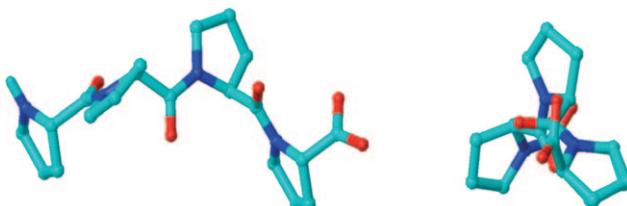


# Adressierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch niedermolekulare Verbindungen: ein Pro-Pro-Dipeptidmimetikum mit PPII-Helixkonformation als Modul für die Synthese PRD-bindender Liganden\*\*

Jan Zaminer, Christoph Brockmann, Peter Huy, Robert Opitz, Cédric Reuter, Michael Beyermann, Christian Freund, Matthias Müller, Hartmut Oschkinat, Ronald Kühne\* und Hans-Günther Schmalz\*

Die Erkennung prolinreicher Motive (PRMs) durch spezialisierte Proteindomänen (so genannte PRDs) anderer Proteine wird in der Natur für eine Vielzahl biologischer Prozesse genutzt. Solche Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen unter anderem bei der Signalübertragung über Tyrosinkinase-Rezeptoren<sup>[1–3]</sup> der Endozytose,<sup>[4]</sup> Transformationen des Cytoskeletts<sup>[5,6]</sup> sowie bei Transkription<sup>[7]</sup> und Spleißen<sup>[8,9]</sup> eine Rolle. In den letzten Jahren wurden auch einige PRDs als mögliche therapeutische Zielstrukturen identifiziert, die durch synthetische niedermolekulare Verbindungen („small molecules“) adressierbar sein könnten. Ein Beispiel ist die Fyn-SH3-Domäne, die für die Regulation der Enzymaktivität und des Zusammenbaus signalgebender Proteinkomplexe wichtig ist.<sup>[8]</sup>

Ein typisches Merkmal aller PRMs ist ihre Neigung, eine linksgängige Polyprolin-II(PPII)-Helix zu bilden, die in der Draufsicht einem trigonalen Prisma ähnelt (Abbildung 1).<sup>[9]</sup>



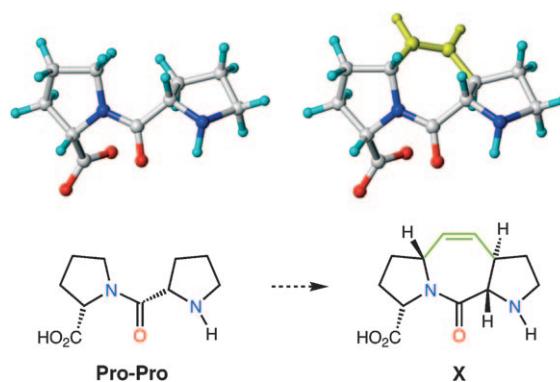
**Abbildung 1.** Ideale PPII-Helix von der Seite (links) und in der Draufsicht (rechts) betrachtet; cyan C, blau N, rot O.

PPII-Helices haben eine Ganghöhe (Pitch) von  $9.3 \text{ \AA}$  und drei Aminosäureeinheiten pro Umdrehung. Die Torsionswinkel betragen typischerweise  $\Phi = -75^\circ$  und  $\Psi = 145^\circ$ .<sup>[10]</sup> Bemerkenswert ist das vollständige Fehlen von Wasserstoffbrücken innerhalb der Hauptkette.

Strukturbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Polyprolinabschnitte der PRMs eine PPII-Konformation einnehmen müssen, um von den PRDs erkannt zu werden. Die Wechselwirkung wird zudem durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen einem konservierten Tryptophan (auf der Oberfläche der Domäne) und einem Rückgrat-Carbonylsauerstoffatom des zentralen PRM des Peptidliganden maßgeblich verstärkt.<sup>[11]</sup>

Im Rahmen eines Projektes, das die Entwicklung niedermolekularer Verbindungen zur spezifischen Beeinflussung intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen zum Ziel hat, waren wir an strukturell definierten Diprolinmimetika interessiert, die eine PPII-Helixkonformation aufweisen und sich in Peptidketten oder andere molekulare Konstrukte einbauen lassen. Nach unserem Wissen haben entsprechende Versuche in anderen Laboratorien<sup>[12]</sup> bislang nicht zur Entwicklung von Systemen mit befriedigenden Eigenschaften geführt.

Die Betrachtung von Molekülmodellen brachte uns auf die Idee, die PPII-Helix durch Einführung einer  $C_2$ -Brücke zwischen zwei benachbarten Prolinresten zu fixieren (Abbildung 2). Eine computergestützte Modellierung legte nahe,



**Abbildung 2.** Diprolin in der PPII-Helixkonformation (links) und das konformativ fixierte Analogon X (rechts). Die Rückgratwinkel von X ( $\Phi = -78^\circ$  und  $\Psi = 146^\circ$ ) entsprechen denen einer idealen PPII-Helix.

[\*] Dr. J. Zaminer, Dipl.-Chem. P. Huy, Dipl.-Chem. C. Reuter, Prof. Dr. H.-G. Schmalz  
Universität zu Köln, Department für Chemie  
Greinstraße 4, 50939 Köln (Deutschland)  
Fax: (+49) 221-470-3064  
E-Mail: schmalz@uni-koeln.de

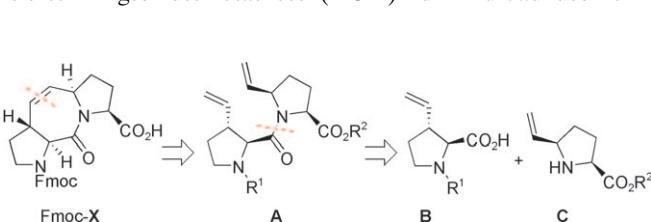
Dr. C. Brockmann, Dipl.-Biophys. R. Opitz, Dr. M. Beyermann, Priv.-Doz. Dr. C. Freund, Dipl.-Biochem. M. Müller, Prof. Dr. H. Oschkinat, Dr. R. Kühne  
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: kuehne@fmp-berlin.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der DFG (FOR 806) und dem FCI (Stipendium für P.H.) gefördert. PPII = Polyprolin II, PRD = prolinreiche Motive erkennende Domäne.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001739> zu finden.

dass durch formale Einführung einer „starren“ Vinylidenbrücke ein Diprolinanalogen **X** erzeugt würde, dessen einzige Vorzugskonformation einer idealen PPII-Helix entspricht. Wir berichten hier nun über die stereoselektive Synthese dieser neuartigen Verbindung (als Fmoc-geschütztes Derivat) sowie über ihre Verwendung als Pro-Pro-Ersatz im Kernmotiv von SH3 bindenden Peptidliganden.

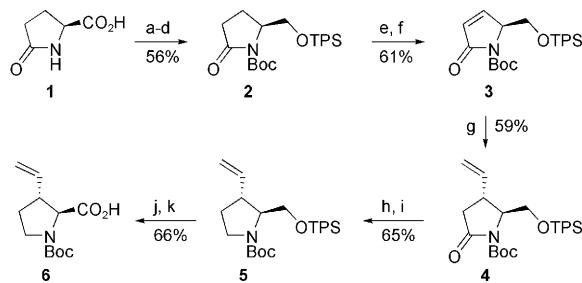
Unsere Synthesestrategie ist in Schema 1 skizziert. Im Schlüsselschritt beabsichtigten wir, eine Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese (RCM) zum Aufbau des zentralen Siebenringes zu nutzen. Die benötigte Dipeptidvorstufe **A** würde durch Peptidkupplung aus geeignet geschützten Vinylprolinbausteinen **B** und **C** erhalten, deren Synthese allerdings eine schwierige Aufgabe war.<sup>[13, 14]</sup>



**Schema 1.** Retrosynthese von Fmoc-X. Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl.

tralen Siebenringes zu nutzen. Die benötigte Dipeptidvorstufe **A** würde durch Peptidkupplung aus geeignet geschützten Vinylprolinbausteinen **B** und **C** erhalten, deren Synthese allerdings eine schwierige Aufgabe war.<sup>[13, 14]</sup>

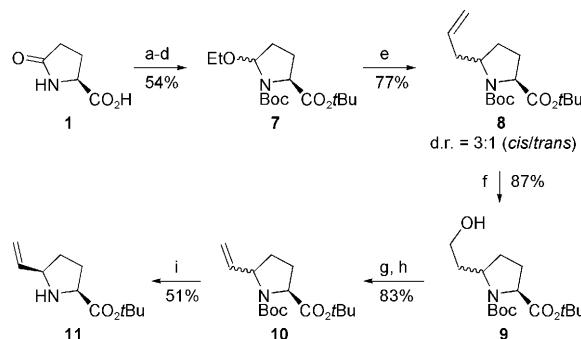
Als Baustein **B** wurde das Boc-geschützte *trans*-3-Vinylprolin **6** ausgehend von L-Pyroglutaminsäure (**1**) gemäß der Sequenz in Schema 2 hergestellt.<sup>[15]</sup> Nach Umwandlung der Carbonsäurefunktion in einen TPS-geschützten Alkohol und Anbringung einer *N*-Boc-Schutzgruppe lieferten die  $\alpha$ -Selenierung von **2** und oxidationsinduzierte Eliminierung (mit Ozon) das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Lactam **3**. Die Einführung des Vinylsubstituenten durch Cuprat-1,4-Addition führte zum Pyrrolidon **4** als reinem *trans*-Diastereomer. Zur Entfernung der Carbonylgruppe wurde **4** mit LiEt<sub>3</sub>BH reduziert und das erhaltene „Lactamol“ durch ionische Hydrierung (Et<sub>3</sub>SiH, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) in das desoxygenierte Zwischenprodukt **5** überführt. Fluoridvermittelte Abspaltung der Silylschutzgruppe und Jones-Oxidation erbrachten schließlich den ge-



**Schema 2.** Synthese des B-Bausteins **6**: a) SOCl<sub>2</sub>, EtOH, RT, 15 h, 99%; b) NaBH<sub>4</sub>, LiCl, THF, RT, 15 h, 73%; c) TPSCl, Iimidazol, DMF, RT, 15 h, 87%; d) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, MeCN, RT, 15 h, 89%; e) LiN(TMS), PhSeCl, THF, -78 °C, 2 h, 78%; f) O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 15 h, 78%; g) Vinyl-MgBr, CuBr-SMe<sub>2</sub>, TMSCl, THF/Et<sub>2</sub>O, -78 °C, 2 h, 59%; h) LiBHEt<sub>3</sub>, THF, -78 °C, 1 h; i) Et<sub>3</sub>SiH, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 2 h, 65% (2 Stufen); j) TBAF, THF, RT, 15 h, 89%; k) Jones-Reagens, Aceton, RT, 2 h, 74%. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DMAP = 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TMS = Trimethylsilyl, TPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

wünschten Baustein **6** in 9% Gesamtausbeute (über elf Stufen).

Die Synthese des *cis*-5-Vinylprolinesters **11** (als Baustein **C**) gelang auf dem in Schema 3 skizzierten Weg, wiederum ausgehend von L-Pyroglutaminsäure (**1**). Die ionische



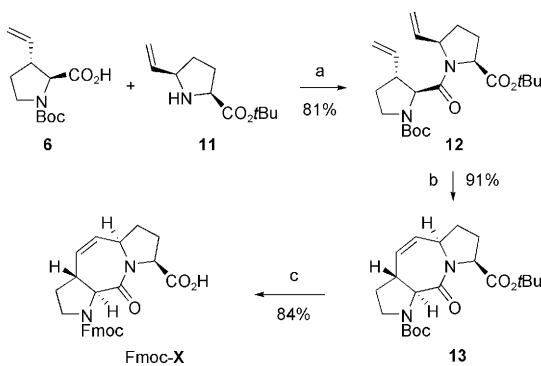
**Schema 3.** Synthese des C-Bausteins **11**: a) HClO<sub>4</sub>, *t*BuOAc, RT, 15 h, 72%; b) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, MeCN, RT, 15 h, 84%; c) DIBALH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 2 h, 93%; d) PPTS, EtOH, RT, 15 h, 96%; e) Allyl-TMS, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 30 min, 77%; f) O<sub>3</sub>, -78 °C, dann NaBH<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, RT, 12 h, 87%; g) (o-NO<sub>2</sub>Ph)SeCN, P(*n*Bu)<sub>3</sub>, Py, THF, RT, 30 min, 92%; h) O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Δ, 30 min, 90%; i) TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 5 min, dann chromatographische Diastereomerentrennung (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 25:1), 51%. DIBALH = Diisobutylaluminiumhydrid, PPTS = Pyridinium-p-toluolsulfonat, Py = Pyridin, OTf = Trifluormethansulfonat.

Allylierung (Allyl-TMS, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) der nach gängigen Vorschriften (als Diastereomerengemisch) erhaltenen Zwi-schenstufe **7** lieferte überwiegend das angestrebte *cis*-konfigurierte Produkt **8** (d.r. ca. 3:1).<sup>[16]</sup> Zur Verkürzung der Seitenkette wurde das Diastereomerengemisch einer Ozonolyse (mit reduktiver Aufarbeitung) unterzogen und der erhaltene Alkohol **9** (durch Ozon-induzierte Eliminierung einer *o*-Nitrophenylselenid-Zwischenstufe)<sup>[17]</sup> zum Vinylderivat **10** umgesetzt. Durch Reaktion von **10** mit TMSOTf gelang die selektive Abspaltung der *N*-Boc-Gruppe in Gegenwart der *tert*-Butylesterfunktion.<sup>[18]</sup> Nun ließen sich die *cis/trans*-Diastereomere durch einfache Flashsäulenchromatographie an Kieselgel trennen. So wurde der gewünschte *cis*-5-Vinylprolinester **11** in reiner Form erhalten (15% Gesamtausbeute über neun Stufen).

Zur Komplettierung der Synthese wurden die beiden Vinylprolinbausteine **6** und **11** mit PyBOP in Gegenwart von DIPEA gekuppelt. Die anschließende Cyclisierung des erhaltenen Peptids **12** durch Ringschlussmetathese verlief problemlos unter Verwendung von 5 Mol-% Grubbs-II-Katalysator.<sup>[18]</sup> Durch Umsetzung mit TFA wurde **13** komplett entschützt (Spaltung der *N*-Boc-Gruppe und des *tert*-Butylesters) und das freie Pro-Pro-Analogon **X** direkt in das Fmoc-geschützte Derivat Fmoc-X überführt (Schema 4).

Unter Standardbedingungen der Festphasen-Peptidsynthese (Fmoc-Strategie<sup>[19]</sup>) wurde das Diprolinanalogen **X** als Ersatz für die zentrale Pro-Pro-Einheit in zwei Peptide eingebaut (WT und LL), die zuvor als an SH3-Domänen bindende Liganden identifiziert worden waren (Tabelle 1).<sup>[20]</sup>

Die Bindungsfähigkeit der **X**-haltigen Peptide (**X**-WT und **X**-LL) zur Fyn-SH3-Domäne wurde (in direktem Vergleich



**Schema 4.** Synthese von Fmoc-X: a) PyBOP, DIPEA, MeCN, RT, 15 h, 81%; b) 5 Mol-% Grubbs II, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Δ, über Nacht, 91%; c) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 1 h, dann Fmoc-Cl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN, H<sub>2</sub>O, RT, 15 h, 86%. DIPEA = Diisopropylethylamin, PyBOP = Benzotriazol-1-yloxytritylordinophosphonium-hexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure.

**Tabelle 1:** Sequenzen der untersuchten Peptidliganden.

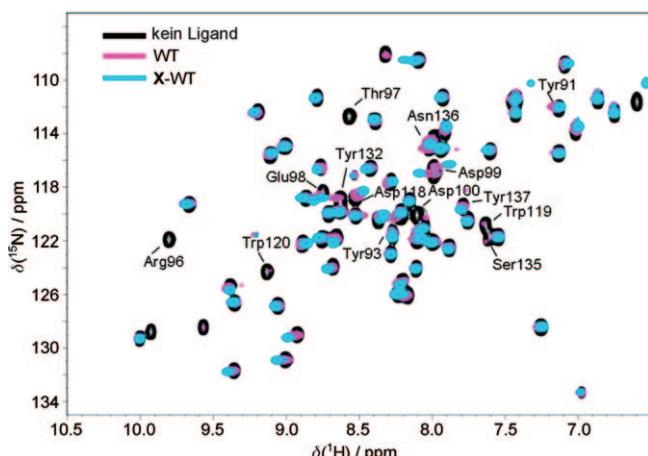
Ligand	Sequenz <sup>[a]</sup>
WT	Ac-Arg-Ala-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-NH <sub>2</sub>
X-WT	Ac-Arg-Ala-Leu-X-Leu-Pro-NH <sub>2</sub>
LL	Z <sup>1</sup> -Arg-Z <sup>2</sup> -Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Z <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>
X-LL	Z <sup>1</sup> -Arg-Z <sup>2</sup> -Leu-X-Leu-Pro-Z <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub>

[a] Z<sup>1</sup>=2-Hydroxynicotinoyl; Z<sup>2</sup>=(2S)-2-Amino-3-(2-hydroxy-2-phenylacetamido)propanoyl; Z<sup>3</sup>=(S)-2-Amino-3-(2,3-dihydroxybenzamido)propanoyl.

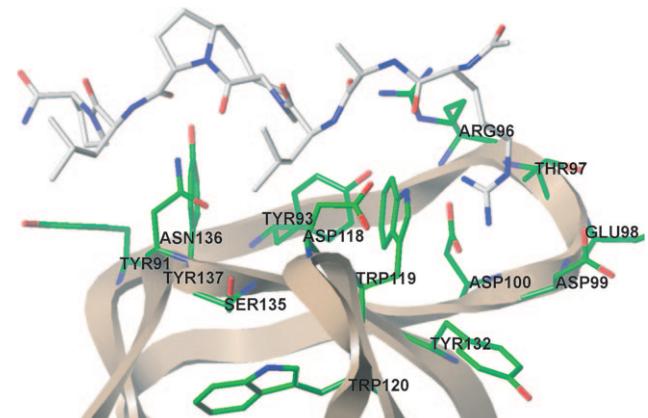
mit den entsprechenden Stammliganden WT und LL) mit NMR-Spektroskopie (<sup>15</sup>N-HSQC<sup>[21a]</sup> und <sup>15</sup>N-SOFAST-HMQC<sup>[21b]</sup>) und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)<sup>[22]</sup> untersucht.

Für alle Liganden wurden NMR-Spektren von <sup>15</sup>N-Fyn-SH3 aufgenommen, und zwar jeweils in Abwesenheit und in Gegenwart der Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Proteinkonzentration (<sup>15</sup>N-Fyn-SH3) betrug 0.8 und 0.4 mm (für WT bzw. X-WT) oder 0.1 mm (für LL und X-LL). Die geringe Löslichkeit von LL und X-LL erforderte den Zusatz von DMSO als Cosolvans. Durch Begrenzung der DMSO-Konzentration auf ≤ 4 % wurden sehr gut vergleichbare Spektren erhalten. In Abbildung 3 sind exemplarisch die überlagerten <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren von <sup>15</sup>N-Fyn-SH3 ohne Ligand sowie in Gegenwart von WT oder X-WT gezeigt.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Messungen zeigen eindeutig, dass alle vier untersuchten Liganden in gleicher Weise an die Fyn-SH3-Domäne binden.<sup>[23]</sup> Am kanonischen Bindungsmodus (Abbildung 4) sind vor allem Reste der so genannten RT-Schleife (Arg96, Thr97 und Asp100) beteiligt, was durch das komplett Verschwinden der Rückgrat-NH-Signale nach Zugabe jedes der vier Liganden belegt wird. Das gleiche Verhalten wird für die NH-Signale von Trp119 und Trp120 beobachtet. Einen zusätzlichen Beitrag zur Bindung leistet Trp119, dessen ε-NH-Gruppe der Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zur Rückgrat-C=O-Gruppe der zweiten Aminosäure des Liganden bildet (Ala für WT und X-WT; Z<sup>2</sup> für LL und X-LL). Die Rückgrat-NH-Gruppen beider Tryptophane befinden sich in räumlicher



**Abbildung 3.** Überlagerte <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren von <sup>15</sup>N-Fyn-SH3 (0.8 mm (WT), 0.4 mm (X-WT)) ohne Ligand sowie in Gegenwart von WT (0.75 mM) oder X-WT (0.325 mM).



**Abbildung 4.** Kanonisches Bindungsmodell für den Kontakt zwischen der Fyn-SH3-Domäne und allen untersuchten Liganden, aufgezeigt am Beispiel von X-WT.

Nähe zu den Argininseitenketten der Liganden. Der C-Terminus der Liganden (und somit das modifizierte PPLP-Motiv) bindet hauptsächlich unter Beteiligung von Tyr91, Tyr93, Asn126 sowie Tyr137, was durch die beträchtliche Verschiebung der entsprechenden NH-Signale deutlich wird.

Als Nächstes wurden die ITC-Messungen einbezogen. Da die LL- und X-LL-Liganden sehr lipophil sind und eine geringe Löslichkeit in wässrigem Medium aufweisen (< 0.1 mm), wurden sie mit DMSO als Cosolvans in die Zellen überführt, wobei dessen Konzentration unter 1 % gehalten wurde.

Die Ergebnisse der ITC-Messungen (Tabelle 2) sind in Einklang mit den NMR-spektroskopischen Daten und bestätigen, dass es uns tatsächlich gelungen ist, eine Diprolin-einheit sowohl des WT- als auch des LL-Liganden durch unser synthetisches Gerüst X zu ersetzen, ohne die Fähigkeit der Liganden zur Bindung an die Fyn-SH3-Domäne zu zerstören. Zwar haben die X-substituierten Peptide geringfügig niedrigere Affinitäten für das Zielprotein als die Stammliganden (was in den K<sub>D</sub>- und ΔG°-Werten zum Ausdruck

**Tabelle 2:** Ergebnisse der ITC-Messungen (Fyn-SH3).

	WT	X-WT	LL	X-LL
$K_D^{[a]}$	$18 \pm 5$	$62 \pm 13$	$8 \pm 2$	$27 \pm 4$
$\Delta G^{\circ[b]}$	$-27.1 \pm 0.7$	$-24.0 \pm 0.5$	$-29.2 \pm 0.7$	$-26.1 \pm 0.3$
$\Delta H^{\circ[b]}$	$-60 \pm 10$	$-54 \pm 13$	$-58 \pm 10$	$-19 \pm 3$
$T\Delta S^{\circ[b]}$	$33 \pm 9$	$30 \pm 13$	$29 \pm 10$	$-7 \pm 4$

[a] [ $\mu$ M]. [b] In  $\text{kJ mol}^{-1}$ ; 95 % Konfidenzintervalle.

kommt), jedoch belegen unsere Befunde erstmals, dass das Kernmotiv eines PRD-bindenden Liganden strukturell überhaupt modifiziert werden kann.<sup>[11]</sup>

Ein zweiter Blick auf Tabelle 2 zeigt, dass die WT-, X-WT- und LL-Liganden die typische thermodynamische Signatur zeigen, die für die Wechselwirkung einer SH3-Domäne mit einem Peptidliganden zu erwarten ist (d.h. ein günstiger enthalpischer Beitrag, der einer ungünstigen Bindungsentropie entgegensteht).<sup>[24–26]</sup> Eine plausible Erklärung dieses Verhaltens ist die Bildung komplexer Wasserstoffbrücken- netzwerke, die auch durch verdeckte Wassermoleküle auf der Bindungsgrenzfläche vermittelt werden.<sup>[26]</sup>

Zwar lassen die NMR-spektroskopischen Daten auf einen ähnlichen Bindungsmodus für alle vier Liganden schließen, jedoch wird das abweichende thermodynamische Verhalten von X-LL durch eine Veränderung des Rückgrat-NH-Signals von Asn136 in gewisser Weise bestätigt (siehe Abbildung 4 der Hintergrundinformationen). Eine Ursache für dieses Verhalten könnte in einer Veränderung der durch Wassermoleküle vermittelten Bindung der C-terminalen Region von X-LL liegen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Substitution zweier Prolinreste des LL-Liganden durch das starre Analogon X zu Sekundärwechselwirkungen zwischen X und den Z-Bausteinen führt.<sup>[27]</sup>

**Fazit:** Wir haben eine stereoselektive Synthese des rational entworfenen tricyclischen Pro-Pro-Mimetikums X entwickelt, die eine Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese nutzt, um das konformativ starre Ringgerüst ausgehend von geeigneten Vinylprolinbausteinen aufzubauen. Wir konnten zeigen, dass dieses neue PPII-Helixmimetikum tatsächlich in der Lage ist, die gewünschte Funktion zu erfüllen. So führte die Modifizierung von Peptidliganden, die an die PRM-erkennende Fyn-SH3-Domäne binden (d.h. die Substitution zweier benachbarter Prolinreste durch X), zu Molekülen, die noch immer ausgeprägte Bindungseigenschaften gegenüber Fyn-SH3 aufweisen.

Somit wurde auch die prinzipielle Möglichkeit aufgezeigt, relativ flache Bindungsstellen an der Oberfläche von Proteinen („undrugable targets“) durch rational entworfene synthetische „small molecules“ (als zentrale Module quasipeptidischer Liganden) zu adressieren. Wir sind zuversichtlich, dass unser Ansatz zur Entwicklung neuer aktiver Verbindungen mit potenziell nützlichen pharmakologischen Eigenschaften führen wird.

Eingegangen am 24. März 2010,  
veränderte Fassung am 8. Juni 2010  
Online veröffentlicht am 27. August 2010

**Stichwörter:** Konformationsanalyse · Molecular Modeling · Peptidmimetika · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Ringschlussmetathese

- [1] R. Aasland, C. Abrams, C. Ampe, L. Ball, M. Bedford, G. Cesareni, M. Gimona, J. Hurley, T. Jarchau, V. Lehto, M. Lemmon, R. Linding, B. Mayer, M. Nagai, M. Sudol, U. Walter, S. Winder, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 141–144.
- [2] L. Ball, R. Kühne, B. Hoffmann, A. Häfner, P. Schmieder, R. Volkmer-Engert, M. Hof, M. Wahl, J. Schneider-Mergener, U. Walter, H. Oschkinat, T. Jarchau, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4903–4914.
- [3] L. Ball, T. Jarchau, H. Oschkinat, U. Walter, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 45–52.
- [4] I. Geisler, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2765–2768.
- [5] M. Dustin, M. Olszowy, A. Holdorf, J. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. van der Merwe, P. Allen, A. Shaw, *Cell* **1998**, *94*, 667–677.
- [6] V. Laurent, T. Loisel, B. Harbeck, A. Wehman, L. Gröbe, B. Jockusch, J. Wehland, F. Gertler, M. Carlier, *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 1245–1258.
- [7] A. Goldstrohm, T. Albrecht, C. Suñé, M. Bedford, M. Garcia-Blanco, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7617–7628.
- [8] M. Kofler, M. Schuemann, C. Merz, D. Kosslick, A. Schlundt, A. Tannert, M. Schaefer, R. Lührmann, E. Krause, C. Freund, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2461–2473.
- [9] B. Laggerbauer, S. Liu, E. Makarov, H.-P. Vornlocher, O. Makarova, D. Ingelfinger, T. Achsel, R. Lührmann, *RNA* **2005**, *11*, 598–608.
- [10] a) C. M. Deber, F. A. Bovey, J. P. Carver, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6191–6198; b) N. Helbecque, M. H. Loucheux-Lefebvre, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, *19*, 94–101; c) H. Okabayashi, T. Isemura, S. Sakakibara, *Biopolymers* **1968**, *6*, 323–330; d) R. K. Dukor, T. A. Kiederling, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1747–1761; e) R. K. Dukor, T. A. Kiederling, V. Gut, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 198–203; f) P. M. Cowan, S. McGavin, *Nature* **1955**, *176*, 501–503.
- [11] a) S. Li, *Biochem. J.* **2005**, *390*, 641–653; b) L. Ball, R. Kühne, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2912–2930; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2852–2869; c) C. Freund, H.-G. Schmalz, J. Sticht, R. Kühne, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, *186*, 407–429.
- [12] a) N. G. Bandur, K. Harms, U. Koert, *Synlett* **2005**, 773–776; b) A. Mamai, N. E. Hughes, A. Wurthmann, J. S. Madalenoitia, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6483–6486; c) A. Mamai, R. Zhang, A. Natarajan, J. S. Madalenoitia, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 455–460; d) P. Tremmel, A. Geyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8548–8549; e) M. Kümin, L.-S. Sonntag, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 466–467; f) R. S. Erdmann, M. Kümin, H. Wennemers, *Chimia* **2009**, *63*, 197–200; g) Y. A. Fillon, J. P. Anderson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11798–11803; h) P. Rizza, G. Siligardi, A. Donella-Deana, A. Calderan, R. Hussain, C. Rubini, L. Cesaro, A. Olser, A. Guiotto, L. A. Pinna, G. Borin, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 462–471; i) D. J. Witter, S. J. Famiglietti, J. C. Cambier, A. L. Castelhano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3137–3142; j) T. M. Kapoor, A. H. Andreotti, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 23–29; k) J. P. Morken, T. M. Kapoor, S. Feng, F. Shirai, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 30–36.
- [13] Ausgewählte Übersichten zu Peptidmimetika: a) L. Belvisi, L. Colombo, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, *Synlett* **2004**, 1449–1471; b) A. Grauer, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5099–5111.
- [14] Synthese von Peptidmimetika mithilfe von RCM: a) L. M. Beal, K. D. Moeller, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4639–4642; b) J.

- Einsiedel, H. Lanig, R. Waibel, P. Gmeiner, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9102–9113.
- [15] a) C. Herdeis, H. P. Hubmann, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1213–1221; b) C. Herdeis, H. P. Hubmann, H. Latter, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 351–354; c) N. Lunglois, R. Z. Andriamialisoa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3057–3058; d) C. Acevedo, E. Kogut, M. A. Lipton, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *57*, 6353–6359; e) P. Somfai, H. Ming He, D. Tanner, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 283–286.
- [16] a) F. Schätzchen, Dissertation, FU Berlin **2000**; b) O. Hara, K. Sugimoto, K. Maikno, Y. Hamada, *Synlett* **2004**, 1625–1627; Schätzchen (Lit. [16a]) trennte die *cis*- und *trans*-Diastereomere von **8** durch präparative HPLC. Dagegen haben wir die Mischung weiter umgesetzt und die Diastereomere auf der Stufe von **11** durch einfache Flashchromatographie auf Kieselgel getrennt.
- [17] P. A. Grieco, S. Gilman, M. Nishizawa, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1485–1486.
- [18] M. M. Fernández, A. Diez, M. Rubiralta, E. Montenegro, N. Casamitjana, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7587–7599, zit. Lit.
- [19] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247–3256.
- [20] H. Li, D. S. Lawrence, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 905–912.
- [21] a) G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189; b) P. Schanda, B. Brutscher, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014–8015.
- [22] A. Velazquez-Campoy, S. A. Leavitt, E. Freire in *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications* (Hrsg.: H. Fu), Humana, Totowa, **2004**.
- [23] Die große Ähnlichkeit der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von WT/X-WT und der  $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC-Spektren von LL/X-LL (siehe Hintergrundinformationen) rechtfertigt es, dass hier nur die WT/X-WT-Spektren im Detail diskutiert werden.
- [24] J. P. Demers, A. Mittermaier, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4355–4367.
- [25] J. C. Ferreon, V. J. Hilser, *Biochemistry* **2004**, *43*, 7787–7797.
- [26] A. Palencia, E. S. Cobos, P. L. Mateo, J. C. Martínez, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 527–537.
- [27] Für die Bindung von LL an Fyn-SH3 berichteten Li et al. (Lit. [20]) eine Dissoziationskonstante von 25 nm bei 4°C, die sie durch Gleichgewichtsdialyse mit fluorimetrischer Detektion des stark fluoreszierenden LL-Liganden bestimmten. Da der LL-Ligand sehr lipophil ist, bindet er jedoch möglicherweise unspezifisch an die Dialysezelle. Tatsächlich ergaben unsere eigenen Messungen, dass der LL-Ligand an Fyn-SH3 nur mit einem  $K_D$ -Wert in  $\mu\text{M}$ -Bereich bindet.