

Laufe von zwei Monaten kleine, gelbe Kristalle von **1** [MS (Cl, Positiv-Ionen-Modus,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  1608–1612 ( $M^+$ ) und **2** [ $m/z$  1643–1658 ( $M^+ + \text{H}$ )].

Eingegangen am 10. Februar,  
veränderte Fassung am 29. April 1997 [Z 10091]

**Stichwörter:** Antimon · Polycyclen · Strukturaufklärung

- [1] a) K. Issleib, B. Hamann, L. Schmidt, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1965**, 339, 298–303; b) J. Ellermann, A. Veit, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 377; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 375; c) H. J. Breunig, A. Soltani-Neshan, *J. Organomet. Chem.* **1984**, 262, C27–C29; d) M. Ates, H. J. Breunig, K. Ebert, S. Gülec, R. Kaller, M. Dräger, *Organometallics* **1992**, 11, 145–150; e) T. F. Berlitz, H. Sinning, L. Lorberth, U. Müller, *Z. Naturforsch. B* **1988**, 43, 744–748; f) O. M. Kekia, R. L. Jones, Jr. A. L. Rheingold, *Organometallics* **1996**, 15, 4104–4106; g) Übersicht: H. J. Breunig in *The Chemistry of Organic Arsenic, Antimony and Bismuth Compounds* (Hrsg.: S. Patai), Wiley, Chichester, **1994**, S. 563.
- [2] a) U. Bolle, W. Tremel, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 91–93; b) S. Charles, B. W. Eichhorn, A. L. Rheingold, S. G. Bott, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8077–8086; c) C. J. Warren, D. M. Ho, R. C. Haushalter, A. B. Bocarsely, *Angew. Chem.* **1993**, 1684–1687; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1646–1649; d) S. C. Critchlow, D. Corbett, *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 770–774.
- [3] Übersicht: M. Baudler, K. Glinka in *The Chemistry of Inorganic Homo- and Heterocycles*, Vol. 2 (Hrsg.: I. Haiduc, D. B. Sowerby), Academic Press, London, **1987**, S. 423.
- [4] Kristallabmessungen  $0.5 \times 0.4 \times 0.15$  mm, Kristallsystem triklin, Raumgruppe  $P\bar{1}$ , Zellabmessungen  $a = 915.6(7)$ ,  $b = 1781.5(7)$ ,  $c = 1794.7(10)$  pm,  $\alpha = 93.54(3)^\circ$ ,  $\beta = 92.87(7)^\circ$ ,  $\gamma = 104.56(6)^\circ$ ,  $V = 2.822(3)$  nm<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $\rho_{\text{ver.}} = 1.897$  Mg m<sup>-3</sup>,  $2\theta_{\text{max.}} = 45.4^\circ$ , Siemens-P4-Vierkreisdiffraktometer,  $\text{MoK}_\alpha$ -Strahlung,  $\lambda = 71.073$  pm, Scanmodus  $2\theta - \omega$ ,  $T = 173(2)$  K, Zahl der gemessenen Reflexe 9170, Zahl der unabhängigen Reflexe 7365 ( $R_{\text{int}} = 0.090$ ) davon 3630 mit ( $I > 2\sigma(I)$ ), Absorptionskoeffizient  $3.956$  mm<sup>-1</sup>, Absorptionskorrektur Difabs, Strukturlösungsverfahren Direkte Methoden, Strukturlösungsprogramm SHELXS-86, Verfeinerungsverfahren Vollmatrix- kleinste-Quadrate-Verfeinerung an  $F^2$ , Verfeinerungsprogramm SHELXL-93, Zahl der freien Parameter 424, Wasserstoffatome geometrisch positioniert und mit einem Reitermodell verfeinert, endgültige  $R$ -Werte,  $R1$  ( $I > 2\sigma(I)$ ) = 0.0957,  $wR2 = 0.2507$ . Die kristallographische Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-100169“ beim Cambridge Crystallographic Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Telefax: Int. +1223/336033; E-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).
- [5] M. Baudler, V. Arndt, *Z. Naturforsch. B* **1984**, 39, 275–283.
- [6] H. J. Breunig, W. Kanig, A. Soltani-Neshan, *Polyhedron*, **1983**, 2, 291–292.

## Chemoenzymatische Synthese fluoreszierender N-Ras-Lipopeptide und ihre Verwendung bei In-vivo-Studien zur Membranlokalisierung\*\*

Herbert Waldmann,\* Michael Schelhaas, Edgar Nägele, Jürgen Kuhlmann, Alfred Wittinghofer,\* Hans Schroeder und John R. Silvius\*

Professor Heribert Offermanns zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Lipidierung von Proteinen durch kovalente Anknüpfung einer Myristoylgruppe an ein N-terminales Glycin sowie durch S-Palmitoylierung und S-Alkylierung von Cysteinen mit Farnesyl- oder Geranylgeranylresten gehört zu den bedeutendsten Modifizierungen von Proteinen in der Natur.<sup>[1]</sup> Lipoproteine übernehmen bei zahlreichen biologischen Prozessen wichtige Aufgaben, insbesondere sind sie entscheidend in die Weiterleitung hormoneller und mitogener Signale durch die Plasmamembran und von dort zum Zellkern involviert. So sind die membrandurchspannenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S-palmitoyliert, die heterotrimeren G-Proteine sind N-myristoyliert, S-palmitoyliert und S-farnesyliert, Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind N-myristoyliert und S-palmitoyliert, die Ras-Proteine schließlich tragen S-Palmitoyl- sowie S-Farnesylgruppen. Darüber hinaus sind zahlreiche weitere, membranassoziierte Proteine, z. B. die  $\text{NO}_x$ -Synthetase<sup>[2]</sup> und virale Hüllproteine,<sup>[3]</sup> S-palmitoyliert.

[\*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. M. Schelhaas, Dr. E. Nägele  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe  
Telefax: Int. + 721/608-4825  
E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

Prof. Dr. F. Wittinghofer, Dr. J. Kuhlmann  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Rheinlanddamm 201, D-44026 Dortmund  
Prof. J. R. Silvius, H. Schroeder  
Department of Biochemistry, McGill University  
Montréal, Quebec H3G 1Y6 (Kanada)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Medical Research Council of Canada gefördert.

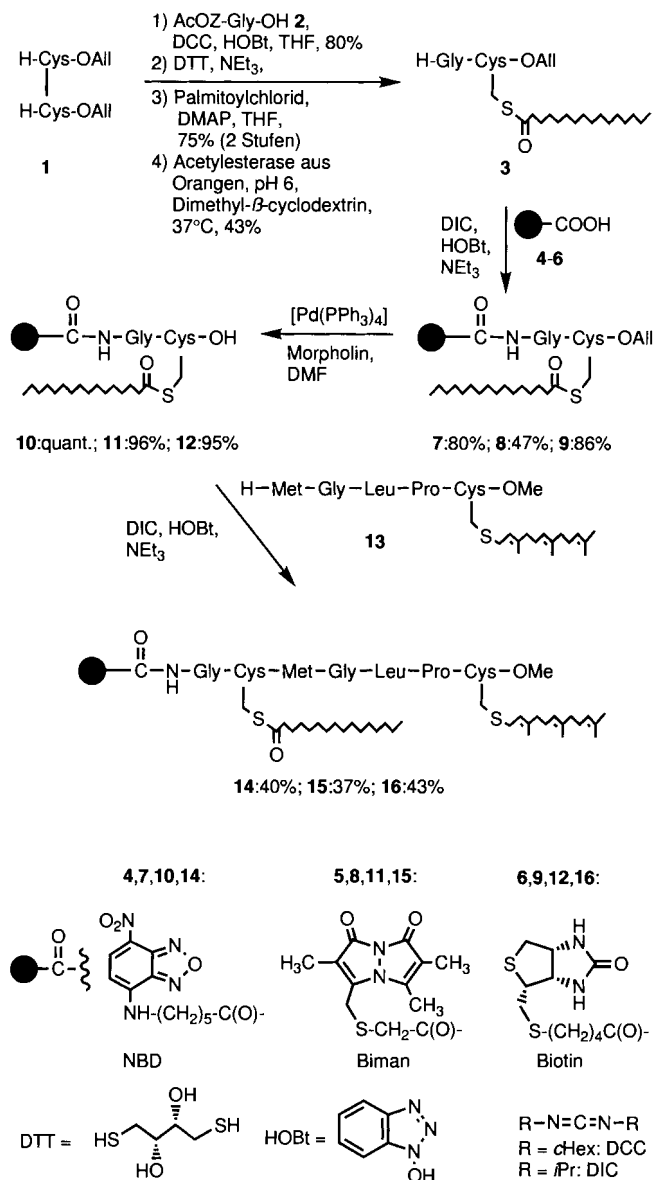
Angesichts der wichtigen biologischen Rollen lipidmodifizierter Proteine gehört die Untersuchung der Proteinlipidierung und ihrer biologischen Bedeutung zu den aktuellen Themen der biologischen Forschung.<sup>[1]</sup> Im Falle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren<sup>[4]</sup> und der Ras-Proteine (siehe unten) konnte belegt werden, daß die korrekte Lipidierung dieser Proteine für ihre biologischen Funktionen sehr wichtig ist. Die biologische Bedeutung der unterschiedlichen Lipidreste, besonders ihre möglichen Funktionen in Signaltransduktionsprozessen, ist allerdings weitgehend ungeklärt und Gegenstand zahlreicher Hypothesen.<sup>[1]</sup> Detaillierte Kenntnisse der Voraussetzungen für eine transiente oder stabile Insertion von Lipopeptiden in biologische Membranen könnten darüber hinaus eine Verbesserung von Wirkstoffen ermöglichen, die in pathologische Signaltransduktionsprozessen, wie die über oncogenes Ras verlaufenden, eingreifen.

Lipidierte Peptide, die die typischen Lipidgruppen und Aminosäuren der zugrundeliegenden Lipoproteine enthalten und zusätzlich Reportergruppen tragen, durch die sie in biologischen Systemen aufgespürt werden können (z. B. Fluoreszenzmarker, die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können), sind wertvolle Reagentien für das Studium solcher Prozesse durch Kombination biophysikalischer<sup>[5]</sup> und zellbiologischer<sup>[6]</sup> Methoden.<sup>[7]</sup>

Wir berichten hier über eine neue, effiziente Methode für die Synthese fluoreszenzmarkierter Lipopeptide und über deren Anwendung bei der Untersuchung der spezifischen Membranlokalisierung von Lipopeptiden und -proteinen durch Membranfusion und Fluoreszenzmikroskopie sowie durch Mikroinjektion und confocale Laserfluoreszenzmikroskopie.

Bei der Entwicklung der neuen Synthesemethode haben wir auf unsere Erfahrungen bei der Herstellung säure- und basenlabiler S-palmitoylierter und S-farnesylierter Ras-Lipopeptide zurückgegriffen.<sup>[8]</sup> Die Ras-Proteine sind membrangebundene lipidmodifizierte Proteine, die von Wachstumsfaktoren ausgelöste Signale zum Zellkern weiterleiten und die oft an der Etablierung maligner Transformationen beteiligt sind.<sup>[9]</sup> Sowohl im normalen als auch im transformierten Zustand können sie ihre Aufgaben nur erfüllen, wenn sie lipidiert sind.<sup>[9]</sup>

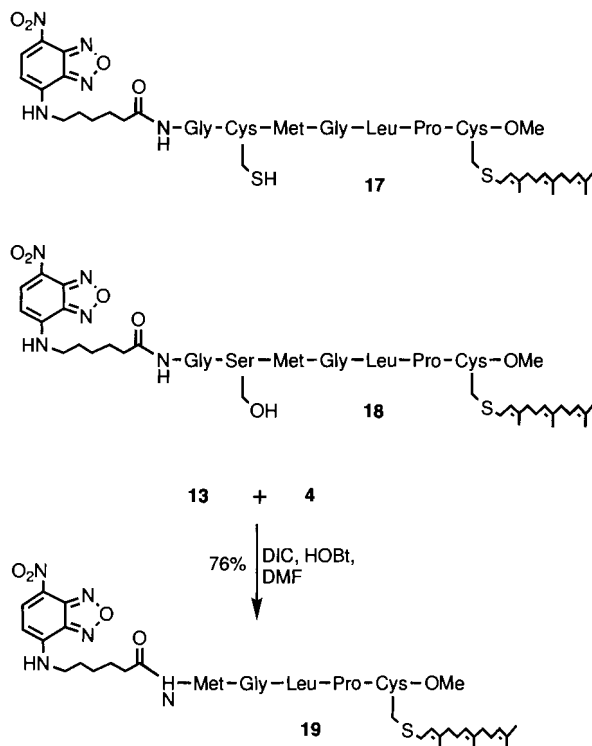
Als Zielverbindungen wurden die unterschiedlich markierten N-Ras-Heptapeptide **14–18** gewählt. Retrosynthetisch wurden diese in verschiedenartig markierte N-terminale Dipeptide und ein gleichbleibendes C-terminales Pentapeptid **13**, das eine säurelabile Farnesylsulfanylgruppe trägt (Schema 1), zerlegt. Dieses Peptid kann in hoher Ausbeute durch enzymatische Abspaltung der N-terminalen *p*-Acetoxybenzyloxycarbonyl (AcOZ)-Gruppe<sup>[8a]</sup> oder der basenvermittelten Ablösung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe<sup>[8c]</sup> als Schlüsselschritt erhalten werden. Die Synthese der selektiv entschützten, S-palmitoylierten Peptide **14–16** wird durch die Basenlabilität der Sulfanylcarbonylgruppe erschwert. So hydrolysieren diese Grup-



Schema 1. Chemoenzymatische Synthese der markierten, farnesylierten und palmitoylierten N-Ras-Lipopeptide **14–16**.

pen in S-palmitoylierten Peptiden selbst bei pH 7 in wässriger Lösung spontan.<sup>[8b]</sup> Wir berichten nun, daß S-palmitoylierte Peptide effizient durch Kombination der Pd<sup>0</sup>-vermittelten Allyl-esterspaltung<sup>[10]</sup> für die C-terminale Deblockierung mit der enzymatischen Ablösung des AcOZ-Restes<sup>[8a]</sup> für die N-terminale Entschützung der Peptidkette aufgebaut werden können. Der Cystinbisallylester **1** wurde mit AcOZ-Glycin **2** in hoher Ausbeute zum entsprechenden Peptid verknüpft. Nach reduktiver Spaltung des Disulfids mit Dithiothreitol (DTT) wurden die Sulfanylgruppen palmitoyliert und der N-terminale AcOZ-Rest durch Acetylerase aus Orangen abgelöst. Der selektiv entschützte, S-palmitoylierte Dipeptidallylester **3** ist auf diese Weise gut zugänglich und wurde dann mit unterschiedlichen Markergruppen verknüpft. So wurden die fluoreszierenden 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl(NBD)- und die Bimanylgruppe mit den Reagentien **4** bzw. **5** eingeführt. Zusätzlich wurde **3** mit dem Biotinderivat **6** gekuppelt. Die vollgeschützten Peptide wurden dann durch Behandlung mit [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] und Morpholin als allylacceptierendem Nucleophil in hoher Ausbeute in die gezielt entschützten, fluoreszenzmarkierten Dipeptide **10–12**

umgewandelt. Bei den N- und C-terminalen Schutzgruppenabspaltungen trat keine unerwünschte Nebenreaktion auf. Die Bedingungen für die enzymatische Ablösung des AcOZ-Restes und die Pd<sup>0</sup>-vermittelte Spaltung des Allylesters sind so mild, daß weder ein direkter Angriff auf den basenlabilen Thioester noch eine baseninduzierte β-Eliminierung eintritt.<sup>[8]</sup> Schließlich wurden **10–12** mit dem N-terminal deblockierten Pentapeptid **13** zu den unterschiedlich markierten S-farnesylierten und S-palmitoylierten Ras-Heptapeptiden **14–16** kondensiert. In ähnlicher Weise wurden die NBD-Heptapeptide **17** und **18** aufgebaut. Darüber hinaus lieferte die Umsetzung des farnesylierten Pentapeptids **13** mit der NBD-Aminocaprinsäure **4** das markierte Peptid **19** (Schema 2).



Schema 2. Die markierten, farnesylierten N-Ras-Peptide **17–19**.

Die NBD- und die bimanylmarkierten Peptide können in biologischen und In-vitro-Modellsystemen direkt fluoreszenzmikroskopisch und spektroskopisch detektiert werden. Der Biotinmarker kann mit dem Protein Streptavidin aufgespürt werden, das auch in fluoreszenzmarkierter Form und mit kolloidalem Gold modifiziert erhältlich ist und so die Untersuchung lipidmodifizierter Modellproteine durch Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie ermöglicht.<sup>[11]</sup>

Die Frage, ob spezielle Lipidmotive Lipoproteine zu bestimmten Membranen dirigieren, gehört zu den aktuellen und ungelösten Problemen bei der Erforschung der biologischen Funktion der Lipidierung von Proteinen.<sup>[8]</sup> Weil mehrere in die Plasmamembran eingelagerte Proteine farnesyliert sind, während Proteine in intrazellulären Membranen oft geranylgeranyliert sind (z. B. die Rab-Proteine<sup>[12]</sup>), wurde vorgeschlagen, daß lipidierte Proteine durch S-Farnesylierung spezifisch zur Plasmamembran dirigiert werden, z. B. durch eine Wechselwirkung mit Rezeptoren.<sup>[11, 13]</sup> Um dieser Frage nachzugehen und um zu bestimmen, ob die in den Ras-Modellpeptiden **14**, und **17–19** vorliegenden Lipidmotive und Aminosäuresequenzen eine spezifische Lokalisierung dieser Sonden in einer bestimmten subzellulären Membran, insbesondere der Plasmamembran, bewir-

ken, haben wir In-vivo-Studien mit den markierten Peptiden durchgeführt.

Zunächst wurden das nur farnesylierte und nicht palmitoylierbare NBD-markierte Pentapeptid **19** sowie das palmitoylierte und farnesylierte NBD-markierte Lipoheptapeptid **14** in NIH-3T3-Fibroblastenzellen mikroinjiziert. Nach 30 min wurde die Verteilung der Peptide in den Zellen durch confocale Laserfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Abbildung 1 oben zeigt den Befund für **19** und belegt, daß das Peptid nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist. Abbildung 1 unten zeigt den

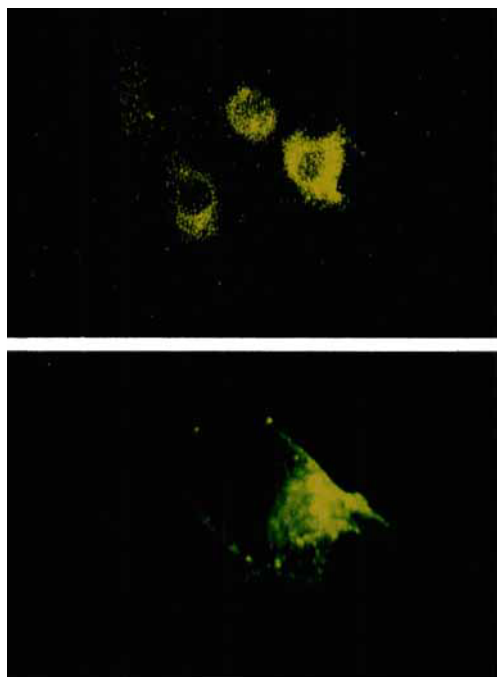


Abb. 1. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3-Fibroblastenzellen. Oben: Nach Mikroinjektion des Pentapeptids **19**; unten: nach Mikroinjektion des Heptapeptids **14** [20]. Die obere Aufnahme zeigt, daß **19** nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist, während die untere Aufnahme eine Anreicherung von **14** in der Plasmamembran erkennen läßt.

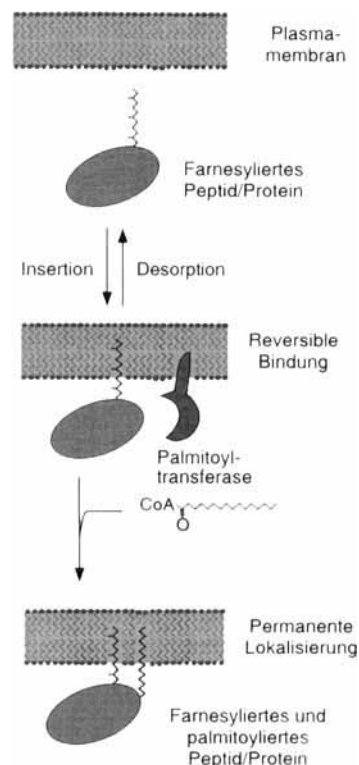
entsprechenden Befund für **14**: Eindeutig ist das doppelt modifizierte Peptid spezifisch in die Plasmamembran eingelagert. Die Fluoreszenzintensität ist in der Membran um die Einstichstelle (großer gelber Fleck) und von dort in die Dendriten der Zelle ausgedehnt am höchsten. Die bemerkenswerten „hot spots“ scheinen Membrankompartimente zu repräsentieren, in denen das Lipopeptid besonders angereichert ist.

In weiteren Experimenten wurde die Palmitoylierung der Lipopeptide **17** und **18** untersucht und der subzelluläre Ort, an dem diese Modifizierung stattfindet, bestimmt. Dafür wurden kultivierte CV-1-Fibroblasten mit [<sup>3</sup>H]Palmitinsäure und ultraschallbehandelten Vesikeln (bestehend aus Phosphatidylcholin, das aus Eigelb extrahiert wurde, und 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamin im Verhältnis 90:10), die mit Lipopeptiden beladen waren,<sup>[6]</sup> inkubiert. Die Palmitoylierung der fluoreszierenden Peptide nach Fusion der Vesikel mit der Zellmembran wurde nach Extraktion der Fibroblastenzellen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Szintillationszählen analysiert.<sup>[6]</sup> Das S-acylierte Peptid wurde anhand seiner Fluoreszenz mit dem Peptid **14** als Referenzverbindung aufgespürt. Dabei zeigte sich, daß das N-Ras-Peptid **17**, das ein farnesyliertes und ein nicht-S-acyliertes Cystein enthält, rasch in den

Fibroblasten acyliert und dadurch in das palmitoylierte und farnesylierte **14** überführt wurde. Das Serinylpeptid **18** wurde unter diesen Bedingungen überhaupt nicht acyliert.

Der subzelluläre Ort, an dem die S-Acylierung von **17** stattfand, konnte fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden.<sup>[6]</sup> Das S-acylierte Peptid **14** akkumulierte nach Inkubieren der CV-1-Fibroblasten mit lipidbeladenen Vesikeln und selektiver Extraktion von nicht acyliertem Peptid bevorzugt in der Plasmamembran. Um zu überprüfen, ob das Peptid in einer intrazellulären Membran, z. B. in einem Kompartiment des endoplasmatischen Reticulums oder des Golgi-Apparats, acyliert und dann z. B. durch vesikulären Membrantransport<sup>[14]</sup> rasch zur Plasmamembran gebracht wurde, wurden die Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Im Golgi-Apparat und in Trans-Golgi-Kompartimenten konnte jedoch weder bei 37 °C (normaler vesikulärer Transport) noch bei 15 °C (unterdrückter Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran<sup>[15]</sup>), Fluoreszenz beobachtet werden. Bei beiden Temperaturen war die Fluoreszenz dagegen in der Plasmamembran hoch. Da zweifach lipidmodifizierte Peptide wie **14** nur zu einem vernachlässigbar kleinen Teil spontan zwischen verschiedenen Membranen ausgetauscht werden<sup>[5, 6]</sup> (Lipopeptide wie **19**; die nur eine Farnesylgruppe tragen, tauschen rasch zwischen verschiedenen Membranen aus), weisen diese Beobachtungen darauf hin, daß die Plasmamembran selbst einer der bevorzugten Orte der zellulären S-Acylierung ist. Zellen, die mit dem Serinylpeptid **18** inkubiert wurden, fluoreszierten hingegen nur schwach.

Diese In-vivo-Experimente mit den markierten N-Ras-Peptiden sprechen für die Gültigkeit eines kürzlich von Silvius et al.<sup>[5]</sup> vorgeschlagenen Modells für die subzelluläre Lokalisierung von Lipoproteinen (Schema 3). Nach diesem Modell kann das farnesylierte, aber nicht acylierte C-terminale Heptapeptid **17** von N-Ras (und auch das analoge Pentapeptid **19**) frei zwischen ver-



Schema 3. Modell für die Adressierung von Lipoproteinen an die Plasmamembran durch S-Palmitoylierung.

schiedenen Membranen diffundieren. Nachdem 17 in einem bestimmten zellulären Membrankompartiment S-acyliert worden ist (dies ist für 19 nicht möglich), kann das nun doppelt lipidmodifizierte Peptid nicht mehr zwischen verschiedenen Membranen transferiert werden. Es wird somit in der Membran lokalisiert, in der die S-Acylierung stattfindet, d.h. im Falle des N-Ras-Peptids in der Plasmamembran. Das mikroinjizierte, zweifach modifizierte Konjugat 14 könnte rasch in der Nähe der Injektionsstelle in die Plasmamembran eingelagert werden und würde dann, durch die beiden Lipidgruppen verankert, dort bleiben. Darüber hinaus könnte es unter den Bedingungen des Assays enzymatisch<sup>[16]</sup> oder nichtenzymatisch am Schwefel entacyliert und nachfolgend an der Plasmamembran wieder reacyliert werden.

Dieses Modell sollte auch für die co- und posttranslationale Modifizierung membrangebundener lipidmodifizierter Proteine durch S-Farnesylierung und S-Palmitoylierung gelten, insbesondere für die Ras-Proteine selbst. Die spezifische Lokalisierung von Lipoproteinen in bestimmten Membranen würde danach nicht nur durch die zuerst eingeführte Lipidgruppe bestimmt, sondern vielmehr durch das Anbringen des zweiten Lipidrestes an der Stelle, an der das Protein verbleiben soll. Diese Vorstellung wird auch dadurch unterstützt, daß kürzlich eine plasmamembrangebundene Protein-S-acyltransferase identifiziert wurde,<sup>[17]</sup> die das freie Cystein im C-terminalen Hexadecapeptid von N-Ras und ähnlich positionierte Cysteine im H-Ras-Protein acyliert. Das vorgeschlagene Modell eines kinetisch kontrollierten Adressierens („kinetic targeting“) berücksichtigt nicht, daß auch spezifische Transportproteine an der Lokalisierung von Lipoproteinen in bestimmten Membranen beteiligt sein können. Es erklärt aber, daß sehr kleine Proteinbereiche wie Lck, Fyn, H- und N-Ras, die die S-Acylierungsstellen enthalten, nach Einbringen in chimäre oder mutierte Proteine sowohl notwendig als auch hinreichend für eine Adressierung dieser Proteine an die Plasmamembran sind.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus wurde kürzlich für das Protein Fyn<sup>[19]</sup> und auch für einfache Lipopeptide, die Substrate für die S-Acylierung sind und die Termini von Proteinen wie Fyn und Lck sind,<sup>[6]</sup> belegt, daß sie durch Acylierung an der Plasmamembran über einen „kinetic targeting“-Mechanismus dort akkumulieren.

Eingegangen am 14. April 1997 [Z 10283]

**Stichwörter:** Fluoreszenzspektroskopie · Lipoproteine · Membranen · Ras-Proteine · Signaltransduktion

- [1] Übersichten: a) P. J. Casey, *Science* **1995**, 268, 221; b) G. Milligan, M. Parenti, A. I. Magee, *TIBS* **1995**, 181.
- [2] L. J. Robinson, T. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 11776.
- [3] a) E. Ponimaskin, M. F. G. Schmidt, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, 23, 565; b) C. Yang, C. P. Spies, R. W. Compans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9871; c) J. Hensel, M. Hintz, M. Kargs, D. Linder, B. Stahl, R. Geyer, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 232, 373.
- [4] Für den G-Protein-gekoppelten  $\beta_2$ -Adrenoceptor (S. Moffet, B. Mouillac, H. Bonin, M. Bouvier, *EMBO J.* **1993**, 12, 349) und Rhodopsin (E. R. Weiss, S. Osawa, W. Shi, C. D. Dickerson, *Biochemistry* **1994**, 33, 7587) wurde gezeigt, daß die S-Palmitoylierung eine zentrale Rolle bei der Regulierung der zugehörigen Effektorsysteme spielt.
- [5] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, 34, 3813, zit. Lit.
- [6] H. Schroeder, R. Leventis, S. Shahinian, P. A. Walton, J. R. Silvius, *J. Cell. Biol.* **1996**, 134, 647.
- [7] Übersicht: R. S. Bhatnagar, J. I. Gordon, *Trends Cell Biol.* **1997**, 14.
- [8] a) H. Waldmann, E. Nägele, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2259; b) M. Schelhaas, S. Glomsda, M. Hänsler, H.-D. Jakubke, H. Waldmann, *ibid.* **1996**, 108, 82 bzw. **1996**, 35, 106; c) P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 75. Übersichten über die enzymatische Synthese von Lipo-, Glyco-, Phospho- und Nucleopeptiden: M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2192; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2056; T. Kappes, H. Waldmann, *Liebigs Ann.* **1997**, 803; K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, im Druck.

- [9] Übersichten: a) S. E. Egan, R. A. Weinberg, *Nature* **1993**, 365, 781; b) M. S. Boguski, F. McCormick, *ibid.* **1993**, 366, 643.
- [10] S. Friedrich-Bochnitschek, H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 751.
- [11] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [12] A. Valencia, P. Chardin, A. Wittinghofer, C. Sander, *Biochemistry* **1991**, 30, 4637.
- [13] a) A. I. Magee, *J. Cell Science* **1990**, 97, 581; b) W. A. Maltese, *FASEB J.* **1990**, 4, 3319; c) K. A. Cadwallader, H. Paterson, S. G. Macdonald, J. T. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 4722; d) O. G. Kisselev, M. V. Ermolaeva, N. Gautam, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21339; e) A. Scheer, P. Gierschik, *Biochemistry* **1995**, 34, 4952.
- [14] L. Gutierrez, A. I. Magee, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1078, 147.
- [15] a) K. S. Matlin, K. Simons, *Cell* **1983**, 34, 233; b) J. Saraste, E. Cuisinier, *ibid.* **1984**, 35, 535; c) M. R. Kaplan, R. D. Simoni, *J. Cell Biol.* **1985**, 101, 446; d) R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang, R. P. Haugland, *ibid.* **1991**, 113, 1267; e) Y.-J. Shiao, J. E. Vance, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 26085; f) C. N. Connolly, C. E. Futter, A. Gobson, C. R. Hopkins, D. F. Cutler, *J. Cell. Biol.* **1994**, 127, 641.
- [16] Für die Identifizierung einer Palmitoyl-Esterase, die H-Ras depalmitoyliert, siehe: J.-Y. Lu, S. Hofmann, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 7251.
- [17] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23269.
- [18] a) L. Alland, S. M. Peseckis, R. E. Atherton, L. Berthiaume, M. Resh, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 16701; b) L. Berthiaume, M. D. Resh, *ibid.* **1995**, 270, 22399; c) J. F. Hancock, K. Cadwallader, H. Patterson, C. J. Marshall, *EMBO J.* **1991**, 10, 4033; d) A. M. Shenoy-Scaria, L. K. Timson Gauen, J. Kwong, A. S. Shaw, D. M. Lublin, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 13, 6385; e) A. M. Shenoy-Scaria, D. J. Dietzen, J. Kwong, D. C. Link, D. M. Lublin, *J. Cell. Biol.* **1994**, 126, 353.
- [19] W. van't Hof, M. D. Resh, *J. Cell. Biol.* **1997**, 136, 1023.
- [20] NIH-3T3-Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Adlermedium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Gibco) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 7.5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Mikroinjektionsexperimente wurden unter Kulturmedium (mit 20 mM Na-HEPES auf pH 7.4 gepuffert) an einer Zeiss-Mikroinjektionseinheit (AIS) unter Verwendung dünner Borsilicat-Glaskapillaren mit Filament (Hilgenberg) und einem Öffnungsdurchmesser  $\leq 0.5 \mu\text{m}$  durchgeführt. Die Verteilung der Fluorophore wurde 30 min nach Injektion mit einem confocalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) auf Basis eines MRC-500-Systems (BioRad) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ermittelt.

## MCM-41 mit nanometergroßen AgRu-Partikeln in den Hohlräumen – Herstellung, Charakterisierung und Katalysatoreigenschaften\*\*

Douglas S. Shepard, Thomas Maschmeyer, Brian F. G. Johnson,\* John Meurig Thomas,\* Gopinathan Sankar, Dogan Ozkaya, Wuzong Zhou, Richard D. Oldroyd und Robert G. Bell

Es besteht ein beträchtliches Interesse, die Bildung und die Strukturen von Dimetallkatalysatorpartikeln zu verstehen und deren Katalysatoreigenschaften in neuen Reaktionen zu nutzen. Dieses Interesse geht auf Arbeiten von Sinfelt et al.<sup>[1]</sup> zurück, in denen gezeigt wurde, daß Ru-Cu-, Pt-Ir- und Pt-Re-Verbindungen auf Aluminiumoxidträgern sehr gute Reformier-Katalysatoren sind. Seitdem mesoporöse Feststoffe<sup>[2,3]</sup> mit Porendurchmessern zwischen 25 und 100 Å leicht herstellbar sind und katalytisch aktive „Monometallzentren“ – etwa Ti<sup>IV</sup>-Ionen, die

[\*] Prof. B. F. G. Johnson, Dr. D. S. Shephard, Dr. W. Zhou  
The University Chemical Laboratories  
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)  
Prof. Sir J. M. Thomas, Dr. T. Maschmeyer, Dr. G. Sankar, Dr. R. D. Oldroyd, R. G. Bell  
Davy-Faraday Research Laboratories  
The Royal Institution of Great Britain  
21 Albemarle Street, London, W1X 4BS (Großbritannien)  
Dr. D. Ozkaya  
Department of Materials Science  
University of Cambridge

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Engineering and Physical Sciences Research Council sowie durch die Europäische Union (Stipendium für T. M.) unterstützt.