

ANGEWANDTE
CHEMIE © WILEY-VCH

Die biologische Signaltransduktion regelt wesentliche zelluläre Funktionen wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel. Bei der Aufklärung der einzelnen Signalpfade wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt. Die Synthese von Teilstrukturen der Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, sowie von Naturstoffen und ihren Analoga, die in Signalkaskaden eingreifen, trägt dazu bei, die entscheidenden Wechselwirkungen im molekularen Detail aufzuklären, besser zu verstehen und gezielt beeinflussen zu können.

Organische Synthese und biologische Signaltransduktion

Klaus Hinterding, Daniel Alonso-Díaz und Herbert Waldmann*

Professor Dieter Seebach zum 60. Geburtstag gewidmet

Viele biologische Phänomene werden heute im molekularen Detail untersucht und verstanden, und die Organische Chemie wendet sich zunehmend biologischen Phänomenen zu. An der Grenze zwischen beiden Disziplinen entwickelt sich daher die „Bioorganische Chemie“, in der sowohl biologische als auch chemische Forschung betrieben wird. Das Zusammenspiel zwischen organischer Synthese und Biologie wird hier am Beispiel der biologischen Signaltransduktion be-

leuchtet. Für die Signalweiterleitung über Rezeptor-Tyrosinkinasen und das Ras-Protein sowie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird gezeigt, wie von einem biologischen Phänomen ausgehend Strukturinformationen erhalten werden können, die zur Entwicklung neuer chemischer Methoden und Synthesen sowie nachfolgend neuer Reagenzien für biologische Studien führen. Im einzelnen werden bioorganische Arbeiten zu Protein-Tyrosinkinasen, zu Wechselwirkungen über

SH2- und SH3-Domänen, zur Protein-Farnesyltransferase, zur Verwendung von Peptidkonjugaten und Inositolphosphaten, zu den Proteinkinasen A und C sowie zu Proteinphosphatasen und zur ligandeninduzierten Dimerisierung von Proteinen vorgestellt.

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Enzyminhibitoren • Peptidkonjugate • Signaltransduktion • Synthesemethoden

What interests us all is finding that deep current – in my case, the most rational understanding of life: its reduction to the molecular details of chemistry.

A. Kornberg^[1]

My idea is that chemistry is the central science. Everything that goes on in biology or medicine has a chemical basis.

R. Lerner^[2]

1. Einleitung

Biologische Vorgänge basieren auf chemischen Prozessen und werden durch die Struktur der beteiligten Moleküle und deren Wechselwirkungen bestimmt. Im Grunde können alle biologischen Vorgänge auf chemische reduziert werden: Die Biologie ist molekular.^[3] Diese Erkenntnis beeinflusst besonders in jüngster Zeit die biologische Forschung. Heute werden viele biologische Phänomene im molekularen Detail untersucht und verstanden, und die zunehmend wichtiger werdennde Strukturbioologie^[4] rückt zusehends in das Blickfeld der Organischen Chemie. So wie sich die Dimension der Studien-

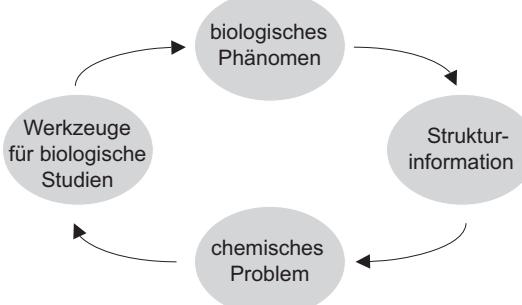
objekte der Biologie verkleinert hat, wendet sich die Organische Chemie zunehmend größeren Molekülen und molekularen Systemen zu. Infolge der hohen Leistungsfähigkeit der organischen Synthese sind heute auch die kompliziertesten der als biologisch relevant erkannten Natur- und Wirkstoffe herstellbar, und nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen großen Molekülen, die in der Natur z. B. die Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen sowie Erkennungsphänomene an Zelloberflächen bestimmen, sind Gegenstand der „Supramolekularen Chemie“. Als Folge der Angleichung von Art und Dimensionen der Gegenstände biologischer und organisch-chemischer Forschung durchdringen sich die beiden Wissenschaften zunehmend, und an der Grenzfläche zwischen beiden etabliert sich ein immer größer werdendes Grenzgebiet: die „Bioorganische Chemie“.

Obwohl dieser Begriff bereits seit einiger Zeit verwendet wird,^[5] ist er bis heute nicht klar und fest definiert (und hierfür besteht auch nicht unbedingt eine Notwendigkeit). Nach unserer Meinung betreibt ein „Bioorganiker“ aktiv Forschung in Chemie *und* (!) Biologie,^[6] er vereint die „two cultures of chemistry and biology“.^[7] Der Schwerpunkt der Arbeiten kann dabei durchaus im Bereich der Chemie oder der Biologie liegen und beispielsweise die Anwendung von Methoden und Werkzeugen der Organischen Chemie zum Studium biologischer Probleme oder den Einsatz biologischer Techniken zur Bearbeitung chemischer Fragestellungen zum Gegenstand haben. Dieser tendenzielle Unterschied kann

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. K. Hinterding, Dr. D. Alonso-Díaz
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Fax: (+49) 721-608-4825
E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

durch eine nähere Kennzeichnung mit den Begriffen „Chemische Biologie“ und „Biologische Chemie“ verdeutlicht werden.

Eines der möglichen Szenarien für die erfolgreiche Kombination biologischer und organisch-chemischer Forschung ist in Schema 1 illustriert. Dabei wird ein ausreichend gut



Schema 1. Mögliches Zusammenspiel von organischer Synthese und Biologie in der „Bioorganischen Chemie“.

bekanntes biologisches Phänomen bezüglich der Struktur der daran beteiligten Biomoleküle analysiert, bei denen es sich um niedermolekulare Wirkstoffe oder um Biomakromoleküle handeln kann. Auf diesen Strukturinformationen basierend werden ungelöste Syntheseprobleme identifiziert und bear-

beitet. Hier findet Innovation im Bereich der organischen Synthese im ureigensten Sinne statt. Nach erfolgreicher Bewältigung der Syntheseprobleme werden mit den entwickelten Methoden und Synthesen neue Reagentien zum Studium des betrachteten biologischen Phänomens hergestellt und dann in biologischen Experimenten eingesetzt. Im Idealfall können mit ihrer Hilfe neue Erkenntnisse gewonnen werden, die durch Anwendung klassischer biologischer Techniken nicht oder nur sehr viel schwieriger zugänglich gewesen wären. Auf diesen neuen Erkenntnissen fußend lassen sich neue Strukturinformationen ableiten, und der skizzierte Cyclus für bioorganisches Forschen kann erneut beschritten werden.

In der vorliegenden Übersicht wird die erfolgreiche Verzahnung biologischer und organisch-chemischer Forschung im Sinne dieser Vorgehensweise am aktuellen Beispiel der biologischen Signaltransduktion vorgestellt.

2. Die biologische Signaltransduktion^[8, 9]

Zur Aufrechterhaltung der Funktions- und Überlebensfähigkeit vielzelliger Organismen werden Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel einer großen Zahl von Zellen durch Synthese, Sezernierung und Erkennung von Signalmolekülen auch über größere Entfernung abgestimmt. Nach Übertragung des Signals durch die Plasmamembran der

Herbert Waldmann, geboren 1957, studierte Chemie an der Universität Mainz und promovierte dort 1985 bei Horst Kunz. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard University bei George Whitesides kehrte er 1986 an die Universität Mainz zurück und habilitierte sich 1991. Von 1991 bis 1993 war er als Professor für Organische Chemie an der Universität Bonn tätig und folgte dann einem Ruf auf ein Ordinariat für Organische Chemie an der Universität Karlsruhe. Seine Arbeiten wurden unter anderem mit dem Friedrich-Weygand-Preis, dem Dozentenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie und dem Carl-Duisberg-Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker ausgezeichnet. Seine Forschung umfaßt mehrere Fachrichtungen wie die diastereo- und enantioselektive Synthese, Peptid-, Kohlenhydrat- und Alkaloidchemie sowie die Anwendung von Enzymen in der Organischen Chemie. Ein Schwerpunkt der aktuellen Arbeiten ist die Kombination von Methoden der organischen Synthese mit biologischen Techniken, insbesondere die Synthese und Anwendung neuer Reagentien und Werkzeuge zum Studium biologischer Fragestellungen wie der Kontrolle von Signaltransduktionswegen.



H. Waldmann



D. Alonso-Díaz



K. Hinterding

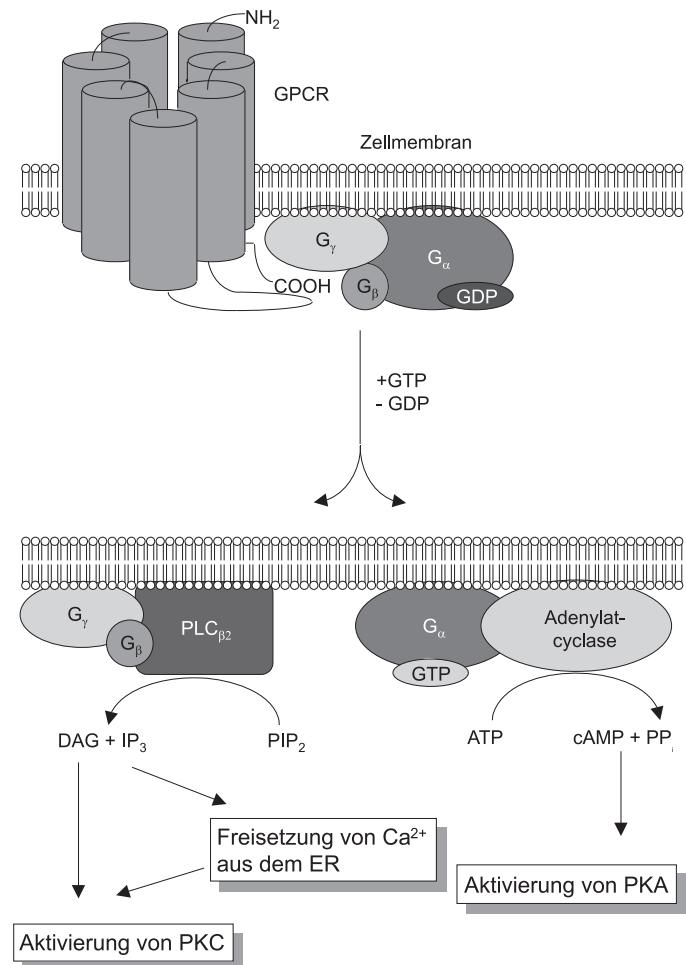
Daniel Alonso-Díaz, geboren 1960 in Sabadell (Barcelona), studierte Chemie an der Universidad Autónoma de Barcelona, wo er 1991 mit einer Arbeit zur Naturstoffsynthese promovierte. Anschließend forschte er in der pharmazeutischen Industrie und koordinierte ein Eureka-Projekt der Europäischen Union. Im Jahre 1995 trat er als Postdoktorand in die Gruppe von H. Waldmann ein, wo er als Marie-Curie-Stipendiat an der Totalsynthese von biologisch aktiven Molekülen arbeitete.

Klaus Hinterding, geboren 1969 in Neuenkirchen/Westfalen, studierte von 1989 bis 1991 in Freiburg Chemie. Nach einem einjährigen Aufenthalt an der University of Edinburgh, wo er in der Gruppe von B. F. G. Johnson an der Synthese von Ruthenium- und Osmiumclustern arbeitete, beendete er 1994 sein Chemiestudium mit der Diplomarbeit bei H. Waldmann in Karlsruhe. 1997 schloß er dort seine Dissertation ab, in der er sich mit der Synthese von Inhibitoren für zelluläre Signaltransduktionsprozesse beschäftigt hat.

Zielzellen ins Zellinnere wird die Botschaft durch intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt und eine Reaktion ausgelöst. Je nach ihren physikalischen Eigenschaften werden die extrazellulären Signalstoffe (Hormone) von Rezeptoren im Zellinneren erkannt (lipophile Hormone, die durch die Plasmamembran diffundieren können, z.B. Steroide und Schilddrüsenhormone) oder aber an der Zelloberfläche von Rezeptoren gebunden (hydrophile Hormone, die die Zellmembran nicht durch Diffusion passieren können, z.B. Peptidhormone und kleine geladene Moleküle wie Adrenalin und Histamin).^[10] Schließlich wird das Signal ausgelöscht und so die Reaktion der Zelle auf den Signalstoff beendet. Besonders die Wirkung der letztgenannten Klasse von Hormonen und die über sie ablaufende Signalvermittlung sind Gegenstand intensiver bioorganischer Forschung gewesen. Die aus diesen Arbeiten hervorgegangenen Erkenntnisse stehen im Mittelpunkt dieser Übersicht.^[11] Nachfolgend werden zunächst die wichtigsten der hierfür relevanten intrazellulären Signalkaskaden skizziert, deren Wirkungsweisen auf zellulärer und molekularer Ebene hinreichend aufgeklärt wurden.

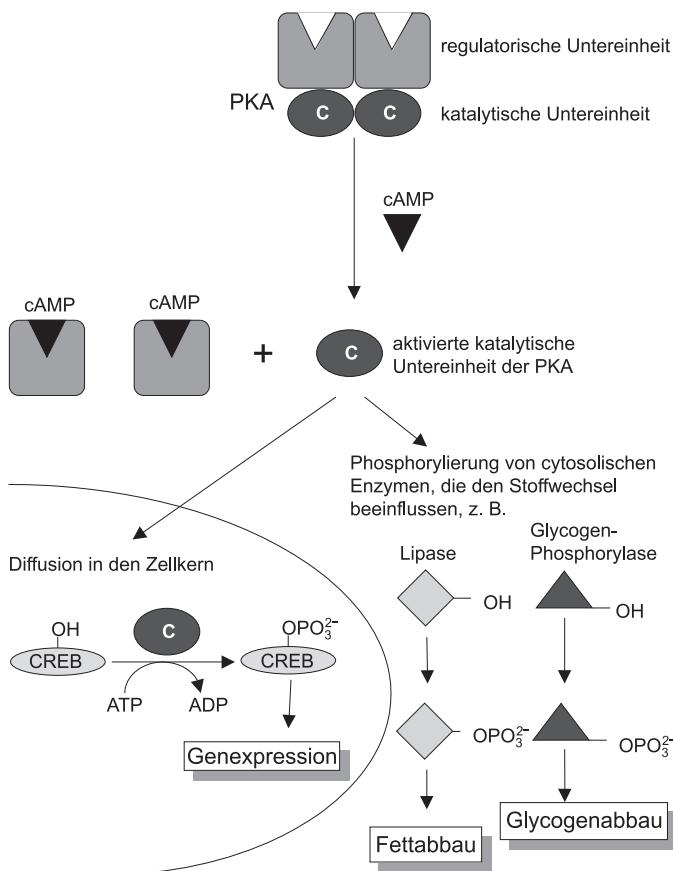
2.1. Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine^[8, 9, 12-24]

Eine Vielzahl hormoneller Botenstoffe, z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Glucagon, Corticotropin, das luteinisierende Hormon und das follicelstimulierende Hormon, aber auch Signale, durch die Sinneseindrücke wie Geschmack,^[23] Geruch und der Sehvorgang^[24] entstehen, werden an der Zelloberfläche durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren^[12] (GPCR) erkannt, die sieben Transmembranhelices aufweisen (Schema 2). Eine intrazelluläre Schleife zwischen den Helices 5 und 6 und das ebenfalls cytosolische C-terminale Segment des Rezeptors wechselwirken dann mit einem membranassoziierten, heterotrimeren Guaninnucleotid-bindenden Protein (G-Protein). G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (G_α , G_β , G_γ),^[13-15] von denen die α -Untereinheit in der inaktiven Form ein GDP-Molekül gebunden hat. Als Folge der Wechselwirkung mit dem Rezeptor wird in G_α GDP gegen GTP ausgetauscht, und der heterotrimere Komplex dissoziiert in G_α/GTP und G_β/G_γ . Diese Aktivierung des G-Proteins durch Nucleotidaustausch und Dissoziation wird durch Hydrolyse des GTP zu GDP und Rückbildung des inaktiven, aber erneut aktivierbaren GDP-bindenden heterotrimeren Komplexes beendet und so das Signal wieder abgeschaltet. Vorher lösen G_α/GTP und G_β/G_γ jedoch unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aus. Wird dieser komplizierte Mechanismus durch äußere Einflüsse gestört, resultieren ernsthafte Komplikationen für die betroffene Zelle und den ganzen Organismus. So bewirkt das Cholera-Toxin eine permanente Bindung von GTP an die α -Untereinheit einer bestimmten G-Protein-Subfamilie (G_s) und damit eine kontinuierliche Stimulierung der Adenylatcyclase, was zu massiver Diarrhöe führt; das den Keuchhusten auslösende Pertussis-Toxin inaktiviert hingegen die α -Untereinheit des G_i -Proteins, wodurch die Stimulierung der Phospholipase C verhindert wird.



Schema 2. Bildung von Second-messenger-Molekülen bei der Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine.

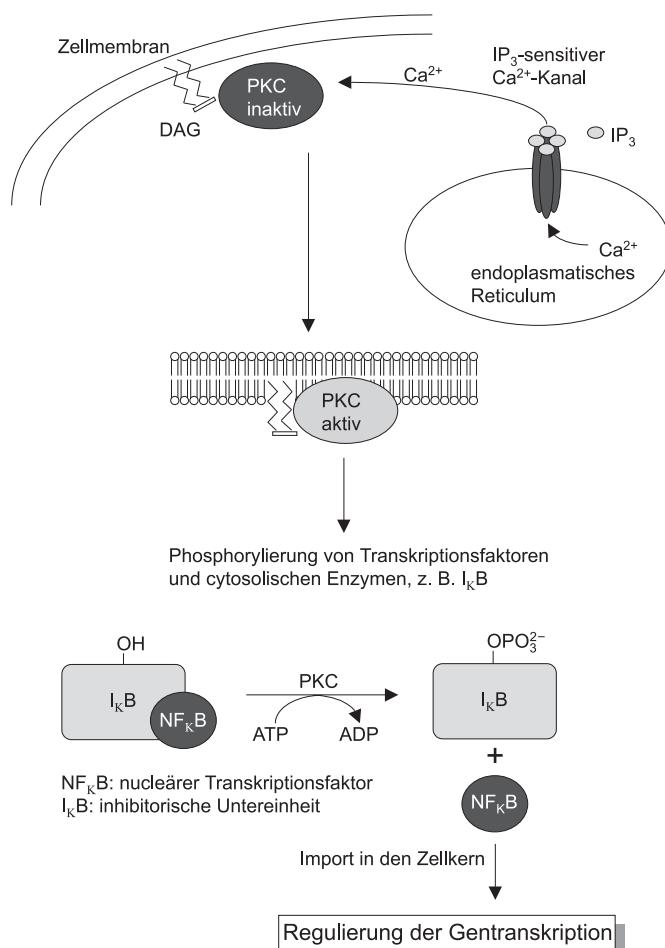
G_α/GTP wirkt abhängig davon, aus welchem heterotrimmen Komplex es freigesetzt wurde, stimulierend (G_{sa}) oder inhibierend (G_{ia}) auf die in die Plasmamembran eingelagerte Adenylatcyclase, die bei Stimulierung die Cyclisierung von ATP zu cyclo-AMP (cAMP) katalysiert (siehe Schema 2). Dieser sekundäre Botenstoff („second messenger“) aktiviert dann cAMP-abhängige Proteinkinasen der Familie A (PKAs)^[16] durch Freisetzung ihrer katalytischen Untereinheiten aus einem inaktiven tetrameren Komplex. Je nach Zelltyp werden von PKAs dann weitere unterschiedliche Enzyme an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert und damit ebenfalls aktiviert. So führt in Leber- und Muskelzellen die Aktivierung von PKAs als Folge der Bindung von Adrenalin an den zugehörigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zum Abbau von Glycogen zu Glucose-1-phosphat, d.h. zur Mobilisierung von Glucose aus der Depotform (Schema 3). In fettspeichernden Adipocyten bewirkt eine durch Adrenalin ausgelöste Enzymkaskade, daß Fettsäuren freigesetzt werden (Schema 3), in den Zellen der Nebennierenrinde stimuliert Corticotropin nach Bindung an einen G_s -gekoppelten Rezeptor die Biosynthese von Steroidhormonen wie Cortisol, und in ovariellen Zellen löst das follicelstimu-



Schema 3. Aktivierung der Proteinkinase A und nachfolgende Signalübertragung auf cytosolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren. CREB = cAMP response element binding protein.

lierende Hormon eine erhöhte Biosynthese von Östradiol und Progesteron aus, die zur Ausprägung der weiblichen Geschlechtsmerkmale benötigt werden. Weiterhin kann Proteinkinase A in den Zellkern diffundieren und dort Transkriptionsfaktoren stimulieren, die nachfolgend die Expression vieler Gene aktivieren.

Der G_{β}/G_{γ} -Komplex (und auch G_{α}) aktiviert die membrangebundene Phospholipase $C_{\beta 2}$ ($PLC_{\beta 2}$), die dann das Plasmamembranlipid Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spaltet. Diese Substanzen sind sekundäre Botenstoffe.^[17-19] IP_3 diffundiert nach seiner Freisetzung durch das Cytosol und wird am endoplasmatischen Reticulum (ER) von einem spezifischen Rezeptor gebunden, der einen Kanal öffnet und Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ins Cytosol entläßt (Schema 4). Ca^{2+} wirkt nun als weiterer sekundärer Botenstoff, der z. B. zur Aktivierung von Proteinkinasen benötigt wird. DAG verbleibt an der Plasmamembran und bindet dort mit Ca^{2+} -Ionen und Phosphatidylserin Serin/Threonin-Proteinkinasen der Familie C (PKCs; Schema 4).^[20-22] Diese in ihrer cytosolischen Form inaktiven Enzyme phosphorylieren nach der Membranlokalisierung weitere Proteine und beeinflussen so eine Vielzahl von Zellreaktionen. Von besonderer Bedeutung ist, daß die PKC auch Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und – je nach Zellart – dadurch die Synthese bestimmter mRNA-Moleküle induziert oder unterdrückt. Die Protein-



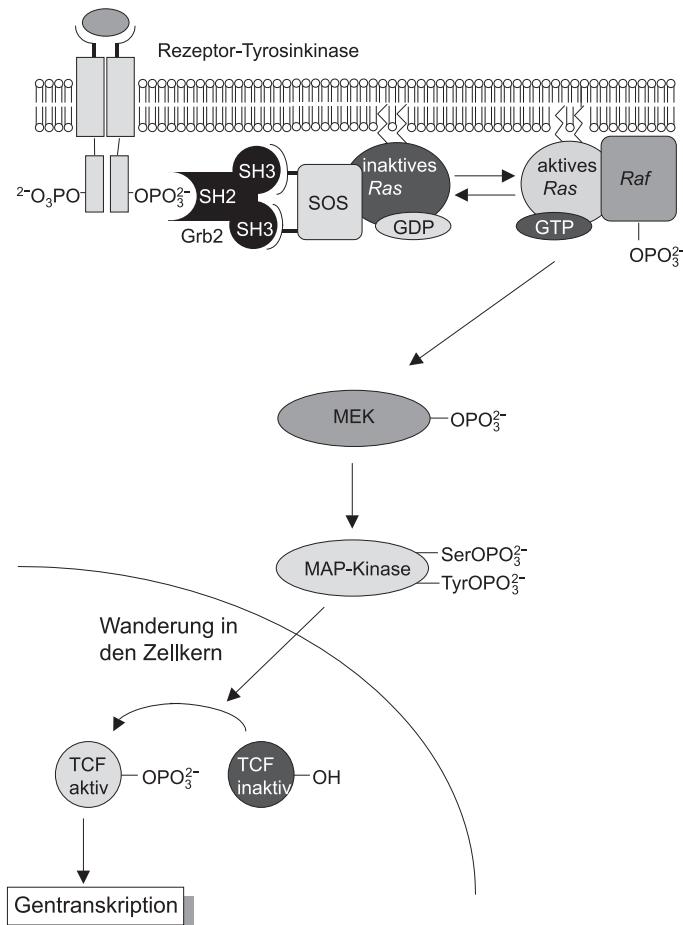
Schema 4. Aktivierung der Proteinkinase C durch den IP_3/DAG -Signalweg und nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors $NF_{\kappa}B$.

kinase C spielt daher bei der Regulation des Zellwachstums eine entscheidende Rolle, und es ist naheliegend, daß eine Fehlfunktion der PKC zu fehlgeleitetem Wachstum und in letzter Konsequenz zur Transformation der Zelle (siehe Abschnitt 2.5) führen kann.

2.2. Signaltransduktion über Rezeptor-Tyrosinkinasen und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen – die Ras/MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade^[9, 25-33]

Viele Polypeptidhormone, durch die die Zellproliferation und -differenzierung beeinflußt werden, binden an Zelloberflächenrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (Rezeptor-Tyrosinkinasen, RTKs). Hierzu zählen die Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), den Nervenwachstumsfaktor (NGF) und den Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF), die Wachstum, Differenzierung sowie Teilung epidermaler, endothelialer und epithelialer Zellen (EGF), sensorischer und sympathischer Neuronen (NGF) sowie Zellen des Bindegewebes, Granulocyten und Zellen des Nervensystems (PDGF) beeinflussen.

Die in der aktiven Form monomeren Rezeptor-Tyrosinkinasen bestehen aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer membran durchspannenden α -Helix und einer cytosolischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Als Folge der Bindung des extrazellulären Liganden dimerisieren die Rezeptoren, und ihre Kinasedomänen erkennen und phosphorylieren Tyrosinreste in der jeweils anderen Monomereinheit (Schema 5). Die phosphorylierten Rezeptoren werden von



Schema 5. Signaltransduktion über die Ras/MAP-Kinase-Kaskade.

Adaptorproteinen erkannt, die selbst keine Signalmoleküle sind, den Rezeptor jedoch mit solchen verbinden. Von besonderer Bedeutung ist hier das Protein Grb2 (Grb2 = growth factor receptor binding protein 2), das die Peptidsequenz des Rezeptors, in der sich das Phosphotyrosin befindet, über seine SH2-Domäne (SH2 = sarcoma homology 2) bindet. Grb2 enthält weiterhin zwei SH3-Domänen, die prolinreiche Sequenzen in einem weiteren Adaptorprotein, Sos (son of sevenless, benannt nach einer *Drosophila*-Mutante), erkennen (Schema 5). Die cytosolischen Proteine Grb2 und Sos werden so an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert und korrekt aufgereiht. Sos wechselt dann mit der inaktiven, GDP-bindenden Form des membranassoziierten Proteins Ras (von rat sarcoma). Dieses tauscht nach Wechselwirkung mit dem als „molekularem Kleber“ wirkenden Grb2/Sos-Komplex GDP gegen GTP aus; Grb2/Sos hat also die Funktion eines Guaninnucleotid-Austauschfaktors (guan-

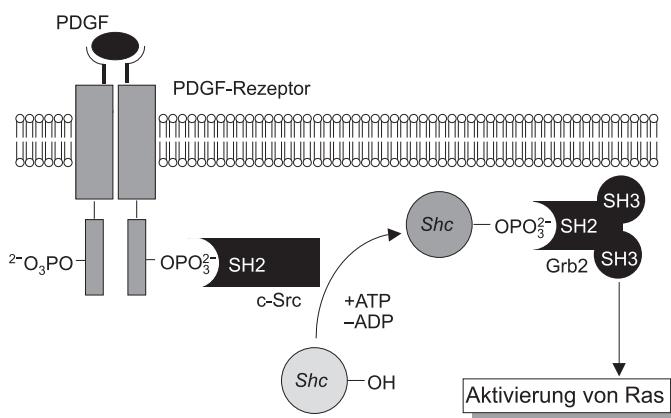
nine nucleotide exchange factor, GEF). Das so aktivierte Ras-Protein wirkt dann als molekularer Schalter und leitet das von der Rezeptor-Tyrosinkinase über nichtkovalente Protein-Protein-Wechselwirkungen eintreffende Signal auf eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen ins Zellinnere um (Schema 5). Ras verfügt über eine schwache GTPase-Aktivität, durch die das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und so das Signal beendet wird. Dieser Prozeß wird durch das GAP-Protein (GTPase activating protein) beschleunigt.

Die aktivierte, GTP-bindende Form von Ras bindet den N-Terminus der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase Raf und lokaliert diese (in Analogie zur Immobilisierung von Sos an Grb2) an die Plasmamembran. Raf vermag nun mit seinem C-Terminus die Proteinkinase MAP-Kinase-Kinase (MAP = mitogen activated protein), die auch als MEK bezeichnet wird (von MAP und ERK, extracellular signal regulated kinase), zu binden und zu phosphorylieren. Die so aktivierte MEK verfügt über Tyrosin- und Serin/Threoninkinase-Aktivität (dual specificity kinase) und phosphoryliert als nächstes das Protein MAP-Kinase, bei dem es sich wiederum um eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase handelt. Die aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert und aktiviert nun einerseits weitere Kinasen, wie die ribosomalen S6-Kinasen, andererseits diffundiert sie in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren, z.B. den ternären Komplexfaktor (TCF, auch als Elk-1 bezeichnet) und das Protein Jun, die dadurch aktiviert werden und die Expression der entsprechenden Gene auslösen.

In einigen Fällen beeinflussen die Ras/MAP-Kinase-Kaskade und der GPCR-Signalweg die Expression derselben Gene. So können durch ein konzertiertes ineinandergreifen verschiedener Signalketten viele Gene sehr schnell exprimiert werden. Eine weitere Möglichkeit der gegenseitigen Beeinflussung von Signalketten besteht in der Aktivierung von Elementen der einen Kaskade durch Mitglieder der anderen (cross talk). So können PKC und andere Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen auch MEK und andere Mitglieder der Ras-Kaskade phosphorylieren^[30] und so eine Querverbindung zwischen dem GPCR-Signalweg und der Ras-Kaskade herstellen. Weitere Beispiele von „cross talk“ zwischen unterschiedlichen Signalkaskaden sind bekannt (siehe Abschnitt 3.2 und Schema 12).^[30]

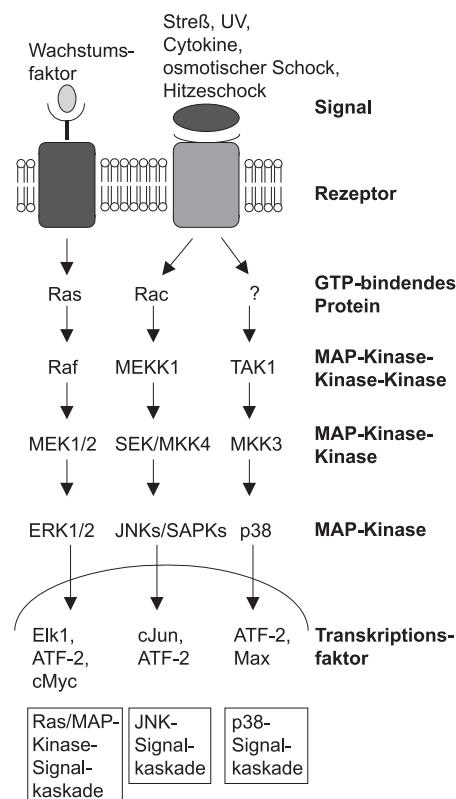
Auch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NRTKs),^[34] d.h. an der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisierte Tyrosinkinasen, die nicht über eine extrazelluläre Rezeptordomäne verfügen, können die Ras-Kaskade anschalten.^[17, 31] So erkennt die NRTK c-Src über eine SH2-Domäne den durch Autophosphorylierung aktivierte PDGF-Rezeptor,^[35] der keine Grb2-Bindungsstelle enthält (Schema 6). c-Src phosphoryliert dann das Adaptorprotein Shc an einem Tyrosinrest und bildet so eine Bindungsstelle für den Grb2/Sos-Komplex, der nachfolgend Ras aktiviert (siehe oben) und damit das Signal weiterleitet.

Die Ras-Signaltransduktionskaskade ist physiologisch außerordentlich wichtig. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung, und eine Fehlregulierung dieses Signalfades kann einer der entscheidenden Schritte bei der Transformation von Zellen sein (siehe Abschnitt 2.5). Der Ras-Weg ist in verschiedenen



Schema 6. Aktivierung der Ras-Signalkaskade durch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. c-Src).

Spezies hochkonserviert,^[9, 25-27] und seine Elemente werden z. B. von Hefen, Würmern, Fliegen und Säugetieren nach dem gleichen Muster zur Weiterleitung von Wachstumssignalen benutzt. Darüber hinaus hat sich in jüngster Zeit gezeigt, daß in Sägerzellen mindestens drei weitere Signaltransduktionspfade existieren, die nach dem gleichen, dem Ras-Weg entsprechenden Schema, unterschiedliche extrazelluläre Signale zum Zellkern weiterleiten (Schema 7).^[30] Hierzu zählen



Schema 7. Gemeinsame Elemente von Signaltransduktionskaskaden, die durch Wachstumsfaktoren, entzündungsfördernde Cytokine, alkylierende Reagenzien und Stressfaktoren aktiviert werden.

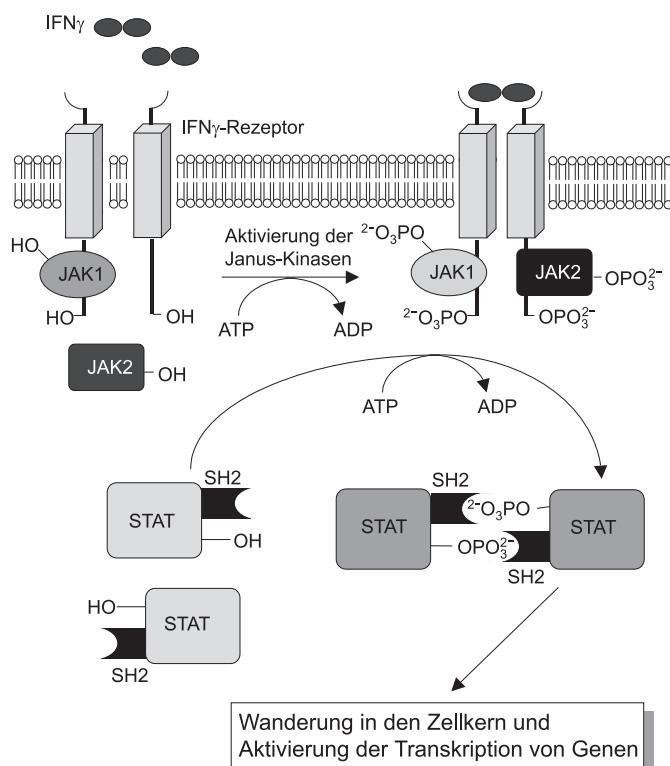
Streß durch UV-Licht und ionisierende Strahlung, alkylierende Reagentien, der osmotische und der Hitzeschock sowie Signale von entzündungsfördernden Cytokinen (siehe Abb.

schnitt 2.3) wie dem Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und Interleukin 1 (IL-1).

2.3. Signaltransduktion über Janus-Kinasen und STAT-Proteine^[9, 36, 37]

Ein sehr wichtiger Signaltransduktionsweg, in dem Proteinphosphorylierung und Protein/Protein-Wechselwirkungen über SH2-Domänen (siehe Abschnitt 2.2) auch eine entscheidende Rolle übernehmen, leitet Signale weiter, die durch Cytokine ausgelöst werden. Cytokine sind lösliche Proteine, die Wachstum, Differenzierung und Funktion einer Vielzahl von Zellen beeinflussen und zu denen z.B. die Interferone α , β und γ sowie die Interleukine 2 bis 7, 9 bis 12 und 15 gehören. Die Interferone werden z.B. von tierischen Zellen nach einer Virusinfektion gebildet und sezerniert. Nach ihrer Bindung an plasmamembranständige Rezeptoren der Zielzellen wird deren Wachstum gehemmt und die Synthese von Proteinen induziert, die der Zielzelle eine Virusresistenz verleihen.

Die Bindung eines Cytokins an seinen Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung und zur Aktivierung von JAK-Kinasen (Janus-Kinasen oder „just another kinase“), einer Klasse von Tyrosinkinasen, die nichtkovalent mit der cytosolischen Domäne des Rezeptors assoziiert sind (Schema 8). Die



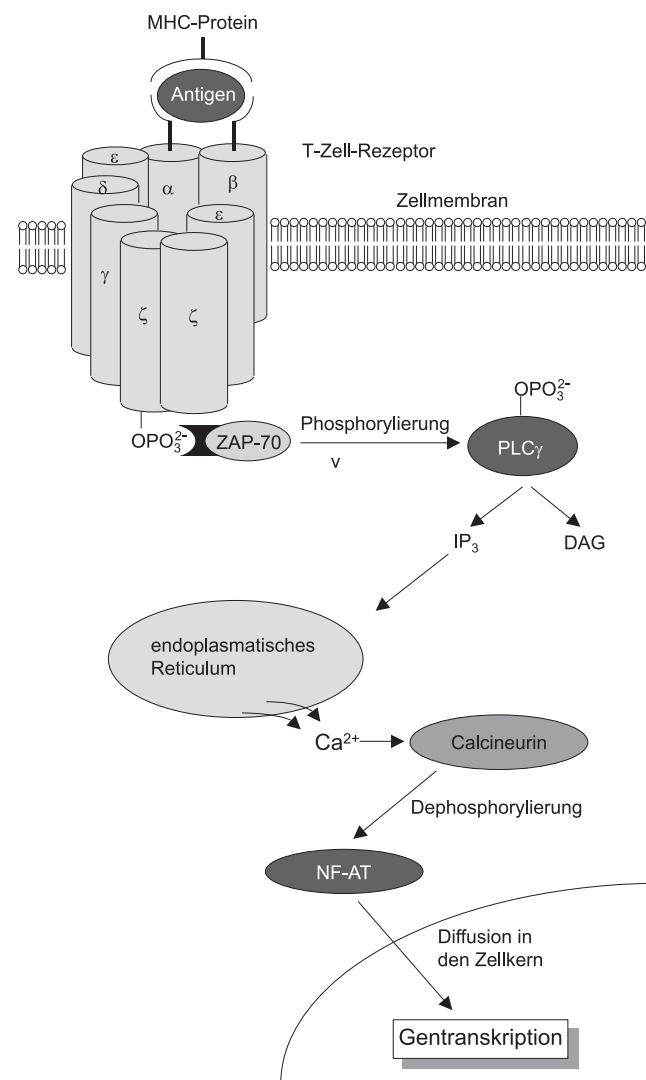
Schema 8. Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade. IFN γ = Interferon γ .

JAK-Kinasen phosphorylieren dann den Rezeptor sowie nachfolgend an diesen bindende STAT-Proteine (STAT=signal transducers and activators of transcription). Diese

cytosolischen Transkriptionsfaktoren bilden nach ihrer Aktivierung homo- und heterodimere Komplexe, die in den Zellkern wandern und dort die Transkription cytokinabhängiger Gene induzieren.

2.4. Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor^[38-40]

Für die Gewährleistung der von den T-Zellen getragenen zellulären Immunantwort ist der vom T-Zell-Rezeptor (TCR) ausgehende Signalweg von essentieller Bedeutung, der sich der gleichen Übertragungsmechanismen wie die vorstehend beschriebenen Signalkaskaden bedient. Nach Aktivierung des Rezeptors durch ein Antigen geht die T-Zelle zunächst von der G_0 -Phase in die G_1 -Phase über, d.h., sie verläßt den Ruhezustand und bereitet die Zellteilung vor.^[38] Die komplexen T-Zell-Rezeptoren bestehen aus acht nichtkovalent miteinander verbundenen, membrandurchspannenden Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$). Sobald ein Makrophage über seine Proteine des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC-Proteine) dem Rezeptor ein Antigenfragment präsentiert, wird dieses von der α - und der β -Untereinheit erkannt und gebunden, und alle acht Untereinheiten aggregieren (Schema 9). Die dadurch einander ebenfalls angenäherten cytoplasmatischen Domänen der einzelnen Untereinheiten werden dann von einer assoziierten Kinase (Lck oder Fyn, Kinasen der Src-Familie) an Tyrosinresten phosphoryliert, wobei insbesondere die Phosphorylierung der ζ -Untereinheit eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der Tyrosinspezifischen Proteinkinase ZAP-70 liefert. Diese Kinase phosphoryliert und aktiviert daraufhin die Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ), die Inositrisphosphat freisetzt (siehe Abschnitt 2.1). Dieser sekundäre Botenstoff bewirkt, daß Calciumionen aus dem endoplasmatischen Reticulum ins Cytosol entlassen werden, und führt damit zur Aktivierung von Calcineurin, einer Ca^{2+} -abhängigen Ser/Thr-spezifischen Proteinkinase. Calcineurin dephosphoryliert nun den cytoplasmatischen Teil des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T-cells), welcher in den Zellkern wandert und dort die Transkription bestimmter, für den weiteren korrekten Ablauf der Immunantwort wesentlicher Gene steuert.^[39] Die T-Zelle exprimiert daraufhin sowohl den Wachstumsfaktor Interleukin2 (IL-2), der in den interzellulären Zwischenraum entlassen wird, als auch dessen Rezeptor (IL-2-R), der als Transmembranprotein in der Plasmamembran verankert wird. Die dadurch bewirkte Selbststimulierung der T-Zelle (autokrine Stimulierung) löst den Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase des Zellzyklus aus, führt also zur Teilung und Vermehrung genau der T-Zelle, die das ursprünglich präsentierte Antigen erkannt hat (klonale Selektion).



Schema 9. Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor.

Dieses einfache Bild der T-Zell-Aktivierung wird ergänzt durch das Überschneiden mit anderen Signalfäden (cross talk). So wird IP₃ auch über den GPCR-Signalweg freigesetzt (siehe Abschnitt 2.1), und der an Tyrosinresten phosphorylierte T-Zell-Rezeptor kann von den SH2-Domänen bestimmter Adapterproteine gebunden und so mit dem Ras-Signalweg verknüpft werden.

2.5. Signaltransduktion und Transformation von Zellen^[41, 42]

Signaltransduktionskaskaden beeinflussen entscheidend die Regulierung von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung. Bei normalem Zellwachstum sind die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten der Signalkaskaden genau aufeinander abgestimmt. Tritt jedoch eine Fehlregulierung wichtiger Signalkaskaden auf, so kann die Zelle transformiert werden, d.h., ihre Wachstumseigenschaften ändern sich, und sie kann sich zu einer Tumorzelle entwickeln. Die Transformation einer Zelle kann prinzipiell

durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden (z.B. durch DNA-schädigende chemische Carcinogene), eine der häufigsten Ursachen ist jedoch die Bildung eines Onkoteins, d.h. des Produktes eines Onkogens, eines Krebsgens. Onkogene entstehen meist aus normalen, das Zellwachstum kontrollierenden zellulären Genen (Protoonkogenen), z.B. durch Mutation oder durch falsche oder fehlregulierte Expression. Zur Wachstumskontrolle tragen hauptsächlich Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, intrazelluläre Signalüberträger, nucleäre Transkriptionsfaktoren sowie Zellzyklus-Kontrollproteine bei. Die meisten Onkogene kodieren für Proteine, die sich einer dieser fünf Klassen zuordnen lassen, wobei solche der Klassen 1–4 wesentliche Elemente der oben beschriebenen Signaltransduktionskaskaden sind.

Nur sehr wenige Onkogene gehen aus den Genen für Wachstumsfaktoren hervor. Die Gene für Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität werden z.B. dann zu Onkogenen, wenn sie nach Mutation für Rezeptoren kodieren, deren Kinaseaktivität auch ohne den jeweiligen Liganden angeschaltet bleibt. In den meisten Fällen kodieren Onkogene dieser Klasse jedoch für „Rumpf“-Rezeptoren, deren extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne verlorengegangen ist. In beiden Fällen gibt das Onkotein ein permanentes Wachstumssignal.

Die Mehrzahl der Onkogene stammt von Genen für Proteine ab, die in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden eingebunden sind. So können Mutationen in den G_{sa} -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (siehe Schema 2) dazu führen, daß diese ihre GTPase-Aktivität verlieren und somit kontinuierlich die cAMP-Synthese stimulieren. Hypophysenzellen mit mutiertem G_{sa} -Protein wachsen wegen des hohen cAMP-Spiegels unkontrolliert, und es bilden sich Hypophysentumore. Ähnlich führen Mutationen in den *ras*-Genen dazu, daß diese nicht mehr aus dem aktiven, GTP-bindenden Zustand in den inaktiven, GDP-bindenden zurückgeführt werden können (siehe Schema 5). Als Folge senden diese hochkonservierten Schalter Dauerwachstums-Signale, die zur Tumorbildung führen können. Mutationen in den *ras*-Genen werden in einer Vielzahl menschlicher Tumore gefunden.

Mutationen in den Genen für Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen können ebenfalls zur Bildung von Onkogenen führen. So wird die Kinaseaktivität und damit die signaltransduzierende Wirkung von Src (siehe Schema 6) durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes am C-Terminus stark verringert. Wird diese Phosphorylierungsstelle verändert (beim Rous-Sarcoma-Virus fehlen z.B. die letzten 18 Aminosäuren des C-Terminus von Src infolge einer Deletion im *src*-Gen), entfällt diese Möglichkeit zur Regulierung, und ein dauerhaftes Signal resultiert. Auch das transformierende Potential der Raf-Serin/Threonin-Kinase (siehe Schema 5) wird durch Deletion regulatorischer Einheiten des normalen zellulären Proteins aktiviert. Der C-Terminus von Raf enthält die Kinaseeinheit, während der N-Terminus zwei Domänen aufweist, durch die die Kinaseaktivität moduliert wird. In den *raf*-Onkogenen sind diese regulatorischen Domänen deletiert, und der katalytisch aktive, C-terminale Enzymteil arbeitet ungesteuert. Onkogene, die für nucleäre Transkriptionsfaktoren kodieren, entfalten ihre Wirkung in vielen Fällen dadurch, daß

die entsprechenden Onkoteine die Transkriptionshäufigkeit von Genen verändern, die z.B. für wachstumsstimulierende Proteine kodieren.

Eine Klasse von Onkogenen mit entscheidender Bedeutung für den Zellzyklus kodiert für Tumorsuppressoren.^[43, 44] Diese Proteine überwachen den laufenden Zellzyklus und verhindern die Tumorbildung, indem sie Zellen in der Ruhephase des Zellzyklus halten oder sogar einen spontanen Zelltod^[45, 46] induzieren. Im Falle von Mutationen in Tumorsuppressoren wird der Zellzyklus nicht mehr richtig kontrolliert, und Mutationen akkumulieren.

Auch die transformierende Wirkung chemischer Verbindungen, die als Tumorpromotoren erkannt wurden, ist darauf zurückzuführen, daß sie Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Während gewöhnliche chemische Carcinogene, wie alkylierende Reagenzien und polycyclische Kohlenwasserstoffe, direkt die DNA schädigen (Tumorinitiatoren), erhöhen Tumorpromotoren wesentlich die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung infolge der Einwirkung eines Tumorinitiators. Zu den Tumorpromotoren gehören Phorbolester und Teleocidine. Diese Substanzen aktivieren die Protein kinase C, indem sie Diacylglycerin imitieren (siehe Schema 4).

Heute geht man davon aus, daß die Carcinogenese in der Regel durch mehrere Faktoren in einem mehrstufigen Prozeß ausgelöst wird; Krebs entsteht durch zahlreiche Faktoren, die innerhalb eines längeren Zeitraums zusammenwirken. Ein Onkogen allein ist normalerweise nicht in der Lage, malignes Wachstum zu induzieren, verschiedene Onkogene müssen sich in ihrer Wirkung ergänzen. Auch menschliche Tumorzellen enthalten mehrere Onkogene, so daß für die maligne Transformation einer einzelnen Zelle wahrscheinlich mehrere genetische Veränderungen (ca. vier bis fünf) in dieser Zelle akkumuliert werden müßten. Dabei herrschen einige Mutationen deutlich vor, weil sie an entscheidenden Stellen der Regulierung von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung eingreifen. So werden bei ca. 50 % aller menschlicher Tumore Mutationen in dem Gen gefunden, das für den Tumorsuppressor p53 kodiert und damit das am häufigsten auftretende Onkogen ist. Von nahezu gleicher Bedeutung ist das *ras*-Onkogen, das bei ca. 40 % aller menschlichen Tumore Mutationen aufweist. Bei einigen der Hauptkrebsarten, wie Darm-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs, steigt die Mutationsrate im *ras*-Onkogen sogar bis auf ca. 80 % an.

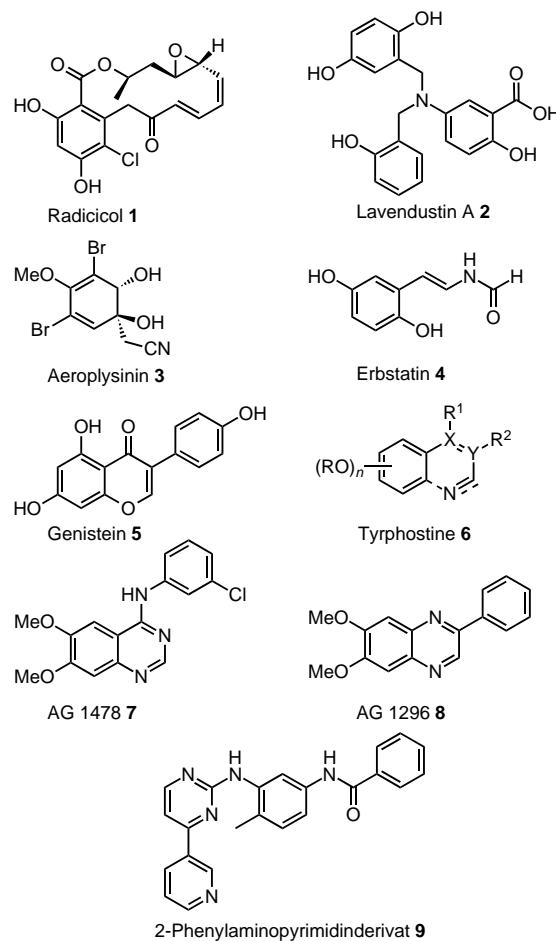
Das Verständnis von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen auf molekularer Basis und deren darauf basierende gezielte Beeinflussung eröffnen daher grundlegend neue Möglichkeiten für das Studium und gegebenenfalls auch die Therapie der malignen Transformationen. Für diese neue Stoßrichtung der „molekularen Medizin“ wurde daher von A. Levitzki der treffende Begriff „Signaltransduktionstherapie“ geprägt.^[47]

3. Inhibierung von Protein-Tyrosinkinasen (PTKs)

Vor dem Hintergrund, daß PTKs wichtige Rollen in der zellulären Signaltransduktion und beim korrekten Ablauf zahlreicher genetischer Programme, z.B. in der Ras-Signal-Kaskade, im JAK/STAT-Signalweg und im TCR-Signalpfad

(siehe Abschnitt 2.2, 2.3 bzw. 2.4) spielen, und auch angesichts der Tatsache, daß die Hälfte der bisher gefundenen Protoonkogene für Proteine mit PTK-Aktivität kodieren,^[48] wird intensiv nach selektiven Inhibitoren dieser Enzyme gesucht.^[49]

Solche Substanzen würden die Möglichkeit eröffnen, Signaltransduktionskaskaden und Verzweigungen verschiedener Signalpfade gezielt zu unterbrechen, um dadurch die molekularen Abläufe der Reizweiterleitung besser verstehen zu lernen; darüber hinaus können sie Maßnahmen für die Therapie von Krankheiten eröffnen, die mit einer abnormalen PTK-Aktivität einhergehen, wie Krebs, Psoriasis, Restenosis oder dem septischen Schock.^[49a] Naturstoffe mit PTK-inhibierender Aktivität sind z. B. Radicicol **1**,^[50] Lavendustin A **2**,^[51] Aeroplysinin **3**,^[52] Erbstatin **4**^[53] und Genistein **5**^[54] (Schema 10), die aufgrund ihrer interessanten pharmakologischen



Schema 10. Strukturen einiger Naturstoffe und synthetischer Verbindungen mit PTK-inhibierender Aktivität.

schen Profile schon vielfältig in der biologischen Forschung eingesetzt wurden. Dennoch stammen die potentesten der heute verfügbaren Inhibitoren aus den Syntheselabors.

Mit zunehmender Kenntnis der Strukturen verschiedener PTKs (die Primärstrukturen vieler verschiedener PTKs sind bekannt und weisen hohe Homologie in der katalytischen Domäne auf;^[55] darüber hinaus wurden die Kristallstrukturen des Insulinrezeptors,^[56] von c-Src^[57] und von einigen Ser/Thr-

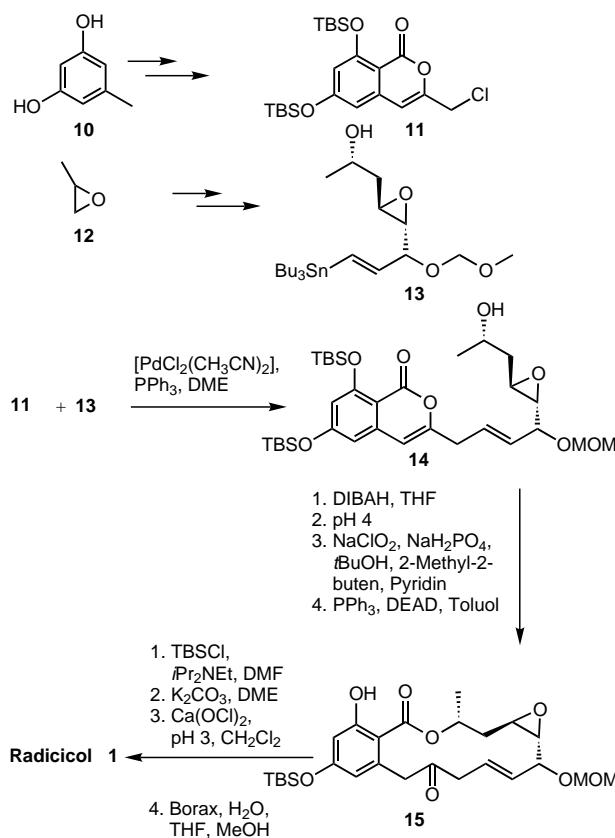
Kinasen^[58] bestimmt) und der Ableitung wesentlicher Strukturmerkmale der Enzymhemmer wurden in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Entwicklung aktiverer und selektiverer Inhibitoren erzielt. Dabei wurde die Annahme, daß Selektivität kaum durch ATP-kompetitive Inhibitoren erreichbar sei, da die Strukturen der ATP-Bindungsstellen nicht nur der PTKs sondern sogar aller Kinasen einander sehr ähnlich sind,^[49c] widerlegt: Die bislang aktivsten und selektivsten Inhibitoren für den EGF-Rezeptor und den PDGF-Rezeptor binden reversibel in der ATP-Bindungsstelle.

Nachfolgend werden stellvertretend einige Naturstoffe mit PTK-inhibierender Wirkung und synthetische Inhibitoren vorgestellt.

3.1. Radicicol

Radicicol **1** (Schema 10), ein Metabolit aus dem Mikroparasiten *Monocillium nordinii*,^[59] zeigt vielfältige biologische Wirkungen (Fungistaticum, Antitumoraktivität, PTK-Inhibitor). Da der Naturstoff nur schwierig zu gewinnen ist, eröffnet hier erst die Entwicklung einer effizienten Totalsynthese die Möglichkeit, genügend Material für biologische und medizinische Studien sowie Analoga mit veränderten biologischen Eigenschaften zu erhalten.

Besondere synthetische Herausforderungen sind der Aufbau des 14gliedrigen Makrolactons und einer konjugierten Dienon-Epoxid-Einheit mit einer *E*- und einer *Z*-Doppelbindung. Ausgehend von Molecular-Modeling-Untersuchungen und der Überlegung, daß eine schon etablierte (*E,Z*)-Dienon-Epoxid-Einheit die Bedingungen einer Makrolactonisierung kaum überstehen würde, wurde bei der einzigen bisher publizierten Totalsynthese^[60] die *Z*-Doppelbindung erst nach der Cyclisierung der Vorstufe **15** durch Eliminierung gebildet (Schema 11). Der Makrocyclus **15** wurde dabei retrosynthetisch auf das Isocumarin **14** zurückgeführt, welches durch palladiumvermittelte Kupplung aus dem Aren **11** und dem alle stereogenen Zentren enthaltenden Vinylstannan **13** aufgebaut wurde. Die Synthese von **11** gelang ausgehend von Orcinol **10** in elf Stufen in einer Gesamtausbeute von 31 %. Dazu wurde nach dem Schützen der freien Hydroxyfunktionen ein weiterer Substituent durch Friedel-Crafts-Acylierung eingeführt, und im Anschluß an Funktionalisierung und C-C-Verknüpfung an der *ortho*-ständigen Methylgruppe wurde zum Isocumarin **11** cyclisiert. Im Vinylstannan **13** muß auf die absolute Konfiguration der drei Stereozentren besondere Rücksicht genommen werden: Während die beiden C-Atome der Epoxideinheit *R*-konfiguriert sein müssen, sollte das hydroxysubstituierte stereogene Zentrum variabel aufgebaut werden können, je nachdem, ob zur Makrolactonisierung die Acylfunktion (unter Retention der Konfiguration) oder die Hydroxyfunktion (mit Inversion der Konfiguration unter S_N2-Bedingungen) aktiviert werden soll. Durch nucleophile Öffnung von enantiomerenreinem Propylenoxid mit lithiertem und an der Hydroxyfunktion geschütztem Propargylalkohol ließ sich die absolute Konfiguration des sekundären Alkohols beliebig einstellen. Die Schlüsselschritte der weiteren Synthese waren eine stereospezifische Reduktion des Alkins zum



Schema 11. Synthese von Radicicol **1**. DEAD = Diethylazodicarboxylat, DIBAH = Diisobutylaluminiumhydrid, MOM = Methoxymethyl, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

(*E*)-Allylalkohol, eine Sharpless-Epoxidierung und die Verlängerung des Kohlenstoffgerüstes mit einem Vinylstannan. In einer palladiumvermittelten Stille-Reaktion wurden die beiden Fragmente **11** und **13** zum Isocumarin **14** gekuppelt; nach Freisetzen der Oxosäure durch Reduktion mit DIBAH und Reoxidation (hierbei wurde selektiv die zur Carboxyfunktion *ortho*-ständige Silylethergruppe gespalten) konnte der Makrocyclus unter Mitsunobu-Bedingungen geschlossen werden (→**15**). Die Synthese wurde mit der Eliminierung des MOM-Acetals, der Chlorierung des Arens unter milden Bedingungen und dem Entfernen der Silylschutzgruppen beendet.

Neben der Wirkung von Radicicol als antifungales Antibioticum^[59] und Tranquilizer^[61] wurde vor allem seine selektive und hohe PTK-inhibierende Aktivität^[50] intensiv untersucht. In einem In-vitro-Assay hemmte der Naturstoff sowohl die Auto-phosphorylierung der v-Src-Tyrosinkinase als auch die Phosphorylierung eines exogenen Substrats mit einem IC_{50} -Wert von $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die Serin/Threonin-Kinasen PKA und PKC wurden dagegen von Radicicol erst bei sehr viel höheren Konzentrationen gehemmt. Da der Naturstoff den Phosphorylierungsgrad der v-Src-Kinase in vivo ebenfalls deutlich verringerte, konnten Experimente an *v-src*-transformierten Rattenfibroblasten (SR-3Y1-2-Zellen) durchgeführt werden, in denen Radicicol die Morphologie des transformierten Phänotyps auf die Normalform zurückführte und die Zellen in der G_1 - bzw. G_2 -Phase des Zellzyklus festsetzte. Nach Aussetzen der Behandlung mit dem Makrolid nahmen die Fibroblasten

wieder die Form der transformierten Spezies an. Da die Spezifität der Wirkung in vivo nicht verlorengeht, konnte die Morphologie *c-erb-B2*-transformierter Zellen (*c-erb-B2* kodiert für eine mutierte und dadurch permanent aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase) ebenfalls auf die Normalform zurückgeführt werden, während dies mit *v-raf-1*-transformierten Zellen nicht gelang (*v-raf-1* kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase, siehe Abschnitt 2.2). Daß Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Tyrosinresten auch bei der Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle spielen, konnte nachgewiesen werden, indem man Friend-Leukämie-Zellen in Gegenwart geringer Dosen Radicicol kultiverte: Der Anteil der differenzierten Zellen, die Hämoglobin akkumulierten, nahm mit zunehmender Konzentration an Radicicol zu.

Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) wurden bisher nur in bezug auf die antifungale Aktivität des Naturstoffs unternommen. Sie ergaben, daß die biologische Wirkung bei Veränderungen am makrocyclischen Ring, insbesondere der Epoxidfunktion, abnahm, während sie vom Substitutionsmuster des aromatischen Ringes unabhängig war. Die Inhibition der Proliferation von HeLa-Zellen und damit die Antitumoraktivität von Radicicol konnte jedoch durch Acylieren der phenolischen OH-Gruppen mit Stearin- und Palmitinsäure sowie durch Verethern drastisch erhöht werden.^[62] Auch wenn erste Untersuchungen zeigen, daß die PTK-inhibierende Aktivität von Radicicol in Gegenwart von Reagentien verschwindet, die die Epoxideinheit reduzieren können, wie Dithiothreit, stehen weitere Forschungen auf diesem Gebiet noch aus.

3.2. Tyrphostine

Besonders gut untersuchte synthetische PTK-Inhibitoren sind die Tyrphostine **6**, die sich von Erbstatin und Tyrosin ableiten und zu denen auch die Verbindungen AG 1478 **7** und AG 1296 **8** gehören (Schema 10).^[49a, b, e] Mehrere hundert Verbindungen dieser Klasse, der ein donorsubstituiertes Styrolgerüst zugrunde liegt, wurden synthetisiert und bezüglich ihrer Wirkung auf Kinasen getestet.

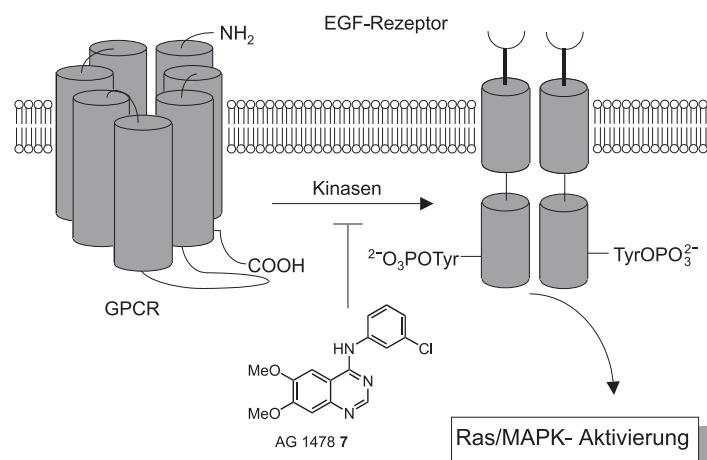
Die meisten der dabei gefundenen PTK-Inhibitoren hatten IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich, die Inhibitoren der neueren Generation, z. B. **7** und **8**, sind jedoch oft um 3–4 Größenordnungen wirksamer und auch ausgenommen spezifisch für einzelne Rezeptorsubtypen.^[49b, e] Tyrphostine wurden z. B. dazu benutzt, das Wachstum von Tumoren zu inhibieren,^[63] die Transformation von Zellen umzukehren,^[64] die Zelldifferenzierung zu initiieren,^[65] die thrombininduzierte Blutplättchenaggregation zu inhibieren,^[66] die Aktivierung von B-Zellen,^[67] T-Zellen^[68] und weiteren Zelltypen zu hemmen, das Wachstum von psoriatischen Keratinocyten zu stoppen^[69] und Versuchstiere vor dem durch Lipopolysaccharid induzierten septischen Schock zu schützen.^[70] Hierbei wurde in den meisten Fällen das molekulare Ziel des Inhibitors genau bestimmt, so daß dessen Beteiligung an den beschriebenen zellulären Funktionen nachgewiesen werden konnte. Diese Beispiele offenbaren das große Potential, das synthetische PTK-Inhibitoren als mögliche Medikamente gegen Krankheiten wie Krebs, Restenosis, Psoriasis und

Sepsis aufweisen. Ein interessantes Ergebnis dieser Experimente ist, daß in bestimmten Fällen zur Erzielung eines gewünschten pharmazeutischen Effektes nicht nur eine Kinase gehemmt werden mußte; somit sollte eine aktive Verbindung ein breites Spektrum von Enzymen regulieren.

Über das pharmazeutische Interesse hinaus sind wirksame und selektive PTK-Inhibitoren für die Erforschung zellulärer Signaltransduktionsmechanismen von besonderer Wichtigkeit. Mit dem hochselektiv die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmenden Tyrophostin AG 1478 **7**^[71] wurde beispielsweise gezeigt, daß die durch UV-Licht oder starke Oxidationsmittel wie H_2O_2 induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors auf die Hemmung zugehöriger, den Rezeptor desaktivierender Phosphatasen zurückzuführen ist.^[72] Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung des ebenfalls hochspezifischen Tyrophostins AG 1296 **8** für den PDGF-Rezeptor erhalten.^[73]

Kinasen der Src-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumoren, wie am Beispiel von Brust- und Dickdarmkrebs eindrucksvoll gezeigt wurde.^[74] A431-Zellen, bei denen durch autokrine Sekretion des $TGF\alpha$ (transforming growth factor α) eine konstitutive Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors erfolgt, weisen eine zehnfach erhöhte Aktivität der Src-Kinasen im Vergleich zu anderen Zellen auf. Daß diese Phänomene zusammenhängen, konnte dadurch gezeigt werden, daß die komplett Blockierung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Zugabe des Tyrophostins **7** ebenfalls zu einem Verschwinden der Src-Aktivität führt.^[75] Hiermit wurde demonstriert, daß eine vermehrte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors für eine Überaktivität der Src-Kinasen verantwortlich sein kann.

Während die einzelnen Schritte der Aktivierung des Ras/MAP-Kinase-Signalweges durch Rezeptor-Tyrosinkinasen gut verstanden werden (siehe Abschnitt 2.2), ist deren ebenfalls mögliche Aktivierung durch GPCRs bislang noch ungeklärt. An Rat-1-Zellen konnte demonstriert werden, daß Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der EGF-Rezeptor als Mediatoren für die mitogenen Signale der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wirken können, indem unabhängig vom Liganden (in diesem Falle also dem des EGF) intrazellulär eine Überkreuzung beider Signalfäde stattfindet (Schema 12).^[76] Stimuliert man nämlich Ratten-Fibroblasten mit GPCR-Agonisten wie Endothelin 1, Lysophosphatsäure oder Thrombin, so wird der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors schnell phosphoryliert. Verhindert man diese kovalente Modifikation durch Zugabe von AG 1478 **7** oder durch Transfektion von Rattenzellen mit einer dominant-negativen EGF-Rezeptor-Mutante, wird die DNA-Synthese unterbrochen und das Wachstum somit gestoppt. Diese Ergebnisse liefern ein anschauliches Beispiel für die Überschneidung von Signalwegen und für die Art und Weise, in der ein Membranrezeptor, hier ein GPCR, sich intrazellulär der Wirkung eines anderen Rezeptors, hier des EGF-Rezeptors, ohne Einwirkung von dessen Liganden, also des EGF, bedient. Weiterhin demonstriert diese Untersuchung die Leistungsfähigkeit von *in vivo* schnell wirkenden, effektiven und selektiven Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Gewinnung biologischer Erkenntnisse.

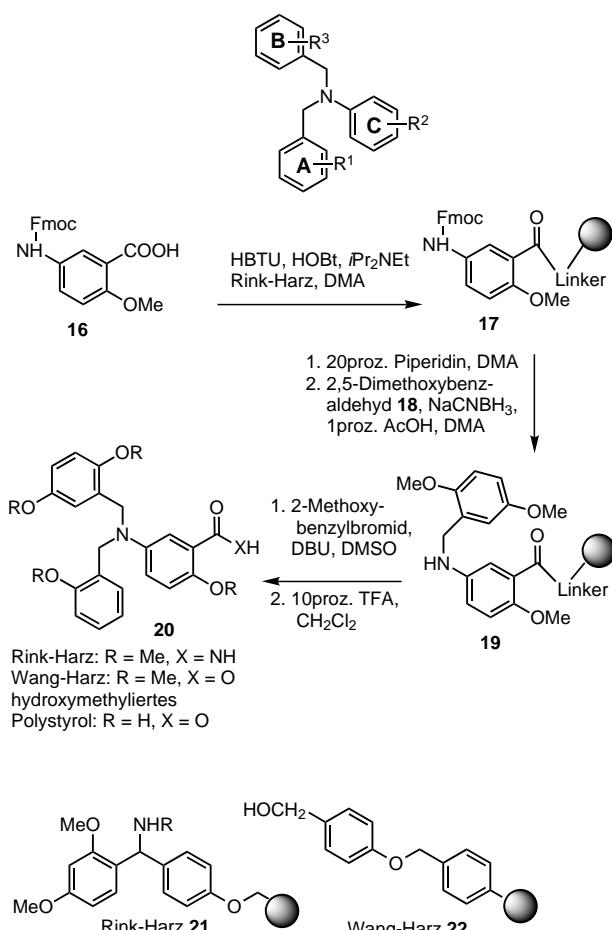


Schema 12. „Cross talk“ zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und dem EGF-Rezeptor. MAPK = MAP-Kinase.

3.3. Lavendustin A und Analoga

Eine elegante und vielversprechende Alternative zur Synthese einer Vielzahl von potentiellen Inhibitoren in kürzester Zeit ist die Anwendung der kombinatorischen Chemie.^[77] Der Naturstoff Lavendustin A **2** inhibiert die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors selektiv, während er nur geringfügige Effekte auf die Aktivität der cAMP-abhängigen Kinase PKA oder der PKC hat.^[78] Detaillierte kinetische Studien ergaben, daß die Substanz kompetitiv bezüglich ATP und Peptidsubstrat wirkt und die Bindungsaffinitäten der Kinase für beide Substrate deutlich verringert. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß Lavendustin A in der Kinasedomäne, aber außerhalb der Bindungsstellen für ATP und das Peptid bindet. Als Zielstruktur für die Herstellung von Analoga mit veränderter biologischer Aktivität durch kombinatorische Synthese bringt die Verbindung ideale Voraussetzungen mit: Das Grundgerüst läßt sich durch einfache und effiziente Reaktionen aus drei aromatischen Bausteinen aufbauen, und über die phenolischen Funktionen oder die Carbonsäuregruppe läßt es sich an eine feste Phase anknüpfen.^[79]

Für die kombinatorische Synthese von 60 Lavendustin-A-Analoga wurden vier Benzylbromide **A**, fünf Benzaldehyde **B** und drei aromatische Aminosäuren **C** eingesetzt; als Polymere wurden das Rink-Harz **21**, das Wang-Harz **22** und hydroxymethyliertes Polystyrol verwendet (Schema 13). Die Fmoc-geschützte Aminosäure **16** wurde zunächst über die Carboxyfunktion an die feste Phase gebunden (→**17**) und dann mit Piperidin N-deblockiert. In Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid gelangen die reduktiven Aminierungen mit den Benzaldehyden, z. B. mit **18**, zu sekundären Aminen (→**19**), die dann in einem weiteren Schritt benzyliert wurden. Nach Abspaltung der Zielmoleküle vom Polymer unter sauren (10proz. TFA für das Rink-Harz, 50proz. TFA für das Wang-Harz) oder Lewis-sauren Bedingungen (BBr_3 für hydroxymethyliertes Polystyrol) konnten die einzelnen Verbindungen sowohl in an den Hydroxyfunktionen geschützter als auch in freier Form erhalten werden. Die Ausbeuten betrugen zwischen 10 und 76 %, die Reinheit lag zwischen 30 und 97 %.



Schema 13. Kombinatorische Synthese von Lavendustin-A-Analoga. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DMA = *N,N*-Dimethylacetamid, DMSO = Dimethylsulfoxid, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, HBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOEt = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol. Der feste Träger (Polystyrol) ist als Kugel dargestellt; für den Linker siehe **21** und **22**.

3.4. Inhibitoren vom 2-Phenylaminopyrimidin-Typ

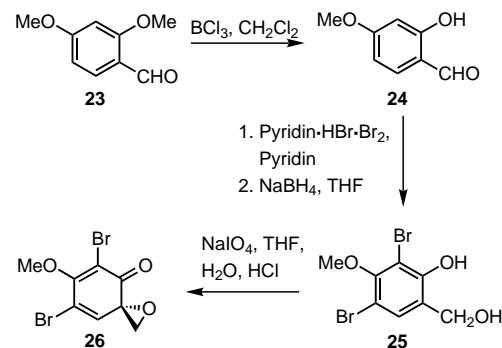
Kürzlich wurden 2-Phenylaminopyrimidin-Derivate als potente Tyrosinkinase-Inhibitoren vorgestellt.^[80] Durch gezielte Variation der Struktur und der sich daraus ergebenden Vorzugskonformation konnte der hochpotente und selektive Inhibitor **9** (Schema 10) des PDGF-Rezeptors hergestellt werden. Da die Substanz effizient in lebende Zellen eindringt, wurde sowohl die Autophosphorylierung des Rezeptors als auch die Phosphorylierung anderer Substrate *in vivo* gehemmt. Während der Inhibitor keinerlei Wirkung auf EGF-, Insulin-, IGF1-, Fibroblasten-Wachstumsfaktor- und Phorbol-ester-stimulierte Signaltransduktion zeigt, konnte die PDGF-induzierte Expression der c-Fos-mRNA in BALB/c 3T3-Zellen blockiert werden. Entsprechend dieser Befunde ließ sich die Proliferation von Zellen blockieren, die das Onkogen *v-sis* überexprimieren (*v-Sis* ist ein PDGF-Rezeptor mit einer Mutation in der Transmembrandomäne) und die als Folge einer autokrinen PDGF-Produktion wachsen, während EGF-, IL3- und *H-ras*-transformierte Zellen nur bei deutlich höheren Inhibitorkonzentrationen im Wachstum behindert

wurden. Durch Verfütterung von **9** an Mäuse, denen mit *v-sis* und *c-sis* transformierte Tumorzellen implantiert wurden, konnte eine Antitumorwirkung demonstriert werden: Die Größe des Tumors wurde dabei in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis verringert.^[81]

3.5. Aeroplysinin

Aeroplysinin **3** ist ein mariner Naturstoff, der in beiden enantiomeren Formen aus den Schwämmen *Aplysina aerophoba*^[82] und *Ianthella ardis*^[83] isoliert wurde und ein hochsubstituiertes Cyclohexadienegerüst mit zwei Stereozentren aufweist. Von seinen vielfältigen biologischen Eigenschaften erregte neben seiner antibiotischen Wirkung vor allem seine Fähigkeit, die Phosphorylierung exogener Substrate des EGF-Rezeptors *in vitro* zu inhibieren, sowie seine Antitumorwirkung auf EGF-Rezeptor-abhängige Zelllinien Aufmerksamkeit.^[52]

Versuche, die Wirkung des Naturstoffs auf die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors *in vivo* zu untersuchen, ergaben allerdings, daß die Applikation der Substanz zu keiner Veränderung des Phosphotyrosingehaltes der Zellen führte.^[84] Dieser Befund wurde auf die hohe Polarität der *trans*-Dioleinheit und die damit verbundene Schwierigkeit, die lipophile Zellmembran zu passieren, zurückgeführt und zum Anlaß genommen, das hydrophobere Analogon **26** zu synthetisieren (Schema 14): Die Struktur von **26** ähnelt der

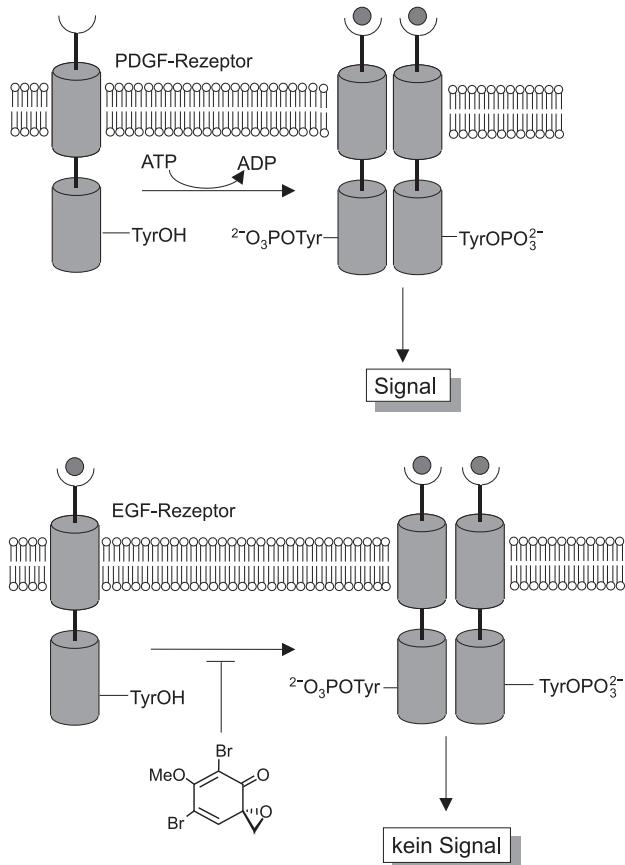


Schema 14. Synthese des biologisch aktiven Aeroplysininanalogs **26**.

von Aeroplysinin sehr, statt der Diolfunktion enthält **26** eine weniger hydrophile Epoxyketoneinheit. Diese hat darüber hinaus den Vorteil, daß sie von Nucleophilen in der katalytischen Domäne des Enzyms angegriffen werden kann, so daß die Möglichkeit gegeben ist, das Substrat kovalent zu modifizieren und damit die Rezeptor-Tyrosinkinase irreversibel zu hemmen. Das Analogon **26** wurde in vier Stufen aus 2,4-Dimethoxybenzaldehyd **23** durch regioselektive Spaltung eines Methylethers, Bromierung, Reduktion zum *ortho*-Hydroxybenzylalkohol und anschließende Becker-Adler-Oxidation in einer Gesamtausbeute von 50 % hergestellt (Schema 14).

Die Wirkung von **26** auf die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde an immortalisierten Rattenzellen untersucht, die den menschlichen EGF-Rezeptor überexpri-

mieren. Das Enzym wurde nach nur fünfminütiger Inkubation mit einem IC_{50} -Wert von $10\text{ }\mu\text{m}$ inhibiert, während selbst bei einer zehnfach höheren Konzentration ($100\text{ }\mu\text{m}$) die Auto-phosphorylierung des PDGF-Rezeptors nicht blockiert wird (Schema 15). Durch die Synthese weiterer strukturell ver-



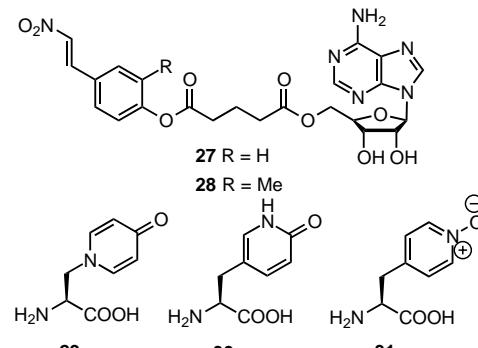
Schema 15. Selektive Blockierung der Signaltransduktion über den EGF-Rezeptor durch das synthetische Aeroplysinanalogon **26**; auf den PDGF-Rezeptor hat **26** keine Wirkung (Einzelheiten siehe Text).

wandter Verbindungen wurde gezeigt, daß für diese hohe In-vivo-Aktivität die lipophilen Bromatome und eine elektrophile funktionelle Gruppe essentiell sind. Darüber hinaus reagierte **26** mit Nucleophilen unter Öffnung der Epoxidfunktion und einer nicht erwarteten Rearomatisierung, was die oben beschriebene Vermutung bezüglich einer kovalenten Modifikation des Enzyms unterstützt. Die starke und selektive Wirkung dieses synthetischen Inhibitors, die unmittelbar nach Applikation der Substanz auftritt, kann nun dazu benutzt werden, vom EGF stimulierte Signale gezielt zu unterbrechen.

An diesem Beispiel wird besonders deutlich, wie sich organische Synthese und biologische Befunde gegenseitig befriedigen können: Die Beobachtung der unzureichenden In-vivo-Aktivität eines Naturstoffs führt zum rationalen Design und zur Synthese eines aktiven Inhibitors, der nun in weiteren biologischen und pharmazeutischen Experimenten eingesetzt werden kann.

3.6. Weitere Inhibitoren

In einer weiteren Untersuchung wurden ausgehend von dem wahrscheinlichen Übergangszustand des Phosphattransfers von ATP auf Tyrosinreste mögliche Bisubstratanaloga synthetisiert.^[85] Die Verbindungen **27** und **28** enthalten einen Nitrostyrolrest als Tyrosinmimeticum, der über einen Alkyl-spacer mit einer Glutaryl-Adenosin-Einheit, die ein ATP-Molekül imitiert, verknüpft ist (Schema 16). **27** und **28**



Schema 16. Bisubstratanaloga und Tyrosinmimetica.

inhibierten den EGF-Rezeptor mit einem IC_{50} -Wert von $<1\text{ }\mu\text{m}$ und wiesen dabei ebenfalls eine deutliche Subtypenselektivität gegenüber den PTKs v-Abl und c-Src sowie gegenüber der Ser/Thr-spezifischen Kinase PKC auf. Auch in einem In-vivo-System mit stark EGF-abhängigen epidermalen Keratinocyten der Maus erwiesen sie sich als potente antiproliferative Substanzen. Des weiteren wurden in einigen Veröffentlichungen Versuche beschrieben, potente und spezifische Inhibitoren bestimmter Tyrosinkinasen herzustellen, indem ein modifiziertes Tyrosin in ein Substratpeptid der jeweiligen Kinase inkorporiert wurde. Als Tyrosinmimetica, die irreversibel mit nucleophilen Seitenketten im aktiven Zentrum des Enzyms reagieren sollten, wurden beispielsweise L-3-Desoxymimosin **29**^[86] sowie das Pyridon **30**^[87] und das Pyridin-N-oxid **31**^[87] verwendet, die nach einer O-Phosphorylierung durch das Enzym mit Nucleophilen reagieren sollten. Die beobachteten biologischen Aktivitäten blieben dabei jedoch hinter den Erwartungen zurück.

4. Untersuchung und Inhibierung von Wechselwirkungen über SH2- und SH3-Domänen

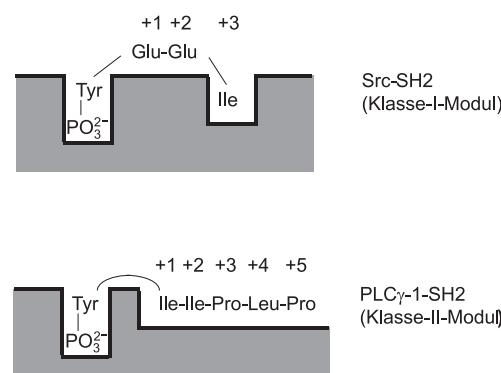
Nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Proteinen spielen bei biochemischen Phänomenen eine entscheidende Rolle. Sie werden häufig von Modulen vermittelt, die in der Natur universell eingesetzt werden und die in vielen Proteinen wie PTKs, Lipidkinasen, Proteinphosphatasen, Phospholipasen, Ras-kontrollierenden Proteinen (siehe Abschnitt 2.2), Transkriptionsfaktoren und Adapterproteinen in allen eukaryontischen Zellen zu finden sind.^[88, 89] Zu diesen Einheiten, deren Struktur im allgemeinen unabhängig von den umgebenden Aminosäuren und den zu bindenden Liganden konserviert ist, zählen insbesondere die gut unter-

suchten SH2- und SH3-Domänen (siehe Abschnitt 2.2). Bei der Erforschung der Wechselwirkungen von SH2- und SH3-Domänen mit ihren Liganden und für das Auffinden erster Modulatoren dieser Wechselwirkungen wurde die kombinatorische Synthese großer Peptidbibliotheken erfolgreich angewendet. Naturstoffe mit entsprechender Wirkung sind bislang nicht bekannt.

4.1. SH2-Domänen

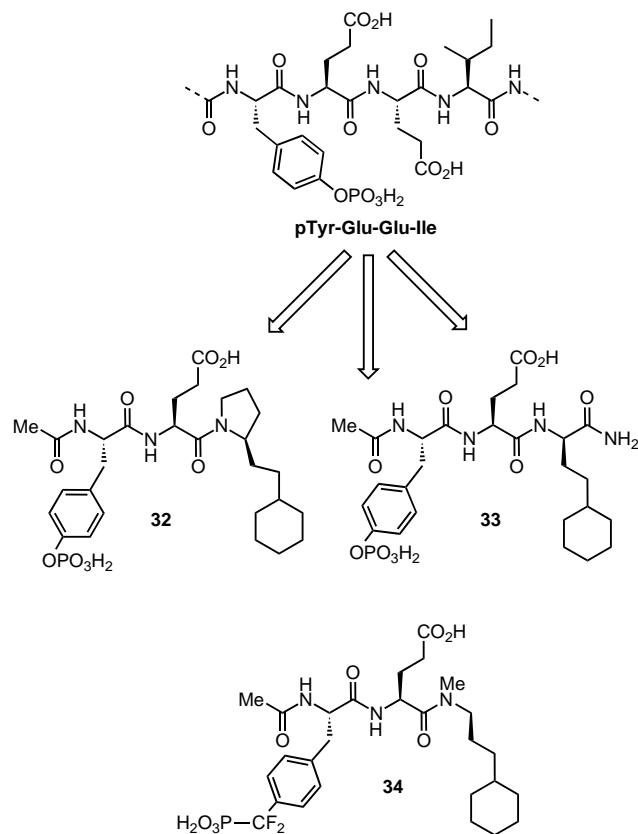
SH2-Domänen sind Cluster aus ca. 100 Aminosäuren, die an Tyrosinresten phosphorylierte Peptide erkennen und binden, wobei die Affinität der Liganden im Bereich von $K_D = 10 - 100 \text{ nm}$ liegt.^[90] Durch die Anwendung der kombinatorischen Chemie konnte eine strukturelle Basis für die Wechselwirkung zwischen den SH2-Domänen bestimmter Proteine und ihren spezifischen Bindungspartnern gefunden werden.^[91] Dazu wurde eine Bibliothek von $18^3 = 5832$ Phosphopeptiden der allgemeinen Sequenz Gly-Asp-Gly-pTyr-Xxx-Xxx-Xxx-Ser-Pro-Leu-Leu-Leu, in der die drei Reste Xxx unter Verwendung aller natürlichen Aminosäuren mit Ausnahme von Cys und Trp variiert wurden, synthetisiert und auf ihre Affinität gegenüber 14 SH2-Domänen getestet. Es stellte sich heraus, daß man prinzipiell zwei Kategorien von SH2-Domänen unterscheiden kann: Klasse-I-Module, zu denen die Domänen der Proteine Src, Fyn, Lck, Fgr, Abl, Crk, und Nck gehören, binden Motive der Art pTyr-Xxx-Xxx-Ile/Pro (wobei Xxx eine hydrophile Aminosäure ist), während Klasse-II-Module, die in Proteinen wie p85, PLC γ und SHPTP2 vorkommen, das Motiv pTyr-Yyy-Zzz-Yyy (wobei Yyy eine hydrophobe und Zzz eine beliebige Aminosäure ist) bevorzugen. Durch computergestützten Vergleich der Sequenzen experimentell bestimmter Vorzugsmotive mit denen natürlicher Proteine können auf einfache Weise potentielle neue Liganden und Zielmoleküle der verschiedenen SH2-Domänen aufgespürt werden. Für die Bindungspartner von p85 und PLC γ wurden diese Vorhersagen beispielsweise bestätigt. Durch NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse wurden die Strukturen der Domänen sowohl mit als auch ohne gebundenen Liganden bestimmt.^[92] Dadurch konnte die experimentell bestimmte Selektivität der Bindung auf molekularer Ebene aufgeklärt und gezeigt werden, daß der pTyr-Rest in einer tiefen Tasche durch ionische (über die Phosphatgruppe) und hydrophobe Wechselwirkungen (über das Aren) gebunden wird, während die C-terminal folgenden Aminosäuren entweder in einer zweiten Tasche (Klasse-I-Domänen; hier bildet sich eine steckdosenförmige Struktur) oder einer hydrophoben Furche gebunden werden (Schema 17).

Die hohe Spezifität, mit der SH2-Module eines Proteins Phosphotyrosin enthaltende Sequenzen eines weiteren Biomoleküls erkennen, macht die Inhibierung oder Modifizierung dieser Wechselwirkung zu einem lohnenden Ziel für die bioorganische und die medizinisch-chemische Forschung, denn sie eröffnen die Möglichkeit, mit geeigneten Substanzen einzelne Signalwege an genau definierter Stelle zu unterbrechen. Insbesondere hat es nicht an Versuchen gefehlt, Antagonisten für die „steckdosenartige“ SH2-Domäne der Src-Kinasen, die die Sequenz pTyr-Glu-Glu-Ile bevorzugen



Schema 17. Schematische Darstellung der Strukturen der beiden Klassen von SH2-Domänen.

(Klasse I), zu finden. So weisen die Tetrapeptidanaloga **32** – **34** (Schema 18), die alle einen hydrophilen (pTyr) und einen hydrophoben „Stecker“ (Ile) für die SH2-„Steckdose“ beinhalten, ähnlich hohe Bindungsaffinitäten wie längere Peptidsequenzen auf, die das natürliche Vorzugsmotiv (siehe oben) aufweisen.^[93, 94] Weitere Arbeiten zu diesem Thema

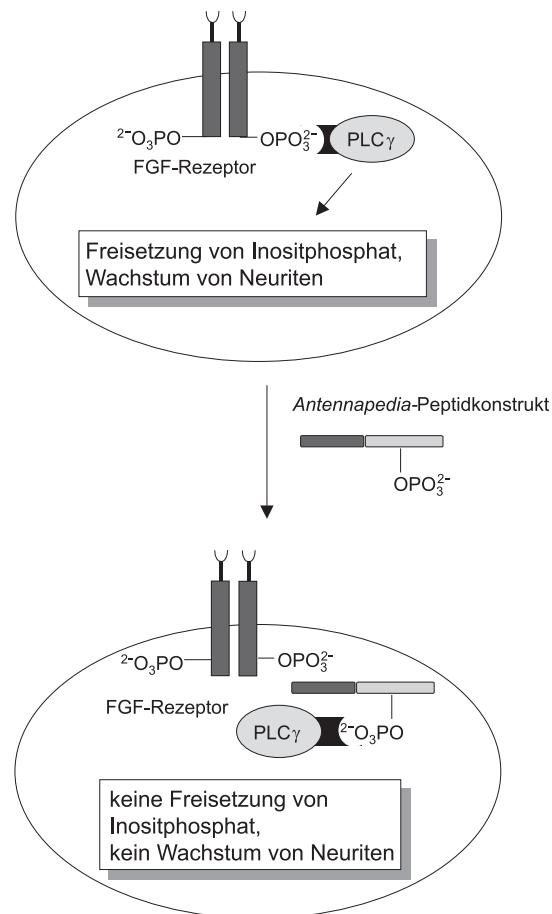


Schema 18. Von pTyr-Glu-Glu-Ile abgeleitete Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen der SH2-Domäne von c-Src und natürlichen Liganden.

umfassen die kombinatorische Synthese von Tyrosin enthaltenden Peptiden^[95] sowie das rationale Design und die Synthese von Phosphotyrosyl-Peptidmimetica als Liganden von c-Src.^[96] Daneben wurden konformativ rigide cyclische Peptide, die Phosphonomethylphenylalanin- oder Phosphotyrosinreste enthalten, als Inhibitoren der Wechselwirkung

zwischen PTKs und den SH2-Domänen verschiedener Liganden synthetisiert.^[97] Das große Potential synthetischer Inhibitoren wird z.B. dadurch belegt, daß das Pentapeptid Ac-pTyr-Glu-Glu-Ile-Glu in der Lage ist, in Zell-Lysaten, d.h. in vitro, die Wechselwirkung zwischen Src und dessen zellulären Phosphoprotein-Partnern zu blockieren, auch wenn dieses Peptid in vivo keine antiproliferativen Effekte auf Zellen ausübt,^[98] da es aufgrund seiner hohen Polarität die Zellmembran nicht durchdringen kann und durch zelluläre Phosphatasen und Peptidasen abgebaut wird.

Kürzlich wurde jedoch über eine neue, vielversprechende Möglichkeit für den Transport von Peptid-Wirkstoffen durch Membranen berichtet. Die Phospholipase C (siehe Abschnitt 2.1) erkennt mit ihrer SH2-Domäne die Phosphotyrosin enthaltenden Sequenzen von Rezeptoren, die nach Bindung ihrer Liganden, z.B. des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF), des EGF, des PDGF oder des Neurotrophins 3 (NT-3), aktiviert wurden. Diese Bindung ist für die Hydrolyse von Phospholipiden und die Freisetzung von Inositphosphaten notwendig. Phosphorylierte Peptide, die den Phosphotyrosin enthaltenden Sequenzen entsprechen, inhibieren diese Bindung in vitro.^[99] Um solche Peptide in das Zellinnere zu transportieren, wurde eine Sequenz von 16 Aminosäuren aus dem *Antennapedia*-Protein erfolgreich verwendet. Das entsprechende Peptid kann biologische Membranen durchdringen und dabei auch andere Peptide und Nucleotide transportieren.^[100] In einem interessanten Experiment wurde nun diese Sequenz an ein Nonapeptid geknüpft, das der von PLC γ am FGF-Rezeptor erkannten Sequenz entspricht. Das Konjugat wurde auf seine Aktivität in cerebralen Neuronen untersucht (Schema 19).^[101] Mit dem phosphorylierten Peptid konnte die Freisetzung von Inositphosphaten bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ vollständig inhibiert werden, während das nichtphosphorylierte Peptid überhaupt keine Wirkung aufwies. Um zu demonstrieren, daß der Wirkstoff tatsächlich ins Cytoplasma eingedrungen war, wurde die Aufnahme eines biotinylierten Derivats durch confocale Mikroskopie verfolgt. Das Peptid hemmte spezifisch die FGF-stimulierte Hydrolyse von Phospholipiden, da eine Behandlung der Zellen mit dem PDGF oder mit Neurotrophin 3 trotz der Gegenwart des Wirkstoffs zur Freisetzung von Inositphosphaten führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der PLC γ nötig und hinreichend für die Stimulierung des FGF-induzierten Wachstums von Neuriten ist, da in Gegenwart des peptidischen Inhibitors diese Wachstumsreaktion blockiert wurde. Diese Befunde belegen, daß mit dieser Methode auch polare Peptide verwendet werden können, um Signalkaskaden gezielt zu unterbrechen. Im JAK/STAT-Signalweg werden die STAT-Proteine durch Phosphorylierung an Tyrosinresten und nachfolgende Dimerisierung dieser Transkriptionsfaktoren über Wechselwirkungen zwischen Phosphotyrosin und SH2-Domänen aktiviert (siehe Abschnitt 2.3). Daraufhin wandern sie in den Zellkern und binden an die DNA. Die Aufklärung dieses Mechanismus gelang unter anderem durch den Einsatz von Phosphotyrosylpeptiden, die je nach ihrer Sequenz in der Lage waren, die Dissoziation des Homodimers zu induzieren und dadurch die Bildung des Protein-DNA-Komplexes zu verhindern.^[102] Die nichtphosphorylierten Analoga der Peptide lösten diesen Effekt nicht aus.



Schema 19. In-vivo-Hemmung der Bindung von PLC γ an den FGF-Rezeptor durch ein *Antennapedia*-Peptidkonstrukt.

Der menschliche Östrogenrezeptor (HER) ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung eines lipophilen Hormons reguliert wird und ebenfalls Homodimere bilden muß, um an die DNA zu binden und die Gentranskription zu aktivieren. Die Rolle der Phosphorylierung des Tyr 537 im HER bei der Dimerisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors wurde mit einem Phosphotyrosylpeptid studiert, das die unmittelbare Umgebung dieser Phosphorylierungsstelle repräsentiert.^[103] Dieses Dodecapeptid inhibierte vollständig die Bindung des HER an das Östrogen-Response-Element (ERE) der DNA und war in der Lage, die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors durch spezifische Bindung des Rezeptormonomers zu verhindern. Wiederum konnten nichtphosphorylierte Peptide sowie Phosphopeptide mit anderen Aminosäuresequenzen diesen Effekt nicht auslösen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Aktivierung der Gentranskription durch den HER ein ähnlicher Mechanismus wie für die Aktivierung der STAT-Proteine postuliert, d.h. eine über SH2-Domänen vermittelte Homodimerisierung. Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeiten besteht darin, daß das Peptid anders als bekannte Antagonisten wie Clomiphen, Tamoxifen und RU486 die Wirkung des Östrogenrezeptors inhibiert, ohne an der Hormonbindungsstelle anzugreifen.

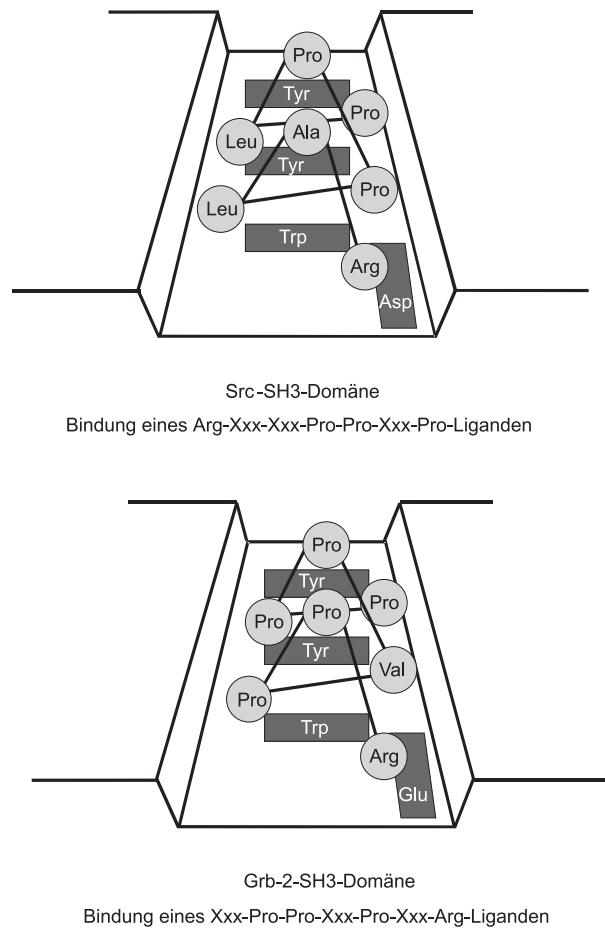
Die Protein-Tyrosinphosphatase SH-PTP2 enthält zwei SH2-Domänen und bindet nach einer Stimulierung durch

Wachstumsfaktoren an den PDGF-Rezeptor, an den EGF-Rezeptor und auch an das mehrfach an Tyrosinresten phosphorylierte Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS1). Synthetische Phosphotyrosylpeptide mit Sequenzhomologie zum IRS1 konnten über eine allosterische Aktivierung die Dephosphorylierung durch das Enzym deutlich beschleunigen.^[104]

Mit einem vom EGF-Rezeptor abgeleiteten Phosphotyrosylpeptid, das das Tyr 1068 dieses Proteins enthält, wurde schließlich die Wechselwirkung dieses Rezeptors mit dem Adapterprotein Grb2 inhibiert. Die Einschleusung dieses Peptids in Zellen führte zu einer geringeren Stimulierung des Ras-Proteins und der MAP-Kinase.^[105]

4.2. SH3-Domänen

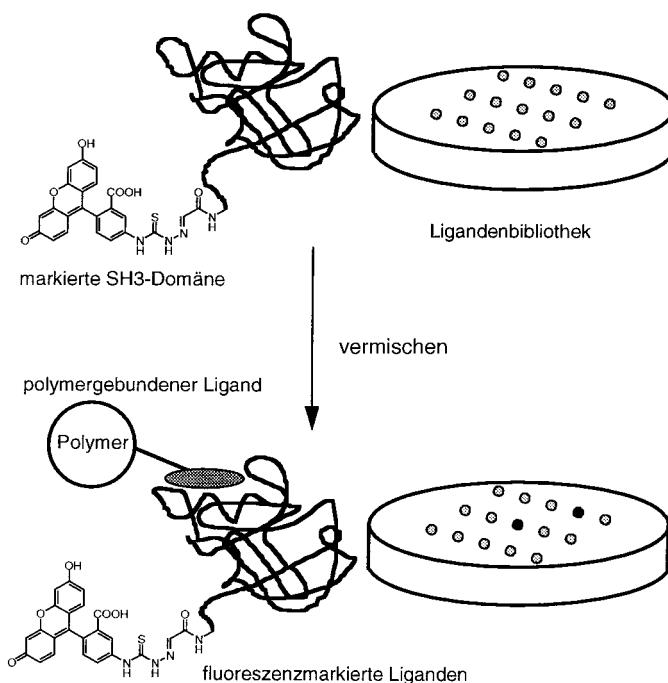
SH3-Domänen bestehen aus ca. 60 Aminosäuren und binden prolinreiche Sequenzen, die eine linksgängige Polyprolinhelix vom Typ II bilden (Schema 20); die Affinität der



Schema 20. Mögliche Orientierungen des Pro-Pro-Xxx-Pro-Motivs in SH3-Domänen von Src und Grb2.

Peptide liegt bei $K_D = 5\text{--}100 \mu\text{M}$.^[88] Die Erforschung der Bindungsspezifitäten und der Eigenschaften dieser Module wurde außer durch die Strukturaufklärung der Domänen und ihrer Liganden^[106] besonders durch die Anwendung der kombinatorischen Chemie vorangetrieben.^[107] Auf der Beob-

achtung fußend, daß Peptide mit der Sequenz Pro-Pro-Xxx-Pro von der SH3-Domäne der Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI-3-Kinase) besonders gut gebunden werden, wurde eine „vorgeprägte“ Bibliothek der allgemeinen Form Xxx-Xxx-Xxx-Pro-Pro-Xxx-Pro-Xxx-Xxx (Xxx steht für jede Aminosäure außer Cystein) synthetisiert, die durch das Pro-Pro-Xxx-Pro-Motiv eine Basisaffinität zur verwendeten SH3-Domäne haben sollte.^[108] Auf Poly(dimethylacrylamid)-Kügelchen wurden durch kombinatorische Synthese nach dem „Split-and-combine“-Verfahren ca. zwei Millionen verschiedene Peptide hergestellt, so daß pro Kügelchen genau eine definierte Verbindung entstand. Um die Bindung der potentiellen Liganden an die SH3-Domäne zu detektieren, wurde die rekombinante SH3-Domäne der PI-3-Kinase nach Oxidation des N-terminalen Serins zum Glyoxylamid an Fluorescein-5-thiosemicarbazid gekuppelt und die Bibliothek mit diesem markierten Protein behandelt (Schema 21). Von 70



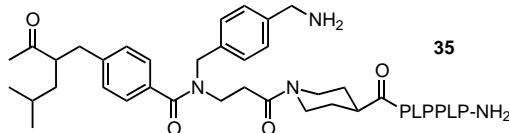
Schema 21. Kombinatorische Synthese von Peptid-Liganden für die SH3-Domäne der PI-3-Kinase.

Kügelchen, die das fluoreszierende Protein banden, wurden die 17 mit der höchsten Fluoreszenz ausgesucht und die an sie gebundenen Peptide durch Edman-Abbau sequenziert. Die gemessenen Bindungsaffinitäten der identifizierten Liganden gehörten zu den höchsten bis dahin bekannten ($K_D = 8\text{--}30 \mu\text{M}$).

Interessanterweise konnten zwei Klassen von Peptidliganden identifiziert werden, die sich unter anderem darin unterschieden, daß ein basischer Argininrest im einen Fall C-terminal vom gemeinsamen Pro-Pro-Xxx-Pro-Motiv (Xxx-Pro-Pro-Leu-Pro-Xxx-Arg, Klasse-I-Liganden) und im anderen Fall N-terminal (Arg-Xxx-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Xxx-Xxx, Klasse-II-Liganden) vorkommt. Die Bestimmung der Strukturen der Peptide aus der Bibliothek, die an die Src-SH3-Domäne binden, durch mehrdimensionale NMR-Tech-

niken lieferte das überraschende Ergebnis, daß die Helices der Liganden in zwei Orientierungen gebunden werden (Schema 20). Dabei bildet jeweils der Argininrest mit einem Aspartat- oder Glutamatrest der Bindungstasche eine Salzbrücke und bestimmt damit die Lage des Peptids, während die Seitenketten des Prolins und Leucins mit aromatischen Aminosäuren im Protein hydrophobe Wechselwirkungen eingehen.^[109] Da diese nichtkovalenten Bindungen allen Domäne-Ligand-Systemen gemein sind, wird die Spezifität eines SH3-Moduls eines bestimmten Proteins für seinen Partner über Wechselwirkungen des Peptids mit zwei, die zentrale Bindungstasche flankierenden Bögen vermittelt (Schema 20).

Die Identifizierung peptidanaloger Liganden gelang auf ähnliche Weise durch einen kombinatorischen Ansatz. Dafür wurden an eine Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Sequenz, die eine Orientierung der hergestellten Analoga im Sinne eines Liganden der Klasse I garantieren sollte, vier weitere Bausteine aus einem Pool von 64 Verbindungen über Amid- und Urethanbindungen angeknüpft.^[110] Die Affinität der festphasengebundenen Liganden für SH3-Domänen wurde mit einer biotinylierten Src-SH3-Domäne bestimmt, die an einen Komplex aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase bindet und dadurch ein detektierbares Signal liefert. Aus einer Bibliothek von 1.1 Millionen Verbindungen konnten so 15 aktive Liganden (z.B. **35**, Schema 22) mit kleinen Dissozia-



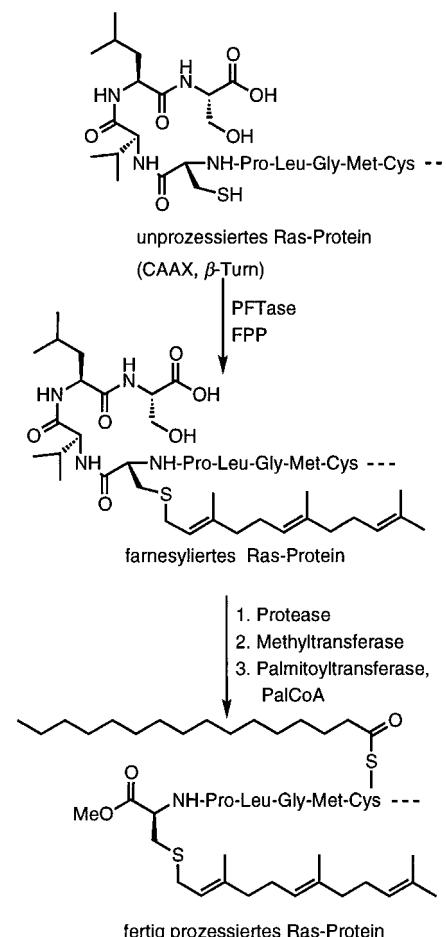
Schema 22. Nichtpeptidischer Ligand der Src-SH3-Domäne. P = Pro, L = Leu.

tionskonstanten ($K_D = 3.4 - 30 \mu\text{M}$) gefunden werden. NMRspektroskopisch wurde darüber hinaus gezeigt, daß die Bindungsspezifität peptidanaloger Liganden durch andere Wechselwirkungen zustande kommt als die peptidische Bindungspartner. Durch das Design von Substanzen, die an beide Stellen binden, sollten daher sehr effektive Inhibitoren für Wechselwirkungen über SH3-Domänen zu erhalten sein.^[111]

5. Inhibierung der Ras-Farnesyltransferase (PFTase)

Ras-Proteine wirken als zentrale Schalter für von Wachstumsfaktoren ausgesandte Signale, die Zellwachstum, Zell-differenzierung und weitere genetische Programme steuern.^[112] Hierfür müssen die Ras-Proteine membranassoziiert sein. Ihre Verankerung in der Zellmembran wird durch co- und post-transkriptionale Modifizierung des C-Terminus mit Lipidresten erreicht, mit denen die Proteine an Membranen binden können.^[113] Dazu wird bei der Biosynthese von Ras der Cysteinrest der C-terminalen CAAX-Sequenz (C steht für Cystein, A für eine in der Regel aliphatische Aminosäure, X für Methionin, Serin, Alanin oder Glutamin) einer Proteinvorstufe zunächst

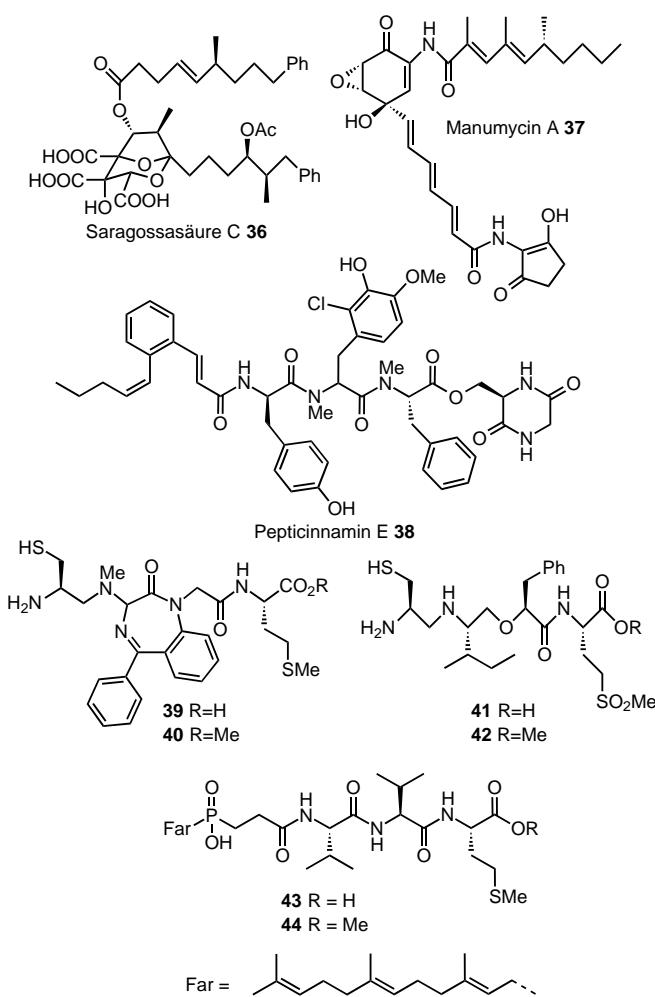
enzymatisch farnesyliert, dann der AAX-Teil durch eine spezifische Protease abgespalten und schließlich der freie terminale Cysteinrest in den Methylester überführt (Schema 23).



Schema 23. Posttranskriptionale Modifizierung des Ras-Proteins. FPP = Farnesylypyrophosphat, Pal = Palmitoyl.

Darüber hinaus findet bei H- und N-Ras in unmittelbarer Nähe zum CAAX-Motiv eine weitere Lipidmodifizierung von Cysteinresten durch Bildung von Palmitoylthioestern statt. Für die transformierende Wirkung von mutierten Ras-Proteinen ist die Farnesylierung essentiell.^[114] Das Verhindern dieser Lipidmodifizierung eröffnet vielfältige Möglichkeiten für das Studium von Signaltransduktionsprozessen und für die Entwicklung alternativer medizinisch-chemischer Strategien, beispielsweise für die Tumortherapie.^[115]

Da die räumliche Struktur der heterodimeren Ras-Farnesyltransferase erst kürzlich bestimmt wurde,^[116] wurden für die Entwicklung von Inhibitoren dieses Enzyms Informationen über Substratspezifitäten sowie über die Konformationen der Substrate in Lösung und gebunden an das Enzym herangezogen. (Die Konformationen wurden NMR-spektroskopisch bestimmt: So bildet der gebundene Ligand Cys-Val-Trp-Met einen β -Turn vom Typ III (Schema 23)).^[117] Darüber hinaus konnten in Screening-Tests Naturstoffe mit hoher PFT-inhibierender Wirkung gefunden werden, zu denen die Saragossasäuren (z. B. **36**),^[118] Manumycin A **37**^[119] und Peptiocinnamin E **38**^[120] gehören (Schema 24).



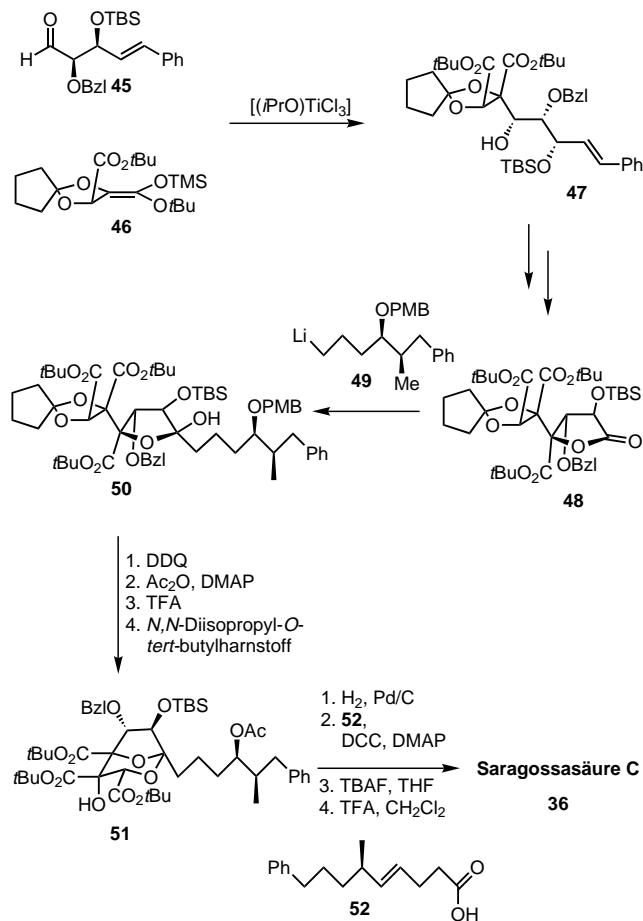
Schema 24. Inhibitoren der Ras-Farnesyltransferase.

5.1. Natürlich vorkommende Ras-Farnesyltransferase-Inhibitoren

5.1.1. Saragossasäuren

Die Saragossasäuren (z.B. 36, Schema 24), die erstmals in nahe der spanischen Stadt Saragossa vorkommenden Pilzkulturen gefunden wurden, inhibieren nicht nur die Farnesyltransferase, sondern auch die Squalen-Synthase.^[118] Das hohe therapeutische Potential dieser komplexen Verbindungen, die in die Cholesterinbiosynthese eingreifen und somit für medizinische Indikationen wie Arteriosklerose, Bluthochdruck und Herzinfarkt von Interesse sind, löste intensive Bemühungen aus, die zur erfolgreichen Totalsynthese dieser neuartigen Naturstoffe führten.^[121, 122] Dabei ist die größte Herausforderung der stereospezifische Aufbau des hochpolaren 2,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octangerüstes, welches an fünf Stereozentren insgesamt drei Carboxy- und drei Hydroxygruppen trägt. Eine dieser Hydroxygruppen muß selektiv mit einer Fettsäure acyliert werden; weiterhin muß eine Alkylkette angebracht werden.

Retrosynthetisch läßt sich nach Entfernen der Acylseitenkette 52 der resultierende Alkohol 51 auf das Lactol 50 zurückführen (Schema 25).^[122] Letzteres sollte durch nucleo-



Schema 25. Synthese der Saragossasäure C 36. BzI = Benzyl, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, DDO = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, PMB = *p*-Methoxybenzyl, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid.

philen Angriff der lithiierten Alkylkette von 49 auf das Lacton 48 erhalten werden, welches aus Weinsäure zugänglich gemacht werden konnte. Der Aufbau des in 45 enthaltenen C₅–C₇-Gerüstes gelang durch eine hoch *syn*-diastereoselektiv verlaufende Evans-Aldolreaktion eines Borenolates mit Phenylacrolein und anschließende Entfernung des chiralen Auxiliars. Ausgehend vom Di-*tert*-butylester der Weinsäure wurde das Silylketenacetal 46 hergestellt, welches eine hoch-diastereoselektiv verlaufende Aldolreaktion mit dem Aldehyd 45 zum Alkohol 47 einging. Durch Standardtransformationen wurde 47 in das Lacton 48 überführt, das alle acht Kohlenstoffatome des bicyclischen Gerüstes sowie die Äquivalente der Alkohol- und Carboxygruppen aufweist. Die Einführung der C₁-Seitenkette gelang durch Addition der Organolithiumverbindung 49 an 48. Nach Manipulationen der Schutzgruppen in der Seitenkette wurde das Lactol 50 unter sauren Bedingungen durch Umacetalisierung in den gewünschten Bicyclus 51 überführt, in dem die Carboxyfunktionen erneut als *tert*-Butylester geschützt waren. Selektive Spaltung des Benzylethers, Einführung der Acylseitenkette 52 und Entschützen der Hydroxy- und Carboxyfunktionen lieferten die Saragossasäure C 36. Diese Synthese sollte sich einfach auf die Herstellung der Saragossasäure A, die sich nur in der Alkylseitenkette von 36 unterscheidet, übertragen

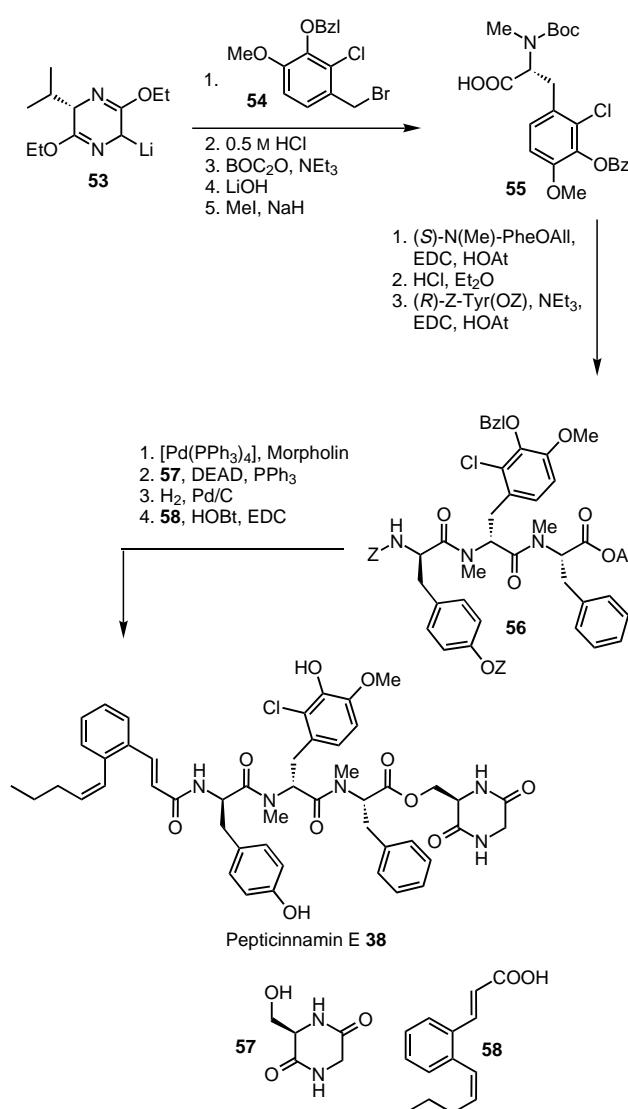
lassen. Bemerkenswert an dieser Totalsynthese ist neben der hohen Stereokontrolle die geringe Stufenanzahl (21 über die längste lineare Sequenz), die damit verbundene hohe Gesamtausbeute von 15% und die geschickte Wahl der Schutzgruppen.

Die Saragossasäuren weisen sehr interessante biologische Wirkungen auf: Sie greifen in den Biosyntheseweg von Cholesterin ein, indem sie die Squalensynthase inhibieren, die Farnesylypyrophosphat (FPP) als Substrat verwendet. Saragossasäure A wurde darüber hinaus als Inhibitor für ein anderes FPP benutzendes Enzym, die Ras-Farnesyltransferase, identifiziert. Dabei wirkt der Naturstoff kompetitiv zu FPP und nicht zum Peptidsubstrat. Wahrscheinlich imitieren die Carboxy- und die Hydroxyfunktionen das Bisphosphat und die hydrophoben Seitenketten den Isoprenteil des Farnesylypyrophosphates.^[123] Um Inhibitoren der PFTase oder auch der Squalensynthase in pharmazeutischen und biologischen Experimenten einzusetzen, ist eine hohe Selektivität gegenüber anderen prenyltransferierenden Enzymen, z.B. den Geranylgeranyltransferasen (GGTasen), von großer Wichtigkeit, da viele Proteine mit diesem C₂₀-Diterpen modifiziert werden. Durch eine geringfügige Veränderung der Alkylseitenkette der Saragossasäure A konnte diese Selektivität deutlich verbessert und die Aktivität gegenüber PFTase um den Faktor 18 erhöht sowie gegenüber der Geranylgeranyltransferase I um den Faktor 2.7 verringert werden. Diese Ergebnisse legen es nahe, durch weitere Veränderungen der Struktur diese Eigenschaften weiter zu verbessern. Interessant ist, daß beide Verbindungen in intakten Zellen selbst bei hohen Konzentrationen und Inkubationszeiten von 24 h keinen Einfluß auf die Funktion des Ras-Proteins ausüben. Auch hier kann man annehmen, daß die Verbindungen wegen der Carboxy- und der Hydroxyfunktionen des Bicyclus zu polar sind, um die Zellmembran zu passieren, so daß deren Maskierung notwendig scheint, um in vivo Effekte zu erzielen.

5.1.2. Pepticinnamin E

Pepticinnamin E **38** (Schema 24) wurde aus *Streptomyces*-Stämmen isoliert und ist ein strukturell interessanter PFTase-Inhibitor.^[120] Man kann spekulieren, daß der Naturstoff ein Übergangszustandsanalogon für den Farnesyltransfer ist, indem die hydrophobe Alkenylacrylsäure den Prenylrest und das konformativ rigide, N-methylierte Peptidgerüst das Peptidsubstrat imitiert. Da die absolute Konfiguration der zentralen, ungewöhnlichen Aminosäure unbekannt ist und die Substanz darüber hinaus durch ihren modularen Aufbau viele Derivatisierungen sowie die kombinatorische Synthese von Analoga mit veränderter biologischer Wirkung ermöglicht, ist ein totalsynthetischer Aufbau des Naturstoffs von erheblichem Interesse.

Bei der Synthese des Pepticinnamins E^[124] **38** (Schema 26) wurde die Acrylsäure **58** ausgehend von 2-Carboxybenzaldehyd nach Veresterung, Z-selektiver Wittig-Reaktion, Reduktion zum Aldehyd und E-selektiver Perkin-Reaktion diastereomerenrein in einer Gesamtausbeute von 31% erhalten. Die zentrale, ungewöhnliche Aminosäure des Naturstoffs konnte in Form von beiden benötigten Enantiomeren



Schema 26. Synthese von Pepticinnamin E **38**. All = Allyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, EDC = *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid, HOAt = 7-Aza-1-hydroxy-1*H*-benzotriazol, Z = Benzylloxycarbonyl.

durch eine Schöllkopf-Reaktion erhalten werden. Dazu wurde der lithiierte Bislactimether **53** mit dem Benzylbromid **54** alkyliert. Abspalten des Auxiliars, Schützen der Aminofunktion, Esterverseifung und Methylieren des Urethans lieferten die Aminosäure **55** und ihr Enantiomer in jeweils enantiomerenreiner Form. Die zentrale Tripeptideinheit **56** konnte durch klassische Peptidkupplungen aufgebaut werden. Aus **56** wurde der Allylester durch Pd⁰-vermittelten Allyltransfer auf Morpholin als nucleophilen Acceptor gespalten. Die Veresterung der erhaltenen Carbonsäure mit dem Alkohol **57** unter Aktivierung der Carboxyfunktion mit Carbodiimiden oder Trichlorbenzoylchlorid gelang nur in niedrigen Ausbeuten. Erst der nucleophile Angriff der Carbonsäure auf den nach Mitsunobu aktivierten Alkohol **57** lieferte den gewünschten Ester in befriedigenden Ausbeuten. Nach Entfernen aller Benzylschutzgruppen wurde durch die Kupplung mit der Acrylsäure **58** schließlich der Naturstoff **38** erhalten.

5.1.3. *Manumycin A*

Manumycin A **37** (Schema 24), ein aus *Streptomyces*-Stämmen isolierter Naturstoff,^[119] ist ein Beispiel für eine Klasse von strukturell neuartigen PFTase-Inhibitoren. Neben der komplexen Stammverbindung blockieren auch strukturell einfachere Abbauprodukte und Derivate die Aktivität der PFTase aus Hefe und Rattenhirnen. Mit Manumycin A konnte anhand der Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ein einfaches Testsystem etabliert werden, mit dem man die In-vivo-Aktivität der Enzymhemmer bestimmen kann.^[125] Darüber hinaus weisen sowohl das Manumycin A als auch das Aminoepoxycyclohexenon-Grundgerüst Antitumoraktivität auf. Die chemische Synthese^[126] von Analoga des Naturstoffs sollte also auch hier ein großes Potential zur Herstellung von hochaktiven, selektiven und metabolisch stabilen Enzyminhibitoren haben.

5.2. Peptidmimetica

Im Hinblick auf die Selektivität der inhibierenden Wirkung gegenüber anderen Enzymen sollten Substanzen, die kompetitiv zum Peptid, insbesondere zum CAAX-Motiv wirken, besonders vorteilhaft sein, da GGTasen hier andere Sequenzmotive bevorzugen (CAAL, wobei L für Leucin steht) als die PFTasen.^[115] Benzodiazepine wie **39** und **40** (Schema 24) sind CAAX-Peptidmimetica, deren zentrale Einheit einen β -Turn imitiert. Darüber hinaus bringen sie den NH₂-Terminus des Cysteinanalogs und den COOH-Terminus des Methionins in räumliche Nähe zueinander, die dadurch ein für die Wirkung der PFTase und die Bindung des Peptidsubstrates essentielles Zn²⁺-Ion komplexieren können.^[127] Die freie Säure **39** inhibiert das Enzym mit einem IC₅₀-Wert von <1 nm, während in intakten Zellen der Methylester **40** trotz seiner schwächeren In-vitro-Aktivität deutlich wirksamer ist, da er die Plasmamembran wegen seiner geringeren Polarität besser durchdringen kann. Diese Eigenschaft konnte dazu benutzt werden, die Morphologie *H-ras*-transformierter Zellen zur Normalform zurückzuführen und ihr Wachstum zu hemmen, während die Substanzen keine Wirkung auf *src*-transformierte und nichttransformierte Ratten-Fibroblasten hatte. Der Inhibitor wirkt also selektiv auf transformierte Zellen und beeinträchtigt normale Zellen im Wachstum nicht. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als die Farnesylierung des Wildtyp-H-Ras-Proteins durch das Benzodiazepin durchaus gehemmt wird und H-Ras am Wachstum normaler Fibroblasten beteiligt ist. Eine genauere Untersuchung dieses unerwarteten Befundes ergab, daß der Inhibitor **40** in nicht-transformierten und *H-ras*-transformierten Zellen die Menge an farnesyliertem H-Ras-Protein verringerte. Aber nur in den transformierten Zellen führte dies zur erwarteten Abnahme der Aktivitäten der Enzyme der Ras-Kaskade: Sowohl die Menge an phosphoryliertem Raf als auch die Aktivitäten von MEK-1, MEK-2 und MAP-Kinase wurden in den Tumorzellen verringert.^[128] Darüber hinaus wurde auch die Stimulierung des Ras-Signalweges durch den EGF in normalen sowie in *src*-transformierten Zellen nicht beeinträchtigt. Die normalen Zellen haben also offensichtlich die Möglichkeit, die

Signalwege ohne oder mit Einbeziehung von Ras zu aktivieren. Tatsächlich konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, daß die Farnesylierung des K-Ras-Proteins durch die Inhibitoren deutlich weniger beeinträchtigt wird als die von H-Ras. K-Ras ist darüber hinaus ein Substrat der GGTase I und kann daher bei Verringerung der PFTase-Aktivität geranylgeranyliert werden.^[129] Normale Zellen wie auch *src*-transformierte Zellen können also anders als *H-ras*-transformierte Zellen den Ausfall eines Ras-Proteins oder eines für das normale Zellwachstum wichtigen Enzyms durch Aktivierung alternativer Wege kompensieren.

5.3. Peptidanaloga

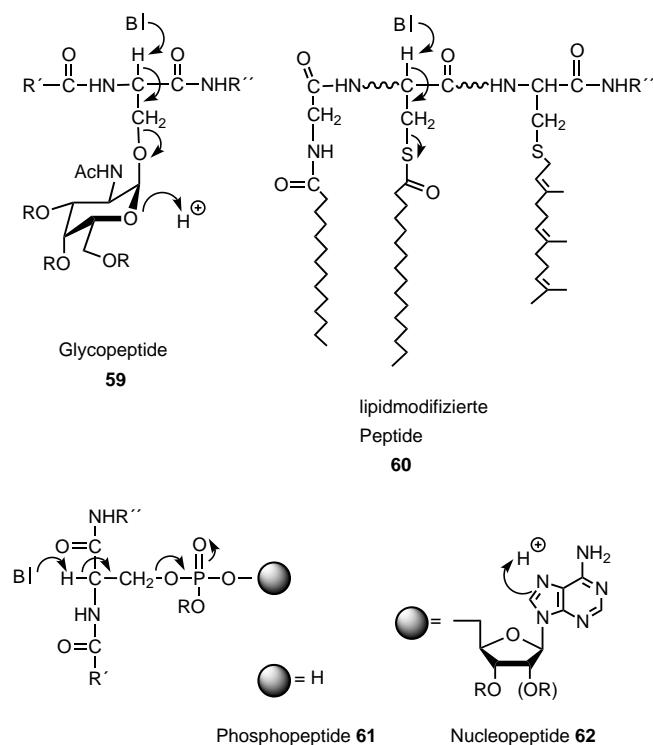
Ein weiterer durch rationales Design entworfener Inhibitor ist das CAAX- β -Turn-Mimeticum **41** (Schema 24).^[130] Es ist ein Analogon von CAAX-Peptiden, bei dem peptidische Amidbindungen durch Ether- und Aminogruppen ersetzt wurden. Die Verbindung inhibiert die PFTase in vitro mit einem IC₅₀-Wert von 1.8 nm und weist eine hochspezifische Wirkung im Vergleich zur Hemmung der GGTase I auf. Mit dem weniger polaren Methylester **42** als Prodrug wurden dagegen in vivo bessere Ergebnisse erhalten: Dieser Ester inhibiert sowohl die Farnesylierung des Ras-Proteins als auch das Wachstum *ras*-transformierter Zellen, während die Proliferation *raf*- oder *mos*-transformierter Fibroblasten nicht beeinträchtigt wird. Auch das Wachstum menschlicher Pankreas-Adenocarcinom-Zellen, in denen mutierte *K-ras*-, *c-myc*- und p53-Gene vorliegen, konnte mit **42** gehemmt werden. Wird die Verbindung über einen Zeitraum von fünf Tagen an Mäuse verabreicht, denen Ras-abhängige Tumore eingeplant wurden, kann das Tumorwachstum um bis zu 66 % im Vergleich zu dem bei unbehandelten Mäusen verringert werden, während mit dem Antitumor-Antibioticum Doxorubicin unter den gleichen Bedingungen nur eine Verringerung von 33 % erreicht wurde. Besonders bemerkenswert ist wiederum, daß bei der Behandlung mit dem β -Turn-Mimeticum – im Unterschied zur Behandlung mit Doxorubicin – keine sichtbaren Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust auftraten.

5.4. Bisubstratinhibitoren

Die Phosphinsäuren **43** (R = H) und **44** (R = Me) (Schema 24) sind Bisubstratanaloga, von denen man a priori erwarten darf, daß sie höhere Aktivitäten und Selektivitäten aufweisen als Mimetica der einzelnen Substrate.^[115] In der Tat ist **43** ein effektiver In-vitro-Inhibitor, und das Prodrug **44** ist aktiv in *H-ras*- und – wenn auch schwächer – in *K-ras*-transformierten Zellen.^[131] Auch inhibiert **44** das Wachstum maligner Zellen vom Neurofibromatose-Typ I, die von der Überaktivierung des Wildtyp-Ras-Proteins abhängen.^[132] Diese vielversprechenden Ergebnisse werden bislang allerdings noch durch die im Vergleich zu den Peptidmimetica geringere Bioverfügbarkeit und In-vivo-Aktivität relativiert.

6. Peptidkonjugate als Werkzeuge für das Studium der biologischen Signaltransduktion

Die an der Transduktion von Signalen von der Plasmamembran in den Zellkern beteiligten Proteine tragen in vielen Fällen zusätzliche, kovalent angeknüpfte Struktureinheiten, die für die Erfüllung der biologischen Funktionen unbedingt benötigt werden (Schema 27). So sind z.B. die Zelloberflächen-



Schema 27. Strukturen und Labilitäten von Peptidkonjugaten. B = Base.

chenrezeptoren für Wachstumsfaktoren (siehe Schema 5) und die von ihnen erkannten Liganden oft Glycoproteine, in denen Serin-, Threonin- und Asparaginsäureeinheiten mit Oligosacchariden verknüpft sind (**59**). Die membranassoziierten, die Signale weiterleitenden Proteine, z.B. die Ras-Proteine, sind an Cystein- und Glycinresten lipidmodifiziert (**60**). Die Signale werden in vielen Fällen durch Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine an Serin- (**61**), Threonin- und Tyrosinresten weitergegeben, und die DNA selbst, die oftmals das Ziel der Signalkaskaden ist, liegt als Nucleoprotein vor, in dem Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste kovalent als Phosphorsäureester mit einem Nucleinsäurestrang verknüpft sind (**62**).

Für das Studium der biologischen Funktionen dieser Peptidkonjugate und die gezielte Beeinflussung der Signaltransduktionskaskaden, in die diese eingebunden sind, können Peptide, die die kovalent modifizierten, charakteristischen Struktureinheiten dieser Proteine enthalten, wertvolle Werkzeuge sein (siehe unten). Die Synthese solcher Peptidkonjugate wird jedoch einerseits durch deren Multifunktionalität erschwert, die verlangt, daß eine Vielzahl orthogonal zueinander stabiler Amino-, Hydroxy-, Sulfanyl-, Carboxy- und Phosphat-Schutzgruppen eingesetzt werden müssen.^[133-136]

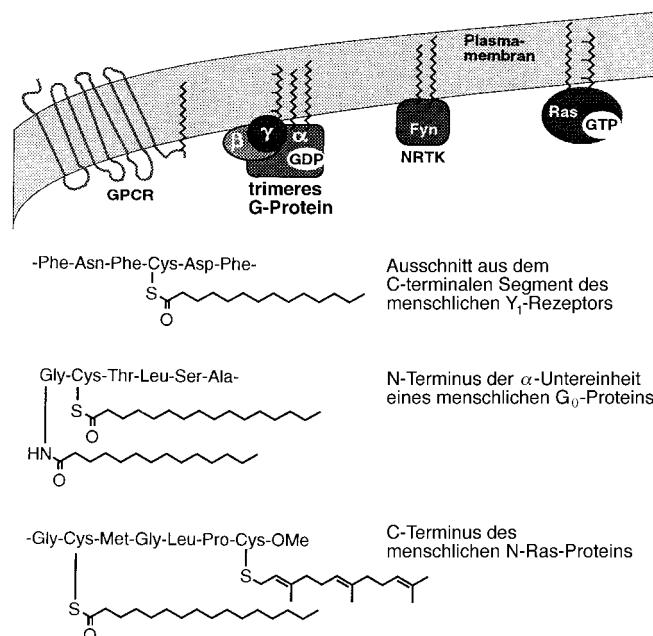
Andererseits sind die Peptidkonjugate ausgesprochen säure- und basenlabil. So werden bei pH > 9 aus den Seringlycosiden **59**, den lipidmodifizierten Peptiden **60** sowie den Phospho- und Nucleopeptiden **61** bzw. **62** die Seitenkettenfunktionalitäten in einer β -Eliminierung abgespalten, und der Thioester **60** hydrolysiert bei pH > 7 in wäßriger Lösung spontan. Im Sauren besteht die Gefahr der Anomerisierung oder gar Spaltung der *N*- und *O*-glycosidischen Bindungen in **59** und **62**, und auch die Olefine des Farnesylrestes in **60** werden leicht von Säuren angegriffen. Bei der Synthese der Peptidkonjugate vom Typ **59-62** müssen daher alle Umsetzungen, insbesondere die Ablösung der diversen Schutzgruppen, unter sehr milden, möglichst neutralen Bedingungen, aber bei vollständiger Wahrung der orthogonalen Stabilität erfolgen.

Peptidkonjugate sind also einerseits von großem Interesse als Reagentien und chemische Werkzeuge für biologische Studien. Andererseits ist ihre Synthese eine Herausforderung an die Organische Chemie. Sie verlangt nach der Entwicklung neuer und alternativer Synthesemethoden, mit denen komplexe Peptidkonjugate effizient und hochselektiv unter sehr milden Bedingungen zugänglich werden. Dieses Teilgebiet der organischen Synthese bietet ausgezeichnete Voraussetzungen für die Initiierung bioorganischer Forschung im Sinne der in Abschnitt 1 gegebenen Definition. Die Chemie der Peptidkonjugate hat daher in den zurückliegenden zwei Jahrzehnten große und zunehmende Beachtung gefunden und zur Entwicklung leistungsfähiger Synthesemethoden und der Anwendung modifizierter Peptide in biologischen Studien geführt. Insbesondere für die Synthese von Glyco-^[137] und Phosphopeptiden^[138] sind heute leistungsfähige Verfahren etabliert. Als wertvolle Alternativen zu den dabei verwendeten klassisch-chemischen Schutzgruppentechniken haben sich enzymlabile Schutzgruppen^[133-136] erwiesen, da Enzyme oft unter milden, neutralen Bedingungen arbeiten und eine hohe Selektivität für die von ihnen erkannten Struktureinheiten und ausgelösten Reaktionen mit einer breiten Substrattoleranz verbinden können. Die daraus hervorgegangenen neuen Synthesemethoden sind Schwerpunkte der nachfolgenden Diskussion.

6.1. Lipidmodifizierte Peptide

Signaltransduzierende Proteine, die in die Plasmamembran eingelagert sind, tragen häufig kovalent angeknüpfte Lipidreste.^[139, 140] So sind die C-Termini vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an ihren Cysteinresten S-palmitoyliert, die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine sowie Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen sind an einem N-terminalen Glycinrest N-myristoyliert und oft in unmittelbarer Nachbarschaft S-palmitoyliert. Die γ -Untereinheiten der G-Proteine enthalten einen S-farnesylierten oder S-geranylgeranylierten Cysteinrest, und die Ras-Proteine sind S-farnesyliert und S-palmitoyliert (Schema 28).

Die Lipidreste werden benötigt, um die Proteine an der Stelle, an der sie ihre biologische Funktion ausüben müssen, d.h. in der Plasmamembran, zu verankern. So erfüllen die Ras-Proteine sowohl in normalen als auch in transformierten

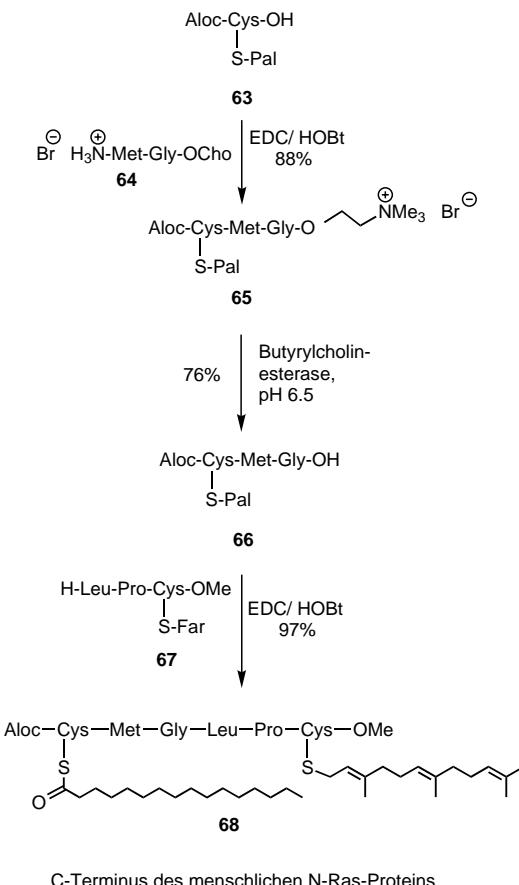


Schema 28. Strukturen plasmamembrangebundener lipidmodifizierter Proteine. GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor, NRTK = Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase.

Zellen ihre signaltransduzierende Funktion nur, wenn sie membrangebunden sind. Dies wird durch Lipidmodifizierung erreicht, nichtfarnesyliertes Ras ist cytosolisch und daher inaktiv. Ob die korrekte Lipidmodifizierung von Proteinen noch weitere biologische Funktionen erfüllt und z. B. aktiv am Prozeß der Signalweiterleitung teilnimmt, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.^[139-140] So gibt es Hinweise darauf, daß die Wechselwirkung von Ras mit seinem Substrat Raf über den C-Terminus des Ras-Proteins erfolgt, wobei die Lipidmodifizierung eine Rolle zu spielen scheint^[142] (für eine ähnliche Vermutung hinsichtlich der Wechselwirkung von Hefe-Ras mit seinem Zielprotein, der Adenylatcyclase, siehe Lit.^[177]). Für den G-Protein-gekoppelten β_2 -Adrenozeptor konnte gezeigt werden, daß nach Bindung eines Agonisten die Desensibilisierung, d. h. das Abschalten des Signals, mit einer Depalmitoylierung des Rezeptors einhergeht.^[143] Darüber hinaus bewirkt die Zugabe des Agonisten, daß der Palmitoylierungsgrad des zum β_2 -Adrenozeptor gehörigen G_{sa} -Proteins erhöht wird, wodurch dessen lipidmodifizierter N-Terminus besser mit der entsprechenden β, γ -Untereinheit wechselwirkt und den ursprünglichen heterotrimeren und damit inaktiven Komplex bildet (siehe Schema 2, Abschnitt 2.1). Auch dieser Prozeß führt zum Abschalten des Signals.^[144] Weiterhin ist ungeklärt, ob die spezifische Art der Lipidmodifizierung einzelner Proteine eine subzelluläre Adressierung zu intrazellulären Membranen vermittelt, z. B. durch Wechselwirkung mit einem Rezeptor, der den Lipidrest erkennt.^[141] Besonders bei der Untersuchung dieser Fragestellung haben lipidmodifizierte Peptide eine entscheidende Rolle gespielt.

Für die Synthese säure- und basenlabiler lipidmodifizierter Peptide sind enzymatische Schutzgruppentechniken^[133-136] besonders leistungsfähig. So wurde der Cholinester als enzymlabile Carboxylschutzgruppe entwickelt, die unter sehr

milden Bedingungen mit der Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum abgelöst werden kann und wegen ihres ionischen Charakters gleichzeitig den hydrophoben lipidmodifizierten Substraten eine bessere Löslichkeit in den für die Biotransformationen benötigten wässrigen Medien verleiht.^[145] Mit ihr gelang z. B. die Synthese des S-palmitoylierten und S-farnesylierten Lipohexapeptids **68** des menschlichen N-Ras-Proteins (Schema 29). Dabei wurde der S-palmitoylierte Tripep-

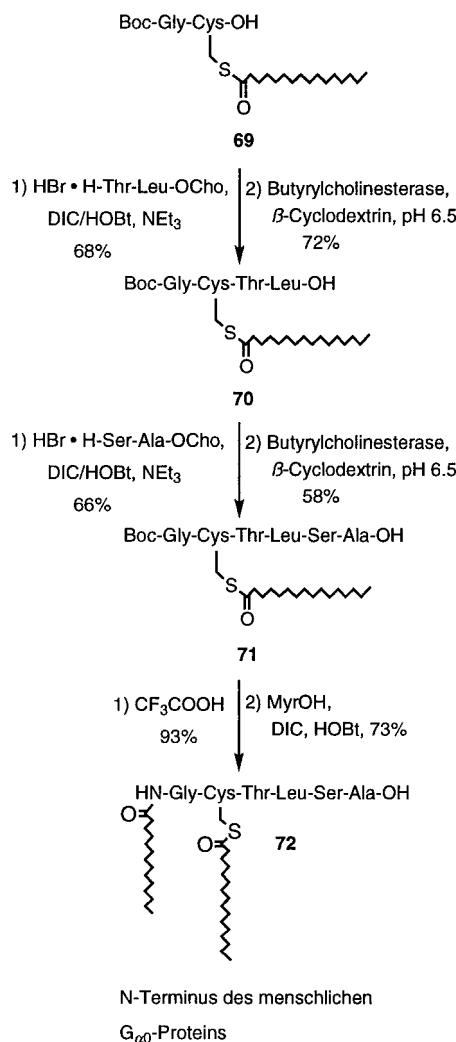


C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins

Schema 29. Chemoenzymatische Synthese des farnesylierten und palmitoylierten C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins unter Verwendung des enzymlabilen Cholinesters. Aloc = Allyloxycarbonyl, Far = Farnesyl, HOCho = Cholin.

tidcholinester **65** aus dem Cysteinderivat **63** aufgebaut und im entscheidenden Schritt der Synthese ohne Angriff auf den unter klassischen Bedingungen reaktiveren Thioester und ohne β -Eliminierung gezielt abgelöst. Die Verlängerung der Peptidkette des selektiv demaskierten Tripeptids **66** mit dem S-farnesylierten Tripeptidmethyleneester **67** gab die Zielverbindung **68** in hoher Ausbeute.

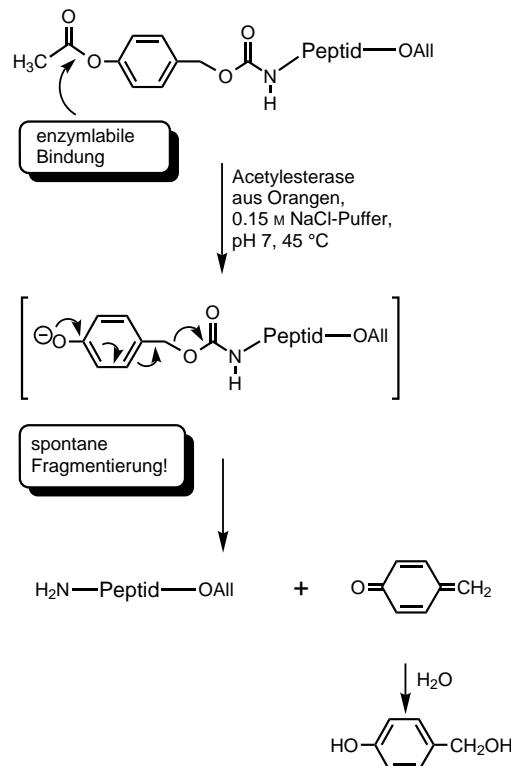
In einer zweiten Anwendung gelang mit dieser Technik die Herstellung des N-myristoylierten und S-palmitoylierten N-terminalen Hexapeptids der α_o -Untereinheit eines heterotrimeren $G_{\alpha o}$ -Proteins^[146] (Schema 30). Ausgehend vom S-palmitoylierten Dipeptid **69** wurde dabei ein Tetrapeptidcholinester synthetisiert und dann unter sehr milden Bedingungen enzymatisch C-terminal zu **70** deblockiert. Auch in diesem Fall trat keine unerwünschte Nebenreaktion ein. Sukzessive Kettenverlängerung und erneute Cholinesterase-vermittelte



Schema 30. Chemoenzymatische Synthese des myristoylierten und palmitoylierten N-Terminus der α -Untereinheit eines heterotrimeren $G_{\alpha 0}$ -Proteins unter Verwendung des enzymlabilen Cholinesters. DIC = Diisopropylcarbodiimid, MyrOH = Myristinsäure.

Entschützung lieferten das noch Boc-maskierte Peptid **71**, das durch Spaltung der Urethangruppe und N-Myristoylierung in die Zielverbindung **72** überführt wurde.

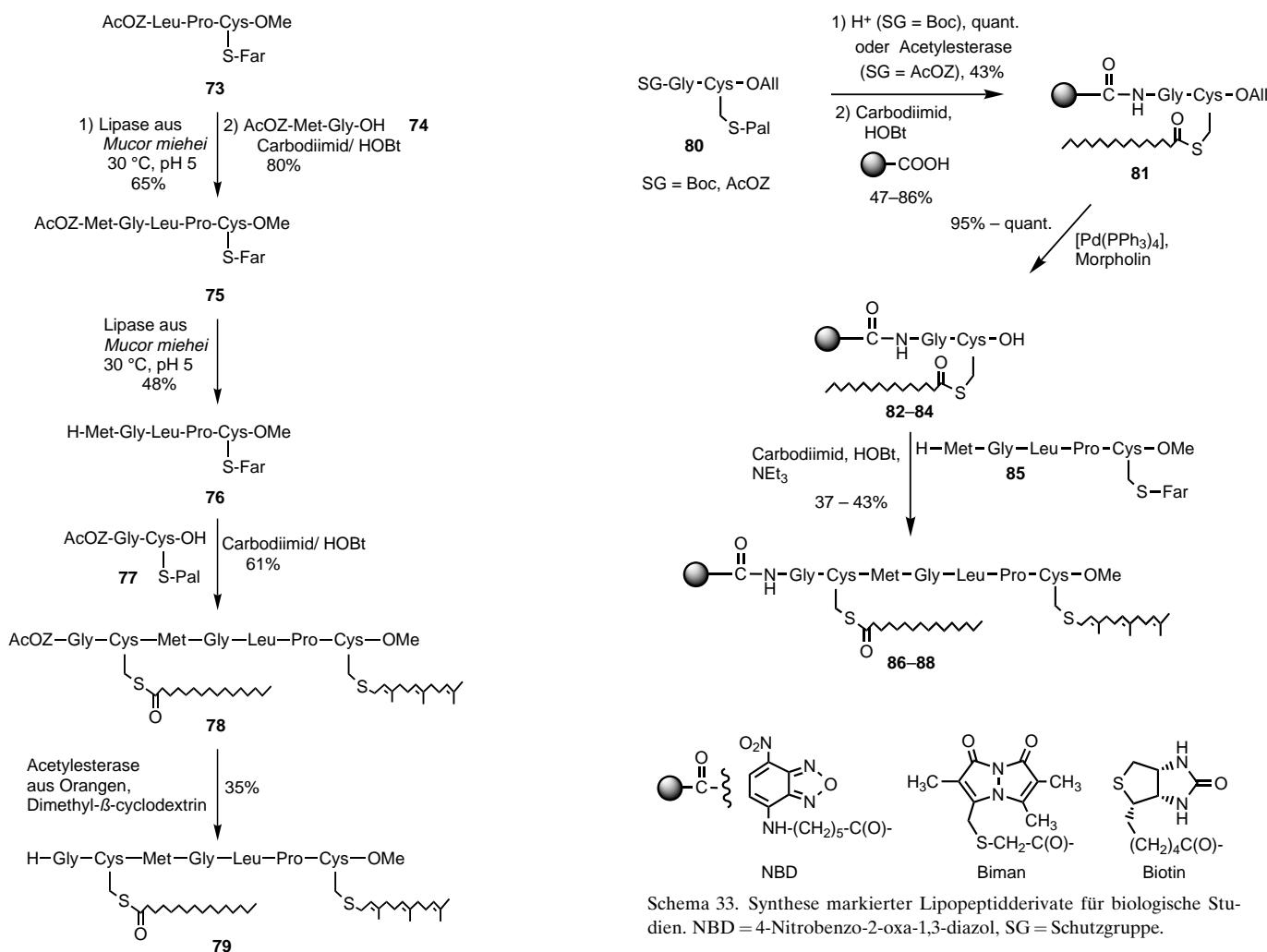
Um die Synthese säure- und basenlabiler lipidmodifizierter Peptide auch durch N-terminale Verlängerung der Peptidkette zu ermöglichen, mußte die erste enzymlabile Urethanschutzgruppe für die Aminofunktion von Peptiden entwickelt werden^[147] (Schema 31). Da kein Biokatalysator für die Abspaltung von Urethanen aus Peptiden bekannt ist, wurde eine Strategie entworfen, nach der das Enzym ein Urethan ohne direkten Angriff auf die Urethanstruktur entfernen kann. Die dafür eingesetzte *p*-Acetoxybenzyloxycarbonyl-(AcOZ)-Gruppe enthält eine funktionelle Gruppe (Acetat), die der Biokatalysator (eine Esterase oder Lipase) erkennen kann und die über eine enzymlabile Bindung (einen Ester) an eine zweite funktionelle Gruppe (ein *p*-Hydroxybenzylurethan) gebunden ist, die nach Spaltung der enzymlabilen Bindung spontan unter Freisetzung des gewünschten Peptidkonjugats fragmentiert (Schema 31). Dieses Prinzip gilt allgemein: Je nach eingesetztem Acylrest (z.B. Acetat oder



Schema 31. Enzyminitiierte Abspaltung der AcOZ-Urethanschutzgruppe.

Phenylacetat) können Enzyme mit unterschiedlichen Selektivitäten (z.B. Acylesterase oder Penicillin-G-Acylase) verwendet werden (siehe Schemata 32, 51 und 54), und auch die analogen C-terminalen *p*-Acetoxybenzylester können nach dem gleichen Mechanismus gespalten werden.^[148] Unter Verwendung des AcOZ-Urethans wurde der C-terminal lipidmodifizierte Heptapeptidester des N-Ras-Proteins aufgebaut^[147] (Schema 32). Die Deblockierung des urethangeschützten farnesylierten Tripeptidmethylesters **73** durch enzyminitiierte Fragmentierung der AcOZ-Gruppe lieferte dabei das selektiv entschützte Peptid. Sukzessive Verlängerung der Peptidkette um das AcOZ-Dipeptid **74** und erneute lipasevermittelte Ablösung der Urethanschutzgruppe führten zum N-Ras-Pentapeptid **76**, das mit dem AcOZ-maskierten S-palmitoylierten Dipeptid **77** zum vollständig geschützten lipidmodifizierten Heptapeptid **78** kondensiert wurde. Aus dieser Verbindung konnte erneut das N-terminale Urethan enzymatisch abgelöst und so das aminodeblockierte Ras-Heptapeptid **79** erhalten werden, das damit für weitere Kettenverlängerungen oder die Anknüpfung zusätzlicher funktioneller Gruppen zur Verfügung steht.

Die hier beschriebenen enzymatischen Techniken haben sich als flexible und effiziente Methoden für die Synthese gleichzeitig basen- und säurelabiler lipidmodifizierter Peptide erwiesen. Gleichwohl können solche Konjugate auch mit klassischen Verfahren aufgebaut werden, wobei die verschiedenartig zu modifizierenden Cysteineinheiten jedoch in aufwendiger Vorgehensweise entsprechend geschützt und in der Regel nach Komplettierung der Peptidkette selektiv freigesetzt und funktionalisiert werden müssen.^[149, 150] Falls nur basenlabile Palmitinsäurethioester in den zu demaskie-



Schema 32. Chemoenzymatische Synthese des C-Terminus des menschlichen N-Ras-Proteins unter Verwendung der enzymablen AcOZ-Urethanschutzgruppe.

renden Verbindungen vorliegen, kann z.B. auch die säurelabile Boc-Gruppe zum Einsatz kommen (siehe unten); säurelabile S-Farnesylcystein enthaltende Peptide können N-terminal durch Abspaltung des Fmoc-Urethans deblockiert werden.^[146,151] Zusätzlich zu den enzymatischen Techniken hat sich die Pd⁰-vermittelte Spaltung des Allylesters als effiziente Methode für die Herstellung empfindlicher lipidmodifizierter Peptide erwiesen.^[146,152] Bei der Entwicklung eines flexiblen Baukastensystems für die Synthese von unterschiedlich lipidmodifizierten N-Ras-Peptiden, die zusätzlich fluorophore Gruppen tragen, anhand derer das Verhalten der Verbindungen in biologischen und biophysikalischen Experimenten verfolgt werden kann, bewies diese Schutzgruppen-technik ihre Leistungsfähigkeit. So wurde der AcOZ- oder Boc-geschützte S-palmitoylierte Cysteinyllester **80** am N-Terminus enzymatisch oder unter sauren Bedingungen selektiv demaskiert und an die freie Aminofunktion eine fluoreszierende Gruppe geknüpft (Schema 33). Ohne jeglichen Angriff auf den Palmitinsäurethioester gelang dann die Spaltung des Allylesters in jeweils sehr hoher Ausbeute durch Pd⁰-vermittelte Allylübertragung auf Morphin als Acceptor-Nucleophil. Die so zugänglichen fluoreszenzmarkierten

und S-palmitoylierten Dipeptide **82–84** wurden jeweils z.B. mit dem farnesylierten N-Ras-Pentapeptid **85** zu den zweifach lipidmodifizierten Ras-Heptapeptiden **86–88** verknüpft, die in weiterführenden biologischen und biophysikalischen Experimenten eingesetzt wurden (siehe unten).

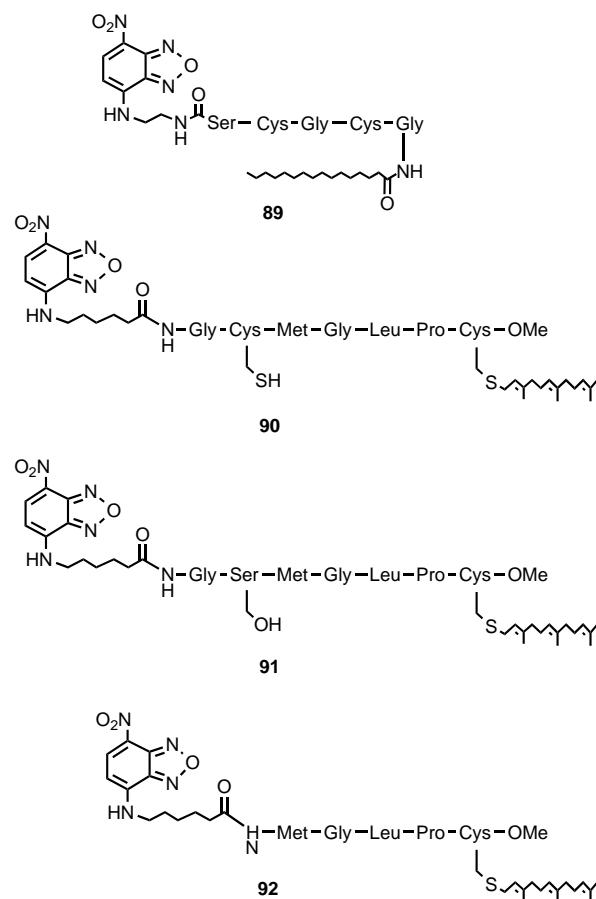
Lipidmodifizierte Peptide kamen in vielfältiger Weise als Werkzeuge zum Einsatz, um z.B. die an der Einführung der Lipidreste in Proteine und die an der Prozessierung der lipidmodifizierten Proteine beteiligten Enzyme zu studieren, und insbesondere, um Erkenntnisse über die Bedeutung der Lipidreste für die Erfüllung der biologischen Aufgaben der lipidmodifizierten Proteine zu erhalten. So wurden die Fragen, welchen Beitrag die Lipidreste zur Verankerung von Proteinen in Membranen leisten und ob die Art der Lipidmodifikation unter Umständen über die Lokalisierung von Proteinen in bestimmten subzellulären Membranen entscheidet, durch Kombination biophysikalischer und zellbiologischer Techniken mit den aus den oben beschriebenen Synthesen zugänglichen Lipopeptiden angegangen.^[153, 154]

In einer Serie biophysikalischer Untersuchungen zur Thermodynamik der Insertion lipidmodifizierter Modellpeptide in Vesikel, die als Modellmembranen fungierten, wurde zunächst die Membranaffinität bestimmt, die die Lipide den Peptiden verliehen.^[149, 155–157] Dabei ergab sich, daß eine N-Myristoyl- oder eine S-Farnesylgruppe allein nicht genug

hydrophoben Charakter einbringt, um eine stabile Membraninsertion von Peptiden – und damit auch von Proteinen – zu gewährleisten. Peptide und Proteine, die nur eine solche Lipidmodifizierung enthalten, insertieren zwar innerhalb von Sekunden in Membranen, sie tauschen aber ebenfalls rasch wieder zwischen verschiedenen Membranen aus (Halbwertszeit in der Größenordnung von Sekunden). Eine Palmitoylgruppe vermittelt den Peptiden eine ca. 15mal höhere Membranaffinität als ein Myristoylrest, und ein Geranylgeranylthioether hat in etwa den gleichen Einfluß. Für C-terminal als Methylester modifizierte farnesylierte und geranylgeranylierte Peptide ist die Membranaffinität etwa eine Zehnerpotenz höher als für die analogen S-prenylierten Carbonsäuren. Die C-terminale Methylierung eines farnesylierten Proteins hat daher einen großen Einfluß auf dessen Verteilung zwischen dem Cytosol und der Membran, während ein geranylgeranyliertes Protein auch ohne Veresterung vorwiegend membrangebunden sein wird. Die Bindung einfacher modifizierter Peptide an Modellmembranen ist somit zwar im thermodynamischen Sinne als stark zu bezeichnen, sie erfolgt aber rasch und reversibel.

Eine einzige Lipidmodifizierung allein gewährleistet nicht die stabile Insertion eines lipidmodifizierten Proteins in eine Membran. Durch eine zweite Lipidmodifizierung wird diese Eigenschaft jedoch vermittelt. Biophysikalische Modellexperimente zur Kinetik des Transfers lipidmodifizierter Peptide von einer Modellmembran in eine andere^[149, 158] ergaben, daß die Halbwertszeit für den Transfer einfach farnesylierter Peptide im Bereich von Sekunden liegt. Für Peptide, die N-myristoyliert und S-palmitoyliert oder S-palmitoyliert und S-farnesyliert sind, liegt die Halbwertszeit im Bereich von Stunden bis Tagen. Diese Werte sind deutlich größer als die Halbwertszeit für den Austausch der S-Acylgruppen membranassozierter Proteine *in vivo* (≤ 2 h) oder für die von Eskortproteinen vermittelte Recyclisierung membrangebundener Proteine. Diese doppelten Lipidmodifizierungen vermitteln unter biologischen Bedingungen und im biologisch relevanten Zeitrahmen also eine stabile Membranbindung entsprechend modifizierter Proteine und können als spezifische Strukturmotive eingesetzt werden, um Proteine in speziellen subzellulären Membranen zu lokalisieren und zu verankern. Tatsächlich wird das N-Myristoyl/S-Palmitoyl-Motiv z. B. bei Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und bei den α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine vorgefunden, und H-Ras und N-Ras sind S-palmitoyliert und -farnesyliert.

Diese Hypothese wurde elegant durch In-vivo-Studien mit fluoreszenzmarkierten N-myristoylierten^[159] und S-farnesylierten Peptiden^[152, 158, 159] überprüft. So werden die Peptide **89** und **90** (Schema 34), die jeweils die einfach lipidmodifizierte Form des N-Terminus der menschlichen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Lck und des menschlichen N-Ras-Proteins repräsentieren, in Fibroblastenzellen S-palmitoyliert, während z. B. in analoge Peptide, in denen die palmitoylierbaren Cysteinreste durch Serinreste ersetzt waren, z. B. in **91**, Palmitinsäure nicht eingebaut wird. Peptide, in denen der Myristoylrest gegen andere Fettsäuren (C_{10} bis C_{16}) oder der Farnesylrest gegen andere Alkylgruppen (*n*-Undecyl, *n*-Octyl, *trans*-Geranyl) ausgetauscht wurde, werden ebenfalls palmitoyliert.



Schema 34. Lipidmodifizierte und mit dem NBD-Marker versehene Peptide für biologische Studien.

Der Ort der Palmitoylierung und die intrazelluläre Verteilung der doppelt lipidmodifizierten Peptide wurden durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestimmt. Dabei ergab sich, daß die aus **89** und **90** gebildeten doppelt lipidmodifizierten Peptide in der Plasmamembran von Fibroblastenzellen angereichert werden (Abb. 1), und zwar auch unter Bedingun-

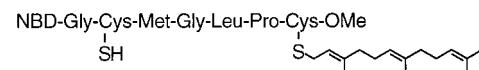
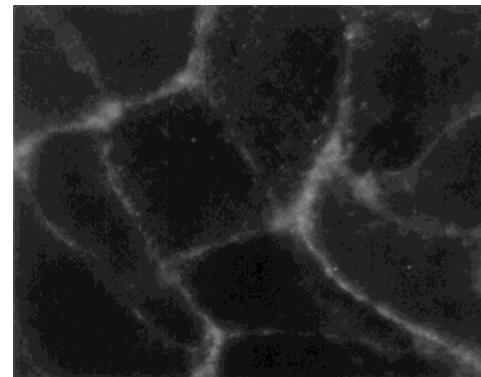
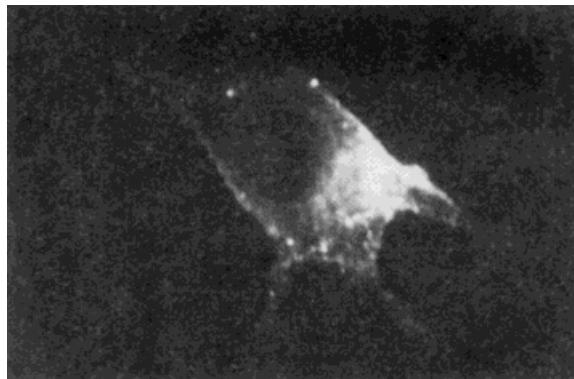


Abb. 1. Fluoreszenzbild von CV-1-Fibroblasten nach Behandeln mit dem NBD-markierten und farnesylierten Lipoheptapeptid **90**. Das Bild zeigt, daß die Fluoreszenz in der Plasmamembran angereichert ist.

gen (15 °C), unter denen ein intrazellulärer Transport z. B. durch Vesikel ausgeschlossen werden kann. Bei analogen Serinylpeptiden wie **91**, die nicht acyliert werden (siehe oben), tritt eine solche selektive Verteilung nicht auf, die S-*n*-alkylierten und -geranylierten Analoga zu **90** verhielten sich jedoch ähnlich. Die Peptide **89**–**91** waren dabei durch Verschmelzen der Fibroblastenmembran mit Vesikeln, die jeweils mit einem der fluoreszenzmarkierten Peptide beladen waren, in die Zellen eingebracht worden. Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch Mikroinjektion von **92** und **86** (Schema 33; NBD-markiert) und jeweils nachfolgende Untersuchung durch confocale Laserfluoreszenzmikroskopie bestätigt.^[152] Dabei zeigte sich, daß das farnesylierte, aber nicht mehr palmitoylierbare Pentapeptid **92** nicht selektiv in eine bestimmte Membran inkorporiert, das zweifach lipidmodifizierte **86** jedoch selektiv in die Plasmamembran eingelagert wird (Abb. 2).

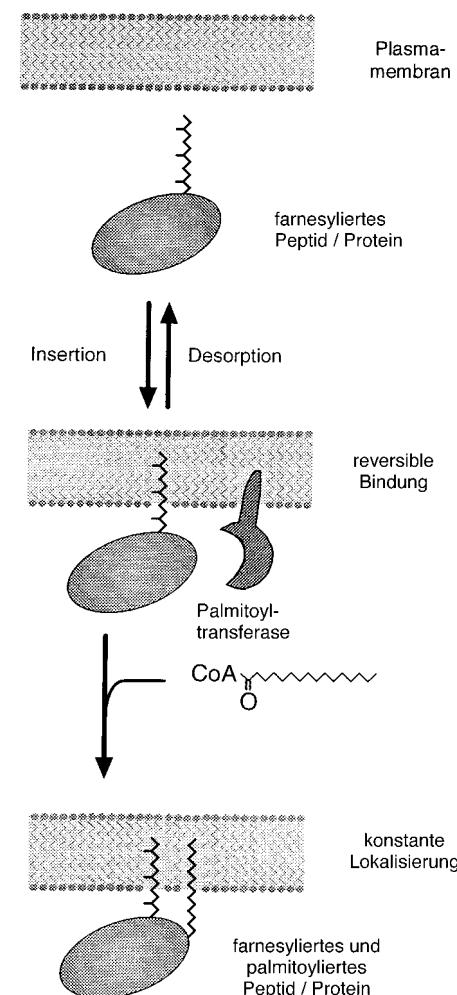


NBD-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe

Abb. 2. Fluoreszenzbild von NIH-3T3-Fibroblasten nach Mikroinjektion des NBD-markierten, farnesylierten und palmitoylierten Ras-Heptapeptids **86**. Das Bild zeigt, daß das Peptid in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Diese Befunde und die aus den biophysikalischen Experimenten erhaltenen Ergebnisse, daß doppelt lipidmodifizierte Peptide (im Unterschied zu einfach modifizierten) nach Einbringen des zweiten Lipidrestes nur sehr langsam zwischen Membranen austauschen (siehe oben) und sich daher in den Zellkompartimenten anreichern sollten, in denen die zweite Lipidmodifizierung angebracht wird, führen zu dem Schluß, daß die einfach lipidmodifizierten Peptide (und damit auch einfach modifizierte Proteine) an der Plasmamembran der Zellen S-palmitoyliert werden.

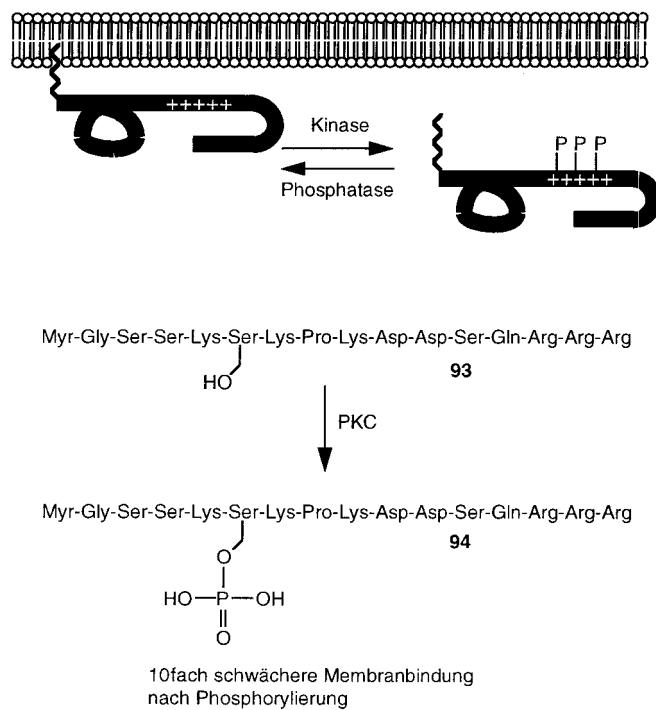
Die Ergebnisse der biophysikalischen und zellbiologischen Untersuchungen stützen daher ein Modell^[159] für die spezifische Lokalisierung von Proteinen durch Myristoylierung/Palmitoylierung oder Farnesylierung/Palmitoylierung. Nach diesem Modell wird die spezifische Lokalisierung nicht nur durch die im Verlauf der Biosynthese zuerst eingebrachte Lipidgruppe bestimmt (im Falle der Ras-Proteine also durch den Farnesylrest). Vielmehr können die einfach modifizierten Proteine frei diffundieren und in Membranen insertieren und von diesen desorbieren (Schema 35). Erst nach S-Acylierung in einem bestimmten Membrankompartiment bleiben sie an der dortigen Membran lokalisiert. Im Falle des N-Ras-Peptids **90** und des p56^{ck}-Peptids **89** ist dies die Plasmamembran, in der die entsprechenden lipidmodifizierten Proteine auch



Schema 35. Modell für die Einlagerung lipidmodifizierter Proteine in die Plasmamembran durch zusätzliche S-Palmitoylierung.

tatsächlich vorkommen. Eine für diese Modifizierung in Frage kommende membrangebundene Protein-S-Acylyltransferase, die ein farnesyliertes N-Ras-Peptid und auch das H-Ras-Protein palmitoyliert, wurde kürzlich identifiziert.^[160] Falls das lipidmodifizierte Protein nicht mehr gebraucht wird oder um von solchen Proteinen weitergeleitete Signale zu terminieren (Regulierung von Signalketten), könnte der Thioester durch eine entsprechende Hydrolase wieder gespalten und damit die Desorption des Proteins von der Membran eingeleitet werden (Schema 35).

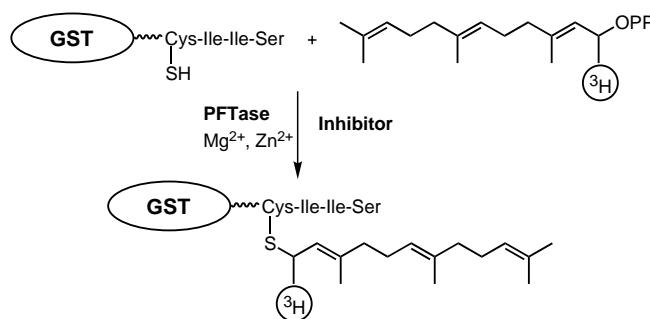
Neben der Einführung eines zweiten Lipidrestes kann eine stabile Insertion eines Proteins in Membranen auch dadurch erreicht werden, daß der erste Lipidrest durch einen Cluster von unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Aminosäuren ergänzt wird, die mit der negativ geladenen Zellmembran wechselwirken^[153, 154] (Schema 36). Diese kooperative Wechselwirkung wird durch Phosphorylierung der Proteine in der positiv geladenen Domäne geschwächt, d. h. durch Verringerung der Zahl der positiven Ladungen durch negativ geladene Phosphatgruppen, und das Protein kann von der Membran desorbieren. Auf diese Weise kann die Membraninsertion/Desorption von Proteinen ebenfalls reguliert werden. Eine Kombination eines Lipidrestes mit protonierten basischen Aminosäuren wird z. B. in der N-myristoylierten



Schema 36. Regulierung der Membranbindung durch Kombination von N-Myristoylierung und einer polybasischen Aminosäuresequenz sowie Phosphorylierung.

Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src, dem N-myristoylierten ala-ninreichen C-Kinase-Substrat (MARCKS) und dem S-farnesylierten, aber nichtpalmitoylierten K-Ras-Protein angetroffen. Für MARCKS wurde die Regulierung nach dem in Schema 36 gezeigten Modell durch umfangreiche Mutationsanalysen belegt, und für das c-Src-Peptid **93** sowie das analoge Phospholipeptid **94**, die den N-Terminus des Proteins repräsentieren, wurde in Experimenten an Modellmembranen ein analoges Verhalten nachgewiesen. So wird die Membranbindung von **93** durch Phosphorylierung an Ser 12 durch Proteinkinase C um eine Zehnerpotenz geschwächt.^[154] Durch Untersuchung dieser und ähnlicher Fragestellungen unter Verwendung geeigneter lipidmodifizierter Peptide könnten wertvolle Informationen erhalten werden, mit denen heterologe rekombinante Proteine entwickelt und zu bestimmten Orten der Zelle dirigiert werden könnten, an denen sie die Signaltransduktion beeinflussen. Darüber hinaus würden der Entwicklung neuer Wirkstoffe, die pathologische Signalvermittlungsprozesse z.B. über Ras beeinflussen, neue Impulse verliehen.

S-farnesylierte Cysteinylpeptide dienten als Werkzeuge zum Studium und zur Inhibition aller Enzyme, die an der Biosynthese S-farnesylierter und C-terminal methylierter Proteine wie der Ras-Proteine beteiligt sind (Schema 5, Schema 23; siehe Abschnitte 2.2 und 5). So wird die Farnesyltransferase, die den Farnesylrest auf die Proteinvorstufe überträgt, durch farnesylierte Peptide, die auch die nachfolgend abgespaltene C-terminale AAX-Sequenz aufweisen, mit IC_{50} -Werten im mm-Bereich inhibiert^[161] (Schema 37). Entsprechend um das AAX-Peptid verkürzte, aber als Methylester maskierte Analoga, die der prozessierten Form der Ras-Proteine entsprechen, zeigten jedoch keine inhibitorische



Inhibitor	IC_{50}
CAAX-Peptide	0.1 – 6 μ M
S-Farnesyl-CAAX-Peptide	1.4 – 8.2 μ M
S-Farnesyl-Cys-OMe-Peptide	keine Inhibition
Aloc-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe 76	5.5 mM

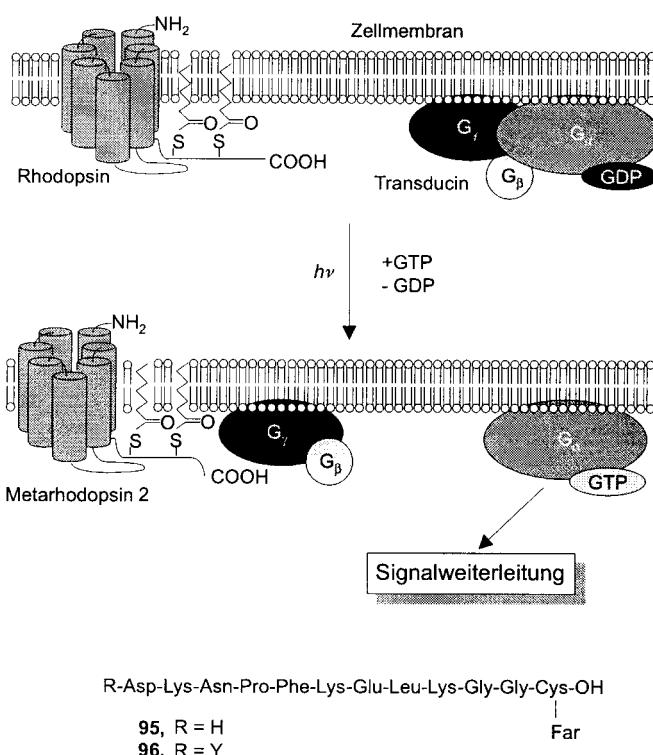
Schema 37. Inhibition der Ras-Farnesyltransferase durch lipidmodifizierte Peptide. GST = Glutathion-S-Transferase.

Wirkung mehr.^[151] Allerdings tritt wieder eine schwache Inhibition auf, wenn ein zwar verestertes, aber farnesyliertes und palmitoyliertes Peptid als Inhibitor zum Einsatz kommt (Schema 37). Dieser Befund deutet auf eine mögliche Feedback-Inhibition bei der Biosynthese der Ras-Proteine hin.^[151]

In ähnlicher Weise wurden Tetrapeptide mit isoprenyliertem N-terminalem Cysteinrest zum Studium der Proteinase eingesetzt, die das C-terminale AAX-Segment aus der Proteinvorstufe abspaltet.^[141, 162, 163] Dabei ergab sich, daß Substrate des Enzyms einen isoprenylierten Cysteinrest aufweisen müssen und daß der Biokatalysator die absolute Konfiguration der Aminosäuren erkennt. Auf diesen Erkenntnissen basierend konnten einfache Farnesylpeptid-Analoga als Inhibitoren der Protease entwickelt werden.^[164] Weiterhin wurden S-isoprenylierte und einfach alkylierte Peptide eingesetzt, um eine Methyltransferase aufzuspüren, die die Bildung des C-terminalen Methylesters farnesylierter Proteine katalysiert.^[141, 165, 166] Dabei zeigte sich auch, daß ein farnesyliertes Peptid in der Lage war, die Methylierung eines natürlichen Proteins zu inhibieren.

Schließlich wurde mit lipidmodifizierten Peptiden das bislang ungelöste Problem angegangen, ob die Lipidreste zusätzlich zu ihrer Bedeutung für die Membranverankerung und -lokalisierung von Proteinen aktive Rollen bei der Ausübung der biologischen Funktion der lipidmodifizierten Proteine übernehmen. Besonders stehen hier die Fragen im Vordergrund, ob es spezifische Rezeptoren in Membranen gibt, die Farnesylreste erkennen, und ob die Lipidreste z.B. über Lipid-Protein-Wechselwirkungen an der Kontrolle von Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. Als biologisches System wurde die Signaltransduktion über den G-Proteinkoppelten Rezeptor Rhodopsin und das heterotrimere G-Protein Transducin in Photorezeptoren gewählt (siehe Abschnitt 2.1). Durch Absorption von Licht wird Rhodopsin zu Metarhodopsin2 aktiviert, das dann mit Transducin wechselwirkt und den Austausch von GDP durch GTP in der α -Untereinheit katalysiert, wofür die β, γ -Untereinheit wichtig ist. Die GTP-beladene α -Untereinheit aktiviert dann eine

cGMP-spezifische Phosphodiesterase, die das Signal an N-Kanäle weitergibt und dadurch die Reaktion auf das Lichtsignal weiterleitet^[141, 167] (Schema 38). Um zu prüfen, ob die



Schema 38. Beeinflussung der Signalweiterleitung im Rhodopsin/Transducin-System durch lipidmodifizierte Peptide.

Kupplung des Rezeptors an das G-Protein über dessen γ -Untereinheit vermittelt wird, wurden z.B. das farnesylierte Peptid **95**, das dem C-Terminus der γ -Untereinheit entspricht, und *N*-Acetyl-*S*-farnesylcystein als Inhibitoren für die Wechselwirkung zwischen Rhodopsin und Transducin geprüft.^[168, 169] Dabei zeigte sich, daß das Peptid **95** die aktive Form des Rezeptors (Metarhodopsin2) stabilisiert und ihn von Transducin entkoppelt. Für den Effekt ist sowohl der Farnesylrest als auch die Aminosäuresequenz wichtig. Der Farnesylrest ist demzufolge direkt für die Protein-Protein-Wechselwirkung wichtig und dient nicht nur als Membrananker.^[168] Mit *S*-prenylierten Cysteinanaloga kann darüber hinaus die Wechselwirkung zwischen aktivierten Rezeptoren und den $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen spezifisch inhibiert werden.^[169] Schließlich wurden analoge Peptide wie **96** eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen der α -Untereinheit von Transducin und dem $\beta\gamma$ -Komplex zu studieren, die z.B. durch **96** auch inhibiert werden konnte.^[170]

Obgleich die aus den vorstehend erläuterten Untersuchungen gezogenen Schlüsse zum Rhodopsin/Transducin-System in Zweifel gezogen wurden,^[141] zeigen unterschiedliche Farnesylcystein-Analoga und farnesylierte Peptide vielfältige physiologische Wirkungen, die nahelegen, daß diese Verbindungen in Signaltransduktionsprozesse eingreifen. Beispielsweise interferieren sie mit der Freisetzung von Superoxid in Neutrophilen,^[171, 172] in die das isoprenylierte Rac-Protein eingebunden ist, blockieren die durch Thromboxan oder

Thrombin induzierte Blutplättchenaggregation^[173, 174] und beeinflussen die Freisetzung von Insulin aus Pankreaszellen.^[175] Diese Effekte scheinen nicht auf eine Inhibition der Prozessierung lipidmodifizierter Proteine zurückzuführen zu sein. Sie legen nahe, daß die isoprenylierten Peptide die Funktionsweise isoprenylierter G-Proteine beeinträchtigen, z.B. indem sie mit Proteinen eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung eingehen oder deren Zielproteine sind.

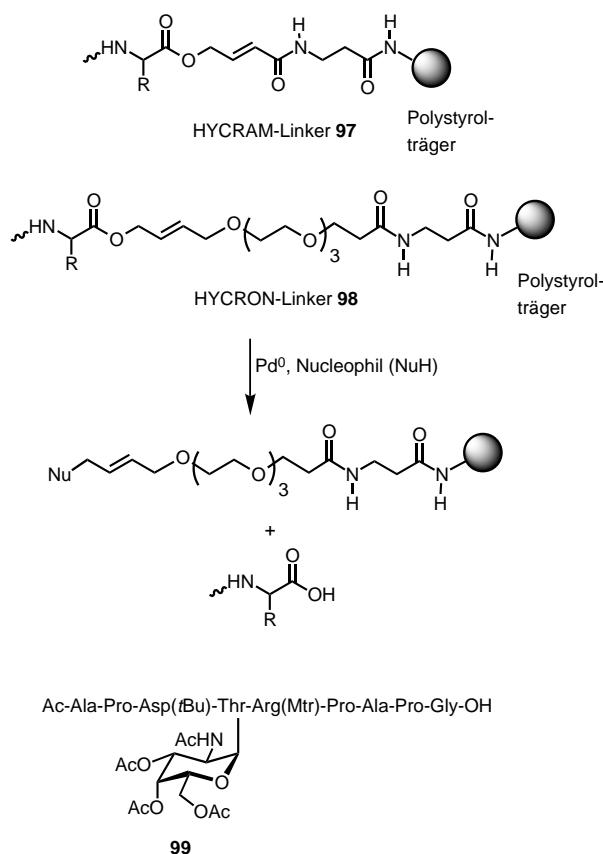
Darüber hinaus wurde mit prenylierten CAAX-Peptiden in der mikrosomalen Membranfraktion von Rinderhirn ein diese Peptide mit hoher Affinität bindendes Protein identifiziert, das ein Rezeptor für prenylierte Peptide sein könnte,^[176] und für Hefe-Ras wurde nachgewiesen, daß der Farnesylrest des Proteins nicht der Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran, sondern vielmehr der Wechselwirkung von Ras mit seinem Zielprotein, der Adenylylacyclase, dient.^[177]

6.2. Glycopeptide

Viele der an der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisierten Proteine tragen komplexe Oligosaccharideinheiten. Diese Glycoproteine sind intensiv in die Regulierung der Kommunikation zwischen Zellen eingebunden, sie regulieren Zell-Zell-Wechselwirkungen und bilden Zelloberflächenantigene.^[178] In diesem Zusammenhang ist besonders bemerkenswert, daß Glycoproteine auch als tumorassoziierte Antigene identifiziert wurden, d.h. als Antigene, die auf der Oberfläche von Tumorzellen auftreten, auf der normaler Zellen jedoch nicht. Weiterhin sind viele der Zelloberflächenrezeptoren, die extrazelluläre Signale aufnehmen und durch die Plasmamembran ins Zellinnere weiterleiten, glycosyliert. Für die Erfüllung der biologischen Funktion dieser Proteinkonjugate sind die Kohlenhydrat- und die Peptidstrukturen bedeutsam, wie für die Proteine des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) nachgewiesen wurde.^[179] Während mit komplexen Oligosacchariden versehene Proteine nahezu ausschließlich auf der Zelloberfläche und extrazellulär biologische Funktionen erfüllen, spielt die Glycosylierung von Proteinen auch intrazellulär eine wichtige Rolle, wie kürzlich gezeigt wurde (siehe Abschnitt 6.3).

Zur Erforschung der biologischen Funktionen von Glycoproteinen können Glycopeptide wertvolle Hilfsmittel sein. Bei der Synthese dieser Peptidkonjugate sowohl in Lösung als auch an fester Phase wurden in den zurückliegenden zwei Jahrzehnten leistungsfähige Techniken für die reversible Blockierung der Amino-, Carboxy- und Alkohol-Gruppen^[177] sowie Methoden für die schonende Ablösung vom polymeren Träger^[180-183] entwickelt. Auch die klassisch-chemische Synthese der Oligosaccharideinheiten der Glycoproteine hat einen hohen Leistungsstand erreicht.^[177, 184] Hierfür zeichnen sich darüber hinaus erste effektive Festphasentechniken ab.^[185]

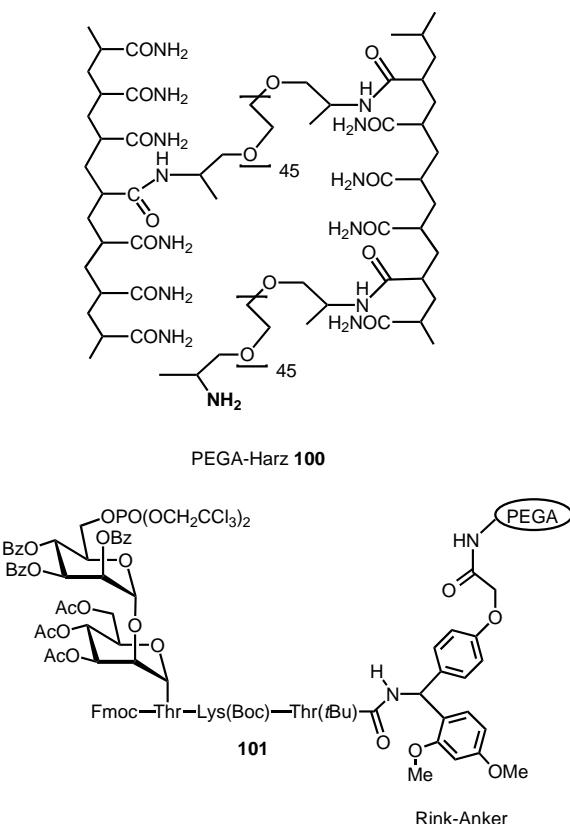
Aufgrund der Leistungsfähigkeit der etablierten klassisch-chemischen Techniken können glycosylierte Peptide heute in effizienter Weise an polymeren Trägern aufgebaut werden. Besonders vorteilhaft sind hierbei die allylischen Linker HYCRAM^[180] **97** und HYCRON^[181] **98** (Schema 39), die eine schonende Ablösung der empfindlichen Glycopeptide von



Schema 39. Festphasen-Glycopeptidsynthese unter Verwendung der HYCRAM- und der HYCRON-Linkergruppe. Mtr = 4-Methoxy-2,3,6-tri-methylbenzolsulfonyl.

der festen Phase in einer Pd⁰-vermittelten Allylübertragung auf N- und C-Nucleophile ermöglichen. Unter Verwendung des HYCRAM-Linkers konnten viele Glycopeptide aufgebaut werden, wobei sowohl die säurelabile Boc- als auch die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe zum Einsatz kamen. Bei der basischen Abspaltung der Fmoc-Gruppe ergaben sich jedoch Schwierigkeiten z. B. durch den nucleophilen Angriff auf die α,β -ungesättigte Amidgruppe in **97**. Auch konnten die Glycopeptide in einigen Fällen nicht quantitativ vom festen Träger abgelöst werden. Diese Nachteile wurden mit der Entwicklung von **98** überwunden. In **98** garantiert ein flexibler Oligoethylenglycol-Spacer, daß der Pd⁰-Komplex bei der Abspaltung gut zur Allylgruppe vordringen kann, die nicht mehr als α,β -ungesättigte Carbonylfunktion, sondern als Ether vorliegt und damit nicht mehr von Nucleophilen konkurrierend angegriffen wird. Mit dem HYCRON-Linker wurde z. B. das Glycopeptid **99** am polymeren Träger aufgebaut und schließlich in hoher Ausbeute abgelöst. Die Methode erwies sich bei der Herstellung eines Eicosapeptids als ebenso leistungsfähig.

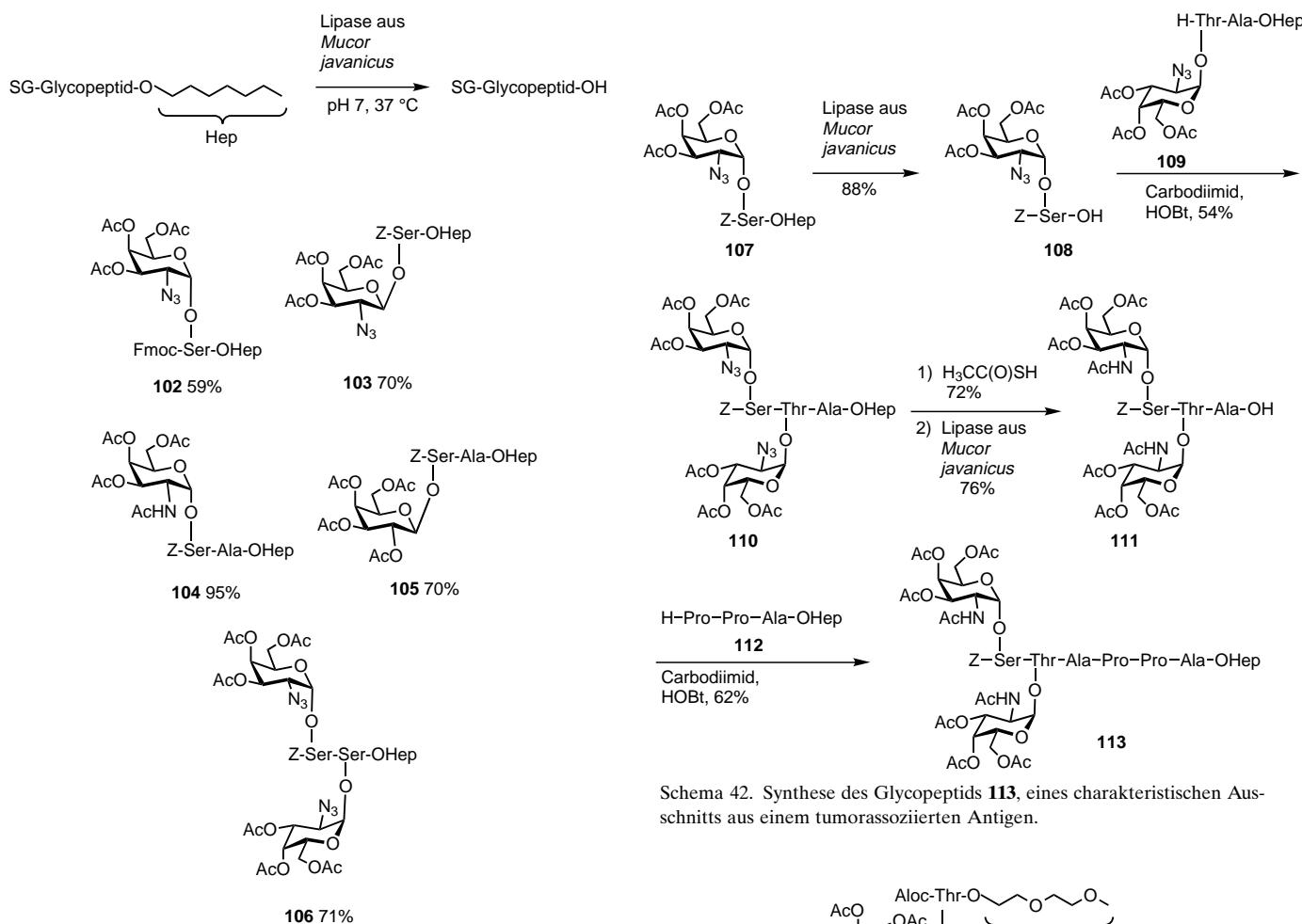
Als vorteilhafte Alternative zu den in der Regel eingesetzten Trägern auf Polystyrolbasis wurde kürzlich das PEGA-Harz **100** (Schema 40) entwickelt, das aus Polyacrylamidketten besteht, die durch Polyethylenglycoleinheiten quervernetzt sind und freie Aminofunktionen tragen, an denen die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden durchgeführt werden kann.^[183] Das hydrophile PEGA-Harz quillt sehr gut



Schema 40. Festphasen-Glycopeptidsynthese am PEGA-Harz.

in vielen Lösungsmitteln, und sein Inneres ist durch die flexible Struktur der Matrix auch für große Moleküle und sogar Enzyme zugänglich. Unter Verwendung des PEGA-Harzes konnten zahlreiche glycosylierte Peptide in automatisierten Festphasensynthesen aufgebaut werden^[182, 183, 186] (Schema 40). Als N-terminale Schutzgruppe wurde das Fmoc-Urethan verwendet, und die aufzubauende Glycopeptidkette wurde über den säurelabilen Rink-Anker (siehe **101**, Schema 40) an den polymeren Träger gebunden. Durch sukzessive Verlängerung der Peptidkette wurden so festphasengebundene Glycopeptide wie **101** effizient synthetisiert. Die Abspaltung dieser Glykonjugate von der festen Phase gelang unter leicht sauren Bedingungen und ohne unerwünschte Nebenreaktion. Durch diese und weitere Festphasentechniken können Glycopeptide heute zuverlässig und effizient automatisiert hergestellt werden.

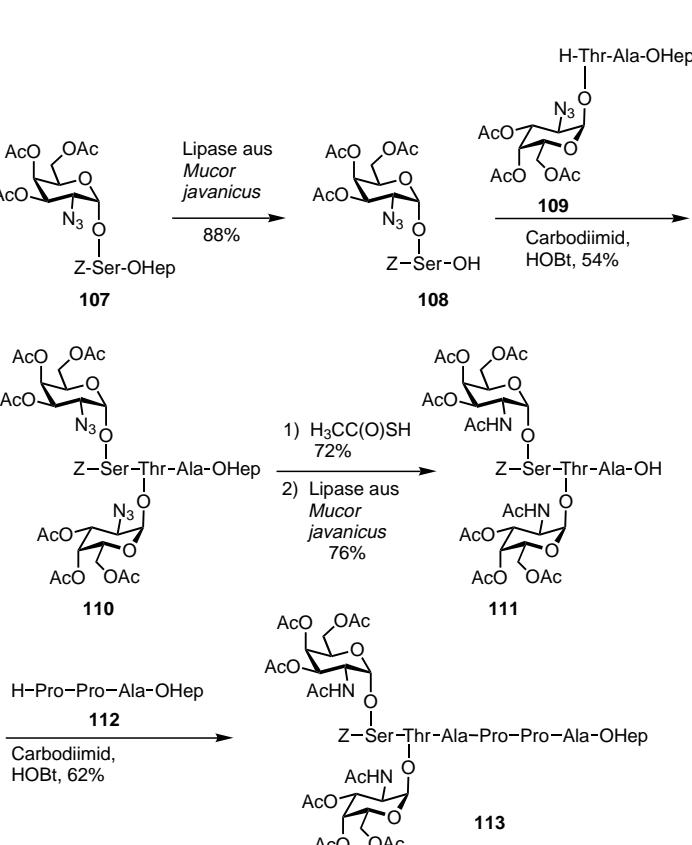
Enzymatische Methoden haben wertvolle Alternativen für die gezielte Deblockierung von Glycopeptiden und die Synthese ihrer Oligosaccharideinheiten eröffnet. Die selektive und schonende enzymatische Deblockierung von O-Glycopeptiden gelang z. B. durch lipasevermittelte Hydrolyse der Heptylesterschutzgruppe. So deblockiert die Lipase aus *Mucor javanicus* den C-Terminus der glycosylierten Aminosäuren und der Peptide **102**–**106** ohne unerwünschten Angriff auf die N-terminalen Urethan- und die Kohlenhydratschutzgruppen^[187] (Schema 41). Eine Anomerisierung oder β -Eliminierung der Kohlenhydrate fand unter diesen milden Bedingungen ebenfalls nicht statt. Mit dieser enzymatischen Schutzgruppentechnik wurde das komplexe Diglycohexaspeptid **113**



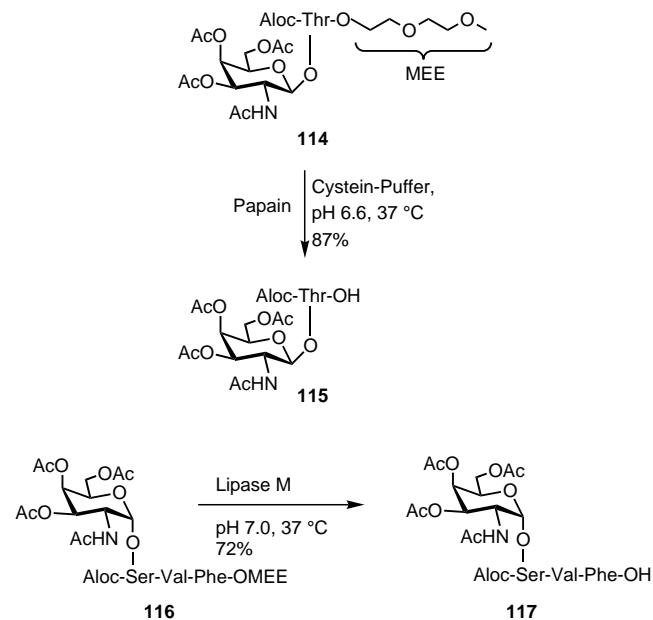
Schema 41. Chemoenzymatische Glycopeptidsynthese unter Verwendung der enzymlabilen Heptyl(Hep)-Schutzgruppe.

aufgebaut, das die charakteristische Verknüpfungsregion eines tumorassoziierten Antigens enthält, das auf der Oberfläche menschlicher Mammacarcinome vorkommt (Schema 42). Nach selektiver Deblockierung des Serylglycosidheptylesters **107** am C-Terminus wurde die freigesetzte Carbonsäure **108** mit dem N-terminal deblockierten Glycodipeptidester **109** zum Diglycotripeptid **110** kondensiert. Dessen Azidogruppen wurden in Acetamidgruppen überführt, und nachfolgend wurde der C-Terminus erneut selektiv und ohne jegliche unerwünschte Nebenreaktion durch enzymvermittelte Hydrolyse freigesetzt (\rightarrow **111**). Die C-terminale Verlängerung der Peptidkette lieferte das gewünschte Peptid **113**.

Bei Verwendung der recht hydrophoben Heptylester traten besonders in Gegenwart ebenfalls hydrophober Aminosäuren Probleme infolge geringer Löslichkeit der Substrate und dadurch bedingt niedriger Umsatzgeschwindigkeiten auf. Diese konnten durch Einführen der hydrophileren 2-(*N*-Morpholino)ethyl(MoEt)-^[188] und insbesondere der Methoxyethoxyethyl(MEE)-Gruppe^[189] überwunden werden. Der MEE-Ester im Glycopeptid **116** wurde z.B. in hoher Ausbeute durch lipasekatalysierte Hydrolyse gespalten (Schema 43), und das Threonylglycosid **114** konnte am C-Terminus durch Papain deblockiert werden. Die Proteasen Papain, Subtilisin und Thermitase wurden darüber hinaus auch zur



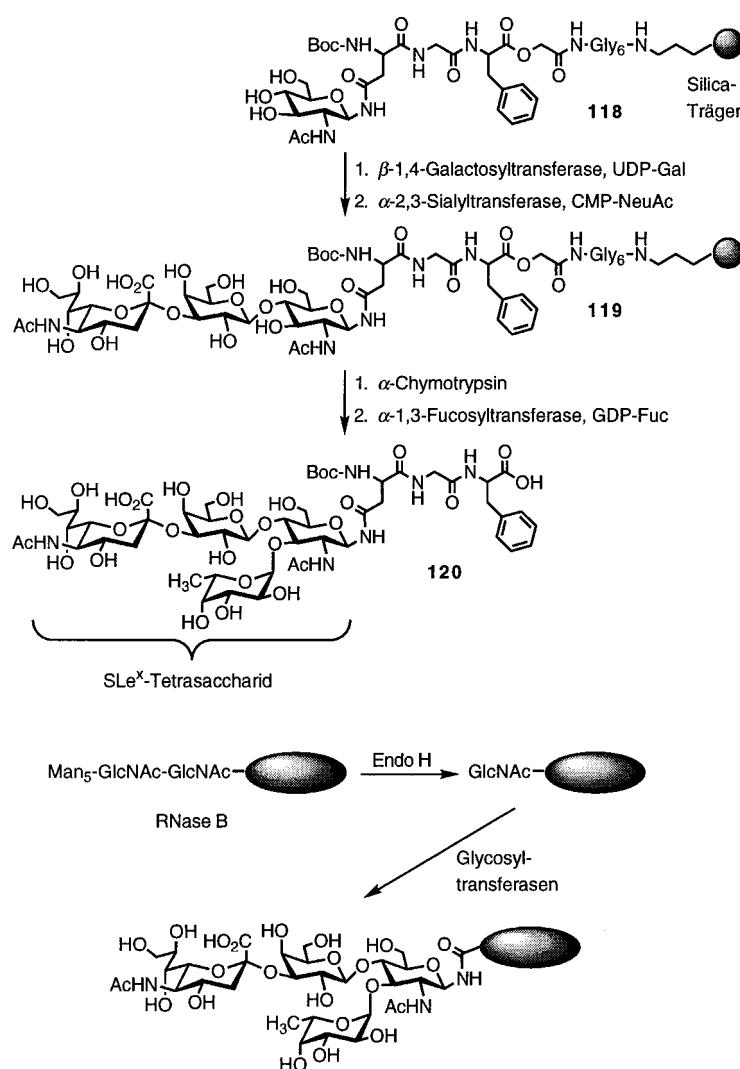
Schema 42. Synthese des Glycopeptids **113**, eines charakteristischen Ausschnitts aus einem tumorassoziierten Antigen.



Schema 43. Enzymatische Glycopeptidsynthese über enzymlabile Methoxyethoxyethyl(MEE)-Ester.

Abspaltung von Glycopeptidmethylester-^[190] und sogar von *tert*-Butylesterschutzgruppen^[191] herangezogen.

Enzymatische Umsetzungen wurden bei der Glycopeptidsynthese auch für den Aufbau der Oligosaccharide eingesetzt. So wurde das glycosyierte Asparaginylpeptid **118** zunächst an einem polymeren Träger synthetisiert (Schema 44), und in



Schema 44. Enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis^x-modifizierten Peptiden und Proteinen mit Glycosyltransferasen.

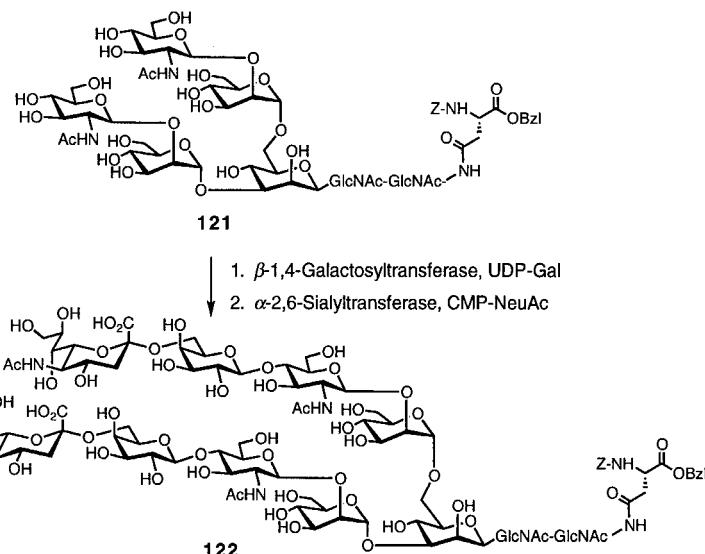
zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Glycosylierungen gelang dann die regio- und stereospezifische Anknüpfung einer Galactose- sowie einer Neuraminsäureeinheit (→119).^[192] Nach Abspaltung des Glycopeptids von der festen Phase durch chymotrypsinvermittelte Esterhydrolyse am C-Terminus eines Phenylalanins wurde das Sialyl-Lewis^x(SLe^x)-Tetrasaccharid durch Fucosylierung des *N*-Acetylglucosamins komplettiert (→120). Diese Technik ermöglichte sehr eindrucksvoll auch die In-vitro-Synthese eines glycosylierten Proteins.^[193] Von der RNase B wurde dafür ein Oligosaccharid mit einer Glycosidase abgespalten, und der verbleibende GlcNAc-Rest wurde dann enzymatisch sukzessive glycosyliert, bis das Protein mit dem SLe^x-Tetrasaccharid versehen war (Schema 44). Mit dieser enzymatischen Technik, deren Prinzip bereits früher als Möglichkeit zur Modifizierung unerwünschter Glycane rekombinanter Glycoproteine vorgeschlagen wurde,^[194] können

glycosylierte Proteine hoher Homogenität erhalten werden, die neue Möglichkeiten für das Studium des Einflusses der Kohlenhydratreste auf die Struktur und die Funktion von Glycoproteinen eröffnen.

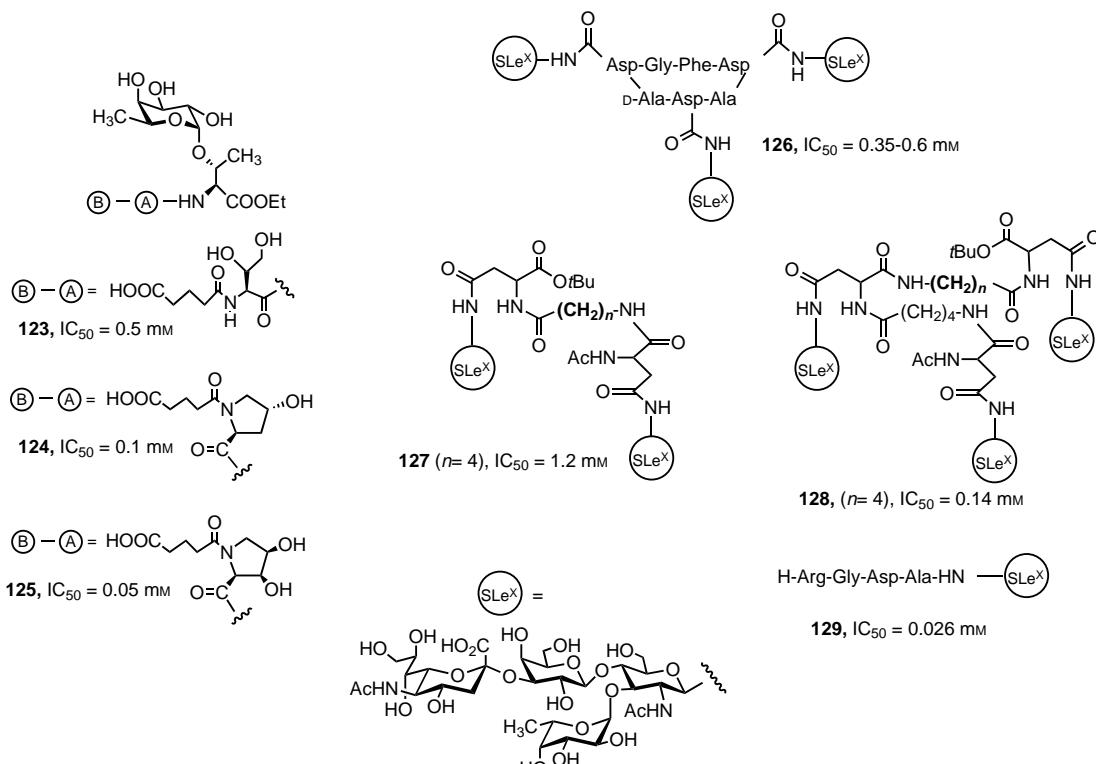
Große Vorteile für die Synthese komplexer Glycopeptide bietet die Kombination von klassisch-chemischen mit enzymatischen Glycosylierungsschritten. So wurde das Glycopeptid 121 durch etablierte Methoden der Kohlenhydratchemie aufgebaut und die Oligosaccharideinheit nachfolgend durch den Einsatz enzymatischer Glycosylierungen zum Undecasaccharid erweitert (→122) (Schema 45).^[195]

Synthetische Glycopeptide, die chemoenzymatisch oder klassisch-chemisch in Lösung oder an einer festen Phase aufgebaut wurden, wurden häufig als Inhibitoren bei Untersuchungen eingesetzt, in denen man das Ziel verfolgte, die Anheftung zirkulierender Leukozyten an Endothelzellen und das nachfolgende Auswandern der Leukozyten aus Blutgefäßen als Reaktion auf akute und chronische Entzündungsprozesse zu hemmen. Dabei erkennen auf der Oberfläche der Endothelzellen befindliche Proteine, die Selectine, auf den Leukozyten komplexe Glycoproteine, die das Sialyl-Lewis^x-Kohlenhydratepitop tragen,^[178, 196] und leiten so den Prozeß der Ausschleusung ein.

Diese Wechselwirkung wurde vor dem Hintergrund der möglichen Entwicklung eines neuen therapeutischen Ansatzes unter Verwendung von Glycopeptiden inhibiert. So wurden basierend auf Daten zur Konformation von SLe^x in Lösung, der räumlichen Struktur des humanen E-Selectins und den für die Erkennung von SLe^x durch das E-Selectin wichtigen Strukturmerkmalen sowie unterstützt durch Molecular-Modeling-Rechnungen die fucosylierten Peptide 123–125 sowie weitere Ana-



Schema 45. Synthese einer komplexen Glycopeptidvorstufe durch sukzessive enzymatische Glycosylierungen.

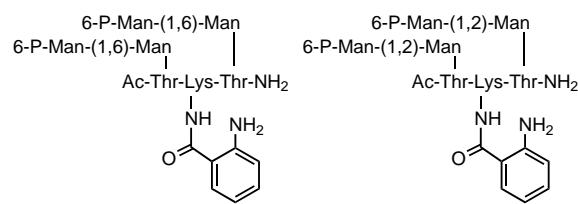
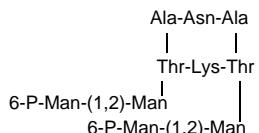
Schema 46. Synthetische Sialyl-Lewis^x-Mimetica.

loga synthetisiert und als Inhibitoren geprüft^[197] (Schema 46). Die Peptide enthalten jeweils die benötigte Fucose, eine Hydroxygruppen tragende Struktureinheit, die die Galactose des SLe^x-Tetrasaccharids imitiert, und eine Glutarsäure, die als Äquivalent für die negativ geladene Gruppe der Sialinsäureeinheit fungiert. **123** erwies sich als genauso wirksam wie natürliches SLe^x, während **124** und **125** deutlich bessere Inhibitoren waren.

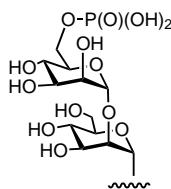
Die Annahme, daß die nur schwache Wechselwirkung von monomeren SLe^x in vivo durch „Clustering“ (Multivalenz) von Liganden erhöht wird, wurde mit den multiplen SLe^x-Glycopeptiden **126**–**128** untersucht (Schema 46). In einem Zelladhäsionstest, bei dem die Bindung von rekombinanten E-Selectin/Immunoglobulin-Fusionsproteinen an SLe^x-Liganden tragende Tumorzellen gemessen wurde, war das trivalente Glycopeptid **126** ein zwei- bis dreimal wirksamerer Inhibitor als monomere SLe^x-Bausteine.^[198] In **127** und **128** wurde der Abstand der SLe^x-Oligosaccharide zueinander variiert, um Rückschlüsse auf die Größe und die räumliche Anordnung der SLe^x-Cluster ziehen zu können.^[199] Dabei ergab sich, daß die divalenten Liganden **127** durchweg weniger wirksam sind als die trivalenten Analoga **128** und daß die Inhibierung tatsächlich von der Zahl der als Spacer eingefügten Methylengruppen abhängt. Eine deutliche Steigerung der zelladhäsionsinhibierenden Wirkung konnte durch Verknüpfung des SLe^x-Tetrasaccharids mit dem Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) erreicht werden, das der Minimalsequenz zahlreicher Adhäsionsmoleküle entspricht und z.B. von Integrinrezeptoren erkannt wird. Das so erhaltene Adhäsionshybrid **129** wies im Zellassay einen IC₅₀-Wert von 26 µM auf und ist damit ein sehr wirksamer Inhibitor der Adhäsion.^[200]

Glycopeptide, die 6-O-phosphorylierte Mannosereste tragen, wurden als Reagentien zum Studium der Erkennung phosphorylierter Glycoproteine mit dem Mannose-6-phosphat(Man-6-P)-Rezeptor eingesetzt.^[186] Lysosomale Enzyme tragen Oligosaccharide mit terminalen Man-6-P-Resten. Über diese Kohlenhydrate werden sie von Man-6-P-Rezeptoren erkannt, nachfolgend korrekt prozessiert und schließlich in den Golgi-Apparat transportiert. Eine Fehlregulierung dieser Vorgänge ist an Entzündungsprozessen im Zentralnervensystem beteiligt. In der Annahme, daß ein verzweigtes Oligosaccharid mit zwei Man-6-P-Resten der natürliche Ligand für den Rezeptor ist, wurden diverse offenkettige und cyclische Glycopeptide wie **130**–**132** (Schema 47) aufgebaut. In diese Verbindungen wurden ein phosphorylierter Mannoserest oder eine phosphorylierte Disaccharideinheit aus α (1,6)- oder α (1,2)-verknüpften Mannoseresten eingebracht sowie Länge und Sequenz der Aminosäurekette zwischen den Sacchariden variiert.^[186] Die Glycopeptide wurden dann in einem eigens entwickelten ELISA-Test als Inhibitoren der Bindung des Man-6-P-Rezeptors an ein immobilisiertes Phosphomannan geprüft. Dabei zeigte sich, daß eine hohe Bindungsaffinität dann erreicht wird, wenn die Liganden divalent sind und 6'-O-phosphorylierte α (1,2)-verknüpfte Disaccharide tragen; Monosaccharide und α (1,6)-verknüpfte Disaccharide sind wesentlich weniger wirksam. Drei bis fünf Aminosäuren als Abstandshalter zwischen den beiden Sacchariden sind günstig, cyclische Peptide scheinen für eine gute Bindung konformativ zu starr zu sein.

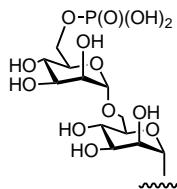
Da Glycoproteine die charakteristischen Strukturen tumorassoziierten Antigene repräsentieren können, wurden entsprechende synthetische Glycopeptide auch intensiv als Reagentien für die Entwicklung von Antitumor-Vaccinen angewendet.^[201]

130, $IC_{50} = 1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ 131, $IC_{50} = 0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$ 132, $IC_{50} = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$

6-P-Man-(1,2)-Man =



6-P-Man-(1,6)-Man =



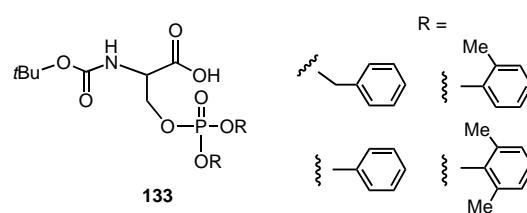
Schema 47. Synthetische Phosphomannosyl-Glycopeptide und ihre inhibierende Wirkung auf den Phosphomannose-Rezeptor.

6.3. Phosphopeptide und Glycophosphopeptide

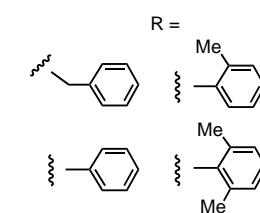
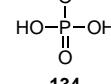
Die durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen vermittelte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen an deren Serin-, Threonin- und Tyrosinresten wird von allen Organismen für die Regulierung vielfältiger intrazellulärer Prozesse benutzt, z.B. für die Signalweiterleitung von der Plasmamembran zum Zellkern sowie für die Steuerung von Zellwachstum und -teilung.^[202] Phosphopeptide wurden daher wiederholt als Reagentien für das Studium und die Steuerung solcher Prozesse eingesetzt. Die Synthese phosphorylierter Serin- und Threoninpeptide ist durch die ausgesprochene Basenlabilität dieser Peptidkonjugate erheblich erschwert (siehe Schema 27) und verlangt ebenfalls nach unter milden Bedingungen ablösbarer Schutzgruppen. An Tyrosinresten phosphorylierte Peptide können die Phosphatgruppen hingegen nicht durch β -Eliminierung verlieren und sind aus diesem Grund wesentlich einfacher aufzubauen.^[138] Auf die Entwicklung von Methoden zu ihrer Herstellung wird daher hier nicht näher eingegangen.

Serin/Threonin-Phosphopeptide können prinzipiell durch nachträgliche Phosphorylierung eines separat synthetisierten Peptids (global phosphorylation strategy) oder aber durch stufenweisen Aufbau der Zielverbindung in Lösung oder an einer festen Phase unter Verwendung phosphorylierter Aminosäurebausteine (building block strategy) synthetisiert werden. Die letztgenannte Vorgehensweise ist in der Regel flexibler.

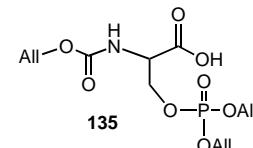
Für die stufenweise Synthese von Phosphopeptiden kamen zunächst Boc-geschützte Bausteine wie 133 zum Einsatz (Schema 48), wobei die Phosphatschutzgruppen jedoch sorg-



133

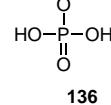
H-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂

134



135

H-Lys-Ile-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-OH



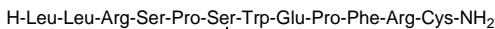
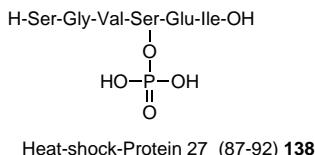
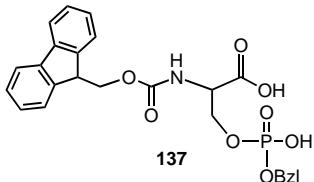
136

Schema 48. Phosphopeptide, die aus vollständig geschützten Phosphoaminoäurebausteinen aufgebaut wurden.

fältig gewählt werden mußten, um Dephosphorylierungen unter den Bedingungen der Boc-Gruppen-Abspaltung zu vermeiden.^[138, 203] Obgleich mit dieser Technik Phosphopeptide, z.B. die Teilsequenz 134 des Tau-Proteins, am polymeren Träger aufgebaut werden konnten,^[204] wurden kürzlich vorteilhaftere, anders geschützte Synthesebausteine entwickelt. Als leistungsfähig erwies sich z.B. die N-terminale Allyloxycarbonyl(Aloc)-Schutzgruppe. So wurde der Aminosäurebaustein 135 (Schema 48) in einer Festphasensynthese des Tau-Proteinfragments 136 an ein Hexapeptid angeknüpft, das an Wang-Harz unter Verwendung der basenlabilen N-terminalen Fmoc-Gruppe und säurelabiler Seitenketten-Schutzgruppen aufgebaut worden war.^[205] Durch Palladium(0)-vermittelte Ablösung der Allylschutzgruppen in Gegenwart von $\text{Me}_3\text{SiN}_3/\text{Bu}_4\text{NF}$ konnten der N-Terminus und die Phosphatgruppe gleichzeitig und ohne β -Eliminierung deblockiert werden. Verlängerung der Peptidkette und abschließende Ablösung des Phosphopeptids vom Harz bei gleichzeitiger Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen lieferten das gewünschte Peptid 136. Nachteilig ist bei dieser Vorgehensweise allerdings die gleichzeitige Freisetzung der Aminofunktion und der Phosphatgruppe, da letztere in den nachfolgenden Peptidkupplungen ebenfalls mitaktiviert werden kann.

Die bei der Festphasensynthese nichtmodifizierter Peptide und Glycopeptide als eine Standardmethode etablierte Verwendung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe kann nicht ohne weiteres bei der Phosphopeptidsynthese angewendet werden, da als Phosphorsäureetriester maskierte Serin- und Threoninphosphopeptide anders als die stabileren Glycopeptide unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung die Phosphatgruppe durch β -Eliminierung und Bildung von α,β -

Dehydroalanylpeptiden verlieren.^[206] Dieser Nachteil konnte jedoch durch Einführung des Fmoc-maskierten Bausteins **137**, der nur noch eine Phosphorsäurediestergruppe trägt, überwunden werden^[207, 208] (Schema 49). Die Phosphatgruppe ist

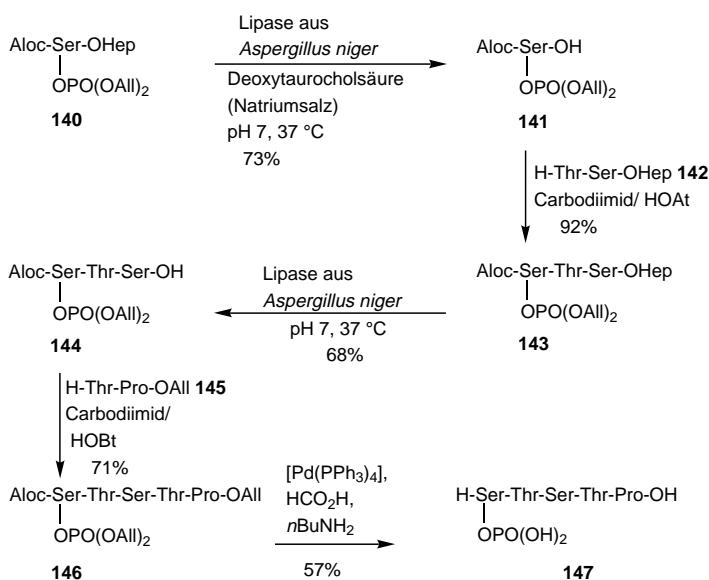


Heat shock Protein 27 (10-20)-Cys-NH₂ **139**

Schema 49. Phosphopeptide, die unter Verwendung des Phosphorsäureesters **137** aufgebaut wurden. Die Zahlen in Klammern entsprechen den Sequenznummern im Protein.

unter den basischen Bedingungen deprotoniert und wird daher als schlechte Abgangsgruppe nicht eliminiert. Sie ist gegenüber Piperidin, das zur Ablösung der Fmoc-Gruppe eingesetzt wird, stabil und wird auch bei den nachfolgenden Verlängerungen der Peptidkette offenbar nicht aktiviert. Unter Verwendung dieses Bausteins wurden durch Festphasensynthese z. B. die Phosphopeptide **138** und **139** aufgebaut, die phosphorylierte Partialsequenzen des Heat-shock-Proteins 27 sind, ohne daß die oben erwähnten unerwünschten Nebenreaktionen auftraten.^[208] Damit ist eine leistungsfähige Methode für die flexible Synthese von Phosphopeptiden am polymeren Träger und unter Verwendung der etablierten N-terminalen Fmoc-Gruppe gegeben.

Auch bei der Phosphopeptidsynthese haben enzymatische Schutzgruppentechniken interessante und vorteilhafte Alternativen zu klassisch-chemischen Methoden eröffnet. So gelang durch die lipasevermittelte Hydrolyse der Heptylester-schutzgruppe (siehe Abschnitt 6.2) die Synthese des Phosphopeptids **147**, eines Ausschnitts aus der menschlichen Raf-1-Kinase (siehe Abschnitt 2.2)^[209] (Schema 50). Dabei wurde der vollständig geschützte phosphorylierte Serinheptylester **140** mit der Lipase aus *Aspergillus niger* selektiv am C-Terminus deblockiert, und nach Verlängerung der Peptidkette löste das Enzym auch aus dem Phosphotripeptidester **143** ausschließlich die Esterschutzgruppe ab. Erneute Kettenverlängerung um ein Dipeptid und abschließende simultane Ablösung aller Allylschutzgruppen lieferten die Zielverbindung **147**. Die Bedingungen der enzymatischen Deblockierungen sind so mild, daß keine β -Eliminierung des Phos-

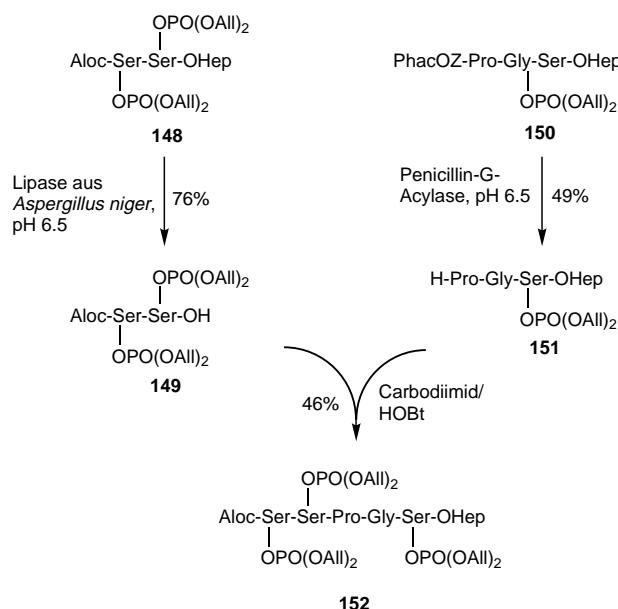


Schema 50. Chemoenzymatische Phosphopeptidsynthese über enzymlabile Heptylester.

phatrestes aus den als Phosphorsäuretriestern maskierten Peptiden auftritt.

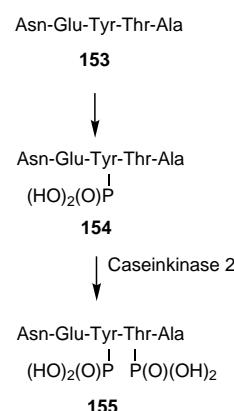
Die N-terminale Deblockierung phosphorylierter Peptide gelang unter Einsatz der Phenylacetoxymethoxy carbonyl-(PhacOZ)-Urethanschutzgruppe.^[210] Diese enzymlabile Gruppe ist ein Analogon der in Abschnitt 6.1 vorgestellten AcOZ-Gruppe und wurde im Zuge der Synthese eines Phosphoglycopeptids entwickelt (siehe unten). Bei Behandlung des PhacOZ-maskierten phosphorylierten Tripeptids **150** mit dem Enzym Penicillin-G-Acylase wurde die terminale Phenylsäureestergruppe selektiv gespalten und dadurch die in Schema 31 dargestellte spontane Fragmentierung des *p*-Hydroxybenzylurethans ausgelöst. Das dabei freigesetzte, N-terminal deblockierte Phosphopeptid **151** wurde dann mit dem zweifach phosphorylierten Dipeptid **149** zum Pentapeptid **152** gekuppelt (Schema 51), das erneut am C-Terminus enzymatisch deblockiert werden kann. Auch **149** konnte durch gezielte lipasevermittelte Heptylesterspaltung aus der entsprechenden vollständig geschützten Vorläuferstufe **148** erhalten werden. Eine alternative Möglichkeit für die selektive N-terminale Deblockierung phosphorylierter Peptide besteht im direkten Schutz der Aminogruppe mit Phenylsäure und der biokatalysierten Spaltung des Phenylacetamids mit Penicillin-G-Acylase.^[211]

Phosphorylierte Peptide erwiesen sich als wertvolle Hilfsmittel beim Studium von Signalkaskaden und der daran beteiligten Phosphoproteine. So kamen Phosphotyrosylpeptide wiederholt bei der Aufklärung der Bindungsspezifität von signaltransduzierenden Proteinen zum Einsatz, die z. B. in der Ras- und der GPCR-Signalkaskade Phosphotyrosinreste mit Hilfe von SH2-Domänen erkennen (siehe Abschnitt 5). Auch gelang unter Verwendung solcher Peptidkonjugate die gezielte Modulierung der Signalweiterleitung über den JAK/STAT-Weg (siehe Abschnitt 2.3). Darüber hinaus kamen tyrosinphosphatmodifizierte Peptide, die Autophosphorylierungssequenzen von Rezeptor-Tyrosinkinasen repräsentieren, bei der Bestimmung der Substrattoleranz von Protein-



Schema 51. Chemoenzymatische Phosphopeptidsynthese über enzymlabile Heptylester und unter Verwendung der PhacOZ-Schutzgruppe.

Tyrosinphosphatasen zum Einsatz.^[212] Die Substratspezifität der für Ser/Thr spezifischen Caseinkinase 2 wurde mit unterschiedlich phosphorylierten Peptiden der Sequenz Ala-Ser/Thr-Tyr-Ser-Ala näher definiert,^[213] die von der phosphorylierten Form der Autophosphorylierungsstelle (Asn-Glu-Tyr-Thr-Ala) der Src-Kinase-Familie abgeleitet worden waren. Dabei wurden sieben Phosphopeptide mit der „Global-phosphorylation“-Strategie (siehe oben) aufgebaut und als Substrate für Caseinkinase 2 geprüft. Die enzymatischen Untersuchungen ergaben, daß eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes die zusätzliche Modifizierung des sich C-terminal anschließenden Serinrestes begünstigt, so daß in den natürlichen Proteinen das Tyrosinphosphat als Determinante fungieren könnte, durch welche eine nachfolgende zweite Phosphorylierung durch Caseinkinase 2 zur C-terminal benachbarten Hydroxyaminosäure dirigiert wird (Schema 52).



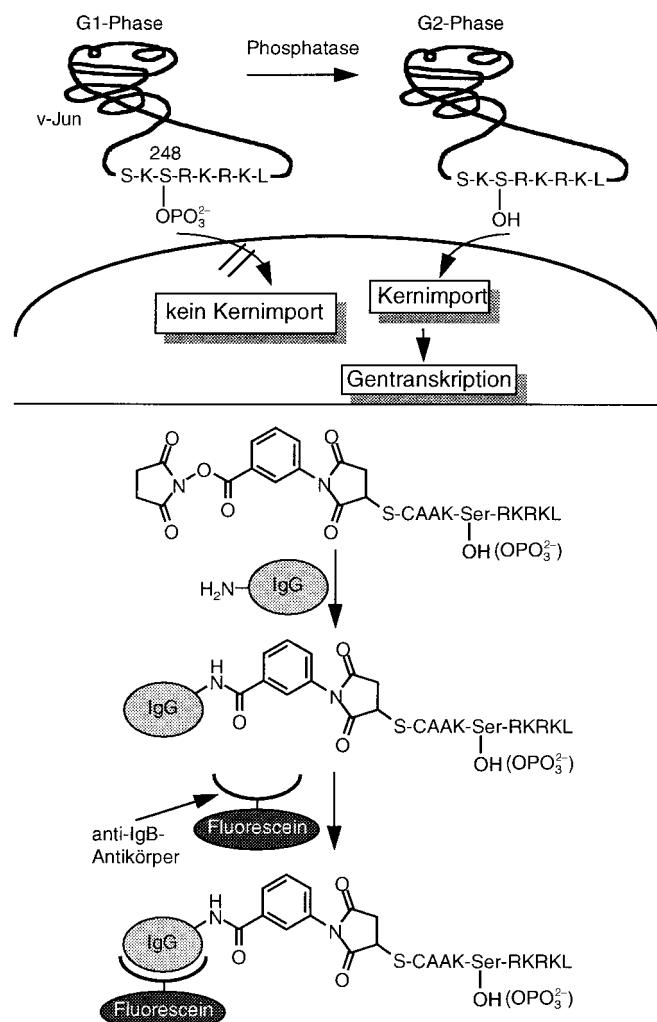
Schema 52. Enzymatische Phosphorylierung eines Peptids mit der Caseinkinase 2.

Diese steuernde Wirkung erklärt, warum Caseinkinase 2 bei den Src-Kinasen von ihrer sonst üblichen Substratspezifität abweicht, nach der C-terminal zum Zielaminoäurerest ein saurer Rest vorliegen sollte.

Sehr elegant wurde ein an einem Serinrest phosphoryliertes Peptid eingesetzt, um die Strukturvoraussetzung für den vom Zellzyklus abhängigen Import des tumorigen Transkriptionsfaktors v-Jun im molekularen Detail aufzuklären.^[214] v-Jun ist in der G1-Phase des Zellzyklus cytosolisch. In dieser Form ist es an Ser 248 phosphoryliert, d.h. in unmittelbarer Nähe seiner Kern-

lokalisierungssequenz (NLS), die den aktiven Transport des Proteins in den Zellkern einleitet. In der G2-Phase wird der Phosphorsäureester jedoch entfernt, und das Protein reichert sich im Zellkern an. Offenbar wird über die Phosphorylierung des Serinrestes in unmittelbarer Nähe der NLS also der Import des v-Jun-Proteins in den Zellkern geregt, in den es gelangen muß, um als Transkriptionsfaktor zu wirken. Daß der Phosphorylierung diese entscheidende Rolle bei der Regulierung des Kernimports zukommt, konnte durch Untersuchungen mit Proteinkinase- und Proteinphosphataseinhibitoren belegt werden. In Gegenwart des Serinkinaseinhibitors Staurosporin (siehe Abschnitt 7) wird die Phosphorylierung von v-Jun unterdrückt, und das nichtphosphorylierte Protein wird in der G0-, der G1- und der S-Phase des Zellzyklus in den Kern transportiert. Der Phosphataseinhibitor Okadaicäure (siehe Abschnitt 9.1) verhindert hingegen die Dephosphorylierung des Proteins und bewirkt, daß es auch in der G2-Phase nicht in den Kern gelangt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden ein phosphoryliertes und das entsprechende nichtmodifizierte Peptid aufgebaut, die beide den fraglichen Serinrest sowie die NLS enthielten und über einen aktivierte Ester an ein Immunglobulin geknüpft wurden (Schema 53). Nach Mikroinjektion

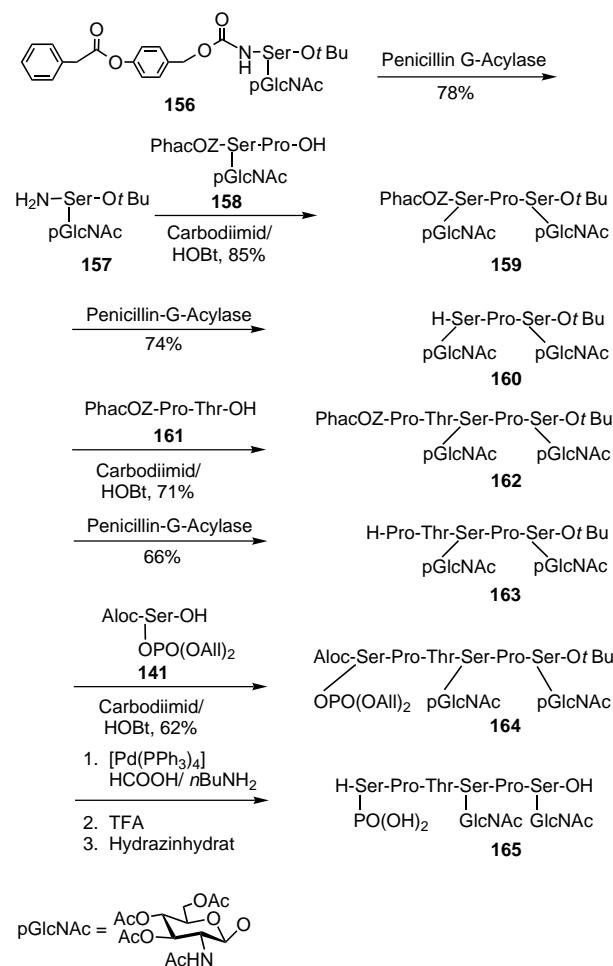


Schema 53. Regulierung des Kernimports von v-Jun durch Phosphorylierung.

der so erhaltenen Proteinkonjugate in das Cytosol von Fibroblasten konnte ihr intrazelluläres Schicksal mit einem Fluorescein-markierten anti-IgG-Antikörper durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Dabei zeigte sich, daß das Konjugat mit phosphoryliertem Serinrest tatsächlich im Cytosol verblieb, während das nichtphosphorylierte Analogon in den Zellkern importiert wurde. Phosphorylierte Peptide wurden weiterhin vielfältig als antigene Struktureinheiten für die Herstellung monoklonaler Antikörper herangezogen, die bestimmte Phosphoproteine erkennen.^[205, 215] Diese Antikörper dienen z. B. als Hilfsmittel für die Immunodiagnostik des Tau-Proteins bei der Alzheimer-Krankheit.

Die glycosidische Verknüpfung von Serin- und Threoninresten intrazellulärer Proteine mit *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) wurde als eine neuartige kovalente Modifizierung intrazellulärer Proteine beschrieben.^[216] Die O-GlcNAc-Modifikation ähnelt der Phosphorylierung in vielfältiger Weise, insbesondere in bezug auf ihren dynamischen Charakter und ihr ubiquitäres Auftreten, z. B. bei Transkriptionsfaktoren wie Myc, dem Serum response factor (SRF), Jun und Fos sowie bei Onkogen-Produkten wie den Tumorsuppressoren Rb und p53. Offenbar nutzen Zellen die reversible Glycosylierung mit GlcNAc als regulatorischen Mechanismus. Insbesondere zeichnet sich ab, daß Phosphorylierung und GlcNAc-Modifizierung in einem „Yin-Yang“-Verhältnis zueinander stehen, d. h. sie sind sich nicht nur ähnlich, sondern oft gegenläufig. Die C-terminale Domäne der menschlichen RNA-Polymerase II ist im cytosolischen Enzym z. B. mehrfach glycosyliert, das intranukleäre Enzym ist im Transkriptionskomplex jedoch hoch phosphoryliert und nicht mehr glycosyliert, wobei die Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen identisch sind.^[216, 217] Zur Klärung der Fragen, ob das Kohlenhydrat potentielle Phosphorylierungsstellen maskiert oder gar markiert, ob Phosphorylierung und Glycosylierung an der Regulierung des Kernimports beteiligt sind oder gar die Transkription des genetischen Codes beeinflussen, können Peptide, die beide Modifikationen enthalten, wertvolle Hilfsmittel sein. Bei ihrer Synthese addieren sich die Probleme der Phosphopeptid- und der Glycopeptidchemie. Mit enzymatischen Schutzgruppentechniken gelang jedoch die erste Synthese eines komplexen Phosphoglycopeptids, das einen Ausschnitt aus der großen C-terminalen Domäne der menschlichen RNA-Polymerase II bildet.^[218] Dabei kamen sowohl die lipasevermittelte Spaltung von Heptylestern (siehe Abschnitt 6.2) als auch die enzyminitiierte Fragmentierung einer Urethanschutzgruppe (siehe oben und Abschnitt 6.1) zum Einsatz.

Bei Behandlung des vollständig geschützten glycosylierten Serins **156**, das am N-Terminus die enzymlabile PhacOZ-Gruppe trägt (siehe Schema 51), mit Penicillin-G-Acylase wurde nur die Phenylsäureestergruppe gespalten, und die in Schema 31 vorgestellte Fragmentierung des resultierenden Phenolats führte zur Freisetzung der gewünschten, selektiv deblockierten Aminosäure **157** (Schema 54). Nach Anknüpfen eines ebenfalls PhacOZ-geschützten Glycodipeptids unter Bildung des Diglycotripeptids **159** setzte die Penicillin-G-Acylase den N-Terminus erneut unter sehr schonenden Bedingungen frei. Ein weiterer Cyclus aus Kettenverlängerung und enzyminitierter N-terminaler Deblockierung lieferte das selektiv entschützte Diglycopenta-



Schema 54. Chemoenzymatische Synthese des Phosphoglycopeptids **165** unter Verwendung der enzymlabilen PhacOZ-Schutzgruppe.

peptid **163**. Schließlich wurde das allylmaskierte Serinderivat **141** angeknüpft, das durch lipasevermittelte Abspaltung der Heptylschutzgruppe aus dem entsprechenden Ester zugänglich war (Schema 50). Abschließend gelang die sukzessive Ablösung aller Aminosäure- und Kohlenhydratschutzgruppen unter Bildung von **165**.

Phosphoglycopeptide wie **146** wurden bislang noch nicht in biologischen Untersuchungen eingesetzt. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß ein synthetisches O-GlcNAc-modifiziertes Peptid, das einer Wiederholungseinheit der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II entspricht, die Gentranskription *in vivo* deutlich inhibiert.^[219] Der gleiche Effekt trat in Gegenwart eines Inhibitors der enzymatischen O-GlcNAc-Abspaltung auf. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die O-GlcNAc-Modifizierung für den Transkriptionsprozeß wichtig ist. Mit synthetischen Phosphoglycopeptiden sollten wertvolle Erkenntnisse über diesen und andere biologische Vorgänge erhalten werden können.

6.4. Nucleopeptide

Nucleoproteine sind vielfach an der Transkription des genetischen Codes bei unterschiedlichen Organismen betei-

ligt. So spielt die Bildung von Nucleopeptidbindungen eine entscheidende Rolle beim Priming der Replikation von Viren.^[220] DNA-Topoisomerasen bilden bei der Ausübung ihrer Funktion Nucleopeptide,^[221] und die DNA liegt kovalent verknüpft mit der Matrix des Zellkerns als Nucleoprotein vor. Nucleopeptide könnten daher vielfältige neue Möglichkeiten z. B. für das Studium der Gentranskription und insbesondere für die Entwicklung neuer und alternativer antiviraler Agenten eröffnen.

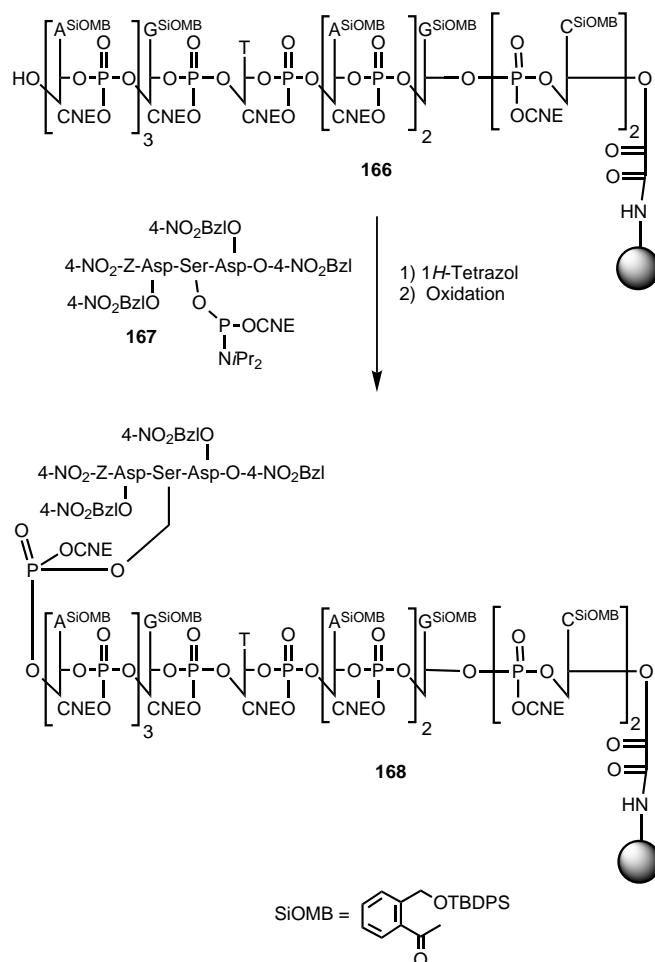
Bei der Synthese von Nucleopeptiden bestehen prinzipiell die gleichen Probleme wie bei der Phosphopeptidsynthese (siehe Abschnitt 6.3). Allerdings vergrößert sich die Zahl der einzusetzenden, orthogonal zueinander stabilen Schutzgruppen durch die hinzukommenden funktionellen Gruppen der Kohlenhydrate und der Nucleobasen deutlich, und die Säurelabilität der Purin-N-Glycoside verbietet die Anwendung säurelabiler Schutzfunktionen.

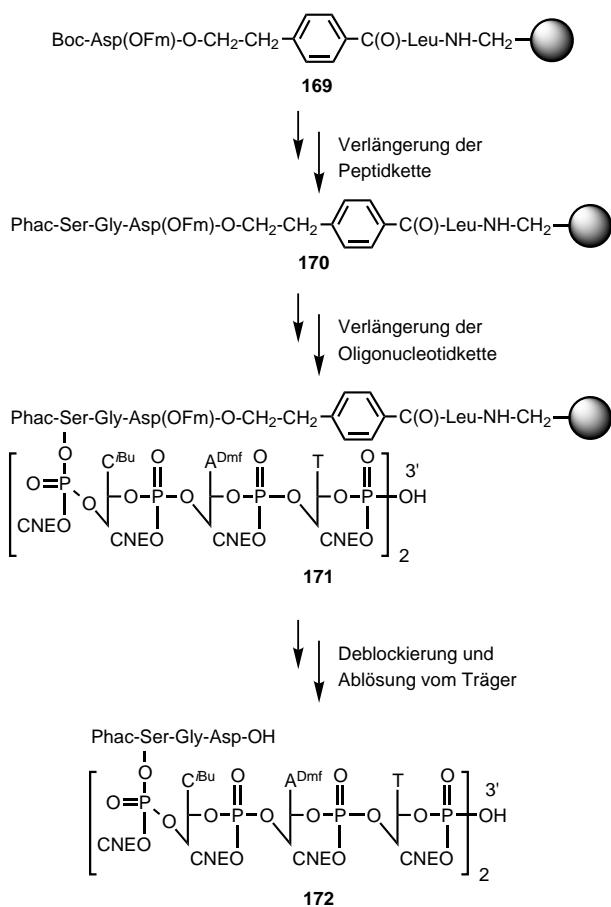
Nachdem sich in ersten Arbeiten^[222] zeigte, daß mit in der Peptidchemie bewährten Schutzgruppen wie dem Allylester oft keine geeigneten Lösungen für diese Probleme gefunden werden,^[223] konnten erste Schutzgruppenkombinationen für die Synthese von Tyrosin-^[223, 224] und Serin/Threonin-Nucleopeptiden^[223, 225–228] in Lösung und am polymeren Träger entwickelt werden. Da die Tyrosinderivate – wie bei den Phosphopeptiden auch – nicht durch baseninduzierte β -Eliminierung zerstört werden, kommt nachfolgend nur die Synthese von Serin/Threonin-Peptidkonjugaten zur Sprache.

Für die Festphasensynthese von Serinnucleopeptiden wurden zwei generelle Strategien entwickelt. In einer konvergenten Vorgehensweise^[225] stellte man zuerst das immobilisierte Oligonucleotid **166** her und kuppelte es mit dem separat aufgebauten Peptidphosphoramidit **167** (Schema 55). Die Schutzgruppen im Peptid- und im Oligonucleotidteil sowie die Linkergruppe zum festen Träger waren dabei so gewählt, daß in zwei abschließenden Schritten das gewünschte Nucleopeptid erhalten wurde. Die Deblockierung war allerdings unvollständig. Als alternative Vorgehensweise wurde der schrittweise Aufbau zunächst des Peptids **170** am polymeren Träger nach der Boc-Methode durchgeführt, an den sich die sukzessive Synthese der Oligonucleotidkette anschließt^[226] (Schema 56). Abschließend wurde der Linker zum polymeren Träger durch Fluorid gespalten und die Basenschutzgruppen durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniak entfernt. Das gewünschte Nucleopeptid **172** wurde in 33 % Gesamtausbeute isoliert. In beiden Fällen wurde nicht angegeben, ob unter den Bedingungen der Abspaltungen auch die β -Eliminierung eintritt.

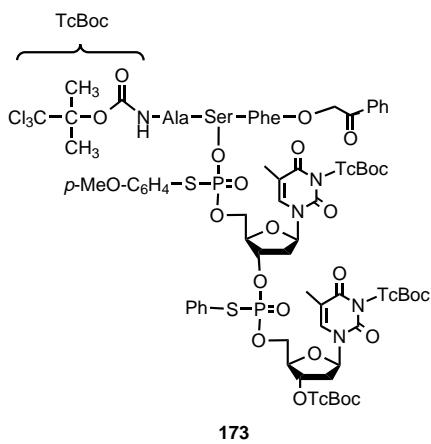
Für die Nucleopeptidsynthese in Lösung kam erfolgreich eine Strategie zum Einsatz, bei der die Aminofunktionen der Nucleobasen und der N-terminalen Aminosäure mit der Trichlor-Boc-Gruppe (TcBoc) und der C-Terminus als Phenacyl(Pac)-Ester geschützt wurden^[227] (Schema 57). In einer konvergenten Vorgehensweise wurde ein Tripeptid mit einem Dinucleotid zum Nucleopeptid **173** verknüpft, aus dem die genannten Schutzfunktionen dann alle in einem Schritt ohne β -Eliminierung entfernt wurden.

Eine schrittweise, flexible Synthese von Nucleopeptiden in Lösung, die nach dem vorstehend erläuterten Verfahren wegen der fehlenden Orthogonalität der Schutzgruppen nicht





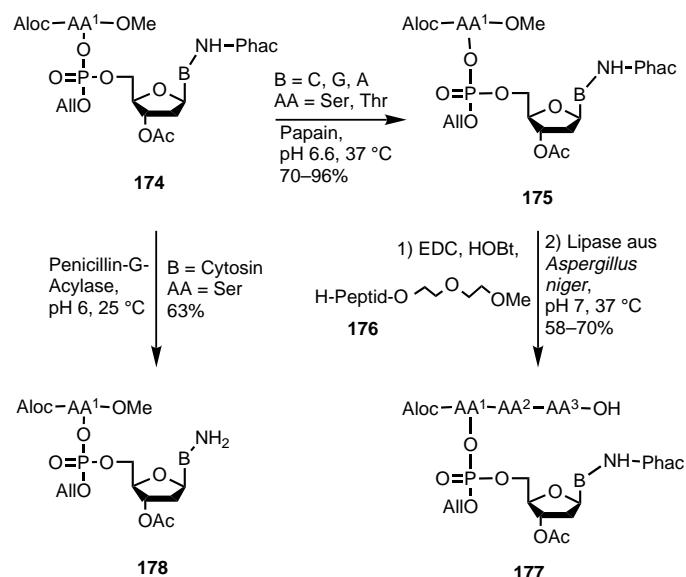
Schema 56. Festphasensynthese von Nucleopeptiden durch sukzessive Verlängerung der Peptid- und der Nucleotidkette. Dmf = Dimethylformamidinyl, Fm = Fluorenylmethyl, Phac = Phenylacetyl.



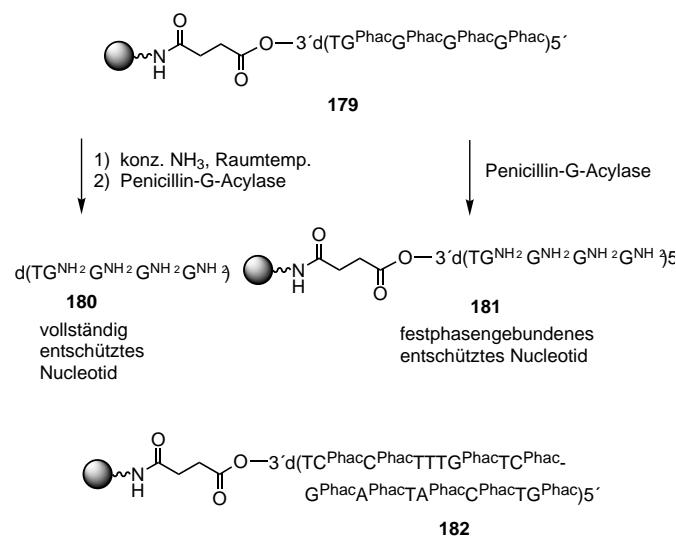
Schema 57. Schutzgruppenkombination für die Synthese von Nucleopeptiden in Lösung.

Enzym sogar festphasenverankerte Oligonucleotide wie **179** am Träger zu deblockieren (Schema 59), ohne die Linkergruppe anzugreifen. Dieser Befund ist auch im Hinblick auf die mögliche Anwendung von Biokatalysatoren bei der kombinatorischen Synthese an polymeren Trägern^[230] von besonderem Interesse.

Synthetische Nucleopeptide wurden bislang noch nicht für biologische Studien eingesetzt.



Schema 58. Nucleopeptidsynthese unter Verwendung enzymlabiler Schutzgruppen.



Schema 59. Enzymatische Deblockierung der Aminogruppen von Oligonucleotiden in Lösung und an fester Phase (Controlled-pore-glass(CPG)-Beads), die als Kugel dargestellt ist.

7. Modulierung der Aktivitäten der Proteinkinasen C und A

Proteinkinase C (PKC)^[231] ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in vielen Zelltypen eine wichtige Funktion in Signalkaskaden ausübt,^[232] durch die zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung gesteuert werden (siehe Abschnitt 2.1).^[233–235] Bis heute konnten von der PKC wenigstens 12 Klassen von Isoenzymen in Säugerzellen identifiziert werden,^[236–238] die je nach den Bedingungen ihrer Aktivierung in drei oder vier Subfamilien unterteilt werden.^[239] Die Subfamilie der konventionellen PKCs (cPKCs) umfaßt die Isoenzyme α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ sowie γ und benötigt Calciumionen und Diacylglycerin (DAG) oder Phorbolester für ihre Aktivierung. Zur Subfamilie der neuartigen PKCs (nPKCs)

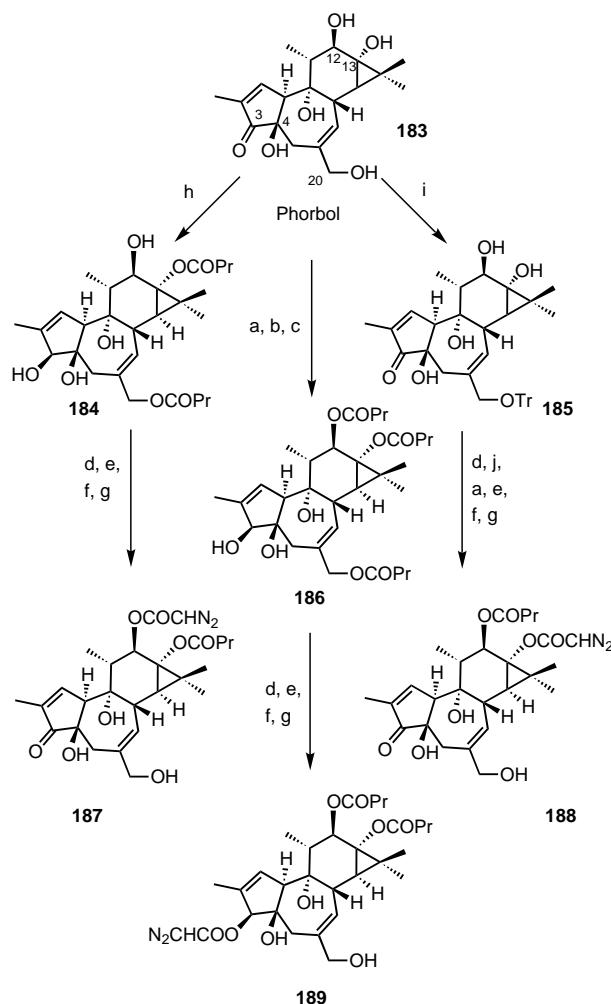
gehören die ε -, δ -, η - und θ -Enzyme, deren Aktivität nicht von Calciumionen, aber von DAG oder Phorbolestern abhängt. Die atypischen PKCs (aPKCs) schließlich werden repräsentiert durch die Subtypen ζ , λ und ι , die von Calciumionen, DAG und Phorbolestern unabhängig sind, während das Isoenzym PKC μ nicht weiter klassifiziert ist. Die letztgenannten Subtypen benötigen zur Ausübung ihrer Funktion membrangebundene Phospholipide wie Phosphatidylserin,^[233, 240] um die PKC an der Plasmamembran zu lokalisieren. Dies verdeutlicht, daß auch Glycerolipide, Sphingolipide und deren metabolische Produkte sowie Phospholipasen und Phosphatidylinositkinasen Signaltransduktionsprozesse beeinflussen können (siehe Abschnitt 2.1).

7.1. Modulierung der Aktivität von PKC durch Bindung an die regulatorische Domäne

Die Aktivierung der PKC durch DAG (siehe Abschnitt 2.1, Schema 2) kann auch durch Naturstoffe wie Phorbolester, Teleocidine, Bryostatine und Aplysia-Toxine bewirkt werden.^[241–245] Durch Molecular-Modeling-Untersuchungen wurde versucht, ein einheitliches Pharmacophor für diese strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen zu finden.^[246–251] Dabei ergab sich, daß ein doppeltes cysteinreiches Motiv in der C1-Region der PKC für die Bindung von DAG nötig und hinreichend ist.^[244, 252–255] Dieser Befund wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse des Komplexes aus PKC δ und Phorbol-13-acetat unterstützt. Die Bindung des Naturstoffs an das Protein über fünf Wasserstoffbrückenbindungen schafft dabei eine gemeinsame hydrophobe Oberfläche, über die der Gesamtkomplex an die Plasmamembran binden kann.^[256] Die Strukturanforderungen für die Bildung des PKC/Aktivator/Phospholipid-Aggregates sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

7.1.1. Phorbolester

Phorbolester fördern das Tumorwachstum, indem sie an die PKC binden und so das Enzym dauerhaft aktivieren, da sie im Unterschied zu DAG metabolisch stabil sind. Bisher wurden zwei Totalsynthesen des strukturell komplexen und synthetisch sehr anspruchsvollen Phorbols veröffentlicht,^[257a,b] ausgehend von diesem Naturstoff wurden darüber hinaus diverse Derivate hergestellt. Beispielsweise gelang die Synthese photoaktivierbarer Substanzen, die Carbenvorstufen in Form von Diazoacetylgruppen an unterschiedlichen Hydroxygruppen des Moleküls tragen.^[257c] Von den sechs Hydroxyfunktionen (an C3, C4, C9, C12, C13 und C20) werden die an C4 und C20 vermutlich für die Bindung an die PKC benötigt, während die C9-Hydroxygruppe für eine chemische Derivatisierung sterisch zu stark abgeschirmt ist. Ausgehend von 12,13-Phorbol-dibutylrat wurden daher Analoga mit photolabilen Markern an C3, C12 und C13 synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht (Schema 60). Die betreffende Hydroxyfunktion wurde dafür jeweils zunächst mit Boc-Glycin verestert, und nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe wurde das freie Amin diazotiert. Die selektive Hydrolyse des



Schema 60. Synthese photoaktivierbarer Phorbolester ausgehend von Phorbol. a) $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}]_2\text{O}$, DMAP, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; b) NaBH_4 , CeCl_3 , MeOH ; c) TBAF, THF; d) Boc-Gly, DMAP, NEt_3 , DCC, THF; e) 1N HCl , AcOH ; f) NaNO_2 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, H_2SO_4 ; g) $\text{Ba}(\text{OH})_2$, MeOH ; h) $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}]_2\text{O}$, NEt_3 , $\text{THF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; i) $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{CCl}$, Pyridin; j) HClO_4 , MeOH .

Butylesters mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ in Methanol lieferte die gewünschten Produkte.

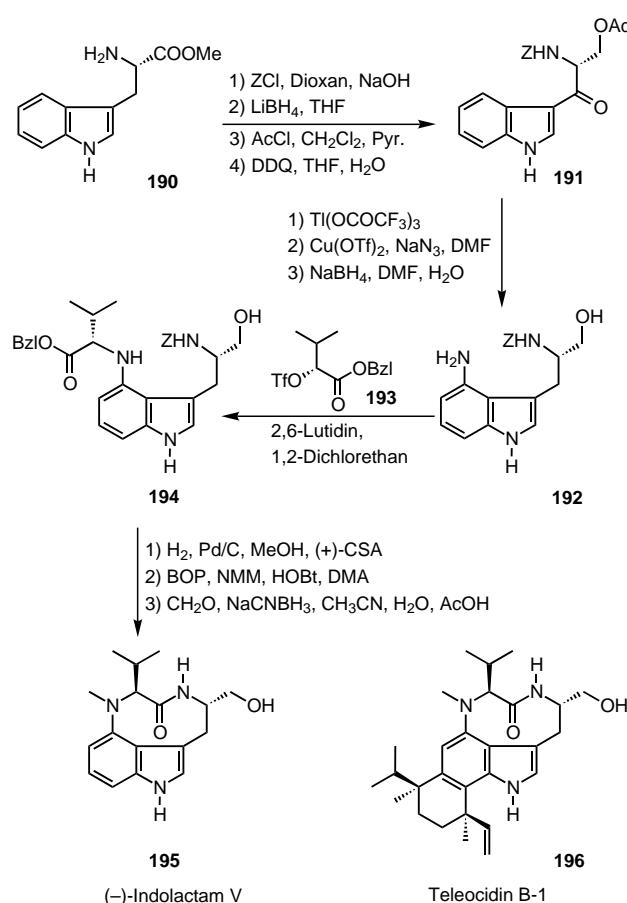
Zur Herstellung von 189 wurden die drei Hydroxygruppen an C12, C13 und C20 mit Buttersäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin und DMAP acyliert. Anschließend wurde die Ketogruppe mit Natriumborhydrid/Certrichlorid reduziert und mit TBAF selektiv der biologisch relevante β -Alkohol 186 erhalten, der nach dem oben beschriebenen Verfahren in den Diazoessigester 189 umgewandelt werden konnte. Acyierte man Phorbol hingegen ohne Zugabe von DMAP, fand eine selektive Derivatisierung an C13 und C20 statt, so daß ein Zugang zum gezielt an C12 markierten Phorbolanalogen 187 eröffnet wurde. Auch für die Markierung der C13-Position (188) konnten die unterschiedlichen Reaktivitäten der Hydroxyfunktionen genutzt werden: Zunächst wurde die reaktivste primäre C20-Hydroxyfunktion trityliert und dann an C13 selektiv mit Boc-Glycin verestert. Nach Entschützen der primären Hydroxygruppe wurde der C12,C20-Dibutylester hergestellt und dieser selektiv zu 188 hydrolysiert. Die synthetisierten Verbindungen kamen bei der

Untersuchung der Bindungsaffinität des Peptids C und bei dessen Photoaffinitätsmarkierung zum Einsatz.^[258] Das Peptid C ist eine cysteinreiche Untereinheit der regulatorischen Domäne von PKC γ , die [³H]Phorbol-12,13-dibutyryl in Gegenwart von Phosphatidylserin mit hoher Affinität bindet. Darüber hinaus erkennt es, wie die PKC, weitere Aktivatoren wie Dioctanoylglycerin und Teleocidin B-4. Das Peptid C konnte durch **187** und **188**, nicht jedoch durch **189** photomarkiert werden, was darauf hindeutet, daß sich die C3-Hydroxygruppe des Phorbols im gebundenen Komplex in der Nähe des polaren Teils des Phosphatidylserins befindet.

Phorbolester wurden in einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Studien eingesetzt. So löst Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) die Differenzierung der Leukämiezelllinie HL60 in makrophagenartige Zellen aus, die sich *in vitro* als cytostatisch und cytotoxisch für maligne menschliche Zellen erwiesen.^[259] Auch wurden mit PMA Hinweise auf die Rolle von Ceramid bei der Induktion der Apoptose über den Fas/Apo-1-Zelloberflächenrezeptor erhalten. So konnte der dabei von Ceramid ausgelöste Effekt durch Aktivierung von PKC mit PMA verringert werden, was darauf hindeutet, daß PKC die Auslösung der ceramidinduzierten Apoptose moduliert.^[260] Aus der Beobachtung, daß unterschiedliche Membrantransportvorgänge durch PMA stimuliert werden, wurde geschlossen, daß die Aktivierung von PKC in diese Prozesse eingebunden ist und eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Exocytose, beim Transport von Rezeptoren und beim konstitutiven Transport von Proteinen durch den Golgi-Komplex spielt.^[261, 262] PMA wurde auch in Studien zur Glucoseaufnahme durch Translokation des Glucosetransporters Glut 4 erfolgreich eingesetzt (siehe Abschnitt 9.1). Dabei kann Glut 4 von Insulin über PI-3-Kinase, über GTP (möglicherweise über GTP-bindende Proteine) und über PKC (nach Aktivierung mit PMA) stimuliert werden.^[263] Hinweise darauf, daß PKC auch an der Signalvermittlung über Stickstoffmonoxid, das in Endothelzellen gebildet wird,^[264] beteiligt ist, wurden durch Verwendung des Phorbolderivates Phorbol-12,13-dibutyryl (PDBu) erhalten.^[265] So führt die Inkubation von Rattenhepatocyten mit PDBu zur Freisetzung des Botenstoffs NO. Schließlich konnte mit PMA gezeigt werden, daß eine PMA-resistente Isoform der PKC an der durch den muscarinischen Agonisten Carbachol induzierten Sekretion exokriner Drüsen direkt beteiligt ist.^[266]

7.1.2. Teleocidine und Indolactam V

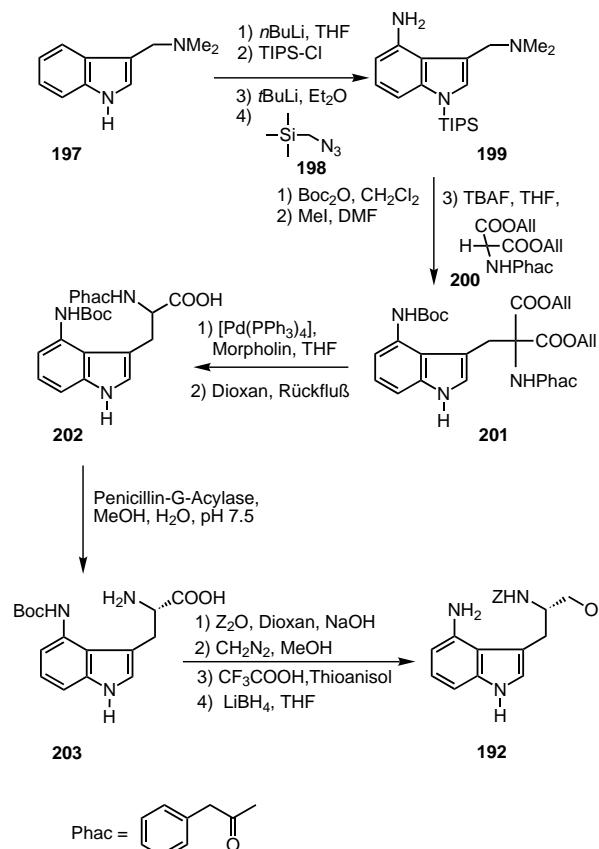
Teleocidine und Indolactame sind Indolalkaloide, die das Tumorwachstum fördern und wie Phorbolester die PKC aktivieren. Sie wurden daher für das Studium der biologischen Bedeutung dieses Enzyms verwendet. Bei der Totalsynthese dieser Naturstoffe,^[267–273] die alle das (–)-Indolactamgerüst aufweisen (Schema 61), ergaben sich als Hauptprobleme die regioselektive Substitution des Indolgerüstes an C4 und C7, der Ringschluß zum neungliedrigen Lactamring und die Kontrolle der Konfiguration an C9 und C12 (siehe z.B. **195** und **196**, Schema 61). Ausgehend vom L-Tryptophanmethylester wurde zunächst das Keton **191** über Schützen des Amins, Reduktion des Esters mit Lithiumborhydrid und anschließende Acetylierung des Alkohols sowie



Schema 61. Synthese von (–)-Indolactam V sowie Teleocidin B-1. (+)-CSA = (+)-Camphersulfonsäure, NMM = *N*-Methylmorpholin, Tf = Trifluormethansulfonyl.

eine DDQ-Oxidation hergestellt (Schema 61).^[270a] Dieses Keton konnte in der 4-Position des Indolgerüstes mit Thallium(II)-trifluoracetat metalliert und nach Behandlung mit Natriumazid/Kupfertriflat und anschließender Reduktion der Azido- und der Oxofunktion in das 4-Aminoderivat **192** überführt werden. Durch eine stereospezifische Reaktion von **192** mit dem aus D-Valin zugänglichen Triflat **193** wurde das noch fehlende Stereozentrum des Indolactams an C12 aufgebaut. Durch Hydrogenolyse wurde sowohl die Carboxy- als auch die Aminofunktion freigesetzt, so daß das Lactam mit 1-Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)phosphonium(BOP)-hexafluorophosphat gebildet werden konnte. Die fehlende *N*-Methylgruppe wurde durch reduktive Aminierung mit Formaldehyd in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid eingebracht.

Bei einer alternativen Synthese^[270b] wurde die Verwendung des Thalliumreagens durch selektive Lithiierung in der 4-Position des Triisopropylsilyl(TIPS)-geschützten Gramins **197** und Einführen der Aminofunktion mit Trimethylsilylmethylazid umgangen (Schema 62). Nach Schützen der primären Aminogruppe konnte die Seitenkette durch Quarternisierung des Amins und konjugierte Addition von Phenylacetylaminodiallylmalonat an das intermediär gebildete α,β -ungesättigte Imin aufgebaut werden. Spaltung des Allylesters und Decarboxylierung der Dicarbonsäure lieferten das

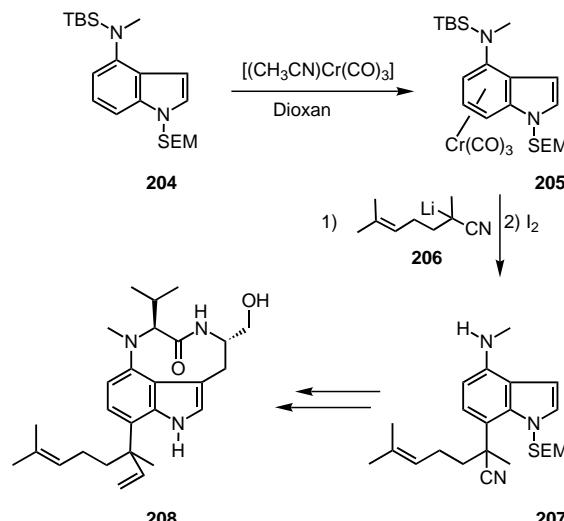


Schema 62. Synthese der Indolactam-V-Vorstufe **192** durch enzymatische Racematspaltung.

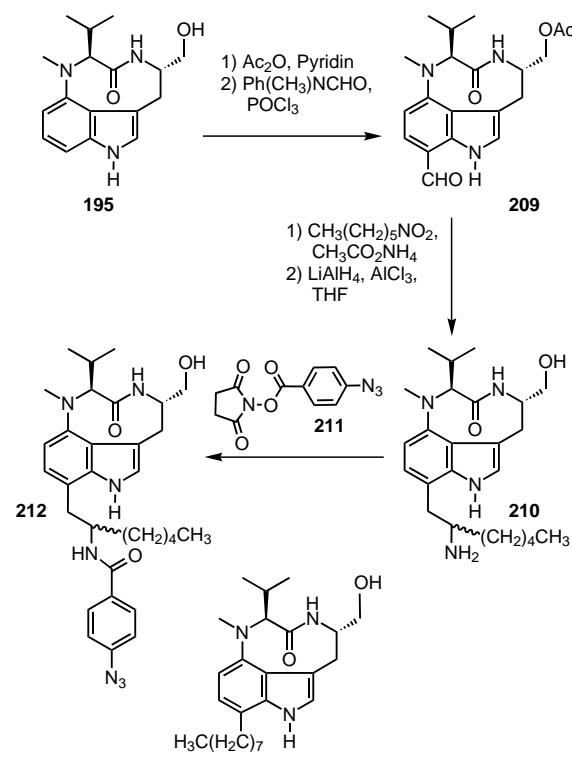
racemische Phenylacetyltryptophanderivat, dessen Enantiomere mit Penicillin-G-Acylase getrennt wurden. Die so erhaltene, an der C4-Position des Indolrings selektiv derivatisierte Aminosäure **203** konnte in den Alkohol **192** überführt werden, der eine schon zuvor beschriebene Vorstufe für das Indolactam V ist (siehe oben).

Die Teleocidine übertreffen wegen ihrer höheren Lipophilie Indolactam V in der PKC-aktivierenden Wirkung, so daß ihrer Synthese^[274, 275] und besonders der regioselektiven Substitution in 7-Position große Beachtung geschenkt wurde. Diese Derivatisierung gelingt beispielsweise durch nucleophile Addition an einen durch das Chromtricarbonylfragment aktivierten Indolring (Schema 63). Darüber hinaus kann die C7-Position des Indolactams V durch eine Vilsmeier-Formylierung funktionalisiert werden,^[276] um photolabile Derivate herzustellen. Dafür wurde das Indolactam V als Acetat geschützt und dann an C7 des Indolgerüsts formyliert (→**209**). Kondensation des Aldehyds mit Nitrohexan (hydrophobe Reste in der C7-Position der Teleocidine scheinen die Tumorpromotor-Wirkung dieser Substanzen zu erhöhen^[277]) und anschließende Reduktion lieferten das Amin **210**, welches mit ³H-markiertem Succinimido-4-azidobenzoat **211** kondensiert wurde (Schema 64). Mit diesen Verbindungen wurde in mehreren In-vitro-Assays versucht, die Bindungspartner und -stellen dieser Naturstoffanaloga durch Photoaffinitätsmarkierung zu identifizieren. Diese Versuche waren jedoch erfolglos.

Indolactam V kam z.B. bei mechanistischen Studien zur Regelung der Muskelkontraktion zum Einsatz, die durch



Schema 63. Synthese des Teleocidins **208**. SEM = Trimethylsilyloxy-methyl.



Schema 64. Synthese des photolabilen Teleocidins **212**; Verbindung **213** ist das biologisch aktive (–)-7-Octylindolactam.

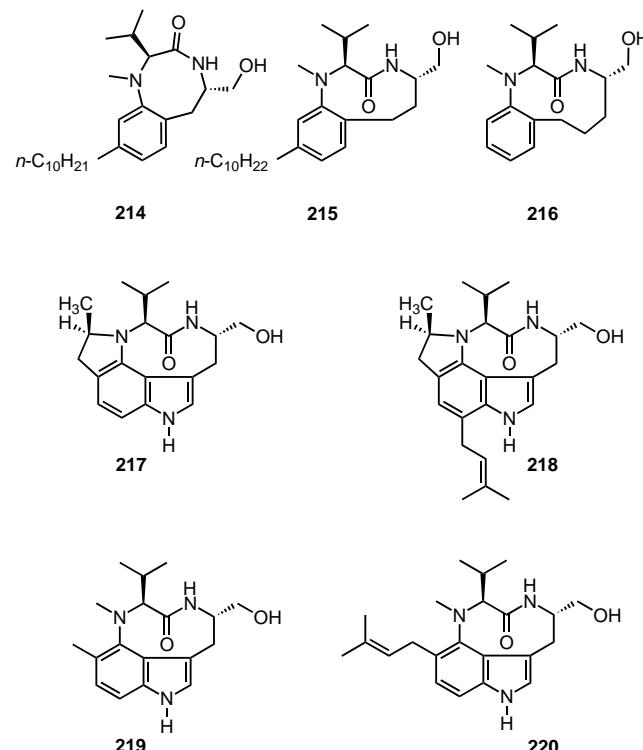
Calcium/Calmodulin-vermittelte Aktivierung der Myosinkinase ausgelöst wird.^[278, 279] Die direkte Aktivierung von PKC führt zur Kontraktion von Arteriolen, und auch Indolactam V erwies sich als potenter Stimulator der Konstriktion kleiner Arterien. Als Wirkmechanismus wurde vorgeschlagen, daß das Alkaloid den Einfluß von Ca^{2+} auf die kontraktiven Prozesse moduliert und zu einer erhöhten Phosphorylierung der Myosinkinase führt.^[280] Auch wurde Indolactam V genutzt, um einen schnellen und generellen Phänotyp-Assay der PKC-Aktivität zu entwickeln, mit dessen Hilfe PKC-aktivie-

rende oder -inhibierende Wirkstoffe aufgefunden werden können.^[281] Das (–)-7-Octylindolactam **213** wurde z.B. in Studien der Rezeptoren für den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) erfolgreich eingesetzt. GABA wird von zwei Rezeptorsubtypen erkannt (GABA_A und GABA_B), die dadurch desensibilisiert werden. Die Aktivierung der PKC führt ebenfalls zur Desensibilisierung von GABA_A, wobei mit (–)-7-Octylindolactam gezeigt wurde, daß der Rezeptor dabei phosphoryliert wird. Man nimmt an, daß die Aufgabe des PKC-Signalsystems darin besteht, Rezeptoren abzuschalten, die nicht vollständig von GABA desensibilisiert wurden. Schließlich kam (–)-7-Octylindolactam bei einer Studie zur Phosphoinosit-Umwandlung in Gliomazellen zum Einsatz. Die Umwandlung dieser Botenstoffe wird durch Bindung eines Agonisten an den ATP-Rezeptor ausgelöst, und man nahm an, daß PKC an der Steuerung dieses Prozesses durch negative Rückkopplung beteiligt ist. (–)-7-Octylindolactam und auch PMA bewirken also eine Desensibilisierung durch die Aktivierung der PKC.^[283]

7.1.3. Indolactamanaloga

Teleocidine und Indolactame können in Lösung zwei stabile Konformationen einnehmen, eine bei fünf- bis achtgliedrigen Ringen bevorzugte Twist-Konformation, in der ein *cis*-Amid vorliegt, und eine bei zehn und mehr Ringgliedern vorherrschende Sofa-Konformation mit *trans*-Amideinheiten. Um zu klären, welche dieser beiden Konformationen für die biologische Wirkung relevant ist, wurden unterschiedliche konformativ eingeschränkte Analoga entworfen, synthetisiert und auch hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität geprüft.^[273, 284–288] So wurden der Indol- gegen einen Benzolring ausgetauscht und Lactame mit unterschiedlichen Ringgrößen aufgebaut, die je nach Zahl der Ringglieder die Twist- (z.B. **214**) oder die Boot-Konformation (**215** und **216**) einnehmen sollten.^[284] Um die Verbindungen zusätzlich ausreichend hydrophob zu gestalten, wurde das Aren mit einer *n*-Decylkette versehen. Die Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde in Assays zur Wachstumshemmung und zur Zelladhäsion menschlicher promyelocytischer Leukämiezellen (HL-60) sowie zu deren Differenzierung zu Monocyten untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Twist-Konformation der Teleocidine die biologisch aktive ist. Auch konnte die optimale Länge der Alkylseitenkette zu 10–14 Kohlenstoffatomen ermittelt werden (Schema 65).^[285]

Durch Austausch des Indolgerüsts gegen einen Benzofuranring wurde gezeigt, daß das Indolstickstoffatom die Isoenzymselektivität beeinflußt und darüber hinaus nur eine unterstützende Rolle bei der Wechselwirkung mit der PKC spielt.^[287] Mit einer Aza-Claisen-Umlagerung als Schlüsselschritt gelang die Synthese der Analoga **217** und **218** mit Twist-Konformation. Die Untersuchung der biologischen Aktivität dieser und weiterer Derivate sowie der Analoga **219** und **220**, die die Sofa-Konformation imitieren, er gab ebenfalls, daß die Twist-Form die biologisch relevante ist.^[288]



Schema 65. Konformativ eingeschränkte Indolactamanaloga.

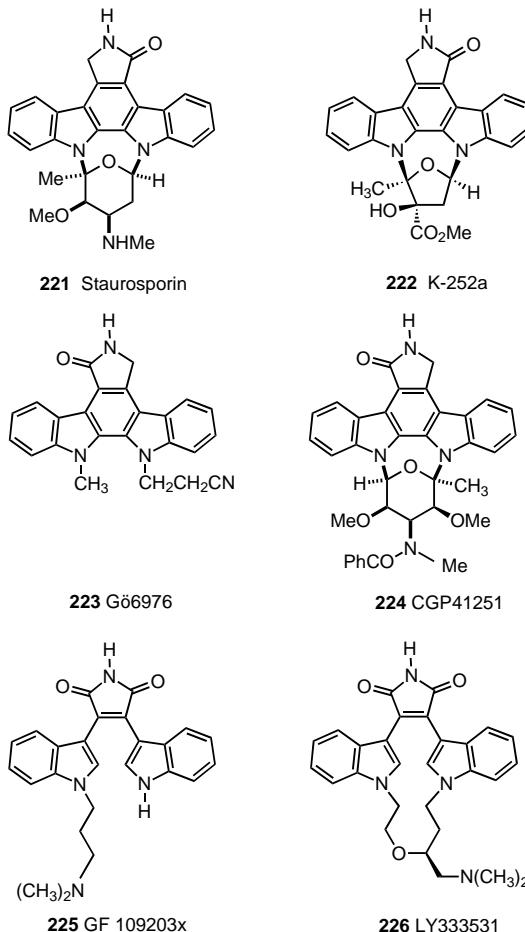
7.1.4. Weitere PKC-Aktivatoren

Diacylglycerin(DAG)-Analoga wurden eingehend als Aktivatoren der PKC untersucht. Dabei ergab sich, daß die Konfiguration des Glycerinderivates für die Bindung an das Enzym wichtig ist. *sn*-1,2-DAG-Analoga werden erkannt, *sn*-2,3- und *sn*-1,3-DAG-Derivate sind inaktiv. Für die Aktivierung wurden zwei Estercarbonylgruppen und ein Alkohol benötigt.^[289] Die Länge der Acylgruppe kann variieren, *sn*-1,2-Dibutyrylglycerin ist jedoch inaktiv, da es in Membranen aufgenommen wird und Micellen bildet. Cyclische Analoga sind allerdings nicht aktiv. Von den diversen untersuchten Analoga erwiesen sich besonders 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerin (OAG) und 1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycerin (DOG) als wertvolle Reagentien für biologische Studien.^[290] Die hohe Selektivität, mit der die PKC die DAG-Analoga erkennt, legt nahe, daß zumindest drei Wechselwirkungen mit dem Enzym wichtig sind, bei denen es sich wahrscheinlich um Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden Estercarbonylgruppen sowie zur OH-Funktion handelt.^[291] Weitere Aktivatoren der PKC, auf die hier aber nicht eingegangen wird, sind Mezerin,^[292] 6-(*N*-Decylamino)-4-hydroxymethylindol (DHI)^[293] und Ingenol.^[294, 295]

7.2. Inhibierung der PKC

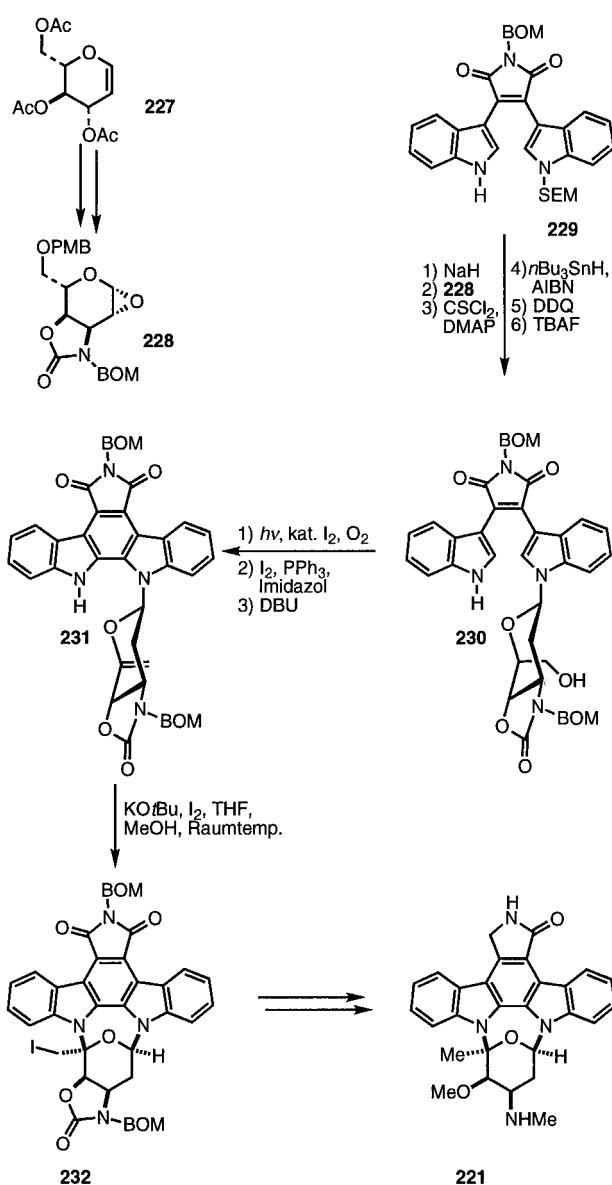
Da die PKC in vielfältige Prozesse entscheidend eingebunden ist, kommt dem Auffinden selektiver Inhibitoren für diese Kinase eine große Bedeutung zu. Von besonderem Interesse ist dabei die Entwicklung von Verbindungen, die die verschiedenen Isoenzyme selektiv inhibieren (siehe Ab-

schnitt 7). Staurosporin^[296] und K-252a^[297] sind mikrobielle Produkte aus der Indolocarbazolalkaloid-Familie (Schema 66), die potentielle Antitumorwirkung aufweisen. Stauro-



Schema 66. Strukturen von Staurosporin und K-252a sowie von Analoga dieser Naturstoffe.

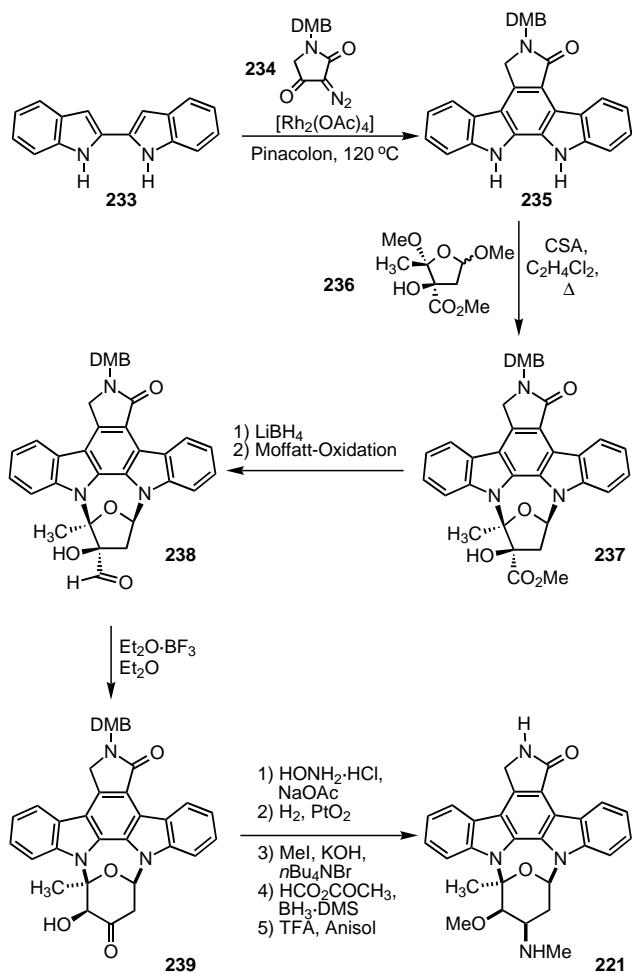
rosporin gehört zu den potentesten der bekannten Inhibitoren der PKC mit einer Wirksamkeit im nanomolaren Bereich^[298] und wechselwirkt mit der ATP-Bindungsstelle in der katalytischen Domäne.^[299, 300] Die Totalsynthese dieses Naturstoffs wurde beschrieben,^[301–304] wobei eine der großen Herausforderungen darin bestand, zwei glycosidische Bindungen zu den nur schwach nucleophilen Indolstickstoffatomen zu knüpfen. Das dafür eingesetzte Monosaccharid-Epoxid **228** wurde ausgehend von Tri-*O*-acetyl-L-glucal **227** aufgebaut (Schema 67).^[301, 302] Es erwies sich als geeigneter Glycosyldonor für die Verknüpfung mit der Aglycon-Vorstufe **229**, die in einer dreistufigen Sequenz aus N-BOM-maskiertem Dibrommaleimid zugänglich war. Der Heterocyclus wurde N-deprotoniert und anschließend mit dem in situ gebildeten Epoxid **228** gekuppelt. Nach Desoxygenierung an C2 des Glycosids unter Barton-Bedingungen und Entschützen der primären Hydroxygruppe der Kohlenhydrateinheit sowie des zweiten Indolstickstoffatoms erhielt man **230**. Eine Photocyclisierung, gefolgt von der Überführung des primären Alkohols in das entsprechende Iodid und der Eliminierung von Iodwasserstoff lieferte das *exo*-Glycal **231**. Den Schlüsselschritt der



Schema 67. Synthese von Staurosporin durch sukzessive Glycosylierung. AIBN = 2,2'-Azobisisobutyronitril, BOM = Benzyloxymethyl.

Synthese bildete die Aktivierung der Doppelbindung mit Iod unter Cyclisierung zu **232**. Nach Dehalogenieren, Öffnen des Oxazolidinons, Methylieren, Abspalten der BOM-Gruppe und Reduktion des Imids zum Amid wurden Staurosporin und dessen Enantiomer erhalten.

(+)-Staurosporin sowie die mit diesem Alkaloid eng verwandten Naturstoffe (+)-K-252a, (+)-RK-286c und (+)-MLR-52 konnten darüber hinaus ausgehend vom gemeinsamen Zwischenprodukt **239** aufgebaut werden (Schema 68).^[303, 304] Dazu wurde die Carbenvorstufe **234** zunächst mit dem 2,2'-Bisindol **233** in Gegenwart von Dirhodiumtetraacetat zum 3,4-Dimethoxybenzyl(DMB)-geschützten Aglycon **235** umgesetzt. Das Bisindol gab mit der Furanose (–)-**236** in Gegenwart von Camphersulfonsäure in einer Cycloglycosylierung **237**, das nach Reduktion der Estergruppe unter Bildung des Aldehyds beim Behandeln mit Bortrifluorid-Etherat eine Ringerweiterung zum Pyran **239** einging. Reduktive Aminierung des Ketons über das Oxim und



Schema 68. Synthese von Staurosporin durch Cycloglycosylierung und Umlagerung.

Alkylierung lieferten schließlich Staurosporin in insgesamt 19 Stufen.

Die Untersuchung von Staurosporin sowie dazu isomeren Verbindungen an zwei Zelllinien, an drei menschlichen PKC-Isoenzymen und an der Topoisomerase I ergab, daß die räumliche Anordnung der Lactam-C5-Carbonylgruppe und die der Pyranosyl-C4'-Methylaminofunktion für die biologische Aktivität wichtiger sind als die Anordnung der Pyranosyl-C3'-Methoxyfunktion und die der Pyranosyl-C2'-Methylgruppe.^[302]

Wegen der hoch konservierten Struktur der katalytischen Domänen verschiedener Proteinkinasen sind Staurosporin **221** und K-252a **222** allerdings keine selektiven Inhibitoren,^[305] so daß versucht wurde, durch Synthese weiterer Analoga selektivere Enzymhemmer zu finden. Repräsentativ sind die Analoga **223**–**225** (Schema 66). **223** gehört zu einer Klasse von Analoga, bei denen der Aminozucker durch verschiedene Alkylsubstituenten ersetzt wurde,^[306] und ist eine der aktivsten und selektivsten Verbindungen dieses Typs. Die zweite Klasse von Inhibitoren, für die **224** typisch ist, sind semisynthetische Derivate des Naturstoffs, wobei **224** PKC sehr viel wirksamer inhibierte als z. B. PKA und Tyrosinkinasen.^[307] Bei der dritten Klasse handelt es sich um Bisindolylmaleinsäureimide.^[308–311]

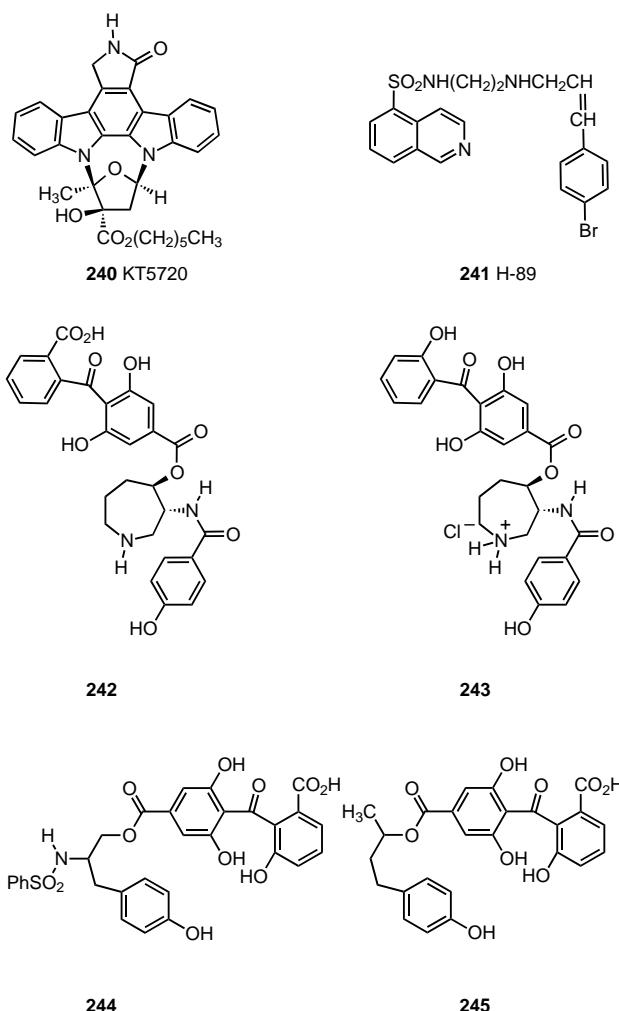
Ein erhöhter Diacylglycerinspiegel und dadurch verursacht eine dauerhafte Aktivierung der PKC in makrovaskulärem Gewebe ist für die Entwicklung chronischer vaskulärer Komplikationen bei Diabetes verantwortlich.^[312] In diesem Zusammenhang war besonders die Beobachtung relevant, daß in der Retina, im Herzen und in der Aorta das Isoenzym $\beta 2$ der PKC stark exprimiert wird. Um festzustellen, ob dieses Isoenzym für die Komplikationen verantwortlich ist, wurde nach Verbindungen gesucht, die spezifisch diesen Subtyp der PKC inhibieren.^[313] Dabei erwies sich das Staurosporinanalogen **226** als potenter, in einem Rattenmodell nichttoxischer und oral zu verabreichender Wirkstoff. Mit **226** konnten die vaskulären Fehlfunktionen korrigiert und somit belegt werden, daß das $\beta 2$ -Isoenzym der PKC die entsprechenden Komplikationen bei Diabetes verursacht.

7.3. Inhibierung der PKA

Proteinkinase A (PKA) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die nach Stimulierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch cAMP aktiviert wird und das eintreffende Signal durch Phosphorylierung weiterer Zielproteine ins Zellinnere weiterleitet (siehe Abschnitt 2.1). Da die PKA an einer Vielzahl wichtiger Prozesse beteiligt ist, besteht großes Interesse an der Entwicklung selektiver Inhibitoren für dieses Enzym. Die PKA besteht aus einem heterotetrameren Komplex aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten. Bei der Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten ändert sich die Konformation des Enzyms und führt zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, die daraufhin die Zielproteine phosphorylieren.

Einige Oligopeptide wie AlaKemptid (Kemptid = H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-OH) und AsnAlaKemptid erkennen und binden an die katalytische Untereinheit der PKA und inhibieren die enzymatische Aktivität, indem sie den Einfluß der regulatorischen Domäne imitieren. Das Interesse konzentrierte sich jedoch auf nichtpeptidische Naturstoffe und deren Derivate und führte mit dem Auffinden von KT5720 **240**, dessen Struktur der von Staurosporin ähnelt, und dem Isochinolinsulfonamid-Derivat H-89 **241** zu zwei der selektivsten nichtpeptidischen Inhibitoren (Schema 69).

Auch der Pilzmetabolit Balanol **253**^[314–316] ist ein PKA-Inhibitor ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$), der allerdings auch die PKC mit gleicher Effizienz hemmt. Um Analoga mit höherer Selektivität entwickeln zu können, wurden mehrere Totalsynthesen des Naturstoffs durchgeführt.^[317–321] Dabei konnten in einer konvergenten Strategie zwei ähnlich komplexe Teilstrukturen der Verbindung (**250** und **251**) aneinander gekuppelt und der Naturstoff durch einfaches Entfernen der Benzylschutzgruppen erhalten werden (Schema 70). Ausgehend von D-Serin wurde das Hexahydroazepin **251** in 15 Stufen in 36% Gesamtausbeute hergestellt. Für die Synthese des Benzophenons **250** wurde zunächst der bromierte Benzylalkohol **246** in einer Mitsunobu-Reaktion mit der aromatischen Carbonsäure **247** zum Ester **248** verknüpft. Durch Metallierung mit *n*-Butyllithium wurde **248** in das Benzophenon **249** überführt, von dem ausgehend das Zwischenprodukt **250** durch Stan-



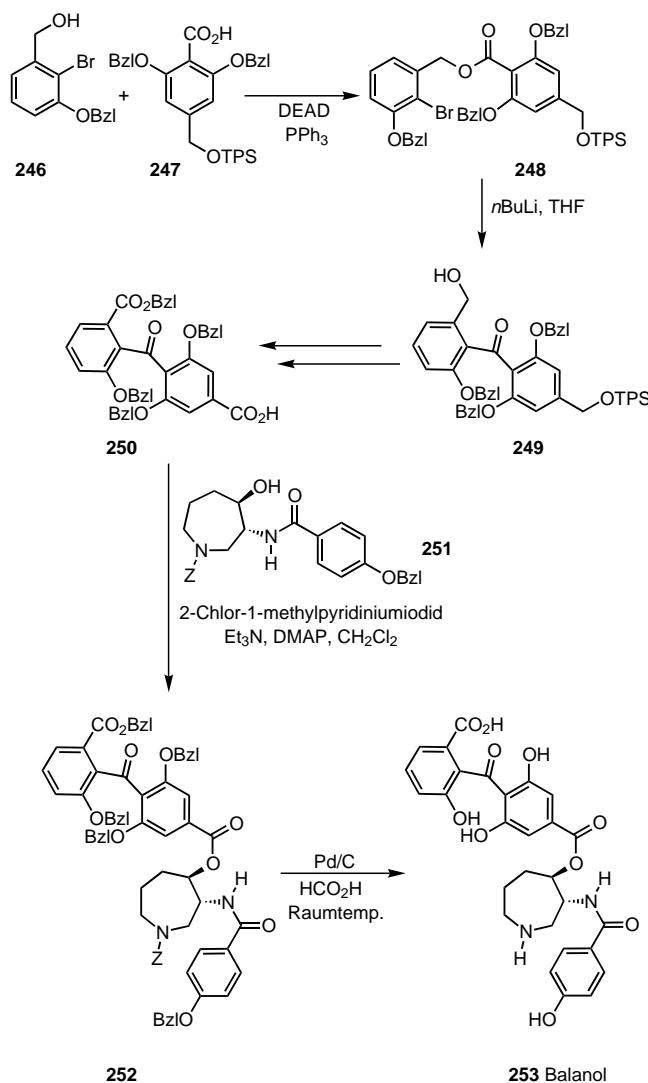
Schema 69. Inhibitoren der Proteinkinase A.

dardtransformationen zugänglich war. Veresterung von **250** und **251** und nachfolgendes Deblockieren liefert Balanol **253**.

Um herauszufinden, welche Struktureigenschaften des Naturstoffs für die Hemmung der Kinasen verantwortlich sind, wurden nach der oben beschriebenen Vorgehensweise weitere Balanolanaloga synthetisiert.^[318] Zwei der hergestellten Verbindungen, 10''-Desoxybalanol **242** und 14''-Decarboxybalanolhydrochlorid **243**, inhibierten die PKA effektiver als die PKC und waren potenter Enzymhemmer als KT5720 **240** und H-89 **241**.^[322] Auch Balanolanaloga, in denen der Perhydroazepinring und das *p*-Hydroxybenzamid durch eine acyclische Einheit ersetzt sind, wie **244** und **245** (Schema 69), sind wirksame Inhibitoren. Dabei ergab sich, daß sie die PKC deutlich effektiver hemmten als die PKA und andere Ser/Thr-Kinasen.^[323]

8. Inositphosphat-Analoga

Inositderivate spielen bei der Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine entscheidende Rollen (siehe Abschnitt 2.1). Darüber hinaus sind sie aber auch an weiteren Signalkaskaden beteiligt. So kann die Aktivierung von



Schema 70. Konvergente Totalsynthese von Balanol. TPS = Triphenylsilyl.

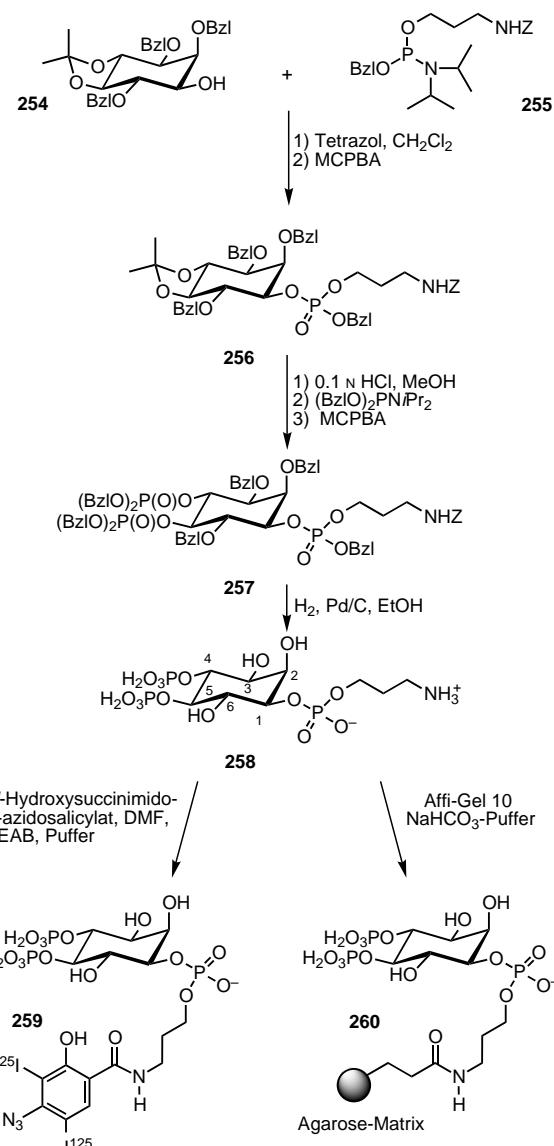
Rezeptor-Tyrosinkinasen zur Stimulierung der Phosphoinosit-3-Kinase (PI-3-Kinase)^[324] führen, die zunächst Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat bildet.^[325] Dieses wird dann in das entsprechende 3,4-Bisphosphat überführt, das wiederum als Membrananker dient, der z. B. von der Proteinkinase B (PKB, *Akt*) über Pleckstrin-Homologie(PH)-Domänen erkannt wird und so eine Membranlokalisierung dieses Proteins bewirkt. Die PKB wird nachfolgend durch Phosphorylierung aktiviert und schaltet eine weitere Kaskade an.^[326] Wegen dieser großen biologischen Relevanz von Inositphosphat-Derivaten und der sich damit eröffnenden Möglichkeit, physiologische Vorgänge wie die Insulinsekretion^[327, 328] gezielt zu beeinflussen, wurde eine Vielzahl von Analoga synthetisiert und als Werkzeuge in biologischen Studien sowie als Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Pharmaka herangezogen. Die Chemie der Inositphosphate ist infolgedessen hochentwickelt und wurde mehrfach ausführlich in Übersichtsartikeln vorgestellt.^[18, 19] Hier wird daher nur auf einige neuere Entwicklungen und Anwendungen in biologischen Studien eingegangen.

8.1. Inositphosphat-Derivate

Im Brennpunkt des Interesses der Inositphosphat-Chemie standen besonders das 1,4,5-Trisphosphat und die Untersuchungen der Strukturgrundlagen für die Erkennung dieses Mediators durch die 1,4,5-IP₃-3-Kinase, die 1,4,5-IP₃-5-Phosphatase und durch dessen Rezeptor, die zur Mobilisierung intrazellulär gespeicherten Calciums führt. Durch die Synthese einer Vielzahl von Derivaten konnten die molekularen Ursachen dieser Wechselwirkungen im Detail untersucht werden. Demnach scheint das 4,5-Bisphosphatmotiv für die Erkennung durch den Rezeptor essentiell zu sein, und eine weitere Phosphatgruppe an der C1-Position führt zu einer verstärkten Ca²⁺-Ausschüttung. Sterisch anspruchsvolle Substituenten an der C1-Phosphat- und an der C2-Hydroxygruppe werden jedoch ebenfalls toleriert. Für die Phosphorylierung von 1,4,5-IP₃ durch die 1,4,5-IP₃-3-Kinase scheint die Phosphatgruppe an C4 von besonderer Bedeutung zu sein. Modifizierungen der C5-Phosphatgruppe werden von der Kinase toleriert, wohingegen die C1-Phosphatgruppe zwar ebenfalls wichtig, aber nicht essentiell ist. Für die Dephosphorylierung von 1,4,5-IP₃ durch die 1,4,5-IP₃-5-Phosphatase ist vermutlich die C1-Phosphatgruppe besonders wichtig.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnten zum weiteren Studium des 1,4,5-IP₃-Rezeptors geeignete Derivate für Photoaffinitätsmarkierungen (259) und für die Herstellung einer Affinitätsmatrix (260) aufgebaut werden (Schema 71).^[329] Dazu wurde das partiell geschützte Inosit 254 in das Phosphat 256 überführt, welches selektiv deblockiert und zum 1,4,5-Trisphosphat 257 phosphoryliert wurde. Die abschließende Entfernung aller Benzylschutzgruppen lieferte das Inosit 258, von dem ausgehend das photoaktivierbare und radioaktiv markierte 4-Azidosalicylamid 259 und die Affinitätsmatrix 260 auf Agarosebasis synthetisiert wurden. Die Trisphosphate 258 und 259 verdrängten in einem In-vitro-Testsystem [³H]myo-1,4,5-IP₃ von gereinigten Rezeptoren aus Rattenhirn^[330] und konnten Calciumionen aus Rezeptoren freisetzen, die in Ca²⁺-beladenen Liposomen rekonstituiert worden waren.^[331] Beide Verbindungen waren weder Substrate noch Inhibitoren für die 1,4,5-IP₃-5-Phosphatase und die 1,4,5-IP₃-3-Kinase. Mit dem immobilisierten Derivat 260 gelang schließlich die Isolierung und Reinigung von Rezeptoren mit guten Aktivitäten.

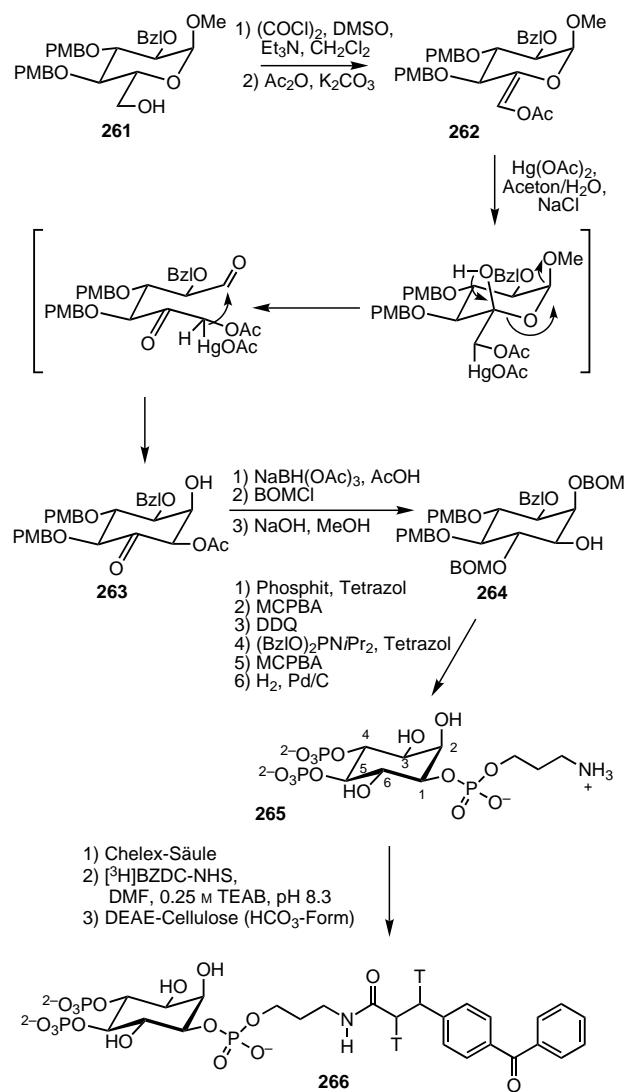
Für den Aufbau enantiomerenreiner IP_n-Derivate und deren Funktionalisierung zu Affinitätsmatrices und photolabilen Analoga wurde eine verbesserte generelle Methode entwickelt.^[332] Ausgehend von D-Glucose wurde dabei das unterschiedlich geschützte und an der primären OH-Gruppe gezielt deblockierte Glycosid 261 aufgebaut, zum Aldehyd oxidiert und dieser in das Enolacetat 262 überführt (Schema 72). Mit Quecksilber(II)-acetat in wässriger Lösung reagierte 262 unter Ringöffnung und erweiterndem Ringschluß zur Ionose 263, die stereoselektiv reduziert und dann an 2-OH und 6-OH als Benzylxymethyl(BOM)-Ether maskiert wurde. Die selektive Abspaltung der Acetylgruppe ermöglichte die Einführung einer Aminoalkyl-modifizierten Phosphatgruppe, und nach gezieltem Entfernen der PMB-Gruppen, Phosphorylierung und Freisetzen der restlichen Hydroxyfunktionen wurde 265 erhalten. An die Aminopropylgruppe



Schema 71. Synthese von Inosittrisphosphaten für Photoaffinitätsmarkierungen und für die Herstellung einer Affinitätsmatrix. MCPBA = *meta*-Chlorperbenzoësäure, TEAB = Tetraethylammoniumbromid.

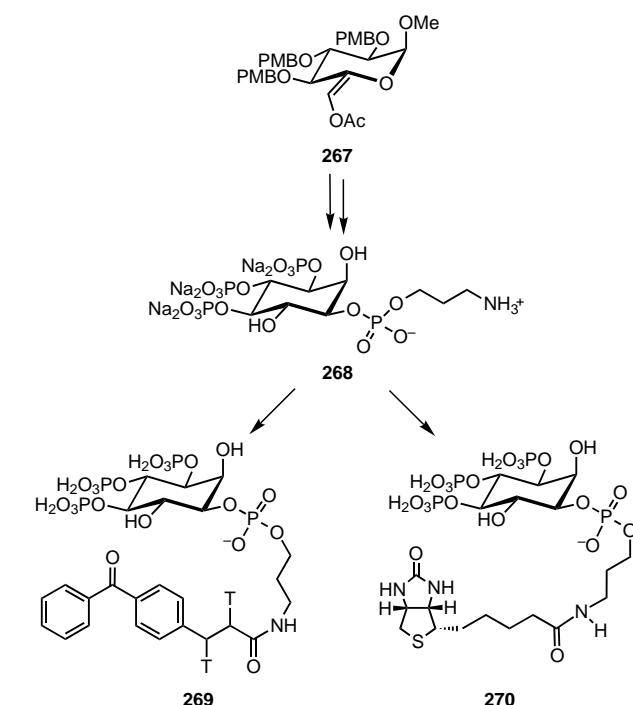
wurde schließlich eine photoaktivierbare und radioaktiv markierte Seitenkette angeknüpft (→266). Das Amid 266 wurde z.B. für die Markierung der Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat(PIP₂)-bindenden Pleckstrin-Homologie-Domäne der Phospholipase-C_{δ1} eingesetzt.^[333, 334] Durch Variieren des Schutzgruppenmusters konnten analog 1,3,4,5-IP₄-Tetrakisphosphate wie 269 und 270 aufgebaut werden (Schema 73). Auch IP₄-Derivate wurden zur Herstellung von Affinitätsmatrices und Photoaffinitätsmarkern herangezogen. So gelang mit der IP₄-Affinitätschromatographie die Reinigung verschiedener Rezeptoren des Tetrakisphosphats. Darüber hinaus konnte auch ein IP₆-Rezeptor isoliert und markiert werden.^[335–337]

Auch 2-Acylderivate wurden als Photoaffinitätsmarker und für die Affinitätschromatographie synthetisiert und verwendet (Schema 74).^[338] Die Synthese ging vom 4,5-Bisphosphat 271 aus, welches in fünf Stufen aus D-myoinositol zugänglich

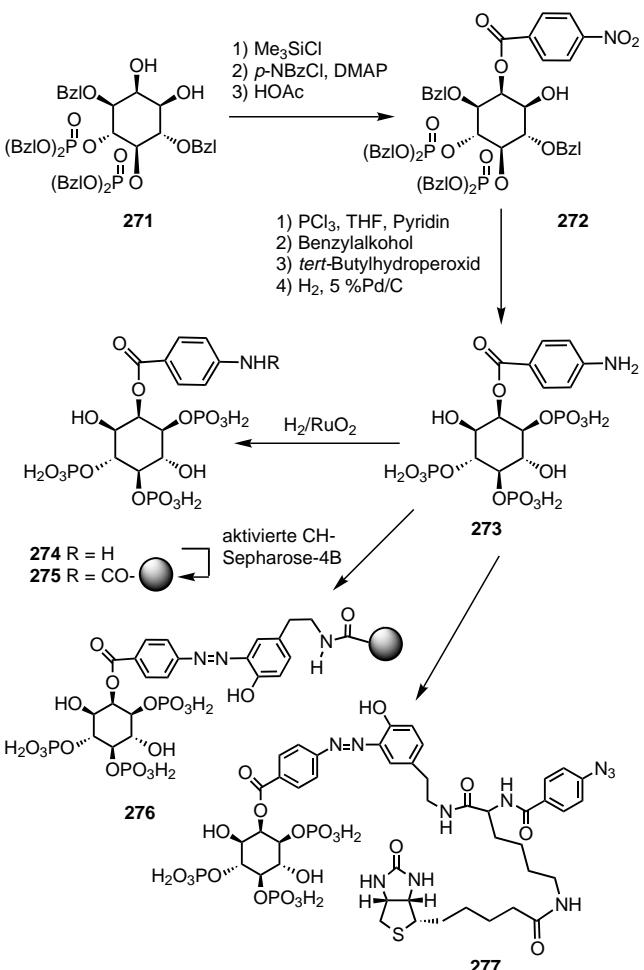


Schema 72. Synthese eines Inositophosphat-Analogons für biologische Studien. BZDC-NHS = 4-Benzylhydroximtsäure-*N*-hydroxysuccinimid (Struktur siehe Schema 79), DEAE = Diethylaminoethyl, T = 3 H.

war. Schutzgruppenmanipulationen lieferten das Monohydroxyderivat **272**, das nach Phosphorylierung, Oxidation und Hydrogenolyse das Trisphosphat **273** gab. Die Reduktion des aromatischen Rings lieferte das Cyclohexancarbonsäure-Derivat **274**. Sowohl **273** als auch **274** wurden hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit der 1,4,5-IP₃-5-Phosphatase und der 1,4,5-IP₃-3-Kinase, ihres Austausches mit D-[³H]1,4,5-IP₃ sowie der Fähigkeit, Calciumionen zu mobilisieren, untersucht. Dabei ergab sich, daß beide Analoga Substrate der Phosphatase waren und aus Saponin-permeabilisierten^[339, 340] Makrophagen Calciumionen freisetzen konnten; allerdings war nur das D-Isomer von **274** ein Substrat der Kinase. Ebenso wurde eine Verdrängung von D-[³H]1,4,5-IP₃ aus seiner Bindungsstelle in mikrosomalen Fraktionen von Rattenhirnen beobachtet. Dementsprechend ist die 2-Hydroxyfunktion von D-1,4,5-IP₃ wahrscheinlich nicht an der Erkennung durch den Rezeptor beteiligt. Ausgehend von **273** und **274** wurden Affinitätsmatrices wie **275** und **276** (Schema 74) für die Isolierung der entsprechenden zellulären Bindungspartner



Schema 73. Synthese der Inosittetrakisphosphate **269** und **270**.

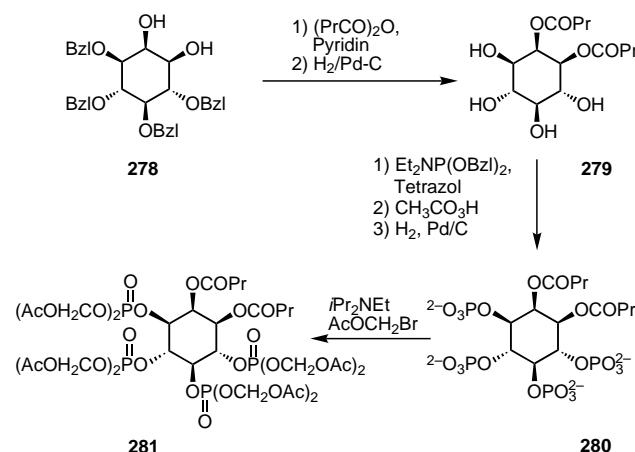


Schema 74. Synthese der Affinitätsmatrices **275** und **276** sowie des biotinylierten Derivates **277**. p-NBzCl = *para*-Nitrobenzoylchlorid.

von 1,4,5-IP₃ hergestellt. Dazu wurde **274** an eine aktivierte CH-Sepharose-4B gekuppelt (→**275**). Das Amin **273** eröffnete nach Bildung des Diazoniumsalzes einen Zugang zur Matrix **276**. In ähnlicher Weise wurde das biotinylierte Analogon **277** aufgebaut, das mit dem Biotin/Avidin-System auch ohne radioaktive Markierung detektierbar war. Über die wiederum aktivierte Aminofunktion gelang die Markierung einer 1,4,5-IP₃-5-Phosphatase aus Erythrocyten-Ghosts.^[341]

Die markierten Analoga **266** und **269** kamen bei der Isolierung der zellulären Bindungspartner der entsprechenden Stammverbindungen und der Markierung der genauen Sequenzen der Bindungsdomänen dieser Proteine zum Einsatz. Beispielsweise wurden mit [³H]BZDC-1,4,5-IP₃ **266** die Bindungsdomänen des IP₃-Rezeptors und der PIP₂-bindenden Proteine untersucht.^[333] Neben der bekannten wichtigen Rolle des 4,5-Bisphosphats für die Rezeptorerkennung konnte für PLC-Isoenzyme gezeigt werden, daß hydrophobe Wechselwirkungen für die Bindung durch die PH-Domäne wichtig sind. Weiterhin konnten aus Rattenhirnen vier IP₄-bindende Proteine isoliert werden, von denen eines durch [³H]BZDC-1,3,4,5-IP₄ **269** effizient markiert wurde. Dieses Protein, Centaurin, weist neben der IP₄-Bindungsdomäne einen PKC-Zinkfinger und noch weitere Domänen auf; darüber hinaus scheint es das erste Protein zu sein, welches PIP₃ effektiver bindet als IP₄.^[342]

Deblockierte Inositphosphate können wegen ihrer hohen Polarität Membranen nicht oder nur schwer durchdringen, wodurch ihre Anwendbarkeit in biologischen Studien oft eingeschränkt wird. Dieses Problem konnte mit geschützten Vorstufen wie **281** (Schema 75) elegant gelöst werden.^[343] In **281** liegen vier Phosphatgruppen als Acetoxymethylester geschützt vor, und die OH-Gruppen der Inosite sind als



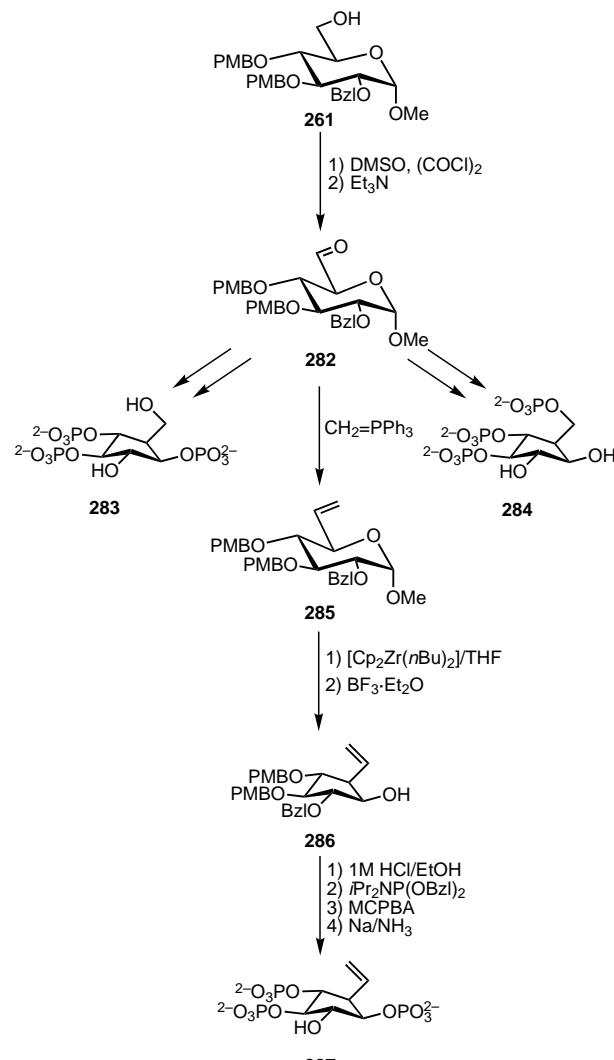
Schema 75. Synthese eines membrangängigen Inosittetrakisphosphat-Analogons.

Butylester maskiert. Diese lipophile Prodrug-Form des Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphats vermag Membranen gut zu durchdringen und wird intrazellulär durch Esterasen und Lipasen rasch zu 3,4,5,6-IP₄ deblockiert. Durch Verwendung dieses Reagens konnte z. B. die Rolle von 3,4,5,6-IP₄ bei der Regulation der Chloridsekretion studiert werden.^[343] So kontrollieren Chloridkanäle, die von cyclischen Nucleotiden und

über die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration geregelt werden, die Salz- und Flüssigkeitssekretion in intestinalen Epithelzellen, und auch die Osmoregulierung, die pH-Balance und die Neurotransmission hängen von der Regelung der Chloridionenkonzentration ab. Mit **281** wurde gezeigt, daß der durch erhöhte Ca²⁺-Konzentration (ausgelöst z. B. durch Histamin) verstärkte Chloridionenstrom von 3,4,5,6-IP₄ inhibiert wird und daß die Chloridsekretion bei erhöhter 3,4,5,6-IP₄-Konzentration von der Ca²⁺-Konzentration unabhängig ist.

8.2. Neue Inositphosphat-Analoga

Als neue Inositphosphat-Analoga mit modifiziertem Ring, welche statt des Cyclohexangerüsts einen fünfgliedrigen Ring aufweisen, wurden die 1,4,5-IP₃-Derivate **287**, **283** und **284** entwickelt (Schema 76).^[344] In **287** sind die Konfigurationen an den Positionen 1, 4, 5 und 6 unverändert, während ein C-Atom (C2) im kontrahierten Ring fehlt. Mehrere Studien haben gezeigt, daß diese Position für die Erkennung durch den 1,4,5-IP₃-Rezeptor nicht benötigt wird. Zur Synthese des Analogons **287** wurde das gezielt deblockierte Glucosederivat



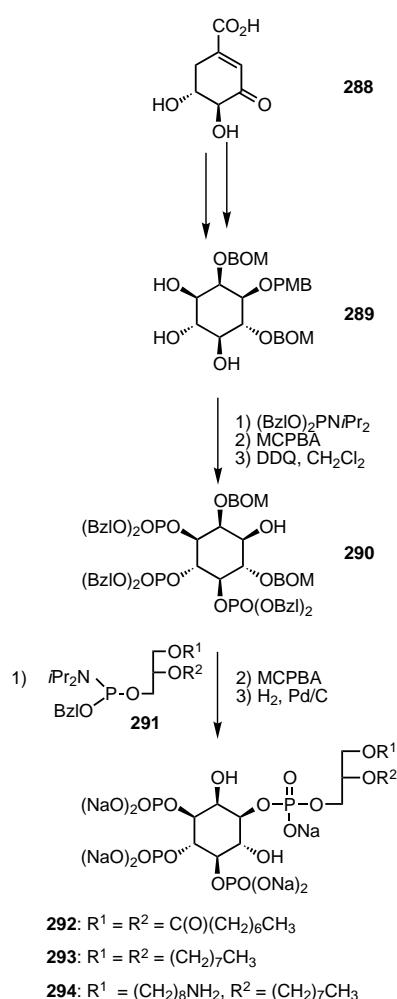
Schema 76. Synthese ringmodifizierter Inositphosphat-Analoga.

261 aufgebaut und durch Swern-Oxidation und anschließende Wittig-Methylenierung zum Vinyl-Kohlenhydrat **285** umgesetzt. Bei der Umsetzung mit $[\text{Cp}_2\text{Zr}(n\text{Bu})_2]$ und dann mit Bortrifluorid-Etherat ging **285** eine Ringkontraktion zum Vinylcyclopentan **286** ein. Standardmanipulationen lieferten das 1,4,5-IP₃-Analogon **287**. Mit **287** konnten aus Blutplättchen-1,4,5-IP₃-Rezeptoren Calciumionen mobilisiert werden, wenn auch bei höheren Konzentrationen als bei 1,4,5-IP₃.

Ausgehend vom Zwischenprodukt **282** gelang die Synthese der Analoga **283** und **284** durch Samarium(II)-iodid vermittelte Ringkontraktion. **283** ist bezüglich der Ca²⁺-Mobilisierung dem Vinylderivat **287** überlegen, während **284** kaum Ca²⁺ mobilisierte. Diese Befunde verdeutlichen, daß ein sechsgliedriger Ring für die Entwicklung von 1,4,5-IP₃-Agonisten nicht notwendig ist, und eröffnen somit neue Perspektiven für die Erforschung und die Blockierung der Inositphosphat-Signalpfade.

8.3. Analoga von Phosphatidylinositophosphaten

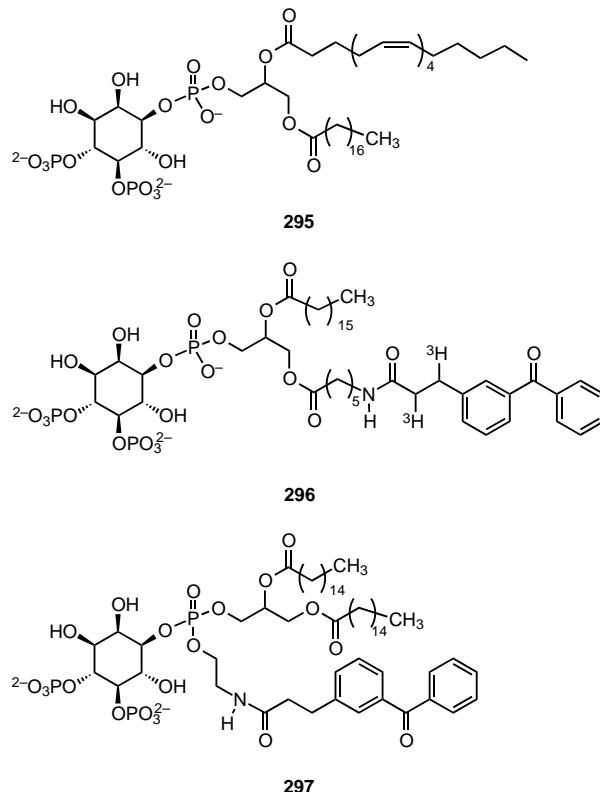
Enantiomerenreine Diester- und Diether-Analoga von PIP₂ und PIP₃ können ausgehend von Verbindungen aus dem Chiral Pool, z.B. Dehydroshikimisäure **288**, synthetisiert werden (Schema 77). So wurde zur Herstellung von **292–294** der



Schema 77. Synthese von Phosphatidylinositophosphaten ausgehend von Dehydroshikimisäure.

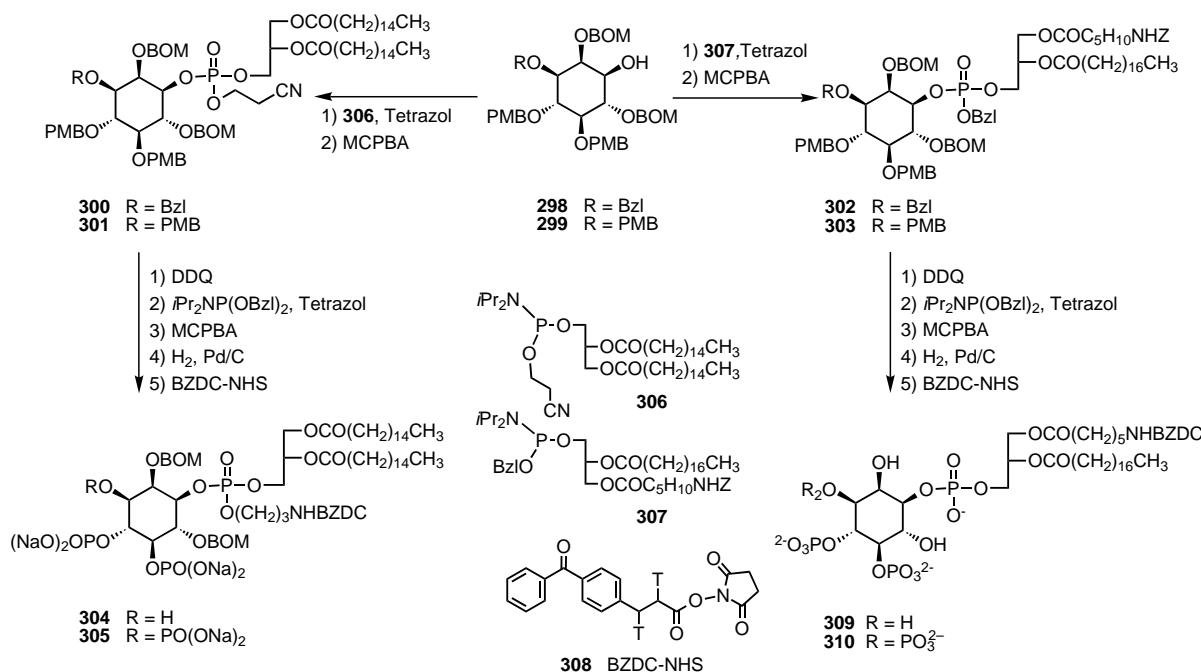
Naturstoff zunächst in das Triol **289** überführt, das nach Phosphorylierung und Entfernen der PMB-Gruppe das Trisphosphat **290** gab. Kondensation mit den Phosphoramiditen **291**, Oxidation durch Persäure und Entschützen liefern die PIP₃-Analoga **292–294**.^[345] Die wasserlöslichen Derivate **292** und **293** stimulierten *in vitro* die Ca²⁺-unabhängigen PKC δ -, PKC ϵ - und PKC η -Isoenzyme,^[345, 346] während **294** für die Kupplung an Antigene und für die Herstellung von Affinitätsmatrices geeignet ist.

Basierend auf der Struktur von PIP₃ **295** und den oben beschriebenen IP₃-Analoga wurden auch Derivate von PIP₃ synthetisiert, die Reportergruppen im Glycerin- (**296**) oder im Phosphotriester-Teil (**297**) des Moleküls trugen (Schema 78). Ihre Synthese gelang ausgehend von den



Schema 78. Strukturen von Phosphatidylinositophosphat **295** und markierten Analoga.

Inositderivaten **298** und **299** unter Verwendung der Phosphoramidite **306** und **307** (Schema 79). Dabei liegen im Endprodukt die vorher als PMB-Ether geschützten Hydroxyfunktionen phosphoryliert und die als Benzyl- oder Benzyl-oxymethylether geschützten Alkohole dagegen frei vor. Für die Einführung von Reportergruppen in die Glycerinseitenkette wurden die Fragmente **298** und **299** jeweils an **307** gekuppelt und weiter zu PIP₂- und PIP₃-Analoga elaboriert. Die am Phosphotriester modifizierten PIP₂- und PIP₃-Analoga **304** bzw. **305** waren entsprechend durch Reaktion des Phosphoramidits **306** mit den Inositderivaten **298** bzw. **299** und weitere Schritte zugänglich. Diese PIP₂-Analoga und verwandte Verbindungen wurden z.B. in Photolabeling-Experimenten und fluoreszenzspektrometrischen Tests ein-



Schema 79. Synthese markierter Phosphatidylinositolphosphate.

gesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß das myristoylierte alaninreiche C-Kinase-Substrat (MARCKS) über elektrostatische Wechselwirkungen eine Abkapselung von PIP₂ und Phosphatidylserin in laterale Domänen der Zellmembran bewirkt und so die Hydrolyse von PIP₂ reversibel inhibiert.^[349]

9. Inhibition von Proteinphosphatasen

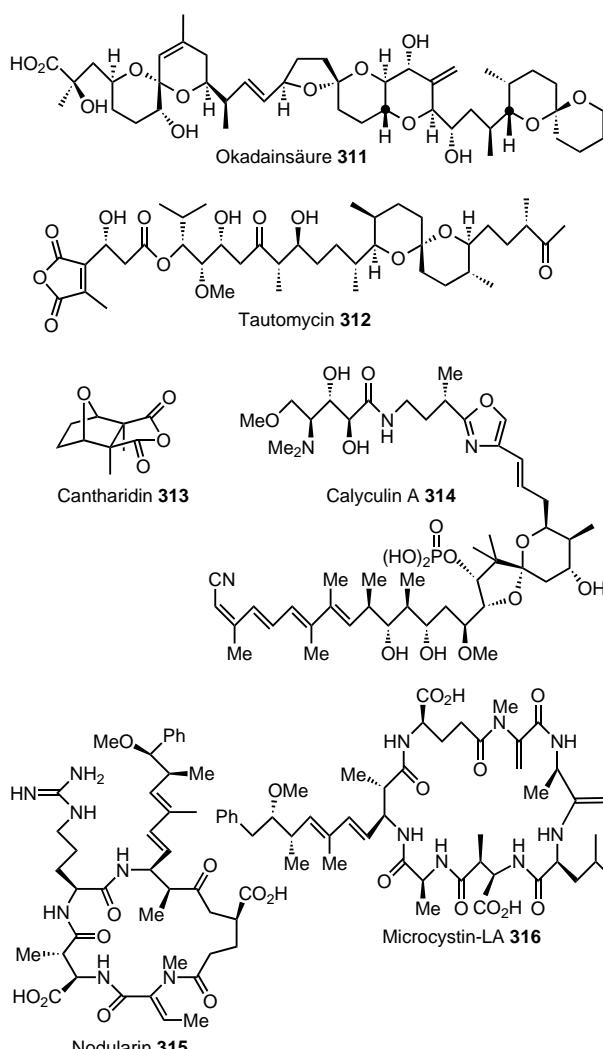
Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist eine kritische Komponente von Signaltransduktionsmechanismen, mit denen Zelldifferenzierung und -wachstum reguliert werden (siehe Abschnitte 3, 6 und 7). Die Lage dieses modulierbaren Gleichgewichts wird von der Aktivität und der Konzentration der Proteinkinasen und -phosphatasen bestimmt,^[350] die sich je nach zellulärem Kontext in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken^[351] oder abschwächen können. Eine Störung dieser Balance kann zu Krankheiten und zur Transformation der Zelle führen. Nachdem in den Abschnitten 3 und 7 auf Tyrosin- und Serin/Threonin-spezifische Kinasen eingegangen wurde, sollen im folgenden ihre zellulären Gegenspieler behandelt werden.

Eukaryontische Proteinphosphatasen^[350] sind strukturell und funktionell vielseitige Enzyme, die in mehrere Familien eingeteilt werden. Die Ser/Thr-spezifischen Phosphatasen unterscheiden sich dabei in ihrer katalytischen Domäne deutlich von den „Dual-Specificity“-Phosphatasen und den Tyrosin-spezifischen Phosphatasen, die beide eine hohe Sequenzhomologie zueinander aufweisen. Die Struktur mehrerer Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen wurde durch Kristallstrukturanalyse ermittelt. Auch sind die Mechanismen der Katalyse bekannt.^[352] Die Bedeutung dieser Enzyme für die Zellphysiologie wird durch die Tatsache betont, daß sie häufig das Ziel mikrobieller oder viral Angriffe sind.

Beispielsweise kodiert der λ -Bakteriophage für eine Ser/Thr-Phosphatase, das Virulenzplasmid von *Yersinia* für eine Tyr-Phosphatase und das *Vaccinia*-Virus für eine Phosphatase, welche sowohl an Ser/Thr- als auch an Tyr-Resten dephosphoryliert.^[350b] Inhibitoren dieser Biokatalysatoren sind wichtige Werkzeuge für In-vivo-Untersuchungen und haben zur Entdeckung einer Reihe von physiologischen Funktionen der Dephosphorylierung von Proteinen geführt. Dabei kommen vor allem Naturstoffe wie Okadainsäure **311**,^[353] Tautomycin **312**,^[354] Cantharidin **313**,^[356] und Calyculin A **314**,^[355] sowie Nodularine wie **315**,^[357] und Microcystine wie **316**,^[358] (Schema 80) zum Einsatz. Die besondere Rolle der Phosphatasehemmer FK 506 und Cyclosporin A wird in Abschnitt 10 beschrieben.

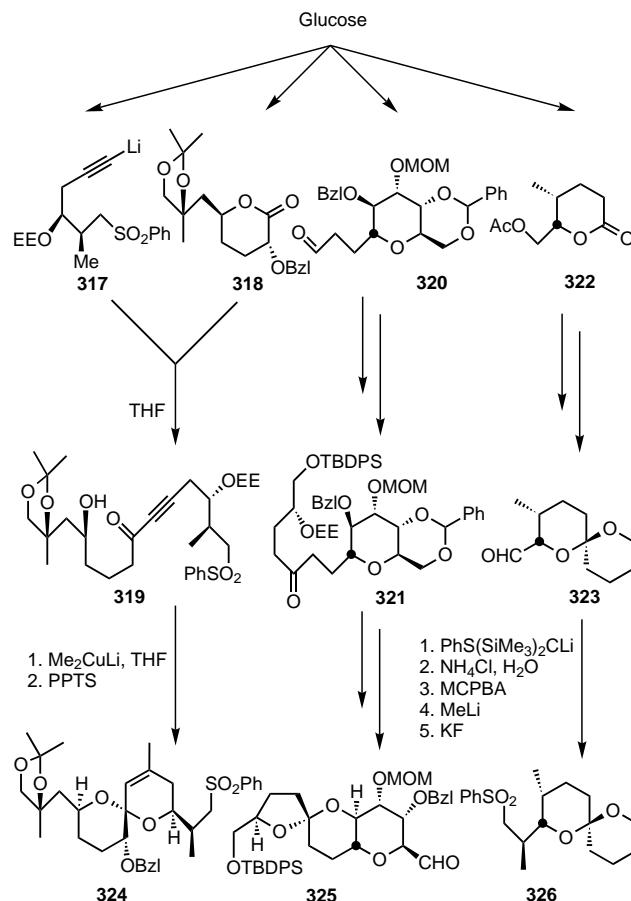
9.1. Okadainsäure

Okadainsäure ist ein Polyetherderivat einer C₃₈-Fettsäure, das aus zwei verschiedenen marinen Schwämmen isoliert wurde.^[353] Neben seiner Wirkung als diarrhöisches Schellfisch-Toxin wurde es als Tumorpromotor^[359] und als spezifischer Ser/Thr-Phosphataseinhibitor^[360] beschrieben. Das Wachstum von Tumoren wird dabei anders als bei den PKC-aktivierenden Phorbolestern (siehe Abschnitt 7) durch die Inhibition der Dephosphorylierung von Zielproteinen der PKC gefördert. Wegen seiner vielfältigen biologischen Wirkungen und der interessanten Polyetherstruktur mit 17 Stereozentren ist der Naturstoff ein reizvolles Synthesenziele. Die größte Herausforderung ist hierbei der korrekte Aufbau der Stereozentren. Das komplexe Molekül konnte retrosynthetisch auf die Fragmente **324**–**326** zurückgeführt werden (Schema 81),^[361] die jeweils ausgehend von Glucosederivaten aufgebaut wurden.

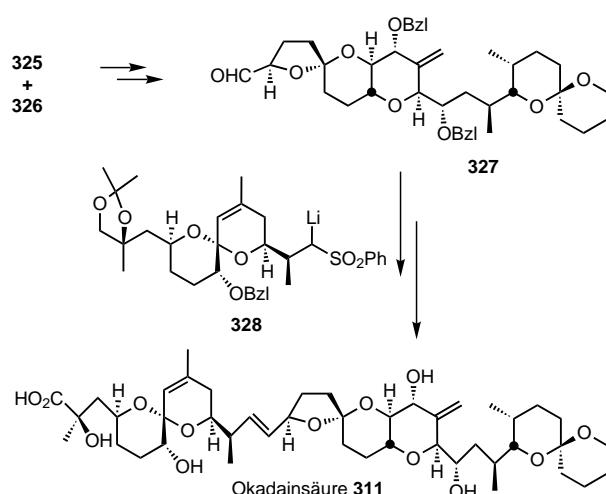


Schema 80. Natürlich vorkommende Phosphataseinhibitoren.

Der Schlüsselschritt der Synthese des Fragments **324**^[362] (Schema 81) war der nucleophile Angriff des Acetylids **317** auf das Lacton **318**, die beide aus Glucose hergestellt wurden. Das einzige noch fehlende Kohlenstoffatom wurde dann durch die stereoselektive konjugierte Addition eines Methylcuprates an das Inon **319** eingefügt, anschließend wurde der Ring säurevermittelt zum Spiroacetal geschlossen. Das Fragment **325** (Schema 81) wurde ebenfalls von Glucose ausgehend synthetisiert.^[363] Standardreaktionen lieferten den Aldehyd **320**, in dem die Benzylidengruppe die Konformation des Pyranoseringes fixierte. Die Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts gelang durch Addition eines lithiierten Sulfons unter Bildung des Ketons **321**. Gezielte Schutzgruppenmanipulationen führten zum Acetal und schließlich zum Fragment **325**. Auch die Herstellung des dritten Fragments (Schema 81) ging von einem enantiomerenreinen Glucosederivat aus.^[364] Nach Funktionalisierung des Pyranosegerüsts wurde mit einem lithiierten Sulfon das Lacton **322** geöffnet und das Produkt dann in den Aldehyd **323** überführt, der in einer Peterson-Olefinition zunächst zum Alken umgesetzt wurde. Die stereoselektive Einführung der fehlenden Methylgruppe gelang durch chelatkontrollierte heterokonjugierte Addition

Schema 81. Synthese der retrosynthetisch erhaltenen Fragmente von Okadainsäure. EE = Ethoxyethyl, PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat.

an das entstandene Vinylsulfon. Dieser Schlüsselschritt der Synthesesequenz wurde auch bei der Herstellung des Fragments **324** angewendet. Zur Komplettierung der Synthese des Naturstoffs (Schema 82)^[365] wurde das Phenylsulfon **326** depro-



Schema 82. Synthese von Okadainsäure.

toniert, mit dem Fragment **325** gekuppelt und die Phenylsulfongruppe nachfolgend entfernt. Nach Einstellen der korrekten Konfiguration des neu geschaffenen Alkohols durch

Oxidation und stereoselektive Reduktion wurde durch weitere Transformationen das Fragment **327** erhalten. Dieses wurde mit dem lithiiertem Sulfon **328** zum benötigten Olefin gekuppelt. Schutzgruppenmanipulationen sowie die Oxidation zur Säure lieferten schließlich Okadainsäure **311**. Die Vielzahl der latent im Molekül vorhandenen Hydroxyfunktionen verlangte eine besonders sorgfältige Schutzgruppenstrategie. Verwendet wurden im Lauf der Synthese Silyl-(TBDPS), Acetal- (MOM, Tetrahydro-2H-pyran-2-yl (THP), Benzyliden, Ethoxyethyl) und die Acetylenschutzgruppen, die schließlich durch Benzylether ersetzt wurden, so daß im letzten Schritt die komplette Entschützung des Moleküls mit Lithium in Ammoniak gelang.

Die Bedeutung von Okadainsäure für die Erforschung biologischer und medizinischer Phänomene wird z. B. dadurch verdeutlicht, daß dieser Naturstoff im Jahr 1995 in ca. 450 und 1996 in ca. 400 Veröffentlichungen erwähnt und in biologischen Experimenten eingesetzt wurde. Dabei wurde besonders seine Eigenschaft ausgenutzt, selektiv die Ser/Thr-Phosphatase PP2A ($IC_{50} = 1\text{ nm}$) ohne Beeinträchtigung der Ser/Thr-Phosphatase PP1 ($IC_{50} = 330\text{ nm}$) zu inhibieren.^[366]

Wesentliche Erkenntnisse ergaben sich beispielsweise bei der Untersuchung des programmierten Zelltods, der Apoptose. So konnte durch Behandlung von Krebszelllinien mit Okadainsäure gezeigt werden, daß die Zellen unabhängig von ihrer Zellzyklusphase bereits über das gesamte für die Durchführung der Apoptose benötigte Proteinrepertoire verfügen.^[367, 368] Eine De-novo-Synthese zusätzlicher Proteine ist nicht erforderlich. Phosphatasen sind also an der Signalkaskade beteiligt, die zur Apoptose führt. Zum besseren Verständnis des Gesamtablaufs sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig, da Okadainsäure auch Lymphozyten vor der Apoptose schützen kann, die von anderen Reagentien induziert wurde.^[369]

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß von Okadainsäure auf K-562-Leukämie-Zellen untersucht.^[370] Die Behandlung mit dem Naturstoff verminderte die Expression der Gene *c-myc* und *max*. Diese kodieren für Proteine, die eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung spielen und dafür im Zellkern heterodimerisieren müssen.^[371] Die Abschwächung der Expression dieser Gene induzierte bei den behandelten Zellen Apoptose. Daß der Naturstoff die Genexpression nicht generell verringert, wurde an mehreren Reportergenen gezeigt. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß PP2A die einzige Phosphatase ist, die inhibiert wird. Die Behandlung der Zellen mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A (**314**, Schema 80) führte zu ähnlichen Ergebnissen, während das gegenüber den Enzymen inaktive Okadainsäure-Tetraacetat keinerlei Änderung der Genexpression bewirkte. Eine naheliegende Hypothese zur Erklärung dieser Befunde ist, daß die Phosphatase PP2A Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription von *c-myc* und *max* benötigt werden, dephosphoryliert und somit aktiviert (siehe Abschnitt 6.3).

Die Beteiligung der Phosphatase PP2A an der durch den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) vermittelten Resistenz gegen Insulin konnte durch die Behandlung von Skelettmuskelzellen der Ratte mit Okadainsäure nachgewiesen wer-

den.^[372] Die Insulinresistenz wird dadurch verursacht, daß der TNF- α die insulinstimulierte, über den Ras/Raf-Schalter verlaufende Phosphorylierung von MEK und die darauf folgende Aktivierung der MAP-Kinase blockiert (siehe Abschnitt 2.2). Eine Aufhebung dieses Effektes durch die Zugebung von Okadainsäure sowie die Beobachtung einer erhöhten PP2A-Aktivität nach Stimulierung durch TNF- α weisen auf die Beteiligung der Phosphatase PP2A hin, die offenbar MEK dephosphoryliert und dadurch inaktiviert. Andere Phosphataseinhibitoren wie Orthovanadat oder FK 506 (siehe Abschnitt 10) führten im Unterschied zu Okadainsäure nicht zu einer Aufhebung der TNF- α -vermittelten Insulinresistenz.

In einer weiteren Arbeit, die sich mit dem insulinstimulierten Transport von Glucose und der Translokation eines Glucosetransporters (Glut 4) von intrazellulären Vesikeln zur Zellmembran beschäftigt, wurde gezeigt, daß Okadainsäure Insulin hinsichtlich der Wirkung auf menschliche Adipozyten imitiert: Die Geschwindigkeit des Glucosetransports wird erhöht und die Wanderung von Glut 4 zur Zellmembran stimuliert.^[373] Anders als im insulinstimulierten Signalweg ist bei Verwendung von Okadainsäure diese Wirkung allerdings unabhängig von der Aktivität der PI-3-Kinase. Dieses Ergebnis legt nahe, daß mehrere Signalwege den Glucosetransport regulieren, und eröffnet Möglichkeiten zur Therapie von Diabetes. Die genaue Ursache der Wirkung von Okadainsäure wurde allerdings bisher nicht weiter untersucht.

Durch den Einsatz von Okadainsäure als in geringen Konzentrationen von ca. 10 nm selektiven Inhibitor der PP2A-Phosphatasen konnte auch die Beteiligung dieser Enzyme bei der EGF-induzierten Regulierung der MAP-Kinase in A431-Zellen^[374] sowie bei der Hyperphosphorylierung des bei der Alzheimer-Krankheit wichtigen Tau-Proteins^[375] nachgewiesen werden.

9.2. Calyculin A

Der Sekundärmetabolit Calyculin A **314** (Schema 80) wurde 1986 aus einem marinen Schwamm isoliert^[355] und wenig später als Inhibitor von Phosphatasen beschrieben.^[376] Im Unterschied zu Okadainsäure, die PP2A um einen Faktor 10–100 effektiver hemmt als PP1, blockiert Calyculin A beide Enzyme mit ähnlichen IC_{50} -Werten. Die relative Konfiguration dieses Naturstoffs wurde durch eine Kristallstrukturanalyse bestimmt,^[355] die Aufklärung der absoluten Konfiguration gelang durch eine erste Totalsynthese, in der besondere Rücksicht auf die hydrolyselabile Phosphatgruppe und die konjugierte Tetraeneinheit genommen werden mußte.^[377] Calyculin A hat eine breitere Enzymspezifität als Okadainsäure, weist aber ansonsten eine sehr ähnliche biologische Wirkung auf.

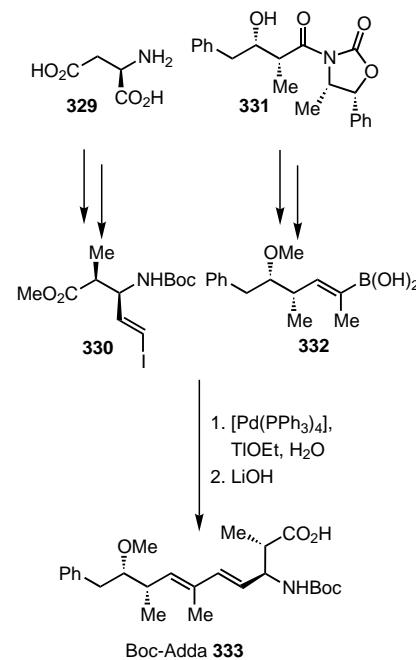
Die Behandlung von menschlichen Tumorzellen mit γ -Strahlen oder Wärme führt zu einer weitgehenden Fragmentierung der DNA sowie zu morphologischen Veränderungen, die für die Apoptose charakteristisch sind. Durch Zusatz von 20 nm Calyculin A oder 500 nm Okadainsäure wurde der plötzliche Zelltod jedoch verhindert.^[378] Den gleichen Effekt übt Calyculin A in geringen Konzentrationen bei der photodynamischen Therapie (PDT) aus. Bei diesem Verfahren zur

Tumorbehandlung wird mit Laserstrahlen in Zellen, die vorher mit photosensitiven Reagentien behandelt wurden, ebenfalls die Apoptose ausgelöst. Dabei kann durch die Ausrichtung der Lichtquelle bösartiges Gewebe gezielt zerstört werden. In Leukämiezellen von Mäusen tritt die charakteristische DNA-Fragmentierung sehr rasch (innerhalb von 30 Minuten) nach der Bestrahlung auf.^[379] Die Behandlung der Zellen mit Calyculin A verhinderte den programmierten Zelltod, während der PKC-Inhibitor Staurosporin den Vorgang beschleunigte. Die Autoren schließen aus dem sehr raschen Auftreten der Apoptose, daß die photodynamische Therapie einen späten Schritt im Gesamtprozeß initiiert (hierauf beruht wahrscheinlich die breite Anwendbarkeit der PDT; dagegen beeinflussen Chemotherapeutika frühe Vorgänge des programmierten Zelltods, die in Tumorzellen nicht mehr stattfinden oder unterdrückt sind). Weiterhin folgern sie, daß eine Ser/Thr-Phosphorylierung/Dephosphorylierung an einem späten Stadium der Signaltransduktionsprozesse, die zum Tod der Zellen führen, beteiligt ist.

Calyculin A und Okadainsäure wirken als starke Tumorpromotoren (siehe oben und Abschnitt 9.1), indem sie die Dephosphorylierung von Zielproteinen der PKC verhindern, so daß letztlich der gleiche Effekt wie bei der Aktivierung der Ser/Thr-Kinase durch Phorbolester (siehe Abschnitt 7) erzielt wird.^[380] Die beiden Naturstoffe führen in verschiedenen Zelltypen weiterhin zur Translokalisierung der PKC vom Cytosol zur Zellmembran, wobei Calyculin A bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen aktiv ist (10 nM) als Okadainsäure (1 μM).^[380] Diese Membranassoziation wird ebenfalls durch Phorbolester initiiert und führt zur Aktivierung der Kinase.^[381] Trotz der Unterschiede in der Struktur und den zellulären Zielproteinen fördern diese beiden Naturstoffe das Tumorwachstum also in ähnlicher Weise durch Membranlokalisierung der PKC. Weitere Anwendungen von Calyculin A umfassen die Untersuchung der TNF-α-vermittelten Insulinresistenz,^[382] der Modulierung der Aktivität der Ras-Farnesylyltransferase durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung^[383] sowie der Rolle der Phosphatasen PP1 und PP2A bei der glucoseinduzierten Regulierung der Glycogensynthese.^[384]

9.3. Nodularine und Microcystine

Nodularine wie **315**^[357] und Microcystine wie **316**^[358] (Schema 80) sind cyclische Penta- bzw. Heptapeptide, die von Cyanobakterien produziert werden. Diese Verbindungen sind hepatotoxisch und für die Gifigkeit von Wasser, in dem blaugrüne Algen wachsen, verantwortlich. Darüber hinaus wirken sie als starke Inhibitoren der Ser/Thr-Phosphatasen PP1 und PP2A sowie als Tumorpromotoren. Die Strukturen dieser beiden Naturstoffe sind sehr ähnlich und weisen als gemeinsames Merkmal eine ungewöhnliche β-Aminosäure, Adda **333** (Schema 83), sowie D-*erythro*-β-Methylasparaginsäure auf. Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften besteht ein großes Interesse an der Synthese dieser Naturstoffe sowie strukturverwandter nichtnatürlicher Analoga.^[385] Dazu wird vor allem eine effiziente und stereospe-



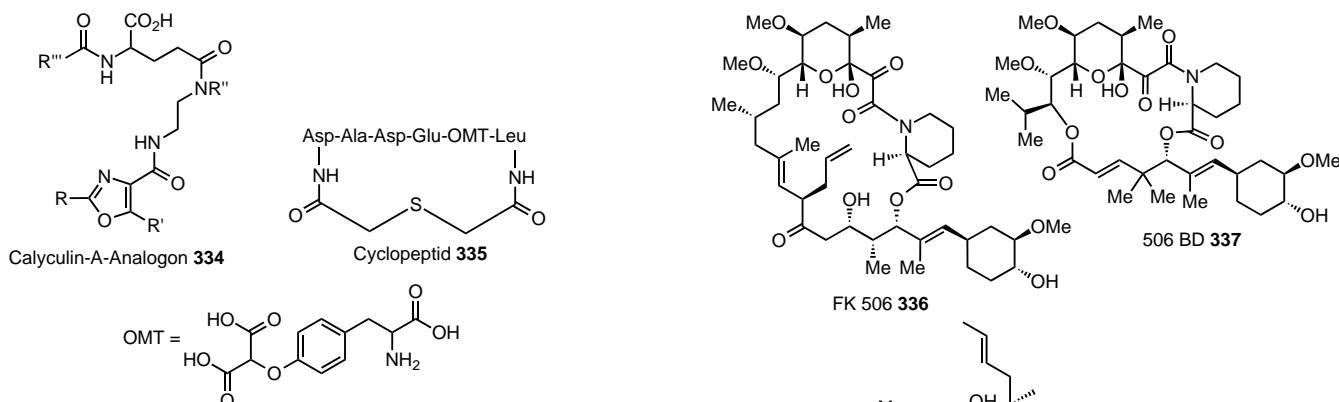
Schema 83. Synthese von Boc-Adda.

zifische Synthese von **333** benötigt.^[386] In der ersten Totalsynthese von Microcystin-LA^[385] wurde **333** aus dem Vinyliolid **330**, das aus einem stereoselektiv in β-Position methylierten Asparaginsäurederivat zugänglich ist, und der Boronsäure **332**, die ausgehend vom *syn*-Aldol **331** synthetisiert wurde, über eine Suzuki-Kupplung hergestellt (Schema 83).

9.4. Weitere Phosphataseinhibitoren

Ein Beispiel für die Entwicklung neuer, synthetischer Phosphataseinhibitoren wurde kürzlich beschrieben.^[387] Basierend auf den wenigen SAR-^[388] und Molecular-Modeling-Untersuchungen^[389] zur Wirkung der natürlich vorkommenden Inhibitoren wurde das stark vereinfachte Calyculin-A-Analogon **334** (Schema 84) entworfen, das eine essentielle Carboxylatfunktion, hydrophobe Reste sowie H-Brücken-Donoren und -Acceptoren enthält. Mit einem kombinatorischen Ansatz wurden 18 Derivate von **334** synthetisiert und auf ihre Wirkung gegenüber den Phosphatasen PP1 und PP2A sowie in menschlichen Brustkrebszellen getestet. Einige Verbindungen der Bibliothek blockierten die Aktivität der Enzyme (wenn auch bei deutlich höheren Konzentrationen als Calyculin A) und entfalteten auch in Ganzzellsystemen eine antiproliferative Wirkung, so daß die angekündigten weiteren Untersuchungen interessante Ergebnisse erwarten lassen.

Ausgehend von den Aminosäuresequenzen bevorzugter Substrate einzelner Phosphatasen können ebenfalls selektive Peptid-Enzyminhibitoren synthetisiert werden. Dabei ist es vorteilhaft, Phosphotyrosin gegen hydrolyselabile Derivate wie Phosphonomethylphenylalanin, Difluorophosphonomethylphenylalanin oder O-Malonyltyrosin (OMT) zu ersetzen. Auf diese Weise wurden cyclische, von einer Autophosphorylierungssequenz des EGF-Rezeptors abgeleitete, gegen Proteolyse stabile Peptide synthetisiert. Die Verbindungen,



Schema 84. Synthetische Phosphataseinhibitoren.

die das OMT-Mimeticum enthielten (z.B. 335, Schema 84), waren in vitro starke Inhibitoren der Phosphatase PTP1.^[390] Interessant wäre die Untersuchung, ob diese Enzymhemmer und die oben erwähnten Microcystine und Nodularine ähnliche Strukturmerkmale aufweisen.

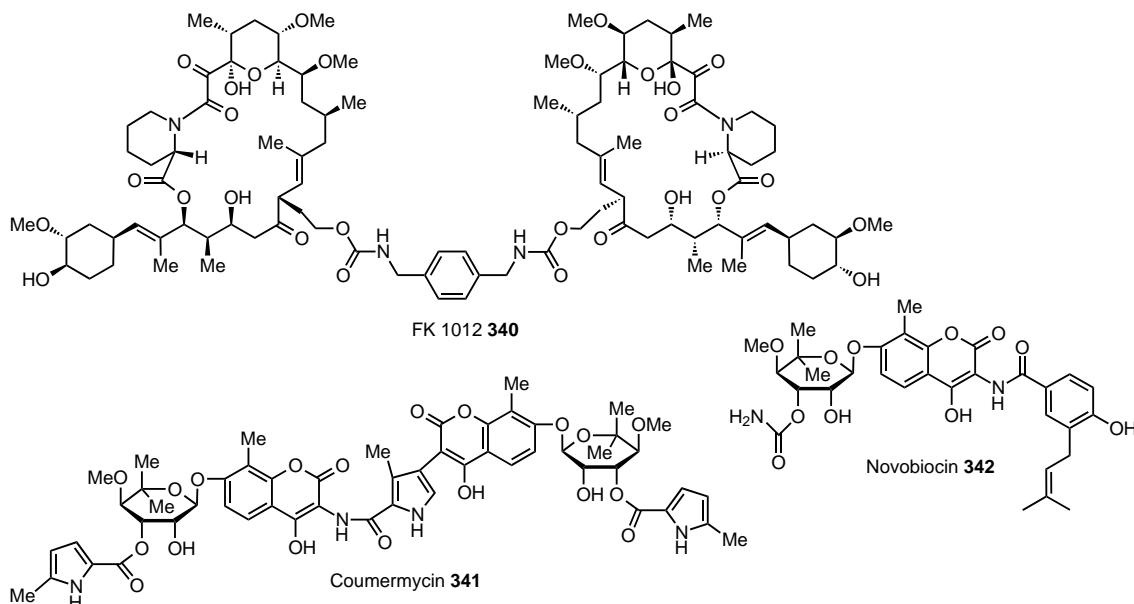
10. Induzierte Dimerisierung von Proteinen durch synthetische Liganden^[391]

Eines der besten Beispiele für die gegenseitige Befruchtung von organischer Synthese und Biologie ist die Aufklärung der Wirkmechanismen der Immunsuppressiva FK506 336 und Cyclosporin (CsA) 338 (Schema 85) sowie der T-Zell-Aktivierung (siehe Abschnitt 2.4 sowie Schema 9). Da dieses faszinierende Forschungsgebiet bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurde,^[392] soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. FK506 und Cyclosporin sind Naturstoffe, die Ca^{2+} -abhängige Signalwege blockieren und aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf die Transkription einiger Gene in T-Zellen als Immunsuppressiva eingesetzt werden, beispielsweise bei Organtransplantationen. Mit immobilisierten Derivaten dieser Liganden wurden deren physiologische Rezeptorproteine, die Immunophilin Cyclophilin (Cyp) und FK506 binding protein (FKBP), identifiziert. Zunächst wurde angenommen, daß die Naturstoffe ihre immununterdrückende Wirkung durch Hemmung der für die Aktivierung von T-Zellen wesentlichen Rotamaseaktivität dieser Proteine ausüben. Diese Hypothese mußte allerdings aufgegeben werden, als festgestellt wurde, daß sowohl Rapamycin 339 als auch die synthetische FK506-bindende Domäne (506BD) 337 (Schema 85) zwar an FKBP binden und dessen Rotamaseaktivität inhibieren, von Rapamycin aber ein anderer Signalweg als von FK506 und CsA und von 506BD gar keine Signalübertragung gehemmt wird. Auf der Hypothese aufbauend, daß die Ligand/Rezeptor-Komplexe eine weiteres Mitglied der Transduktionskaskade beeinflussen, wurde durch Affinitätschromatographie der zelluläre Bindungspartner des „aktivierten Komplexes“ aus FK506 und FKBP isoliert. Es handelt sich dabei um die Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin, deren Enzymaktivität durch die Bindung an FK506/FKBP inhibiert, durch FK506, FKBP, Cyp, Rapamycin, 506BD oder Rapamycin/FKBP

Schema 85. Immunsuppressiva und der synthetische Ligand 506BD.

hingegen nicht beeinflußt wird. Durch die so verhinderte Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (siehe Schema 9) wird der Zellzyklus im G0-Stadium angehalten, was zur Immunsuppression führt. Interessanterweise wird die Phosphatase Calcineurin ebenfalls durch den Komplex aus CsA und Cyclophilin inhibiert. Die Naturstoffe haben also zwei Proteinbindungsdomänen; mit einer binden sie an die Immunophilin, mit der anderen an Calcineurin, weswegen sie als „chemical inducers of dimerization“^[391] bezeichnet wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten eröffneten damit völlig neue Möglichkeiten und Konzepte für die Erforschung von Signaltransduktionsvorgängen.

Ligandenvermittelte Signaltransduktionsprozesse werden oft durch Di- oder Oligomerisierung von Rezeptoren initiiert.^[393] Hierfür werden die extrazellulären und die Transmembrandomänen jedoch nur bedingt benötigt. Ihre Funktion besteht primär darin, die enzymatisch aktiven intrazellulären Domänen in unmittelbare Nachbarschaft zu bringen, so daß beispielsweise eine Transphosphorylierung stattfinden kann. Auf dieser Annahme aufbauend wurde ausgehend von FK506 ein Dimer synthetisiert, in dem zwei FK506-Monomere über eine funktionelle Gruppe innerhalb der Calcineurin-Bindungsdomäne miteinander verknüpft sind.^[394] Dieser dimere Ligand, FK 1012 340 (Schema 86), sollte also nach wie



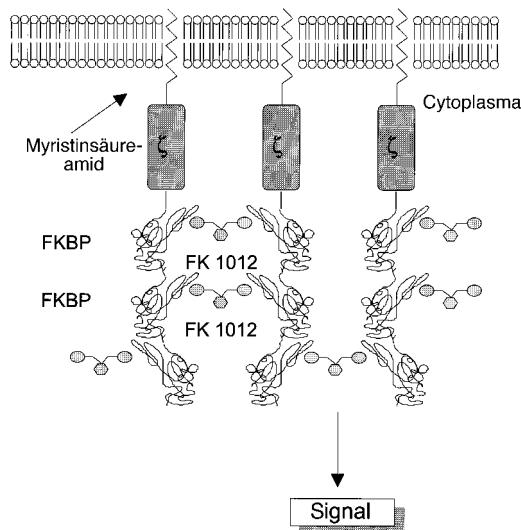
Schema 86. Die Dimerisierung von Proteinen induzierende Liganden sowie das monomere Novobiocin.

vor in der Lage sein, FKBP zu binden; eine Inhibierung des TCR-Signalweges über die essentielle Bindung an die Phosphatase Calcineurin ist aber ausgeschlossen.

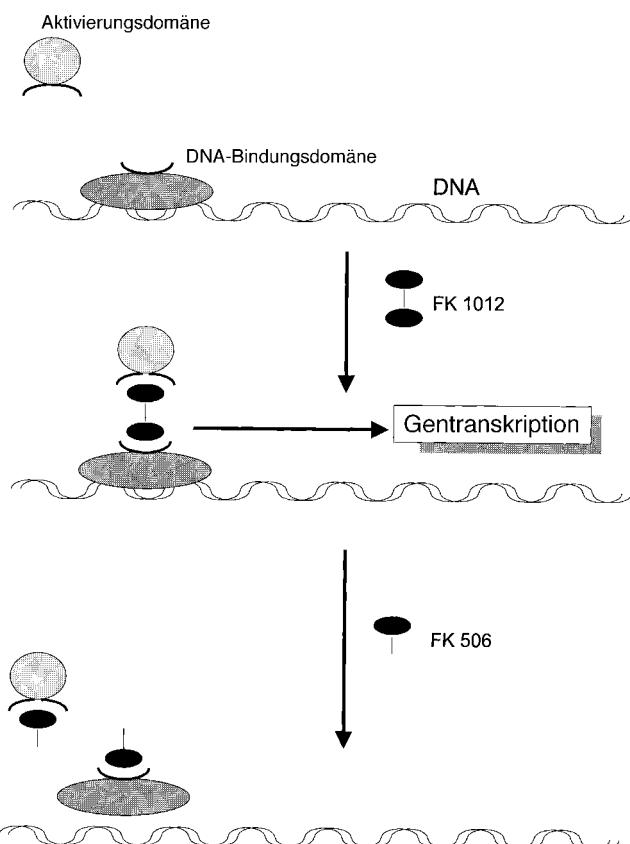
Um den Nutzen dieser Eigenschaft für biologische Studien zu belegen, wurden Tag-Jurkat-T-Zellen mit chimären Src/ζ/FKBP-Rezeptoren transfiziert, die aus dem N-Terminus von Src (dieses Protein wird myristoyliert und bewirkt damit eine Membranlokalisierung), aus der ζ-Kette des TCR (zur Induzierung einer Kinasekaskade nach Dimerisierung der Rezeptoren, siehe Schema 9) und aus mehreren Kopien des FKBP konstruiert wurden. Bei Behandlung dieser Zellen mit dem synthetischen Dimer **340** oligomerisierten die Rezeptorkonstrukte dadurch, daß der Ligand sie über die Bindung an FKBP miteinander verband (Schema 87). Als Folge dieser künstlich hervorgerufenen Aggregation und der dadurch angeschalteten Kinasekaskade trat die Aktivierung von Reportergen auf, wie sie auch durch

ein Cross-linking über Antikörper hervorgerufen wird. Wurde die Myristoylierung und damit die Membranassoziation der Rezeptoren verhindert, indem man den N-terminalen Glycinrest des Src-Proteins gegen Alanin austauschte, wurde der Signalweg nicht aktiviert. Den gleichen Befund erhielt man, wenn die Rezeptorkonstrukte nur ein Exemplar des FKBP enthielten, während drei Kopien die maximale Aktivität gewährleisteten. Daraus wurde geschlossen, daß für die Aktivierung des TCR-Signalweges weder die extrazelluläre noch die Transmembrandomäne des TCR nötig sind, sondern daß der Rezeptor an der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert werden muß. Ligandeninduzierte konformative Änderungen im T-Zell-Rezeptor spielen offenbar keine wesentliche Rolle. Darüber hinaus scheint eine Oligomerisierung der Rezeptoren notwendig zu sein, eine bloße Dimerisierung durch die synthetisierten Liganden führt nicht zum Anschalten der Signalkaskade. Das künstliche Signal kann durch Zugabe von monomerem FK 506 oder von CsA wieder abgeschaltet werden, die Transduktionskaskade kann also nach Belieben aktiviert oder unterbrochen werden.

Diese Methode wurde beispielsweise auch eingesetzt, um die Transkription von Genen gezielt anzuschalten. Transkriptionsfaktoren bestehen aus funktionell verschiedenen Domänen, die unabhängig voneinander die Bindung an die DNA und die Aktivierung der Transkription vermitteln.^[395] Da hierzu keine kovalenten Bindungen nötig sind, besteht die Möglichkeit, mit dimeren Liganden solche Domänen einander anzunähern und so die Transkription zu induzieren. Dazu wurden zwei chimäre Proteine, die jeweils das FKBP sowie in einem Fall eine DNA-Bindungsdomäne (GF3 oder HF3) und im anderen Fall eine Aktivierungsdomäne (NF3V1) enthalten, in Zellen exprimiert (Schema 88)^[396] Die Behandlung dieser Zellen mit dem Liganden FK 1012 **340** führte tatsächlich zu einer Aktivierung der Transkription, die durch Zugabe des monomeren FK 506 unterbrochen werden konnte. Darüber hinaus wird vermutet, daß die Aktivierungsdomäne für



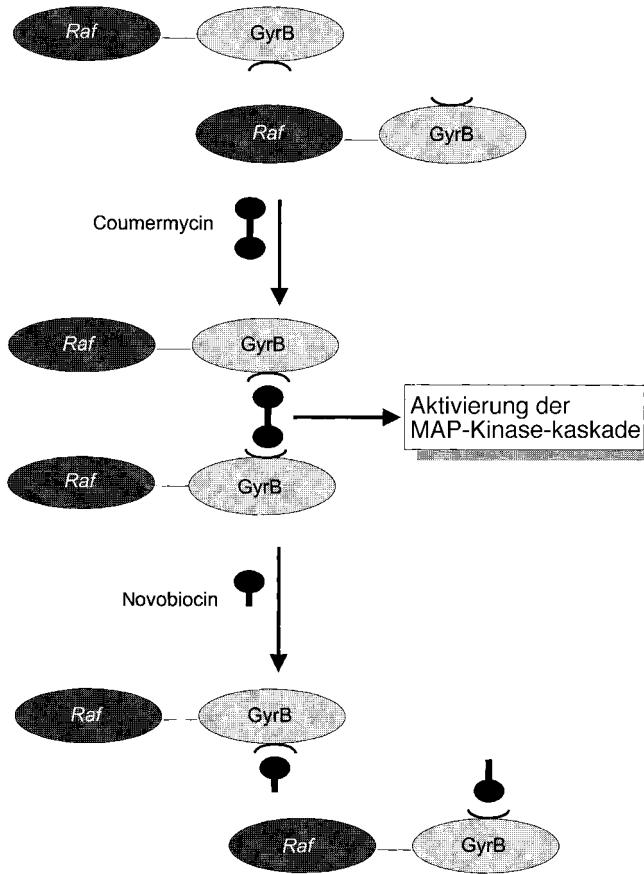
Schema 87. Aktivierung chimärer Rezeptoren durch FK 1012.



Schema 88. Induzierung der Gentranskription durch einen synthetischen Liganden.

die Aufrechterhaltung der Transkription dauerhaft an die DNA gebunden sein muß, daß also die einmalige Bildung eines Komplexes nicht ausreicht.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Signaltransduktion über die Raf-Kinase anhand der induzierten Dimerisierung untersucht.^[397] Coumermycin **341** (Schema 86) ist ein Antibioticum, das an zwei Moleküle der B-Untereinheit einer bakteriellen DNA-Gyrase (GyrB) bindet und somit ebenfalls eine Dimerisierung induziert. Um die Mechanismen zu untersuchen, die zur Aktivierung der Raf-1-Kinase (siehe Abschnitt 2.2) führen, wurden chimäre Raf-Fusionsproteine hergestellt, in denen die GyrB-Untereinheit an den C-Terminus von Raf geknüpft wurde. Exprimierte man diese Proteine in Cos-Zellen, ließ sich ihre katalytische Aktivität, d.h. die Phosphorylierung von MEK, durch Zugabe des Antibioticums **341** induzieren (Schema 89). Hohe Dosen an Coumermycin sowie an Novobiocin **342** (einem monomeren Coumermycinanalogon, Schema 86) blockierten dagegen die MEK-Aktivierung, was mit der Hypothese der Aktivierung durch Dimerisierung im Einklang ist. Wurde für diese Experimente eine Mutante (R89L) von Raf verwendet, die nicht mit Ras wechselwirkt und daher auch nicht an der Plasmamembran lokalisiert sein sollte, so wurde die gleiche Coumermycin-abhängige Reaktion festgestellt wie im Fall der Wildtyp-Proteine. Die Dimerisierung der Raf-Kinase reicht also zu ihrer Aktivierung aus, eine Membranlokalisierung ist hierfür nicht erforderlich. Die Rolle des Ras-Proteins bei der Aktivierung von Raf könnte nach diesen Ergebnissen also



Schema 89. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Coumermycin-induzierte Dimerisierung der Raf-Kinase.

darin bestehen, eine Aggregation der Kinase zu induzieren. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen, bei denen die Dimerisierung von chimären FKBP/Raf-Fusionsproteinen durch FK1012 induziert wurde.^[398]

Mit einem Cyclosporin-A-Dimer wurde in Zellen, die die intrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors kovalent verknüpft mit Cyclophilin exprimieren, eine Fas-vermittelte Apoptose induziert.^[391] Auch ein synthetisches Konstrukt aus FK 506 und Cyclosporin A, FKCsA, konnte erfolgreich zur Aggregation zweier verschiedener Proteine eingesetzt werden.^[399]

Das Potential dieser konzeptionell völlig neuen Klasse von Wirkstoffen wird noch dadurch erhöht, daß sie in der Regel oral verfügbar sind und leicht von Zellen aufgenommen werden. So wurde mit dem Naturstoff Rapamycin in Mäusen, in die zuvor Zellkonstrukte implantiert worden waren, über die Steuerung der Transkription ein therapeutisches Protein, das menschliche Wachstumshormon (human growth hormone, hGH), produziert werden.^[400] Diese Zellkonstrukte wurden dafür mit den Genen für hGH sowie für zwei regulatorische Proteine versehen, die Erkennungssequenzen für Rapamycin enthielten.

11. Zusammenfassung und Ausblick

Die in diesem Beitrag beschriebenen Beispiele für das erfolgreiche Ineinandergreifen organisch-chemischer und biologischer Arbeiten bei der Untersuchung und Steuerung der biologischen Signaltransduktion belegen eindrucksvoll die

Leistungsfähigkeit der interdisziplinären Forschung im Bereich der „Bioorganischen Chemie“ („Chemischen Biologie“) im Sinne der im einleitenden Abschnitt gegebenen Definition. Heute werden mit rasch wachsender Geschwindigkeit immer mehr biologische Phänomene im molekularen Detail untersucht, aufgeklärt und verstanden. Für die Organische Chemie eröffnet sich damit eine Vielzahl neuer Betätigungsfelder, in denen sie ihre Leistungsfähigkeit ausspielen kann und in denen sie auf neue, große und wichtige Herausforderungen trifft, die es anzunehmen gilt und bei deren Bewältigung der Organischen Chemie eine Schlüsselrolle zukommen kann. Für die Biologie ergeben sich aus der bioorganischen Forschung neue, alternative Ansätze, mit denen Erkenntnisse rascher, direkter und oft mit einem höheren Maß an Präzision und Eindeutigkeit erhalten werden können und die mit den heute etablierten Methoden nicht oder nur mit viel höherem Aufwand erreichbar sind. Um die „Bioorganische Chemie“ an der Grenze zwischen Organischer Chemie und Biologie als leistungsfähiges und breit bearbeitetes Gebiet zu etablieren, wie die Physikalische Chemie zwischen Physik und Chemie, bedarf es der Bereitschaft und des Willens der Organischen Chemiker und der Biologen, die Grenze zur Nachbardisziplin zu überschreiten. Es gilt, die Sprache und das methodische Vorgehen des jeweils anderen zu erlernen, sich gegenseitig zu respektieren (und nicht etwa die Nachbarwissenschaft als reinen Themen- oder Substanzlieferanten zu betrachten) und sich in wirklich praktizierter Kooperation den sich stellenden Fragen zu widmen. Die Zukunft wird zeigen, ob wir dieser Herausforderung gewachsen sind.

Die Motivation zum Verfassen der vorliegenden Übersicht wurde aus unseren eigenen Arbeiten an der Universität Mainz, der Universität Bonn und der Universität Karlsruhe zur Verknüpfung organisch-chemischer und biologischer Forschung im Bereich der Signaltransduktion geboren. Unsere Arbeiten sind hauptsächlich in den Abschnitten 3 und 5–7 erwähnt. An ihnen waren während der zurückliegenden Jahre und sind zur Zeit beteiligt (in alphabetischer Reihenfolge): D. Alonso-Díaz, D. Brom, A. Cotté, F. Eisele, S. Gabold, S. Glomsda, P. Hagenbuch, A. Heuser, K. Hinterding, V. Jungmann, D. Kadereit, T. Kappes, B. Klaholz, V. Klein, T. Krämer, N. Kuder, K. Kuhn, Y. Li, T. Lipps, R. Machauer, B. Meseguer-Vidagany, E. Nägele, D. Owen, T. Pathak, T. Pohl, A. Reidel, J. Sander, M. Schelhaas, U. Schlede, T. Schmid, T. Schmittberger, S. Schulze, D. Sebastian, P. Stahl, F. Stieber, P. Stöber und T. Zelinski. Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Bundesministerium für Bildung und Forschung, vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Europäischen Union, von der Alexander-von-Humboldt-Stiftung, von der Krupp-Stiftung sowie von der Bayer AG, der BASF AG, der Degussa AG, der Boehringer Mannheim GmbH und der Boehringer Ingelheim KG gefördert.

Eingegangen am 17. Juni 1997 [A235]

- [1] A. Kornberg, *The Golden Helix—Inside Biotech Ventures*, University Science Books, Sausalito, CA (USA), 1995, S. 4.
 [2] *Chem. Eng. News* 1996, 74(20), 39.
 [3] Siehe auch: G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* 1990, 102, 1247–1257; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 1209–1219.

- [4] Dieser Umstand wird auch durch die Gründung neuer Journale zu diesem Thema belegt, die in kürzester Zeit großes Interesse und Beachtung finden, z. B. *Nature Structural Biology*, *Structure*, *Current Opinion in Structural Biology*.
 [5] Siehe z. B.: H. Dugas, *Bioorganic Chemistry*, 3. Aufl., Springer, New York, 1995.
 [6] In jüngster Zeit scheint besonders die stärkere Betonung der biologischen Komponenten an Bedeutung zu gewinnen. So wurde das „Chemistry Department“ der Harvard University kürzlich in „Department of Chemistry and Chemical Biology“ (und nicht „Biological Chemistry“!) umbenannt, die Harvard University wird zusätzlich ein „Institute for Chemistry and Cell Biology“ eröffnen (*Chem. Eng. News* 1997, 75(24), 31), und am Scripps Research Institute wurde das „Skaggs Department of Chemical Biology“ eröffnet.^[2]
 [7] Siehe a) Lit.^[1], S. 13; b) A. Kornberg, *Chem. Biol.* 1996, 3, 3–5. In diesen Abhandlungen macht der Autor als einen der Hauptunterschiede zwischen chemischer und biologischer Forschung die unterschiedliche Art der Bearbeitung von Problemen durch Chemiker und Biologen aus: „Chemists seek precise answers to well-defined problems, whereas biologists are content with approximate answers to complex problems“ (Lit.^[7a], S. 14); „Chemists seem more conservative, analytical and clanish, [...] They obtain precise data with relatively few and elegant techniques. [...] Biologists on the other hand seem more artistic, eclectic and right-brain dominated. They focus on complex phenomena in cells and organisms using a wider range of techniques with less precision“ (Lit.^[7b], S. 3–4). – Wir sind darüber hinaus der Meinung, daß zwischen Biologen und Chemikern oft ein durch die Ausbildung und die dadurch geprägte Denkweise bedingtes Kommunikationsproblem besteht. So ruft der Begriff „Glucose-6-phosphat“ bei einem Organiker zunächst eine Strukturassoziation hervor, die biologische Funktion rangiert weiter hinten, während ein Biologe z. B. als erstes an die Rolle dieses Kohlenhydrats in der Glykolyse denken wird und die Struktur für ihn untergeordnet ist. Chemiker und Biologe betrachten gleichsam bevorzugt die jeweils unterschiedlichen, aber untrennbar zusammengehörigen Seiten derselben Medaille.
 [8] a) M. Rodbell, *Angew. Chem.* 1995, 107, 1549–1558; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1420–1428, b) A. G. Gilman, *ibid.* 1995, 107, 1533–1546 bzw. 1995, 34, 1406–1419.
 [9] Für eine ausführliche Darstellung siehe: a) H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudeira, J. Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, 2. Aufl., de Gruyter, Berlin, 1996, Kap. 20; b) G. Krauss, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, WILEY-VCH, Weinheim, 1997.
 [10] Eine dritte Klasse bilden lipophile Hormone mit membranständigen Rezeptoren, wie die Arachidonsäureabkömmlinge, die von vielen Zellarten kontinuierlich gebildet und sezerniert und oft in unmittelbarer Nähe zum Biosyntheseort wieder abgebaut werden.
 [11] Die Beeinflussung des Verhaltens anderer Organismen der gleichen Art durch Pheromone wird hier nicht diskutiert.
 [12] a) S. Watson, S. Arkinstall, *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego, 1994, zit. Lit; b) G. H. Gold, E. N. Pugh, Jr., *Nature* 1997, 385, 677–679.
 [13] L. Birnbaumer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990, 30, 675–705.
 [14] D. E. Coleman, S. R. Sprang, *Trends Biochem. Sci.* 1996, 21, 41–44.
 [15] D. E. Clapham, *Nature* 1996, 379, 297–299, zit. Lit.
 [16] S. S. Taylor, J. A. Buechler, W. Yonemoto, *Annu. Rev. Biochem.* 1990, 59, 971–1005.
 [17] M. J. Berridge, *Nature* 1993, 361, 315–325.
 [18] a) D. C. Billington, *The Inositol Phosphates*, VCH, Weinheim, 1993; b) D. C. Billington, *Chem. Soc. Rev.* 1989, 18, 83–122.
 [19] B. V. L. Potter, D. Lampe, *Angew. Chem.* 1995, 107, 2085–2125; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1933–1972.
 [20] Y Asaoka, S. Nakamura, K. Yoshida, Y. Nishizuka, *Trends Biochem. Sci.* 1992, 17, 414–417.
 [21] Y. Nishizuka, *Science* 1992, 258, 607–614.
 [22] K. Buchner, *Eur. J. Biochem.* 1995, 228, 211–211.
 [23] T. A. Gilbertson, S. C. Kumamon, *Chem. Biol.* 1996, 3, 233–237.
 [24] P. A. Hargrave, J. H. McDowell, *FASEB J.* 1992, 6, 2323–2331.
 [25] F. McCormick, *Nature* 1993, 363, 15–16.
 [26] S. E. Egan, R. A. Weinberg, *Nature* 1993, 365, 781–783.

- [27] M. S. Bogushi, F. McCormick, *Nature* **1993**, *366*, 643–654.
- [28] M. Spaargaren, J. R. Bischoff, F. McCormick, *Gene Expression* **1995**, *4*, 345–356.
- [29] *Intracellular Signal Transduction, Advances in Pharmacology* **36** (Hrsg.: H. Hidaka, A. C. Nairin), Academic Press, San Diego, **1996**.
- [30] a) B. Stein, D. Anderson, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 289–298; b) C. E. Canman, M. B. Kastan, *Nature* **1996**, *384*, 213–214.
- [31] M. L. Gishizky, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1995**, *30*, 247–253.
- [32] A. J. Bridges, *Chemtracts: Org. Chem.* **1995**, *8*, 73–107.
- [33] D. L. Cadena, G. N. Gill, *FASEB J.* **1992**, *6*, 2334–2337.
- [34] J. B. Bolen, *Oncogene* **1993**, *8*, 2025–2031.
- [35] G. Alonso, M. Koegl, N. Mazurenko, S. A. Courtneige, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9840–9848.
- [36] P. Lamb, H. M. Seidel, R. B. Stein, J. Rosen, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 269–278.
- [37] J. E. Darnell Jr., I. M. Kerr, G. R. Stark, *Science* **1994**, *264*, 1415–1421.
- [38] J. Kunz, M. N. Hall, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 334–338.
- [39] G. R. Crabtree, N. A. Clipstone, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 1045–1083.
- [40] M. N. Prusichy, D. M. Spencer, T. M. Kapoor, H. Miyake, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 163–172.
- [41] G. M. Cooper, *Oncogenes*, 2. Aufl., Jones and Bartlett, London, **1995**.
- [42] Lit.^[9], Kap. 26.
- [43] F. McCormick, P. Myers, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 7–9.
- [44] T. Jacks, R. A. Weinberg, *Nature* **1996**, *381*, 643–644.
- [45] C. B. Thompson, *Science* **1995**, *267*, 1456–1462.
- [46] A. J. Hale, C. A. Smith, L. C. Sutherland, V. E. A. Stoneman, V. L. Longthorne, A. C. Culhane, G. T. Williams, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 1–26.
- [47] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1–13.
- [48] T. Hunter, *Cell* **1991**, *64*, 249–270.
- [49] Übersichten: a) A. Levitzki, *FASEB J.* **1992**, *6*, 3275–3282; b) A. Levitzki, A. Gazit, *Science* **1995**, *267*, 1782–1788; c) T. R. Burke, Jr., *Stem Cells* **1994**, *12*, 1–6; d) T. R. Burke, Jr., *Drugs Future* **1992**, *17*, 119–131; e) D. W. Fry, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 151–160.
- [50] H. J. Kwon, M. Yoshida, Y. Fukui, S. Hoeinouchi, T. Beppu, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6926–6930.
- [51] T. Onoda, H. Iinuma, Y. Sasaki, M. Hamada, K. Isschiki, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Tatsuta, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1252–1257.
- [52] M. H. Kreuter, R. E. Leake, F. Rinaldi, W. Müller-Klieser, A. Maidhof, E. G. Müller, H. C. Schröder, *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, *97B*, 151–158.
- [53] H. Umezawa, M. Imoto, T. Sawar, K. Isshiki, N. Matsuda, T. Uchida, H. Finuma, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 170–173.
- [54] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagama, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5592–5595.
- [55] K. J. Murray, W. J. Coates, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1994**, *29*, 255–264.
- [56] S. R. Hubbard, L. Wie, L. Elis, W. A. Hendrickson, *Nature* **1994**, *372*, 746–754.
- [57] W. Xu, S. C. Harrison, M. J. Eck, *Nature* **1997**, *385*, 595–601; zur Kristallstruktur der Src-Kinase Hck siehe: F. Sicheri, I. Moarefi, J. Kuriyan, *ibid.* **1997**, *385*, 602–608.
- [58] Erk2: F. M. Zhang, A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, E. J. Goldsmith, *Nature* **1994**, *367*, 704–711; Cdk2: H. L. De Bondt, J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgan, S.-H. Kim, *Nature* **1993**, *363*, 595–602; PKA: D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science* **1991**, *253*, 407–414.
- [59] P. Delmotte, J. Delmotte-Plaque, *Nature* **1953**, *171*, 344–347.
- [60] M. Lampilas, R. Lett, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 773–776, 777–780.
- [61] F. McCapra, A. I. Scott, P. Delmotte, J. Delmotte-Plaque, *Tetrahedron Lett.* **1964**, *15*, 869–875.
- [62] a) Y. Sugimura, K. Iino, Y. Tsujita, Y. Shimada, T. Kobayashi, T. Kasagaki (Sankyo Co. Ltd), EP-B EP 460950 A1, **1991** [Chem. Abstr. **1992**, *116*, 105970h]; b) G. J. Calton (Grace, W.R. & Co.), US-B 874,348, **1978** [Chem. Abstr. **1981**, *94*, 121499u].
- [63] Siehe z. B.: T. Yoneda, R. M. Lyall, M. M. Alsina, P. E. Persons, A. P. Spada, A. Levitzki, A. Zilberstein, G. R. Mundy, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4430–4435.
- [64] Siehe z. B.: M. Kovalenko, A. Gazit, A. Bohmer, C. Rorsman, L. Romstrand, C. H. Heldin, J. Waltenberger, F. D. Bohmer, A. Levitzki, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 6106–6114.
- [65] M. Anafi, A. Gazit, C. Gilon, Y. Benneriah, A. Levitzki, *FEBS Lett.* **1993**, *330*, 260–264.
- [66] F. Rendu, A. Eldor, F. Grelac, C. Bachelot, A. Gazit, C. Gilon, S. Levytoledano, A. Levitzki, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 881–888.
- [67] C. Roifman, K. Chin, A. Gazit, G. B. Mills, C. Gilon, A. Levitzki, *J. Immunol.* **1991**, *146*, 2965–2971.
- [68] J. B. Stanley, R. Gorczynski, C. K. Huang, J. Love, G. B. Mills, *J. Immunol.* **1990**, *145*, 2189–2198.
- [69] A. Dvir, Y. Milner, O. Chamsky, C. Gilon, A. Gazit, A. Levitzki, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 857–865.
- [70] A. Novogrodsky, A. Vanichkin, M. Patya, A. Gazit, N. Osherov, A. Levitzki, *Science* **1994**, *264*, 1319–1322.
- [71] D. W. Fry, A. K. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, A. J. Bridges, *Science* **1994**, *265*, 1093–1095.
- [72] A. Knebel, H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, P. Herrlich, *EMBO J.* **1996**, *15*, 5314–5325.
- [73] F. D. Böhmer, A. Böhmer, A. Obermeier, A. Ullrich, *Analyt. Biochem.* **1995**, *228*, 267–273.
- [74] a) M. S. Talamonti, M. S. Roh, G. E. Gallick, *J. Clinic. Invest.* **1993**, *91*, 53–60; b) A. E. Ottenhof, G. Rikksen, A. A. Michels, G. E. Staal, *Cancer Res.* **1993**, *52*, 4773–4778.
- [75] N. Osherov, A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 1047–1053.
- [76] H. Daub, F. U. Weiss, C. Wallasch, A. Ullrich, *Nature* **1996**, *9*, 557–560.
- [77] Übersichten: a) F. Balkenhol, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2437–2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288–2337; b) L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555–600.
- [78] C.-Y. J. Hsu, P. E. Persons, A. P. Spada, R. A. Bednar, A. Levitzki, A. Zilberstein, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, *31*, 21105–21112.
- [79] J. Green, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4287–4290; siehe auch: R. Devraj, M. Cushman, *ibid.* **1996**, *61*, 9368–9373.
- [80] J. Zimmermann, E. Buchdunger, H. Mett, T. Meyer, N. B. Lydon, P. Traxler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1221–1226.
- [81] E. Buchdunger, J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Müller, U. Regenass, N. B. Lydon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2558–2562.
- [82] E. Fattorusso, L. Minale, G. Sodano, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, *751*–752.
- [83] W. Fulmor, G. E. Van Lear, G. O. Morton, R. D. Mills, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *52*, 4551–4552.
- [84] H. Waldmann, K. Hinterding, A. Knebel, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1553–1555; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1541–1542.
- [85] a) S. Peterli, R. Stumpf, M. Schweizer, U. Sequin, H. Mett, P. Traxler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 696–706; b) S. Peterli, D. Hubmann, U. Sequin, H. Mett, P. Traxler, *ibid.* **1994**, *77*, 59–69.
- [86] E.-S. Lee, J. Juray, M. Cushman, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9873–9882.
- [87] D. M. Andrews, M. Gregorou, T. C. M. Page, J. M. Peach, A. J. Pratt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1335–1340.
- [88] T. Pawson, *Nature* **1995**, *373*, 573–580.
- [89] G. B. Cohen, R. Ren, D. Baltimore, *Cell* **1995**, *80*, 237–248.
- [90] B. Schaffhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1242*, 61–75.
- [91] Z. Songyang, S. E. Shoelson, M. Chandhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, B. G. Neel, R. B. Birge, J. E. Fajardo, M. M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, L. C. Cantley, *Cell* **1993**, *72*, 767–778.
- [92] a) G. Waksman, D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, *Nature* **1992**, *358*, 646–653; b) G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, J. Kuriyan, *Cell* **1993**, *72*, 779–790; c) M. J. Eck, S. K. Atwell, S. E. Shoelson, S. C. Harrison, *Nature* **1994**, *368*, 764–769; d) M. M. Zhou, R. P. Meadows, T. M. Logan, H. S. Yoon, W. S. Wade, K. S. Ravichandran, S. J. Burakoff, S. W. Fesik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7784–7788; e) S. M. Pascal, A. U. Singer, G. Gish, T. Yamazaki, S. E. Shoelson, T. Pawson, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *Cell* **1994**, *77*, 461–472.

- [93] M. S. Plummer, T. K. Sawyer, *Drug Des. Discovery* **1996**, *13*, 75–81.
- [94] M. Rodriguez, R. Crosby, K. Alligood, T. Gilmer, J. Berman, *Lett. Peptide Sci.* **1995**, *2*, 1–6.
- [95] Q. Lou, M. E. Leftwich, K. S. Lam, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 677–682.
- [96] M. S. Plummer, E. A. Lunney, K. S. Para, A. Shahripour, C. J. Stankovic, C. Humblet, J. H. Fergus, J. S. Marks, P. Herrera, S. Hubbell, A. Saltiel, T. K. Sawyer, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 41–47.
- [97] M. Nomizu, A. Otaka, T. R. Burke, Jr., P. P. Roller, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2691–2702.
- [98] T. Gimer, M. Rodriguez, S. Jordan, R. Crosby, K. Alligood, M. Green, M. Kimery, C. Wagner, D. Kinder, P. Charifson, A. M. Hassel, D. Willard, M. Luther, D. Rusnak, D. D. Sternbach, M. Mehrota, M. Peel, L. Shampine, R. Davis, J. Robbins, I. R. Patel, D. Kassel, W. Burtzhart, M. Moyer, T. Bradshaw, J. Berman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31 711–31 719.
- [99] D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, G. Zhu, S. J. Decker, A. Saltiel, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 240–248.
- [100] L. Theodore, D. Derossi, G. Chassaing, B. Llirbat, M. Kubes, P. Jordan, H. Chneiweiss, P. Godement, A. Prochiantz, *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 7158–7167.
- [101] a) H. Hall, E. J. Williams, S. E. Moore, F. S. Walsh, A. Prochiantz, P. Doherty, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 580–587; b) Übersicht: A. Prochiantz, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 629–634.
- [102] K. Shuai, C. M. Horvath, L. H. Tsai Huang, S. A. Qureshi, D. Cowburn, J. E. Darnell, Jr., *Cell* **1994**, *76*, 821–828.
- [103] S. F. Arnold, A. C. Notides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7475–7479.
- [104] S. Sugimoto, T. J. Wandless, S. E. Shoelson, B. G. Neel, C. T. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13614–13622.
- [105] M. Rojas, S. Y. Yao, Y.-Z. Lin, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27456–27461.
- [106] a) W. A. Lim, F. M. Richards, R. O. Fox, *Nature* **1994**, *372*, 375–379; b) A. Musacchio, M. Saraste, M. Wilmanns, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 546–551; A. Musacchio, M. Noble, R. Paupit, R. Wierenga, M. Saraste, *Nature* **1992**, *359*, 851–855.
- [107] J. K. Chen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1041–1058; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 953–969.
- [108] J. K. Chen, W. S. Lane, A. W. Brauer, A. Tanaka, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12591–12592.
- [109] S. Feng, J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon, S. L. Schreiber, *Science* **1994**, *266*, 1241–1247.
- [110] A. P. Combs, T. M. Kapoor, S. Feng, J. K. Chen, L. F. Daude-Snorr, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 287–288.
- [111] S. Feng, T. M. Kapoor, F. Shiron, A. P. Combs, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 661–670.
- [112] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779–827.
- [113] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, *57*, 1167–1177.
- [114] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133–139.
- [115] Übersichten: a) S. Ayral-Kaloustian, J. S. Skotnicki, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 171–180; b) G. L. Bolton, J. S. Sebolt-Leopold, J. C. Hedges, *ibid.* **1994**, *29*, 165–174; c) J. E. Buss, J. C. Marsters, Jr., *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 787–791; d) F. Tamanoi, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 350–353; e) R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 313–315; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633–636.
- [116] H. W. Park, S. R. Boduluri, J. F. Moomaw, P. J. Casey, L. S. Beese, *Science* **1997**, *275*, 1800–1807.
- [117] K. S. Koblan, J. C. Culberson, S. J. Desolms, E. A. Giuliani, S. D. Mosser, C. A. Omer, S. M. Pitzenberger, M. J. Bogusky, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 681–688.
- [118] a) K. E. Wilson, R. M. Burk, T. Biftu, R. G. Ball, K. Hoogsteen, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7151–7158; b) J. D. Bergstrom, M. M. Kurtz, D. J. Rew, A. M. Amend, J. D. Karkas, R. G. Bosteor, V. S. Bansal, C. Dufresne, F. L. Van Middlesworth, O. D. Hensens, J. M. Liesch, D. L. Zink, K. E. Wilson, J. Onishi, J. A. Milligan, G. Bills, L. Kaplan, M. Nallin Omstead, R. G. Jenkins, L. Huang, M. S. Meinz, L. Quinn, R. W. Burg, T. Biftu, R. G. Ball, K. Hoogsteen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 80–84; c) C. Dufresne, K. E. Wilson, S. B. Singh, D. L. Zink, J. D. Bergstrom, D. Rew, J. D. Polishook, M. Meinz, L. Huang, K. C. Silverman, R. B. Lingham, M. Mojena, C. Cascales, F. Pelaez, J. B. Gibbs, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1923–1929; d) J. M. Dawson, J. E. Farthing, P. S. Marshall, R. F. Middleton, M. J. O'Neill, A. Shuttleworth, C. Styli, R. M. Tait, P. M. Taylor, H. G. Wildman, A. D. Buss, D. Langley, M. V. Hayes, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 639–647; e) P. J. Sidebottom, R. M. Highcock, S. J. Lane, P. A. Procopi, N. S. Watson, *ibid.* **1992**, *45*, 648–658; f) W. J. Blows, G. Foster, S. J. Lane, D. Noble, J. E. Piercy, P. J. Sidebottom, G. J. Webb, *ibid.* **1994**, *47*, 740–754.
- [119] D. Van der Pyl, J. Inokoshi, K. Shiomi, H. Yang, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1802–1805.
- [120] K. Shiomi, H. Yang, J. Inokoshi, D. Van der Pyl, A. Nakagawa, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 229–234.
- [121] a) E. M. Carreira, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10825–10826; b) K. C. Nicolaou, E. W. Yue, Y. Naniwa, F. De Ricondis, A. Nadin, J. E. Leresche, S. La Greca, Z. Yang, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2306–2309; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2184–2187.
- [122] D. A. Evans, J. C. Barrow, J. L. Leighton, A. J. Robichand, M. Sefkow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12 111–12 112.
- [123] J. B. Gibbs, D. L. Pampliano, S. D. Mosser, E. Rands, R. B. Lingham, S. B. Singh, E. M. Scolnick, N. E. Kohl, A. Oliff, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7617–7620.
- [124] K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, im Druck; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, im Druck.
- [125] a) M. Hara, M. Han, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3333–3337; b) M. Hara, K. Akasaka, S. Akinaga, M. Okabe, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh, F. Tamanoi, *ibid.* **1993**, *90*, 2281–2285.
- [126] a) P. Wipf, Y. Kim, H. Jahn, *Synthesis* **1995**, 1549–1561; b) I. Kapfer, N. J. Lewis, G. MacDonald, R. J. K. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2101–2104; c) L. Alcaraz, G. MacDonald, I. Kapfer, N. J. Lewis, R. J. K. Taylor, *ibid.* **1996**, *37*, 6619–6622.
- [127] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, T. E. Rawson, T. C. Somers, R. S. McDowell, C. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson, J. C. Marsters, Jr., *Science* **1993**, *260*, 1937–1942.
- [128] G. L. James, M. S. Brown, M. H. Cobb, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27 705–27 714.
- [129] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6221–6226.
- [130] N. E. Kohl, F. R. Wilson, S. D. Mosser, E. Guilian, S. J. Desolms, M. W. Conner, N. J. Anthony, W. J. Holtz, R. P. Gomez, T.-J. Lee, R. L. Smith, S. L. Graham, G. D. Hartman, J. B. Gibbs, A. Oliff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9141–9145.
- [131] a) D. V. Patel, E. M. Gordon, R. J. Schmidt, H. N. Weller, M. G. Young, R. Zahler, M. Barbacid, J. M. Carboni, J. L. Gullo-Brown, L. Hunikan, C. Ricca, S. Robinson, B. R. Seizinger, A. V. Tuomari, V. Manne, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 435–442; b) V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. Ricca, J. Gullo-Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995**, *10*, 1763–1779.
- [132] N. Yan, C. Ricca, J. Fletcher, T. Glover, B. R. Seizinger, V. Manne, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3569–3575.
- [133] M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192–2219; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056–2083.
- [134] H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911–937.
- [135] T. Kappes, H. Waldmann, *Liebigs Ann.* **1997**, 803–813.
- [136] B. Sauerbrei, T. Kappes, H. Waldmann, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *186*, 65–86.
- [137] a) H. Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 297–311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 294–308; b) M. Meldal, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 710–718.
- [138] J. W. Perich in *Peptides and Protein Phosphorylation* (Hrsg.: B. E. Kemp), CRC Press, Boca Raton, FL (USA), **1990**, S. 289.
- [139] P. J. Casey, *Science* **1995**, *268*, 221–225.
- [140] G. Milligan, M. Parenti, A. I. Magee, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 181–186.
- [141] R. R. Rando, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1300*, 5–16.
- [142] a) C.-D. Hu, K. Kariya, M. Tamada, K. Akasaka, M. Shirouzu, S. Yokoyama, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30 274–30 277; b) T. Okada, T. Masuda, M. Shinkai, K. Kariya, T. Kataoka, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4671–4678; c) D. Stokoe, F. McCormick, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2384–2396.
- [143] S. Moffet, B. Mouillac, H. Bonin, M. Bouvier, *EMBO J.* **1993**, *12*, 349–356.

- [144] P. B. Wedegaertner, H. R. Bourne, *Cell* **1994**, *77*, 1063–1070.
- [145] M. Schelhaas, S. Glomsda, M. Hänsler, H.-D. Jakubke, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 82–85; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 106–109.
- [146] T. Schmittberger, A. Cotté, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **1998**, im Druck.
- [147] H. Waldmann, E. Nägele, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2425–2428; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2259–2262.
- [148] H. Waldmann, F. Eisele, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [149] S. Shahinian, J. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813–3822.
- [150] L. Liu, G.-F. Jang, C. F. Farnsworth, K. Yokohama, J. A. Glomset, M. H. Gelb, *Methods Enzymol.* **1995**, *250*, 189–206.
- [151] P. Stöber, M. Schelhaas, E. Nägele, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 75–83.
- [152] H. Waldmann, M. Schelhaas, E. Nägele, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, H. Schroeder, J. R. Silvius, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2334–2337; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2238–2241.
- [153] R. S. Bhatnagar, J. I. Gordon, *Trends Cell Biol.* **1997**, *7*, 14–20.
- [154] S. McLaughlin, A. Achren, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 272–276.
- [155] J. R. Silvius, F. l'Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014–3022.
- [156] R. M. Peitzsch, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10436–10443.
- [157] C. A. Buser, C. T. Sigal, M. D. Resh, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13093–13101.
- [158] H. Schröder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nägele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102–13109.
- [159] H. Schroeder, R. Leventis, S. Shahinian, P. A. Walton, J. R. Silvius, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 647–660.
- [160] L. Liu, T. Dudler, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23269–23276.
- [161] a) M. D. Schaber, M. B. O'Hara, V. M. Garsky, S. D. Mosser, J. D. Bergstrom, S. L. Moores, M. S. Marshall, P. A. Friedman, R. A. F. Dixon, J. B. Gibbs, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14701–14704; b) S. L. Moores, M. D. Schaber, S. D. Mosser, E. Rands, M. B. O'Hara, V. M. Garsky, M. S. Marshall, D. L. Pompiliano, J. B. Gibbs, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14603–14610; c) D. L. Pompiliano, E. Rands, M. D. Schaber, S. D. Mosser, N. J. Anthony, J. B. Gibbs, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800–3807.
- [162] Y.-T. Ma, R. R. Rando, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6275–6279.
- [163] Y.-T. Ma, A. Chaudhuri, R. R. Rando, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11722–11777.
- [164] Y.-T. Ma, B. A. Gilbert, R. R. Rando, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2386–2393.
- [165] E. W. Tan, D. Pérez-Sala, F. J. Canana, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* **1994**, *266*, 10719–10722.
- [166] R. C. Stephenson, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 16248–16254.
- [167] P. A. Hargrave, J. H. McDowell, *FASEB J.* **1992**, *6*, 2323–2331.
- [168] O. G. Kisselev, M. V. Ermolaeva, N. Gautam, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21399–21402.
- [169] A. Scheer, P. Gierschik, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4952–4961.
- [170] T. Matsuda, T. Takao, Y. Shimonishi, A. Murata, T. Asano, T. Yoshizawa, Y. Fukada, *J. Biol. Chem.* **1995**, *269*, 30358–30363.
- [171] J. Ding, D. J. Lu, D. Pérez-Sala, Y.-T. Ma, J. F. Maddox, B. A. Gilbert, J. A. Badwey, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16837–16844.
- [172] M. R. Philips, M. R. Phillinger, R. Staud, C. Volker, M. G. Rosenfeld, G. Weissmann, J. F. Starck, *Science* **1993**, *259*, 977–980.
- [173] Y.-T. Ma, Q.-M. Shi, Y. H. Lim, S. H. McGrail, J. A. Ware, R. R. Rando, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5414–5420.
- [174] H. Akbar, W. Wang, R. Kornhauser, C. Volker, J. B. Stock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 868–872.
- [175] G. M. Bokoch, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 212–218.
- [176] J. A. Thissen, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13780–13783.
- [177] S. Bhattacharya, L. Chen, J. R. Broch, S. Powers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2984–2988.
- [178] a) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130; b) L. A. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964–969; c) S. Hakomori, *Adv. Cancer Res.* **1989**, *52*, 257–331; d) T. Feizi, *Nature* **1985**, *314*, 53–57; e) J. C. Paulson in *The Receptors*, Vol. 2 (Hrsg.: M. Conn), Academic Press, New York, **1985**, S. 131–219.
- [179] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E.-N. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5286–5293.
- [180] W. Kosch, J. März, H. Kunz, *React. Polym.* **1994**, *22*, 181–194.
- [181] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813–826.
- [182] a) M. Christiansen, M. Meldal, H. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1453–1460; b) A. M. Jansson, K. J. Jensen, M. Meldal, J. Lomako, W. M. Lomako, C. E. Olsen, K. Bock, *ibid.* **1996**, 1001–1006.
- [183] a) M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077–3080; b) M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. C. Palcic, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1849–1850.
- [184] a) H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184–201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 155–172; b) R. R. Schmidt, *ibid.* **1986**, *98*, 213–236 bzw. **1986**, *25*, 212–235; c) K. Toshima, K. Tasuda, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503–1531.
- [185] a) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, *269*, 202–204; b) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520–1522; c) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeReose, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 449–450.
- [186] a) M. K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen, H. Elsner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1994**, 1299–1310; b) H. Franzky, M. K. Christensen, R. M. Jorgensen, M. Meldal, H. Cordes, S. Mouritsen, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 21–40.
- [187] a) P. Braun, H. Waldmann, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 197–207; b) *Synlett* **1992**, 39–40.
- [188] G. Braun, P. Braun, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3111–3114.
- [189] a) H. Kunz, D. Kowalczyk, P. Braun, G. Braun, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 353–355; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 336–338; b) J. Eberling, P. Braun, D. Kowalczyk, M. Schultz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2638–2646.
- [190] a) D. Cantacuzene, S. Attal, S. Bay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 197–200; b) D. Cantacuzene, S. Attal, S. Bay, *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, *50*, 231–236; c) H. Ishii, K. Unabashi, Y. Mimura, Y. Inoue, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 3042–3043.
- [191] M. Schulz, P. Hermann, H. Kunz, *Synlett* **1992**, 37–38.
- [192] M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1135–1136.
- [193] K. Witte, P. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2114–2118.
- [194] R. Schneider, M. Hammel, E. C. Berger, O. Ghisalba, J. Nuesch, D. Gygax, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 589–600.
- [195] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507–2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [196] Kurze Übersicht: A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 188–191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 178–181.
- [197] a) S.-H. Wu, M. Shimazaki, C.-C. Lin, W. J. Moore, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 106–108; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 88–90; b) C. C. Lin, M. Shimazaki, M.-P. Heck, S. Aoki, R. Wang, T. Kimura, H. Ritzén, S. Takayama, S.-H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6826–6840.
- [198] U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359–362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 321–324.
- [199] G. Baisch, R. Öhrlein, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1949–1952; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1812–1815.
- [200] U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1104–1106; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 990–993.
- [201] a) T. Toyokuni, A. K. Singhal, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 231–242; b) B. M. Longenecker, M. Reddish, R. Koganty, G. D. MacLean, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**, *690*, 276–291.
- [202] a) *Protein Phosphorylation* (Hrsg.: F. Marks), VCH, Weinheim, **1996**; b) T. Hunter, M. Karin, *Cell* **1992**, *70*, 375–387; c) E. G. Krebs, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1173–1180; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1122–1129; d) E. H. Fischer, *ibid.* **1993**, *105*, 1181–1188 bzw. **1993**, *32*, 1130–1137.
- [203] a) P. F. Alewood, J. W. Perich, R. B. Johns, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 987–990; *ibid.* **1986**, *27*, 1373–1376; 1377–1380; b) M. Tsukamoto, R. Kita, K. Ishiguro, T. Uchida, K. Sato, *ibid.* **1991**, *32*, 7083–7086.

- [204] K. Ishiguro, A. Omori, K. Sato, K. Tomizawa, T. Uchida, *Neurosci. Lett.* **1991**, *128*, 195–198.
- [205] G. Shapiro, D. Büchler, C. Dalvit, P. Frey, M. del Carmen Fernandez, B. Gomez-Lor, E. Pombo-Villar, U. Stauss, R. Swoboda, C. Warichel, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 147–156.
- [206] a) A. Paquet, M. Johns, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 97–103; b) S. Ferrari, W. Bannworth, S. J. Morley, N. F. Totty, G. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7282–7286.
- [207] T. Vorherr, W. Bannwarth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2661–2664.
- [208] a) T. Wakamiya, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, *Chem. Lett.* **1994**, 1099–1102; b) T. Wakamiya, T. Nishida, R. Togashi, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 465–468; c) T. Wakamiya, R. Togashi, T. Nishida, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Y. Kumagaye, K. Nakajima, K. Nagata, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 135–145.
- [209] a) D. Sebastian, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2927–2930; b) D. Sebastian, A. Heuser, S. Schulze, H. Waldmann, *Synthesis* **1997**, 1098–1108.
- [210] T. Zelinski, T. Pathak, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [211] a) H. Waldmann, A. Heuser, S. Schulze, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8725–8728; b) Lit. [209b]
- [212] R. L. Stone, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31323–31326, zit. Lit.
- [213] J. W. Perich, F. Meggio, L. A. Pinna, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 143–150.
- [214] T. Tagawa, T. Kuroki, P. K. Vogt, K. Chida, *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 255–263.
- [215] a) W.-K. Liu, W. T. Moore, R. T. Williams, F. L. Hall, S.-H. Yen, *J. Neurosci. Res.* **1993**, 371–376; b) W.-K. Liu, S.-H. Yen, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1131–1139; c) P. Seubert, M. Mawal-Dewan, R. Barbour, R. Jakes, M. Goedert, G. V. W. Johnson, J. M. Litersky, D. Schenk, I. Lieberburg, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18917–18922; d) K. Ishiguro, K. Sato, M. Takamatsu, J. Park, T. Uchida, K. Imakori, *Neurosci. Lett.* **1995**, *202*, 81–84.
- [216] a) G. W. Hart, L. K. Kreppel, F. I. Comer, C. S. Arnold, D. M. Snow, Z. Ye, X. Cheng, D. DellaMauna, D. S. Caine, B. J. Earles, Y. Akimoto, R. N. Cole, B. K. Hayes, *Glycobiology* **1996**, *6*, 711–716; b) G. W. Hart, K. D. Greis, L.-Y. Dennis Dong, M. A. Blumberg, R.-Y. Chou, M.-S. Jiang, E. P. Roquemore, D. M. Snow, L. K. Kreppel, R. C. Cole, B. K. Hayes, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1637–1645.
- [217] W. G. Kelly, M. E. Dahmus, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10416–10424.
- [218] a) T. Pohl, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1829–1832; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1720–1723; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6702–6710.
- [219] L. Medina-Vera, R. S. Haltiwanger, *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 340.
- [220] a) M. Salas, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 39–71; b) L. Blanco, J. M. Lázaro, M. de Vega, A. Bonnin, M. Salas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12198–12202.
- [221] K. A. Henningfeld, T. Arslan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11701–11714.
- [222] B. A. Juodk, *Nucleosides Nucleotides* **1984**, *3*, 445–483.
- [223] E. Kuyt-Yeheskiely, C. M. Tromp, A. W. M. Lefebre, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6515–6523.
- [224] a) H. Hotoda, Y. Ueno, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2117–2120; b) C. M. Dreef-Tromp, H. van der Elst, J. E. van den Boogaart, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2435–2439.
- [225] C. M. Dreef-Tromp, J. C. M. van der Maarel, H. van der Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4015–4020.
- [226] a) J. Robles, E. Pedroso, A. Grandas, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4449–4452; b) J. Robles, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2482–2486.
- [227] Y. Ueno, R. Saito, T. Hata, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4451–4457.
- [228] H. Waldmann, S. Gabold, *Chem. Commun.* **1997**, 1861–1862.
- [229] H. Waldmann, A. Reidel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 642–644; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 647–649.
- [230] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19–46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17–42.
- [231] M. Inoue, A. Kishimoto, Y. Takai, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7610–7616.
- [232] Y. Nishizuka, *Nature* **1984**, *308*, 693–698.
- [233] Y. Nishizuka, *Science* **1992**, *258*, 607–614.
- [234] M. J. Clemens, I. Trayner, J. Menaya, *J. Cell Sci.* **1992**, *103*, 881–887.
- [235] M. J. Hubbard, P. Cohen, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 172–177.
- [236] C. L. Ashendel, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *822*, 219–242.
- [237] L. V. Dekker, P. J. Parker, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 73–77.
- [238] H. Hug, T. F. Sarre, *Biochem. J.* **1993**, *291*, 329–343.
- [239] M. Gschwendt, S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H.-J. Mueller, F.-J. Johannes, *FEBS Lett.* **1996**, *392*, 77–80.
- [240] Y. Asaoka, S. Nakamura, K. Yoshida, Y. Nishizuka, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 73–77.
- [241] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7847–7851.
- [242] M. Castagna, *Biol. Cell* **1987**, *59*, 3–14.
- [243] U. Kikkawa, A. Kishimoto, Y. Nishizuka, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 31–44.
- [244] D. J. Burns, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18330–18338.
- [245] A. C. Newton, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 1–25.
- [246] A. M. Jeffrey, R. M. J. Liskamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 241–245.
- [247] P. A. Wender, K. F. Koehler, Nancy A. Sharkey, M. L. Dell'Aquila, P. M. Blumberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4214–4218.
- [248] A. Itai, Y. Kato, N. Tomioka, Y. Itaka, Y. Endo, M. Hasegawa, K. Shudo, H. Fujiki, S.-I. Sakai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3688–3692.
- [249] P. A. Wender, C. M. Cribbs, K. F. Koehler, N. A. Sharkey, C. L. Herald, Y. Kamano, G. R. Pettit, P. M. Blumberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7197–7201.
- [250] H. Nakamura, Y. Kishi, M. A. Pajares, R. R. Rando, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9672–9676.
- [251] R. R. Rando, Y. Kishi, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2211–2218.
- [252] Y. Ono, T. Fujii, K. Ogita, K. Igarashi, T. Kuno, C. Tanaka, U. Kikkawa, Y. Nishizuka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4868–4871.
- [253] A. F. G. Quest, E. S. G. Bardes, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2961–2970.
- [254] P. A. Wender, K. Irie, B. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 239–243.
- [255] K. Irie, F. Koizumi, Y. Iwata, T. Ishii, Y. Yanai, Y. Nakamura, H. Ohigashi, P. A. Wender, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 453–458.
- [256] G. Zhang, M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, J. H. Hurley, *Cell* **1995**, *81*, 917–924.
- [257] a) P. A. Wender, H. Kogen, H. Y. Lee, J. D. Munger, R. S. Wilhelm, P. D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8957–8958; b) P. A. Wender, K. D. Rice, M. E. Schnute, *ibid.* **1997**, *119*, 7897–7898; c) K. Irie, T. Ishii, H. Ohigashi, P. A. Wender, B. L. Miller, N. Takeda, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2164–2173.
- [258] P. A. Wender, K. Irie, B. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 239–243.
- [259] J. B. Weinberg, *Science* **1981**, *213*, 655–657.
- [260] C. G. Tepper, S. Jayadev, B. Liu, A. Bielawska, R. Wolff, S. Yonehara, Y. A. Hannun, M. F. Seldin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8443–8447.
- [261] J. M. Backer, G. L. King, *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 1267–1277.
- [262] M. Fabbri, S. Bannykh, W. E. Balch, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26848–26857.
- [263] M. Todaka, H. Hayashi, T. Imanaka, Y. Mitani, S. Kamohara, K. Kishi, K. Tamaoka, F. Kanai, M. Shichiri, N. Morii, S. Narumiya, Y. Ebina, *Biochem. J.* **1996**, *315*, 875–882.
- [264] C. J. Lowenstein, S. H. Snyder, *Cell* **1992**, *70*, 705–707.
- [265] S. Hortalano, A. M. Genaro, L. Boscá, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24937–24940.
- [266] K. Möller, D. Benz, D. Perrin, H.-D. Söling, *Biochem. J.* **1996**, *314*, 181–187.
- [267] J. Quick, B. Saha, P. E. Driedger, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8549–8552.
- [268] M. F. Semmelhack, H. Rhee, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1395–1398.
- [269] M. Mascal, C. J. Moody, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 823–830.

- [270] a) T. P. Kogan, T. C. Somers, M. C. Venuti, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6623–6632; b) D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [271] T. Masuda, S. Nakatsuka, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 2257–2260.
- [272] A. P. Kozikowski, K. Sato, A. Basu, J. S. Lazo, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6228–6234.
- [273] Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, M. Hasegawa, S. Sakai, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5905–5924.
- [274] M. F. Semmelhack, H. Rhee, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1399–1402.
- [275] H. Muratake, M. Natsume, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2265–2268.
- [276] K. Irie, S. Okuno, F. Koizumi, K. Koshimizu, H. Nishino, A. Iwashima, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10817–10830.
- [277] K. Irie, N. Hagiwara, H. Tokuda, K. Koshimizu, *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 547–552.
- [278] R. A. Murphy, *FASEB J.* **1994**, *8*, 311–314.
- [279] M. Nishikawa, S. Shirakawa, R. S. Adelestein, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8978–8983.
- [280] M. A. Hill, M. J. Davis, J. Song, H. Zou, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *276*, 867–874.
- [281] H.-L. Shieh, H. Hansen, J. Zhu, H. Riedel, *Mol. Carcinogen.* **1995**, *12*, 166–176.
- [282] N. J. Leidenheimer, S. J. McQuilkin, L. D. Hahner, P. Whiting, R. A. Harris, *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 1116–1123.
- [283] W.-W. Lin, D.-M. Chuang, *Neurochem. Int.* **1993**, *23*, 53–60.
- [284] Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, A. Itai, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1841–1855.
- [285] Y. Endo, M. Yamaguchi, M. Hirano, K. Shudo, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1138–1140.
- [286] A. P. Kozikowski, D. Ma, Y. Pang, P. Shum, V. Likic, P. K. Mishra, S. Macura, A. Basu, J. S. Lazo, R. G. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3957–3965.
- [287] A. P. Kozikowski, D. Ma, L. Du, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6666–6672.
- [288] K. Irie, T. Isaka, Y. Iwata, Y. Yanai, Y. Nakamura, F. Koizumi, H. Ohigashi, P. A. Wender, Y. Satomi, H. Nishino, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10733–10743.
- [289] B. Ganong, C. Loomis, Y. Hannun, R. M. Bell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1184–1188.
- [290] J. Florin-Christensen, M. Florin-Christensen, J. M. Delfino, H. Rasmussen, *Biochem. J.* **1993**, *289*, 783–788.
- [291] R. M. Bell, D. J. Burns, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4661–4664.
- [292] N. Rudra, N. Singh, M. Gupta, *J. Biosci.* **1996**, *21*, 477–485.
- [293] R. Z. Kozlowski, M. L. J. Ashford, *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *107*, 34–43.
- [294] G. Krauter, C.-W. von der Lieth, R. Schmidt, E. Hecker, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*, 417–427.
- [295] S. Armstrong, C. E. Ganote, *Cardiovasc. Res.* **1994**, *28*, 1700–1706.
- [296] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi, R. Masuma, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 275–282.
- [297] H. Kase, K. Iwahashi, Y. Matsuda, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1059–1065.
- [298] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, F. Tomita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *135*, 397–402.
- [299] H. Kase, K. Iwahashi, M. Kaneko, Y. Matsuda, C. Murakata, S. Nakanishi, A. Sato, K. Yamada, M. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *142*, 436–440.
- [300] J. M. Herbert, E. Seban, J. P. Maffrand, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 189–195.
- [301] J. T. Link, S. Raghavan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 552–553.
- [302] J. T. Link, S. Raghavan, M. Gallant, S. J. Danishefsky, T. C. Chou, L. M. Ballas, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2825–2842.
- [303] J. L. Wood, B. M. Stoltz, H.-J. Dietrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10413–10414.
- [304] J. L. Wood, B. M. Stoltz, S. N. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10656–10657.
- [305] T. Tamaoki, H. Nakano, *Biotechnology* **1990**, *8*, 732–735.
- [306] J. H. Hartenstein, J. Aranda, H. Barth, H. J. Betché, J. Kleinschroth, R. Reck, C. Rudolph, U. Trostmann, C. Schächtele, *Perspect. Med. Chem.* **1993**, *99*–118.
- [307] T. Meyer, U. Regenass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti, A. Matter, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 851–856.
- [308] P. D. Davis, C. H. Hill, E. Keech, G. Lawton, J. S. Nixon, A. D. Sedgwick, J. Wadsworth, D. Westmacott, S. E. Wilkinson, *FEBS Lett.* **1989**, *259*, 61–63.
- [309] D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, A. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, L. Duhamel, D. Charon, J. Kirillovsky, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5771–5781.
- [310] P. D. Davis, C. H. Hill, G. Lawton, J. S. Nixon, S. E. Wilkinson, S. A. Hurst, E. Keech, S. E. Turner, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 177–184.
- [311] P. D. Davis, L. H. Elliott, W. Harris, C. H. Hill, S. A. Hurst, E. Keech, M. K. H. Kumar, G. Lawton, J. S. Nixon, S. E. Wilkinson, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 994–1001.
- [312] T. Inoguchi, R. Battan, E. Handler, J. R. Sportsman, W. Heath, G. L. King, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11059–11063.
- [313] H. Ishii, M. R. Jirousek, D. Koya, C. Takagi, P. Xia, A. Clermont, S.-E. Bursell, T. S. Kern, L. M. Ballas, W. F. Heath, L. E. Stramm, E. P. Feener, G. L. King, *Science* **1996**, *272*, 728–731.
- [314] P. Kulanthaivel, Y. F. Hallock, C. Boros, S. M. Hamilton, W. P. Janzen, L. M. Ballas, C. R. Loomis, J. B. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6452–6453.
- [315] P. Kulanthaivel, Y. F. Hallock, C. Boros, S. M. Hamilton, W. P. Janzen, L. M. Ballas, C. R. Loomis, J. B. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10468–10468.
- [316] S. Ohsima, M. Yanagisawa, A. Katoh, T. Fujii, T. Sano, S. Matsukuma, T. Fuyumai, M. Fujui, K. Watanabe, K. Yokose, M. Arisawa, T. Okuda, *J. Antibiotics* **1994**, *47*, 639–647.
- [317] K. C. Nicolau, M. E. Bunnage, K. Koide, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8402–8403.
- [318] K. C. Nicolau, K. Koide, M. E. Bunnage, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 454–466.
- [319] J. W. Lampe, P. F. Hughes, C. K. Biggers, S. H. Smith, H. Hu, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5147–5148.
- [320] J. W. Lampe, P. F. Hughes, C. K. Biggers, S. H. Smith, H. Hu, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4572–4581.
- [321] C. P. Adams, S. M. Fairway, C. J. Hardy, D. E. Hibbs, M. B. Hursthouse, A. D. Morley, B. W. Sharp, N. Vicker, I. Warner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2355–2362.
- [322] K. Koide, M. E. Bunnage, L. G. Paloma, J. R. Kanter, S. S. Taylor, L. L. Brunton, K. C. Nicolau, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 601–608.
- [323] J. M. Defauw, M. M. Murphy, G. E. Jagdman, Jr., H. Hu, J. W. Lampe, S. P. Hollinshead, T. J. Mitchell, H. M. Crane, J. M. Heerding, J. S. Mendoza, J. E. Davis, J. W. Darges, F. R. Hubbard, S. E. Hall, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5215–5227.
- [324] T. F. Franke, D. R. Kaplan, L. C. Cantley, *Cell* **1997**, *88*, 435–437.
- [325] S. Spiegel, D. Foster, R. Kolesnick, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1996**, *8*, 159–167.
- [326] B. A. Hemmings, *Science* **1997**, *275*, 628–630.
- [327] C. A. Alter, B. A. Wolf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *208*, 190–197.
- [328] B. A. Wolf, R. J. Konrad, C. A. Alter in *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research* (Hrsg.: P. R. Flatt, S. Lenzen), **1993**.
- [329] G. D. Prestwich, J. F. Mareecek, R. J. Mourey, A. B. Theibert, C. D. Ferris, S. K. Danoff, S. H. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1822–1825.
- [330] P. F. Worley, J. M. Baraban, S. Supattapone, V. S. Wilson, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12132–12136.
- [331] C. D. Ferris, R. L. Huganir, S. Supattapone, S. H. Snyder, *Nature* **1989**, *342*, 87–89.
- [332] G. D. Prestwich, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 503–513.
- [333] B. Mehrotra, J. T. Elliot, J. Chen, J. D. Olszewski, A. A. Profit, A. Chaudhary, M. Fukuda, K. Mikoshiba, G. D. Prestwich, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4237–4244.
- [334] K. M. Ferguson, M. A. Lemmon, J. Schlessinger, P. B. Sigler, *Cell* **1996**, *83*, 1037–1046.
- [335] V. A. Estevez, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1623–1626.
- [336] A. B. Theibert, V. A. Estevez, R. J. Mourey, J. F. Mareecek, R. K. Barrow, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9071–9079.
- [337] V. A. Estevez, G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9885–9887.
- [338] S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Ogasawara, M. Hirata, T. Kanematsu, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 189–206.

- [339] M. Hirata, Y. Watanabe, T. Ishimatsu, T. Ikebe, Y. Kimura, K. Yamaguchi, S. Ozaki, T. Koga, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20303–20308.
- [340] M. Hirata, F. Yanaga, T. Koga, T. Ogasawara, Y. Watanabe, S. Ozaki, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8404–8407.
- [341] Y. Watanabe, M. Hirata, T. Ogasawara, T. Koga, S. Ozaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 399–402.
- [342] L. P. Hammonds-Odie, T. R. Jackson, A. A. Profit, I. J. Blader, C. Turck, G. D. Prestwich, A. B. Theibert, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18859–18868.
- [343] M. Vajanaphanich, C. Schultz, M. T. Rudolf, M. Wasserman, P. Enyedi, A. Craxton, S. B. Shears, R. Y. Tsien, K. E. Barrett, A. Traynor-Kaplan, *Nature* **1994**, *371*, 711–714.
- [344] D. J. Jenkins, A. M. Riley, B. V. L. Potter, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7719–7726.
- [345] K. K. Reddy, M. Saady, J. R. Falck, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3385–3390.
- [346] A. Toker, M. Meyer, K. K. Reddy, J. R. Falck, R. Aneja, D. J. Burns, L. M. Ballas, L. C. Cantley, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32358–32367.
- [347] J. Chen, A. A. Profit, G. D. Prestwich, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6305–6312.
- [348] Q.-M. Gu, G. D. Prestwich, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8642–8647.
- [349] M. Glaser, S. Wanaski, C. A. Buser, V. Bogulavsky, W. Rashidzada, A. Morris, M. Rebecchi, S. F. Scarlata, L. W. Runnels, G. D. Prestwich, J. Chen, A. Aderem, J. Ahn, S. McLaughlin, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26187–26193.
- [350] Übersichten: a) K. J. Murray, W. J. Coates, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1994**, *29*, 255–264; b) T. Hunter, *Cell* **1995**, *80*, 225–236; c) D. Barford, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 407–412; d) E. B. Fanman, M. A. Saper, *ibid.* **1996**, *21*, 413–417.
- [351] W. Vogel, R. Lammers, J. Huang, A. Ullrich, *Science* **1993**, *259*, 1611–1614.
- [352] Ser/Thr-Phosphatasen: a) M. P. Egloff, P. T. W. Cohen, P. Reinemer, D. Barford, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 942–959; b) J. Goldberg, H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan, *Nature* **1995**, *376*, 745–753; c) C. R. Kissinger, H. E. Parge, D. R. Knighton, C. T. Lewis, L. A. Pelletier, A. Tempcyk, V. J. Kalish, K. D. Tucker, R. E. Showalter, E. W. Moonaw, L. N. Gastinel, N. Habuka, X. H. Chen, F. Maldonado, J. E. Barker, R. Bacquet, J. E. Villafranca, *Nature* **1995**, *378*, 641–644; d) J. P. Griffith, J. L. Kim, E. E. Kim, M. D. Sintchak, J. A. Thomsen, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, P. R. Caron, K. Hsiao, M. A. Navia, *Cell* **1995**, *82*, 507–522. – Tyr-Phosphatasen: e) M. Zhang, R. L. Van Etten, C. V. Stauffacher, *Biochemistry* **1994**, *33*, 11097–11105; f) D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science* **1994**, *236*, 1379–1404; g) J. A. Stuckey, H. L. Schubert, E. B. Fauman, Z. Y. Zhang, J. E. Dixon, M. A. Saper, *Nature* **1994**, *370*, 571–575; h) Z. C. Jia, D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science* **1995**, *268*, 1754–1758; i) A. M. Bilwes, J. den Hertog, T. Hunter, J. P. Noel, *Nature* **1996**, *382*, 555–559; j) J. Yuvaniyama, J. M. Denu, J. E. Dixon, M. A. Saper, *Science* **1996**, *272*, 1328–1331; k) E. B. Fanman, C. Yuvaniyama, H. L. Schubert, J. A. Stuckey, M. A. Saper, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18780–18788.
- [353] K. Tachibana, P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand, F. J. Schmitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469–2471.
- [354] X.-C. Cheng, T. Kihara, H. Kusakabe, J. Magae, Y. Kobayashi, R.-P. Fang, Z.-F. Ni, Y.-C. Shen, K. Ko, I. Yamaguchi, K. Isono, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 907–909.
- [355] Y.-M. Li, C. Mackintosh, J. E. Cassida, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1435–1443.
- [356] Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, S. Fujita, T. Furuya, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2780–2781.
- [357] a) K. L. Rinehart, K.-I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8557–8558; b) M. Namikoshi, B. W. Choi, R. Sakai, F. Sun, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, W. R. Evans, P. Cruz, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2349–2357.
- [358] M. Namikoshi, F. Sun, B. W. Choi, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, W. R. Evans, V. R. Beasley, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3671–3679.
- [359] R. Nishiaki-Matsushima, T. Ohta, S. Nishiaki, M. Suganuma, K. Kohyama, T. Ishikawa, W. W. Carmichael, H. Fujiki, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1992**, *118*, 420–424.
- [360] C. Bialoju, A. Takai, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 283–290.
- [361] M. Isobe, Y. Ichikawa, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 963–966.
- [362] Y. Ichikawa, M. Isobe, D.-L. Bai, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4737–4748.
- [363] Y. Ichikawa, M. Isobe, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4749–4758.
- [364] Y. Ichikawa, M. Isobe, H. Masaki, T. Kawai, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4759–4766.
- [365] M. Isobe, Y. Ichikawa, D.-L. Bai, H. Masaki, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4767–4776.
- [366] A. Takai, G. Mieskes, *Biochem. J.* **1991**, *275*, 233–239.
- [367] M. C. Raff, *Nature* **1992**, *356*, 379–399.
- [368] R. Boe, B. T. Gjertsen, O. K. Vintermyr, G. Houge, M. Lanotte, S. O. Doskeland, *Exp. Cell. Res.* **1991**, *195*, 237–246.
- [369] Y. Ohoka, Y. Nakai, M. Mukai, M. Iwata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *197*, 916–921.
- [370] A. Lerga, B. Belandia, M. D. Delgado, M. A. Cuadrado, C. Richard, J. M. Ortiz, J. Martin-Perez, J. Leon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 889–885.
- [371] K. B. Marcu, S. A. Bossone, A. J. Patel, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 809–860.
- [372] N. Begum, L. Ragolia, M. Srinivasan, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 214–220.
- [373] C. M. Rondinone, U. Smith, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18148–18153.
- [374] N. Chajry, P.-M. Martin, C. Cocher, Y. Berthois, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 97–102.
- [375] L. Dupont-Wallois, P. E. Sautiere, C. Cocquerelle, B. Baileul, A. Delacourte, M. L. Caillet-Boudin, *FEBS Lett.* **1995**, *357*, 197–201.
- [376] H. Ishihara, B. L. Martin, D. L. Brautigan, H. Karahashi, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura, D. J. Hartshorne, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 871–877.
- [377] D. A. Evans, J. R. Gage, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9434–9453; weitere Synthese: N. Tanimoto, S. W. Gerritz, A. Sawabe, T. Noda, S. A. Fill, S. Masamune, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 674–677; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 673–675.
- [378] Q. Song, M. F. Lavin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 47–55.
- [379] Y. Luo, D. Kessel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *221*, 72–76.
- [380] R. Gopalakrishna, Z. H. Chen, U. Gundimeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 950–957.
- [381] T. P. Thomas, R. Gopalakrishna, W. B. Anderson, *Methods Enzymol.* **1986**, *141*, 399–411.
- [382] H. Kanety, R. Feinstein, M. Z. Papa, R. Hemi, A. Karasik, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23780–23784.
- [383] A. Kumar, M. H. Beresini, P. Dhawan, K. D. Mehta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *222*, 445–452.
- [384] S. Pugazhenthi, B. Yu, R. R. Gali, R. L. Khandelwal, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1179*, 271–276.
- [385] Synthese von Microcystin-LA: J. M. Humphrey, J. B. Aggen, A. R. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11759–11770; siehe auch: H. Y. Kim, K. Stein, P. L. Toogood, *Chem. Commun.* **1996**, 1683–1684; Synthese von Nodularinanaloga: A. P. Mehrotra, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6915–6918; Synthese von Microcystin/Nodularin-Analoga: C. Taylor, R. J. Quinn, P. Alewood, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2107–2112.
- [386] Siehe z. B. a) F. D'Aniello, A. Mann, M. Taddei, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4870–4871; b) N. Sin, J. Kallmerten, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5645–5648; c) *ibid.* **1996**, *37*, 2349–2352.
- [387] P. Wipf, A. Cunningham, R. L. Rice, J. S. Lazo, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 165–177.
- [388] a) S. Nishiaki, H. Fujiki, M. Suganuma, H. Furuya-Suguri, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1837–1841; b) A. Takai, M. Murata, K. Torigoe, M. Isobe, G. Mieskes, T. Yasumoto, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 539–544; c) K. Sasaki, M. Murata, T. Yasumoto, G. Mieskes, A. Takai, *Biochem. J.* **1994**, *288*, 259–262.
- [389] a) R. J. Quinn, C. Taylor, M. Suganuma, H. Fujiki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1029–1034; b) C. Taylor, R. J. Quinn, R.

- McCulloch, R. Nishiwaki-Matsushima, H. Fujiki, *ibid.* **1992**, *2*, 299–302.
- [390] M. Akamatsu, P. P. Roller, L. Chen, Z.-Y. Zhang, B. Ye, T. R. Burke, Jr., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 157–163.
- [391] G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 418–422.
- [392] a) M. K. Rosen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 413–430; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 384–400; b) S. L. Schreiber, *Science* **1991**, *251*, 283–287; c) J. Kunz, M. N. Hall, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 334–338.
- [393] a) C.-H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213–223; b) D. J. Austin, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 131–136.
- [394] a) D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024; b) M. N. Prusky, D. M. Spencer, T. M. Kapoor, H. Miyake, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 163–172.
- [395] a) R. Brent, M. Ptashne, *Cell* **1985**, *43*, 729–736; b) L. Keegan, G. Gill, M. Ptashne, *Science* **1986**, *231*, 699–704.
- [396] S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, *382*, 822–826.
- [397] M. A. Farrar, J. Alberola-Illa, R. M. Perlmutter, *Nature* **1996**, *383*, 178–181.
- [398] Z. Luo, G. Tzivion, P. J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, J. Avruch, *Nature* **1996**, *383*, 181–185.
- [399] P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607.
- [400] V. M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J. F. Amara, T. Keenan, S. R. Magari, T. Phillips, N. L. Courage, F. Cerasoli, D. A. Holt, M. Gilman, *Nature Medicine* **1996**, *2*, 1028–1032.