

- Absorptionskorrektur [8b]; Strukturlösung mit Direkten Methoden [8c]; Least-Squares-Verfeinerung (alle Atomic anisotrop) mit SHELXL-93 [8d]; 76 freie Parameter; GoF = 1.16, R-Werte ($I \geq 2\sigma(I)$): $R_1 = 0.044$, $wR_2 = 0.098$; Restelektronendichte: $1.5/-1.6 \text{ e} \times 10^{-6} \text{ pm}^{-3}$. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter der Hinterlegungsnummer CSD-401792 angefordert werden. b) N. Walker, D. Stuart, Programm DIFABS, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1983**, *39*, 158–166; c) G. Sheldrick, Programm SHELXS-86, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, *46*, 467; d) G. Sheldrick, Programm SHELXL-93, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**.
- [9] A. Simon, E. Westerbeck, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1977**, *428*, 187–198.
- [10] W. Höckner, H. K. Müller-Buschbaum, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1979**, *451*, 40–44.
- [11] W. B. Pearson, *The Crystal Chemistry and Physics of Metals and Alloys*, Wiley Interscience, New York, **1972**.
- [12] M. L. Fornasini, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, *31*, 2551–2553.
- [13] M. L. Fornasini, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1975**, *44*, 1355–1357.

Rationales Design neuer Rezeptor-Ligand-Kombinationen**

Peter J. Belshaw, Joseph G. Schoepfer, Karen-Qianye Liu, Kim L. Morrison und Stuart L. Schreiber*

Die Signalübertragung in Zellen erfolgt hauptsächlich durch zwei Mechanismen: Bei dem einen spielen allosterische Effekte eine Rolle, bei dem anderen räumliche Nähe^[1]. Die Rolle ligand-induzierter allosterischer Änderungen in Proteinen hat über viele Jahre große Beachtung gefunden und zur Synthese einer großen Zahl von Molekülen geführt, die für die Signalübertragung notwendige allosterische Änderungen entweder fördern oder hemmen. Kürzlich konnten zellbiologische Untersuchungen die Rolle der regulierten Proteindimerisierung oder -oligomerisierung als Mittel des Informationstransfers aufklären. Durch diesen Vorgang kann eine enge Nachbarschaft von Enzym und Substrat oder von Rezeptor und Ligand begünstigt werden, was die molekulare Wechselwirkung, die zur Signalübertragung führt, erleichtert. Die Dimerisierung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren^[2], die Oligomerisierung von Antigenrezeptoren^[3] und die Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren^[4] sind Beispiele für diesen Prozeß. Das zunehmende Verständnis eröffnete den Chemikern neue Möglichkeiten zur Synthese von Molekülen, die zwei Bindungsregionen für Proteine haben und dadurch Proteinassoziationen induzieren können. Derartige chemische Dimerisierungsauslöser (CIDs) können viele zelluläre Prozesse einschließlich solcher mit biologischer und medizinischer Bedeutung aktivieren. Vor kurzem haben wir eine Methode zur Steuerung der Proteinassoziation in Zellen mittels Induktion beschrieben^[5, 6]. Dieses Ergebnis wurde durch die Expression heterozygoter Proteine in Säugetierzellen erreicht, die aus einer Dimerisierungsdomäne und dem interessierenden Protein oder der interessierenden Proteindomäne

bestehen. Behandelt man die Zellen mit einem synthetischen, in die Zelle eindringenden Dimerisierungsauslöser, der an die Dimerisierungsdomäne bindet, wird die Selbstassoziation ausgelöst und ein Signal übertragen (Abb. 1).

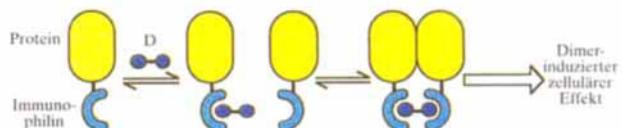


Abb. 1. Regulierte intrazelluläre Dimerisierung mit synthetischen Liganden, die durch die Zellmembran passieren können (D = Kupplungsreagens).

Von den vielen denkbaren Rezeptor-Ligand-Systemen wurden für diese Arbeit die Immunophilin FKBP12 und Cyclophilin A (CyP) sowie deren Liganden FK506 bzw. Cyclosporin A (CsA) ausgewählt. Die Liganden können durch die Zellmembran diffundieren und synthetisch in rationaler Weise so modifiziert werden, daß sie ihre intrinsischen immunsuppressiven und toxischen Eigenschaften verlieren. Dies erfordert eine Modifizierung der Calcineurin-, nicht aber der Immunophilin-Bindungsdomäne der natürlich vorkommenden CIDs. FKBP12 und CyP binden ihre Liganden mit hoher Affinität ($K_d = 0.5$ bzw. 5 nM), sind monomer, zeigen bei der Expression in Zellen keine erkennbare Wirkung, und ihre geringe Größe (12 bzw. 18 kDa) erleichtert das Einschleusen ihrer cDNA in Expressionsvektoren. Ein Nachteil ist allerdings, daß die natürlichen Immunophiline in vielen Zellen in hohen Konzentrationen exprimiert werden. Damit besteht die Gefahr, daß sich viele „falsche“ Rezeptor-Ligand-Komplexe bilden, was die Fähigkeit der CIDs herabsetzt, an mit dem Immunophilin vereinigte Proteine zu binden (Abb. 2a). Der daraus resultierende Verlust an Spezifität ist besonders in ganzen Organismen abträglich, in denen möglicherweise nur wenige Zellen die Immunophilin-Protein-Hybride exprimieren, weil damit die Pufferwirkung der natürlichen Immunophiline verstärkt wird.

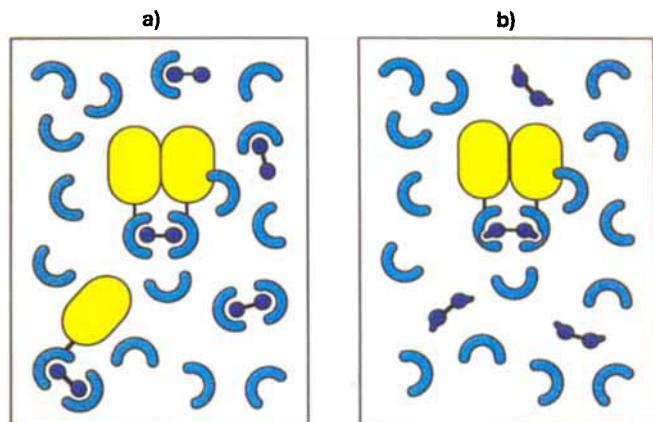


Abb. 2. Verbesserte Rezeptor-Ligand-Paare für die regulierte intrazelluläre Proteinassoziation mit synthetischen Liganden. a) Mögliche Proteinassoziationen in Zellen, die Wildtyp-Immunophiline als Dimerisierungsdomänen exprimieren. b) Proteinassoziationen, die vorausgesagt werden, wenn synthetisch modifizierte CIDs und Immunophiline mit dazu passenden Mutationen verwendet werden.

Um dieses Problem zu lösen, nahmen wir uns die Herstellung neuer Rezeptor-Ligand-Paare vor, die aufgrund gezielter Veränderungen in den Bindungsregionen einen hohen Grad an Spezifität versprachen. Das Design der Immunophilinliganden sah den Einbau von Substituenten vor, die aus sterischen Gründen mit Aminosäureseitenketten im Immunophilinrezeptor zusammenstoßen würden, so daß ihre Wechselwirkung mit endogenen

[*] Prof. S. L. Schreiber, P. J. Belshaw, Dr. J. G. Schoepfer, K.-Q. Liu, K. L. Morrison

Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry
Harvard University
Cambridge, MA 02138 (USA)
Telefax: Int. + 617/495-0751
E-mail: belshaw@slsiris.harvard.edu

[**] Diese Arbeit wurde vom National Institute of General Medical Sciences gefördert (GM-52067). Wir danken der NSERC für ein Postdocstipendium für P. J. B. und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, der Roche Research Foundation und der Ciba-Geigy-Jubiläums-Stiftung für die Unterstützung von J. G. S.

Immunophilinen unterbunden wäre. Für den Rezeptor wiederum wurde nach kompensierenden Mutationen gesucht, die ihn – durch Ausschaltung der „schädlichen“ Wechselwirkung – als Dimerisierungsdomäne geeignet machen könnten (Abb. 2b). Wir berichten hier über entsprechende Studien mit CyP-CsA als Testsystem. Die Lösung des oben beschriebenen Problems ist unserer Meinung nach nicht das einzige Resultat dieser Studien, sondern wir gehen davon aus, daß sie auch zu neuen experimentellen Systemen führen werden, die geeignet sind, unser Verständnis der molekularen Erkennung durch Proteinrezeptoren zu überprüfen.

Die hochauflöste Struktur des CyP-CsA-Komplexes^[7, 8] diente als Startpunkt für das Design der modifizierten Liganden. Die MeVal11-Seitenkette des Cyclosporins ist ebenso wie eine tiefe Tasche am Rezeptor, die aus den hydrophoben Resten Phe60, Met61, Ala101, Phe113 und Leu122 besteht, an der primären hydrophoben Wechselwirkung zwischen CyP und CsA beteiligt (Abb. 3A). Mehrere CsA-Derivate mit Modifizierungen

am Rest 11 wurden bereits früher synthetisiert^[9]. Bindungsstudien ergaben, daß eine Vergrößerung der MeVal11-Seitenkette die Bindung an CyP außer Kraft setzte (MeIle11, Me-*allo*-Ile11). Umgekehrt ist die Affinität von Verbindungen mit kleineren Seitenketten (MeAla11) immer noch beträchtlich. Diese Tasche am Rezeptor wurde von uns für die Modifizierung ausgewählt, weil unser Weg zu einer Vergrößerung der nicht zugänglichen hydrophoben Oberfläche führen würde und hydrophobe Wechselwirkungen einen signifikanten Beitrag zur Gibbs-Bindungsenergie leisten können^[10].

Als erste Testsubstanz wurde MeIle11CsA ausgewählt. Ein hypothetisches Modell von MeIle11CsA, an CyP gebunden (Abb. 3B), deutet auf eine ungünstige sterische Wechselwirkung zwischen der strategischen Methylgruppe des modifizierten Liganden und dem Phenylring von Phe113 am Rezeptor hin. Eine Entfernung dieses Ringes (Phe113 → Ala) sollte diese Störung beseitigen (Abb. 3C), zugleich aber ein beträchtliches Volumen freien Raumes erzeugen. Um diese Löcher zu verkleinern und die Bindungsenergie zu maximieren, wurden zur Vergrößerung zweier in der Nähe befindlicher Seitenketten zwei sekundäre Mutationen konzipiert. Eine Ser99 → Thr-Mutation (Abb. 3D) liefert eine zusätzliche Methylenegruppe und eine Cys115 → Met-Mutation (Abb. 3E) erweitert das Molekül um weitere zwei Methylengruppen. Monte-Carlo-Minimierungen von Teilstrukturen wurden inklusive aller Torsionen für die Seitenketten der Reste MeIle11, Phe60, Met61, Met115 und Thr99 mit MacroModel 4.0 durchgeführt. Alle anderen Atome innerhalb eines Abstandes von 6 Å zu den Atomen dieser Reste wurden zwar berücksichtigt, ihre Bewegung aber durch eine zusätzlich eingeführte Kraft von 100 kJ Å⁻¹ unterbunden. Die Berechnungen zeigten, daß das für Threoninreste seltenste Konformer in Kristallen die günstigste Packung bildet^[11]. Ebenso ließ sich voraussagen, daß die beiden Bereiche der sekundären Mutationen ihre bevorzugten Konformationen simultan einnehmen können, woraufhin die dreifach mutierten Moleküle ebenfalls untersucht wurden (Abb. 3F).

Die mutierten Proteine wurden durch PCR-Mutagenese hergestellt, wobei die Megaprimer-Methode verwendet wurde und die Verifizierung durch Sequenzierung erfolgte^[12]. Die von dem leicht erhältlichen CsA ausgehende Syn-

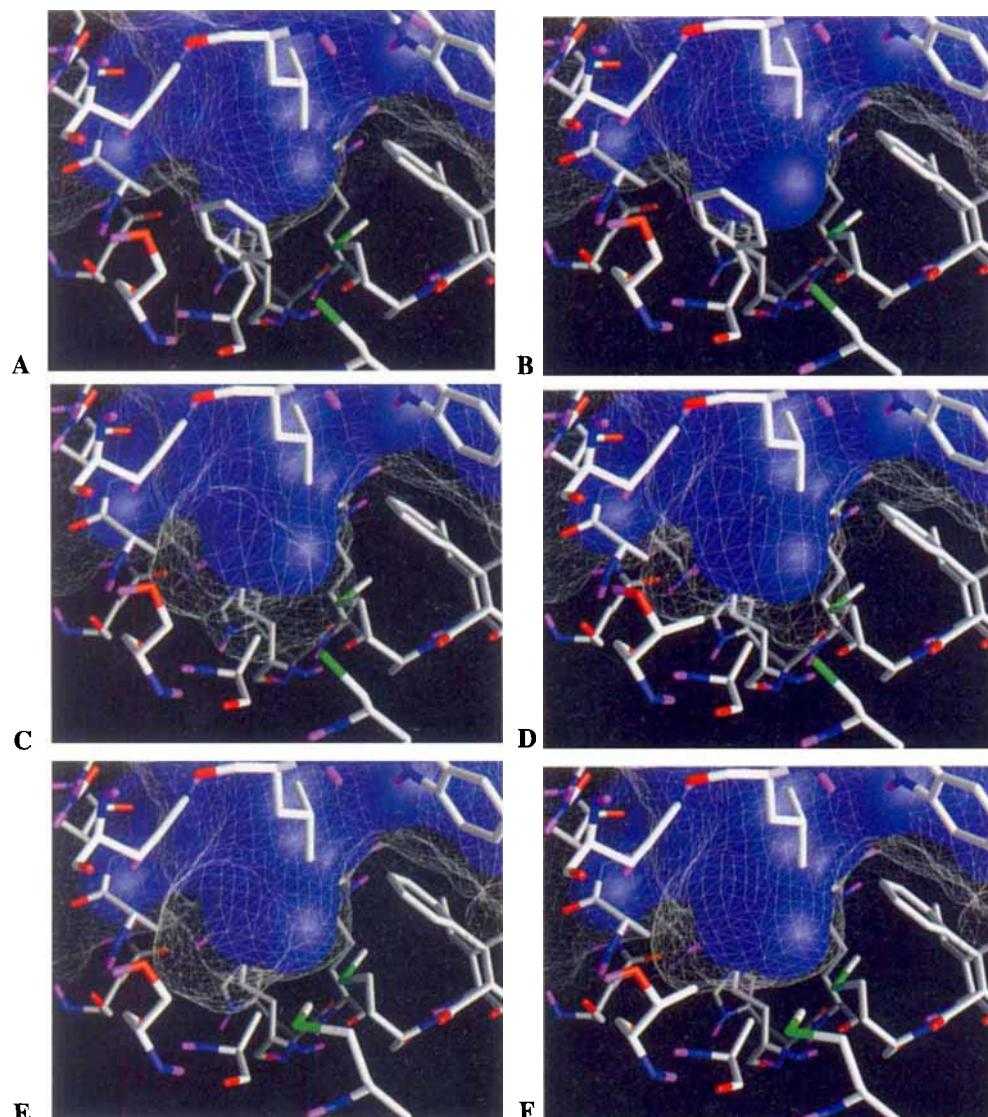


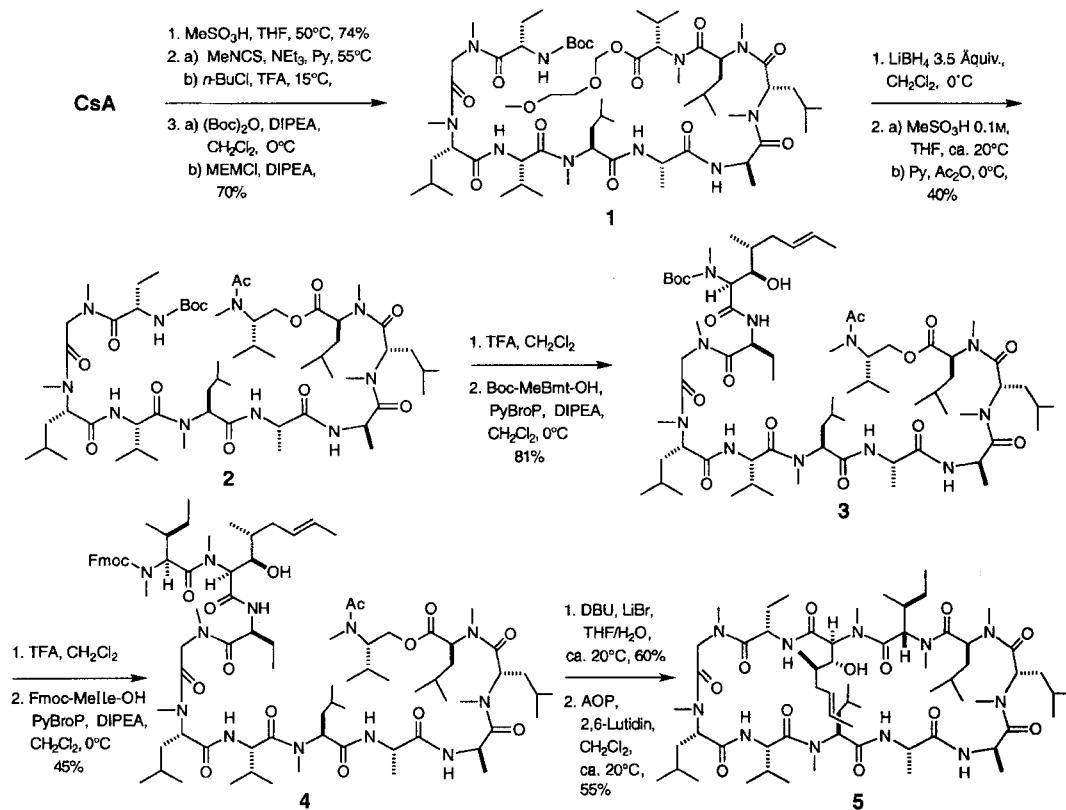
Abb. 3. Graphische Darstellung der Bindungsstellen zwischen CyP und CsA und Varianten. Die blaue Oberfläche und die weiße Gitternetzoberfläche repräsentieren die für das Lösungsmittel zugänglichen Oberflächen von CsA bzw. CyP (nichtpolare Wasserstoffatome wurden weggelassen). Die Seitenketten von CyP, die Kontakte zu CsA haben, sind mit röhrenförmigen Bindungen dargestellt, wobei der Blick aus dem Inneren des Proteins auf die Seitenketten gezeigt ist. Der blau gezeichnete Bereich, der sich am weitesten im Hintergrund befindet, korrespondiert mit der Seitenkette des Restes 11 von CsA. a) Struktur von CyP-CsA im Kristall. b) Hypothetisches Modell des CyP-Melle11CsA-Komplexes. c) CyP(F113A)-Melle11CsA-Komplex. d) CyP(S99T, F113A)-Melle11CsA-Komplex. e) CyP(F113A, C115M)-Melle11CsA-Komplex. f) CyP(S99T, F113A, C115M)-Melle11CsA-Komplex. Die Graphiken wurden mit GRASP[23] erstellt.

diese führt zu einem gemeinsamen Intermediat für die Synthese der Verbindungen mit Modifizierungen an den Resten 1 und 11 (Schema 1). Daß die Position 1 gerade die Stelle ist, die wir bereits genutzt haben, um dimere Versionen von CsA ($(\text{CsA})_2$) herzustellen^[13], macht dieses Vorgehen besonders attraktiv, sollten wir doch durch die Verwendung modifizierter Aminosäuren an den Positionen 1 und 11 CID's mit größerer Spezifität als $(\text{CsA})_2$ leicht synthetisieren können. Der CsA-Ring wurde geöffnet und zunächst zu iso-CsA^[14] konvertiert. Das entstehende Amin wurde anschließend einem modifizierten Edman-

Tabelle 1. K_d -Werte [nM] für die Komplexbildung zwischen modifizierten CsA-Liganden und Cyclophilinen (CyP) (Wildtyp und mutiert).

Protein	Melle11CsA	CsA
hCyP(Wildtyp)	>3000[a]	5 ± 1
hCyP(F113A)	53 ± 9	55 ± 15
hCyP(F113A, C115M)	75 ± 13	19 ± 7
hCyP(S99T, F113A)	2 ± 0.5	5 ± 1
hCyP(S99T, F113A, C115M)	4 ± 1	7 ± 1

[a] Das ist der niedrigst mögliche Wert, da eine exakte Bestimmung wegen der geringen Löslichkeit des Liganden nicht zweifelsfrei möglich ist.



Schema 1. Synthese von Melle11CsA aus CsA. Für Einzelheiten siehe *Experimentelles*.

Abbau unterworfen^[15]. Durch dieses Verfahren wird die MeBmt-Aminosäure entfernt, und man erhält ein lineares Peptid, das an Amino- und Carboxyterminus geschützt ist. Die Wahl des Methoxyethoxymethyl(MEM)-Esters war für die nachfolgende Reduktion essentiell^[16], denn alle anderen Kombinationen gebräuchlicher Ester und Reduktionsmittel versagten. Der Reduktion folgte eine säurekatalysierte N-O-Verschiebung, und eine N-Acylierung wiederum lieferte das Zielintermediat, das für die Modifizierungen an den Resten 1 und/oder 11 eingesetzt wurde. Zwei Cyclen aus Entschützen und Kuppeln ergaben ein lineares, geschütztes Undecapeptid, das nach dem Entfernen der Schutzgruppen zu Melle11CsA cyclisiert wurde. Diese beispiellose Cyclisierung zwischen den Resten 10 und 11 verläuft ohne erkennbare Racemisierung und mit guten Ausbeuten, wobei die Wahl der Base und des Kupplungsreagens entscheidenden Einfluß auf die Reaktion hat^[17].

Durch die Bindung an CsA wird die Fluoreszenzintensität von CyP ungefähr verdoppelt, was zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten K_d genutzt wurde^[18–20]. Die Konstanten für die Komplexbildung zwischen Melle11CsA/CsA und Wildtyp-CyP/mutierten CyPs wurden bestimmt (Tabelle 1). Die

zusätzliche Methylgruppe von Melle11CsA verschlechtert die Bindung an CyP drastisch. Der Wechsel von Phe113 zu Ala wirkt sich noch drastischer aus: Die Bindungsstärke des Wildtyp-Rezeptors wird bis auf eine Größenordnung wiederhergestellt. Die Doppelmutante CyP(S99T, F113A) bindet Melle11CsA mit einer Affinität von 2 nm. Bringt man also einen Substituenten am Cyclosporin an und stellt durch gezielte Mutation eine Bindungstasche für diesen am Rezeptor her, resultiert ein neues Rezeptor-Ligand-Paar, das mit zwei- bis dreifach höherer Affinität als das Wildtyp-System bindet. Die andere Doppelmutante, CyP(F113A, C115M), zeigt eine geringere Affinität für Melle11CsA als die einfache F113A-Mutante und belegt so, daß diese Mutation leicht destabilisierend wirkt. Dies scheint an einem störenden Kontakt zwischen der terminalen Methylgruppe von M115 und der terminalen Methylgruppe der Melle11-Seitenkette zu liegen. Modelle zeigen, daß dieser Kontakt geringfügig enger als jeder andere in der Bindungstasche ist, obschon wir eine Störung der lokalen Struktur aufgrund des Methionins nicht ausschließen können. Interessanterweise bindet die dreifache Mutante CyP(S99T, F113A, C115M) Melle11CsA schlechter als die Doppelmutante CyP(S99T, F113A),

und die Differenz der Gibbs-Energien dieser beiden Mutanten ist ungefähr genauso groß wie die Differenz der Energien von CyP(F113A) und CyP(F113A, C115M). Dies deutet darauf hin, daß die Destabilisierung durch die C115M-Mutation von der S99T-Mutation unabhängig ist. Alle Mutanten banden gut an CsA, wobei die Affinitäten generell bei Abnahme des vorhergesagten leeren Volumens anstiegen.

Wir haben mittels struktureller Leitlinien erfolgreich ein rationales Design neuer Rezeptor-Ligand-Paare mit hoher Affinität verwirklicht. Die Wahl anderer Reste mit großen, hydrophoben, in ihrer Konformationsvielfalt eingeschränkten Seitenketten als Ersatz für MeIle11 könnte in Verbindung mit geschickten Punktmutationen zu noch höheren Energiegewinnen durch den hydrophoben Effekt führen. Wir planen zusätzlich, dimere Versionen der neuen Liganden zu synthetisieren, um die Dimerisierung der Zielproteine in vivo induzieren zu können. Auf diese Weise sollte sich die Wirkung endogener Immunophilin in Experimenten dieser Art einschätzen lassen. Das iterative Zusammenspiel von Synthese, Molekular- und Strukturbioologie sowie Kalorimetrie und anderen physikalischen Methoden wird helfen, die Beiträge spezifischer molekulärer Wechselwirkungen zur Gibbs-Bindungsenergie offenzulegen.

Experimentelles

Die Fluoreszenzmessungen wurden auf einem Hitachi-F2000-Fluoreszenzspektrometer nach zehnminütiger Inkubation mit dem Liganden bei 20 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit 10 nm Bandbreite unter Verwendung eines 33/100-Filters. Das Emissionsspektrum wurde zwischen 300 und 400 nm mit 10 nm Bandbreite aufgenommen. Die Proteine wurden mit 3 mL Tris-gepuffertem Salin bei pH = 7.4 auf ca. 100 nm (bei $K_d < 10$ nm) oder 200–500 nm (bei $K_d > 10$ nm) verdünnt. Kleine Mengen Ligand in 50proz. Ethanol wurden zwischen aufeinanderfolgenden Messungen so hinzugefügt, daß das hinzugekommene Gesamtvolumen < 1.5% betrug. Eine Gleichung, die die beobachteten Änderungen der Fluoreszenz (ΔF_{obs}), die gesamte Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung (ΔF_{sat}), die Proteinconzentration (E_0), die Ligandconzentration (I_0) und K_d miteinander korreliert, kann im Rahmen der Tight-binding-Kinetik und unter der Annahme, daß $F_{obs} = (E/I)F_{sat}/E_0$ gilt abgeleitet werden [Gl.(a)]. Die Fluoreszenzänderung bei

$$\Delta F_{obs} = ((E_0 + I_0 + K_d) - (E_0 + I_0 + K_d)^2 \cdot 4(E_0)(I_0))^{1/2} / (\Delta F_{sat}) / 2 \quad (a)$$

338 nm (nach Eichung der Fluoreszenz auf die Ligandlösung) wurde gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. An die Daten für jede Bestimmung von K_d (≥ 14 Messungen) wurde mit dem Programm Kaleidagraph 3.0 Gleichung (a) angepaßt. Alle Anpassungen haben eine Güte von $r > 0.99$.

Die physikalischen Daten aller Verbindungen sind in Einklang mit den erwarteten Strukturen und auf Anfrage bei den Autoren erhältlich.

1: Zu einer Lösung iso-CsA[14] (2.886 g, 2.401 mmol) in Pyridin (144 mL) wurden Triethylamin (7.2 mL) und Methylisothiocyanat (7.2 mL) gegeben. Die Lösung wurde unter Stickstoff 30 min auf 50 °C erwärmt. Es wurde weiteres Triethylamin (2.9 mL) und weiteres Methylisothiocyanat (2.9 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde weitere 30 min erwärmt. Nach dem Einengen bei Raumtemperatur wurde der Rückstand in Chlorbutan/Trifluoressigsäure(TFA) 9/1 aufgenommen, 1 h bei 10 °C gerührt, eingeeengt und der Rückstand dreimal aus Essigsäureethylester/Hexan gefällt, so daß man die rohe Vorstufe von **1** erhielt. Zu dieser (2.4 g) in Dichlormethan (DCM), 100 mL) wurde *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Anhydrid (654 mg, 3.0 mmol) und Diisopropylethylamin (DIPEA) (1.4 mL, 8.0 mmol) gegeben. Nach vierständigem Rühren bei Raumtemperatur wurde MEMCI (570 µL, 5 mmol) zugegeben und die Mischung ca. 12 h gerührt. Die Lösung wurde mit DCM (200 mL) verdünnt und mit NaHSO₄-Lösung (1 M), Wasser, NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (gesättigt, jeweils 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde chromatographisch gereinigt (Kieselgel, DCM/Methanol 98/2, 95/5) und ergab Verbindung **1** (1.933 g, 66 % Ausbeute bezogen auf iso-CsA).

2: Zu einer Lösung von **1** (975 mg, 0.795 mmol) in DCM (10 mL) wurde 1 mL einer 2 M Lithiumborhydrolösung in THF tropfenweise bei 0 °C gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur ca. 12 h gerührt und dann wurden nochmals 0.5 mL der Lithiumborhydrolösung zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und die Reaktion durch Zugabe einer Citronensäurelösung abgebrochen. Die Mischung wurde mit DCM (100 mL) verdünnt und mit NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (gesättigt, jeweils 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und der Rückstand in DCM/Methanol (98/2) aufgenommen und durch Kieselgel gefiltert. Einengen ergab die rohe Vorstufe von **2** (773 mg). Zu dieser (746 mg) in wasser-

freiem THF (40 mL) wurde Methansulfonsäure (300 µL) gegeben. Nach 72stündigem Röhren bei Raumtemperatur unter Stickstoff wurden bei 0 °C Pyridin (400 µL), DIPEA (1.5 mL) und Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 2 h wurde die Lösung mit DCM (100 mL) verdünnt und mit NaHSO₄-Lösung (1 M), Wasser, NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (gesättigt, jeweils 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und chromatographisch gereinigt (Kieselgel, DCM/Methanol 98/2) und lieferte so Verbindung **2** (360 mg, 40 % bezogen auf **1**).

3: Zu Verbindung **2** (60 mg, 0.051 mmol) in DCM (1 mL) wurde tropfenweise TFA (0.5 mL) gegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM (50 mL) verdünnt und dreimal mit NaHCO₃-Lösung (gesättigt), danach mit Wasser und Kochsalzlösung (gesättigt, jeweils 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und in DCM (0.5 mL) aufgenommen. Boc-(2S,3R,4R,6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-octensäure (Boc-MeBmt)[21] (18.7 mg, 0.062 mmol), Bromotris(pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat) (PyBroP)[22] (27 mg, 0.060 mmol) und DIPEA (27 µL) wurden bei 0 °C unter Stickstoff hinzugegeben. Nach 2 h bei dieser Temperatur ließ man auf Raumtemperatur erwärmen, verdünnte mit DCM (50 mL), wusch mit NaHSO₄-Lösung (1 M), Wasser, NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (jeweils 20 mL). Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und chromatographisch gereinigt (Flash-Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton 9/1) und lieferte so Verbindung **3** (56 mg, 81 %).

4: Zu einer Lösung von **5** (27 mg, 0.022 mmol) in DCM (1 mL), wurde tropfenweise TFA (0.5 mL) gegeben. Nach 1 h Röhren bei 0 °C verdünnte man mit DCM (50 mL) und wusch dreimal mit NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (jeweils 10 mL). Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde in DCM (30 µL) aufgenommen, und Fmoc-N-Melle (12 mg, 0.032 mmol), PyBroP (14 mg, 0.032 mmol) und DIPEA (15 µL) wurden hinzugegeben und die Mischung 6 h bei 0 °C und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden bei 0 °C nochmals Fmoc-N-Melle (5 mg, 0.013 mmol) und PyBroP (5 mg, 0.011 mmol) (5 mg, 0.011 mmol) zugegeben. Man ließ innerhalb von ca. 12 h auf Raumtemperatur erwärmen. Die Mischung wurde mit DCM (50 mL) verdünnt, mit NaHSO₄-Lösung (1 M), Wasser, NaHCO₃-Lösung (gesättigt), Wasser und Kochsalzlösung (jeweils 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, eingeeengt und chromatographisch gereinigt (Kieselgel, Essigsäureethylester/Aceton 9/1) und lieferte so **4** (19 mg, 60 %).

5: Zu einer Lösung von **4** (4.6 mg, 0.0028 mmol) in THF/Wasser (10/1, 200 µL) wurden 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (3 µL) und Lithiumbromid (2 mg) gegeben. Man ließ ca. 12 h röhren und gab erneut DBU (4 µL) und Lithiumbromid (3 mg) zu. Nach 5 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure (20 µL) abgebrochen und das Gemisch durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (Beckman ODS Ultrasphere 5 µm, 10 mm × 25 cm, 0.1 % TFA/Acetonitril 70/30 → 10/90 in 30 min, 70 °C, 3 Läufe) und lieferte so die Peptidvorstufe von **5** (2.1 mg, 60 %). Eine Lösung von diesem Peptid (1.2 mg, 970 nmol), AOP [17] (4 mg, 0.009 mmol) und Lutidin (2,6-Dimethylpyridin) (4 µL) in DCM (1.2 mL) wurden 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Essigsäure (30 µL) abgebrochen, die Mischung eingeeengt und der Rückstand in Acetonitril aufgenommen, um ihn durch Umkehrphasen-HPLC zu reinigen (Beckman ODS Ultrasphere 5 µm, 10 mm × 25 cm, 0.1 % TFA/Acetonitril 70/30 → 10/90 in 30 min, 70 °C). Dieses Verfahren ergab das reine cyclische Peptid **5** (0.65 mg, 55 %).

Ein eingegangen am 9. Juni 1995 [Z8080]

Stichworte: Cyclophilin • Cyclosporin • Immunophilin • Proteindimerisierung

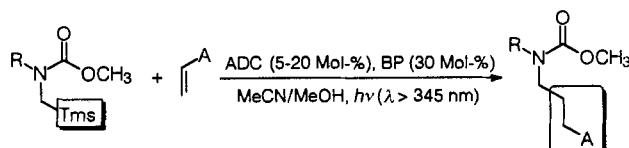
- [1] D. J. Austin, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. & Biol.* **1994**, *1*, 131.
- [2] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 459.
- [3] A. C. Chan, D. M. Desai, A. Weiss, *Annu. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 555.
- [4] W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science* **1988**, *240*, 1759.
- [5] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019.
- [6] M. N. Prusky, D. M. Spencer, T. M. Kapoor, H. Miyaki, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. & Biol.* **1994**, *1*, 163.
- [7] H. Ke, D. Mayrose, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber, Z. Y. Chang, F. A. Etzkorn, S. Ho, C. T. Walsh, *Structure (London)* **1994**, *2*, 33.
- [8] G. Pfugl, J. Kallen, T. Schirmer, J. N. Jansonius, M. G. Zurini, M. D. Walkins-haw, *Nature* **1993**, *361*, 91.
- [9] V. F. Quesniaux, M. H. Schreier, R. M. Wenger, P. C. Hiestand, M. W. Hardig, M. H. V. Van Regenmortel, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 1359.
- [10] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, *267*, 383.
- [11] J. S. Richardson, D. C. Richardson in *Prediction of Protein Structure and The Principles of Protein Conformation*, Vol. XIII (Hrsg.: G. D. Fasman), Plenum, New York, **1989**.
- [12] G. Sarkar, S. S. Sommer, *BioTechniques* **1990**, *8*, 404.
- [13] P. J. Belshaw, S. L. Schreiber, *Chem. & Biol.*, eingereicht.
- [14] R. Oliayi, V. J. Stella, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 617.

- [15] A. Ruegger, M. Kuhn, H. Lichti, H. R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, W. A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075.
[16] R. E. Ireland, W. J. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 4705.
[17] L. A. Carpino, F. A. El, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 695.
[18] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, D. W. Speicher, *Science* **1984**, *226*, 544.
[19] H. Husi, M. Zurini, *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 251.
[20] L. D. Zydowsky, F. A. Etzkorn, H. Y. Chang, S. B. Ferguson, L. A. Stoltz, S. I. Ho, C. T. Walsh, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1092.
[21] W. D. Lubell, T. F. Jamison, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3511.
[22] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437.
[23] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Prot. Struct. Funct. Genet.* **1991**, *11*, 283.

Radikalische C-C-Bindungsknüpfung durch photoelektronentransferkatalysierte Addition von α -Silylcarbamaten an acceptorsubstituierte Alkene**

Eric Meggers, Eberhard Steckhan* und Siegfried Blechert

Lichtinduzierte Reaktionen zwischen Donor- und Acceptor-molekülen haben eine bedeutende Stellung in der Chemie der Radikalionen erlangt^[1]. So ist der photoinduzierte Elektronen-transfer (PET) die Basis einer modernen Variante zur milden Erzeugung von Radikalen^[2]. Durch Einelektronenoxidation entsteht intermediär ein Radikalkation, welches anschließend unter Abspaltung eines Elektrofugs fragmentiert. Uns gelang jetzt die Verwirklichung einer auf diesem Prinzip basierenden Methode zur elektronentransferkatalysierten intermolekularen C-C-Bindungsknüpfung. Unter Einwirkung von UV/Vis-Licht und in Gegenwart katalytischer Mengen von 9,10-Anthracendi-carbonitril (ADC) und Biphenyl (BP) addieren α -Silylcarbamate an acceptorsubstituierte Alkene. Hierbei kommt es zur Bildung γ -acceptorsubstituierter Aminoderivate (Schema 1)^[3].



Schema 1. PET-katalysierte Umsetzung von α -Silylcarbamaten mit acceptorsubstituierten Alkenen (A = Acceptor). Tms = Trimethylsilyl, für A und R siehe Tabelle 1.

Wir realisierten diese Umsetzung mit den in Tabelle 1 aufgeführten Edukten^[4]. Die Ergebnisse weiterer Reaktionen mit acceptorsubstituierten Alkenen deuten darauf hin, daß dieser Reaktionstyp allgemeingültigen Charakter hat. Elektronenreiche Alkene wie Cyclohexen und 1-Hexen reagieren jedoch nicht.

[*] Prof. Dr. E. Steckhan, E. Meggers

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn
Telefax: Int. + 228/735683
E-mail: steckhan@uni-bonn.de

Prof. Dr. S. Blechert

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität
Straße des 17. Juni 124, D-10623 Berlin
Telefax: Int. + 30/31423619
E-mail: gurt0531@mailsrrz.rz.tu-berlin.de

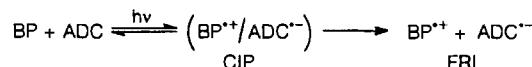
[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung (I/69415), dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF AG gefördert. E. M. dankt der Theodor-Laymann-Stiftung für ein Stipendium.

Tabelle 1. Durchgeführte Additionsreaktionen.

α -Silylcarbamat	Aiken	Additionsverb. [a]	Ausbeute [%]
			4 62 [b]
			5 25 [b]
			6 46 [b]
			7 60-67 [c]
			8 32 [c, e]
			9 ca. 75 [d, e]

[a] Alle Additionsverbindungen sind anhand von ^{13}C -NMR (DEPT), ^1H -NMR, IR, MS, Hochauflösungs-MS und CHN-Analyse vollständig charakterisiert. Von 9 konnte wegen seiner Zersetzung keine Elementaranalyse erhalten werden. Typische Daten siehe experimenteller Teil. [b] Isolierte Ausbeuten. [c] Gaschromatographisch bestimmte Ausbeuten. [d] Die Ausbeute wurde gaschromatographisch abgeschätzt. [e] 9 entsteht im Diastereomerenverhältnis von ca. 2/1, während von 8 nur ein Diastereomer gefunden wurde.

Für die Reaktion kann folgender Mechanismus angenommen werden: Das durch eine ET-Quenchreaktion zwischen dem primären Elektronendonator BP ($E_{\text{ox}} = 1.98$ V vs. SCE) und dem photochemisch angeregten ADC ($E_{\text{red}}(\text{S}1) = 2.0$ V vs. SCE)^[5] entstehende Biphenylradikalkation (Schema 2) oxidiert in einer anschließenden Einelektronentransfer(SET)-Reaktion das α -Silylcarbamat ($E_{\text{ox}} \approx 1.45$ V vs. Ag/AgCl)^[6] zum Radikalkation (Redoxphotosensibilisierung)^[7].



Schema 2. Redoxphotosensibilisierung mit ADC und BP (CIP = Kontaktionenpaar, FRI = Freie Radikalionen).

Nach der Silylgruppenabspaltung^[8] wird das gebildete nucleophile Radikal durch eine Verbindung mit einer elektronenarmen Doppelbindung abgefangen. Der Rückelektronen-transfer von einem ADC-Radikalanion auf das entstandene Sekundärradikal und die nachfolgende Protonierung schließen die ET-Katalyse ab (Schema 3). Als Alternative nicht auszuschließen ist, daß auf der Stufe des α -Carbonylradikals ein