **52** wurden die Thiol-Funktionen der Cysteine als säurelabile 4-Monomethoxytritylthioether geschützt.^[126] Hierzu war es zunächst erforderlich, die entsprechend doppeltgeschützten Cystein-Bausteine darzustellen (Schema 18).

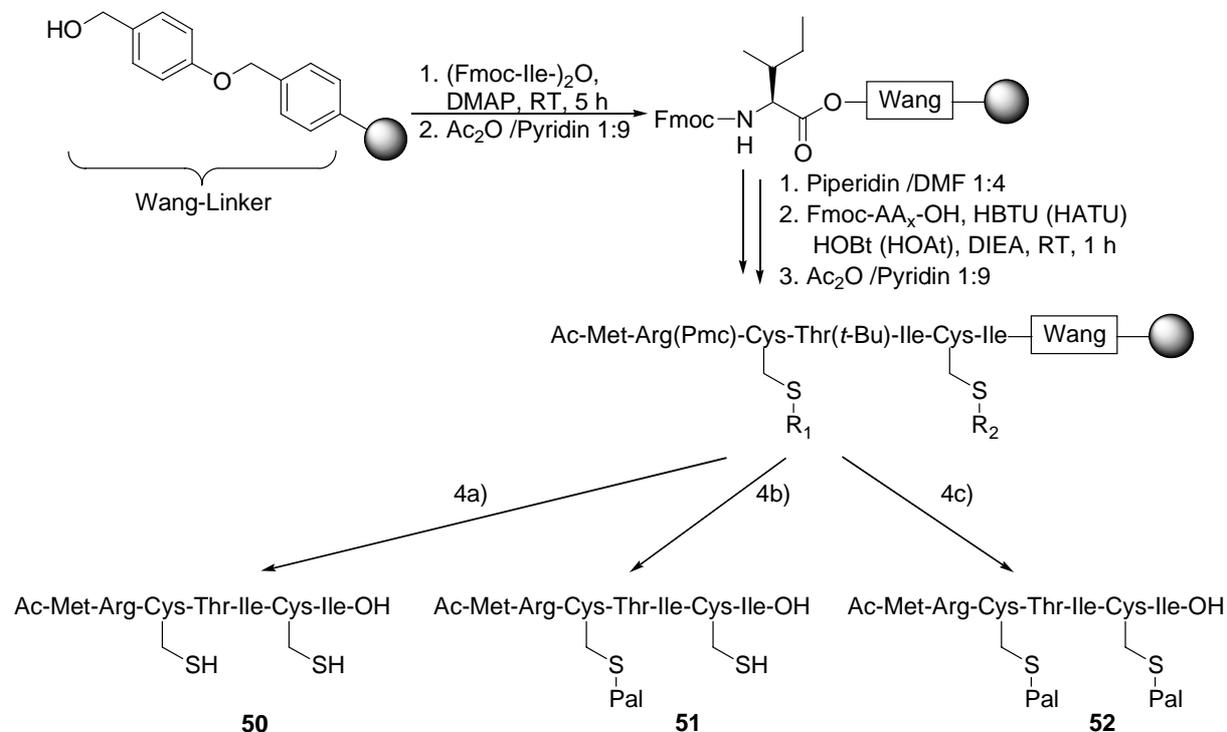


Schema 18: Synthese des Bausteins Fmoc-Cys(Mmt)-OH **54**.

Die Synthese gelang ausgehend von L-Cystein, das zunächst mit 4-Monomethoxytritylchlorid umgesetzt wurde, wodurch eine selektive Schützung der Thiolfunktion erreicht wurde. Anschließend wurde der *N*-Terminus durch Umsetzung mit Fmoc-OSu geschützt und man erhielt das gewünschte doppeltgeschützte Produkt in einer Ausbeute von 74 % über beide Stufen.

Zur Synthese der drei Heptapeptide musste als erstes das Harz beladen werden: als Linkergruppe wurde der Wang-Linker verwendet, der unter sauren Bedingungen (95 % Trifluoressigsäure) spaltbar ist. Die Anknüpfung der ersten Aminosäure (Fmoc-Ile-OH) an das Polymer geschah in einem zweistufigen Prozess. Zunächst wurde durch Umsetzung der Aminosäure mit DIC das entsprechende symmetrische Anhydrid gebildet, welches dann in einem zweiten Schritt unter Steglich-Bedingungen mit dem Benzylalkohol des Harzes verestert wurde (Schema 19). Dadurch konnten Harzbeladungen von etwa 80 % erzielt

werden. Nach Anknüpfung der ersten Aminosäure wurden die verbliebenen freien Hydroxyfunktionalitäten durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (1:9 (v/v)) blockiert.



Schema 19: Synthese der drei unterschiedlich lipidierten Influenza-Virus A Peptide **50**, **51** und **52**.

4a) 95% TFA, 5% TIS; 4b) 1. DTT (20 eq), DIEA (2.5% v/v) 2. Pal-Cl (30 eq), NEt₃ (10 eq), β-ME (5 eq), cat. DMAP, 16h, 3. 95% TFA, 5% TIS 4c) 1. 1% TFA 6*10 min, 2. Pal-Cl (60 eq), NEt₃ (10 eq), β-ME (10 eq), cat. DMAP, 16h 3. 95% TFA, 5% TIS.

Der weitere Aufbau der Peptidkette erfolgte unter Standardbedingungen der Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese bei Verwendung des Kupplungsreagenz HBTU / HOBt. Zur Einführung des Arginin-Bausteins war ein Wechsel der Aktivierungsreagenzien zu HATU / HOAt^[127, 128] und des Lösungsmittels zu NMP erforderlich, da sonst die nachfolgenden Kupplungen unvollständig abliefen. Durch Verwendung dieser stärker aktivierenden Reagenzien konnte das unmodifizierte Influenza Virus A Heptapeptid **50** nach Abspaltung mit 95 %iger Trifluoressigsäure (Schema 19; 4a)) in einer akzeptablen Ausbeute von 22 % erhalten werden. Die Synthesen der linearen Sequenzen von **51** und **52** erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bei **50**: Verwendung von HATU / HOAt für die letzten beiden Kupplungsschritte. Zur Vermeidung einer Oxidation des Methionins wurde die letzte Kupplung inklusive des Aktivierungsschrittes unter Argon durchgeführt. Zur Einführung der Monolipidierung (4b)) wurde zunächst die *tert.*-Thiobutyl-geschützte Thiofunktion selektiv

freigesetzt. Dies gelang unter Verwendung von 20 Äquivalenten Dithiothreitol und 2.5 Vol.-% DIEA in DMF bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 16 h, wobei die Spaltung annähernd quantitativ verlief. Zur anschließenden Palmitoylierung wurde das polymergebundene freie Thiol mit 30 Äquivalenten Palmitoylchlorid, 10 Äquivalenten Triethylamin, einer katalytischen Menge DMAP sowie 5 Äquivalenten β -Mercaptoethanol zur Vermeidung der Disulfidbildung umgesetzt.^[129] Diese Acylierungsreaktion wurde für 16 h durchgeführt. Nach Abspaltung vom Harz mit 95 %iger Trifluoressigsäure und 5 % Triethylsilan als *Scavenger* konnte das monopalmitylierte Heptapeptid **51** erhalten werden. Die Synthese lieferte neben dem gewünschten Peptid **51** auch noch das unpalmitylierte Peptid **50**, das durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 abgetrennt und somit **51** in einer Gesamtausbeute von 9 % erhalten werden konnte. Eine Verlängerung der Reaktionszeit respektive eine Wiederholung des Acylierungsschrittes führten zu keiner Verbesserung der Ausbeute. Zur Synthese (4c)) des doppelt palmitylierten Heptapeptids **52** erfolgte zunächst die selektive Freisetzung der cysteinischen Thiol-Funktionen durch Abspaltung der Mmt-Gruppe mit 1 % Trifluoressigsäure und 1 % Triethylsilan in Dichlormethan für jeweils 10 min. Die Reaktion wurde sechsmal wiederholt, bis keine durch das Mmt-Kation hervorgerufene charakteristische Gelb-Orangefärbung der Abspaltlösung mehr erkennbar war. Anschließend wurde die doppelte Lipidmodifizierung durch Reaktion mit 60 Äquivalenten Palmitoylchlorid, 10 Äquivalenten Triethylamin sowie einer katalytischen Menge DMAP eingeführt.^[129] Zur Verhinderung der in diesem Fall möglichen internen Disulfidbildung wurden 10 Äquivalente β -Mercaptoethanol zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h erfolgte die Abspaltung vom polymeren Träger mit 95 %iger Trifluoressigsäure und 5 % Triethylsilan als *Scavenger* und lieferte nach Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie das doppelt palmitylierte Influenza Virus A Heptapeptid **52** in einer Ausbeute von 13 %.

Die Synthese am polymeren Träger stellt somit einen raschen und effektiven Zugang zu den unterschiedlich lipidierten Influenza-Virus A-Peptiden dar.

4.3.2 Biokalorimetrische Experimente mit den Influenza-Peptiden

Um zu evaluieren, welchen Einfluss die Lipidmodifizierung auf die Assoziation des Peptids mit einem Modellsystem der *lipid rafts* hat, wurden Untersuchungen mit Hilfe der differentiellen Scanning-Kalorimetrie (DSC) durchgeführt. Diese wurden an

Modellmembranen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Richard M. Epand an der McMaster-University in Hamilton, Ontario, Kanada durchgeführt. Wie in Kapitel 2.2 schon erwähnt, handelt es sich bei *lipid rafts* um cholesterolreiche Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran; um diese Situation in einem Modellsystem nachzuahmen, wurde als Membranlipid 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ohne und mit unterschiedlichen Anteilen Cholesterol (25- und 40 mol%) vermessen.

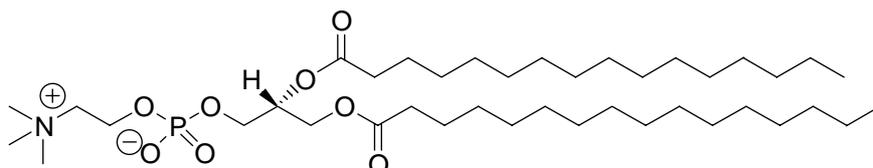


Abbildung 25: Struktur des Membranlipids 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC).

Hierbei stellt die Mischung aus DPPC mit 40 mol% Cholesterol ein gutes Modellsystem für cholesterolreiche Membranen dar und weist somit eine Membranzusammensetzung auf, die den *lipid rafts* angenähert ist. In den Messungen wurden multilamellare Vesikel mit einem Lipid:Peptid Verhältnis von 20:1 verwendet: zur Generierung der Vesikel wurden entsprechende Mengen der Stammlösungen von Lipid, Peptid und Cholesterol gemischt und dann durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel ein Film erzeugt, der durch Zugabe von PIPES-Puffer hydratisiert wurde, so dass sich eine Konzentration von 2.5 mg Lipid pro ml ergibt. Mit den so dargestellten Suspensionen wurden DSC-Messungen durchgeführt, die jeweils aus zwei Aufheiz- und zwei Abkühlkäufen zwischen 10°C und 110°C bei einer Heiz-/Abkühlrate von 0.75°C/min⁻¹ bestanden. Zunächst wurden reines DPPC ohne Cholesterolzusatz mit jeweils einem der drei Peptide **50**, **51** und **52** vermessen (Abb. 26).

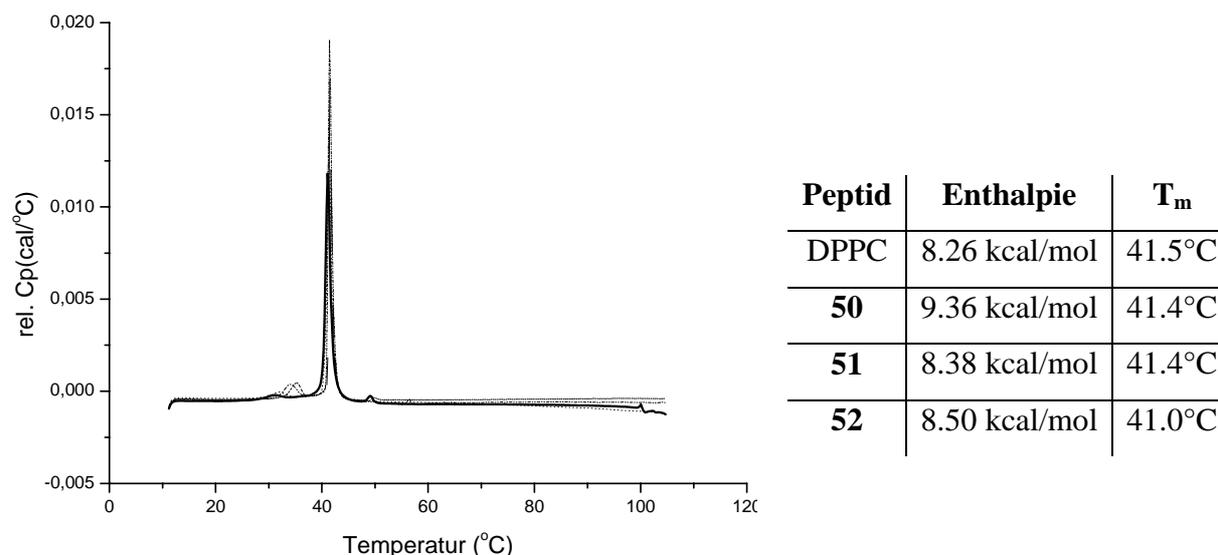


Abbildung 26: DSC-Läufe mit DPPC als Lipid und den Peptiden **50**, **51** und **52**.

Es ist erkennbar, dass prinzipiell zwischen den Läufen kein signifikanter Unterschied besteht: so sind die Änderungen in der Enthalpie zwischen den einzelnen Läufen vernachlässigbar gering und die Temperatur des Haupt-Phasenüberganges bleibt nahezu unbeeinflusst. Dagegen erfährt der Vorübergang abhängig vom Grad der Palmitoylierung eine Verbreiterung, die allerdings nicht quantifiziert wurde.

Im Anschluss an die Messung mit reinem DPPC wurden Peptid-Lipid-Mischungen vermessen, in denen die Lipidkomponente aus DPPC mit 25mol-Prozent Cholesterol bestand. Die mit diesem System erhaltenen Ergebnisse waren allesamt sehr uneinheitlich; so zeigte auf Grund des höheren Cholesterolanteils das System ohne Peptidzusatz eine starke Verbreiterung des Phasenüberganges einhergehend mit einem Absinken der Enthalpie auf 1.14 kcal/mol. Die Temperatur des Phasenübergangs lag bei 43.3°C. Generell ist festzuhalten, dass bedingt durch die uneinheitliche Verbreiterung des Phasenüberganges keine exakte Bestimmung seines Beginns und Endes und damit der Fläche (= Enthalpie) erfolgen kann. Somit werden die erhaltenen Werte im Rahmen dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen.

Im nächsten Schritt wurde ein Lipidsystem gewählt, das aus DPPC mit einem Anteil von 40mol-Prozent Cholesterol besteht. Die mit diesem System erhaltenen Messergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

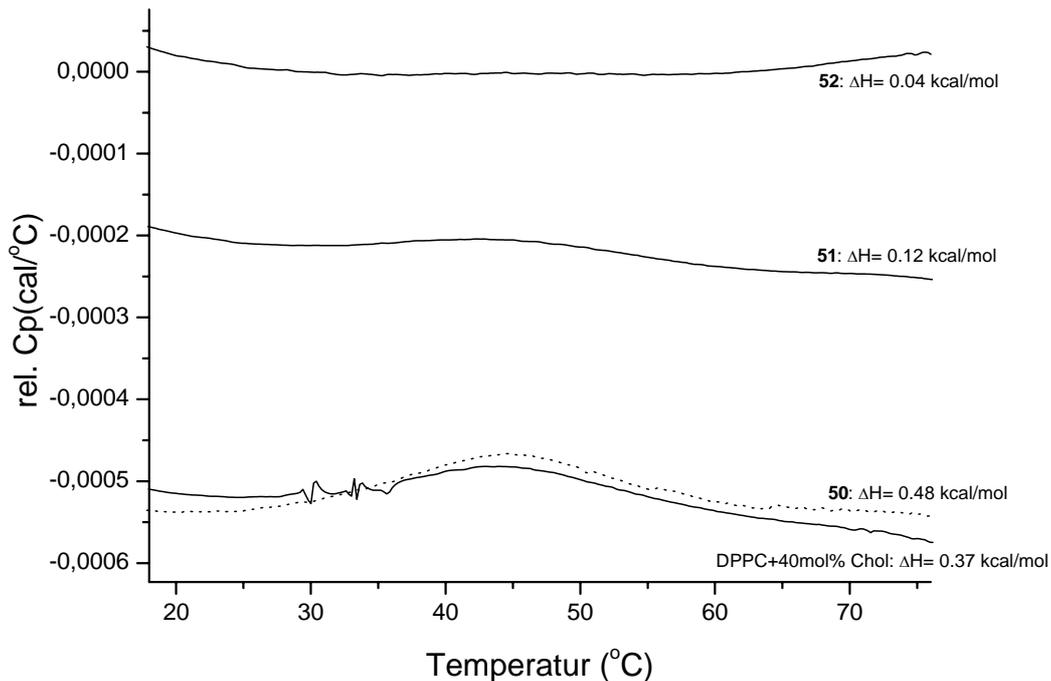


Abbildung 27: DSC-Läufe mit DPPC + 40mol-Prozent Cholesterol als Lipid und den Peptiden **50**, **51** und **52**.

In diesem System tritt generell durch den hohen Anteil von Cholesterol im Lipidsystem eine starke Verbreiterung des Phasenübergangs auf, wobei hier jedoch ein schärferer Übergang als im System mit 25mol-Prozent Cholesterol vorliegt und somit eine Quantifizierung möglich ist. Ohne (Lipo-)Peptidzusatz beträgt die Übergangsenthalpie 0.37 kcal/mol und steigt bei Zugabe des unpalmitoylierten Peptids **50** um etwa 0.1 kcal/mol an. Setzt man allerdings monopalmitoyliertes Influenzapeptid **51** zu, so sinkt die Enthalpie des Phasenübergangs auf etwa ein Drittel des Wertes ohne Zusatz von Peptid ab. Noch drastischer ist der Abfall des Enthalpiewertes bei Zusatz des doppelt palmitoylierten Influenzapeptids **52**. In diesem Fall ist der Phasenübergang praktisch nicht mehr existent, da hier nur noch etwa ein Zehntel des ursprünglichen Wertes erreicht wird (0.04 kcal/mol).

Man kann also festhalten, dass in diesem System abhängig vom Grad der Palmitoylierung ein Einbau des Influenzapeptides in die Lipidstruktur erfolgt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Resultaten, die für reines DPPC erzielt wurden, so wird deutlich, dass auf der Seite des Lipids das Cholesterol die entscheidende Größe ist: (doppelt) palmitoylierte Influenzapeptide bevorzugen cholesterolreiche Membranen gegenüber „normalen“ Membranen. Überträgt man diese im Modellsystem erhaltenen Ergebnisse auf die biologische Fragestellung der Inkorporation in *lipid rafts*, so scheint es, dass die zweifache Palmitoylierung eine Art Steuerungsfunktion für die Assoziation des Peptids (Proteins) mit diesen cholesterolreichen Mikrodomänen ist. Ähnliche Ergebnisse konnten kürzlich bei der

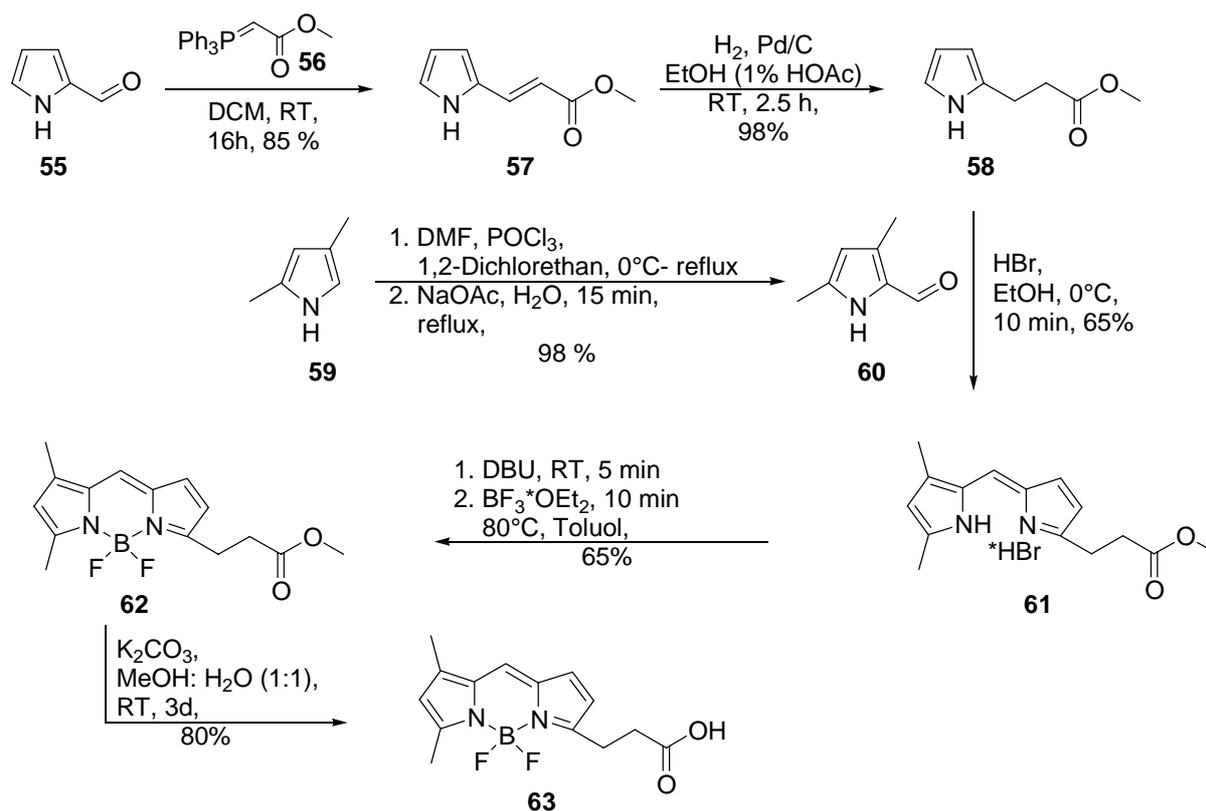
Untersuchung der Membranassoziation unterschiedlich lipidmodifizierter Proteine gefunden werden: es zeigte sich, dass Acyl-Modifizierungen im Gegensatz zu Prenyl-Modifizierungen der Proteine eine Präferenz für die Einlagerung in cholesterolreiche Mikrodomänen hervorrufen.^[130]

Biokalorimetrische Untersuchungen mit dem Hedgehog-Peptid

Um festzustellen, ob eine vergleichbare Präferenz für cholesterolreiche Domänen auch für das Hedgehog-Peptid vorliegt, wurden analoge Untersuchungen mit dem *N*-terminal acylierten und *C*-terminal mit Cholesterol veresterten Heptapeptid **35** durchgeführt. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in allen durchgeführten Experimenten keine Änderung der Phasenübergangsenthalpie oder –temperatur zu erkennen ist und somit auch kein bevorzugter Einbau dieses Peptids in cholesterolreiche Membranen stattfindet. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf das komplette Hedgehog-Protein verbietet sich allerdings, da dort *N*-terminal noch eine weitere Lipidmodifizierung in Form eines Palmitoylrestes vorliegt. WANG et al. untersuchten mit einem extrem verkürzten „Modell“ die Präferenz von Hedgehog für *lipid rafts*, in dem sie für ein *N*-terminal palmitoyliertes und *C*-terminal mit Cholesterol verestertes Tripeptid zeigen konnten, dass der Palmitoylrest entscheidend für die Assoziation mit den cholesterolreichen Domänen ist.^[131] Unter diesem Gesichtspunkt stehen die hier gefundenen Ergebnisse für das Hedgehog-Peptid in Einklang, da lediglich ein Cholesterolrest vorliegt, der alleine nicht für eine Assoziation mit cholesterolreichen Domänen ausreichend zu sein scheint.

4.3.3 BODIPY-Synthese

Die Fluoreszenz-Farbstoffe des 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-Typs^[132] sind sehr stark fluoreszierende Materialien^[133], die zahlreiche Anwendungen in Biochemie und Molekularbiologie gefunden haben. Der Handelsname für diese „BODIPY“-Farbstoffe (BOR-Difluorid verbrücktes PYromethen-Gerüst) ist von der Firma Molecular Probes geschützt^[134] und der größte Teil der Literatur besteht aus Patentschriften.^[135] Da die BODIPY-Farbstoffe typischerweise für biochemische Zwecke in kleinen Mengen verkauft werden, ist ein Einsatz in der organischen Synthese aufgrund des sehr hohen Preises nicht möglich. Daher wurde in enger Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Martin Völkert die Synthese dieses Farbstoffes entwickelt und umgesetzt (Schema 20).^[48]

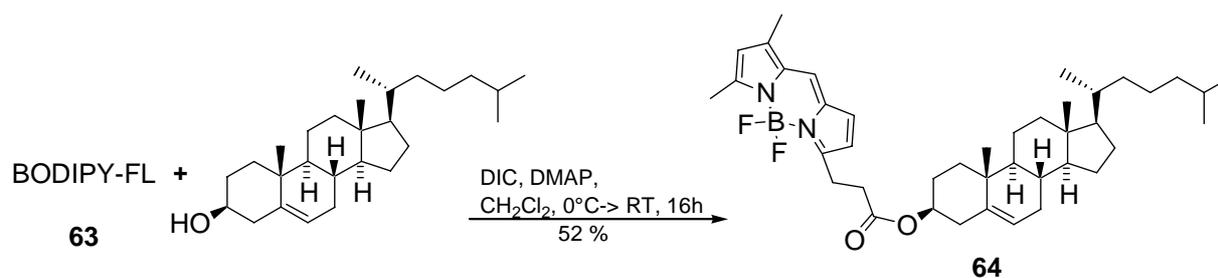


Schema 20: Syntheseroute zum BODIPY-FL **63** (in Zusammenarbeit mit Martin Völkert).

Die Synthese startet mit 2-Pyrrolicarbaldehyd **55**, der in einer Wittig-Reaktion mit dem Phosphoran **56** umgesetzt wird. Nachfolgend wird das erhaltene Acrylsäurederivat **57** durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium auf Kohle in den entsprechenden Propionsäureester **58** überführt.^[136] Hierbei ist es notwendig, die Reaktion dünnschichtchromatographisch zu verfolgen, da es bei zu langer Reaktionszeit zu einer Reduktion des pyrrolischen Ringsystems kommen kann. Durch eine Ehrlich-Reaktion mit 3,5-Dimethyl-pyrrol-2-carbaldehyd **60** wird der Propionsäureester **58** zum Dipyromethen-Hydrobromid **61** umgesetzt. Der in dieser Reaktion eingesetzte Aldehyd **60** ist zum Preis von 180€/g kommerziell erhältlich, kann jedoch ausgehend von 2,4-Dimethylpyrrol **59** (9€/g) in einer Formylierungsreaktion unter Vilsmeier-Bedingungen in hoher Ausbeute und exzellenter Reinheit synthetisiert werden. Durch Reaktion mit DBU und frischem Bortrifluorid-Etherat wird das Dipyromethen-Hydrobromid **61** in das entsprechende BF₂-verbrückte, stark fluoreszierende Analogon **62** überführt. Bei dieser Reaktion ist es essentiell, ein auf 80°C vorgewärmtes Ölbad zu verwenden, um die Reaktionszeit so kurz als möglich zu halten. Dies impliziert allerdings, dass diese Stufe wegen der Wärmeübertragung auf kleine Ansatzgrößen beschränkt bleibt. Abschließend wird der Methylester des BODIPY in dreitägiger Reaktion durch Kaliumcarbonat verseift und man erhält den gewünschten Fluoreszenzfarbstoff **63**.

Dieser ist durch vorsichtiges Ansäuern unter Eiskühlung und anschließende Extraktion aus dem Reaktionsansatz isolierbar, wobei ein zu starkes Ansäuern zu einer Zerstörung des Fluorophors führt. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Synthese von BODIPY-FL in einer Gesamtausbeute über alle Stufen von etwa 30 % verläuft. Hierbei wird von vergleichsweise günstigen Edukten ausgegangen, so dass zukünftig die breite Einsetzbarkeit dieses Fluoreszenzfarbstoffes in der organischen Synthese gewährleistet sein wird.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Winter an der Universität Dortmund wurde nach einer Sonde für cholesterolreiche Domänen der Plasmamembran gesucht. Hierbei fiel die Wahl auf fluoreszenzmarkiertes Cholesterol. Dieses sollte bei Verwendung von mit einem komplementären Fluoreszenzmarker versehenen Lipopeptiden eine Detektionsmöglichkeit eröffnen, ob sich die in der Plasmamembran inkorporierten Lipopeptide in einer cholesterolreichen Umgebung befinden. Daher wurde mit BODIPY-FL markiertes Cholesterol **64** synthetisiert. Die Veresterung erfolgte unter Steglich-Bedingungen und verlief in einer mittleren Ausbeute (Schema 21).



Schema 21: Synthese des BODIPY markierten Cholesterols **64**.

Zurzeit werden mit dieser und anderen Verbindungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Winter Untersuchungen zur Einlagerung von Lipopeptiden in *lipid rafts* durchgeführt, deren Ergebnisse an anderer Stelle ausführlich beschrieben werden.

4.4 Arrays kleiner Moleküle

Die Arbeit an diesem Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Dr. Rolf-Peter Breinbauer und Dipl.-Chem. Maja Köhn durchgeführt und dieses Kapitel beschreibt die ersten orientierenden Versuche sowie deren Ergebnisse. Eine ausführliche Darstellung dieses Projektes mit seinen vielfältigen Möglichkeiten wird sich in der Dissertation von Maja Köhn finden.^[137]

4.4.1 Generelles Konzept

In der Wirkstoffforschung ist es wichtig, die synthetisierten Verbindungen in biologischen Testsystemen auf ihre Wirkung hin zu untersuchen. Diese Untersuchungen werden zurzeit meistens in Mikrotiterplatten als Bindungsassays in Lösung durchgeführt. Das hier vorgestellte Konzept verfolgt einen anderen Weg: hier werden die zu testenden Substanzen auf einer Oberfläche immobilisiert und dann die Wechselwirkung mit möglichen Bindungspartnern untersucht. Dabei wird im Vergleich zu den bislang durchgeführten Assays in Lösung deutlich weniger Substanz benötigt, so dass auch Substanzen, die mittels der *One-Bead-One-Compound-Strategie* dargestellt wurden,^[138] auf mehreren Assays analysiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die rasche Wiederverfügbarkeit, denn einmal auf der Oberfläche immobilisierte Substanzen, sollten bei geeigneter Lagerung der Chips für weitere Untersuchungen mit anderen möglichen Bindungspartnern schnell zur Verfügung stehen. Daher liegt der Schwerpunkt dieses Projektes auf der Etablierung einer geeigneten Ligationschemie, die unter milden Bedingungen die zu testenden Substanzen auf der entsprechend funktionalisierten Oberfläche immobilisiert. Diese Immobilisierungsreaktion sollte hochselektiver Natur sein, damit im Substrat befindliche Funktionalitäten keine unerwünschten Nebenreaktionen eingehen. Idealerweise sollte das Substrat im Hinblick auf eine spätere Automatisierung mit Hilfe der organischen Festphasensynthese zugänglich sein, die den Einbau einer für die Ligationsreaktion erforderlichen reaktiven Gruppe erlaubt.

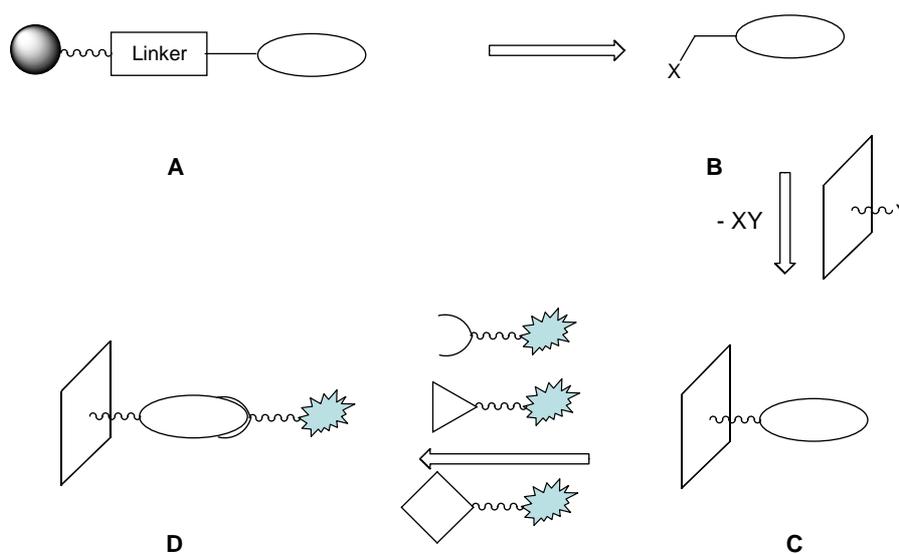
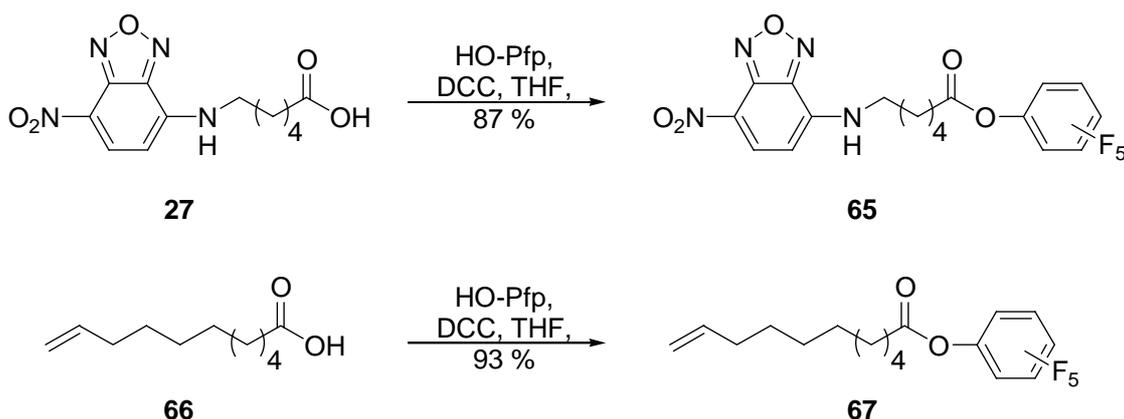


Abbildung 28: Generelles Konzept zur Herstellung und Verwendung von Naturstoffarrays.

Zunächst erfolgt die Synthese der Zielverbindung am polymeren Träger (Abb. 28, **A**), von dem sie nach Abschluss in aktivierter Form abgespalten wird (**B**). Im nächsten Schritt (**C**) wird die Zielverbindung in einer hochselektiven Reaktion mit der Oberfläche verknüpft, die aus einem entsprechend modifizierten Glas besteht. Dieser Chip kann nun mit Analytlösung überspült werden und ermöglicht die fluoreszenzbasierte Auslese und Erkennung möglicher Bindungspartner (**D**).

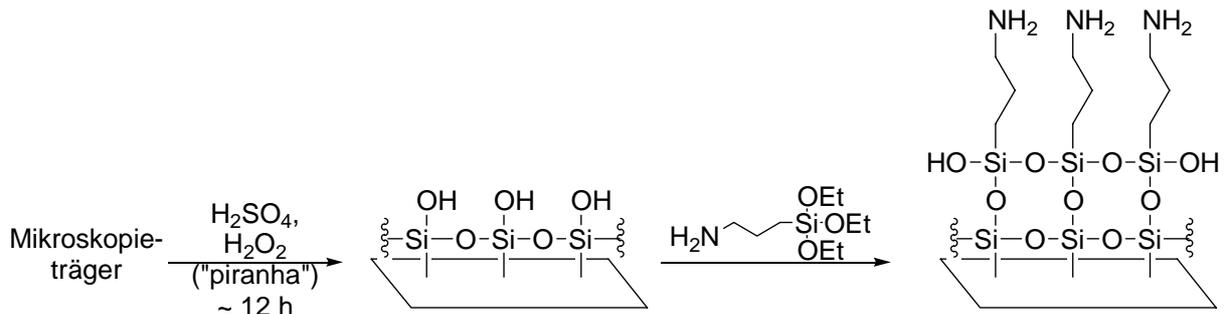
Um einen Zugang zu dieser Technologie zu erhalten, sollten erste Untersuchungen an einem relativ einfachen System durchgeführt werden: Aktivester von Fluoreszenzfarbstoffen sollten auf aminofunktionalisierten Glasoberflächen durch Bildung einer Amidbindung immobilisiert werden und der Erfolg der Reaktion durch Auslese im Fluoreszenzscanner überprüft werden. Hierzu wurden zunächst der NBD-Aminocapronsäurepentafluorphenolester (**66**) und der Undecensäurepentafluorphenolester (**67**) ausgehend von den entsprechenden Säuren carbodiimid-vermittelt in guter Ausbeute dargestellt (Schema 22).



Schema 22: Synthese der Pentafluorphenolester **65** und **67**.

Neben dem Fluoreszenzfarbstoff wurde noch der Undecensäureaktivester generiert, um ihn in einer äquimolaren Mischung mit dem Fluoreszenzfarbstoff zu spotten und somit für eine Verdünnung zu sorgen, die das Fluoreszenz-Quenching unterdrücken soll.

Als Glasoberfläche fanden kommerziell erhältliche Mikroskopieträger Verwendung, die durch zwölfstündiges Behandeln mit so genannter *Piranha-Lösung* (H_2SO_4 : H_2O_2) aktiviert wurden. Zur Aminofunktionalisierung wurden sie danach eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 3-Triethoxysilylpropylamin behandelt und dann bei 120°C für 1 h getrocknet. Im Anschluß daran wurde die Oberfläche mit Ethanol gewaschen und im Argonstrom getrocknet.^[76]



Schema 23: Aminofunktionalisierung von Mikroskopieträgern.

Diese aminofunktionalisierte Glasoberfläche wurde danach mit 0.5 μl einer äquimolaren Mischung aus **65** und **67** in DMF in einer DMF-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Danach wurde durch Waschen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln der Überschuss entfernt und der Mikroskopieträger an der Luft getrocknet. Die so modifizierten Oberflächen wurden dann von Dr. Claus Hultschig (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) in einem Fluoreszenzscanner ausgelesen (Abb. 29).

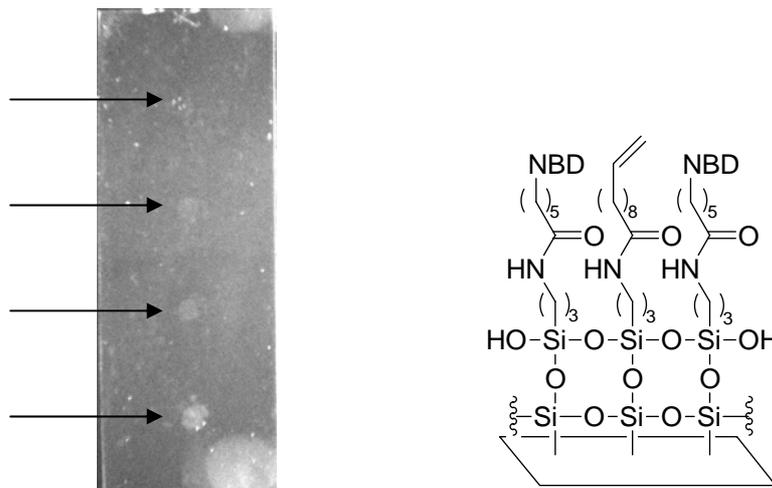
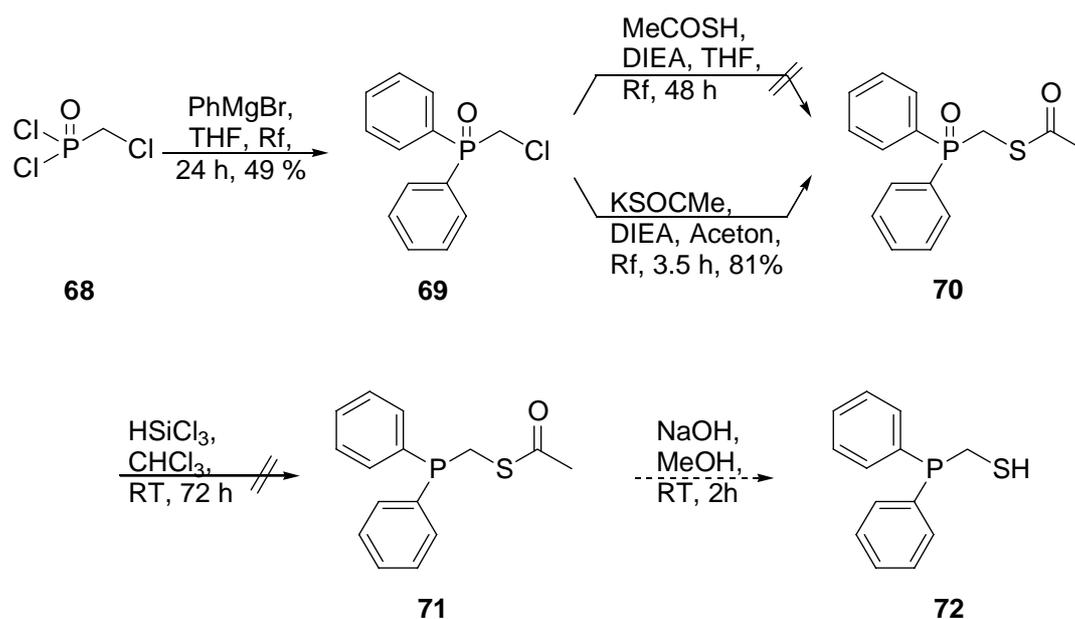


Abbildung 29: Fluoreszenzbild der immobilisierten **65** und **67**.

Es zeigt sich, dass diese Ligationstechnik erfolgreich ist. Kürzlich wurde von SHAIR et al. eine ähnliche Ligrationsreaktion beschrieben, wobei dort allerdings Carbonsäure und aminofunktionalisierte Oberfläche durch Zusatz von Pentafluorphenyl-diphenylphosphonat zur Reaktion gebracht wurden.^[139] Beide Methoden haben den Nachteil, dass die aktivierten Carbonsäuren nicht nur mit den Aminofunktionalitäten der Glasoberfläche reagieren können, sondern auch Nebenreaktionen mit im Zielmolekül befindlichen Amin- oder Thiofunktionalitäten eingehen könnten, was unter Umständen zu einer ungewollten

Polymerisation dieser Zielverbindungen führen würde. Weiter ist es bislang nicht möglich, eine Verbindung als Pentafluorphenol-Ester vom polymeren Träger abzuspalten, so dass diese Art der Ligation zur Realisierung dieses Konzepts nicht die Methode der Wahl zu sein scheint.

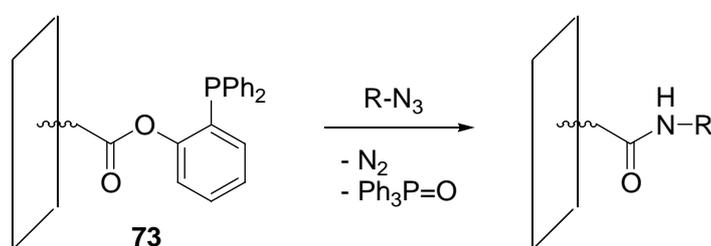
Daher wurde nach einer Ligrationsreaktion gesucht, die hochselektiv abläuft und dabei eine Vielzahl von in Naturstoffen vorkommenden Funktionalitäten toleriert. Eine solche Reaktion stellt die *Staudinger-Ligation* dar (siehe auch Kapitel 2.3.4), bei der eine Azidfunktion mit einem substituierten Phosphinothioester respektive Phosphinolester unter Bildung einer Amidbindung ligiert. Bei den eingesetzten Funktionalitäten handelt es sich in beiden Fällen um Gruppen, die nicht oder nur äußerst selten in Naturstoffen vorkommen, wodurch ein hohes Maß an Selektivität gegeben ist. Prinzipiell eröffnen sich zwei verschiedene Wege der Realisierung; einerseits die Reaktion eines oberflächengebundenen Azids mit einem vom Polymer abgespaltenen Phosphinothioester oder andererseits die Einführung einer Azidmodifizierung während der Abspaltung vom polymeren Träger bei Verwendung von Phosphinothioester modifizierten Oberflächen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde die zweite Möglichkeit gewählt, da die generierten Phosphinothioester als extrem oxidationsempfindliche Substanzen die Handhabung während der Abspaltung und Immobilisierung sehr erschwert hätten. Somit wurde zunächst die Synthese eines entsprechenden Phosphinothiols **72** versucht, das nach RAINES et al. sehr gute Ausbeuten im Ligationsschritt liefern soll (Schema 24).^[69]



Schema 24: Syntheseroute zum Phosphinothiol **72**.

Die Synthese startete ausgehend von Chlormethylphosphonsäuredichlorid (**68**), das in einer Grignard-Reaktion mit Phenylmagnesiumbromid in das entsprechende Phosphinoxid **69** in befriedigender Ausbeute überführt wurde. Der nächste Schritt wird in der Literatur^[69] als wiederholte Umsetzung des Phosphinoxids **69** mit insgesamt 13 Äquivalenten von je Thioessigsäure und tertiärer Aminbase beschrieben. Diese Reaktion lieferte anstelle der Literatursausbeute von 85 % in unabhängigen Untersuchungen^[140] reproduzierbar kein Produkt. Daher wurde der Thioester **70** in einer alternativen Reaktion durch Umsetzung mit Kaliumthioacetat in Acteon in einer Ausbeute von 81 % dargestellt^[141]; diese Reaktion hat neben der deutlich kürzeren Reaktionszeit den Vorteil, nicht so stark geruchsbelästigend wie die oben beschriebene zu sein. Als nächstes sollte eine Reduktion des Phosphoratoms in die für die *Staudinger-Ligation* erforderliche reaktive Oxidationsstufe III erfolgen: die dreitägige Reaktion des Thioesters **70** mit Trichlorsilan führte nicht zu einer Reduktion des Phosphors, sondern eventuell bedingt durch Wasserspuren zu einer Generierung des Thioethers, der für die weiteren Umsetzungen unbrauchbar war. An dieser Stelle wurde entschieden, die Synthese des Phosphinothiols **72** nicht weiter fortzusetzen.

Um die *Staudinger-Ligation* doch noch realisieren zu können, wurde von Maja Köhn der in Schema 25 abgebildete Phosphinolester **73** dargestellt und in der Ligation etabliert.^[137]



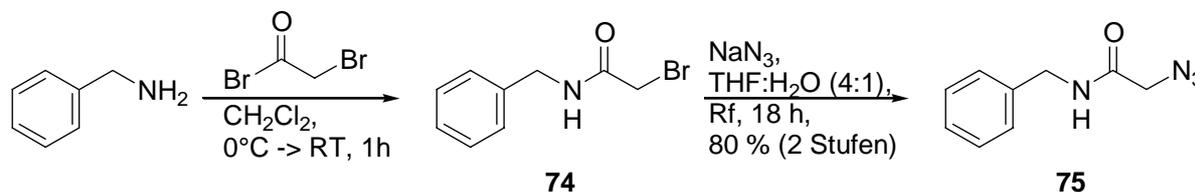
Schema 25: *Staudinger-Ligation* unter Verwendung des Phosphinolesters **73**, etabliert von Maja Köhn.

4.4.2 Synthese von Aziden

Da die Synthese und Evaluierung geeigneter Phosphin(thi)olester von Maja Köhn durchgeführt wurde, fand im Rahmen dieser Arbeit eine Fokussierung auf die Synthese entsprechender Azide statt:

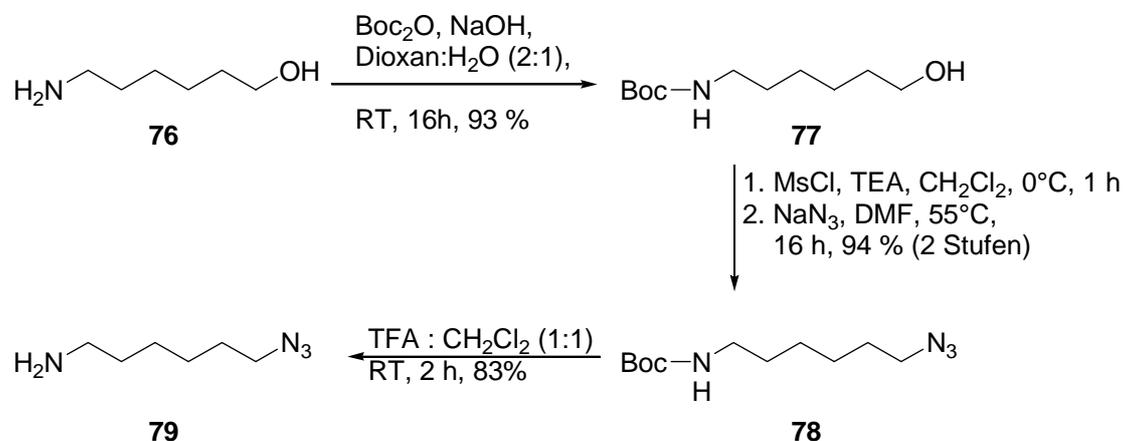
Zunächst wurde zur Evaluierung der optimalen Ligrationsbedingungen das in der Literatur^[68] in Testligationen verwendete Glycylazid **75** in einer zweistufigen Synthese ausgehend von

Benzylamin und Bromacetyl bromid in guter Ausbeute dargestellt (Schema 26). Dieser Baustein wurde von Maja Köhn in Testligationen verwendet.^[137]



Schema 26: Synthese des Glycylazids **75**.

Zur Einführung einer Azidfunktionalität in Zielverbindungen war es erforderlich, einen Baustein zu synthetisieren, der einerseits eine Azidgruppe und zum anderen eine Funktionalität aufweist, die leicht mit der entsprechenden Zielverbindung kondensiert werden kann. Die Wahl fiel dabei auf 6-Azidohexylamin **79**, das die geforderten Funktionalitäten besitzt und durch die C-6-Kette für einen ausreichenden Abstand zwischen Naturstoff und Oberfläche sorgt (Schema 27).

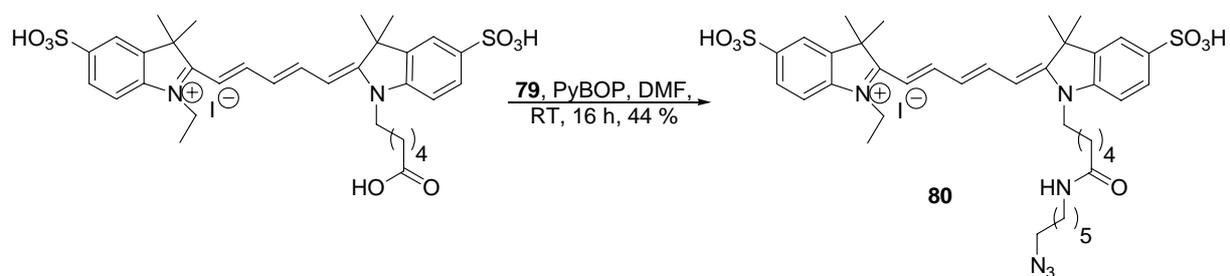


Schema 27: Synthese des 6-Azidoethylamins **79**.

Die Synthese startete ausgehend von 6-Aminoethylamin (**76**), das zunächst durch Umsetzung mit Di-*tert.*-butyldicarbonat monogeschützt wurde, was in einer Ausbeute von 93 % gelang. Danach wurde die freie Hydroxyfunktion zunächst in den entsprechenden Methansulfonsäureester überführt, der dann durch Reaktion mit Natriumazid substituiert wurde. Diese zweistufige Reaktion liefert das Boc-geschützte Hexylazid **78** in einer Ausbeute von 94 % über beide Stufen. Schließlich wurde die Boc-Schutzgruppe von der Aminogruppe durch zweistündige Behandlung mit 50 %iger Trifluoressigsäure abgespalten, wobei das

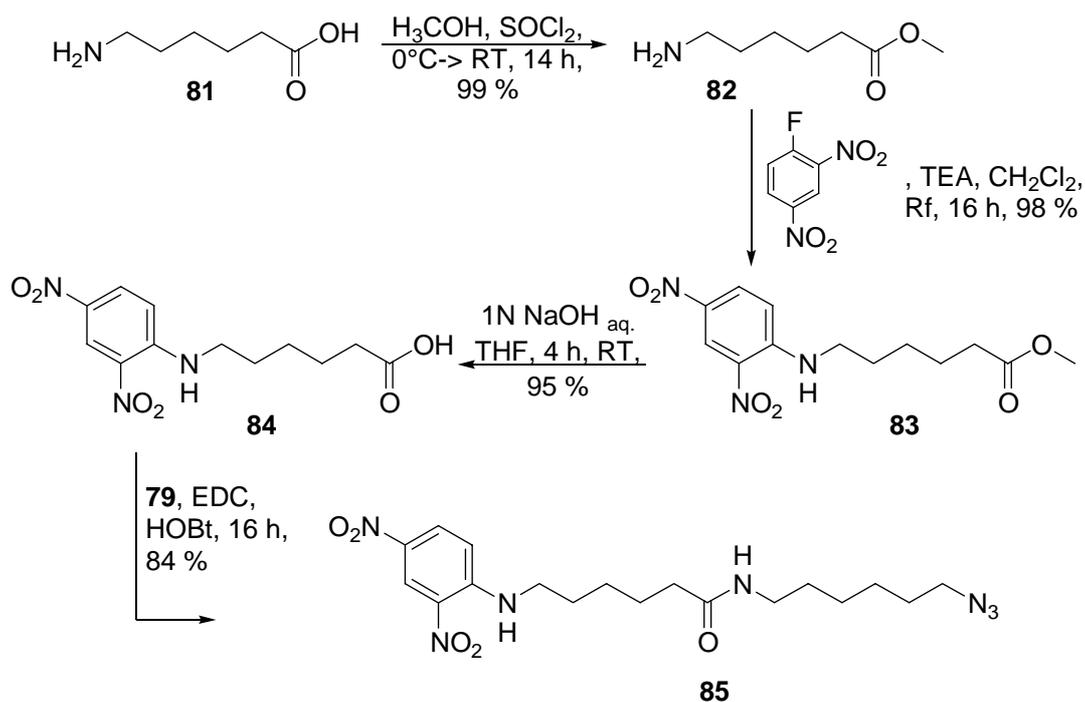
TFA-Addukt durch Extraktion mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung entfernt wird, so dass eine freie, reaktive Aminfunktionalität generiert wurde.

Mit diesem Baustein **79** wurden nun die Synthesen zweier unterschiedlicher Azide durchgeführt, mit denen der Erfolg der *Staudinger-Ligation* auf Glasoberflächen überprüft werden konnte. Zunächst erfolgte die Generierung des azid-modifizierten Farbstoffes CY 5 unter Aktivierung mit PyBOP, welche das gewünschte Produkt in einer mittleren Ausbeute lieferte (Schema 28). Bei Verwendung von DIC oder EDC als Kupplungsreagenzien konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden. Darüber hinaus musste die Aufreinigung des Produktes aufgrund seiner sehr guten Wasserlöslichkeit und der damit verbundenen relativen Unlöslichkeit in gängigen organischen Lösungsmitteln durch präparative HPLC erfolgen.



Schema 28: Synthese des CY 5-Hexylazids **80**.

Neben diesem Farbstoff-Azid **80**, das den Vorteil der direkten Auslesbarkeit auf der Glasoberfläche nach erfolgreicher Ligation hat, wurde mit dem 6-(2,4-Dinitro-phenylamino)-hexansäure-(6-azidoheptyl)-amid **85** noch ein weiteres Azid synthetisiert (Schema 29), das komplementär zum Farbstoff-Azid **80** ist. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein Hapten (Dinitrophenyl-Struktur)^[142], das über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper ausgelesen wird. Dieses Prinzip entspricht also genau demjenigen, das für die spätere Anwendung bei den Arrays kleiner Moleküle Verwendung finden soll.



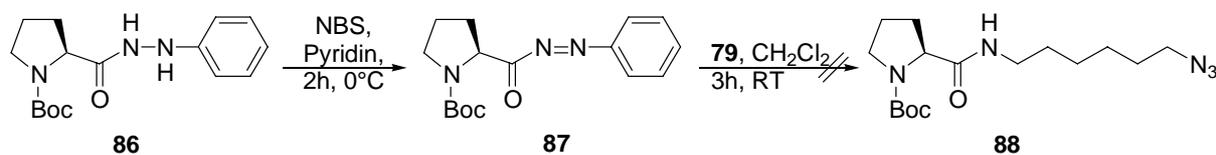
Schema 29: Synthese des Haptens DNPaca-Hexylazid **85**.

Die Synthese startet ausgehend von Aminocapronsäure **81**, die in nahezu quantitativer Reaktion in den entsprechenden Methylester **82** überführt wird. Dieser wird in ebenfalls sehr guter Ausbeute durch Reaktion mit 2,4-Dinitrofluorbenzol zum 2,4-Dinitrophenylamin **83** umgesetzt. Die anschließende Verseifung des Methylesters gelang mit 1N Natriumhydroxid-Lösung und lieferte die 2,4-Dinitrophenylaminocapronsäure (DNPaca) **84** in einer Ausbeute von 95 %. Durch carbodiimid-vermittelte Kupplung mit **79** wurde das entsprechende DNPaca-hexylazid **85** zugänglich gemacht, das von Maja Köhn zurzeit in Ligationsreaktionen untersucht wird.

4.4.3 Abspaltung vom Harz als Azid

Um zu evaluieren, ob es möglich ist, eine Azidmodifizierung durch Abspaltung vom Hydrazinbenzoyllinker in ein Molekül einzuführen, wurden zunächst Untersuchungen an einem Testsystem in Lösung durchgeführt. So wurde *N*-terminal Boc- und *C*-terminal als Phenylhydrazid geschütztes Prolin **86**, das freundlicherweise von Dipl.-Chem. Martin Völkert zur Verfügung gestellt wurde, zunächst mit *N*-Bromsuccinimid zum Acyldiazen **87** oxidiert,

um es anschließend durch Reaktion mit 6-Azidohexylamin **79** in die entsprechende azidmodifizierte Verbindung **88** zu überführen (Schema 30).

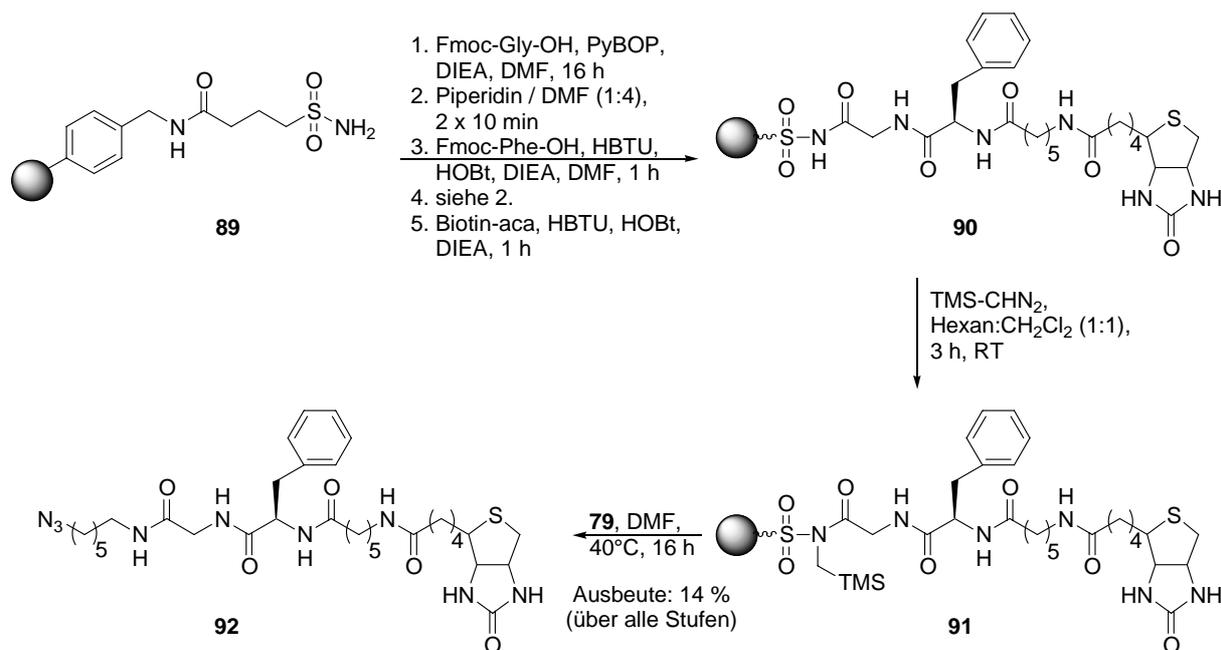


Schema 30: Versuchte Spaltung des Phenylhydrazids mit 6-Azidohexylamin **79**.

Es zeigte sich allerdings, dass eine solche Überführung nicht möglich ist: die Analyse der Reaktionsprodukte zeigte neben wenig Hydrolyseprodukt (= Boc-Pro-OH) eine Vielzahl von Produkten, deren Identifizierung nicht gelang. Eine Erklärung für das Scheitern der Aminolyse wäre das Stattfinden einer [2+3]-Cycloaddition des Azids mit dem Acyldiazen **87**, was zu Pentazol mit einem extrem instabilen Ringsystem aus 5 Stickstoffatomen führen würde. Dieses könnte einerseits rasch hydrolysieren und hätte zum anderen die Möglichkeit, weitere Reaktionen einzugehen.

Daher war es erforderlich, einen anderen durch Nucleophile spaltbaren Anker zu finden. Die Wahl fiel dabei auf den 4-Sulfamylbutyryl-Linker **89**, der von ELLMAN et al. eingeführt wurde^[143] und eine Weiterentwicklung des von KENNER et al. etablierten Ankers darstellt.^[144] Dieser Linker wurde sowohl in der Synthese von Peptidamiden^[50] und -thioestern^[145] als auch in der organischen Synthese^[146] eingesetzt. Bei diesem Anker handelt es sich ähnlich dem Hydrazinobenzoyl-Linker um einen „Safety-Catch-Linker“, der nach Abschluss der Synthese durch Umsetzung mit Iodacetonitril oder (Trimethylsilyl)- Diazomethan zunächst aktiviert werden muss, um dann durch Zugabe eines geeigneten Nucleophils gespalten zu werden.

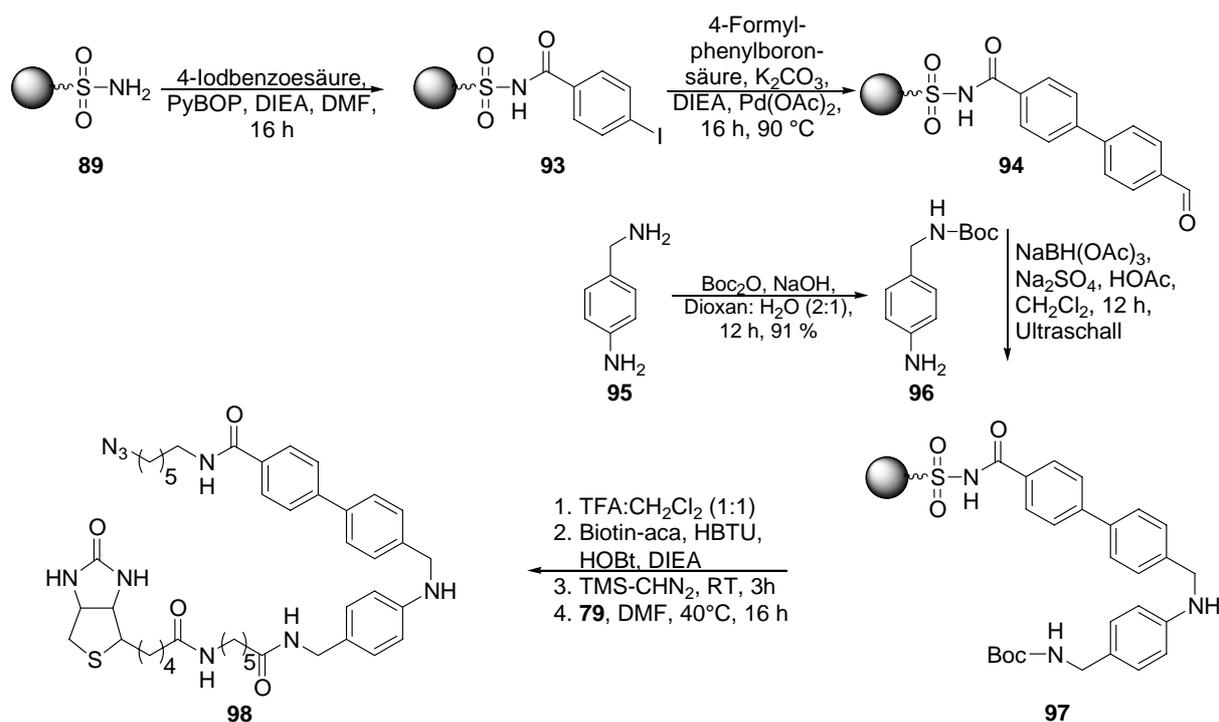
Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun zunächst die Einsetzbarkeit diese Linkersystems in der Synthese *N*-terminal biotinylierter und *C*-terminal azid-modifizierter Peptide untersucht (Schema 31). Nach der erfolgreichen Ligation des Peptids über das Azid auf der Glasoberfläche, kann die Auslese über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin erfolgen, das hochselektiv und nahezu irreversibel an das Biotin bindet.^[147]



Schema 31: Synthese des biotinylierten azid-modifizierten Dipeptids **92** durch Abspaltung vom Polymer.

Die Synthese startete mit der Anknüpfung der ersten Aminosäure an den polymeren Träger durch Aktivierung mit PyBOP in einer 16stündigen Reaktion. Anschließend wurde unter Standardbedingungen der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese das biotinylierte Dipeptid **90** aufgebaut. Die hierzu erforderliche Biotinylaminocaprinsäure wurde in Zusammenarbeit mit Martin Völkert gemäß der Literatur dargestellt.^[148] Nach Aktivierung des Linkers durch Reaktion mit 50 Äquivalenten Trimethylsilyldiazomethan erfolgte die Umsetzung mit 5 Äquivalenten **79** bei 40°C über Nacht, so dass das C-terminal azid-modifizierte Peptid **92** in einer Gesamtausbeute von 14 % erhalten wurde.

Um die Anwendbarkeit dieses Konzepts auf wirkstoffähnliche Substanzen zu erweitern, wurde ein biotinyliertes Analogon eines Antibiotikums gegen das *Mycobacterium tuberculosis* synthetisiert und durch Abspaltung vom polymeren Träger azid-modifiziert (Schema 32).



Scheme 32: Synthese des biotinylierten Antibiotika-Analogon **98**.

Nach Anknüpfung der 4-Iodbenzoesäure an den Sulfamylbutyryl-Linker erfolgte durch eine Suzuki-Reaktion mit 4-Formylphenylboronsäure die Generierung des polymergebundenen Biphenylaldehyds **94**. Dieser wurde nachfolgend in einer reduktiven Aminierung mit dem in sehr guter Ausbeute zugänglichen Anilin-Derivat **96** umgesetzt. Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit 50 %iger Trifluoressigsäure konnte Biotinyl-aminocaproonsäure angeknüpft werden, so dass nach Aktivierung mit Trimethylsilyldiazomethan und anschließender Umsetzung mit **79** das biotinylierte, azid-modifizierte Antibiotika-Analogon **98** in einer Ausbeute von 6 % erhalten wurde.

4.4.4 Erste Ergebnisse der Immobilisierung

Die eigentlichen Versuche zur *Staudinger-Ligation* wurden von Maja Köhn durchgeführt, so dass auf die erforderliche Optimierung der Bedingungen hier nicht weiter eingegangen werden soll. In Abbildung 30 ist das Ergebnis der erfolgreichen Immobilisierung des CY 5-Azids **80** auf entsprechend modifizierte Phosphinoberflächen abgebildet. Das Azid ist dabei jeweils viermal (in quadratischer Anordnung) in unterschiedlichen Konzentrationen (0.0001, 0.001, 0.01 und 0.1 mM) gespottet worden.

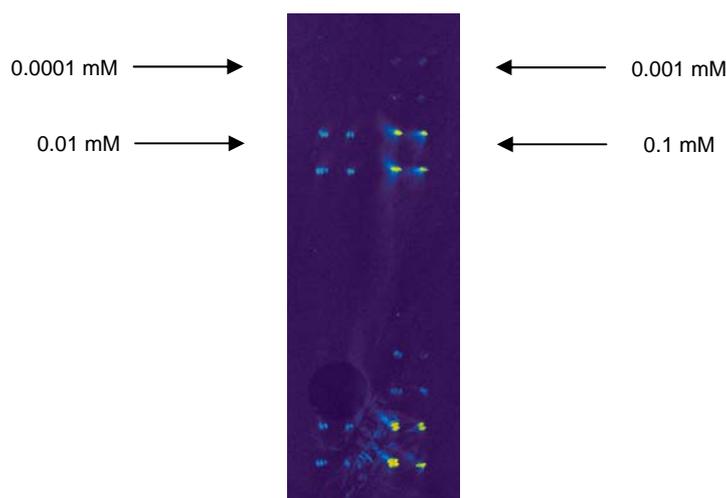


Abbildung 30: Ergebnis der *Staudinger-Ligation* mit CY-5-Azid **80** auf Glasoberflächen, durchgeführt von Maja Köhn.

Man kann erkennen, dass ab einer Konzentration von 0.001 mM des CY 5-Azids in Acetonitril/Wasser die Immobilisierung nachweisbar ist; deutliche Signale werden ab einer 10fach höheren Konzentration erhalten.

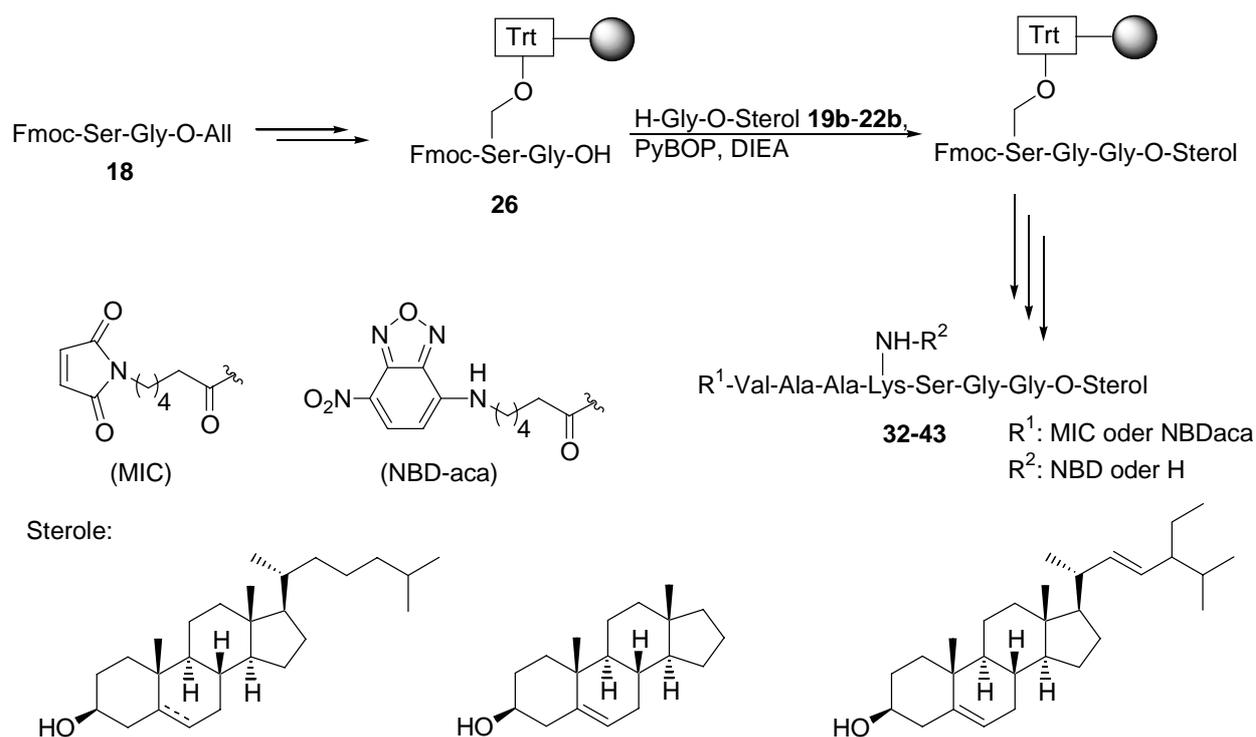
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das entwickelte Konzept zur Immobilisierung von mittels Festphasensynthese dargestellten Verbindungen realisieren lässt. Hierzu wurden modellhafte Verbindungen in aktivierter Form vom polymeren Träger abgespalten, die in einer hochselektiven Immobilisierungsreaktion auf der Glasoberfläche angebracht werden können, so dass im letzten Schritt eine rasche und automatisierbare Auslese von Bindungsaffinitäten erfolgen kann.

5. Zusammenfassung und Ausblick

*Vorhersagen sind immer schwierig,
insbesondere wenn sie die Zukunft betreffen.*

NIELS BOHR

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig die Synthese sterolmodifizierter Peptide entwickelt, die dem C-Terminus der Signaldomäne des Sonic Hedgehog-Proteins (Shh) entsprechen. Dabei wurden neben dem natürlich vorkommenden Cholesterol weitere Sterole angeknüpft und hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Membrananker untersucht.



Schema 33: Strategie zum Aufbau der Hedgehog-Peptide.

Zur Synthese dieser Peptide wurde eine konvergente Strategie aus Flüssig- und Festphasenchemie entwickelt (Schema 33), die einen hocheffizienten Zugang zu den gewünschten Verbindungen ermöglicht.

Zunächst erfolgte in Lösung die Synthese des zentralen Dipeptids Fmoc-Ser-Gly-OAll **18**, das anschließend über den Trityllinker an den polymeren Träger immobilisiert wurde. Der Aufbau des Peptids begann mit der Palladium(0)-vermittelten Spaltung des Allylestere unter neutralen Bedingungen, an die sich die C-terminale Verlängerung mit verschiedenen, zuvor in Lösung generierten Glycinsterylestern **19b–22b** anschloss. Danach erfolgte der Aufbau der N-terminalen Peptidsequenz unter Standardbedingungen der Festphasenpeptidsynthese, wobei N-terminal der Fluoreszenzmarker NBD-Aca oder die MIC-Gruppe angekuppelt wurden. Die Verwendung der MIC-Gruppe erlaubt die Ligation des Peptids mit C-terminal verkürztem Ras-Protein. Um einen Zugang zu fluoreszenzmarkierten Proteinen zu eröffnen, wurde der in Peptidfestphasensynthesen universell einsetzbare Baustein Fmoc-Lys(NBD)-OH **31** entwickelt. Mit ihm wurden sterolmodifizierte Peptide generiert, die N-terminal eine MIC-Gruppe trugen und in der Lysinseitenkette fluoreszenzmarkiert waren. Im Ganzen wurden 12 verschiedene sterolmodifizierte Heptapeptide **32–43** mit dieser Strategie dargestellt.

Mit einigen dieser Peptide wurden Peptid-Protein-Konstrukte durch maleimidcaproyl-vermittelte Ligation dargestellt. Hierzu wurde C-terminal trunkiertes onkogenes N-RasG12V(1-181) verwendet, an das die entsprechenden N-terminal MIC-modifizierten Hedgehog-Peptide **34** und **43** ligiert wurden (Abb. 31). Diese Verknüpfung gelang in hohen Ausbeuten und lieferte die gewünschten Peptid-Protein-Konstrukte in hoher Reinheit.

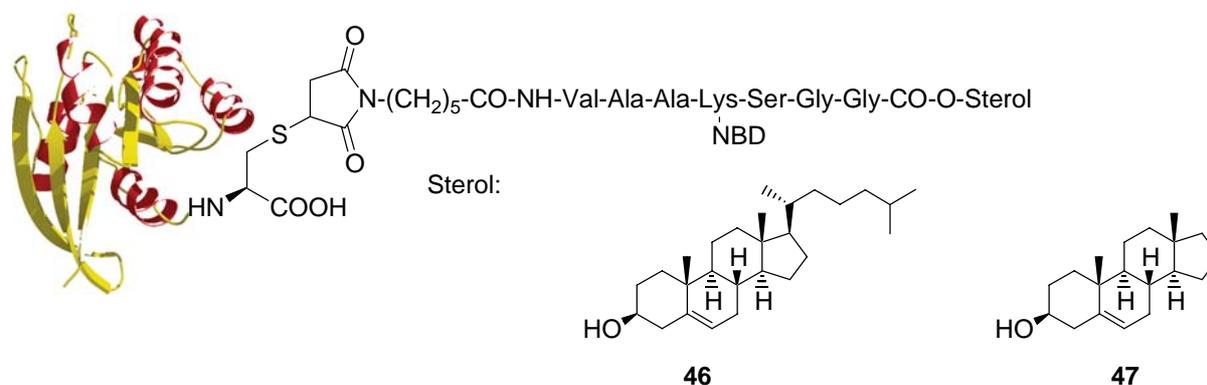
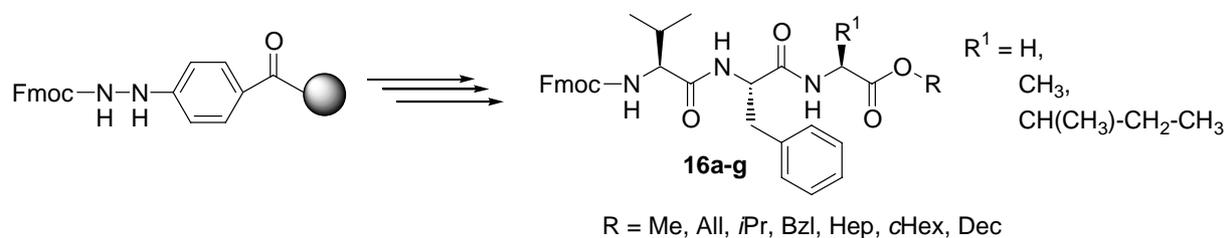


Abbildung 31: Synthetisierte fluoreszenzmarkierte Peptid-Protein-Konjugate **46** und **47**.

Im Zuge der Untersuchung alternativer Synthesewege, die zu C-terminal mit Cholesterol veresterten Peptiden führen, wurde der Hydrazinobenzoyllinker evaluiert: hierzu wurden Modelltripeptide am polymeren Träger aufgebaut und nach Oxidation durch Zugabe geeigneter O-Nucleophile gespalten (Schema 34). Es zeigte sich, dass eine ganze Reihe wichtiger C-terminaler Schutzgruppen eingeführt werden können, nicht jedoch Cholesterol. So konnten peptidische Allyl-, als auch Benzyl- und Heptylester zugänglich gemacht werden,

die als weit verbreitete, etablierte C-terminale Schutzgruppen bekannt sind. Somit stellt diese Strategie einen effizienten Weg dar, die für die Fragmentkondensation in Lösung benötigten geschützten Bausteine mit Hilfe der Festphasensynthese rasch und in guten Ausbeuten darzustellen.



Schema 34: Festphasensynthese verschiedener Peptidester **16a-g**.

In biophysikalischen Untersuchungen wurden erstmalig die Membranbindungseigenschaften von Peptiden und Proteinen mit Cholesterol und Androstenol als Ankergruppen untersucht. Dabei wurden zunächst mit Hilfe von Intervesikeltransferexperimenten die Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten für den Transfer der Modellpeptide bestimmt. In einem nächsten Schritt wurden diese Werte dann durch Intervesikeltransferexperimente und Oberflächenplasmonresonanzmessungen der Peptid-Protein-Konstrukte **46** und **47** erstmalig direkt mit den Werten der entsprechenden Proteine korreliert.

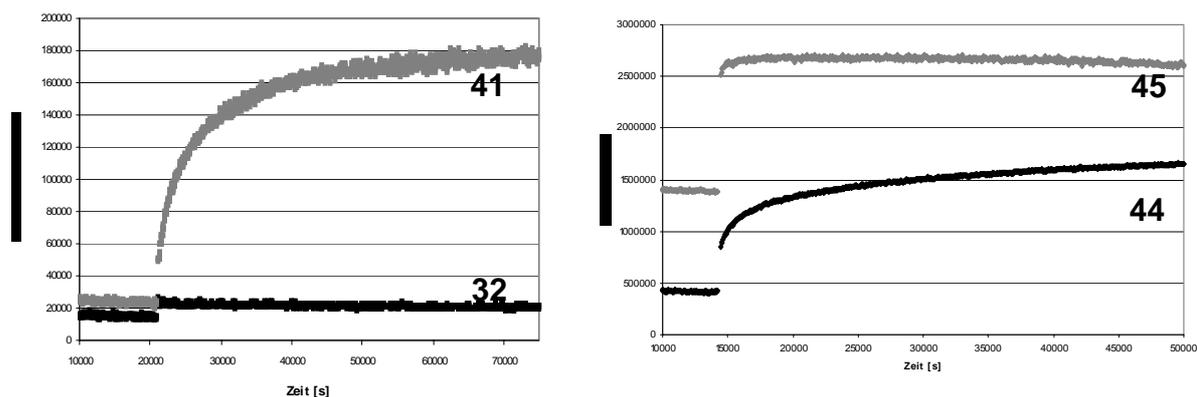


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei den Intervesikeltransferexperimenten mit den Peptiden **32** und **41** (links), sowie bei den Peptid-Protein-Konjugaten **44** und **45** (rechts).

Es zeigte sich, dass Cholesterol Peptide irreversibel und Proteine reversibel (mit einer Halbwertszeit von etwa 3 h) in die Membran einbaut. In seinen Membranbindungseigen-

schaften ist es somit etwa in der Größenordnung einer doppelten Geranylgeranyl-Modifizierung. Androstenol hingegen verankert Peptide mit einer Halbwertszeit von 45 Minuten in der Modellmembran, wodurch es immer noch einen um den Faktor 10 stärkeren Membrananker darstellt als ein Palmitoylrest. Proteine werden allerdings durch Androstenol nur mit einer Halbwertszeit von 0.013 Minuten an die Membran gebunden, so dass man hier nicht von einer unter physiologischen Bedingungen signifikanten Membranbindung sprechen kann. Insgesamt lieferten die biophysikalischen Untersuchungen deutliche Hinweise, warum die Natur für die Ausschleusung des Hedgehog-Proteins aus den Sendezellen ein Helferprotein im Hedgehog-Signalweg installiert hat.

Weiterhin zeigte sich, dass die bisher mit Lipopeptiden erhaltenen Werte zur Insertion in Modellmembranen nicht einfach auf die Situation in Lipoproteinen übertragen werden dürfen, da bei den Peptiden ein deutlich anderes Verhältnis zwischen lipophilen und hydrophilen Resten besteht als bei Lipoproteinen.

Um diese Ergebnisse mit der Situation *in vivo* vergleichen zu können, wurden mit den Peptid-Protein-Konstrukten **46** und **47** Mikroinjektionen von Dipl.-Biochem. Melanie Wagner durchgeführt, in denen zum einen die Lokalisation innerhalb der Zelle und zum anderen ihre Fähigkeit zur Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen untersucht wurde (Abb. 33).

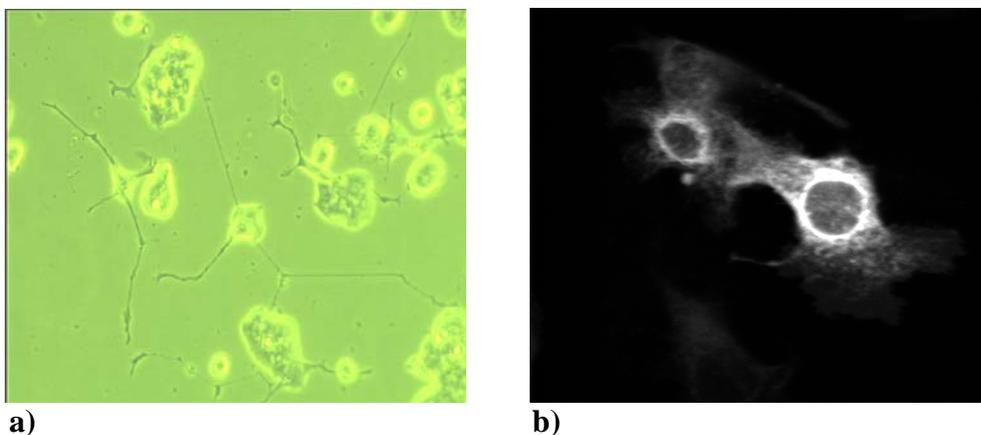
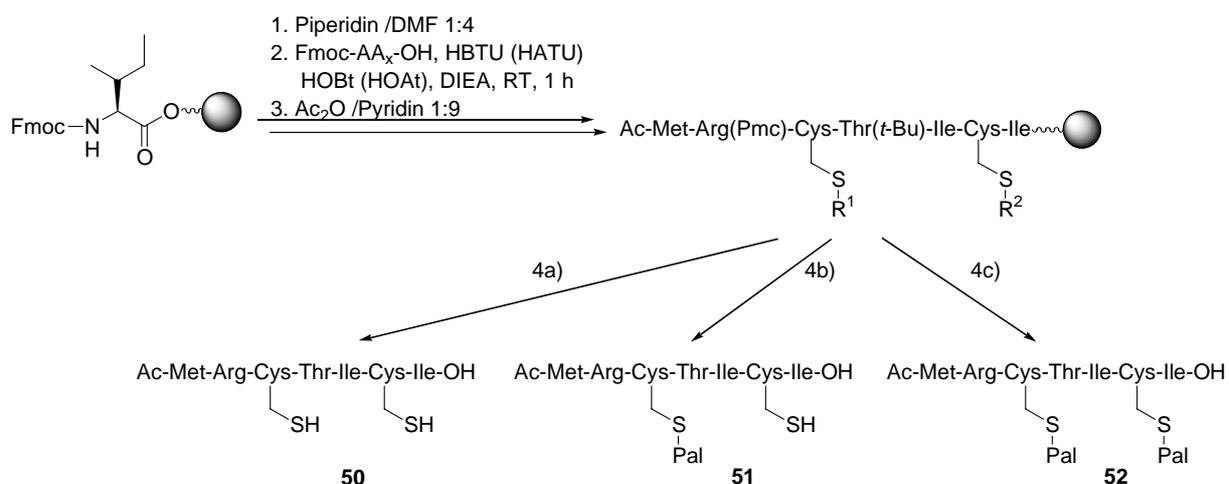


Abbildung 33: Ergebnisse der Mikroinjektion von **46** in a) PC12-Zellen und b) MDCK-Zellen

Es zeigte sich im PC12-Differenzierungsassay (Abb. 33, a)), dass auch hier das Cholesterol das signifikant bessere Ankermolekül zur Immobilisierung in der Plasmamembran ist. So liegt die Transformationsaktivität von **46** annähernd im Bereich von Vollängen-Ras-Proteinen, wohingegen die Aktivität von **47** nur etwa 50 % des Wertes von **46** erreicht. Bei einer ersten Untersuchung der Lokalisation innerhalb der Zelle (Abb. 33, b)) konnte eine Anreicherung der Konstrukte im Golgi-Apparat und im Endomembran-System festgestellt werden.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss unterschiedliche Lipidmodifizierungen des Influenza-Virus-A Hämagglutinins auf dessen Assoziation mit so genannten *lipid rafts* ausüben. Hierzu wurde mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese ein rascher Zugang zu unterschiedlich palmitoylierten Heptapeptiden erschlossen (Schema 35). Diese Synthese ermöglicht den vollständigen Aufbau der Peptide am polymeren Träger, wobei die unterschiedlichen Palmitoylierungsmuster durch geeignete Wahl der Schutzgruppen für die cysteinischen Thiole erzeugt werden konnten.



Schema 35: Synthese der drei unterschiedlich palmitoylierten Influenza-Virus-A Heptapeptide **50**, **51** und **52**. 4a) 95% TFA, 5% TIS; 4b) 1. DTT (20 eq), DIEA (2.5% v/v) 2. Pal-Cl (30 eq), NEt₃ (10 eq), β-ME (5 eq), cat. DMAP, 16h, 3. 95% TFA, 5% TIS 4c) 1. 1% TFA 6*10 min, 2. Pal-Cl (60 eq), NEt₃ (10 eq), β-ME (10 eq), cat. DMAP, 16h 3. 95% TFA, 5% TIS.

Mit diesen Peptiden wurden biokalorimetrische Untersuchungen (DSC) durchgeführt, um deren Einbau in Modellmembranen zu evaluieren, die aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DDPC) mit Zusätzen von 0-, 25- und 40-mol% Cholesterol bestehen. Hierbei zeigte sich, dass das doppelt palmitoylierte Heptapeptid **52** sehr gut in die Membran aus DPPC+ 40-mol% Cholesterol eingebaut wird, da der Phasenübergang des Lipids von der Gelphase zur flüssig-kristallinen Phase nahezu vollständig verschwindet. Bei dieser Lipidzusammensetzung zeigte das monopalmitoylierte Peptid **51** ebenfalls einen leichten Einfluss auf den Phasenübergang, was sich mit einem schwachen Einbau in die Lipidstruktur erklären lässt. Bei allen anderen Lipidzusammensetzungen respektive bei dem unpalmitoylierten Analog **50** waren keine oder nicht signifikante Änderungen des Phasenüberganges zu beobachten. Daher konnte gefolgert werden, dass das doppelt palmitoylierte Influenzapeptid cholesterolreiche Membranen gegenüber „normalen“ Membranen bevorzugt. Eine Übertragung dieser im Modellsystem

erhaltenen Ergebnisse auf die biologische Fragestellung der Inkorporation in *lipid rafts* lässt den Schluss zu, dass die zweifache Palmitoylierung eine Art Steuerungsfunktion für die Assoziation des Peptids (Proteins) mit diesen cholesterolreichen Mikrodomänen ist.

Das dritte Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit ersten Versuchen zur Generierung von Arrays kleiner Moleküle, die eine alternative Möglichkeit zur Detektion von Substrat-Protein-Wechselwirkungen darstellen. Es wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Maja Köhn durchgeführt. Hierzu wurde nach einigen orientierenden Versuchen ein Konzept entwickelt, das basierend auf der hochspezifisch ablaufenden *Staudinger-Ligation* eine Möglichkeit zur effektiven Immobilisierung von Substanzen eröffnen soll, die durch organische Festphasensynthese dargestellt wurden. Der für diese Ligation erforderliche Azid-Baustein 6-Azidohexylamin **79** konnte in einer vierstufigen Synthese in guter Ausbeute dargestellt werden. Mit ihm wurden zunächst Modellverbindungen wie der entsprechend azid-modifizierte Farbstoff CY5 **80** und das Hapten DNPaca **85** dargestellt, mit welchen eine Überprüfung des Immobilisierungskonzeptes vollzogen wurde.

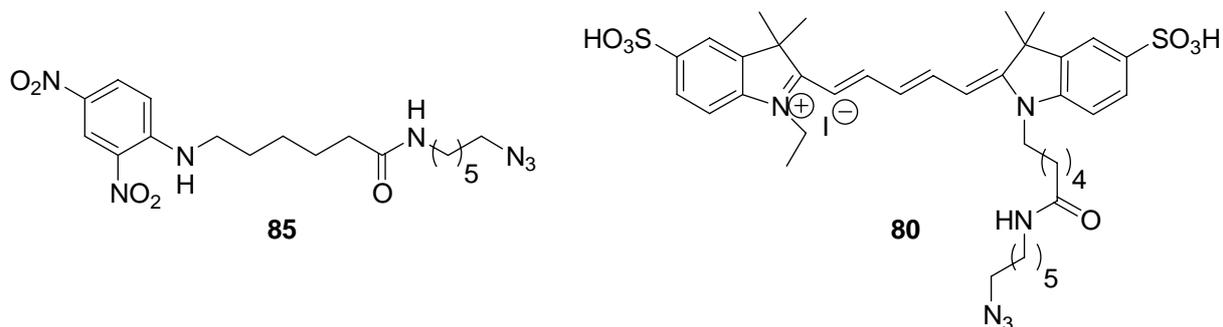
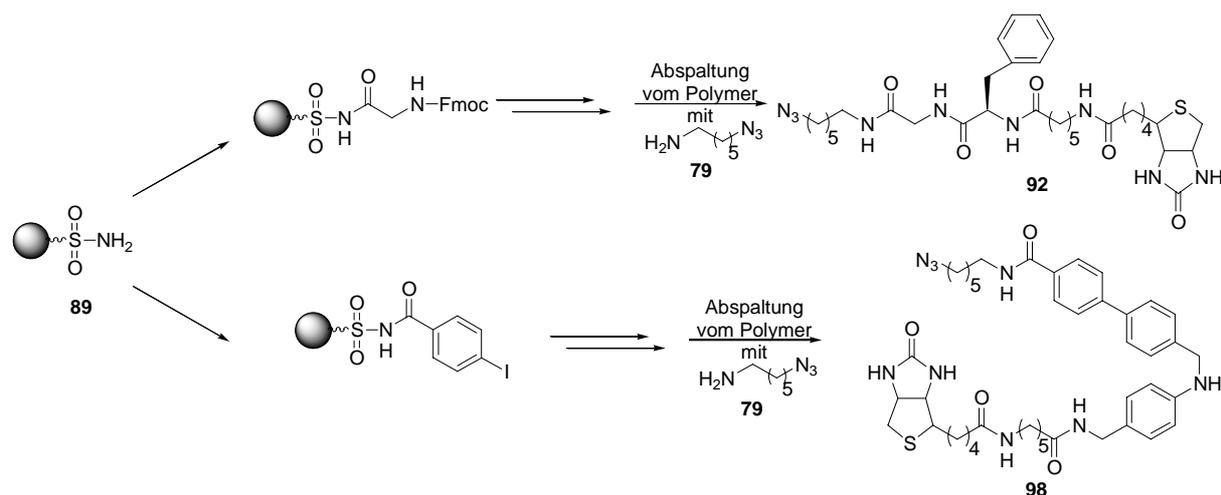


Abbildung 34: In Lösung dargestellte Azide **80** und **85**.

Um das Konzept der Abspaltung vom polymeren Träger nach Abschluss der Synthese in aktivierter Form umzusetzen, war es erforderlich, zunächst einen geeigneten Linker zu finden. Hierbei fiel die Wahl auf den Sulfamylbutyryl-Linker, da der zunächst favorisierte Hydrazinobenzoyl-Linker unter den Abspaltungsbedingungen nicht das gewünschte Produkt lieferte. Um die Realisierbarkeit dieses Konzeptes zu demonstrieren, wurden neben dem biotinylierten Dipeptid **92** das Antibiotikum-Analogon **98** in einer sechsstufigen Synthese am polymeren Träger synthetisiert und in azid-modifizierter Form abgespalten (Schema 36).



Schema 36: Synthese des biotinylierten Antibiotika-Analogons **98**.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass neben der Abspaltung vom Polymer mit dem Nucleophil 6-Azidohexylamin (**79**) auch die Ligationschemie auf entsprechend modifizierten Glasoberflächen prinzipiell funktioniert,^[137] ist nun im nächsten Schritt erforderlich, dieses Konzept zunächst mit der Synthese und Untersuchung von bekannten Wirkstoffen weiterzuführen, um die Leistungsfähigkeit dieses Systems zu demonstrieren.

Ausblick

Im Hinblick auf das Projekt der Hedgehog-Peptide und Peptid-Protein-Konstrukte wäre es in weiteren Studien interessant, mit Hilfe der MIC-Ligation oder *Expressed Protein Ligation* Konjugate mit dem Hedgehog-Protein anstelle des verkürzten Ras-Proteins zu generieren. Diese Konjugate könnten entscheidend zur Aufklärung des Shh-Signalwegs beitragen: Mit fluoreszenzmarkierten Hedgehog-Proteinen könnte nach Einschleusung in Hh-Sendzellen ihre Sekretion und ihre weitere räumliche Orientierung verfolgt werden. Weiterhin wären Hedgehog-Proteine vorstellbar, die C-terminal eine andere Sterolmodifizierung tragen oder bei denen der Cholesterolrest nicht über eine Esterfunktion angeknüpft wäre, was Rückschlüsse auf die Toleranz solcher Modifikationen im Hinblick auf Interaktionspartner im Hh-Signalweg zulassen würde.

Unter der Voraussetzung, dass die Aufreinigung des durch EPL generierten Peptid-Protein-Konstrukts (**45**) gelänge, würde es ein wichtiges Hilfsmittel zur Erforschung des Ras-Signalwegs darstellen. Denn ein solches Konstrukt würde am Ligationscystein eine freie

Thiol-Gruppe besitzen, die nach Mikroinjektion intrazellulär palmitoyliert werden könnte. Hierdurch wären interessante Rückschlüsse auf die Spezifität einer (noch zu findende) Palmitoyltransferase möglich.

Für das Projekt der Arrays kleiner Moleküle sollten im nächsten Schritt weitere Verbindungen sowohl in Lösung als auch mit Hilfe des Festphasenansatzes dargestellt werden, um die Orthogonalität der Chemie des Ligationsschrittes zu demonstrieren. Ferner wäre es vorstellbar, bekannte Wirkstoffe mit Hilfe dieser Technologie zu immobilisieren und diese anschließend hinsichtlich ihrer Wechselwirkung sowohl mit bekannten als auch mit potentiellen Bindungspartnern zu untersuchen. Hierdurch wäre der Schritt vom mehr modellhaften Bindungssystem (Biotin-Streptavidin) hin zur realitätsnahen Anwendung vollzogen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker AM 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, 125.8 MHz ^{13}C -NMR

Die chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben und die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, m = Multiplett, br = breites Signal.

Die 70 eV EI- und die FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix diente bei den FAB-Messungen 3-Nitrobenzylalkohol (3-NBA). Die ESI-Messungen wurden mit einem Finnigan LCQ Massenspektrometer durchgeführt. Angegeben sind jeweils die m/z-Werte.

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in g/100 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen vermerkt.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktmessgerät 530 bestimmt und sind unkorrigiert.

Die UV/VIS-Spektren wurden mit Cary 50 UV/VIS-Spektrometer der Firma Varian aufgenommen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Spectrofluorimeter FluoroMax I der Firma SPEX Instruments S.A. durchgeführt. Die Spaltbreiten für Anregung und Emission betragen 0.5 nm.

Die biokalorimetrischen Untersuchungen wurden mit einem VP-DSC Gerät der Firma Microcal vorgenommen.

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen wurden mit einem BIAcore 1000 der Firma Amersham Pharmacia Biotech unter Verwendung eines L1-Sensorchips durchgeführt.

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄). Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm respektive 366 nm und zur Anfärbung folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz A: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser

Reagenz B: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser

Die entsprechenden Laufmittel und R_f-Werte sind bei den jeweiligen Verbindungen vermerkt. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma Merck mit einem Überdruck von 0.3-0.8 bar. Die Größenausschlusschromatographie wurde an Sephadex LH 20 der Firma Amersham Pharmacia unter Verwendung von Chloroform:Methanol=1:1 (v/v) durchgeführt.

Die präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde mit einem System der Firma Agilent (1100 Series) durchgeführt. Als Säulen fanden eine CC125/21 Nucleosil 120-5 C4 Säule respektive CC125/21 Nucleodur 120-5 C18 Gravity der Firma Macherey&Nagel bei Flussraten von 27 ml/ min Verwendung. Die analytische HPLC wurde mit einem HP 1100 – Modell der Firma Hewlett-Packard mit CC125/4 Nucleosil 120-5 C4 Säule respektive CC125/4 Nucleodur 120-5 C18 Gravity der Firma Macherey&Nagel mit Flussraten von 1 ml/ min durchgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils bei den Wellenlängen 210 nm respektive 301 nm. Als Laufmittel wurden Wasser+ 0.1 Vol.-% TFA (A) und Acetonitril+ 0.1 Vol.-% TFA (B) verwendet.

Es wurden zwei Standardgradienten benutzt:

Gradient A (Grad. A): 1 min 10 % B, dann innerhalb von 10 min auf 100 % B.

Gradient B (Grad. B): 3 min 10 % B, dann innerhalb von 15 min auf 100 % B.

Alle verwendeten Ausgangskemikalien wurden bei den Firmen Acros Chimica, Advanced Chemtech, Aldrich, Fluka, Maybridge, Molecular Probes, Novabiochem, Riedel de Haen, Senn Chemicals oder Sigma erworben. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach gebräuchlichem Laboratoriumsstandard absolutiert.^[149]

Alle verwendeten Proteine wurden von C. Nowak und M. Wagner der Abteilung I des MPI Dortmund überexprimiert. Mikroinjektionen wurden mit Hilfe eines automatisierten Injektionssystems AIS unter Beobachtung der Zellen mit einem inversen Mikroskop Axiovert 135TV von M. Wagner durchgeführt.

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1

Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasen-Peptidsynthese (AAV 1)

Fmoc-Entschützung

Das in DMF vorgequollene Harz wird zweimal für je 10 min mit je 6 ml Piperidin/Dimethylformamid (1/4(v/v)) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz sukzessive mit DMF, CH₂Cl₂, Ethylacetat gewaschen und getrocknet.

Boc-Entschützung

Das in CH₂Cl₂ vorgequollene Harz wird zweimal für je 10 min mit je 7 ml Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1/1(v/v)) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz sukzessive mit CH₂Cl₂, Methanol und Ethylacetat gewaschen und getrocknet.

Beladungsbestimmung mittels UV-VIS-Spektroskopie

Es werden etwa 5 mg Harz (im Feinvakuum getrocknet) mit 15 ml Piperidin/Dimethylformamid (1/4(v/v)) für 30 min bei RT inkubiert und dann von dieser Lösung die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda=301$ nm bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann die Konzentration bestimmt werden ($\epsilon=7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$).^[86]

N-terminale Verlängerung

HBTU als Kupplungsreagenz

Eine 0.1 M Lösung von 4 Äquivalenten der N-terminal geschützten Aminosäure, 3.6 Äquivalenten HBTU, 4.8 Äquivalenten HOBt sowie 8 Äquivalenten Diisopropylethylamin in Dimethylformamid wird unter Argonatmosphäre für 1 min bei Raumtemperatur voraktiviert und dann zum N-terminal entschützten polymergebundenen Peptid gegeben. Die resultierende Mischung wird 60 min bei RT geschüttelt und dann je fünfmal mit DMF und CH₂Cl₂ und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet.

DIC als Kupplungsreagenz

Eine 0.1 M Lösung von 4 Äquivalenten der N-terminal geschützten Aminosäure, 4 Äquivalenten DIC, 4.8 Äquivalenten HOBt in Dimethylformamid wird für 5 min bei Raumtemperatur voraktiviert und dann zum N-terminal entschützten polymergebundenen

Peptid gegeben. Die resultierende Mischung wird 60 min bei RT geschüttelt und dann je fünfmal mit DMF und CH₂Cl₂ und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet.

C-terminale Allylesterspaltung am polymeren Träger

Das im Feinvakuum getrocknete Polymer wird unter Argonatmosphäre in absolutem und entgastem Dichlormethan suspendiert und 24 Äquivalente Phenylsilan als Scavenger zugesetzt. Nach Zugabe von 0.2 Äquivalenten Pd(PPh₃)₄ wird die Mischung unter Argonatmosphäre 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Abspaltungsreaktion wird einmal wiederholt und dann das Harz je dreimal mit DMF, DMF:H₂O (1:1), CH₂Cl₂ und Ethylacetat gewaschen und im Feinvakuum getrocknet.

C-terminale Verlängerung

Zum in NMP vorgequollenen C-terminal entschützten polymergebundenen Peptid wird eine 0.1 M Lösung von 5 Äquivalenten Glycinsterylester-hydrotrifluoracetat, 5 Äquivalenten PyBOP und 10 Äquivalenten Diisopropylethylamin in NMP gegeben und über 16 h bei RT geschüttelt. Danach wird das Polymer je fünfmal mit DMF und CH₂Cl₂ und Ethylacetat gewaschen und getrocknet.

Erstbeladung des Harzes:

Trityl-Harz:

In einer typischen Reaktion werden 100 mg Trityl-Harz (Beladung: 1.47 mmol g⁻¹) unter Argonatmosphäre in 5 ml absolutem Dichlormethan vorgequollen und anschließend mit einer Lösung von 125 mg Fmoc-Ser-Gly-OAll **18** (0.29 mmol; 2 eq) und 76 mg DIEA (0.59 mmol; 4 eq) in 5 ml absolutem Dichlormethan versetzt und für 5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz mit Dichlormethan gewaschen, getrocknet und eine Beladungsbestimmung durchgeführt. Ist die Beladung zu gering wird obige Reaktion wiederholt. Im Allgemeinen ist eine Wiederholung nicht erforderlich, da die erzielten Beladungen im Bereich von 85-90 % liegen. Die Blockierung der noch freien Reaktivitäten auf dem Polymer erfolgt durch Schütteln mit einer Lösung von 1 ml Methanol und 152 mg DIEA (1.18 mmol; 8 eq) für 15 min. Anschließend wird das Harz je fünfmal mit DMF, CH₂Cl₂ und Ethylacetat gewaschen und getrocknet.

Wang-Harz:

Zur Beladung werden 10 Äquivalente der *N*-terminal blockierten Aminosäure in absolutem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit 5 Äquivalenten DIC versetzt. Bei dieser Temperatur wird für 30 min gerührt und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in absolutem DMF aufgenommen, mit 0.1 Äquivalenten *N,N*-Dimethylaminopyridin versetzt und zum in absolutem DMF vorgequollenen Harz gegeben. Man schüttelt diese Suspension für 3 h bei Raumtemperatur, wäscht das Harz je fünfmal mit DMF und CH₂Cl₂ und Ethylacetat und bestimmt die Beladung. Gegebenenfalls wird die Beladungsreaktion wiederholt und dann werden die freien Hydroxyfunktionalitäten durch zehnmünütige Reaktion mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1/10(v/v)) blockiert.

Hydrazinobenzoyl Harz:

Die Anknüpfung der ersten Aminosäure erfolgt unter Bedingungen der Peptidbindungsanknüpfung wobei DIC als Kupplungsreagenz Verwendung findet. Die Reaktion wird je nach Beladungsgrad wiederholt. Der Blockierungsschritt wird in diesem Fall mit Pivaloysäureanhydrid/Pyridin (1/10(v/v)) durchgeführt.

Abspaltung vom Trityl-Harz

Das in Dichlormethan vorgequollene Harz wird mit einer Lösung von 5 % Trifluoressigsäure und 5 % Triethylsilan in Dichlormethan für 20 min geschüttelt. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt, anschließend das Harz mit Dichlormethan gewaschen und die vereinigten organischen Filtrate werden im Vakuum aufkonzentriert. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC oder Grobenausschlusschromatographie.

6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2**Generierung verschiedener Peptidester unter Verwendung des Hydrazidlinkers**

Nach Anknüpfung der ersten Aminosäure unter oben angeführten Bedingungen erfolgt der Aufbau des Peptids gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift 1 (Kap. 6.2) unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenstrategie. Nach UV/VIS-spektroskopischer Bestimmung der Harzbeladung wird das *N*-terminal Fmoc-geschützte Peptid unter folgenden Bedingungen oxidativ vom Harz abgespalten.

Method A:

In einer typischen Reaktion werden 200 mg des Harzes zu einer Lösung von 0.5 Äquivalenten (bezogen auf die Beladung nach der letzten Kupplung) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 10 Äquivalenten Pyridin und 5 Äquivalenten des entsprechenden Alkohols in 5 ml absolutem Dichlormethan gegeben. Die resultierende Suspension wird 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und dabei Sauerstoff durchgeleitet. Nach Filtration des Harzes wird fünfmal mit Dichlormethan nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum aufkonzentriert. Durch Filtration über eine Festphasenextraktionskartusche mit Dichlormethan als Eluens werden die Peptidester vom Kupfersalz befreit.

Method B:

Das Harz (200 mg) wird für 5 min bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 2 Äquivalenten *N*-Bromsuccinimid (aus H_2O umkristallisiert) und 2 Äquivalenten Pyridin in 5 ml absolutem Dichlormethan geschüttelt, anschließend getrocknet und mit absolutem Dichlormethan sowie absolutem Tetrahydrofuran gewaschen. Nach Trocknung wird das Harz mit einer Lösung von 5 Äquivalenten des entsprechenden Alkohols in 5 ml absolutem Dichlormethan für 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das Harz abfiltriert und fünfmal mit Dichlormethan nachgewaschen. Nach Aufkonzentration im Vakuum werden die Produkte mittels präparativer HPLC gereinigt.

Nach diesen Methoden wurden folgende Peptidester dargestellt:

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-glycin-methylester (16a)**

Fmoc-Val-Phe-Gly-O-Me

Farbloser Feststoff.

HPLC: $t_{\text{R}} = 7.96$ min (Grad A)

Schmp.: 191°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.6^\circ$ ($c = 0.17$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1(v/v)): $\delta = 7.76$ (d, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.58 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.41-7.37 (m, 2H, CH Fmoc), 7.33-7.28 (m, 2H, CH Fmoc), 7.23-7.12 (m, 5H, Phe), 4.70 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, α -CH, Phe), 4.45-4.32 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.19 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.07-4.02 (m, 1H, α -CH, Val), 3.86-3.82

(m, 2H, α -CH, Gly), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (dd, $^2J= 6.5$ Hz, $^3J= 13.9$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.94 (dd, $^2J= 8.3$ Hz, $^3J= 13.9$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.03-1.98 (m, 1H, β -CH, Val), 0.78 ppm (d, $^3J= 6.7$ Hz, 6H, γ -CH, Val, 2 Rotamere).

C₃₂H₃₅N₃O₆ (557.64).

HR-FAB-MS: ber.: 558.2604 [M+H]⁺
gef.: 558.2593 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-glycin-allylester (16b)

Fmoc-Val-Phe-Gly-O-All

Farbloser Feststoff.

HPLC: t_R = 7.96 min (Grad A)

Schmp.: 189°C

$[\alpha]_D^{20} = -28.9^\circ$ (c = 0.19, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 10:1(v/v)): $\delta = \delta = 7.74$ (d, $^3J= 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.56 (d, $^3J= 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.39-7.35 (m, 2H, CH Fmoc), 7.30-7.28 (m, 2H, CH Fmoc), 7.20-7.10 (m, 5H, Phe), 5.88-5.78 (m, 1H, CH Allyl), 5.28-5.19 (m, 2H, CH=CH₂), 4.69 (t, $^3J= 7.6$ Hz, 1H, α -CH, Phe), 4.55 (d, $^3J= 5.5$ Hz, 2H, O-CH₂-, Allyl), 4.44-4.29 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.17 (t, $^3J= 6.6$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.07-4.01 (m, 1H, α -CH, Val), 3.88-3.83 (m, 2H, α -CH, Gly), 3.18 (dd, $^2J= 6$ Hz, $^3J= 14$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.91 (dd, $^2J= 8$ Hz, $^3J= 14$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.01-1.94 (m, 1H, β -CH, Val), 0.76 ppm (d, $^3J= 6.6$ Hz, 6H, γ -CH, Val, 2 Rotamere).

C₃₄H₃₇N₃O₆ (583.67).

HR-FAB-MS: ber.: 584.2761 [M+H]⁺
gef.: 584.2758 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-glycin-isopropylester (16c)Fmoc-Val-Phe-Gly-O-*i*Pr

Farbloser Feststoff.

HPLC: $t_R = 8.06$ min (Grad A)Schmp.: 186°C $[\alpha]_D^{20} = -31.1^\circ$ ($c = 0.14$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1(v/v)): $\delta = 7.73$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.56 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.38-7.35 (m, 2H, CH Fmoc), 7.29-7.26 (m, 2H, CH Fmoc), 7.20-7.09 (m, 5H, Phe), 4.99-4.92 (m, 1H, α -CH, *iso*-Propyl) 4.67 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, α -CH, Phe), 4.43-4.27 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.16 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.98-3.94 (m, 1H, α -CH, Val), 3.83-3.75 (m, 2H, α -CH, Gly), 3.17 (dd, $^2J = 6.4$ Hz, $^3J = 13.6$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.92 (dd, $^2J = 8.1$ Hz, $^3J = 13.6$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 1.99-1.93 (m, 1H, β -CH, Val), 1.18 (dd, $^2J = 6.6$ Hz, $^3J = 9$ Hz, 6H, *iso*-Propyl), 0.75 ppm (d, $^3J = 6.8$ Hz, 6H, γ -CH, Val, 2 Rotamere).

 $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$ (585.69).HR-FAB-MS: ber.: 586.2917 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 586.2891 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-isoleucin-heptylester (16d)

Fmoc-Val-Phe-Ile-O-Hep

Farbloses Öl.

HPLC: $t_R = 8.93$ min (Grad A) $[\alpha]_D^{20} = -25.2^\circ$ ($c = 0.33$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1(v/v)): $\delta = 7.74$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.57 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.39-7.36 (m, 2H, CH Fmoc), 7.31-7.27 (m, 2H, CH Fmoc), 7.19-7.07 (m, 5H, Phe), 4.63-4.60 (m, 1H, α -CH, Phe), 4.44-4.37 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.31-4.27 (m, 1H, α -CH, Ile), 4.18 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.04 (t, $^3J = 6.7$

Hz, 2H, -CH₂-O, Heptyl), 3.87 (d, ³J= 6.8 Hz, 1H, α-CH, Val), 3.07 (dd, ²J= 6.6 Hz, ³J= 13.8 Hz, 1H, β-CH, Phe), 2.91 (dd, ²J= 7.9 Hz, ³J= 13.8 Hz, 1H, β-CH, Phe), 1.98-1.93 (m, 1H, β-CH, Val), 1.84-1.74 (m, 1H, β-CH, Ile), 1.60-1.55 (m, 2H, Heptyl), 1.25-1.19 (m, 9H, γ'-CH, Ile, Heptyl), 1.18-1.06 (m, 1H, γ'-CH, Ile), 0.86-0.80 ppm (m, 15H, γ-CH, Val, Ile, δ-CH, Ile, Heptyl).

C₄₂H₅₅N₃O₆ (697.90).

HR-FAB-MS: ber.: 720.3989 [M+Na]⁺
gef.: 720.4007 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-alanin-benzylester (16e)

Fmoc-Val-Phe-Ala-O-Bzl

Farbloses Öl.

HPLC: t_R= 7.71 min (Grad A)

[α]_D²⁰ = -26.8° (c= 0.38, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 10:1(v/v)): δ = 7.69 (d, ³J= 7.5 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.53-7.51 (m, , 2H, CH Fmoc), 7.34-7.31 (m, 2H, CH Fmoc), 7.29-7.27 (m, 2H, CH Fmoc), 7.24-7.22 (m, 5H, Bz), 7.13-7.03 (m, 5H, Phe), 5.06 (s, 2H, Bz), 4.57-4.52 (m, 1H, α-CH, Phe), 4.44-4.35 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.26-4.22 (m, 1H, α-CH, Ala), 4.12 (t, ³J= 6.7 Hz, 1H, CH Fmoc), 3.80 (d, ³J= 6.6 Hz, 1H, α-CH, Val), 3.02 (dd, ²J= 6.0 Hz, ³J= 14.0 Hz, 1H, β-CH, Phe), 2.84 (dd, ²J= 8.0 Hz, ³J= 14.0 Hz, 1H, β-CH, Phe), 1.94-1.88 (m, 1H, β-CH, Val), 1.28 (d, ³J= 7.0 Hz, 3H, β-CH, Ala), 0.75 ppm (d, ³J= 6.6 Hz, 6H, γ-CH, Val, 2 Rotamere).

C₃₉H₄₁N₃O₆ (647.76).

HR-FAB-MS: ber.: 648.3074 [M+H]⁺
gef.: 648.3084 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-glycin-cyclohexylester (16f)

Fmoc-Val-Phe-Gly-O-cHex

Farbloser Feststoff.

HPLC: $t_R = 8.54$ min (Grad A)Schmp.: 180°C $[\alpha]_D^{20} = -25.0^\circ$ ($c = 0.72$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1(v/v)): $\delta = 7.73$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.56 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.39-7.35 (m, 2H, CH Fmoc), 7.30-7.28 (m, 2H, CH Fmoc), 7.20-7.10 (m, 5H, Phe), 4.74-4.67 (m, 2H, α -CH, Cyclohexyl, α -CH, Phe), 4.43-4.28 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.17 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.00-3.96 (m, 1H, α -CH, Val), 3.85-3.77 (m, 2H, α -CH, Gly), 3.18 (dd, $^2J = 6.2$ Hz, $^3J = 14$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.91 (dd, $^2J = 8.4$ Hz, $^3J = 14$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.01-1.92 (m, 1H, β -CH, Val), 1.74-1.63 (m, 4H, β -CH Cyclohexyl), 1.46-1.19 (m, 6H, Cyclohexyl), 0.76 ppm (d, $^3J = 6.7$ Hz, 6H, γ -CH, Val, 2 Rotamere).

 $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6$ (625.75).HR-FAB-MS: ber.: 626.3230 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 626.3221 (in 3-NBA)

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-valyl-phenylalanyl-glycin-decalylester (16g)

Fmoc-Val-Phe-Gly-O-Dec

Farbloser Feststoff.

HPLC: $t_R = 9.18$ min (Grad A)Schmp.: 176°C $[\alpha]_D^{20} = -27.5^\circ$ ($c = 0.24$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 10:1(v/v)): $\delta = 7.72$ (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.55 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.37-7.34 (m, 2H, CH Fmoc), 7.29-7.25 (m, 2H, CH Fmoc), 7.19-7.11 (m, 5H, Phe), 4.77-4.64 (m, 2H, 1-CH, Decalyl, α -CH, Phe), 4.42-4.26 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.16 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.98-3.93 (m, 1H, α -CH, Val), 3.82-3.76 (m, 2H, α -CH, Gly), 3.13 (dd, $^2J = 6.3$ Hz, $^3J = 13.8$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 2.88

(dd, $^2J= 8.6$ Hz, $^3J= 13.8$ Hz, 1H, β -CH, Phe), 1.98-1.89 (m, 2H, β -CH, Val, β' -CH, Decalyl), 1.73-1.62 (m, 3H, β -CH, 2-CH, 4'-CH, Decalyl), 1.57-1.11 (m, 14H, Decalyl), 0.75 ppm (d, $^3J= 6.8$ Hz, 6H, γ -CH, Val, 2 Rotamere).

C₄₁H₄₉N₃O₆ (679.84).

HR-FAB-MS: ber.: 680.3700 [M+H]⁺
gef.: 680.3713 (in 3-NBA)

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3

N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-seryl-glycin-allylester (18)

Fmoc-Ser-Gly-O-Al

Zu einer Lösung von 2 g Glycinallylester-hydrostosylat **17** (6.96 mmol) und 2.28 g *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-L-serin (6.96 mmol; 1 eq) in 40 ml Dichlormethan werden unter Eiskühlung 2.13 g HOBt (13.9 mmol; 2 eq), 1.80 g DIEA (2.4 ml; 13.9 mmol; 2 eq) zugesetzt und die Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene DIC-Harnstoff wird abfiltriert und man wäscht die organische Phase je dreimal mit 50 ml 1N HCl, 50 ml ges. NaHCO₃-Lösung und 50 ml ges. NaCl-Lösung. Nach Trocknung über MgSO₄ und Entfernung des Lösungsmittel im Vakuum erfolgt die säulenchromatographische Aufreinigung mit Dichlormethan:Methanol=100:1 (v/v) als Eluens.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.69 g (6.33 mmol, 91 %)
R_f-Wert: 0.39 (Dichlormethan/Methanol 10/1 (v/v))
Schmp.: 147°C

$[\alpha]_D^{20} = -9.8^\circ$ (c=0.62, CHCl₃:CH₃OH 1:1 (v/v))

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.76$ (d, $^3J= 7.4$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.58 (d, $^3J= 7.0$ Hz, 2H, CH Fmoc), 7.42-7.38 (m, 2H, CH Fmoc), 7.33-7.29 (m, 2H, CH Fmoc), 6.99 (s, br, NH-Amid), 5.94-5.83 (m, 2H, CH, Allyl, NH, Urethan), 5.35-5.23 (m, 2H, CH=CH₂), 4.63 (d, $^3J= 5.9$ Hz, 2H, CH₂-O-, Allyl), 4.44 (d, $^3J= 6.7$ Hz, 2H, CH₂-O-, Fmoc), 4.33-

4.29 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.23 (t, $^3J= 6.7$ Hz, 1H, CH, Fmoc), 4.02 (d, $^3J= 6.3$ Hz, 2H, α -CH, Gly), 3.73-3.62 (m, 2H, β -CH₂, Ser), 3.08 ppm (s, br, 1H, OH, Ser).

C₂₃H₂₄N₂O₆ (424.45).

HR-FAB-MS: ber.: 425.1713 [M+H]⁺
gef.: 425.1693 (in 3-NBA)

Synthese von *N*-Boc-Glycin-sterylestern (Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 2)

Unter Argonatmosphäre werden 5.17 mmol Sterol, 5.17 mmol (1 eq) des Boc-geschützten Glycins und 4.14 mmol (0.8 eq) *N,N*-Dimethylaminopyridin in 40 ml abs. Dichlormethan gelöst und anschließend unter Eiskühlung 5.70 mmol (1.1 eq) Diisopropylcarbodiimid zugesetzt. Die resultierende Lösung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Dann wird der gebildete Harnstoff abfiltriert und die organische Phase je dreimal mit 50 ml 1N HCl, 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung und 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an SiO₂ mit Dichlormethan als Eluens.

N-*tert*-Butyloxycarbonyl-glycin-cholesteryl-ester (19a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV2 werden 2.0 g Cholesterol (5.17 mmol), 0.91 g *N*-Boc-Glycin (5.17 mmol), 0.51 g *N,N*-Dimethylaminopyridin (4.14 mmol) und 0.72 g Diisopropylcarbodiimid (5.70 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.6 g (4.8mmol, 93%)

R_f-Wert: 0.33 (Dichlormethan)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.37$ (d, $^3J= 4.1$ Hz, 1H, C=CH), 5.01 (s (br), 1H, NH), 4.71-4.64 (m, 1H, CH-O), 3.87 (s, 2H, α -CH, Gly), 2.32 (d, $J= 7.6$ Hz, 2H, Sterol), 2.02-1.95 (m, 2H, Sterol), 1.88-1.78 (m, 3H, Sterol), 1.62-1.53 (m, 5H, Sterol), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.40-1.20 (m, 6H, Sterol), 1.14 (d, $^3J= 6.4$ Hz, 6H, Sterol), 1.10-1.06 (m, 3H, Sterol), 1.01 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.96-0.90 (m, 2H, Sterol), 0.91 (d, $^3J= 6.4$ Hz, 3H, Sterol), 0.86 (dd, $^2J= 1.6$ Hz, $^3J= 6.6$ Hz, 6H, Sterol), 0.67 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 169.4 (C=O, Ester), 155.1 (Carbamat), 139.2 ($\underline{\text{C}}=\text{CH}$), 122.8 (C= $\underline{\text{C}}\text{H}$), 79.9 (CH-O), 75.2 (C_q -*tert.*-Butyl), 56.4 (C-Sterol), 56.7 (C-Sterol), 56.2 (C-Sterol), 50.1 (C-Sterol), 42.7 (α -C, Gly), 42.4 (C-Sterol), 39.8 (C-Sterol), 39.6 (C-Sterol), 38.1 (C-Sterol), 37.0 (C-Sterol), 36.6 (C-Sterol), 36.3 (C-Sterol), 35.9 (C-Sterol), 32.0 (C-Sterol), 31.9 (C-Sterol), 28.4 (C-*tert.*-Butyl), 28.3 (C-Sterol), 28.1 (C-Sterol), 27.8 (C-Sterol), 24.4 (C-Sterol), 24.0 (C-Sterol), 23.6 (C-Sterol), 23.0 (C-Sterol), 22.7 (C-Sterol), 21.1 (C-Sterol), 19.4 (C-Sterol), 18.8 (C-Sterol), 12.0 ppm (C-Sterol).

$\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{NO}_4$ (543.82).

HR-FAB-MS: ber.: 566.4185 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
gef.: 566.4215 (in 3-NBA)

Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[150]

Androst-5-en-3 β -ol (23)

Es werden 2 g *trans*-Dehydroandrosteron (6.93 mmol), 6.8 ml Hydrazinhydrat (13.5 mmol; 1.95 eq) sowie 3.63 g Kaliumhydroxid (65 mmol; 9.4 eq) in 50 ml Diethylenglykol gelöst und für 1.5 h auf 120°C erhitzt. Anschließend setzt man einen Destillationsaufsatz auf und erhitzt zur destillativen Abtrennung des überschüssigen Hydrazinhydrats für 4 h auf 200°C Badtemperatur. Man lässt auf 75°C abkühlen und setzt 50 ml H_2O zu, wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert, getrocknet und aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 1.67 g (6.09 mmol, 88%)

Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.^[94]

$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}$ (274.44).

N-*tert.*-Butyloxycarbonyl-glycin-androst-5-en-3 β -yl-ester (20a)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV2 werden 1.0 g Androst-5-en-3 β -ol **23** (3.64 mmol), 0.64 g *N*-Boc-Glycin (3.64 mmol), 0.36 g *N,N*-Dimethylaminopyridin (2.91 mmol) und 0.51 g Diisopropylcarbodiimid (4.00 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 1.35 g (3.13mmol, 86%)

R_f-Wert: 0.29 (Dichlormethan)

Schmp.: 109°C

$[\alpha]_D^{20} = -39.7^\circ$ (c=0.4, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.38$ (d, ³J= 3.7 Hz, 1H, C=CH), 5.01 (s, 1H, NH), 4.71-4.63 (m, 1H, CH-O), 3.87 (s, 2H, α -CH, Gly), 2.33 (d, ³J= 7.4 Hz, 1H, CH₂, Sterol), 2.04-1.97 (m, 1H, CH, Sterol), 1.90-1.85 (m, 2H, CH₂, Sterol), 1.77-1.68 (m, 1H, CH, Sterol), 1.67-1.51 (m, 7H, Sterol), 1.45 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 1.43-1.38 (m, 2H, Sterol), 1.19-1.13 (m, 4H, Sterol), 1.02 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.99-0.87 (m, 2H, Sterol), 0.71 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.7$ (C=O, Ester), 155.7 (Carbamat), 139.3 (C=CH), 122.9 (C=CH), 79.9 (CH-O), 75.1 (C_q-*tert.*-Butyl), 54.8 (C-Sterol), 50.3 (C-Sterol), 42.6 (α -C, Gly), 40.5 (C-Sterol), 40.2 (C-Sterol), 38.6 (C-Sterol), 38.0 (C-Sterol), 37.0 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 32.2 (C-Sterol), 32.1 (C-Sterol), 30.8 (C-Sterol), 28.3 (C-*tert.*-Butyl), 27.7 (C-Sterol), 25.6 (C-Sterol), 21.1 (C-Sterol), 20.5 (C-Sterol), 19.3 (C-Sterol), 17.2 ppm (C-Sterol).

C₂₆H₄₁NO₄ (431.61).

HR-FAB-MS: ber.: 432.3114 [M+H]⁺

gef.: 432.3131 (in 3-NBA)

***N*-*tert.*-Butyloxycarbonyl-glycin-cholestan-3 β -yl-ester (21a)**

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV2 werden 4.44 g Cholestanol (11.4 mmol), 2.0 g *N*-Boc-Glycin (11.4 mmol), 1.12 g *N,N*-Dimethylaminopyridin (9.13 mmol) und 1.58 g Diisopropylcarbodiimid (12.6 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 5.6 g (10.3 mmol, 90%)

R_f-Wert: 0.25 (Dichlormethan)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.99$ (s (br), 1H, NH), 4.80-4.71 (m, 1H, CH-O), 3.85 (s, 2H, α -CH, Gly), 1.97-1.94 (m, 1H, Sterol), 1.83-1.78 (m, 2H, Sterol), 1.76-1.71 (m, 1H,

Sterol), 1.67-1.48 (m, 6H, Sterol), 1.45 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 1.39-0.97 (m, 21H, Sterol), 0.89 (d, $^3J= 6.4$ Hz, 3H, Sterol), 0.86 (dd, $^2J= 1.8$ Hz, $^3J= 6.6$ Hz, 6H, Sterol), 0.81 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.64 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.8$ (C=O, Ester), 155.7 (Carbamat), 79.8 (CH-O), 75.0 (C_q-*tert.*-Butyl), 56.4 (C-Sterol), 56.3 (C-Sterol), 54.2 (C-Sterol), 44.6 (C-Sterol), 42.6 (α -C, Gly), 40.0 (C-Sterol), 39.5 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 36.2 (C-Sterol), 35.8 (C-Sterol), 35.5 (C-Sterol), 35.4 (C-Sterol), 33.9 (C-Sterol), 32.0 (C-Sterol), 28.6 (C-Sterol), 28.3 (C-*tert.*-Butyl), 28.2 (C-Sterol), 28.0 (C-Sterol), 27.4 (C-Sterol), 24.2 (C-Sterol), 23.8 (C-Sterol), 22.8 (C-Sterol), 21.2 (C-Sterol), 18.7 (C-Sterol), 12.2 (C-Sterol), 12.1 ppm (C-Sterol).

C₃₄H₅₉NO₄ (545.84).

FAB-MS: ber.: 568.43 [M+Na]⁺
gef.: 568.16 (in 3-NBA)

***N*-*tert.*-Butyloxycarbonyl-glycin-stigmasteryl-ester (22a)**

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV2 werden 2.0 g Stigmasta-5,22-dien-3 β ol (4.85 mmol), 0.85 g *N*-Boc-Glycin (4.85 mmol), 0.47 g *N,N*-Dimethylaminopyridin (3.89 mmol) und 0.67 g Diisopropylcarbodiimid (5.31 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.51 g (4.41 mmol, 91%)

R_f-Wert: 0.31 (Dichlormethan)

Schmp.: 121°C

$[\alpha]_D^{20} = -16.3^\circ$ (c=1, CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.37$ (d, $^3J= 4.5$ Hz, 1H, C=CH), 5.15 (dd, $J= 8.6$ Hz, $J= 15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 5.01 (dd, $J= 8.6$ Hz, $J= 15.2$ Hz, 1H, CH=CH und s (br), 1H, NH), 4.71-4.66 (m, 1H, CH-O), 3.87 (s, 2H, α -CH, Gly), 2.32 (d, $J= 7.8$ Hz, 2H, Sterol), 2.07-1.96 (m, 2 H, Sterol), 1.88-1.85 (m, 2H, Sterol), 1.83-1.77 (m, 1H, Sterol), 1.73-1.62 (m, 9H, Sterol), 1.45 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 1.27-1.09 (m, 7H, Sterol), 1.03-0.95 (m, 8H, Sterol), 0.84 (d, $J= 6.5$ Hz, 3H, Sterol), 0.79 (d, $J= 6.8$ Hz, 6H, Sterol), 0.69 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 170.3 (C=O, Ester), 156.2 (Carbamat), 79.4 (CH-O), 75.3 (C_q -*tert.*-Butyl), 56.4 (C-Sterol), 56.3 (C-Sterol), 54.2 (C-Sterol), 44.6 (C-Sterol), 42.8 (α -C, Gly), 40.5 (C-Sterol), 39.9 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 36.2 (C-Sterol), 35.8 (C-Sterol), 35.6 (C-Sterol), 35.4 (C-Sterol), 33.5 (C-Sterol), 32.4 (C-Sterol), 28.9 (C-Sterol), 28.5 (C-*tert.*-Butyl), 28.2 (C-Sterol), 28.0 (C-Sterol), 27.2 (C-Sterol), 24.9 (C-Sterol), 23.8 (C-Sterol), 22.8 (C-Sterol), 21.6 (C-Sterol), 18.7 (C-Sterol), 12.9 (C-Sterol), 12.3 ppm (C-Sterol).

$\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{NO}_4$ (569.86).

HR-FAB-MS: ber.: 569.4444 $[\text{M}]^+$
gef.: 569.4435 (in 3-NBA)

Synthese von Glycin-sterylestern (Allgemeine Arbeitsvorschrift AAV 3)

Es werden 5.5 mmol *N*-Boc-glycin-sterylester in 30 ml Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung 10 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur lässt man 2 h bei dieser Temperatur rühren (dünnschicht-chromatographische Kontrolle mit Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v)). Anschließend wird das Lösungsmittel und die Trifluoressigsäure durch mehrmalige Coevaporation mit Toluol im Vakuum entfernt.

Glycin-cholesteryl-ester-hydrotrifluoracetat (19b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 3 g *N*-Boc-glycin-cholesteryl-ester (**19a**) (5.5 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.4 g (5.4 mmol, 99 %)

R_f -Wert: 0.02 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))

Schmp.: 181°C

$[\alpha]_D^{20} = -27.1^\circ$ (c=1, CHCl_3 : CH_3OH 1:1 (v/v))

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 : MeOD-d_4 , 10:1): δ = 5.34 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, C=CH), 4.69-4.61 (m, 1H, CH-O), 3.69 (s, 2H, α -CH, Gly), 2.32-2.27 (m, 2H, CH Sterol), 1.99-1.90 (m, 2H, CH, Sterol), 1.85-1.75 (m, 3H, Sterol), 1.63-1.39 (m, 7H, Sterol), 1.36-1.18 (m, 5H,

Sterol), 1.15-1.01 (m, 7H, Sterol), 0.97 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.96-0.90 (m, 2H, Sterol), 0.87 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, Sterol), 0.82 (dd, ²J= 1.8 Hz, ³J= 6.5 Hz, 6H, Sterol), 0.64 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃:MeOD-d₄,10:1): δ = 166.6 (C=O, Ester), 138.9 (C=CH), 123.2 (C=CH), 76.9 (CH-O), 56.6 (C-Sterol), 56.2 (C-Sterol), 49.9 (C-Sterol), 42.6 (α-C, Gly), 40.0 (C-Sterol), 39.6 (C-Sterol), 39.4 (C-Sterol), 37.6 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 36.4 (C-Sterol), 36.1 (C-Sterol), 35.7 (C-Sterol), 31.8 (C-Sterol), 31.7 (C-Sterol), 28.1 (C-Sterol), 27.9 (C-Sterol), 27.4 (C-Sterol), 24.2 (C-Sterol), 23.8 (C-Sterol), 22.7 (C-Sterol), 22.4 (C-Sterol), 20.9 (C-Sterol), 19.1 (C-Sterol), 18.6 (C-Sterol), 11.7 ppm (C-Sterol).

C₃₂H₅₄F₃NO₄ (573.77).

HR-FAB-MS: ber.: 444.3842 [M-TFA+H]⁺
gef.: 444.3826 (in 3-NBA)

Glycin-androst-5-en-3β-yl-ester-hydrotrifluoracetat (20b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 1.3 g *N-tert.*-Butyloxycarbonyl-glycin-androst-5-en-3β-ol-ester (**20a**) (3.0 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 1.26 g (2.82 mmol, 94 %)
R_f-Wert: 0.01 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))
Schmp.: 179°C

$[\alpha]_D^{20} = -50.7^\circ$ (c=1, CHCl₃:CH₃OH 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:MeOD-d₄,10:1): δ = 5.38 (d, ³J= 4.1 Hz, 1H, C=CH), 4.67-4.63 (m, 1H, CH-O), 3.84 (s, 2H, α-CH, Gly), 2.37-2.28 (m, 1H, CH₂, Sterol), 2.05-1.96 (m, 1H, CH, Sterol), 1.91-1.83 (m, 2H, CH₂, Sterol), 1.77-1.70 (m, 1H, CH, Sterol), 1.68-1.52 (m, 7H, Sterol), 1.45-1.36 (m, 2H, Sterol), 1.21-1.11 (m, 4H, Sterol), 1.01 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.99-0.87 (m, 2H, Sterol), 0.72 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃:MeOD-d₄,10:1): δ = 166.1 (C=O, Ester), 133.5 (C=CH), 122.9 (C=CH), 76.4 (CH-O), 54.6 (C-Sterol), 50.1 (C-Sterol), 40.4 (α-C, Gly), 40.0 (C-Sterol), 39.9 (C-Sterol), 38.4 (C-Sterol), 37.6 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 36.5 (C-Sterol), 32.0 (C-

Sterol), 31.9 (C-Sterol), 27.3 (C-Sterol), 25.4 (C-Sterol), 20.9 (C-Sterol), 20.3 (C-Sterol), 19.1 (C-Sterol), 17.0 ppm (C-Sterol).

$C_{24}H_{40}F_3NO_4$ (463.57).

HR-FAB-MS: ber.: 332.2590 [M-TFA+H]⁺
gef.: 332.2570 (in 3-NBA)

Glycin-cholestanyl-ester-hydrotrifluoracetat (21b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 3.0 g *N*-Boc-glycin-cholestanol-ester (21a) (5.5 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 3.13 g (5.4 mmol, 99 %)
R_f-Wert: 0.02 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))
Schmp.: 176°C
[α]_D²⁰ = -38.1° (c=1, CHCl₃:CH₃OH 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.79-4.71 (m, 1H, CH-O), 3.67 (s, 2H, α-CH, Gly), 1.94-1.91 (m, 1H, CH Sterol), 1.80-1.70 (m, 3H, CH, Sterol), 1.64-1.60 (m, 1H, Sterol), 1.54-1.38 (m, 6H, Sterol), 1.28-0.93 (m, 20H, Sterol), 0.85 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, Sterol), 0.82 (dd, ²J= 1.8 Hz, ³J= 6.6 Hz, 6H, Sterol), 0.78 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.61 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 166.7 (C=O, Ester), 76.6 (CH-O), 56.4 (C-Sterol), 56.3 (C-Sterol), 54.1 (C-Sterol), 44.6 (C-Sterol), 42.5 (α-C, Gly), 40.0 (C-Sterol), 39.9 (C-Sterol), 39.4 (C-Sterol), 36.5 (C-Sterol), 36.1 (C-Sterol), 35.7 (C-Sterol), 35.4 (C-Sterol), 35.3 (C-Sterol), 33.5 (C-Sterol), 31.9 (C-Sterol), 28.4 (C-Sterol), 28.1 (C-Sterol), 27.9 (C-Sterol), 27.1 (C-Sterol), 24.1 (C-Sterol), 23.8 (C-Sterol), 22.7 (C-Sterol), 22.4 (C-Sterol), 21.1 (C-Sterol), 18.6 (C-Sterol), 12.1 (C-Sterol), 12.0 ppm (C-Sterol).

$C_{32}H_{56}F_3NO_4$ (575.79).

HR-FAB-MS: ber.: 446.3998 [M-TFA+H]⁺
gef.: 446.4011 (in 3-NBA)

Glycin-stigmasteryl-ester-hydrotrifluoracetat (22b)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV3 werden 2.5 g *N*-Boc-glycin-stigmasterylester (22a) (4.4 mmol) umgesetzt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.47 g (4.2 mmol, 96 %)

R_f-Wert: 0.05 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))

Schmp.: 194°C

$[\alpha]_D^{20} = -42.3^\circ$ (c=1, CHCl₃:CH₃OH 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.34 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, C=CH), 5.10 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH=CH), 4.97 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 15.1 Hz, 1H, CH=CH), 4.68-4.65 (m, 1H, CH-O), 3.66 (s, 2H, α-CH, Gly), 2.30 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, Sterol), 2.05-1.95 (m, 2 H, Sterol), 1.88-1.85 (m, 2H, Sterol), 1.83-1.75 (m, 1H, Sterol), 1.73-1.62 (m, 9H, Sterol), 1.37-1.09 (m, 7H, Sterol), 1.05-0.95 (m, 8H, Sterol), 0.82 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, Sterol), 0.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, Sterol), 0.65 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 169.8 (C=O, Ester), 138.4 (C=CH), 129.5 (C=CH), 124.1 (CH=CH), 123.5 (CH=CH), 76.8 (CH-O), 57.0 (C-Sterol), 56.1 (C-Sterol), 51.4 (C-Sterol), 42.4 (α-C, Gly), 40.7 (C-Sterol), 40.2 (C-Sterol), 39.8 (C-Sterol), 37.0 (C-Sterol), 36.7 (C-Sterol), 32.6 (C-Sterol), 32.0 (C-Sterol), 29.1 (C-Sterol), 27.7 (C-Sterol), 25.6 (C-Sterol), 24.5 (C-Sterol), 21.4 (C-Sterol), 21.2 (C-Sterol), 19.4 (C-Sterol), 19.1 (C-Sterol), 12.4 (C-Sterol), 12.2 ppm (C-Sterol).

C₃₃H₅₂F₃NO₄ (583.77).

HR-FAB-MS: ber.: 470.3998 [M-TFA+H]⁺

gef.: 470.4026 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaprönsäure (27)**

Zu einer Lösung von 500 mg NBD-Chlorid (2.51 mmol) und 1.62 g DIEA (2.17 ml; 12.5 mmol; 5 eq.) in 15 ml trockenem Methanol werden unter Eiskühlung 329 mg ε-Aminocaprönsäure (2.51 mmol: 1 eq) zugesetzt. Man erwärmt auf RT und lässt bei dieser

Temperatur über Nacht rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen und mit 50 ml 1 N HCl und 50 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan als Eluens gereinigt.

Orange-brauner Feststoff.

Ausbeute: 428 mg (1.45 mmol, 58 %)
R_f-Wert: 0.62 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))
Schmp.: 148°C

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ = 8.51 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 6.34 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 3.58-3.53 (m, 2H, ε-CH₂), 2.74 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, α-CH₂), 1.84-1.76 (m, 2H, β-CH₂), 1.73-1.65 (m, 2H, δ-CH₂), 1.54-1.48 ppm (m, 2H, γ-CH₂).

C₁₂H₁₄N₄O₅ (294.26).

FAB-MS ber.: 295.1042 [M+H]⁺
gef.: 295.1026 (in 3-NBA)

***N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-(ε-*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)-L-Lysin (31)**

Fmoc-Lys(NBD)-OH

Zu einer Lösung von 500 mg *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyllysin **30** (1.04 mmol) und 310 mg NBD-Cl (1.55 mmol; 1.5 eq) in einer Mischung aus 15 ml H₂O und 10 ml Methanol werden 262 mg Natriumhydrogencarbonat (3.12 mmol; 3 eq) gegeben und für 2.5 h auf 55°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird durch Zusatz von 1N HCl der pH-Wert auf 2 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt nach flash-chromatographischer Reinigung an SiO₂ erhalten (Eluens: Dichlormethan/Methanol 10/1 (v/v)).

Orange grün metallisch glänzende Kristalle.

Ausbeute: 0.36 g (0.67 mmol, 65 %)
R_f-Wert: 0.23 (Dichlormethan/Methanol 10/1 (v/v))
Schmp.: 116°C
 $[\alpha]_D^{20} = +14.3^\circ$ (c=0.35, CHCl₃)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.42 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH NBD) 7.76 (d, ³J= 7.4 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.66-7.61 (m, 2H, CH Fmoc), 7.38-7.34 (m, 2H, CH Fmoc), 7.31-7.25 (m, 2H, CH Fmoc), 6.26 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH NBD), 4.40-4.27 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.25-4.21 (m, 1H, α-CH, Lys), 4.18 (t, ³J= 6.8 Hz, 1H, CH Fmoc), 3.51 (s(br), 2H, ε-CH Lys), 1.99-1.93 (m, 1H, β-CH', Lys), 1.84-1.77 (m, 3H, β-CH'', δ-CH Lys), 1.62-1.59 ppm (m, 2H, γ-CH Lys).

C₂₇H₂₅N₅O₇ (531.52).

HR-FAB-MS: ber.: 532.1832 [M+H]⁺
gef.: 532.1820 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholesteryl-ester (32)**

NBD-aca-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Cholesterol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 93 mg (60.5 μmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC mit dem Gradienten B.

Oranges Pulver nach Lyophilisation.

Ausbeute: 22 mg (18.2 μmol, 30 %)
HPLC: t_R = 9.23 min (Grad B)
 $[\alpha]_D^{20} = -18.3^\circ$ (c= 0.22, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.48 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH, NBD), 6.23 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH, NBD), 5.35-5.32 (m, 1H, C=CH), 4.62-4.56 (m, 1H, CH-O), 4.39-4.32 (m, 1H, α-CH, Ser), 4.27-4.19 (m, 4H, α-CH, Lys, Ala, Val), 4.01-3.96 (m, 1H, β-CH, Ser), 3.96-3.90 (m, 4H, α-CH₂, Gly), 3.86-3.83 (m, 1H, β-CH', Ser), 2.92-2.87 (m,

2H, CH₂-N, Aca), 2.37-2.31 (m, 4H, CH₂, Sterol, ε-CH₂, Lys), 2.07-1.98 (m, 4H, CH, Sterol, β-CH, Val), 1.88-1.79 (m, 5H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.63-1.53 (m, 9H, Sterol, CH₂, Lys), 1.50-1.34 (m, 9H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala, CH₂, Aca), 1.32-1.24 (m, 10H, CH₂ Sterol, CH₂ Aca), 1.15-1.06 (m, 6H, Sterol), 1.00 (s, 4H, CH₃ Sterol), 0.95-0.88 (m, 10H, CH₂, Sterol), 0.86-0.84 (m, 8H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.67 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₆₃H₁₀₀N₁₂O₁₃ (1233.54).

HR-FAB-MS ber.: 1233.7611 [M+H]⁺
gef.: 1233.7655 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholesteryl-ester (33)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Cholesterol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 102 mg (66.2 μmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 21 mg (17.9 μmol, 27 %)

$[\alpha]_D^{20} = -21.4^\circ$ (c= 0.13, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 6.74 (s, 2H, -CH=CH- MIC), 5.35-5.33 (m, 1H, C=CH), 4.63-4.57 (m, 1H, CH-O), 4.40-4.38 (m, 1H, α-CH, Ser), 4.29-4.21 (m, 4H, α-CH, Lys, Val, Ala), 4.02-3.87 (m, 1H, β-CH₂, Ser), 3.95-3.92 (m, 4H, α-CH₂, Gly), 3.88-3.85 (m, 1H, β-CH₂', Ser), 3.49 (t, ³J= 7.1 Hz, 2H, CH₂-N, MIC), 2.90 (t, ³J= 7.1 Hz, 2H, CH₂, MIC), 2.32-2.28 (m, 4H, CH₂, MIC, Sterol), 2.07-1.93 (m, 4H, β-CH, Val, CH₂ MIC), 1.89-1.78 (m, 5H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.67-1.56 (m, 9H, Sterol, CH₂, Lys), 1.51-1.48 (m, 4H, CH₂ Sterol), 1.44-1.38 (m, 9H, CH Sterol, β-CH₃ Ala, CH₂, Lys), 1.35-1.31 (m, 6H, CH₂ Sterol, CH₂ MIC), 1.15-1.09 (m, 6H, Sterol), 1.01 (s, 3H, CH₃ Sterol), 1.00-0.95 (m, 10H, CH₂, Sterol), 0.86-0.84 (m, 8H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.68 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

$C_{61}H_{99}N_9O_{12}$ (1150.49).

FAB-MS: ber.: 1150.74 $[M+Na]^+$
gef.: 1150.74 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-(ϵ -N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl))-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholesteryl-ester (34)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NBD)-Ser-Gly-Gly-O-Cholesterol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 93 mg (60.4 μ mol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Oranges Öl.

Ausbeute: 18 mg (13.8 μ mol, 23 %)

$[\alpha]_D^{20} = -20.1^\circ$ (c= 0.14, $CHCl_3$:MeOH 1:1)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$: CD_3OD 2:1(v/v)): $\delta = 8.47$ (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, CH, NBD), 6.71 (s, 2H, $-CH=CH-$ MIC), 6.19 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, CH, NBD), 5.33-5.31 (m, 1H, $C=CH$), 4.60-4.54 (m, 1H, CH-O), 4.37 (t, $^3J = 4.8$ Hz, 1H, α -CH, Ser), 4.31-4.27 (m, 1H, α -CH, Lys), 4.21-4.13 (m, 3H, α -CH, Ala, Val), 4.03-3.99 (m, 1H, β -CH, Ser), 3.96-3.89 (m, 4H, α - CH_2 , Gly), 3.85-3.82 (m, 1H, β -CH', Ser), 3.49-3.46 (m, 3H, CH_2 -N, MIC, ϵ - CH_2 , Lys), 2.30-2.26 (m, 3H, CH_2 , MIC, Sterol), 2.02-1.95 (m, 4H, CH, Sterol, β -CH, Val), 1.85-1.74 (m, 5H, CH_2 , Sterol, CH_2 , Lys), 1.63-1.53 (m, 9H, Sterol, CH_2 , Lys), 1.44-1.36 (m, 9H, CH_2 Sterol, β - CH_3 Ala, CH_2 , Lys, CH_2 , MIC), 1.32-1.24 (m, 9H, CH_2 Sterol, CH_2 MIC), 1.14-1.04 (m, 6H, Sterol), 0.99 (s, 4H, CH_3 Sterol), 0.97-0.88 (m, 10H, CH_2 , Sterol), 0.85-0.83 (m, 8H, Sterol, γ - CH_3 Val), 0.66 ppm (s, 3H, CH_3 , Sterol).

$C_{67}H_{100}N_{12}O_{15}$ (1313.58).

FAB-MS: ber.: 1335.73 $[M+Na]^+$
gef.: 1335.77 (in 3-NBA)

N*-Acetyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholesteryl-ester (35)*Ac-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Cholesterol**

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Synthese an 151 mg (52.5 µmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 38 mg (38 µmol; 72 %)

$[\alpha]_D^{20} = -18.1^\circ$ (c=0.14, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.35-5.33 (m, 1H, C=CH), 4.51-4.43 (m, 1H, CH-O), 4.30-4.23 (m, 4H, α-CH, Lys, Ala, Val), 4.12-4.08 (m, 1H, α-CH, Ser), 3.82-3.74 (m, 4H, α-CH₂, Gly), 3.63-3.53 (m, 2H, β-CH, Ser), 2.75-2.73 (m, 2H, ε-CH₂ Lys), 2.27-2.25 (m, 2H, CH₂, Sterol), 1.97-1.90 (m, 3H, Sterol, β-CH, Val), 1.86 (s, 3H, CH₃, Acetyl), 1.83-1.76 (m, 3H, CH, Sterol, CH₂, Lys), 1.69-1.64 (m, 1H, Sterol), 1.57-1.46 (m, 9H, Sterol, CH₂, Lys), 1.41-1.37 (m, 9H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala), 1.32-1.29 (m, 8H, CH₂ Sterol, CH₂ Lys), 1.23-1.16 (m, 6H, Sterol), 1.13-1.05 (m, 3H, CH₃ Sterol), 0.97 (s, 3H, CH₃ Sterol), 0.90-0.88 (m, 4H, CH₂, Sterol), 0.85-0.83 (m, 9H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.65 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₅₃H₉₀N₈O₁₀ (999.33).

FAB-MS: ber.: 999.6858 [M+H]⁺

gef.: 999.6837 (in 3-NBA)

(S-tert.-butyl)*-L-cysteyl-L-alanyl-L-alanyl-(ε-*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino))-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholesteryl-ester (36)*H₂N-Cys(*S*-tBu)-Ala-Ala-Lys(NBD)-Ser-Gly-Gly-O-Cholesterol**

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 200 mg (50.2 µmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC mit dem Gradienten A.

Oranges Pulver nach Lyophilisation.

Ausbeute: 45 mg (37.0 µmol, 74 %)

HPLC: t_R = 9.56 min (Grad A)

$$[\alpha]_D^{20} = -40.0^\circ \text{ (} c = 0.07, \text{CHCl}_3\text{:MeOH 1:1)}$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.51 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, CH, NBD), 6.29 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, CH, NBD), 5.34-5.32 (m, 1H, C=CH), 4.63-4.55 (m, 1H, CH-O), 4.40-4.26 (m, 4H, α -CH, Lys, Ala, Ser), 4.12-4.09 (m, 1H, α -CH, Cys), 3.99-3.73 (m, 6H, α -CH₂, Gly, β -CH, Ser), 3.56-3.50 (m, 2 H, ϵ -CH₂ Lys), 3.25-3.18 (m, 2H, β -CH Cys), 2.33-2.30 (m, 2H, CH₂, Sterol), 2.04-1.93 (m, 3H, CH, Sterol), 1.88-1.76 (m, 5H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.56-1.48 (m, 8H, Sterol, CH₂, Lys), 1.43-1.37 (m, 7H, CH₂ Sterol, β -CH₃ Ala, CH₂, Lys.), 1.35 (s, 9H, S-*t*Bu), 1.31-1.24 (m, 5H, CH₂ Sterol), 1.17-1.08 (m, 9H, Sterol), 1.01 (s, 4H, CH₃ Sterol), 0.93-0.90 (m, 4H, CH₂, Sterol), 0.87-0.85 (m, 6H, Sterol), 0.68 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₅₉H₉₃N₁₁O₁₂S₂ (1212.57).

FAB-MS: ber.: 1234.6344 [M+Na]⁺

gef.: 1234.6366 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholestanyl-ester (37)**

NBD-aca-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Cholestanol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 75 mg (59.5 μ mol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC mit dem Gradienten B.

Oranges Pulver nach Lyophilisation.

Ausbeute: 12 mg (10.1 μ mol, 17 %)

HPLC: t_R = 9.10 min (Grad. B)

$$[\alpha]_D^{20} = -25.2^\circ \text{ (} c = 0.28, \text{CHCl}_3\text{:MeOH 1:1)}$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.47 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, CH, NBD), 6.25 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, CH, NBD), 4.62-4.56 (m, 1H, CH-O), 4.39-4.32 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.27-4.19 (m, 4H, α -CH, Lys, Ala, Val), 4.01-3.96 (m, 1H, β -CH, Ser), 3.96-3.90 (m, 4H, α -CH₂, Gly), 3.86-3.83 (m, 1H, β -CH', Ser), 2.92-2.87 (m, 2H, CH₂-N, Aca), 2.37-2.30 (m, 4H, CH₂, Sterol, ϵ -CH₂, Lys), 2.10-1.98 (m, 4H, CH, Sterol, β -CH, Val), 1.85-1.79

(m, 5H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.63-1.53 (m, 9H, Sterol, CH₂, Lys), 1.50-1.34 (m, 9H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala, CH₂, Aca), 1.32-1.24 (m, 10H, CH₂ Sterol, CH₂ Aca), 1.15-1.06 (m, 6H, Sterol), 1.02 (s, 6H, CH₃ Sterol), 0.98-0.88 (m, 10H, CH₂, Sterol), 0.86-0.82 (m, 8H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.67 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₆₃H₁₀₂N₁₂O₁₃ (1235.56).

FAB-MS ber.: 1235.78 [M+H]⁺
gef.: 1235.28 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-(ε- N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl))-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-cholestanyl-ester (38)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NBD)-Ser-Gly-Gly-O-Cholestanol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 75 mg (59.5 μmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Oranges Öl.

Ausbeute: 16 mg (12,4 μmol, 21 %)

$[\alpha]_D^{20} = -21.7^\circ$ (c= 0.10, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.49 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH, NBD), 6.74 (s, 2H, -CH=CH- MIC), 6.24 (d, ³J= 8.8 Hz, 1H, CH, NBD), 4.72-4.66 (m, 1H, CH-O), 4.38 (t, ³J= 4.4 Hz, 1H, α-CH, Ser), 4.33-4.30 (m, 1H, α-CH, Lys), 4.23-4.18 (m, 3H, α-CH, Ala, Val), 3.99-3.97 (m, 1H, β-CH, Ser), 3.96-3.91 (m, 4H, α-CH₂, Gly), 3.86-3.84 (m, 1H, β-CH', Ser), 3.51-3.47 (m, 4H, CH₂-N, MIC, ε-CH₂ Lys), 2.28 (t, ³J= 7.4 Hz, 2H, CH₂, MIC), 2.02-1.97 (m, 5H, CH, Sterol, β-CH, Val), 1.85-1.72 (m, 6H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.65-1.51 (m, 13H, Sterol, CH₂, Lys), 1.44-1.37 (m, 10H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala, CH₂, Lys), 1.34-1.25 (m, 9H, CH₂ Sterol, CH₂ MIC), 1.13-1.05 (m, 8H, Sterol), 0.99-0.93 (m, 11H, CH₂, Sterol), 0.90-0.88 (m, 6H, Sterol), 0.86-0.84 (m, 8H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.81 (s, 3H, CH₃ Sterol), 0.64 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₆₇H₁₀₂N₁₂O₁₅ (1315.60).

HR-FAB-MS: ber.: 1337.7485 [M+Na]⁺
gef.: 1337.7432 (in 3-NBA)

***N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-stigmasteryl-ester (39)**

NBD-aca-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Stigmasterol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 73 mg (59.5 µmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC mit dem Gradienten B.

Oranges Pulver nach Lyophilisation.

Ausbeute: 13 mg (10.7 µmol, 18 %)

HPLC: 10.27 min (Grad. B)

$[\alpha]_D^{20} = -30.1^\circ$ (c= 0.17, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.49 (d, ³J= 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 6.24 (d, ³J= 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 5.36-5.34 (m, 1H, C=CH), 5.14 (dd, J= 8.7Hz, J= 15.2 Hz, 1H, CH=CH), 5.01 (dd, J= 8.7Hz, J= 15.2 Hz, 1H, CH=CH), 4.62-4.57 (m, 1H, CH-O), 4.29-4.19 (m, 4H, α-CH, Lys, Ala, Val), 4.04-3.85 (m, 6H, β-CH, Ser, α-CH₂, Gly), 2.92-2.87 (m, 2H, CH₂-N, Aca), 2.36-2.31 (m, 4H, CH₂, Sterol, ε-CH₂, Lys), 2.06-1.93 (m, 3H, CH, Sterol, β-CH, Val), 1.90-1.79 (m, 7H, CH₂, Sterol, CH₂, Lys), 1.69-1.60 (m, 7H, Sterol, CH₂, Lys), 1.54-1.46 (m, 8H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala), 1.49-1.36 (m, 8H, CH₂ Sterol, CH₂ Aca), 1.30-1.22 (m, 6H, Sterol), 1.19-1.10 (m, 6H, Sterol), 1.01 (s, 6H, Sterol), 0.97-0.92 (m, 7H, CH₂, Sterol), 0.88-0.76 (m, 10H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.69 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₆₅H₁₀₂N₁₂O₁₃ (1259.59).

HR-FAB-MS: ber.: 1259.7768 [M+H]⁺
gef.: 1259.7708 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-stigmasteryl-ester (40)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Stigmasterol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 73 mg (59.5 µmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 15 mg (12.5 µmol, 21 %)

$[\alpha]_D^{20} = -23.2^\circ$ (c= 0.11, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): $\delta = 6.74$ (s, 2H, CH=CH), 5.36-5.35 (m, 1H, C=CH), 5.14 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 15.4$ Hz, 1H, CH=CH), 5.00 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 15.4$ Hz, 1H, CH=CH), 4.62-4.56 (m, 1H, CH-O), 4.51-4.48 (m, 2H, α -CH), 4.39-4.21 (m, 3H, α -CH), 4.04-3.81 (m, 6H, β -CH, Ser, α -CH₂, Gly), 3.52-3.48 (m, 2H, CH₂-N, MIC), 2.32-2.27 (m, 4H, CH₂, Sterol, ϵ -CH₂, Lys), 2.07-1.98 (m, 4H, CH, Sterol, β -CH, Val), 1.95-1.83 (m, 2H, CH₂, Lys), 1.71-1.49 (m, 14H, Sterol, CH₂, Lys), 1.44-1.38 (m, 7H, Sterol, β -CH₃ Ala), 1.44-1.37 (m, 6H, CH₂ Sterol, CH₂ Aca), 1.33-1.24 (m, 4H, Sterol), 1.19-1.09 (m, 6H, Sterol), 1.06-0.95 (m, 13H, CH₂, Sterol), 0.85-0.78 (m, 10H, Sterol, γ -CH₃ Val), 0.71 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₆₃H₁₀₁N₉O₁₂ (1176.53).

HR-FAB-MS: ber.: 1198.7467 [M+Na]⁺

gef.: 1198.7555 (in 3-NBA)

N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-androstenyl-ester (41)

NBD-aca-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Androstenol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 91 mg (63.8 µmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative HPLC mit dem Gradienten B.

Oranges Pulver nach Lyophilisation.

Ausbeute: 41 mg (37.0 μ mol, 58 %)

HPLC: t_R = 8.94 min (Grad. B)

$[\alpha]_D^{20}$ = -84.6° (c = 0.24, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 2:1(v/v)): δ = 8.49 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 6.24 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, CH, NBD), 5.35 (d, ³J = 4.1 Hz, 1H, C=CH), 4.62-4.58 (m, 1H, CH-O), 4.58-4.55 (m, 1H, α -CH, Lys), 4.39 (t, ³J = 5.1 Hz, 1H, α -CH, Ser), 4.30-4.26 (m, 1H, α -CH, Val), 4.24-4.19 (m, 2H, α -CH, Ala), 4.00-3.97 (m, 1H, β -CH, Ser), 3.96-3.92 (m, 4H, α -CH₂, Gly), 3.85-3.81 (m, 1H, β -CH', Ser), 3.50 (s, br, NH₂, Lys), 2.91 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-N, Aca), 2.35-2.31 (m, 4H, CH₂, Sterol, CH₂, Aca), 2.07-1.98 (m, 2H, CH, Sterol, β -CH, Val), 1.91-1.83 (m, 5H, CH₂, Sterol, CH₂, Aca), 1.71-1.56 (m, 11H, Sterol, CH₂, Lys), 1.52-1.37 (m, 15H, CH₂ Sterol, β -CH₃ Ala, CH₂, Lys, CH₂, Aca), 1.31-1.25 (m, 2H, Aca), 1.19-1.08 (m, 4H, Sterol), 1.02 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.99-0.86 (m, 8H, Sterol, γ -CH₃ Val), 0.71 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₅₅H₈₄N₁₂O₁₃ (1121.33).

FAB-MS: ber.: 1143.62 [M+Na]⁺

gef.: 1143.53 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-androsteryl-ester (42)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Ser-Gly-Gly-O-Androstenol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 90 mg (62.9 μ mol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 29 mg (28.3 μ mol, 45 %)

$[\alpha]_D^{20}$ = -71.1° (c = 0.19, CHCl₃:MeOH 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 2:1(v/v)): δ = 6.71 (s, 2H, $-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}-$ MIC), 5.33-5.32 (m, 1H, $\text{C}=\underline{\text{CH}}$), 4.60-4.55 (m, 1H, CH-O), 4.38-4.35 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.27-4.17 (m, 4H, α -CH, Lys, Val, Ala), 4.00-3.89 (m, 6H, β - CH_2 , Ser, α - CH_2 , Gly), 3.47 (t, $^3J=7.1$ Hz, 2H, CH_2 -N, MIC), 2.88 (t, $^3J=7.1$ Hz, 2H, CH_2 , MIC), 2.28-2.23 (m, 2H, CH_2 , Sterol), 2.05-1.94 (m, 3H, β -CH, Val, CH_2 MIC), 1.88-1.70 (m, 4H, CH_2 , Sterol, CH_2 , Lys), 1.65-1.50 (m, 12H, Sterol, CH_2 , Lys), 1.42-1.36 (m, 12H, CH_2 Sterol, β - CH_3 Ala, CH_2 , Lys, CH_2 , MIC), 1.33-1.23 (m, 5H, CH_2 Sterol, CH_2 MIC), 1.19-1.10 (m, 4H, Sterol), 0.99 (s, 3H, CH_3 , Sterol), 0.95-0.90 (m, 8H, Sterol, γ - CH_3 Val), 0.69 ppm (s, 3H, CH_3 , Sterol).

$\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{N}_9\text{O}_{12}$ (1038.28).

FAB-MS: ber.: 1038.62 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
gef.: 1038.65 (in 3-NBA)

Maleinimidocaproyl-L-valyl-L-alanyl-L-alanyl-(ϵ - N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl))-L-lysyl-L-seryl-glycyl-glycin-androstenyl-ester (43)

MIC-Val-Ala-Ala-Lys(NBD)-Ser-Gly-Gly-O-Androstenol

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 1 wird die Harzbeladung und Synthese an 90 mg (63.5 μmol) Festphase durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v) als Eluens.

Oranges Öl.

Ausbeute: 21 mg (17.0 μmol , 27 %)

$[\alpha]_D^{20} = -89.3^\circ$ (c= 0.21, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 2:1(v/v)): δ = 8.45 (d, $^3J=8.7$ Hz, 1H, CH, NBD), 6.70 (s, 2H, $-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}-$ MIC), 6.18 (d, $^3J=8.7$ Hz, 1H, CH, NBD), 5.31-5.29 (m, 1H, $\text{C}=\underline{\text{CH}}$), 4.61-4.52 (m, 1H, CH-O), 4.37-4.34 (m, 1H, α -CH, Ser), 4.27-4.24 (m, 2H, α -CH, Lys, Val), 4.19-4.14 (m, 2H, α -CH, Ala), 4.01-3.96 (m, 1H, β -CH, Ser), 3.94-3.91 (m, 4H, α - CH_2 , Gly), 3.83-3.81 (m, 1H, β - CH' , Ser), 3.48-3.44 (m, 3H, CH_2 -N, MIC, NH, NBD), 2.29-2.23 (m, 4H, CH_2 , Sterol, CH_2 , MIC), 2.01-1.93 (m, 2H, CH, Sterol, β -CH, Val), 1.85-1.68 (m, 5H, CH_2 , Sterol, CH_2 , Lys), 1.65-1.48 (m, 10H, Sterol, CH_2 , Lys), 1.45-1.34

(m, 12H, CH₂ Sterol, β-CH₃ Ala, CH₂, Lys, CH₂, MIC.), 1.32-1.22 (m, 6H, CH₂ Sterol, CH₂ MIC), 1.19-1.08 (m, 4H, Sterol), 0.99 (s, 3H, CH₃, Sterol), 0.96-0.83 (m, 8H, Sterol, γ-CH₃ Val), 0.70 ppm (s, 3H, CH₃, Sterol).

C₅₉H₈₄N₁₂O₁₅ (1201.37).

FAB-MS: ber.: 1223.61 [M+Na]⁺
gef.: 1223.65 (in 3-NBA)

6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4

Allgemeine Vorschrift zur Kupplung der maleinimidcaproylmodifizierten Lipopetide an verkürzte N-RasG12V(1-181)-Proteine

Durch Umpuffern über eine HiTrap-Säule (Sephadex G-25 Superfine, 5 ml Säulenvolumen) in Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂) werden 20 mg gereinigtes und konzentriertes (ca. 20 g/l) N-RasG12V(1-181) von überschüssigem Salz und 1,4-Dithioerythrol befreit. Der Proteingehalt der resultierenden Lösung wird UV/VIS-spektroskopisch nach der BRADFORD-Methode bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

In 40 µl DMSO werden 1.3 Äquivalente des Peptids gelöst und mit 1 ml einer wässrigen Lösung von 11% Triton[®] X-114 versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Diese Lösung wird auf 0°C gekühlt und 1 Äquivalent des umgepufferten Proteins zugesetzt, mit Argon überschichtet, um eine Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern und für 16 h bei 4°C unter stetigem Mischen im Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wird der Kupplungsansatz für 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert, um eventuell ausgefallenes Protein zu sedimentieren, und wie folgt einer Triton[®] X-114 Extraktion unterworfen, um die gekuppelten, hydrophob modifizierten Proteine von den ungekuppelten Proteinen zu separieren:

Der lösliche Überstand der Zentrifugation wird mit 3 ml DEAE-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE) vermischt und 5 min bei 37°C inkubiert. Die resultierende milchige Suspension wird 5 min bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert, wobei eine Phasentrennung eintritt. Die obere, wässrige Phase wird abgetrennt und wiederum mit 1 ml 11% Triton[®] X-114 versetzt; die nach der Extraktion verbleibende untere Triton-Phase wird

auf Eis gelagert. Diese Extraktion wird noch weitere zweimal durchgeführt. Anschließend werden die Detergensphasen vereinigt und dreimal mit je 7 ml DEAE-Puffer wie oben beschrieben gewaschen. Das erhaltene Triton-Extrakt wird mit dem 9-fachen Volumen an DEAE-Puffer verdünnt und das Triton[®] X-114 mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose wie folgt entfernt: Nach der Probenaufgabe auf die mit DEAE-Puffer equilibrierte Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min wird 50 min mit gleicher Flussrate mit DEAE-Puffer gespült. Danach wird das Proteinkonjugat durch Anlegen eines NaCl-Gradienten (1 M NaCl innerhalb von 25 min) eluiert und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Auf Grundlage des erhaltenen Chromatogramms werden die proteinhaltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert und vereinigt. Mit Hilfe einer Ultrazentrifugationseinheit (10 kDa-Ausschlussmembran) wird die Lösung aufkonzentriert und durch anschließende Zugabe von Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂) und erneute Zentrifugation entsalzt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt im Fall der NBD-markierten Konstrukte über die Absorption des Fluorophors. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgt bei -80 °C.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.2

6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.1

Verwendete Stammlösungen:

20 mM 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC) in Methanol

100 µM NBD-Aca-markiertes Peptid in Methanol/Chloroform 1:1

200 µM *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin in Methanol

Vesikelpuffer: 10 mM HEPES, 8 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH = 7.0

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der mit Fluoreszenzquencher und Lipopeptid beladenen Vesikel:

Man mischt 15 µl der Lipopeptid-Stammlösung, 15 µl der Fluoreszenzquencher-Stammlösung sowie 7.5 µl der POPC-Stammlösung und entfernt im schwachen Argonstrom unter ständiger Rotation das Lösungsmittel, dass in der unteren Hälfte des Eppendorf Gefäßes ein Film ausgebildet wird. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wird noch für 6 h im Hochvakuum getrocknet. Im Anschluß daran hydratisiert man den Lipidfilm mit 150 µl

Vesikelpuffer, friert für 2 Minuten auf -196°C ein und erwärmt wieder auf 60°C für 2 Minuten. Dieser Frier-Auftau Zyklus wird 50mal wiederholt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der mit Lipopeptid beladenen Vesikel:

Die Darstellung nur mit Lipopeptid beladenen Vesikel erfolgt analog obiger Vorschrift, jedoch ohne Zusatz des Fluoreszenzquenchers.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Akzeptorvesikel:

Zur Generierung der Akzeptorvesikel werden $30\ \mu\text{l}$ der POPC-Stammlösung verdampft, mit $150\ \mu\text{l}$ Vesikelpuffer hydratisiert und anschließend 50 Frier-Auftau-Schritten unterzogen.

Untersuchungen zum Flip-Flop-Austausch

In $1500\ \mu\text{l}$ Vesikelpuffer werden bei 20°C $7.63\ \mu\text{l}$ der Vesikelmischung (beladen mit fluoreszenzmarkiertem Hedgehog-Peptid **32** oder **41**) gegeben und die Fluoreszenzintensität bei $535\ \text{nm}$ detektiert (die Anregung erfolgte bei $468\ \text{nm}$). Nach 3 Stunden werden $15\ \mu\text{l}$ einer $1\ \text{M}$ Lösung von Natriumdithionit in Vesikelpuffer zugesetzt und die Fluoreszenzänderung für weitere 6 Stunden beobachtet.

Untersuchungen zum Intervesikeltransfer

In $1500\ \mu\text{l}$ Vesikelpuffer werden bei 20°C $7.63\ \mu\text{l}$ der Vesikelmischung (beladen mit fluoreszenzmarkiertem Hedgehog-Peptid **32** oder **41** sowie dem Fluoreszenzquencher *N*-(Lissamin-rhodamin-sulfonyl)phosphatidylethanolamin) gegeben und eine Basislinie der Fluoreszenz bei $535\ \text{nm}$ aufgenommen. Dann werden $22.9\ \mu\text{l}$ der Akzeptorvesikelmischung (zwölfacher Überschuss) zugesetzt und die Änderung der Fluoreszenz für 10 h beobachtet.

Experimente mit den Lipoproteinen

Die Untersuchungen zur Membranassoziation der Lipopeptid-Protein-Konstrukte **46** und **47** werden unter analogen Bedingungen durchgeführt, wobei nur mit Fluoreszenzquencher beladene Vesikel mit dem jeweiligen Konstrukt für 2 h vorinkubiert werden und dann in $1500\ \mu\text{l}$ Vesikelpuffer bei 20°C vermessen werden. Die hierbei verwendeten Konzentrationen und Verhältnisse an Fluorophor, Fluoreszenzquencher sowie Akzeptorvesikeln entsprechen den oben angegebenen.

Eine ausführliche Darstellung der experimentellen Daten findet sich an anderer Stelle.^[151]

6.4 Versuche zu Kapitel 4.3

6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1

***N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*S*-Monomethoxytrityl-*L*-cystein (54)**

Zu einer Lösung von 1.75 g *L*-Cysteinhydrochlorid (10 mmol) in 10 ml absolutem DMF suspendiert werden 3.08 g Monomethoxytritylchlorid (10 mmol; 1 eq.) zugesetzt und für 3 Stunden bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wird mit 4N NaOH-Lösung der pH-Wert auf 5 eingestellt, der ausgefallene weiße Feststoff abfiltriert und intensiv mit Wasser und Diethylether gewaschen. Nach Trocknung im Feinvakuum erhält man das Produkt als weißes amorphes Pulver (3.93 g = 9.9 mmol). Dieses wird in 20 ml Dioxan:10%ige wässrige NaHCO₃-Lösung (1:1 (v/v)) gelöst und langsam eine Lösung von 3.34 g Fmoc-O-Su (9.9 mmol; 1 eq) in 10 ml Dioxan zugesetzt. Man rührt für 24 h bei Raumtemperatur und konzentriert anschließend die Reaktionsmischung im Vakuum auf. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und durch Zugabe von Cyclohexan wird das Produkt ausgefällt.

Ausbeute: 5.25 g (8.5 mmol, 85 %)

R_f-Wert: 0.45 (Dichlormethan:Methanol 10:1 (v/v))

$[\alpha]_D^{20} = +18.1^\circ$ (c= 1, DMF)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (d, ³J= 7.2 Hz, 2H, CH Fmoc), 7.65-7.63 (m, 2H, CH Fmoc), 7.43-7.37 (m, 7H, CH Fmoc, CH Mmt), 7.33-7.28 (m, 6H, CH Fmoc, CH Mmt), 7.24-7.18 (m, 3H, CH Mmt), 6.79 (d, ³J= 8.8 Hz, 2H, H-4, Mmt), 4.42-4.31 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.26-4.21 (m, 1H, CH Fmoc, α-CH Cys), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.69 ppm (d, ³J= 5.3 Hz, 2H, β-CH Cys).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 157.8, 155.9, 144.5, 143.6, 143.5, 141.0, 136.3, 130.5, 129.1, 127.7, 127.5, 126.8, 126.5, 124.9, 119.7, 113.0, 66.9, 66.1, 55.1, 53.8, 47.0, 34.4 (Fmoc), 26.9 ppm (β-C, Cys).

C₃₈H₃₃NO₅S (615.74).

HR-FAB-MS: ber.: 638.1977 [M+Na]⁺

gef.: 638.1964 (in 3-NBA)

Unterschiedlich palmitoylierte Influenza-Peptide

Die Synthese der Heptapeptide erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV1 (Kapitel 6.2) am Wang-Linker, wobei für die Ankupplung der letzten beiden Aminosäuren als Aktivierungsreagenz HATU / HOAt anstelle von HBTU / HOBt verwendet wird.

Entschüttung der Mmt-geschützten polymergebundenen Cysteine

Das Harz wird in Dichlormethan vorgequollen, eine Lösung von 1% Trifluoressigsäure und 1% Triethylsilan in Dichlormethan zugesetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit Dichlormethan gewaschen und wiederum mit 1% TFA, 1% TES in Dichlormethan behandelt. Insgesamt wird der Abspaltungsprozess sechsmal für jeweils 10 Minuten durchgeführt.

Entschüttung des tert.-Thiobutyl-geschützten polymergebundenen Cysteins

Das in DMF vorgequollene Harz wird bei Raumtemperatur für 16 h mit einer Lösung von 20 Äquivalenten Dithiothreitol und 2.5 Vol.-% DIEA in DMF geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit DMF, Dichlormethan und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Palmitoylierung am polymeren Träger

Pro freigesetztem polymergebundenem Thiol wird das Harz mit 30 Äquivalenten Palmitoylchlorid, 10 Äquivalenten Triethylamin, 5 Äquivalenten β -Mercaptoethanol sowie einer katalytischen Menge DMAP in einer Mischung aus Chloroform:DMF 1:1 (v/v) umgesetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur für 16 h durchgeführt. Anschließend wird das Harz mit DMF, Chloroform, Methanol und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Abspaltung vom polymeren Träger

Die im Vakuum getrockneten Harze werden bei Raumtemperatur für 4 h mit 95 % Trifluoressigsäure und 5 % Triethylsilan als Scavenger umgesetzt. Diese lange Reaktionszeit ist zur Entfernung der Pmc-Schutzgruppe erforderlich. Anschließend wird durch mehrmalige Coevaporation mit Toluol die Trifluoressigsäure vollständig entfernt und der Rückstand durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20 gereinigt.

Auf diese Weise werden folgende Peptide erhalten.

***N*-Acetyl-L-methionyl-L-arginyl-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-cysteyl-L-isoleucin
(50)**

Ac-Met-Arg-Cys-Thr-Ile-Cys-Ile-OH

Farbloses Öl.

Ausbeute: 26 mg (22 %)

$[\alpha]_D^{20} = -14.1^\circ$ ($c = 0.20$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 4.58\text{-}4.47$ (m, 3H, 3 $\alpha\text{-CH}$), $4.29\text{-}4.19$ (m, 3H, $\alpha\text{-CH}$), $4.13\text{-}3.97$ (m, 2H, $\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}$, Thr), $3.70\text{-}3.63$ (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$, Arg), $3.10\text{-}3.02$ (m, 4H, 2 $\beta\text{-CH}_2$, Cys), $2.94\text{-}2.64$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Met), $2.41\text{-}2.28$ (m, 2H, $\beta\text{-CH}$, Met), 1.99 (s, 3H, SCH_3 , Met), $1.97\text{-}1.82$ (m, 4H, 2 $\beta\text{-CH}_2$, Ile, Arg), 1.80 (s, 3H, CH_3 Acetyl), $1.77\text{-}1.57$ (m, 4 H, $\gamma\text{-CH}_2$, Arg), $1.55\text{-}1.47$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Ile), $1.23\text{-}1.18$ (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_3$, Thr), $1.16\text{-}1.08$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$, Ile), $0.96\text{-}0.88$ ppm (m, 12H, CH_3 , Ile).

$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{S}_3$ (881.14).

HR-FAB-MS: ber.: 881.4047 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 881.4076 (in 3-NBA)

***N*-Acetyl-L-methionyl-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-cysteyl-L-isoleucin (51)**

Ac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys-Ile-OH

Farbloses Öl.

Ausbeute: 14.1 mg (9 %)

$[\alpha]_D^{20} = -10.4^\circ$ ($c = 0.17$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{MeOD-d}_4$ 5:1 (v/v)): $\delta =$ Unabhängig vom Verdünnungsgrad und Lösungsmittel zeigt dieses Peptid ein starkes Aggregationsverhalten, wodurch extrem breite Signale ohne erkennbare Multiplizitäten auftreten daher sind im Folgenden

nur einige signifikante Signale aufgeführt: $\delta = 1.99$ (s, SCH₃ Met), 1.23 (s, Pal), 0.97-0.85 ppm (m, Pal, Ile).

C₅₁H₉₄N₁₀O₁₁S₃ (1119.55).

FAB-MS: ber.: 1119.63 [M+H]⁺
gef.: 1119.57 (in 3-NBA)

***N*-Acetyl-L-methionyl-L-arginyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-threonyl-L-isoleucyl-(*S*-palmitoyl)-L-cysteyl-L-isoleucin (52)**

Ac-Met-Arg-Cys(Pal)-Thr-Ile-Cys(Pal)-Ile-OH

Farbloses Öl.

Ausbeute: 24 mg (13 %)

$[\alpha]_D^{20} = -25.7^\circ$ (c= 0.31, CHCl₃:MeOH 1:1)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃: MeOD-d₄ 5:1 (v/v)): Auch dieses Peptid zeigt unabhängig von der Verdünnung bedingt durch Aggregation extrem breite Signale. Daher sind im Folgenden nur einige Signale angegeben: $\delta = 2.02$ (s, SCH₃ Met), 1.25 (s, Pal), 0.94-0.85 ppm (m, Pal, Ile).

C₆₇H₁₂₄N₁₀O₁₂S₃ (1357.96).

FAB-MS: ber.: 1357.86 [M+H]⁺
gef.: 1357.26 (in 3-NBA)

6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2

Biokalorimetrische Untersuchungen

Zur Generierung der Vesikel werden entsprechende Mengen der organischen Lipid-Stammlösungen in einem Reagenzglas gemischt, dass eine Gesamtlipidmenge von 5 mg resultiert. Zu dieser Lösung wird das entsprechende Peptid im Massenverhältnis 1: 20 zugesetzt und unter Rotation im leichten Argonstrom verdampft, so dass im unteren Drittel des Reagenzglases ein Lipidfilm entsteht. Dieser wird zur Entfernung von

Lösungsmittelresten für 2-6 h im Feinvakuum getrocknet und danach mit 2 ml Vesikelpuffer (20 mM PIPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.3 mM NaN₃) hydratisiert. Die so erhaltene Suspension wird 10 min im leichten Vakuum entgast und anschließend in den DSC-Messungen eingesetzt. Diese bestehen aus je zwei Aufheiz- und Abkühlkäufen zwischen 10°C und 110°C mit einer Heiz-/Kühlrate von 0.75°C/ min. Auf diese Weise werden die vier Lipopeptide **35**, **50**, **51** und **52** mit jeweils drei verschiedenen Lipidzusammensetzungen DPPC, DPPC mit 25mol-Prozent Cholesterol und DPPC mit 40mol-Prozent Cholesterol vermessen.

6.4.3 Versuche zu Kapitel 4.3.3

3,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (**60**)

Man gibt unter Eiskühlung zu 1.75 g eiskaltem DMF (1.85 ml; 0.024 mol; 1.1 eq) 3.68 g Phosphoroxychlorid (2.20 ml; 0.024 mol; 1.1 eq) und rührt bei 0°C für fünf Minuten. Anschließend verdünnt man diese Lösung mit 12 ml 1,2-Dichlorethan und tropft unter Eiskühlung innerhalb von 30 Minuten eine Lösung von 2 g 2,4-Dimethylpyrrol (2.16 ml; 0.022 mol, 1 eq) in 15 ml 1,2-Dichlorethan zu. Danach refluxiert man für 15 Minuten und lässt auf RT abkühlen. Dann setzt man eine Lösung von 11.4 g (0.139 mol; 6.3 eq) Natriumacetat in 40 ml H₂O zu und refluxiert erneut für 15 Minuten. Nach Abkühlen auf RT trennt man die organische Phase ab und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit 50 ml Ether. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 50 ml gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das Produkt als grauschwarzen Feststoff.

Ausbeute: 2.65 g (0.021 mol, 98 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.45 (s, 1H, CHO), 5.85 (s, 1H, CH), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.31 ppm (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 175.6 (CHO), 138.7 (C₅-Pyrrol), 134.8 (C₃-Pyrrol), 128.5 (C₂-Pyrrol), 111.9 (C₄-Pyrrol), 13.2 (C₅-CH₃), 10.7 ppm (C₃-CH₃).

C₇H₉NO (123.15).

GC-MS gef.: 123 [3.47 min]

3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)-acrylsäure-methylester (57)

Unter Argonatmosphäre werden 6.69 g (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran **56** (0.020 mol; 2 eq) in 30 ml absolutem Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur eine Lösung von 0.95 g 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd **55** (0.010 mol; 1 eq) in 25 ml absolutem Dichlormethan zugegeben und über Nacht gerührt. Der Ansatz wird zwischen je 50 ml Wasser und Ether verteilt und die organische Phase dreimal mit 50 ml Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird 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 SiO₂ gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v)).

Farbloses Öl.

Ausbeute: 1.28 g (0.085 mol, 85%)

R_f-Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.55 (d, ³J_{trans} = 16 Hz, 1H, CH=CHCO₂Me), 6.91 (m, 1H, C₅-Pyrrol-H), 6.56 (m, 1H, C₄-Pyrrol-H), 6.28 (m, 1H, C₃-Pyrrol-H), 5.99 (d, ³J_{trans} = 16 Hz, 1H, CH=CHCO₂Me), 3.77 ppm (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 167.8 (C=O, Ester), 134.2 (CH=CHCO₂Me), 128.2 (CH=CHCO₂Me), 122.3 (C_{Pyrrol}-CH=CH-), 114.4 (C₅-Pyrrol), 110.9 (C₄-Pyrrol), 110.7 ppm (C₃-Pyrrol).

C₈H₉NO₂ (151.16).

HR-FAB-MS: ber.: 152.0712 [M+H]⁺

gef.: 152.0683 (in 3-NBA)

3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)-propionsäure-methylester (58)

Man löst 1.0 g 3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)-acrylsäure-methylester **57** (6.6 mmol) in 50 ml Methanol und fügt 0.5 ml Eisessig hinzu. Anschließend werden katalytische Mengen Palladium auf Aktivkohle (10%) zugesetzt und die resultierende Suspension evakuiert bis das Lösungsmittel zu Sieden beginnt. Das Evakuieren wird fünfmal wiederholt, wobei zwischenzeitlich nicht belüftet wird. Im Anschluss wird mit Wasserstoff belüftet und die Lösung für 2 h bei

Raumtemperatur kräftig gerührt. Danach wird der Katalysator über Celite abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Bräunliches Öl.

Ausbeute: 1.01 g (6.6 mmol, 99%)

R_f-Wert: 0.51 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.67 (m, 1H, C₅-Pyrrol-H), 6.11 (m, 1H, C₄-Pyrrol-H), 5.93 (m, 1H, C₃-Pyrrol-H), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.93 (t, ³J=6.7 Hz, 2H, β-CH), 2.65 ppm (t, ³J=6.7 Hz, 2H, β-CH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 174.2 (C=O, Ester), 130.7 (C₂-Pyrrol), 116.6 (C₅-Pyrrol), 107.9 (C₄-Pyrrol), 105.3 (C₃-Pyrrol), 51.8 (OCH₃), 34.4 (α-CH₂), 22.6 ppm (β-CH₂).

C₈H₁₁NO₂ (153.18).

3-[5-(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethyl-en)-5H-pyrrol-2-yl]-propionsäure-methylester-hydrobromid (61)

Zu einer Lösung von 0.5 g 3-(1H-Pyrrol-2-yl)-propionsäure-methylester **58** (3.3 mmol) und 0.41 g 3,5 Dimethyl-1H-pyrrol-2-carbaldehyd **60** (3.3 mmol; 1 eq) in 30 ml Ethanol werden unter Eiskühlung und kräftigem Rühren 48 %ige HBr-Lösung (5.3 mmol; 1.6 eq) zugesetzt. Nach 5 min wird der leuchtend rote Feststoff abfiltriert und im Feinvakuum getrocknet. Die Mutterlauge wird zur Nachfällung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und der ggf. angefallene Niederschlag ebenfalls abfiltriert und getrocknet. Roter Feststoff.

Ausbeute: 0.72 g (2.1 mmol, 65 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 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, OCH₃), 3.40 (t, ³J=7.2 Hz, 2H, β-CH), 2.92 (t, ³J=7.2 Hz, 2H, α-CH), 2.73 (s, 1H, CH₃), 2.36 ppm (s, 1H, CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): 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 (OCH₃), 33.2 (α-CH₂), 23.8 (β-CH₂), 14.9 (CH₃), 12.3 ppm (CH₃).

C₁₅H₁₉BrN₂O₂ (339.32).

HR-FAB-MS: ber.: 258.1368 [M-HBr]⁺
gef.: 258.1375 (in 3-NBA)

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäuremethylester (62)

Unter Argonatmosphäre werden 100 mg 3-[5-(3,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-2-ylmethyl-en)-5*H*-pyrrol-2-yl]-propionsäure-methylester-hydrobromid **61** (0.3 mmol) in 20 ml abs.Toluol suspendiert und bei Raumtemperatur zunächst 137 mg DBU (0.9 mmol; 3 eq) und dann 213 mg Bortrifluoridetherat (1.5 mmol; 5 eq) zugesetzt. Dann wird der Ansatz für 15 min im vorgewärmten Ölbad auf 90°C erhitzt. Nach Entfernen des Ölbad wird vorsichtig mit 20 ml Wasser hydrolysiert. Dann wird das Reaktionsgemisch mit 100 ml Chloroform versetzt und die organische Phase fünfmal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Nach dreimaliger Rückextraktion der wässrigen Phasen mit 100 ml Chloroform werden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird flash-chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1(v/v)).

Roter Feststoff.

Ausbeute: 59 mg (0.2 mmol, 61 %)

R_f-Wert 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 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, OCH₃), 3.30 (t, ³J=7.4 Hz, 2H, β-CH), 2.77 (t, ³J=7.4 Hz, 2H, β-CH), 2.57 (s, 1H, CH₃), 2.25 ppm (s, 1H, CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): 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).

C₁₅H₁₇BF₂N₂O₂ (306.12).

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäure (63)**[BODIPY-FL™]**

Zu einer Lösung von 0.24 g 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäuremethylester **62** (0.8 mmol) in 200 ml Methanol werden 0.22 g Kaliumcarbonat (1.6 mmol; 2eq) in 30 ml Wasser gegeben. Nach etwa 3 Tagen (dünnschichtchromatographische 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. Danach wird die wässrige Phase unter Eiskühlung durch tropfenweise Zugabe von 0.1 N HCl auf einen pH-Wert von 3-3.5 eingestellt und fünfmal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die die Säure enthaltende organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird flash-chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan/Methanol = 20:1(v/v)).

Grünlich metallisch schimmernde Kristalle.

Ausbeute: 0.18 g (0.64 mmol; 80 %)

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 (C=O, Säure), 160.0 (C-Pyrrol), 157.1 (C-Pyrrol), 144.5 (Methylen), 135.3 (C-Pyrrol), 135.3 (C-Pyrrol), 128.3 (C-Pyrrol), 124.6 (C-Pyrrol), 120.1 (C-Pyrrol), 116.3 (C-Pyrrol), 33.0 (α-CH₂), 24.0 (β-CH₂), 13.9 (CH₃), 10.2 ppm (CH₃).

C₁₄H₁₅BF₂N₂O₂ (292.09).

HR-EI-MS: ber.: 292.0890 [M]⁺

gef.: 292.1171

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionsäurecholesterylester (64)

Unter Argonatmosphäre werden 10 mg Cholesterol (25.9 μmol), 7.55 mg BODIPY-FL (**63**) (25.9 μmol; 1 eq) und 2.5 mg 4-Dimethylaminopyridin (20.7 μmol; 0.8 eq) in 5 ml absolutem

Dichlormethan gelöst und anschließend unter Eiskühlung 3.6 mg DIC (28.5 μmol ; 1.1 eq) zugesetzt. Die resultierende Lösung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Nach Verdünnen mit 10 ml Dichlormethan wird die organische Phase je dreimal mit je 10 ml 1N HCl, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an SiO_2 (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1(v/v)).

Oranges Öl.

Ausbeute: 8.9 mg (13.5 μmol , 52 %)

R_f -Wert: 0.62 (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1(v/v))

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.07 (s, 1H, $\text{C}_{3'}\text{-Pyrrol-H}$), 6.88-6.87 (m, 1H, $\text{C}_{\text{Pyrrol-H}}$), 6.28-6.27 (m, 1H, $\text{C}_{\text{Pyrrol-H}}$), 6.11 (s, 1H, Methylene-H), 5.37 (d, $^3J= 4.8$ Hz, 1H, C=CH, Chol), 4.68-4.60 (m, 1H, CH-O, Chol) 3.29 (t, $^3J=7.5$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}$, Bodipy), 2.73 (t, $^3J=7.5$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}$, Bodipy), 2.57 (s, 1H, CH_3), 2.31 (d, $J= 7.6$ Hz, 2H, Chol), 2.25 (s, 1H, CH_3), 2.02-1.93 (m, 2H, Chol), 1.86-1.80 (m, 3H, Chol), 1.69-1.46 (m, 8H, Chol), 1.43 (s, 3H, Chol), 1.35-1.33 (m, 3H, Chol), 1.26-1.25 (m, 1H, Chol), 1.17-1.06 (m, 6H, Chol), 1.01 (s, 6H, Chol), 0.91 (d, $^3J= 6.5$ Hz, 3H, Sterol), 0.87 (dd, $^2J= 1.8$ Hz, $^3J= 6.6$ Hz, 6H, Sterol), 0.68 ppm (s, 3H, CH_3 , Sterol).

$\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (660.46).

HR-FAB-MS: ber.: 660.4638 $[\text{M}]^+$

gef.: 660.4548 (in 3-NBA)

6.5 Versuche zu Kapitel 4.4

6.5.1 Versuche zu Kapitel 4.4.1

N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocaproyl-pentafluorphenolester (65)

Zu einer Lösung von 50 mg *N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-aminocapronsäure **27** (0.17 μmol) in 10 ml Tetrahydrofuran werden unter Eiskühlung 35 mg

Dicyclohexylcarbodiimid (0.17 μmol ; 1 eq.) zugesetzt. Nach zehnmütigen Rühren bei dieser Temperatur wird 31 mg Pentafluorphenol (0.17 μmol ; 1 eq.) zugesetzt und man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird über Celite abfiltriert und anschließend das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan als Eluens gereinigt.

Oranges Öl.

Ausbeute: 68 mg (0.15 μmol , 87 %)

R_f -Wert: 0.75 (Dichlormethan)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.48 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, CH, NBD), 6.26 (s, 1H, NH), 6.19 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, CH, NBD), 3.58-3.53 (m, 2H, ϵ - CH_2), 2.74 (t, 3J = 7.2 Hz, 2H, α - CH_2), 1.94-1.85 (m, 4H, β - CH_2 , δ - CH_2), 1.67-1.61 ppm (m, 2H, γ - CH_2).

$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_5\text{N}_4\text{O}_5$ (460.31).

Undecensäure-pentafluorphenolester (67)

Zu einer Lösung von 514 mg 10-Undecensäure (**66**) (2.79 mmol) in 10 ml Tetrahydrofuran werden unter Eiskühlung 576 mg Dicyclohexylcarbodiimid (2.79 mmol; 1 eq.) zugesetzt. Nach zehnmütigen Rühren bei dieser Temperatur wird 513 mg Pentafluorphenol (2.79 mmol; 1 eq.) zugesetzt und man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird über Celite abfiltriert und anschließend das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan als Eluens gereinigt.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 906 mg (2.59 mmol, 93 %)

R_f -Wert: 0.67 (Dichlormethan)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.86-5.76 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.02-4.91 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.65 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, α - CH_2), 2.08-2.01 (m, 2H, ω - CH_2), 1.81-1.73 (m, 2H, β - CH_2), 1.43-1.32 ppm (m, 10 H, restliche CH_2).

^{13}C -NMR(100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.6$ (C=O), 142.4 (C, -Pfp), 139.9 (C, -Pfp), 138.1 (C, -Pfp), 136.6 (C, -Pfp), 139.1 ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 114.2 ($-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 33.8 (ω -C), 33.3 (α -C), 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8 (restliche C-Atome der Undecensäure), 24.8 ppm (β -C).

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{F}_5\text{O}_2$ (350.32).

FAB-MS: ber.: 351.1383 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gef.: 351.1405 (in 3-NBA)

6.5.2 Versuche zu Kapitel 4.4.2

2-Azido-*N*-benzyl-acetamid (75)

Unter Argonatmosphäre werden 20.4 ml Benzylamin (0.186 mol; 2 eq) in 190 ml absolutem Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung tropft man innerhalb von 45 min 8.1 ml Bromacetyl bromid (0.093 mol; 1 eq) und erwärmt anschließend langsam auf Raumtemperatur. Man rührt bei dieser für 60 min und filtriert anschließend den Feststoff ab. Die organische Phase wird dreimal mit je 50 ml 1N HCl gewaschen und dann über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man einen farblosen Feststoff, der in 200 ml THF gelöst wird. Zu dieser wird eine Lösung von 30.3 g Natriumazid (0.466 mol; 5 eq) in 50 ml Wasser gegeben und man refluxiert die resultierende Mischung für 18 h. nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die organische Phase abgetrennt, zweimal mit je 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum [Schutzschild] liefert das Produkt als schwach gelbes Öl.

Ausbeute: 14.1 g (0.074 mol; 80 %)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.35$ -7.24 (m, 5H, Benzyl), 6.83 (s (br), 1H, NH), 4.42 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$), 3.92 ppm (s, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 166.5$ (C=O, Amid), 137.4 (C1, Benzyl), 128.6, 127.7, 127.6, 52.4 (C- N_3), 43.3 ppm (CH_2 Benzyl).

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ (190.09).

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-Aminohexanol (77)**

Zu einer Lösung von 2.27 g 6-Aminohexanol (19.4 mmol) und 1.08 g NaOH (27 mmol; 1.4 eq) in 20 ml Dioxan und 10 ml H₂O wird unter Eiskühlung innerhalb von 40 min eine Lösung von 5 g Boc₂O (23.3 mmol; 1.2 eq) in 20 ml Dioxan zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird Dioxan im Vakuum entfernt, mit 50 ml Ethylacetat überschichtet und der pH-Wert mittels 1N HCl auf 5 eingestellt. Die wäßrige Phase wird insgesamt dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen einmal mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und man erhält ein farbloses viskoses Öl.

Ausbeute: 3.90 g (17.9 mmol = 93% d. Th.)

R_f-Wert: 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.58 (t, ³J= 6.6 Hz, 2H, CH₂OH), 3.07 (t, ³J= 7.0 Hz, 2H, CH₂NH-), 1.52 (dt, ³J= 6.6 Hz, 2H, β-CH₂), 1.45 (m, 2H, ε-CH₂), 1.41 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.33 ppm (m, 4H, γ-CH₂, δ-CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 155.9 (C=O, Urethan), 79.0 (C_q, *tert*-Butyl), 62.5 (CH₂-OH), 40.5 (CH₂-NH-), 32.6 (β-C), 30.07 (ε-C), 28.5 (CH₃, *tert*-Butyl), 26.4 (γ-C), 25.4 ppm (δ-C).

C₁₁H₂₃NO₃ (217.31).

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-Aminohexyl-methansulfonsäureester (77b)**

Unter Argonatmosphäre werden 1.22 g (5.6 mmol) N-Boc-Aminohexan-6-ol in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 0.79 g Triethylamin (1.09 ml; 7.9 mmol; 1.4 eq) versetzt. Zu dieser Lösung tropft man unter Eiskühlung 0.77g (0.52 ml; 6.7 mmol; 1.2 eq) Methansulfonsäurechlorid zu und rührt für 15 min bei Eiskühlung und für weitere 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 40 ml ges. Ammoniumchloridlösung zugesetzt, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase weitere zweimal mit 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 ml ges. NaCl-

Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und man erhält ein schwach gelbes Öl, welches ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 1.65 g (5.59 mmol, 99 %)
R_f-Wert: 0.69 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.21 (t, ³J= 6.6 Hz, 2H, CH₂O-), 3.09 (t, ³J= 7.0 Hz, 2H, CH₂NH-), 2.99 (s, 3H, H₃C-SO₂-), 1.74 (dt, ³J= 6.6 Hz, 2H, β-CH₂), 1.47 (m, 2H, ε-CH₂), 1.41 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.35 ppm (m, 4H, γ-CH₂, δ-CH₂).

C₁₂H₂₅NO₅S (295.40).

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Aminohexylazid (78)**

Der aus obiger Umsetzung erhaltene Methansulfonsäureester **77b** (1.65 g, 5.6 mmol) wird in 30 ml absolutem DMF gelöst und es werden 3.65 g NaN₃ (56 mmol; 10 eq) zugesetzt. Die resultierende Suspension wird unter heftigem Rühren für 12 h auf 50°C erhitzt und anschließend das DMF im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 100 ml Ethylacetat aufgenommen und fünfmal mit je 40 ml Wasser sowie zweimal mit je 40 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt flash-chromatographisch an SiO₂ gereinigt.

Schwachgelbes Öl.

Ausbeute: 1.32 g (5.5 mmol, 98 %)
R_f-Wert 0.52 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.24 (t, ³J= 6.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.08 (t, ³J= 6.8 Hz, 2H, CH₂NH-), 1.57 (dt, ³J= 7.0 Hz, 2H, β-CH₂), 1.47 (m, 2H, ε-CH₂), 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl), 1.34 ppm (m, 4H, γ-CH₂, δ-CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 155.7 (C=O, Urethan), 79.0 (C_q, *tert*-Butyl), 51.4 (CH₂-N₃), 40.5 (CH₂-NH-), 30.0 (β-C), 28.8 (ε-C), 28.5 (CH₃, *tert*-Butyl), 27.0 (γ-C), 26.4 ppm (δ-C).

$C_{11}H_{22}N_4O_2$ (242.32).

HR-FAB-MS: ber.: 243.1821 $[M+H]^+$
 gef.: 243.1840 (in 3-NBA)

6-Azidohexylamin (79)

Zu einer Lösung des Boc-geschützten 6-Aminoethylazid 3.80 g (15.7 mmol) in 10 ml Dichlormethan werden unter Eiskühlung 8 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Man rührt für 10 min bei Eiskühlung und weitere 30 min bei Raumtemperatur bis laut DC-Kontrolle das Edukt verbraucht ist. Zur Entfernung der Trifluoressigsäure wird dreimal mit jeweils 15 ml Toluol coevaporiert und anschließend in Dichlormethan aufgenommen und über Nacht mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen.

Gelbliches Öl

Ausbeute: 1.86 g (13.1 mmol, 83 %)

R_f -Wert: 0.05 ((Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1(v/v))

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.25 (t, 3J = 6.8 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.08 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, CH_2NH_2), 1.65 (m, 2H, β - CH_2), 1.59 (m, 2H, ϵ - CH_2), 1.39 ppm (m, 4H, γ - CH_2 , δ - CH_2).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 51.2 (CH_2-N_3), 39.8 (CH_2-NH-), 28.5 (β -C), 27.3 (ϵ -C), 26.1 (γ -C), 25.9 ppm (δ -C).

$C_6H_{14}N_4$ (142.20).

CY 5-hexansäure-(6-azido-hexyl)-amid (80)

Zu einer Lösung von 30 mg des Farbstoffes CY 5 (38.3 μ mol), 5.5 mg 6-Azidohexylamin (79) (38.3 μ mol; 1 eq) sowie 19.9 mg PyBOP (38.3 μ mol; 1 eq) in 3 ml DMF gelöst werden unter Eiskühlung 9.9 mg DIEA (13.3 μ l; 76.5 μ mol; 2 eq) zugesetzt. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur und entfernt dann das Lösungsmittel im Vakuum vollständig. Die Aufreinigung des Produktes erfolgt mittels präparativer HPLC mit einer Nucleodur C 18-Gravity Säule.

Dunkelblaues Öl.

Ausbeute: 14.9 mg (16.9 μ mol, 44 %) + 12 mg CY 5 reisoliert
HPLC: 11.1 min (Grad. B)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ = 7.63-7.44 (m, 6H, Aromat), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.17-6.11 (m, 1H), 5.85-5.77 (m, 2H), 3.72-3.58 (m, 4H), 2.74 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 2.63 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.39-1.30 (m, 2H), 1.19 (s, 12H), 1.03-0.98 (m, 2H), 0.95-0.87 (m, 7H), 0.82-0.85 ppm (m, 4H).

$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$ (908.91).

ESI-MS: ber.: 781.4 [$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2^+$]
gef.: 781.3

6-Aminocaprinsäuremethylester-hydrochlorid (82)

Zu einer Lösung von 50 ml absolutem Methanol werden unter Argonatmosphäre und Eiskühlung 6.12 ml Thionylchlorid (83.9 mmol; 2.2 eq) gegeben und anschließend 5 g 6-Aminocaprinsäure (38 mmol; 1 eq) zugesetzt. Man entfernt die Eiskühlung und rührt für 4 h bei Raumtemperatur nach. Dann wird im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und man erhält nach Umkristallisation aus Cyclohexan:Ethylacetat das Produkt.

Farbloser Feststoff

Ausbeute: 6.82 g (37.7 mmol, 99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.00 (m, 2H, $\epsilon\text{-CH}_2$), 2.32 (t, 3J = 7.2 Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 1.79 (dt, 3J = 7.6 Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.67 (dt, 3J = 7.4 Hz, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 1.44 ppm (m, $\gamma\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 173.6 (C=O, Ester), 51.6 (C, OMe), 39.8 ($\epsilon\text{-CH}_2$), 33.7 ($\alpha\text{-C}$), 27.3 ($\beta\text{-C}$), 26.0 ($\gamma\text{-C}$), 24.3 ppm ($\delta\text{-C}$).

$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2$ (145.20).

FAB-MS ber.: 146.1181 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$
gef.: 146.1162 (in 3-NBA)

6-(2,4-Dinitro-phenylamino)-hexansäure-methylester (83)

Unter Argonatmosphäre werden 1 g 2,4-Dinitrofluorbenzol (5.37 mmol) und 0.976 g 6-Aminocaprinsäuremethylester-hydrochlorid **82** (5.37 mmol; 1 eq) in 20 ml abs. Dichlormethan gelöst und 1.49 ml trockenes Triethylamin (1.09 g; 10.7 mmol; 2 eq) zugesetzt. Diese Lösung wird über Nacht unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlung mit 100 ml Chloroform verdünnt. Die organische Phase wird je zweimal mit 50 ml 1N HCl sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Gelbes Öl.

Ausbeute: 1.63 g (5.26 mmol, 98%)

R_f-Wert: 0.55 (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.13 (m, 1H, DNP), 8.28-8.25 (m, 1H, DNP), 6.92-6.89 (m, 1H, DNP), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.45-3.40 (m, 2H, ε-CH₂), 2.37 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, α-CH₂), 1.85-1.69 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂), 1.54-1.47 ppm (m, 2H, γ-CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 173.5 (C=O, Ester), 148.1 (DNP), 135.9 (DNP), 130.2 (DNP), 124.2 (DNP), 113.7 (DNP), 51.7 (C, OMe), 43.4 (ε-CH₂), 33.8 (α-C), 28.5 (β-C), 26.5 (γ-C), 24.5 ppm (δ-C).

C₁₃H₁₇N₃O₆ (311.29).

HR-FAB-MS: ber.: 312.1196 [M+H]⁺

gef.: 312.1176 (in 3-NBA)

6-(2,4-Dinitro-phenylamino)-hexansäure (84)

Zu einer Lösung von 1.63 g 6-(2,4-Dinitro-phenylamino)-hexansäure-methylester (5.26 mmol) in 30 ml Tetrahydrofuran werden bei Raumtemperatur 20 ml einer 1N NaOH-Lösung zugesetzt. Man lässt für 4h rühren (dünnschichtchromatographische Kontrolle mit Chloroform:Methanol 20:1 (v/v)) und trennt dann die organische Phase ab. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 150 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird je zweimal mit 40 ml 1N HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Flash-

chromatographische Reinigung an Kieselgel mit Chloroform:Methanol 20:1(v/v) liefert das Produkt.

Gelber Feststoff.

Ausbeute: 1.48 g (4.99 mmol, 95 %)

R_f-Wert: 0.38 (Chloroform:Methanol 20:1 (v/v))

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ = 9.03 (m, 1H, DNP), 8.29-8.25 (m, 1H, DNP), 7.11-7.09 (m, 1H, DNP), 3.50-3.47 (t, ³J= 7.1 Hz, 2H, ε-CH₂), 2.33 (t, ³J= 7.4 Hz, 2H, α-CH₂), 1.82-1.66 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂), 1.54-1.47 ppm (m, 2H, γ-CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, MeOH-d₄): δ = 176.3 (C=O, Säure), 148.5 (DNP), 130.1 (DNP), 123.9 (DNP), 120.7 (DNP), 114.5 (DNP), 43.3 (ε-CH₂), 33.9 (α-C), 28.6 (β-C), 26.6 (γ-C), 24.7 ppm (δ-C).

C₁₂H₁₅N₃O₆ (297.26).

HR-FAB-MS: ber.: 298.1039 [M+H]⁺

gef.: 298.1056 (in 3-NBA)

6-(2,4-Dinitro-phenylamino)-hexansäure-(6-azido-hexyl)-amid (85)

Zu einer Lösung von 150 mg 6-(2,4-Dinitrophenylamino)-hexansäure (0.51 mmol) in 30 ml absolutem Dichlormethan werden mit 93 mg HOBt (0.61 mmol; 1.2 eq) und 107 mg EDC (0.56 mmol; 1.1 eq) zugesetzt. Nach zehnmütigem Rühren bei Raumtemperatur wird 93 mg 6-Azido-hexylamin **79** (0.66 mmol; 1.3 eq) zugesetzt und über Nacht bei gleicher Temperatur gerührt. Dann wird die organische Phase je dreimal mit je 10 ml 1N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Flash-Chromatographie mit Chloroform:Methanol=20:1(v/v) als Eluens wird das Produkt als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 180 mg (0.43 mmol, 84 %)

R_f-Wert: 0.49 (Chloroform:Methanol 20:1 (v/v))

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ = 9.08-9.07 (m, 1H, DNP), 8.24-8.21 (m, 1H, DNP), 6.91-6.89 (m, 1H, DNP), 3.43-3.38 (m, 2H, ε-CH₂ DNP-aca), 3.27-3.20 (m, 4H, CH₂N₃, CH₂NH-), 2.19 (t, ³J= 7.3 Hz, 2H, α-CH₂, DNP-aca), 1.83-1.68 (m, 4H, β-CH₂, δ-CH₂ DNP-aca),

1.61-1.55 (m, 2H, β -CH₂), 1.53-1.46 (m, 4H, γ -CH₂), 1.41-1.32 ppm (m, 4H, δ -CH₂, ϵ -CH₂).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 172.1 (C=O, Amid), 148.1 (DNP), 135.7 (DNP), 130.2 (DNP), 130.0 (DNP), 124.1 (DNP), 113.8 (DNP), 51.3 (CH₂-N₃), 43.3 (ϵ -CH₂), 39.4 (CH₂-NH-), 36.3 (α -C), 29.6 (β -C), 28.7 (β -C), 28.5 (ϵ -C), 26.5(γ -C), 26.4 (γ -C), 26.3 (δ -C), 25.1 ppm (δ -C).

C₁₈H₂₇N₇O₅ (421.45).

FAB-MS: ber.: 422.2152 [M+H]⁺
gef.: 422.2160 (in 3-NBA)

6.5.3 Versuche zu Kapitel 4.4.3

N-tert.-Butyloxycarbonyl-4-amino-benzylamin (96)

Zu einer Lösung von 1.48 g 4-Aminobenzylamin (12 mmol) und 0.58 g Natriumhydroxid (15 mmol; 1.2 eq) in einer Mischung aus 10 ml H₂O und 15 ml 1,4-Dioxan wird unter Eiskühlung innerhalb von 30 min eine Lösung von 2.51 g Di-*tert.*-Butyldicarbonat (11 mmol; 0.95 eq) in 10 ml 1,4-Dioxan zugetropft. Man erwärmt auf RT und rührt für 12 h bei dieser Temperatur. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und jeweils dreimal mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum.

Gelbliches Öl.

Ausbeute: 2.43 g (11 mmol, 91 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.03 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, C₂-H), 6.64 (d, ³J = 6.6 Hz, 2H, C₃-H), 4.13 (s, 2H, Benzyl), 1.41 ppm (s, 9H, *tert.*-Butyl).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 155.8 (Carbamat), 144.7 (C₄), 128.9 (C₁), 128.6 (C₂), 115.4 (C₃), 79.4 (C_q-*tert.*-Butyl), 44.1 (Benzyl), 28.4 ppm (*tert.*-Butyl).

C₁₂H₁₈N₂O₂ (222.28).

FAB-MS: ber.: 223.1447 [M+H]⁺
gef.: 223.1460 (in 3-NBA)

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-prolin-phenylhydrazinodiazen (87)**

Zu einer Lösung von 25 mg *tert.*-Butyloxycarbonyl-prolinyl-phenylhydrazid (82 μmol) in 3 ml absolutem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 15 mg umkristallisiertes *N*-Bromsuccinimid (84 μmol ; 1.03 eq) und 6.7 mg Pyridin (84 μmol ; 1.03 eq) zugesetzt. Man rührt bei dieser Temperatur für 90 min und wäscht die organische Phase je zweimal mit je 2 ml 1N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und man erhält das Produkt als rotes Öl.

R_f-Wert: 0.71 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1(v/v))

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.91-7.87 (m, 2H, Phenyl), 7.58-7.51 (m, 3H, Phenyl), 4.89-4.71 (m, 1H, α -CH Pro), 3.61-3.44 (m, 2H, δ -CH₂ Pro), 2.41-2.20 (m, 2H, β -CH₂ Pro), 2.10-1.92 (m, 2H, γ -CH₂ Pro), 1.42 ppm (s, 2 Rotamere, 9H, *tert.*-Butyl).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 189.3 (C(O)-N=N-), 151.6 (C=O, *tert.*-Butyl, 2 Rotamere), 133.5 (Phenyl), 129.2 (Phenyl), 129.1 (Phenyl), 123.6 (Phenyl), 123.4 (Phenyl), 80.5 (C_q-*tert.*-Butyl, 2 Rotamere), 60.2 (α -C Pro), 46.6 (δ -CH₂, Pro), 30.7 (β -CH₂ Pro), 28.5 (CH₃ *tert.*-Butyl, 2 Rotamere), 24.0 ppm (γ -CH₂).

C₁₆H₂₁N₃O₃ (303.36).

Anknüpfung an den Sulfamylbutyryl-Linker

Zur Beladung wird zu in DMF vorgequollenen Sulfamylbutyryl-Harz eine Lösung von 4 Äquivalenten Säure, 4 Äquivalenten PyBOP und 8 Äquivalenten DIEA in DMF gegeben und 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Ethylacetat gewaschen und in Vakuum getrocknet.

Abspaltung vom Sulfamylbutyryl-Linker

Zur Aktivierung wird das Harz in trockenem Dichlormethan vorgequollen und dann mit einer 2 M Lösung von Trimethylsilyldiazomethan (50 Äquivalente bezüglich der Harzbeladung) in Hexan versetzt. Nach dreistündigem Schütteln bei Raumtemperatur wird das Harz mit

Dichlormethan, DMF und Ethylacetat gewaschen und in Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung wird eine Lösung von 5 Äquivalenten des Nucleophils (e.g. 6-Azidohexylamin (**79**)) in DMF zum aktivierten Polymer gegeben und für 18 h bei 40°C geschüttelt. Nach Abfiltration des Harzes wird das Lösungsmittel im Vakuum vollständig entfernt und das Produkt entsprechend aufgereinigt.

Biotinylaminocaproyl-L-phenylalanyl-glycin-(6-azido-hexyl)-amid (92**)**

Die Synthese wird ausgehend von 181 mg Harz durchgeführt und liefert nach Abspaltung mit 6-Azidohexylamin (**79**) vom polymeren Träger das Produkt als farbloses Öl. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC an einer Nucleosil C4-Säule.

Ausbeute: 11.8 mg (17 μmol ; 14 %)

HPLC: 7.14 min (Grad. A)

$[\alpha]_D^{20} = +4.0^\circ$ (c= 0.1, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.30\text{-}7.21$ (m, 5H, Phe), 4.50-4.45 (m, 2H), 4.31-4.28 (m, 1H), 3.87 (d, $J = 16.8$ Hz), 3.61 (d, $J = 16.8$ Hz), 3.34 (s, 4H), 3.28-3.26 (m, 2H), 3.22-3.16 (m, 3H), 3.14-3.10 (m, 2H), 2.96-2.90 (m, 2H), 2.21-2.17 (m, 3H), 2.15 (s, 2H), 1.74-1.39 (m, 17 H), 1.29 (s, 3H), 1.26-1.21 ppm (m, 2H).

$\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_9\text{O}_5\text{S}$ (685.88).

FAB-MS: ber.: 686.38 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 686.12 (in 3-NBA)

Biotinyliertes Antibiotika-Analogon

Nach Beladung von 70 mg Sulfamylbutyryl-Harz (49 μmol) analog obiger Vorschrift wird das Harz mit 59 mg 4-Formylphenylboronsäure (0.39 mmol; 8 eq), 121 mg Kaliumcarbonat (0.88 mmol; 18 eq), 51 mg DIEA (0.39 mmol; 8 eq) in 4 ml Dioxan und 0.5 ml Wasser suspendiert und 20 min im Ultraschallbad unter Argonatmosphäre entgast. Dann werden 2 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 μmol ; 0.2 eq) zugegeben, erneut wird intensiv mit Argon gespült und das Reaktionsgemisch auf 95°C erwärmt. Nach 18 h wird das Polymer abfiltriert und mit 2 x 10 ml DMF, 1 x 10 ml Wasser, 1 x 10 ml DMF, 2 x 10 ml THF, 1 x 10 ml Methanol, 2 x 10 ml Dichlormethan und 1 x 10 ml Cyclohexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der so

erhaltene polymergebundene Biphenylaldehyd **94** wird mit 70 mg Natriumsulfat (0.49 mmol; 10 eq) und 131 mg des Anilins **96** (0.74 mmol; 15 eq) in Dichlormethan/Eisessig 10:1 (v/v) suspendiert und mit Ultraschall behandelt. Nach 2 h werden 104 mg NaBH(OAc)₃ (0.49 mmol; 10 eq) zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Polymer abfiltriert und mit 2 x 10 ml DMF, 2 x 10 ml THF/ Wasser (1:1), 2 x 10 ml THF, 1 x 10 ml Methanol, 2 x 10 ml Dichlormethan und 1 x 10 ml Cyclohexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wird das Harz zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe je zweimal mit 5 ml 50 %iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan für 10 min geschüttelt und danach mit Dichlormethan, Methanol und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet. Danach wird das Harz zur Anknüpfung der Biotinmodifizierung für 1 h mit einer Lösung von 70 mg Biotinyl-aminocaprinsäure (0.20 mmol; 4 eq), 68 mg HBTU (0.18 mmol; 3.6 eq), 36 mg HOBt (0.24 mmol; 4.8 eq) und 50 mg DIEA (0.39 mmol; 8 eq) in 3 ml DMF geschüttelt und dann mit DMF, Dichlormethan und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Abspaltung wird unter oben angegebenen Bedingungen mit 6-Azidohexylamin (**79**) durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt mittels präparativer HPLC an einer Nucleosil C4-Säule.

Gelbliches Öl.

Ausbeute: 2.3 mg (6 %)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.86-7.19 (m, 12H, arom), 6.40-6.33 (m, 1H), 4.30-4.27 (m, 1H), 4.12-4.09 (m, 1H), 3.32-3.28 (m, 3H), 3.10-3.05 (m, 1H), 3.01-2.96 (m, 2H), 2.87-2.79 (m, 2H), 2.66-2.63 (m, 1H), 2.56-2.51 (m, 1H), 2.13 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 2.02 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 1.64-1.39 (m, 8H), 1.37-1.20 ppm (m, 6H).

C₃₄H₅₇N₉O₄S (796.04).

HPLC: 8.98 min (Grad. A)

ESI-MS: ber.: 796.8 [M+H]⁺

gef.: 796.4

7. Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1996**, 274, 255-259.
- [2] K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 716-780.
- [3] W. Binns, L. F. James, J. L. Shupe, G. Everett, *Am. J. Vet. Res.* **1963**, 24, 1164-1175.
- [4] R. F. Keeler, W. Binns, *Teratology* **1968**, 1, 5-10.
- [5] M. K. Cooper, J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1998**, 280, 1603-1607.
- [6] P. W. Ingham, A. P. McMahon, *Genes Dev.* **2001**, 15, 3059-3087.
- [7] D. A. Bumcrot, R. Takata, A. P. McMahon, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 2294-2303.
- [8] H. Roelink, J. A. Porter, C. Chiang, Y. Tanabe, D. T. Chang, P. A. Beachy, T. M. Jessell, *Cell* **1995**, 81, 445-455.
- [9] J. Briscoe, A. Pierani, T. M. Jessell, J. Ericson, *Cell* **2000**, 101, 435-445.
- [10] J. A. Porter, D. P. Vonkessler, S. C. Ekker, K. E. Young, J. J. Lee, K. Moses, P. A. Beachy, *Nature* **1995**, 374, 363-366.
- [11] T. M. T. Hall, J. A. Porter, K. E. Young, E. V. Koonin, P. A. Beachy, D. J. Leahy, *Cell* **1997**, 91, 85-97.
- [12] J. A. Porter, S. C. Ekker, W. J. Park, D. P. Vonkessler, K. E. Young, C. H. Chen, Y. Ma, A. S. Woods, R. J. Cotter, E. V. Koonin, P. A. Beachy, *Cell* **1996**, 86, 21-34.
- [13] R. K. Guy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7307-7312.
- [14] R. B. Pepinsky, C. H. Zeng, D. Y. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber, K. Miatkowski, F. R. Taylor, E. A. Wang, A. Galdes, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14037-14045.
- [15] X. Zeng, J. A. Goetz, L. M. Suber, W. J. Scott, C. M. Schreiner, D. J. Robbins, *Nature* **2001**, 411, 716-720.
- [16] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569-572.
- [17] Y. Chen, G. Struhl, *Cell* **1996**, 87, 553-563.
- [18] D. Carpenter, D. M. Stone, J. Brush, A. Ryan, M. Armanini, G. Frantz, A. Rosenthal, F. J. de Sauvage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 13630-13634.
- [19] L. V. Goodrich, M. P. Scott, *Neuron* **1998**, 21, 1243-1257.
- [20] J. P. Incardona, H. Roelink, *Cellular & Molecular Life Sciences* **2000**, 57, 1709-1719.
- [21] J. Alcedo, M. Ayzenzon, T. Von Ohlen, M. Noll, J. E. Hooper, *Cell* **1996**, 86, 221-232.
- [22] M. van den Heuvel, P. W. Ingham, *Nature* **1996**, 382, 547-551.

-
- [23] D. M. Stone, M. Hynes, M. Armanini, T. A. Swanson, Q. Gu, R. L. Johnson, M. P. Scott, D. Pennica, A. Goddard, H. Phillips, M. Noll, J. E. Hooper, F. J. de Sauvage, A. Rosenthal, *Nature* **1996**, *384*, 129-134.
- [24] P. Aza-Blanc, F. A. Ramirez-Weber, M. P. Laget, C. Schwartz, T. B. Kornberg, *Cell* **1997**, *89*, 1043-1053.
- [25] C. H. Chen, D. P. von Kessler, W. J. Park, P. A. Beachy, *Cell* **1999**, *98*, 305-316.
- [26] J. Ericson, J. Briscoe, P. Rashbass, V. Van Heyningen, T. M. Jesell, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1997**, *62*, 451-466.
- [27] R. Burke, D. Nellen, M. Bellotto, E. Hafen, K.-A. Senti, B. J. Dickson, K. Basler, *Cell* **1999**, *99*, 803-815.
- [28] I. The, Y. Bellaïche, N. Perrimon, *Mol. Cell* **1999**, *44*, 633-639.
- [29] G. van Meer, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1989**, *5*, 247-275.
- [30] E. London, D. A. Brown, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111-136.
- [31] E. London, D. A. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 182-195.
- [32] S. Mukherjee, F. R. Maxfield, *Traffic* **2000**, *1*, 203-211.
- [33] G. Sowa, M. Pypaert, W. C. Sessa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14072-14077.
- [34] E. D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 95-99.
- [35] P. W. Janes, S. C. Ley, A. I. Margee, P. S. Kabouridis, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 23-34.
- [36] M. G. Tansey, R. H. Baloh, J. Milbrandt, E. M. J. Johnson, *Neuron* **2000**, *25*, 611-623.
- [37] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock, R. G. Parton, *Nature Cell Biology* **1999**, *1*, 98-105.
- [38] T. Magee, C. Marshall, *Cell* **1999**, *98*, 9-12.
- [39] I. A. Prior, A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nature Cell Biology* **2001**, *3*, 368-375.
- [40] A. Rietveld, S. Neutz, K. Simons, S. Eaton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12049-12054.
- [41] M. J. Page, A. Hall, S. Rhodes, R. H. Skinner, V. Murphy, M. Sydenham, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19147-19154.
- [42] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nägele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2334-2337.
- [43] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102-13109.
- [44] M. Schelhaas, E. Nägele, N. Kuder, B. Bader, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1239-1252.

- [45] D. Kadereit, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *3*, 200-203.
- [46] D. Atherton, D. A. Wellings, in: *Houben-Weyl: Methoden der organische Chemie, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme, Stuttgart, **2002**.
- [47] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954-5955.
- [48] M. Völkert, Dissertation (in Vorbereitung), Universität Dortmund **2003**.
- [49] R. R. Flavell, M. Huse, M. Goger, M. Trester-Zedlitz, J. Kuriyan, T. W. Muir, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 165-168.
- [50] J. B. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [51] G. T. Hermanson, in *Bioconjugates Techniques*, Academic Press, London, **1996**, p. Chapters 2.2 and 5.
- [52] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223-226.
- [53] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023-1035.
- [54] T. C. Evans, J. Brenner, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3923-3926.
- [55] T. C. Evans, J. Brenner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2256-2264.
- [56] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *96*, 388-393.
- [57] K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16205-16209.
- [58] R. Xu, B. Ayers, D. Dowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 388-393.
- [59] G. J. Cotton, B. Ayers, R. Xu, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1100-1101.
- [60] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.
- [61] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. H. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [62] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648-5649.
- [63] P. McCaldon, P. Argos, *Proteins* **1988**, *4*, 99-122.
- [64] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [65] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902.
- [66] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [67] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [68] B. Nilsson, L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [69] B. Nilsson, L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12.

- [70] M. B. Soellner, B. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.
- [71] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039-3043.
- [72] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326-1341.
- [73] D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, *Nature* **2000**, *405*, 827-836.
- [74] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamyor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.
- [75] M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473-488.
- [76] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967-7968.
- [77] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849-7850.
- [78] J. R. Falsey, M. Renil, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 346-353.
- [79] N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3254-3258.
- [80] F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature* **2002**, *416*, 653-657.
- [81] M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1133-1145.
- [82] R. Reents, Dissertation, Universität Dortmund **2002**.
- [83] T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, *Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *740*, 31-32.
- [84] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5677-5680.
- [85] H. B. Milne, W. J. Kilday, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 64-66.
- [86] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [87] W. H. Hartung, R. Simonoff, *Org. React.* **1953**, *VII*, 263-326.
- [88] D. Sebastian, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2927-2930.
- [89] D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, 1098-1108.
- [90] H. Waldmann, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *Xx*, 1712-1725.
- [91] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.
- [92] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615.
- [93] R. K. Mann, P. A. Beachy, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1529*, 188-202.
- [94] K. Mori, T. Nakayama, M. Sakuma, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 401-408.
- [95] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9333-9336.
- [96] G. Liu, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7712-7713.
- [97] T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 935-942.

- [98] J. M. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055-3058.
- [99] K. Barlos, D. Gatos, I. Kallitsis, P. Papaioannou, P. Sotiriou, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1079-1081.
- [100] K. Barlos, D. Gatos, I. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [101] N. Thieriet, F. Guibé, F. Albericio, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1815-1817.
- [102] C. Bordier, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1604-1607.
- [103] S. Uchiyama, T. Santa, K. Imai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, *11*, 2525-2532.
- [104] R. Homan, H. J. Pownall, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *938*, 155-163.
- [105] W. C. Wimley, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1296-1303.
- [106] J. C. McIntyre, R. G. Sleight, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11819-11827.
- [107] C. Balch, R. Morris, E. Brooks, R. G. Sleight, *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *70*, 205-212.
- [108] F. Eisele, Dissertation, Universität Dortmund **2000**.
- [109] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813-3822.
- [110] J. Kuhlmann, *persönliche Mitteilung* **2003**.
- [111] F. Eisele, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 382-386.
- [112] J. R. Sambles, G. W. Bradbery, F. Yang, *Contemp. Phys.* **1991**, *32*, 173-183.
- [113] D. Bar-Sagi, J. R. Feramisco, *Cell* **1985**, *42*, 841-848.
- [114] G. Schmidt, C. Lenzen, I. Simon, R. Deuter, R. H. Cool, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Oncogene* **1996**, *12*, 87-96.
- [115] M. F. G. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *988*, 411-426.
- [116] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1981**, *289*, 366-373.
- [117] D. C. Wiley, J. J. Skehel, *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 365-394.
- [118] P. A. Mir-Bullough, F. M. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1994**, *371*, 37-43.
- [119] W. Keil, R. Geyer, J. Dabrowski, U. Dabrowski, H. Niemann, S. Stirm, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2711-2720.
- [120] S. Y. Mir-Shekar, D. A. Ashford, D. J. Harvey, R. A. Dwek, I. T. Schulze, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4027-4036.
- [121] E. Ponimaskin, M. F. G. Schmidt, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 565-568.
- [122] M. Veit, H. Reverey, M. F. G. Schmidt, *Biochem. J.* **1996**, *318*, 163-172.
- [123] P. Scheiffele, M. G. Roth, K. Simons, *EMBO J.* **1997**, *16*, 5501-5508.
- [124] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [125] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.

-
- [126] K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, N. Koch, S. Koutsogianni, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 148-153.
- [127] F. Albericio, L. A. Carpino, *Meth. Enzym.* **1997**, *289*, 104-126.
- [128] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [129] B. Denis, E. Trifilieff, *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 372-377.
- [130] D. A. Zacharias, J. D. Violin, A. C. Newton, R. Y. Tsien, *Science* **2002**, *296*, 913-916.
- [131] T. Wang, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13031-13040.
- [132] A. Treibs, F. H. Kreuzer, *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208-223.
- [133] J. Karolin, L. B.-A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.
- [134] www.probes.com.
- [135] R. P. Haugland, H. C. Kang,, Molecular Probes, Inc., USA, **1988**.
- [136] R. Bihovsky, I. Pendrak, *Bioorganic & Medicinal Letters* **1996**, *6*, 1541-1542.
- [137] M. Köhn, Dissertation (in Vorbereitung), Universität Dortmund.
- [138] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- [139] G. A. Korbel, G. Lalic, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 361-362.
- [140] R. Breinbauer, *persönliche Mitteilung* **2001**.
- [141] W. H. A. Kuijpers, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10931-10944.
- [142] M. F. M. Johnston, B. G. Barisas, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **1974**, *13*, 390-396.
- [143] J. B. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056.
- [144] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 636-637.
- [145] Y. Shin, K. A. Winans, J. B. Backes, S. H. B. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689.
- [146] J. B. Backes, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11171-11172.
- [147] E. A. Bayer, M. Wilchek, *Methods Biochem. Anal.* **1980**, *26*, 1-45.
- [148] M. Schelhaas, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH) **1997**.
- [149] D. D. Perrin, W. L. F. Armstrong, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [150] L. Lapatsanis, C. Profilis, P. Catsoulacos, *J. Chem. Eng. Data* **1980**, *25*, 287-289.
- [151] A. Wolf, Dissertation (in Vorbereitung), Ruhr-Universität Bochum **2003**.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
abs.	absolut
All	Allyl
ber.	berechnet
Boc	<i>N-tert.</i> -Butyloxycarbonyl
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSC	Differentielle Scanning-Kalorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EI-MS	Electron Impact-Massenspektrometrie
eq	Äquivalent(e)
FAB-MS	Fast Atom Bombardment- Massenspektrometrie
Fmoc	<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
h	Stunde
HATU	<i>N</i> -[(dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5 <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
kDa	Kilo-Dalton
M	Molarität
MESA	Mercaptoethansulfonsäure
MIC	Maleinimidocaproyl
min	Minuten
min	Minuten
Mmt	4-Monomethoxytrityl
Ms	Methansulfonyl
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitoyl
PMC	Pentamethylchromansulfonamid
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin
PPTS	Pyridinium <i>para</i> -Toluolsulfonat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
tert	tertiär
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett
v	Volumen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessanten Themenstellungen und für die Betreuung und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Laborkollegen aus dem Labor D 3.14 danke ich für das tolle Umfeld in den letzten drei Jahren. Im Einzelnen danke ich Dr. Reinhard Reents für seine Art, auch unangenehmen Dingen etwas Positives abzugewinnen. Lars Wittenberg war durch sein fundiertes Chemiewissen bei manchen Problemen eine stete Quelle neuer Anregungen und hat uns darüber hinaus manchen Spaß bereitet („Mutter“). Sasikala Thavam danke ich für die tolle praktische Unterstützung und dafür, dass sie von Zeit zu Zeit die Ordnung in unserer *Männerwirtschaft* wiederherstellte, wodurch wir nicht ganz im Chaos versanken. Martin Völkert danke ich nicht nur für den *Wahrnehmungs-Man*, sondern dafür, ein unentbehrlicher Gesprächspartner in allen Lebenslagen zu sein. Elisabeth Gonthier war nicht nur durch ihre zahlreichen leckeren Beiträge ein äußerst willkommener *Gast* unserer Kuchenrunde.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich für die gute Atmosphäre und manche gemeinsame Unternehmung bedanken.

Dr. Rolf-Peter Breibauer, Elisabeth Gonthier, Maja Köhn, Martin Völkert und Alexander Wolf danke ich für die rasche und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Kooperationspartnern Alexander Wolf, Dr. Jürgen Kuhlmann, Christine Nowak und Melanie Wagner danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit auf dem Hedgehog-Projekt. Dr. Richard M. Epanand danke ich für die freundliche Aufnahme in Hamilton und interessante Zusammenarbeit auf dem Influenza-Projekt. Maja Köhn und Dr. Rolf-Peter Breinbauer sei für die tollen gemeinsamen Untersuchungen an der *Glasfront* gedankt. Martin Völkert danke ich für das exzellente Teamwork bei der Synthese eines *unverschämt teuren Farbstoffes*.

Der Herrmann-Schlosser-Stiftung der Degussa AG danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Den analytischen Abteilungen der Universität Dortmund und des Max-Planck-Instituts Dortmund danke ich für die Durchführung der Analysen. Besonderer Dank gilt Sandra Eichhorn, Dörte Goehrke, Dr. Petra Janning, und Christiane Vornweg für die zügige Aufnahme der zahlreichen Massenspektren.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carsten Peters
Geboren am: 15.05.1974 in Werl (Deutschland)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/ 1980-07/ 1984 Marien-Grundschule in Werl-Büderich
08/ 1984-06/ 1993 Marien-Gymnasium in Werl
14.06.1993 Schulabschluss mit Reifezeugnis

Wehrdienst:

10/ 1993-09/ 1994 Wehrdienst bei 6./FlaRakGrp 38 in Bad Arolsen (Hessen)

Studium:

10/ 1994-09/ 1996 Chemie-Grundstudium an der Ruhr-Universität Bochum
07/10/1996 Diplom-Chemiker Vorexamen
10/ 1996-10/ 1998 Chemie-Hauptstudium an der Ruhr-Universität Bochum
11/ 1998-05/ 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Organische Chemie I
-Bioorganische Chemie- der Ruhr-Universität Bochum unter der
Betreuung von Prof. Dr. G. von Kiedrowski über das Thema
*Aufbau von Nanostrukturen über immobilisierte
Trisligonucleotidyle*
25.05.1999 Diplom-Chemiker Hauptexamen

Promotion:

seit 11/ 1999 Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an
der Universität Dortmund und am Max-Planck Institut für
molekulare Physiologie, Dortmund mit dem Thema *Synthese
und biologische Evaluierung sterolmodifizierter Hedgehog-
Signalpeptide und Proteine*
07/ 2003 Promotion

Dortmund, im Juni 2003