

Guanidiniocarbonylpyrrol-modifizierte Peptide als selektive Liganden für Survivin

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaft
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Marius Heimann

geboren in Emmerich

Fakultät für Chemie
Universität Duisburg-Essen

2022

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/77113

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221114-092225-7

Alle Rechte vorbehalten.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von Mai 2018 bis Dezember 2022 unter der Betreuung von Prof. Dr. Jens Voskuhl und Prof. Dr. Carsten Schmuck an der Fakultät für Chemie (Organische Chemie) der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als die von mir gekennzeichneten Quellen und Hilfsmitteln bedient habe. Außerdem erkläre ich, dass keine Promotionsverfahren in diesem oder einem anderen Fach endgültig gescheitert sind und dass diese Dissertation ausschließlich in diesem Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Essen, den

Marius Heimann

Erstgutachter: Prof. Dr. Jens Voskuhl

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Shirley Knauer

Vorsitzende: Prof. Dr. Bettina Siebers

Datum der Disputation: 07.11.2022

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mir die Zeit nehmen um denen Personen zu danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Der erste Dank gilt *Prof. Dr. Carsten Schmuck*. Du hast mich in allen meinen Abschlussarbeiten bereut und warst auch während meines Studiums ein großartiger Dozent, der zwar stets viel von den Studierenden gefordert, sie aber auch ebenfalls viel gefördert hat. So sehr es mich erfreut hat, dass du es mir ermöglichtest, ebenfalls meine Promotion in deinen Arbeitskreis zu starten; so sehr erfüllt es mich mit Trauer, dass wir uns viel zu früh von dir verabschieden mussten. Ich hoffe dennoch, dass du mit meiner Dissertation zufrieden gewesen wärst.

Dementsprechend großer Dank gilt *Prof. Dr. Michael Giese, Prof. Dr. Jochen Niemeyer, Prof. Dr. Jens Voskuhl* und *Dr. Christoph Hirschäuser* dafür, dass sie gemeinsam zusätzlich noch die Organisation und Betreuung des AK Schmucks übernahmen. Insbesondere dir Jens, möchte ich für deine Geduld bei meiner Betreuung bedanken. Du übernahmst mich in einer problematischen Phase meiner Promotion und dank dir kann ich diese Ergebnisse nun präsentieren.

Allen Kollegen des SFB 1093 gilt mein Dank ins besonders *Dr. Lydia Didt*, die stets engagiert die Organisation aller Veranstaltungen übernahm. Ebenfalls danken möchte ich explizit *Dr. Annika Lennartz*, dafür, dass sie mir stets große Mengen an Survivin zur Verfügung stellte, und *Paul Stahl*, der die Tox-Assays an HeLa-Zellen für mich durchgeführt hat. Außerdem kann ich nicht genug betonen, wie wichtig die NMR-Titrationen für meine Dissertation waren, weshalb ich *Dr. Christine Beuck* nicht genug danken kann. Ebenso danke ich *Prof. Dr. Shirley Knauer* dafür, dass sie als Zweitgutachterin dieser Dissertation zur Verfügung steht.

Ebenso möchte ich meinen Kollegen des AK Schmucks für die kollegiale und freundlichen Arbeitsatmosphäre, die sie geschaffen haben, danken. Hier möchte ich auch extra meine GMP-Manager Kollegen *Thies Dirksmeyer* und *Daniel Sebena* hervorheben, dafür dass sie immer ein offenes Ohr für meine synthetischen Probleme hatten. Ferner möchte ich *Elisabeth Verheggen* danken, die stets bereit war, bei praktischen Problemen mit Rat beiseite zu stehen. Da ich ohne *Dr. Felix*

Niemeyer und *Dr. Thorsten Schaller* erst deutlich später auf die Ursache für meine Dupletts im C-NMR gestoßen wäre, gilt auch euch mein Dank. Ebenfalls möchte ich mich bei *Dr. Eva Zeppenfeld* für ihre Unterstützung bedanken.

Nun möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die sich die Zeit genommen haben diese Dissertation zu korrigieren. *Alla Heckel*, *Andrea Heimann*, *Angelika Geerlings*, *Anika Hering*, *Katharina Hellmann*, *Mario Kerst* und *My-Hue Le*. Eure Korrekturvorschläge haben dafür gesorgt, dass meine Dissertation ihre jetzige Qualität erreichen konnte.

Ich möchte ebenfalls drei meiner engsten Freundinnen an dieser Stelle für ihre emotionale Unterstützung während meiner Promotion danken. *Alla*, du hattest immer ein offenes Ohr für jegliche meiner Probleme und warst immer sofort zur Stelle wenn der Schuh drückte. Ich wünsche dir hier ebenfalls alles gute und viel Erfolg für deine eigene Promotion. *Katharina*, auch wenn wir viel zu selten Zeit zum Telefonieren finden, haben deine Tipps mich stets wieder aufgemuntert und ich will dich nicht missen müssen. Ich wünsche dir viel Erfolg für deine künftige Karriere und alles Gute. *Angelika*, wir sind schon seit vielen Jahren befreundet und ich würde mich freuen, wenn es so bleibt. Ohne deine Motivationsmaßnahmen wäre meine Dissertation wahrscheinlich noch nicht fertig. Ich freue mich darauf im November deine Hochzeit mit dir zu feiern und wünsche dir viel Glück und alles Gute, sowohl für deine Ehe mit deinem Traummann, als auch für deine eigene Promotion.

Zuletzt will ich noch meiner Familie für ihre Unterstützung danken. Ohne die Unterstützung meiner Eltern *Jörg* und *Andrea Heimann*, hätte ich es bei Weitem nicht bis zu meiner Promotion geschafft. Ins besondere meiner Mutter möchte ich nochmal für ihre Mühen danken, trotz ihrem geringen Fachwissen, die grammatikalischen Fehler und Kleinigkeiten in meiner Dissertation zu finden. Meinen Vater möchte ich auch für seine ständige, wenn auch unkonventionelle, Unterstützung während meines gesamten Studiums danken. Sie kam nicht immer gut oder richtig bei mir an, aber ich schätze sie im Nachhinein dennoch. Meinen Bruder *Dr. Philipp Heimann* möchte ich ebenfalls für sein Verständnis für die Probleme während meiner Promotion danken.

Euch allen,

Vielen Dank

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Hintergrund.....	3
2.1. GCP als Oxoanionen Bindungsmotiv.....	3
2.2. Survivin.....	7
2.2.1. Survivin als Inhibitor der Apoptose.....	8
2.2.2. Survivins Rolle in der Mitose.....	10
2.2.2.1. Chromosom Passanger Complex.....	10
2.2.2.2. Histon H3.....	13
2.3. Beispiele für Survivin als potentiell Ziel für Krebstherapien.....	17
2.3.1. Sepantroniumbromid YM155 als Inhibitor der Survivin Expression.....	18
2.3.2. LYS2181308/ISIS23722 - ein antisense Oligonukleotid zur Inhibierung von Survivin.....	20
2.3.3. Immuntherapie mit einer kurzen Peptidsequenz der Survivin 2B-Variante.....	21
2.3.4. Modulierung der Survivin/Crm1 und der Survivin/Histon H3 Interaktion durch GCP-haltige Liganden.....	22
2.3.5. Peptidsequenzen zur Verbesserung der Stöchiometrie der Bindung des molekularen Tweezers zu Survivin.....	30
3. Zielsetzung.....	32
4. Ergebnisse und Diskussion.....	33
4.1. Modifizierung der neuerer Sequenz von Histon H3 mit Dap(GCP).....	33
4.2. Kombination des Histon fünfer Peptids mit GCP-Dap(GCP).....	42
4.3. Untersuchung des Einflusses der fünften Aminosäure der Histon Bindungssequenz.....	74
4.4. Modifizierung des Histon fünfer Peptids mit GCP und Dap(GCP).....	77
4.5. Potentielle Verbesserungen der Liganden.....	84
5. Zusammenfassung.....	86
6. Summary.....	90
7. Experimentalteil.....	94
7.1. Allgemeine Synthesevorschrift für die mikrowellen-gestützte Festphasen-Peptidsynthesen.....	96
7.2. Synthese von 22	97
7.3. Synthese von 23	99
7.4. Synthese von 25	102

7.5. Synthese von 26	105
7.6. Synthese von 27	107
7.7. Synthese von 28	109
7.8. Synthese von 32	111
7.9. Synthese von 33	113
8. Literaturverzeichnis.....	115
9. Anhang.....	129
9.1. ITC.....	129
9.2. HPLC-Chromatogramme.....	133
9.3. ¹ H-NMR-Spektren.....	137
9.4. ¹³ C-NMR-Spektren.....	145
9.5. IR-Spektren.....	153
9.6. HR-MS Spektren.....	156
9.7. Abkürzungsverzeichnis.....	160
9.7.1 Abkürzungen der Aminosäuren.....	163

1. Einleitung

Im Jahr 2018 wurden 18,1 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert und 9,6 Millionen Menschen starben an ihrer Krebserkrankung. Für das Jahr 2040 wird prognostiziert, dass diese Zahlen sich verdoppeln werden. Entgegen der weitläufigen Vorstellungen ist dies dabei kein reines Problem der Industrie- und Schwellenländer, da durch eine grundlegende Verbesserung der medizinischen Grundversorgung auch in den Entwicklungsländern die Anzahl der diagnostizierten Krebserkrankungen steigt. Dennoch gibt es deutliche Unterschiede zwischen den in den Industrie- und Schwellenländern und den in den Entwicklungsländern diagnostizierten Arten der Karzinomerkrankungen. Zwar werden die meisten Tumorerkrankungen vermehrt in Staaten mit einem höheren Lebensstandard diagnostiziert, jedoch bilden unter anderen das Kaposi-Sarkom und Gebärmutterhalskrebs die Ausnahme. Ersteres kann durch Herpes-Viren bei Patienten mit dem Akquiriertem Immun-Defizienz-Syndrom (AIDS) ausgelöst werden, während der die zweitgenannte Erkrankung durch eine Impfung gegen Humane Papillomviren verhindert werden könnte. Damit zählen diese beiden beispielhaft aufgezählten Krebsarten zu denen, die durch Prävention und/oder eine entsprechende Impfung verhinderbar sind. Insgesamt schätzt die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass 30 bis 50% der Krebserkrankungen vermeidbar wären. Diese ließen sich entweder durch eine Impfung gegen zum Beispiel Humane Papillomviren und Hepatitis-B vermeiden oder werden erst durch diverse Risikofaktoren wie zum Beispiel Adipositas oder erhöhter Alkohol oder Tabakkonsum ausgelöst. Die Minimierung des Krebsrisikos ist dementsprechend der vielversprechendste Ansatz zur Reduzierung der Krebstoten, jedoch bedeutet die oben erwähnte Schätzung der WHO ebenfalls, dass mehr als die Hälfte der Karzinomerkrankungen von nicht beeinflussbare Faktoren wie zum Beispiel die genetischen Veranlagung des Patienten abhängt. Deshalb werden regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen empfohlen, da der Behandlungserfolg eher von dem Zeitpunkt der Diagnose als von den möglichen Behandlungsmethoden abhängt. Die Behandlungsmöglichkeiten sind abhängig von der Karzinomtyp. Hierbei handelt es sich meist um Operationen, Chemotherapien oder Strahlentherapien. Sowohl das Wissen um eine bösartige Erkrankung als auch die Behandlungsmöglichkeiten sorgen nicht nur für eine erhöhte physische Belastung der Patienten, sondern auch eine psychische Belastung der Patienten und ihrer

Angehörigen. Zwar wird an neueren innovativen Therapien geforscht, jedoch wurden bis jetzt keine signifikante Verbesserungen in der Lebensqualität und Erhöhung der Lebensdauer gegenüber den etablierten und auch weltweit bezahlbaren Therapien erzielt.^[1]

Mit dem fortschreitenden Verständnis des Mechanismus' der Mitose geriet das Protein Survivin in den Fokus vieler Forschungsgruppen als potentielles Zielprotein für neuartige Krebsbehandlungen. Krebszellen besitzen in der Regel eine hohe Expression an Survivin, wohingegen es in den meisten regulären Gewebearten kaum expressioniert ist. Survivin besitzt sowohl als Teil des *chromosom passanger complex*' (CPC), als auch als Mitglied der Inhibitor der Apoptose Proteine (IAP) regulierende Funktionen, sowohl in der Mitose als auch in der Apoptose. Neben Krebszellen besitzen aber unter anderen auch (Hamatopoetische) Stammzellen, vaskuläre Endothelzellen, Granulozyten, T-Zellen und Erythrozyten eine hohe Survivinexpression. Zu den Karzinomarten mit erhöhter Survivinexpression gehören zum Beispiel Lungen-, Hirn-, Darm-, Brust-, Leber-, Blasen-, Prostata-, Nieren- und Hautkrebs, weshalb Survivin ebenfalls als Biomarker für eine Krebserkrankung gilt. Eine hohe Survivinkonzentration wird assoziiert mit der Progression der Erkrankung, der Resistenz gegenüber Medikamenten (*drug resistance*) und einer geringen Überlebensrate.^{[2],[3],[4]}

Survivin ist somit ein vielversprechendes Ziel für neuartige Krebstherapien. Obwohl seit dessen Entdeckung bereits über zwei Jahrzehnte vergangen sind, konnte noch keine Anti-Survivin-Therapie erfolgreich etabliert werden. Lediglich vier Verbindungen konnten bis 2019 zweite Phase der klinischen Studien erreichen, in der keine einen signifikanten Mehrwert für die Patienten erzielen konnte.^{[5],[6]}

In den letzten Jahren rückte die *baculovirus IAP repeat*-Domäne (BIR-Domäne) von Survivin in den Fokus, da diese Domäne sowohl an den beiden Funktionen von Survivin beteiligt ist als auch Liganden, die an dieser Domäne binden, eine toxikologische Wirkung zeigten. Die Optimierung der Bindung dieser supramolekularen Liganden mit Survivin ist der Fokus dieser Arbeit.^{[7],[8],[9]}

2. Hintergrund

2.1. GCP als Oxoanionen Bindungsmotiv

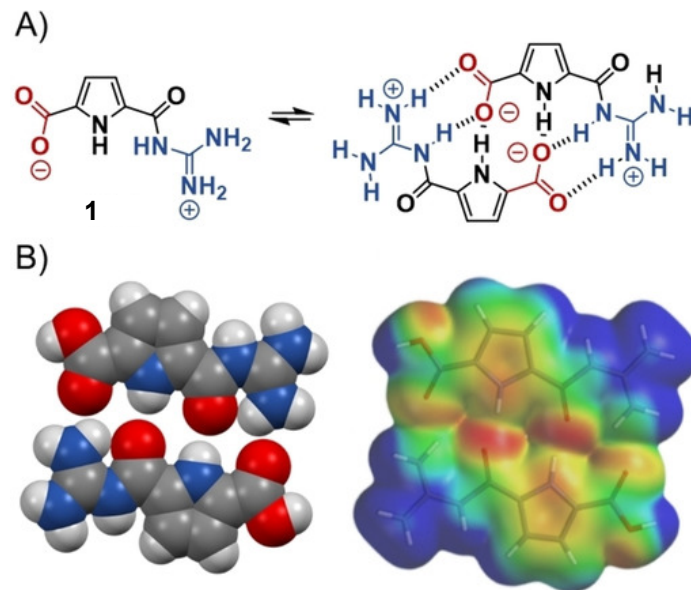


Abbildung 1: Dimerisierung des GCP-Zwitterions durch Wasserstoffbrückenbindungen (A). Kalottenmodell (CCDC 111759) und die berechnete elektrostatischen Oberflächenpotential (B) des Dimers.^[10]

Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP) **1** ist ein künstlich entwickeltes Oxo-Anionen Bindungsmotiv, das 1999 zum ersten Mal publiziert wurde. Es besteht aus einem 2,5-disubstituierten Pyrrol. Während sich in der 2-Position eine Carboxylgruppe befindet, ist in der 5-Position ein Guanidin über eine andere Carboxylgruppe verknüpft. Durch die Kombination der nicht kovalenten Wechselwirkungen aus Wasserstoffbrücken-bindungendonatoren und der positive Ladung am Guanidin entsteht eine Bindungstasche.(Abbildung 1) Diese nicht kovalenten Wechselwirkungen werden auch supramolekulare Wechselwirkungen genannt. Zu diesen zählen Wechselwirkungen wie die zum Beispiel Dipol-Dipol- oder die Kationen- π -Wechselwirkung aber auch mechanische Bindungen wie die der Catechanen oder Rotaxanen, die keine, beziehungsweise kaum Pendants in biologischen Systemen besitzen. GCP wurde mit seinen spezifischen supramolekularen Wechselwirkungen designt, um Oxoanionen wie zum Beispiel Carboxylate und Phosphate zu komplexieren. Dies ist nicht nur in unpolaren Lösungsmitteln sondern auch in Wasser möglich, weshalb GCP nicht nur in materialwissenschaftlichen sondern auch in biologischen Anwendungsgebieten Verwendung findet. Des Weiteren kann das Zwitterion von GCP stabile Dimere in

wässriger Lösung ausbilden, oder durch die freie Carboxylgruppe durch eine Kupplung mit einem Amin das korrespondierenden Amid bilden. (Abbildung 1) Dies ermöglicht nicht nur die flexible Verwendung von GCP, zum Beispiel in der Peptidchemie, sondern erhöht auch die Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückendonoren um eins.^{[10],[11],[12],[13],[14]}

GCP-haltige Verbindungen wurden bereits erfolgreich, sowohl mit modifizierten GCP in pH-schaltbaren Gelen^[15] als auch in biologischen Anwendungen wie die Gentransfektion,^{[16],[17],[18],[19]} angewendet. Eine weitere Verwendung für GCP sind Liganden für Proteine wie β -Tryptase^{[20],[21]}, 14-3-3 ξ ^{[22],[23],[24],[25]} und Survivin (Beispiele für Survivin-Liganden^{[8],[9]} werden genauer im Kapitel 2.3.4 erläutert). Dabei adressiert der GCP-Teil dieser meist die negativ geladenen Seitenketten der Glutamin- und Asparaginsäuren an der Oberfläche, während der Rest der Liganden die Regioselektivität festlegt. Dieser Rest kann wie an den in Abbildung 2 beispielhaft gezeigten Liganden **2** und **3a-b** in der Größe stark variieren.^[10]

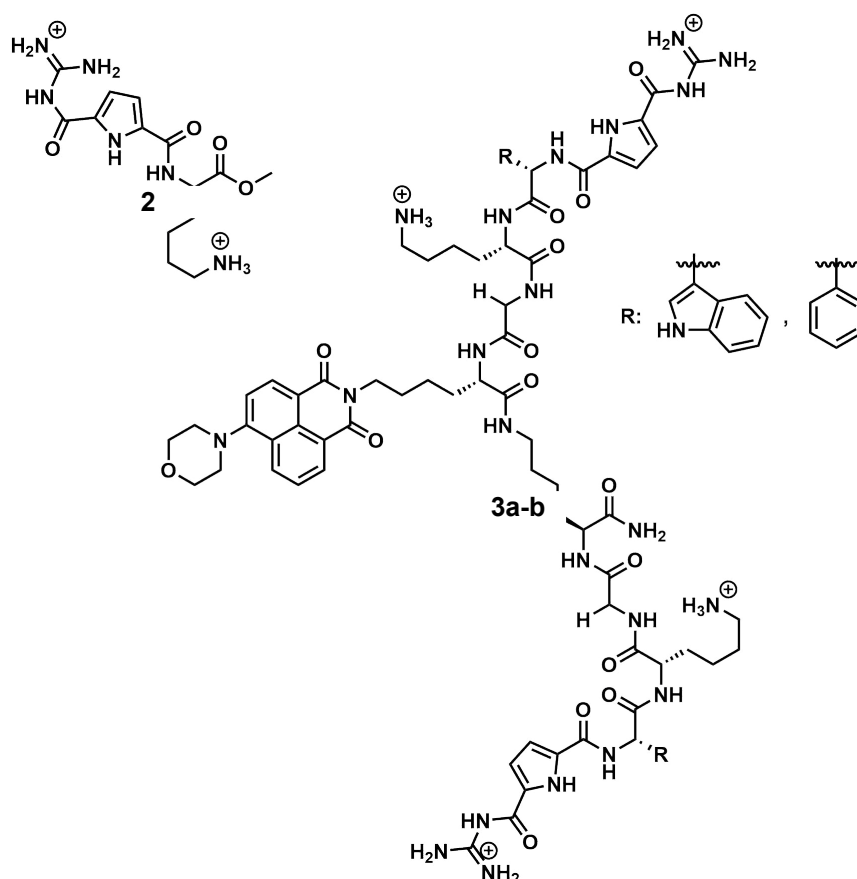
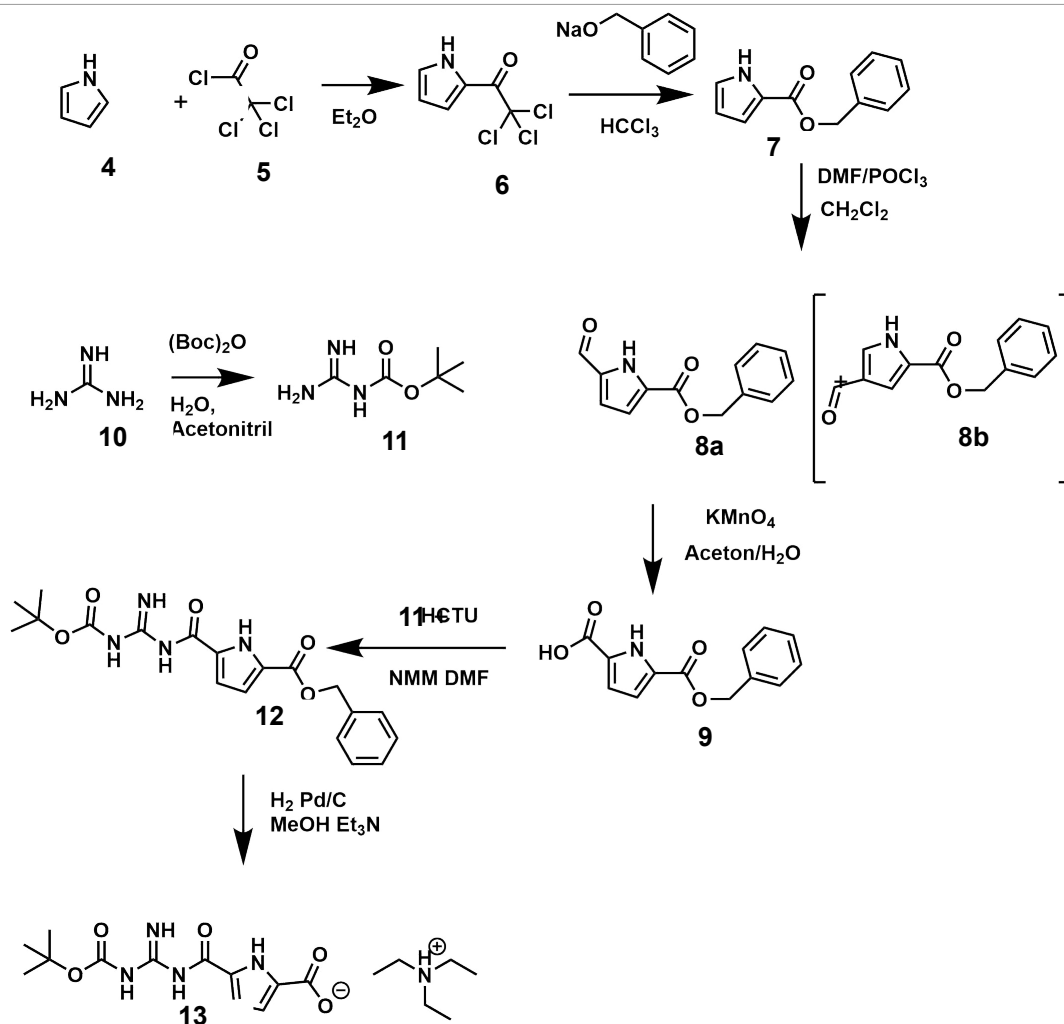


Abbildung 2: Struktur der literaturbekannten 14-3-3 Liganden **2** und **3a-b**.^{[24],[25]}

Die Synthese von Boc-geschützten GCP ist in der Literatur bekannt und wird anhand des Schema 1 erläutert.



Schema 1: Schematischer Verlauf der literaturbekannte Synthese des Boc-geschützten GCP-Bausteins.^[26]

Als Grundbaustein für die GCP-Synthese wird Pyrrol **4** verwendet, welches in einer katalysatorfreien Friedel-Crafts-Acylierung mit Trichloressigsäurechlorid **5** zum Trichloracetylpyrrol **6** reagiert. Dieses wird im Anschluss mit Natriumbenzylalkoholat zum korrespondierenden Benzylester **7** umgesetzt. Durch die Vilsmeier-Haag-Reaktion wird ein Wasserstoffatom am Pyrrolring durch eine Carbonylfunktion substituiert. Hierbei entstehen die beiden Konstitutionsisomere **8a** und **8b**, wovon nur das 2,5-substituierte Isomer **8a** benötigt wird. Nachdem die beiden Isomere getrennt wurden, wird die Aldehydfunktion von **8a** mit Kaliumpermanganat zur Carbonsäure **9** oxidiert. Guanidin **10** wird parallel zu der bisher genannten Synthese mittels Boc-Anhydrid zum einfach Boc-geschützten Guanidin **11** umgesetzt. **11** wird mit der Carbonsäure **9** mittels HCTU und NMM in DMF zu **12** gekuppelt. Zuletzt wird der Benzylester von **12** durch eine Palladium-katalysierte Hydrierung entfernt.

Dadurch entsteht der für die Synthese verwendbare Boc-geschützte GCP-Baustein **13**.^{[26],[27]}

Auf Grundlage des GCPs wurden 2005 die vier Argininmimetika **14a-d** etabliert. (Abbildung 3) Diese basieren auf den Aminosäuren *L*-Diaminopropionsäure (Dap), *L*-2,4-Diaminobutansäure (Dab), *L*-Ornithin (Orn) und *L*-Lysin (Lys). Sie besitzen alle ein endständiges Amin an der Seitenkette, woran das Boc-geschützte GCP gekuppelt wurde. Das α -Amin der Aminosäuren wurde mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützt, so dass diese Bausteine prinzipiell in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können.^[12]

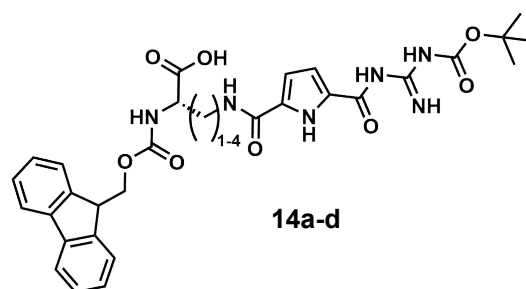


Abbildung 3: Struktur der etablierten GCP-haltigen Argininmimetika **14a-d**.

2.2. Survivin

Survivin ist ein Protein mit einer Molekularmasse von 16,5 kDa, das sowohl als Inhibitor der Apoptose (IAP) bekannt, als auch ein Teil des *chromosom passenger complexes* (CPC) ist, und damit für diverse Kontrollmechanismen und den korrekten Ablauf der Mitose verantwortlich ist. Zusätzlich besitzt Survivin eine erhöhte Expression in vielen Krebszellen, während es in dem meisten differenzierten Zellen kaum expressioniert ist, weshalb es zu einem potentiellen Zielmolekül für neuartige Krebsbehandlungen wurde. Der CPC besteht zusätzlich aus dem *inner centromere protein* (INCENP), Aurora B und Borealin (ebenfalls bekannt als Dasra). Als Mitglied der IAP-Familie fällt Survivin unter anderen dadurch auf, dass es das kleinste Mitglied dieser Familie ist und nur eine für die IAP-Proteine typische *baculovirus IAP repeat*-Domäne (BIR-Domäne) besitzt. Diese befindet sich bei Survivin am N-Terminus und besteht unter anderem aus einem komplexierten Zn^{2+} -Ion. Am C-Terminus existiert eine helikale Struktur, die für die Ausbildung des CPCs notwendig ist. Zusätzlich besitzt Survivin ebenfalls ein *nuclear export signal* (NES) zwischen den Aminosäure Valin V₈₉ und Leucin L₉₈ (₈₉VKKQFEELTL₉₈). Durch diese Peptidsequenz kann Survivin aktiv mittels *chromosome region maintenance 1* (Crm1) und *guanosine triphosphate kinase Ras-related nuclear protein* (GTPase Ran) aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert werden. Jedoch kann Survivin nur passiv in den Zellkern gelangen, da sein Molekulargewicht zwar unter 60 kDa liegt, es aber kein *nuclear localisation signal* (NLS) besitzt, welches das Gegenstück der NES darstellt.^{[4],[28],[29],[30],[31],[32],[33],[34],[35],[36]}

In den nachfolgenden Kapiteln wird näher auf die verschiedenen Funktionen von Survivin und diversen „*anti*-Survivintherapien“ eingegangen.

2.2.1. Survivin als Inhibitor der Apoptose

Die Funktion von Survivin besitzt in zweierlei Hinsicht eine Sonderrolle innerhalb der IAP-Familie. Zum Einen verfügt es nicht nur lediglich eine BIR, sondern ist ebenfalls essentiell für den korrekten Verlauf der Mitose. Dementsprechend nimmt Survivin eine besondere Rolle in der Erhaltung von Tumorzellen dem *tumor cell maintenance* ein. Diese Aufgabe besteht unter anderen aus dem Schutz vor der Apoptose, der Zellteilung und der Zellstressantwort der Krebszellen. Jedoch hat ein Survivin Knockdown in Hefe keine Auswirkung auf die Apoptose der betroffenen Zellen.^{[37],[30]}

Während der Interphase befindet sich der größte Anteil des Survivins im Cytoplasma, da durch dessen NES nukleares Survivin aktiv ins Cytoplasma transportiert wird. Bei einem mutierten NES verteilt sich dieses gleichmäßig zwischen dem Cytoplasma und dem Kern. Dies ist ebenfalls bei Krebszellen der Fall, bei denen selbst in der Interphase Survivin auch im Kern detektierbar ist.^[4]

Im Cytoplasma bildet Survivin ein „schmetterlingsförmiges“-Homodimer aus, dem die Apoptose-inhibierende Wirkung Survivins zugeschrieben wird. Die Bindungsstelle des Dimers entspricht der des Borealin-Survivin-Heterodimers, dessen Bindung zwar stärker ist als die des Homodimers, aber durch die räumliche Trennung des nuklearen Borealins vom Survivin wird die Bildung des Homodimers in der Interphase begünstigt.^{[29],[30]}

Survivin inhibiert zwei Signalkaskaden der Apoptose: Zum Einen die extrinsische und zum anderen die intrinsische apoptotische Signalkaskade. Erstere führt zunächst zur Aktivierung von Caspase 8 während die Zweite Caspase 9 aktiviert; beide Kaskaden führen jedoch zur Aktivierung von Caspase 3. Caspasen sind Cystein Proteasen, die am C-Terminus von Aspartaten Proteine spalten, welche nicht nur biologische Funktionen in der Apoptose und Pyrolyse haben, sondern auch in der DNS Fragmentation.^[38]

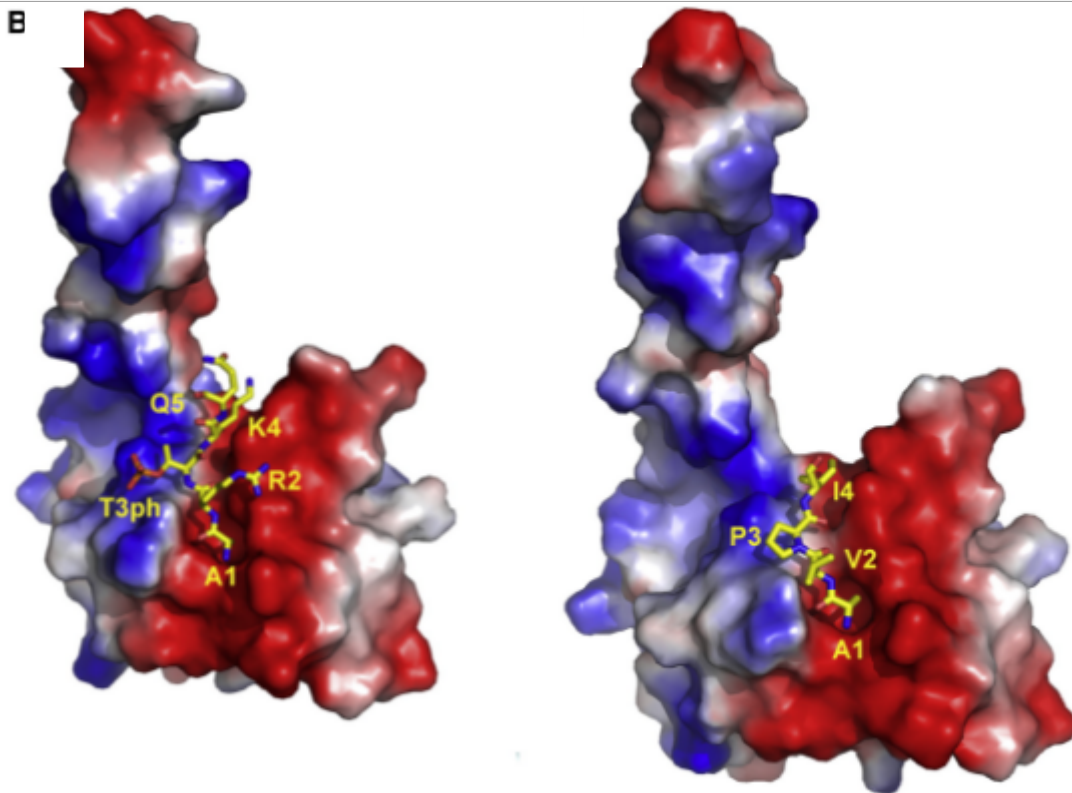


Abbildung 4: Struktur von Survivin dargestellt mittels elektrostatischen Oberflächenpotential mit dem N-Terminalen Peptid von Histon H3 (links) und dem von Smac/Diablo (rechts).^[7]

Diverse Mechanismen zur Modulierung der Aktivität von Survivin sind bekannt. So phosphoryliert zum Beispiel die Kinase *cyclin dependent kinase 1 (Cdk1)* Survivin am Threonin T34. Das hat eine Aktivierung der anti-apoptotischen Funktion von Survivin zur Folge, die eine spontane Apoptose verhindert. Im Gegensatz zur Aktivierung der antiapoptischen Funktion bindet der proapoptischer Faktor Smac/Diablo an der BIR-Domäne von Survivin (Abbildung 4) und inhibiert diese, aus dem der Zelltod resultiert.^{[7],[30],[39],[40],[41]}

2.2.2. Survivins Rolle in der Mitose

Die Funktion von Survivin während der Mitose ist eng mit dem Aufbau und der Funktion des CPCs verbunden.

2.2.2.1. Chromosom Passanger Complex

Wie bereits in Kapitel 2.2. erwähnt besteht der CPC aus vier Proteinen: Survivin, Borealin INCENP und Aurora B. Der CPC kann dabei in zwei Teile unterteilt werden. Der erste Teil bestimmt die Lokalisierung des Komplexes während der Mitose und besteht aus dem N-Terminus von INCENP sowie Survivin und Borealin. Diese Proteine besitzen alle eine lange α -helikale Teilstruktur, mit denen sie aneinander binden und einen 1:1:1 Komplex bilden. (Abbildung 5) Am anderen Ende von INCENPs α -Helix bindet dessen C-Terminus mit Aurora B und bildet so den enzymatischen Teil des CPCs.^{[30],[42]}

Die Lokalisierung des CPCs kann folglich durch die Modulierung von INCENP, Borealin oder Survivin gestört werden. Daraus resultiert eine Fehlfunktion des CPCs. Diese drei Proteine binden an vielfältigen Bindungspartnern; so bindet INCENP am *hetero chromatin protein* HP1, das für die Position des CPCs während der Interphase relevant ist, und Borealin am *charged multivesikular body proteins* (CHMPS) des *endosomal sorting complexes required for transport III* (ESCRT-III). Darüber hinaus ist die Phosphorylierung von Borealin durch Cdk1 notwendig für dessen Bindung an die Shogushin 1&2 (*sgo1/sgo2*) Proteine. Die Phosphorylierung von Borealin am Threonin T230 durch das *monopolar spindle protein 1* (MPS1) ist hingegen für die Modulierung der Dimerisierung und die Aurora B Aktivität zuständig. Ebenfalls relevant für die korrekte Lokalisierung des CPCs scheint die Survivin/Crm1 Interaktion zu sein. Beispiele für Liganden, die in räumlicher Nähe zur Survivins Dimerisierungsfläche bzw. der Survivin/Borealin Dimerisierungsfläche binden, können zum mitotischen Arrest und Zelltod führen, was zu einer Inhibierung des Tumorwachstums in Vitro und in Vivo zur Folge haben kann.^{[30],[43],[44],[45]}

Die Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen der CPC Komponenten sind zellzyklus-abhängig und sorgen für die Relokalisierungen des CPCs während der Mitose. Neben den beiden bereits erwähnten Phosphorylierungen vom Borealin kann Survivin unter anderem von den Kinasen Aurora B am Serin S117, Cdk1 am Threonin T34, *casein kinase 2* (Ck2) am Threonin T48 und von der *polo-like kinase 1*

(Plk1) am Serin S20 phosphoryliert werden. Während die Phosphorylierung von Survivin durch Aurora B einen negativen regulatorischen Effekt auf die Mitose zu haben scheint, ist die Ubiquitinierung von Survivin am Lysin K63 relevant für die richtige Orientierung der Chromosomen.^{[30],[46],[47],[48]}

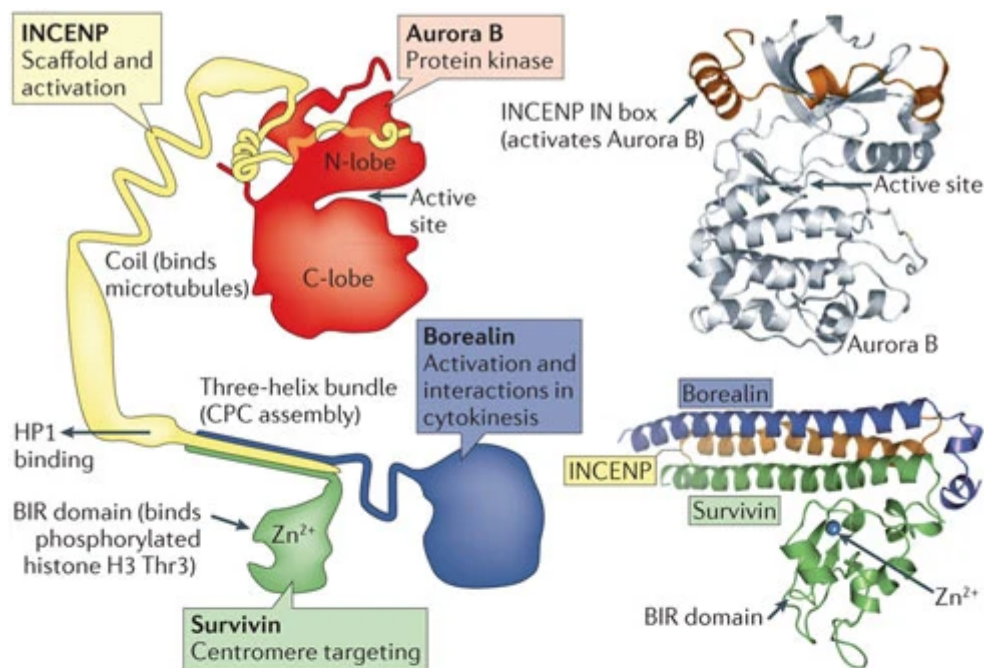


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *chromosom passenger complex* (CPC) mit kurzen Beschreibungen der Funktion und Domänen der Bestandteile (links). Kristallstruktur von Aurora B mit dem C-Terminus von INCENP (Aminosäuren 790-894) (oben rechts). Kristallstruktur von Survivin mit Fragmenten von INCENP (Aminosäuren 1-58) und Borealin (Aminosäuren 10-109) (unten rechts).^[30]

Während der Prophase phosphoryliert der CPC das Serin an der Position 10 von Histon H3. Außerdem korrigiert er Fehler in der Prometa- und Metaphase.^[29]

Aurora B gehört zu einer Familie von stark konservierten Serin- und Threoninkinasen. Während des Eintritts in die Mitose assoziiert Aurora A mit den Polen der Spindeln. Aurora C erfüllt zwar ähnliche Funktionen wie Aurora B, jedoch nur in Zellen, die Meiose statt Mitose betreiben.^{[30],[49]}

Aurora B hat eine große Anzahl an Substraten, zu denen unter anderem Histon H3 an der Stelle S10 und Aurora B selbst gehören.^[50]

Aurora B wird durch zwei Mechanismen aktiviert: Zum Einen durch die Bindung an der INBOX von INCENP und zum anderen durch die Phosphorylierung, sowohl durch Aurora-B in *trans* am Threonin T232, als auch durch die Checkpointkinase 1 (Chk1) am Serin S331. Letztere ist Teil der Kontrolle der DNS auf mögliche Schäden (*DNA damage checkpoint*). Des Weiteren ist für den korrekten Fortschritt der Mitose die SUMOylierung (*small ubiquitin-related modifier* (SUMO)) von Aurora B an deren Kinase Domäne notwendig.^{[30],[49],[51],[52],[53]}

Der CPC nimmt ebenfalls eine zentrale Rolle in dem *spindle assembly checkpoint* (SAC) ein. Er wird durch ungebundene Kinetechore ausgelöst und verzögert die Trennung von Schwesterchromatiden. Durch Aurora B werden die SAC Komponenten *mitotic arrest deficient 1* und *2* (Mad1 und Mad2) sowie *budding uninhibited by benzimidazoles 1* (Bub1) und *Bub1-related kinase* BubR1(oder MAD3/Bub1b) sowie *mycobacterium proteasomal ATPase* (MPA) in menschlichen Zellen rekrutiert. Ferner assoziiert Survivin mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindeln. Der Verlust dieser Interaktion führt zur Aktivierung von Caspase 3 und somit zur Apoptose.^{[30],[54],[55],[56]}

In der späten Mitose entfernt sich der CPC vom inneren Centromer. Dies geht mit der Dephosphorylierung von Histon H3 und der Ubiquitinierung der Glutaminsäure E3 von Aurora B einher. Während der Anaphase ist der CPC an den zentralen Spindel lokalisiert. Wichtig hierfür ist die Interaktion von INCENP und Aurora B mit der *mitotic kinesin-like protein 2* (Mklp2), die von Aurora B phosphoryliert wird, wodurch der zentrale Spindel stabilisiert wird.^{[30],[57],[58],[59],[60],[61]}

2.2.2.2. Histon H3

Histone sind eine Proteinklasse bestehend aus basischen Proteinen, die gemeinsam mit der DNS im Zellkern den Chromatin-Komplex bilden. Es gibt vier Arten von Histonen (H2A, H2B, H3 und H4), die gemeinsam ein Oktamer formen, wobei jedes Histon jeweils zweimal in diesem Komplex vorhanden ist. Um diesen Komplex können sich 146 DNS-Basenpaare anlagern. Alle Histone besitzen einen konservierten C-Terminus für die Bindung zu den DNS-Basenpaaren und einen N-Terminus, der *post-translational* zum Beispiel acetyliert, phosphoryliert oder methyliert werden kann.^{[62],[63],[64],[65]}

Von besonderem Interesse ist hierbei das Histon H3, dessen Phosphorylierung im Verlauf der Mitose essentiell für ihren Erfolg ist. Die Phosphorylierung von Histon H3 ist zwar auch zum Beispiel an den Stellen des Threonins H3T11 und des Serins H3S28 bekannt, jedoch sind die Stellen H3T3 und H3S10 für die Mitose relevant.^{[64],[66],[67]}

Wichtig für das Verständnis der Histon H3 Modifikationen innerhalb der Mitose ist sowohl der räumliche als auch der zeitliche Verlauf der Histon-Phosphorylierung, der im Folgenden dargestellt wird.

Während der späten G2- bis frühen Prophase beginnt die Phosphorylierung an der H3T3 Position, die bis zur Metaphase weiter zunimmt. Ursächlich ist hierfür die Protease Haspin durchgeführt und zwar hauptsächlich in der Centromer-Region. Das phosphorylierte H3T3ph bindet an Survivin, einerlei ob dieses sich im CPC befindet oder nicht. Dies sorgt für die korrekte Lokalisierung des CPCs am Chromosom. Dadurch wird außerdem Haspin durch das Aurora B des CPCs phosphoryliert, was die katalytische Aktivität des Haspins weiter erhöht. Dieser positive Feedbackloop verstärkt die Lokalisierung des CPCs in der Centromer-Region.^{[64],[66],[67],[68],[69],[70],[71]}

Durch die räumliche Nähe des CPCs zum Chromosom wird während der Metaphase das H3S10 an den Armen der Chromosomen durch das Aurora B des CPCs phosphoryliert. Dies stört die Bindung des HP1 (*heterochromatin binding protein 1*) zum trimethylierten Lysin K9 und damit die Lokalisierung des CPCs an den Chromosom-Armen. Im Verlauf der Anaphase nimmt der Anteil des H3T3ph ab, bis dieser in der Telophase nicht mehr detektiert werden kann. Bis zur Interphase nimmt

der Anteil an H3S10ph ebenfalls ab. Eine Ausnahme hierfür sind zum Beispiel HeLa-Zellen, bei denen H3T3ph im gesamten Zellzyklus detektierbar bleibt.^{[30],[64],[68],[67],[70]}

Dieser Zyklus wurde bereits in mehreren Studien untersucht und auf verschiedene Weisen moduliert. So sorgt die Inhibierung von Haspin und das damit verbundene Ausbleiben von H3T3ph für eine fehlerhafte Metaphase. Unterdessen sorgt eine katalytisch inaktive Aurora B Mutante für eine fehlerhafte Chromosomsegregation während der Telo- und Anaphase.^{[66],[67],[69]}

Die Bindung von Histon H3 an Survivin wurde bereits ausgiebig mittels kleiner Peptidsequenzen untersucht. Dabei war es einigen Arbeitsgruppen möglich, die Kristallstruktur von Survivin mit dem H3 N-Terminus zu bestimmen.^{[7],[28],[72]} In diesen Kristallstrukturen konnte jedoch nur die Position der ersten vier Aminosäuren (ARTphK) bestimmt werden. (Abbildung 6) Dies lässt darauf schließen, dass diese für die Bindung zu Survivin besonders relevant sind, da die restlichen Aminosäuren der Sequenz keine einheitliche Konformation angenommen haben, um mittels Röntgenbeugung bestimmt werden zu können. Das Survivin bildet mittels seiner Aminosäuren L64, E76 und W67 eine kleine hydrophobe Tasche, die zwar groß genug ist für die Methylgruppe des Alanins aber zu klein für andere hydrophobe Seitenketten wie zum Beispiel die Isopropylgruppe des Valins. Zusätzlich dazu befindet sich das freie Amin des Alanins in der Nähe der Carboxylate von D71 und E76, die allgemein in einem Carboxyl-Hotspot liegen. Ebenso bildet das Carbonylsauerstoffatom des Alanins eine Wasserstoffbrücke mit dem Histidin H80 aus, das ebenfalls ein Teil der Bindungstasche des phosphorylierten Threonins ist. Das Arginin der Sequenz bindet sowohl mittels hydrophober als auch ionischer Wechselwirkungen an der Seitenkette der Glutaminsäure E65; diese ist jedoch nicht konserviert in anderen BIR-Domänen. Auch unterscheidet sich die Bindungstasche für das phosphorylierte Threonin von den anderen BIR-Domänen. Dieser Unterschied besteht beim Survivin aus dem bereits erwähnten Histidin H80 und dem Lysin K62; Andere BIR-Domänen besitzen an dieser Position ein Tryptophan und ein Glycin. Dies hat zur Folge, dass die Bindungstasche beim Survivin deutlich basischer ist als bei den anderen BIR-Domänen, was die Selektivität zum phosphorylierten Threonin des H3 weiterhin erhöht. Abschließend scheint das Lysin K4 lediglich schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit den Glutaminsäuren E51 und E63 sowie eine H-Brücke zum Letzteren auszubilden. Zwar bindet auch

Smac/Diablo an der BIR-Domäne von Survivin, jedoch ist dessen Bindung um den Faktor 25 schwächer als die zum phosphorylierten Histon H3.^{[28],[72]}

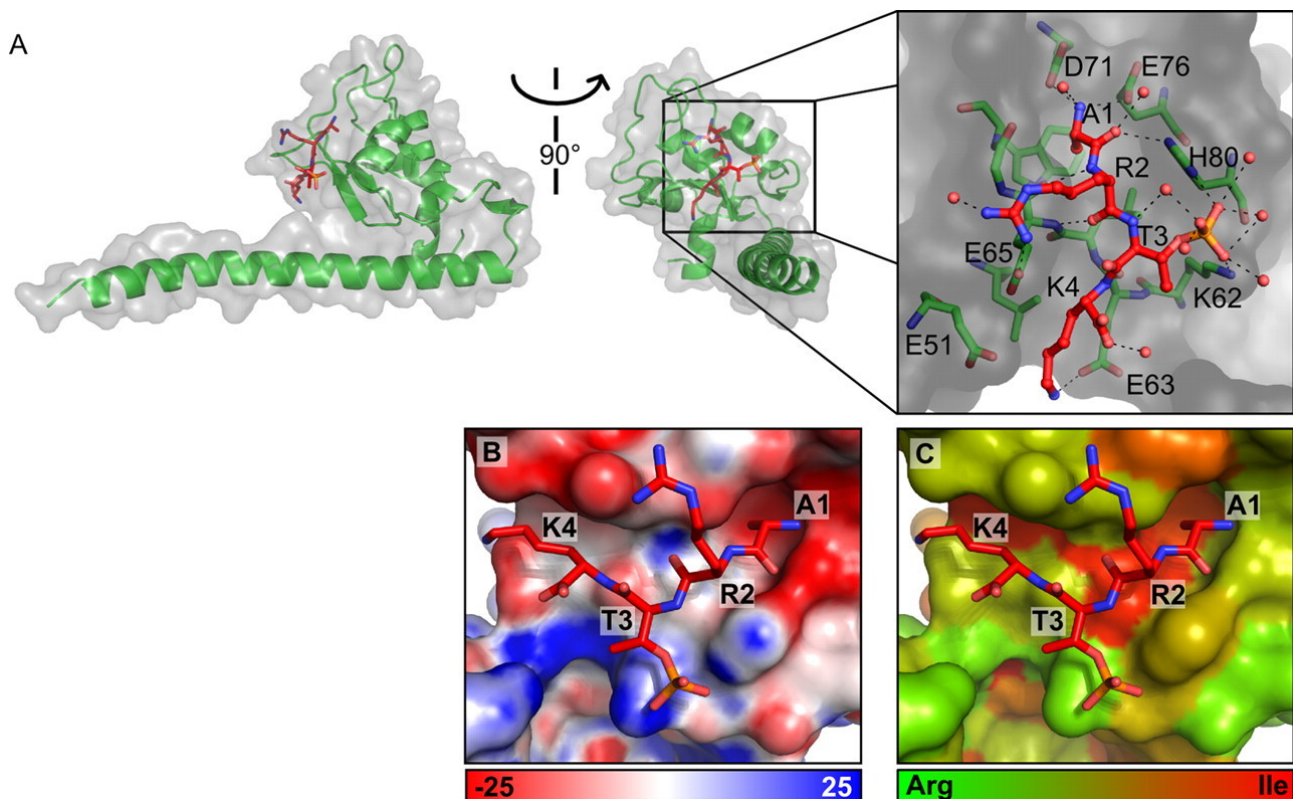


Abbildung 6: (A): Kristallstruktur von Survivin (Sequenz in grün und Oberfläche in grau) mit dem Histon H3 N-terminalen Peptid (in rot). (B): Elektrostatisches Oberflächenpotential in der Nähe der Peptidsequenz; negativ geladene Seitenketten sind in rot, positiv geladene in blau dargestellt. (C): Hydrophobie der Oberfläche von Survivin in der Nähe der Bindungstasche; die Polarität wurde abgestuft von Arginin (in grün) bis Isoleucin (in rot) abgestuft.^[72]

Überdies sind von den phosphorylierten und unphosphorylierten Vierersequenz mittels ITC bestimmten Bindungskonstanten in der Literatur bekannt. Bei einem pH-Wert von 7.8 bindet ARTphK ($N = 1,05 \pm 0,05$, $K_D = 61,7 \pm 8,5 \mu\text{M}$, $\Delta H = -2.120 \pm 210 \text{ cal/mol}$, $-T\Delta S = -3.640 \text{ cal/mol}$) genauso stark wie ARTK ($N = 1,27 \pm 0,03$, $K_D = 60,4 \pm 4,0 \mu\text{M}$, $\Delta H = -3.160 \pm 120 \text{ cal/mol}$, $-T\Delta S = -2.600 \text{ cal/mol}$). Daher ist die Histon-Survivin Bindung bei diesem pH-Wert nicht phosphat-spezifisch. Bei weiteren Experimenten mit der 12-er Peptidsequenz des Histon H3s wurde die pH-Abhängigkeit untersucht. Dabei sank der K_D der phosphorylierten Sequenz von $15,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ bei pH 7,8 auf $1,45 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bei pH 6,8, wohingegen der K_D der unphosphorylierten Sequenz lediglich von $17,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$ auf $11,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$ sinkt. Somit bindet die phosphorylierte Sequenz bei pH 6,8 um den Faktor 8 stärker.^[72]

Im Vergleich dazu bindet das 15-er Peptid (Abbildung 7) mit einem K_D von $4,8 \pm 1,13 \mu\text{M}$ bei pH 7,5 in der selben Größenordnung wie das bereits erwähnte 12-er Peptid ($K_D = 6,29 \pm 0,31 \mu\text{M}$ bei pH 7,6 beziehungsweise $2,31 \pm 0,08 \mu\text{M}$ bei pH 7,2). Dementsprechend scheint weder die Verkürzung noch die Verlängerung der Peptidsequenz zu einer signifikanten Verstärkung der Bindung zu führen.^{[7],[72]}

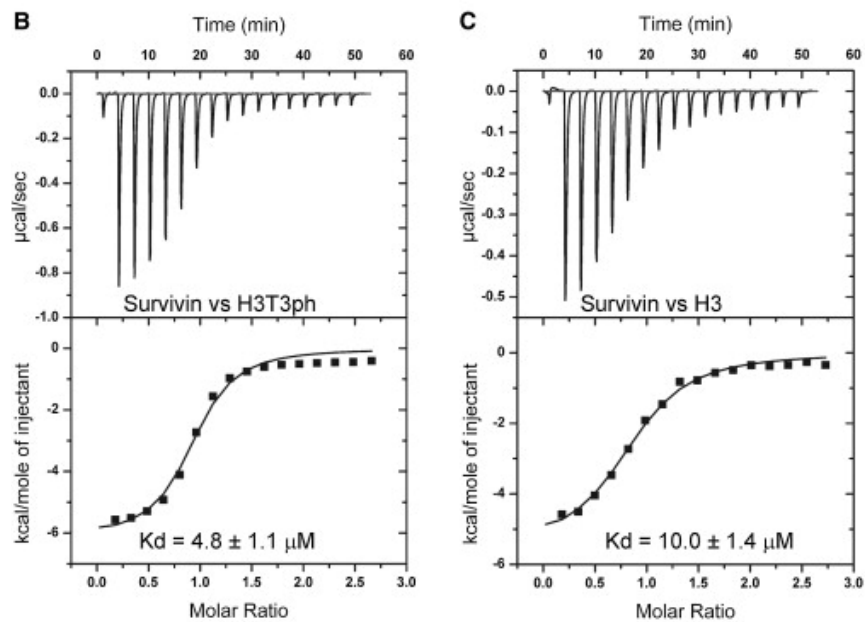


Abbildung 7: Isotherme Titrationskalorimetrie von Survivin und der Histon H3 Peptiden. ITC Bindungskurve für den Komplexen zwischen H3(1-15)T3ph (links) beziehungsweise H3(1-10) Peptiden (rechts) und Survivin bei pH 7,5.^[7]

2.3. Beispiele für Survivin als potentielles Ziel für Krebstherapien

Durch Survivins erhöhte Exposition in vielen Krebsarten und seine Schlüsselrolle in relevanten Signalkaskaden ist es ein potentes Ziel für mögliche Krebstherapien. Jedoch hat es bis jetzt kein Survivin spezifischer Wirkstoff bis in Phase III-Studien geschafft. Es haben sich aber fünf mögliche Ansätze für eine Survivin-Therapie herauskristallisiert: ^{[5],[6]}

1. Inhibierung/Modulierung der Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) von Survivin mit seinen Partnerproteinen
2. Inhibierung der Homodimerisierung von Survivin
3. Inhibierung der Transkription von Survivin
4. Induzierung der mRNA Degradaation von Survivin
5. Survivin oder Peptidsequenzen als Grundlage für eine Immun-Therapie

In den folgenden Unterkapiteln werden einige Substanzen vorgestellt.

2.3.1 Sepantroniumbromid YM155 als Inhibitor der Survivin Expression

Die Survivin inhibierende Wirkung von YM155 wurde von der Astella Pharma inc. entdeckt. Es bindet jedoch nicht an Survivin selbst, sondern am ILF3-p54^{nrb} Komplex, der wiederum am Promoter für Survivin bindet. Folglich wird die Expression sowohl der Survivin mRNS als auch des Proteins inhibiert.^{[73],[74],[75]}

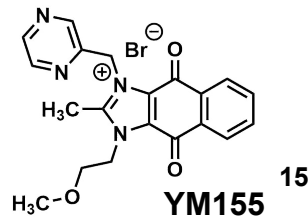


Abbildung 8: Struktur von YM155

Weiterhin scheint YM155 den Mechanismus zur DNS-Reparatur zu stören/inhibieren, wodurch diese Zellen vermehrt die Apoptose verlaufen. Dies konnte in Xenograft-Modellen, in denen Mäuse humane Prostatakrebszellen (PC-3, PPC-1 und HRPC), Bauchspeicheldrüsenkrebszellen, „non small cell lung cancer“-Zellen (NSCLC), Brustkrebszellen oder Melanom-Zellen eingepflanzt wurden, bewiesen werden.^{[76],[77],[78],[79],[80],[81],[82],[83],[84]}

Zusätzlich sollen die Expressionen anderer IAP- oder Bcl-2-Proteine nicht von YM155 beeinflusst werden. Eine Ausnahme scheint jedoch der *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) zu sein, der in Bauchspeicheldrüsen ebenfalls eine geringere Expression zu haben scheint.^{[81],[82]}

Mit YM155 wurden dementsprechend klinische Studien durchgeführt. Dabei wurde der Wirkstoff in allen Studien intravenös mit einer kontinuierlichen Infusion über drei bis sieben Tage verabreicht. Nach einer mehrtägigen Pause wurden die Infusionen wiederholt. Während der Phase I-Studien wurde dabei eine gute Verträglichkeit von YM155, sowohl als Einzelwirkstoff, als auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen (Docetaxel und Carboplatin) festgestellt, weshalb weitere Phase II-Studien durchgeführt wurden. Hier wurden Patienten (unter anderen mit NSCLC (non-small-Cell Lung Cancer), Brustkrebs, Lymphoma und nicht operierbaren Stufe III und IV Melanomen) sowohl mit YM155 als Einzelwirkstoff, als auch in Kombination mit anderen Medikamenten durchgeführt. Alle Phase II-Studien konnten keinen erkennbaren Mehreffekt der Behandlung mit YM155 feststellen.^{[85],[86],[87],[88],[89],[90],[91],[92],}

^{[93],[94]}

Die schlechten Ergebnisse der klinischen Studien von YM155 werden der schnellen Konzentrationsabnahme am Ende der Behandlung zugeschrieben. Des Weiteren wird nicht ausgeschlossen, dass die Hauptwirkung von YM155 in der Beschädigung der DNS liegt, die Survivin als Nebenwirkung inhibierte.^{[5],[6]}

2.3.2. LYS2181308/ISIS23722 - ein *antisense* Oligonukleotid zur Inhibierung von Survivin

LYS2181308 ist ein Oligonukleotid, das zunächst unter dem Namen ISIS2372 publiziert wurde und an die Survivin mRNA bindet.^{[5],[6]}

Seine Struktur lautet:

5'- TGTGCTATTCTGTGAATT-3'

Die unterstrichenen Nucleinsäuren sind an der 2'-O-Position methoxyethyliert. Der Wirkmechanismus dieser Substanz beruht auf der Inhibierung der mRNA von Survivin, wodurch sowohl dessen, als auch die Expression des Proteins reduziert wird.^{[5],[6],[95]}

In den Zell-Experimenten konnte bewiesen werden, dass *acute myelogenous leukemia*-Zellen (AML-Zellen) einen Arrest in der G₂/M-Phase des Zellzyklus für 24 h aufwiesen. Des Weiteren wurde ein erhöhter Anteil an Apoptose festgestellt, der auf die Aktivierung der entsprechenden Signalkaskade des *mitochondrial pathway* und die damit verbundene Reaktivierung von Caspase 3 zurückgeführt wurde. Analog zu YM155 wurde ebenfalls eine Kombinationsbehandlung mit Docataxel vorgeschlagen.^{[96],[97],[98],[99]}

Die darauf folgenden Phase I und II klinischen Studien ergaben ein einheitliches Bild. LYS2181308 wurde den krebserkrankten Patienten per Infusion verabreicht. Wenige Patienten wiesen starke Nebenwirkungen auf und die terminale Halbwertszeit war mit 21 bis 31 Tagen relativ hoch. Jedoch konnte auch hier in den Phase II-Studien kein erkennbarer Mehreffekt durch die Behandlung mit LYS21813 festgestellt werden, weshalb keine weitergehende Studien durchgeführt wurden.^{[100],[101],[97],[102]}

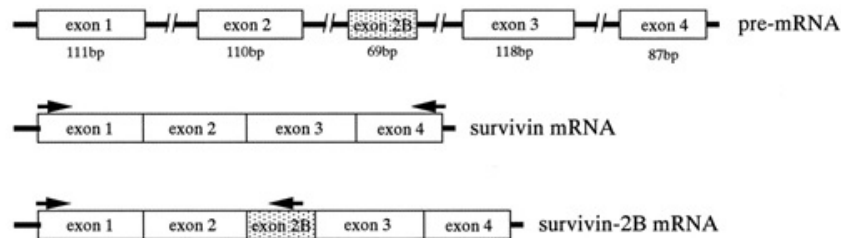
Jedoch gab es im Falle von LYS21813 eine Studie mit C11 markiertem Wirkstoff, die Aufschluss über die geringe Wirksamkeit in den klinischen Studien gibt. Dabei wurde die Verteilung des Antikörper-Oligonukleotids auf die verschiedenen Organe der Patienten nach der Behandlung festgestellt. Während LYS21813 sich kaum im Muskelgewebe und in der Lunge ansammelte, reichte es in der Leber und den Nieren der Patienten am meisten an. Die Anreicherung in den Tumoren wurde als moderat bezeichnet, konnte aber durch wiederholte Behandlung erhöht werden.^[103]

Diese Verteilung zwischen den Organen der Patienten kann ein Grund für die geringe Wirkung von LYS21813 im Menschen sein.

2.3.3. Immuntherapie mit einer kurzen Peptidsequenz der Survivin 2B-Variante

Survivin 2B ist eine alternativ gespleißte Isoform von Survivin, die vermehrt ebenfalls in Krebszellen vorkommt. Bei dieser Variante wurden beim Spleißvorgang der *pre*-mRNS das Exon 2B nicht entfernt. Diese 69 zusätzlichen Basenpaare führen zu einer längeren Peptidsequenz von Survivin2B als das des regulären Survivins. (Abbildung 9)^[104]

A



B



Abbildung 9: (A): Schematische Darstellung der Transkription von Survivin und den zwei Möglichkeiten des Spleißens: Survivin mit vier Exons und Survivin 2B mit dem zusätzlichen Exon 2B. Pfeile zeigen die Position der PCR Primere. (B) Ausschnitt der Peptidsequenz von Survivin 2B mit den korrelierenden Exons.^[104]

Durch dieses Exon 2B wird das Survivin 2B unter anderen um die Sequenz ⁸⁰AYACNTSTL⁸⁸ erweitert. Diese Peptidsequenz löst, wenn sie als Peptid geimpft wird, eine Immunantwort aus.^[104]

In den Phase I-Studien konnte sowohl eine gute Verträglichkeit, als auch die Immunantwort bei einem Teil der Patienten nachgewiesen werden. Zwar konnte eine Phase I-Studie eine signifikant höhere Überlebenschance der geimpften Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, aber dessen Ergebnisse konnten in den anderen Phase I und II Studien nicht reproduziert werden. Selbst die Verbesserung des Impfprotokolls durch die Zugabe von Adjuvanten (*incomplete Freund's adjuvants*, *interferon α* und *β*) konnte keine Wirkung über den Placeboeffekt hinaus festgestellt werden.^{[105],[106],[107],[108],[109],[110]}

2.3.4. Modulierung der Survivin/Crm1 und der Survivin/Histon H3 Interaktion durch GCP-haltige Liganden

Die Verbindung **L1**, welche zwei GCP-Einheiten enthält, ist in der Lage die Survivin Histon Interaktion zu modulieren. (Abbildung 10)^[8]

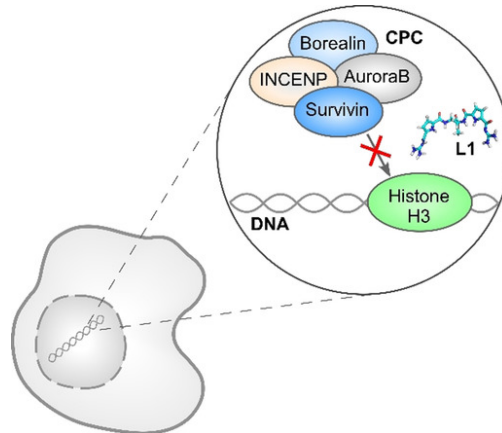


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Wirkung des Liganden **L1** auf die CPC-Histon H3 Wechselwirkung.^[8]

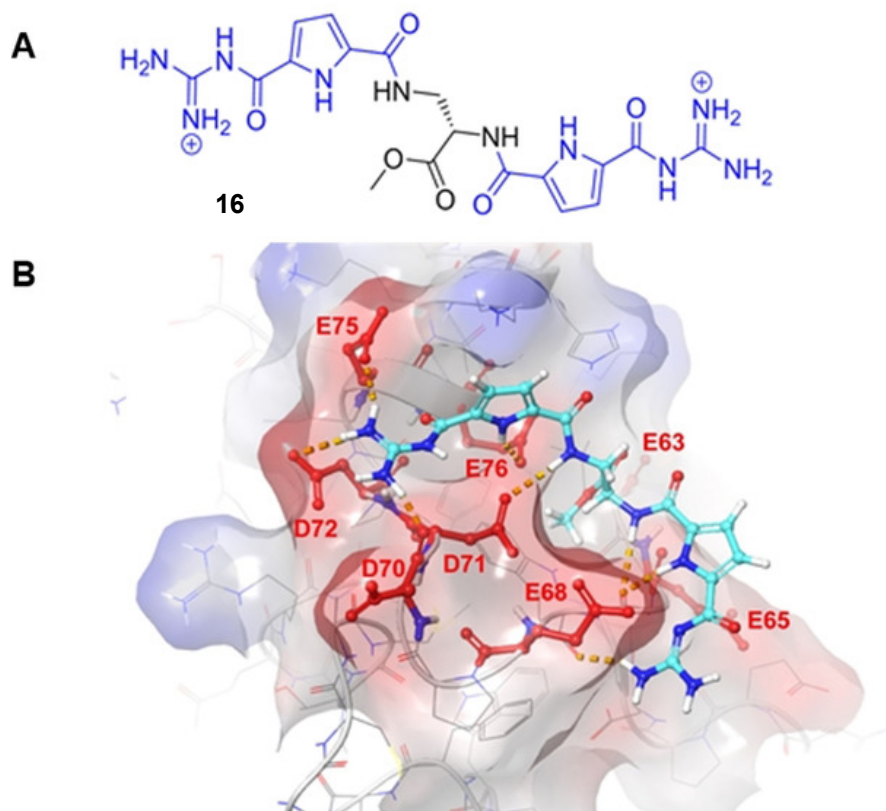


Abbildung 11: (A) Struktur des Liganden **L1** mit zwei GCP-Einheiten (in blau). (B) simulierte Struktur des Komplexes zwischen dem Liganden **L1** (in blau) und Survivin an der BIR-Domäne von Survivin. Mögliche supramolekulare Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien dargestellt.^[8]

Die Histon H3-Survivin Interaktion konnte bereits mit einer Konzentration von 1 μM **L1** auf 50% reduziert werden. Außerdem wiesen 32% der mit **L1** behandelte HeLa-Zellen mitotische Defekte auf, während es bei der Kontrollgruppe nur 6% waren. In einem zusätzlichen Rescue-Experiment wurde mit **L1** versetzte Zellen zusätzliches Survivin transfiziert, wodurch die Wirkung von **L1** im Vergleich zur Kontrolle reduziert wurde. Dazu bindet das Dimer an den Asparagin- und Glutaminsäuren der nukleophilen Hotspotregion (E68, D70-72 und E75) in der Nähe der BIR-Domäne des Survivin, was durch NMR-Titrations bewiesen werden konnte (siehe Abbildung 11 und 12). Ferner legt die modellierte Struktur des Komplexes nahe, dass die Methylgruppe der Verbindung **L1** in der gleichen hydrophoben Tasche des Survivins bindet wie auch die Methylgruppe des Alanins A1 der Histon H3 oder Smac(Diablo) Bindungssequenz (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2.2).^[8]

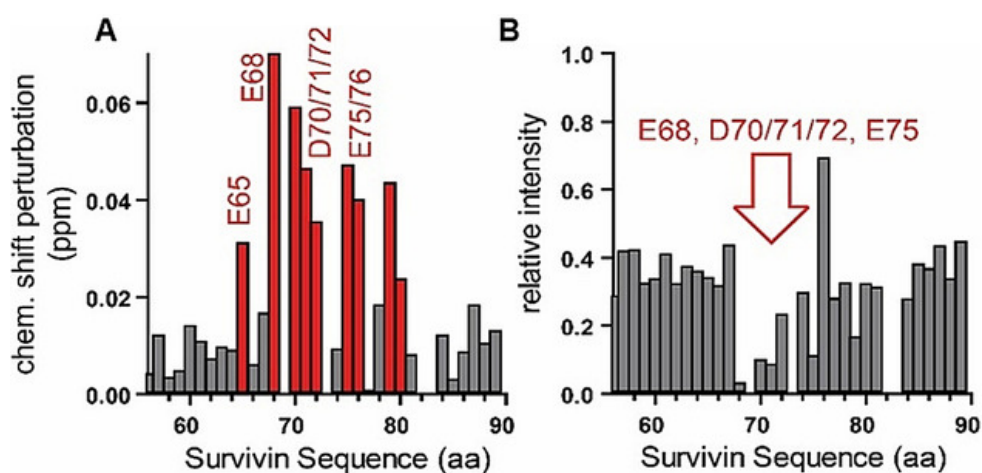


Abbildung 12: NMR-Titration der Verbindung **L1** (300 μM) mit ^{15}N -markierten Survivin 1-120 (300 μM). (A) Verschiebung der chemischen Verschiebung (*chem. shift perturbation*) der einzelnen Aminosäure-Signale aufgetragen gegen die entsprechenden Aminosäuren. (B) Relative Intensitäten der NMR-Signale aufgetragen gegen die entsprechenden Aminosäuren.^[8]

Die unveröffentlichten ITCs (durchgeführt von Annika Lennartz, Abbildung 13) lassen darauf schließen, dass die Verbindung **L1** zwar mit einem K_D von ungefähr $158 \pm 119 \mu\text{M}$ an Survivin bindet, jedoch die Stöchiometrie nicht konstant zu sein scheint ($N \approx 2-3$). Dies lässt den Schluss zu, dass es mehrere simultane Bindungsereignisse von **L1** an Survivin existieren. Zwar scheint **L1** an der BIR-Domäne präferiert zu binden, jedoch gibt es keine Beweise, dass auch alle Moleküle von **L1** im Umfeld der BIR-Domäne binden. Zusätzlich gibt es keine Indizien dafür, die die Ursache der Schwankung in der Stöchiometrie ist.

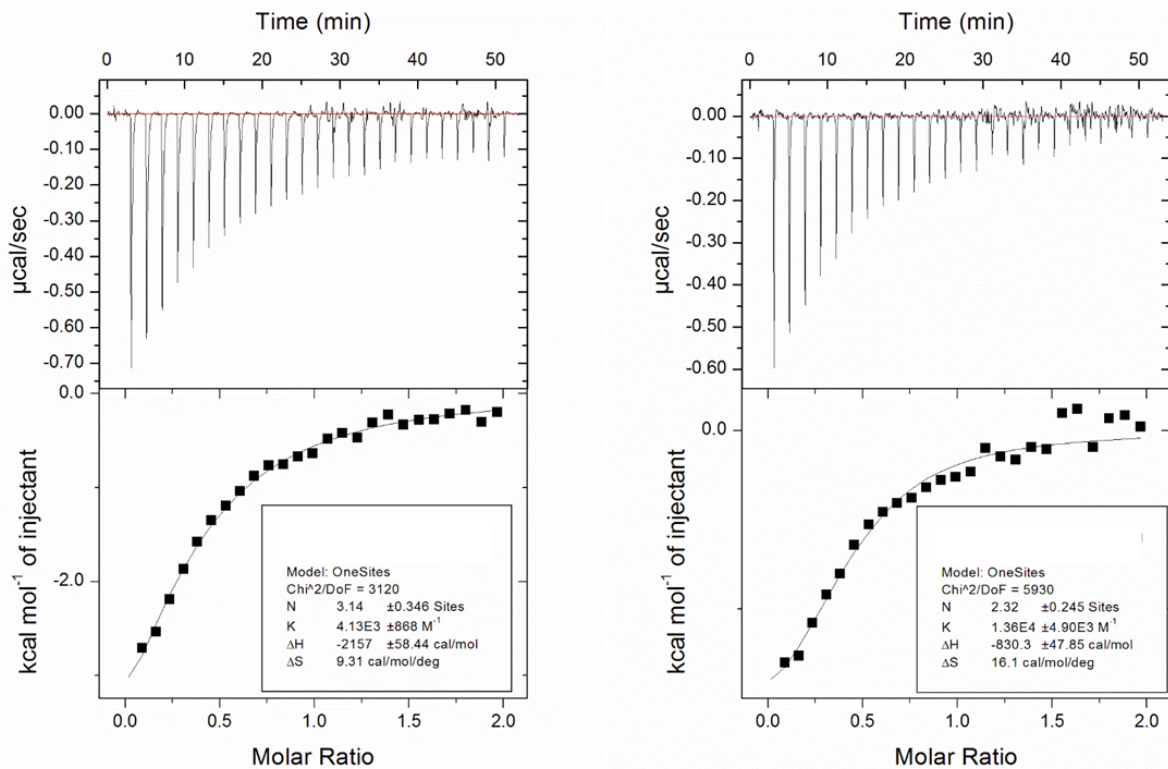


Abbildung 13: ITC-Titrations von 2 mm Survivin zu 200 μM **L1**. Obere Hälfte: Roh-ITC; Untere Hälfte: Graph und Plot. Durchgeführt von Annika Lennartz. Unpubliziert.

Als Erweiterung der Struktur **L1** wurden die beiden Liganden **L_{HIS}** und **L_{NES}** etabliert.

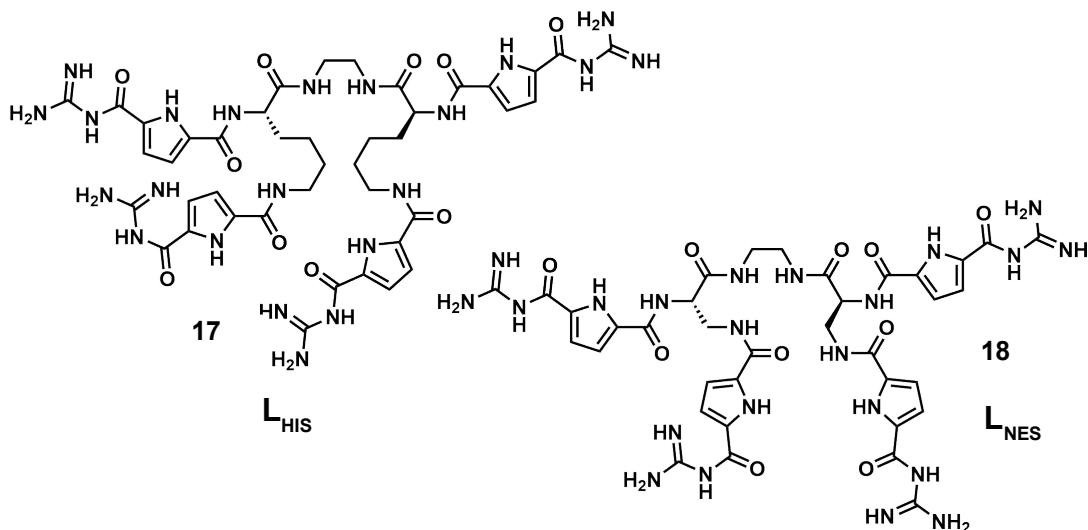


Abbildung 14: Struktur der Verbindungen **L_{HIS}** und **L_{NES}**.

Diese Verbindungen bestehen aus zwei Aminosäure, an denen jeweils zwei GCP-Einheiten und über Ethylendiamin miteinander gebunden sind. Bei **L_{NES}** ist die

Aminosäure wie bei **L1** Diaminopropionsäure (Dap) während bei **L_{HIS}** diese Verbindung mit Lysin gebildet wurde.

Die Verbindungen **L_{NES}** und **L_{HIS}** wurden nach der Bindungsstelle benannt, dessen PPI sie nach den *proximity ligation assay* (PLA) unterdrücken. Diese Regioselektivität wurde mit Computersimulationen ebenfalls gestützt.^[9]

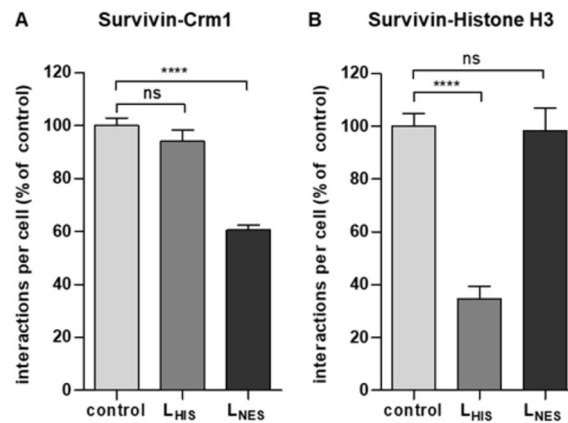


Abbildung 15: *In situ proximity ligation assay* der Survivin-Crm1 respektive Survivin-Histon H3 Interaktion in HeLazellen behandelt mit einer 10 μ M Lösung von **L_{NES}** oder **L_{HIS}**. (A) Anzahl der Interaktionen von Survivin und Crm1 in den Zellen ($n > 97$). (B) Anzahl der HeLazellen, die einen Arrest in der frühen Phase der Mitose (Pro- und Metaphase; $n > 30$) hatten. Nur die obere Hälfte der symmetrischen Fehlerbalken wurde dargestellt. Daten wurden mittels des t-Testes analysiert und (****) zeigt einen p-Wert der kleiner als 0,0001 an.^[9]

Außerdem konnte im Falle von **L_{NES}** mittels eines Fluorophor-Biosensor-Experiments nachgewiesen werden, dass sich das Survivin in mit **L_{NES}** behandelten Zellen stärker im Zellkern ansammelt. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass der Transport von Survivin aus dem Zellkern durch diesen Liganden reduziert wird.^[9]

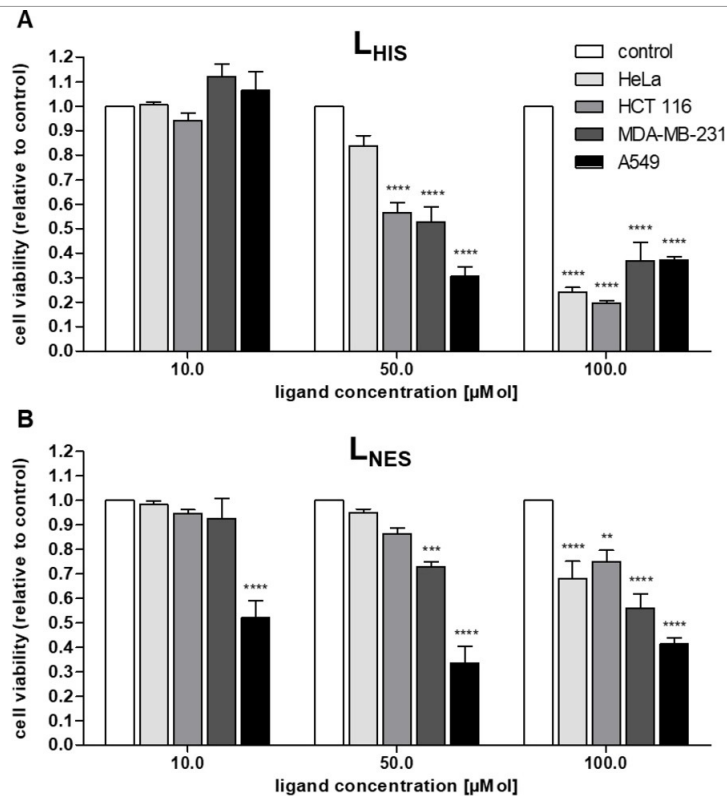


Abbildung 16: Toxikologisches Zell-Assay von **L_{HIS}** und **L_{NES}** mit verschiedenen Arten von Krebszellen (HeLa, A549, MDA-MB-231 und HCT 116). Diese Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von **L_{HIS}** (A), **L_{NES}** (B) oder der korrespondierenden Menge von DMSO als Kontrolle versetzt und für 72 h inkubiert und die Zellvermehrung gemessen. Die Daten wurden einer Varianzanalyse unterzogen. (**) zeigt einen p-Wert unter 0,01, (***) Einen kleiner als 0,001 und (****) Einen kleiner als (****) an.^[9]

Es wurden toxikologische Untersuchungen mit den Liganden **L_{NES}** und **L_{HIS}** und diversen Krebszellarten durchgeführt. (Abbildung 15) Hierbei wurden für **L_{HIS}** bei der Konzentration von 50 μM bereits deutliche Wirkungen an den Darmkrebszellen HCT116, Lungenkrebszellen A569 und Blutkrebszellen MDA-MB-231 festgestellt, während die Zellviabilität der HeLa Zellen erst bei 100 μM deutlich zurück ging. Der Effekt von **L_{NES}** auf A569-Zellen konnte schon bei einer Konzentration von 10 μM festgestellt werden, jedoch ist die Wirkung von **L_{NES}** auf die anderen getesteten Zellen deutlich bei vergleichbaren Konzentrationen deutlich geringer als die von **L_{HIS}**.

^[9]

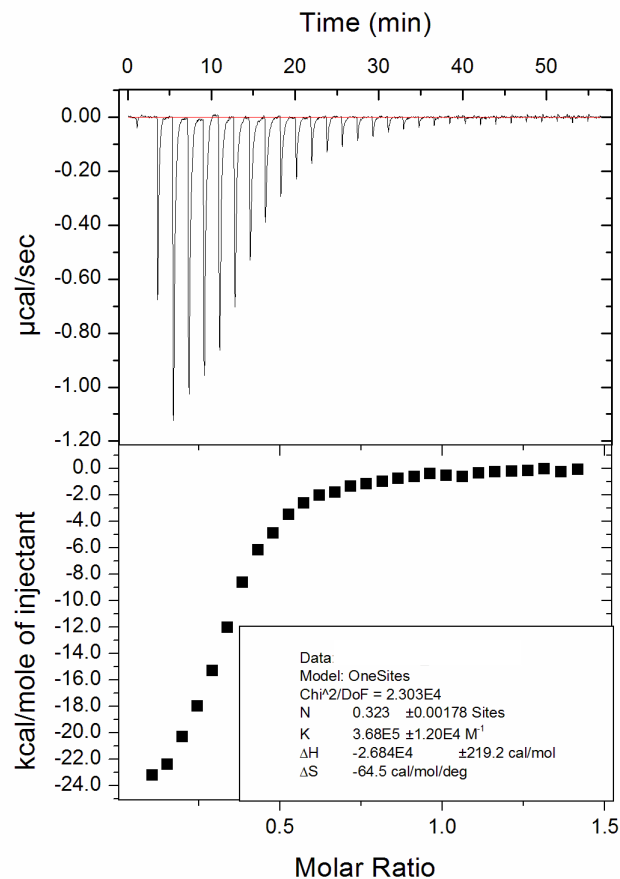


Abbildung 17: ITC-Messung von Survivin-120 (1 mM) mit L_{NES} (0.1 mM) in Puffer (HEPES 2,5 mM), NaCl (10 mM, $MgCl_2$ (1 mM und TCEP (0,05 mM), pH = 6,5). Obere Hälfte: Rohdaten der ITC. Untere Hälfte: Integrierte Peaks und thermodynamische Parameter.^[9]

In den ITC-Titrationen der Verbindungen wurde bewiesen, dass beide Verbindungen an Survivin binden. Hier wurde für die Verbindung L_{NES} eine Dissoziationskonstante von K_D $2,72 \pm 0,09 \mu M$ und eine Stöchiometrie von $0,323 \pm 0,001$ zum Survivin-Dimer bestimmt. (Abbildung 17) Währenddessen bindet L_{HIS} mit einem K_D von $694,4 \pm 211,7$ nM und einer Stöchiometrie von $0,183 \pm 0,006$ sowohl stärker aber auch mit einem geringeren Anteil an Survivin. (Abbildung 18) Die thermodynamischen Daten von beiden Verbindungen ähnelten sich mit einer Enthalpie $\Delta H \approx 26.000$ cal/mol und einer Entropie $\Delta S \approx 18.000$ cal/mol sehr.^[9]

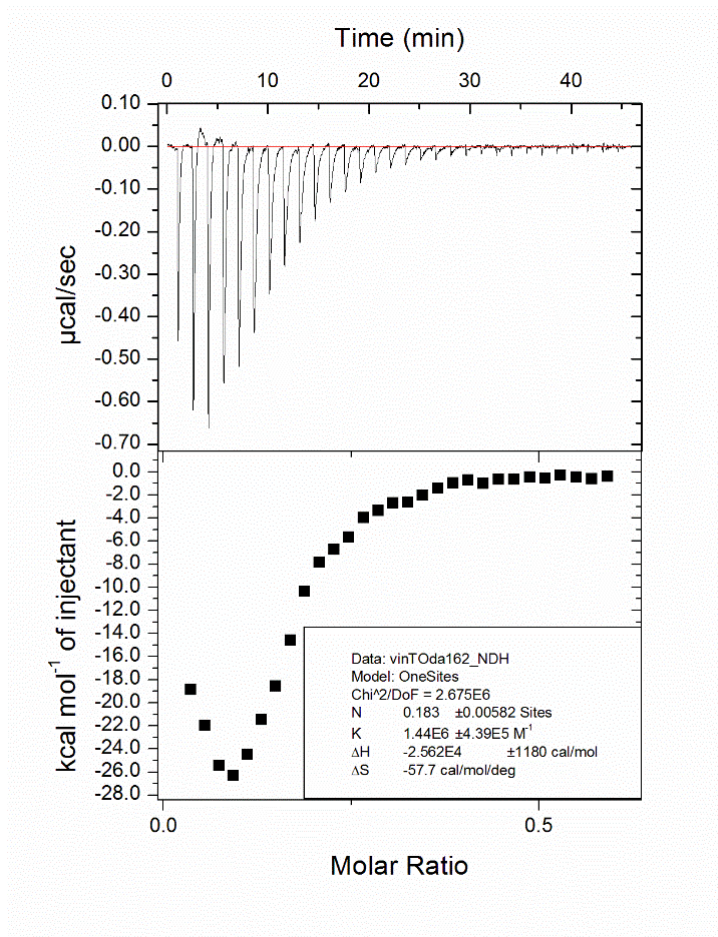


Abbildung 18: ITC-Messung von Survivin-120 (1 mM) mit L_{HIS} (0.1 mM) in Puffer (HEPES 2,5 mM), NaCl (10 mM, MgCl_2 (1 mM und TCEP (0,05 mM), pH = 6,5). Obere Hälfte: Rohdaten der ITC. Untere Hälfte: Integrierte Peaks und thermodynamische Parameter.^[9]

Zwar konnte bewiesen werden, dass sowohl die Inhibierung der Survivin-Histon H3 als auch der Survivin/Crm1-Interaktion brauchbare Ziele einer künftigen Anti-Krebs Therapie sind, jedoch werfen die mittels der ITC bestimmten Stöchiometrien weitere Fragen auf. Im Falle von **L1** scheint die Stöchiometrie mit 2-3 Liganden pro Dimer auf mehrere simultane Bindungsereignisse am Survivin hinzuweisen. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass es ein Bindungsereignis an der BIR-Domäne von Survivin gibt, dies beweist jedoch nicht eindeutig, dass die überschüssigen Äquivalente von **L1** ebenfalls an dieser Stelle binden. Im Gegensatz dazu nehmen die Stöchiometrien der Verbindungen L_{HIS} und L_{NES} mit von $N \approx 0,2-0,3$ (mathematisch) rationale Werte an. Rein rechnerisch würden somit zwei Moleküle L_{HIS} beziehungsweise drei Moleküle L_{NES} an zehn Survivindimere binden. Dementsprechend ist es nicht eindeutig, ob die Bindung an Survivin auch die Ursache für deren Zelltoxizität ist. Obwohl der Ligand L_{NES} zu den Verbindungen mit den stärksten Affinitäten zu

Survivin, die in der Literatur bekannt sind, gehört, sollte daher der nächste Optimierungsschritt der Verbesserung der Stöchiometrie gelten.

2.3.5 Peptidsequenzen zur Verbesserung der Stöchiometrie der Bindung des molekularen Tweezers zu Survivin

Der molekulare Tweezer stellt ein Grundbaustein dar, der an den Lysinen und Argininen der Proteinoberflächen binden kann. Die Struktur des diphosphorylierten Tweezers ist in Abbildung 19 dargestellt.^[111]

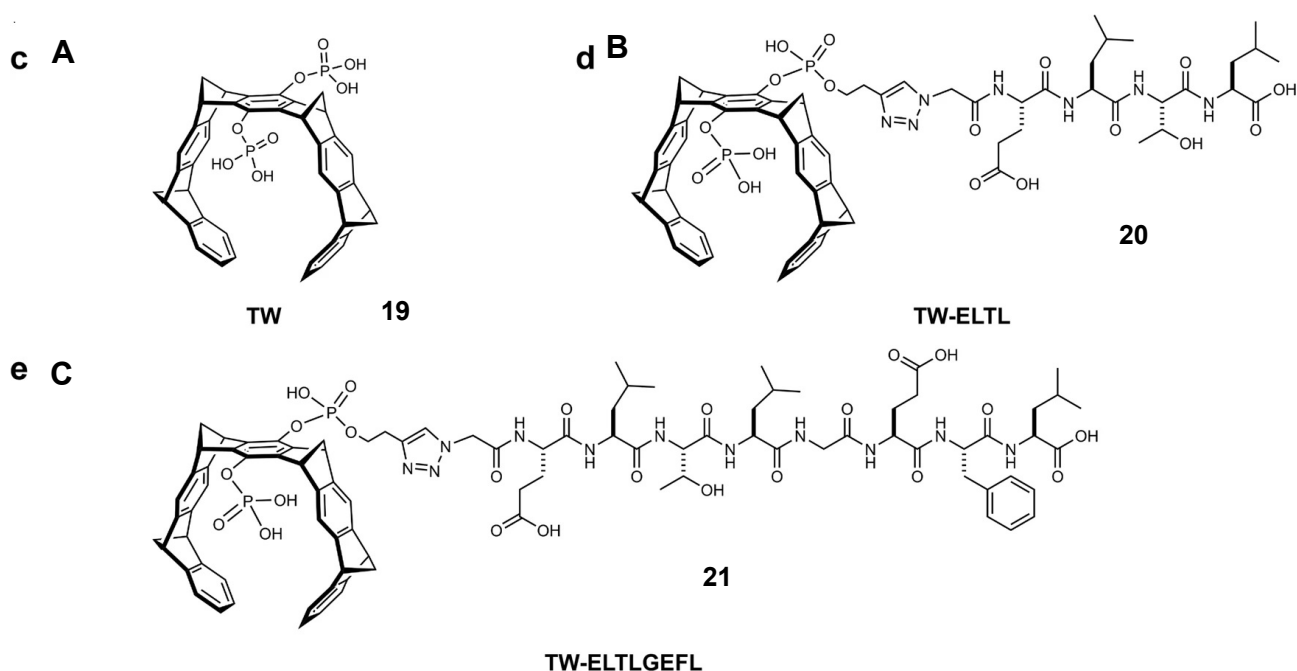


Abbildung 19: Struktur des unmodifizierten Tweezers TW (A), der asymmetrisch mit einem vierer Peptid verbundenen Tweezer TW-ELTL (B) und dem mit einem achter Peptid verbundenen Tweezer TW-ELTLGEFL (C).^[111]

Um die Regioselektivität der molekularen Tweezer zu erhöhen wurde dieser mit einer Alkin-Gruppe modifiziert, um ihn mit einer 1,3-Dipolaren Cycloaddition einer vierer bzw. achter Peptidsequenz mit Azid zu verbinden (siehe Abbildung 19 B und C). Diese Peptide sollen der natürlichen Dimer-Fläche ähneln und somit in Kombination mit dem Tweezer die Survivin/Crm1-Interaktion modulieren.^[111]

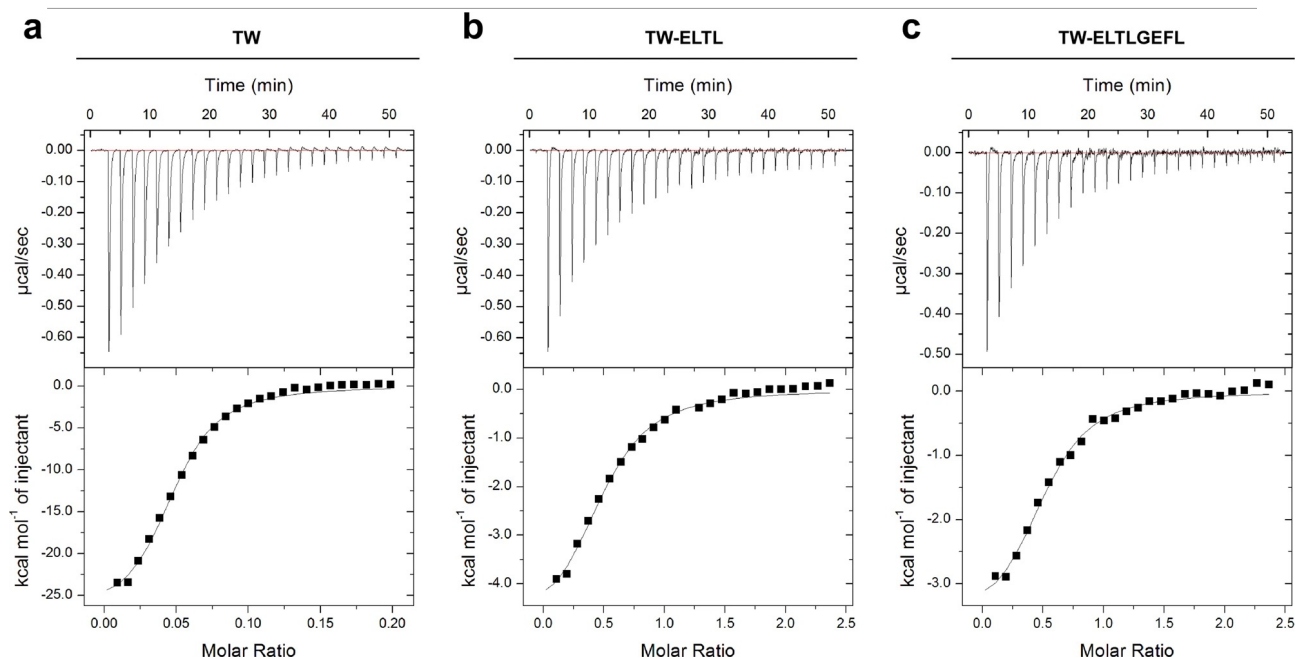


Abbildung 20: ITC-Daten der Titration von den Tweezern mit Survivin-120. (A) Titration von 300 μM Survivin-120 zu 300 μM TW. Titration von 1.2 mM Survivin-120 zu 100 μM TW-ELTL (B) beziehungsweise TW-ELTLGEFL (C). Durchgeföhrt in PBS-Puffer, bei pH 7.4 und 25 $^{\circ}\text{C}$. Untere Hälfte entspricht den integrierten Peaks inklusive Fit. Die Dissoziationskonstanten sind $38 \pm 4 \mu\text{M}$ für TW, $24 \pm 4 \mu\text{M}$ für TW-ELTL und $19 \pm 3 \mu\text{M}$ für TW-ELTLGEFL.^[111]

Im Vergleich zu dem unmodifizierten Tweezer **19** binden die modifizierten Tweezer **20** und **21** nicht im Verhältnis 1:20, sondern im Verhältnis von 1:2 zu Survivin (Abbildung 20). Die Bindungsaffinitäten verstärkten sich um den Faktor 2 zwischen **19** ($38 \pm 4 \mu\text{M}$) und **21** ($19 \pm 3 \mu\text{M}$). Darüber hinaus konnte unter anderem mittels 2D-NMR-Titration bewiesen werden, dass die beiden Peptid-modifizierten Tweezer selektiv am NES von Survivin binden. Durch die Kombination von dem nicht selektiv bindenden Tweezer 7 mit einer selektiv bindenden Aminosäure-Sequenz konnte somit nicht nur die Regioselektivität der Liganden deutlich, sondern auch die Bindungsaffinität leicht verbessert werden.^[111]

3. Zielsetzung

Die Modulierung der Funktionen von Survivin ist eine gängige Methode zur Entwicklung neuer Chemotherapien. Zur Zeit ist jeder entwickelte Wirkstoff spätestens in der zweiten klinischen Phase am Menschen gescheitert. *C. Vallet et al.*^{[8], [9]} konnten jedoch beweisen, dass auch die Modulierung der Histon H3-Survivin-Interaktion für eine deutliche Zunahme an mitotischen Defekten in HeLa-Zellen sorgte. Dies ist besonders erstaunlich, da der entsprechende Ligand **L1** kaum regioselektiv zu sein scheint. Im Gegensatz dazu konnten *A. Lennartz et al.*^[111] bereits beweisen, dass die Modifikation von Peptidsequenzen mit einem chemischen Bindungsmotiv die Selektivität im Vergleich zum normalen Bindungsmotiv verbessert. Dementsprechend ist das Ziel dieser Dissertation die Histon H3 Bindungssequenz mit dem GCP-Bindungsmotiv zu modulieren, um neue und potentiell stärkere Liganden für Survivin zu entwickeln. Dadurch sollte nicht nur die Bindungsstärke erhöht, sondern vor allem auch die Stöchiometrie verbessert werden. Um dies zu erreichen, wird zum Einen in der literaturbekannte H3 Bindungssequenz Arginin durch das künstliche Arginin Analogon Dap(GCP) ausgetauscht; zum Anderen wird an den N-Terminus der Bindungssequenz mittels Diaminopropionsäure und GCP ein Analogon zum Ligand **L1** gekuppelt. Dies ist möglich, da sich die beiden Liganden an der Stelle eine Bindungstasche am Survivin zu teilen scheinen.^{[8], [72]} Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Modifikationen sollen weiter Optimierungen und Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Synthese der Peptide soll mittels Mikrowellen-gestützte Festphasenpeptidsynthese durchgeführt werden. Die Reinheit der Peptide wird mittels HPLC bestimmt und die Verbindungen mittels Massenspektrometrie, ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und IR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Bindungsparameter zu Survivin sollen mittels Isothermer Titrationskalorimetrie ermittelt werden. Die Bindungsstelle an Survivin wird von einer Auswahl an Liganden mittels NMR-Titration mit ¹⁵N angereichertem Survivin bestimmt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Modifizierung der neuerer Sequenz von Histon H3 mit Dap(GCP)

Die ersten Liganden **22** bis **25** (Abbildung 21) basieren auf der Sequenz der ersten neun Aminosäuren des N-Terminus von Histon H3 (H₂N-Ala-Arg-pThr-Lys-Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-NH₂).

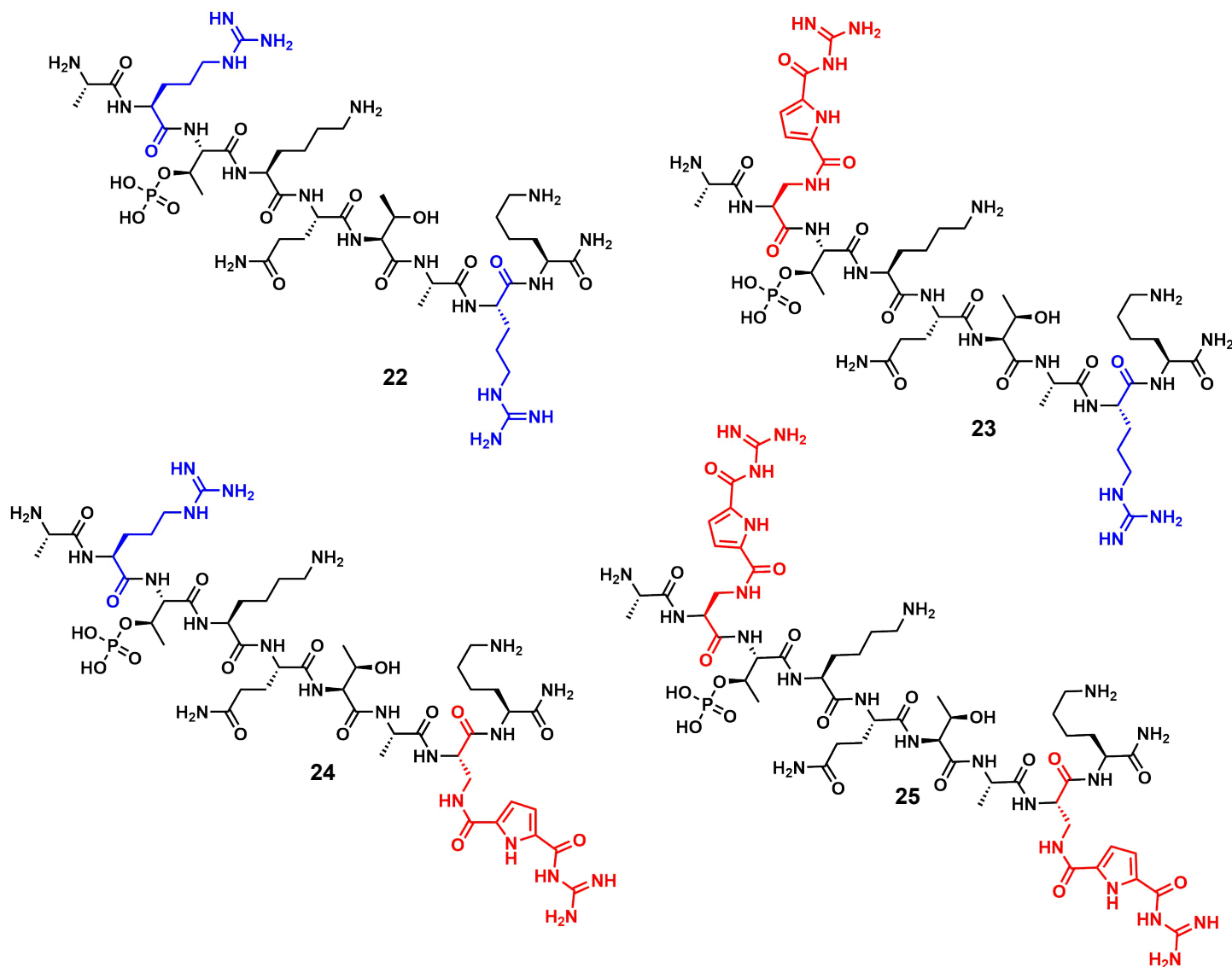


Abbildung 21: Struktur der Neunerpeptide **22** bis **25**.

Dabei stellt die Verbindung **22** als unmodifizierte Peptidsequenz die Kontrollverbindung dar. Ausgehend von ihr wurden die Arginine (in blau) systematisch durch Dap(GCP) (in Rot) ersetzt. Die Substitution der Arginine führen zu den Sequenzen **23**, **24** und **25**.

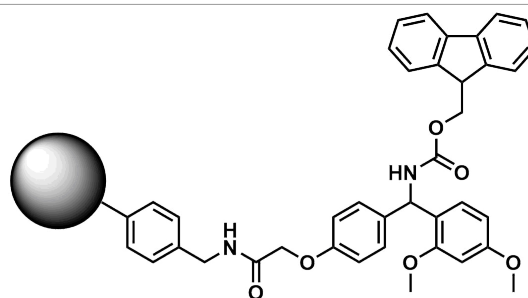
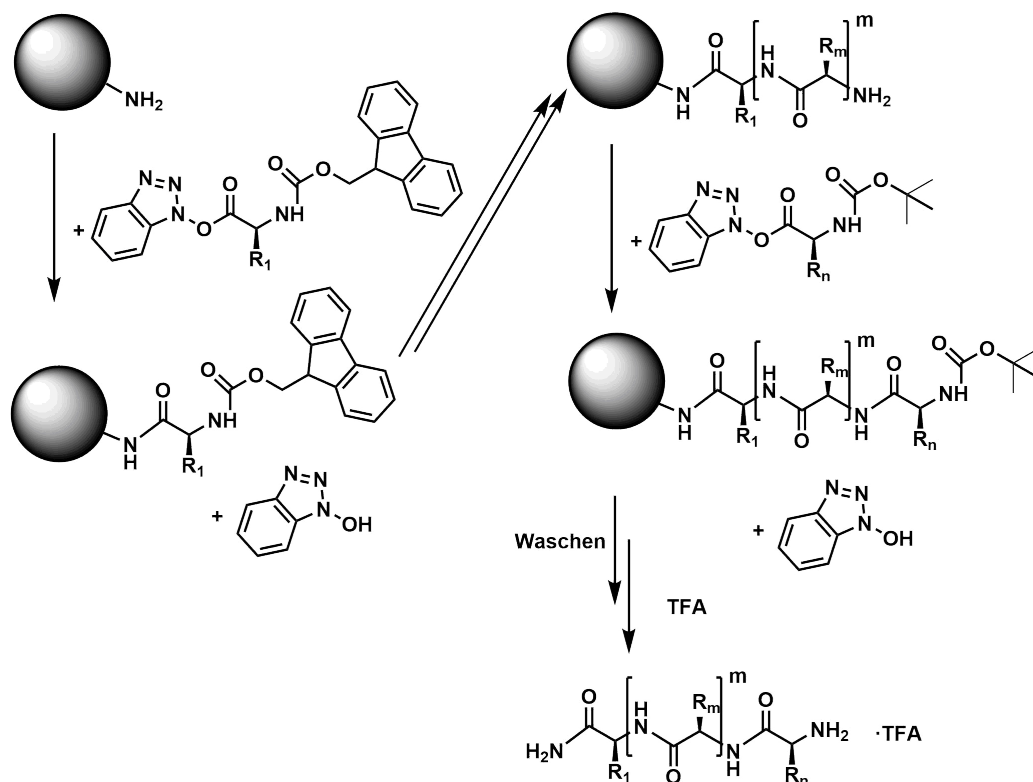


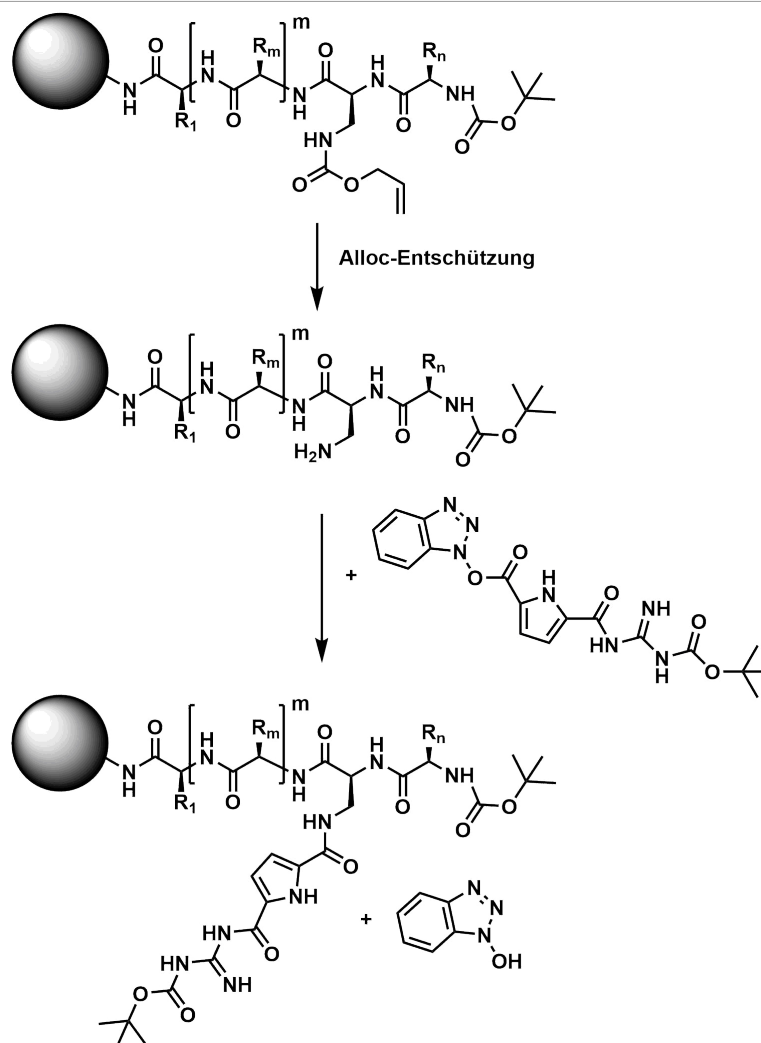
Abbildung 22: Struktur des Fmoc-geschützten Wang-Linkers am Harz.

Für die Synthese der Verbindungen wurde zunächst Rinkamid Harz (80-100 mesh, Struktur siehe Abbildung 22) und die entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäuren verwendet. Eine Mikrowelle wurde verwendet, um die Kupplungszeiten zu verkürzen, weshalb auch DMF als Lösungsmittel verwendet wurde, da dessen Siedepunkt über der Betriebstemperatur der Mikrowellensynthese liegt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Piperidin Lösung in DMF entschützt. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP in Kombination mit Collidin eingesetzt, wodurch der Aktivester der Aminosäure *in situ* hergestellt wird. Die vergleichsweise sanften Bedingungen zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe erlaubte es, die Aminosäure-Bausteinen, die über den Linker an das Harz gekuppelt wurden, zu entschützen ohne sie vom Harz abzutrennen (Schema 2). Durch die so entstandene freie Amin-Funktion ermöglichte ein weiterer Aminosäure-Baustein an das Harz zu kuppeln, wodurch die gewünschte Peptidsequenz sukzessiv aufgebaut werden konnte. Die Seitenketten der Aminosäuren und das α -Amin der letzten Aminosäure wurden dabei meist mit säure-labilen Schutzgruppen (Pbf oder Boc) geschützt. Diese wurden bei der Abspaltung vom Harz ebenfalls entfernt.



Schema 2: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese.

Für die Verbindungen **23** bis **25** fand Dap(GCP) als Baustein Verwendung. Statt diesen als einzelnen Baustein einzusetzen, wurde die Diaminopropionsäure Fmoc-Dap(Alloc)-OH an den korrekten Stellen in der Sequenz eingebaut. Nach der Vervollständigung der Peptidsequenz wurde die Alloc-Schutzgruppe entfernt und die entstandenen freien Amine mit Boc-GCP gekuppelt. (Schema 3) Während des Abspaltens wurden alle verbleibenden Schutzgruppen entfernt und die Peptide wurden mittels präparativer HPLC gereinigt. Alle Verbindungen wurden somit als TFA Salze isoliert und auch als Solche in weiteren Experimenten verwendet. Eine Diskussion der Diastereomeren-Reinheit wird in Kapitel 4.2. beispielhaft an der Verbindung **27** durchgeführt



Schema 3: Synthesestrategie für die Synthese von Peptidsequenzen mit Dap(GCP).

Während die Synthese und Isolierung von **22** und **23** mit Reinheiten über 95% problemlos durchgeführt werden konnten, konnten **24** und **25** unter diesen Reaktionsbedingungen nicht erhalten werden. Da sich die Struktur von **23** und **24** lediglich durch die Position des Arginin und des Dap(GCP)s voneinander unterschied, ließ sich ein Problem mit der chemischen Reaktion an sich ausschließen. Deswegen wurde von einem Diffusionsproblem ausgegangen, weshalb in den nächsten Synthesen ein Harz mit einem höheren *mesh*-Bereich von 100-200 gewählt wurde. Harze mit höherem *mesh* werden normalerweise für längere Peptidsequenzen verwendet, damit die Porengröße des Harzes vergrößert wird. Gleichzeitig steigt damit aber auch der Diffusionsweg des Aktivesters zum Reaktionszentrum, was die benötigte Reaktionszeit verlängert.

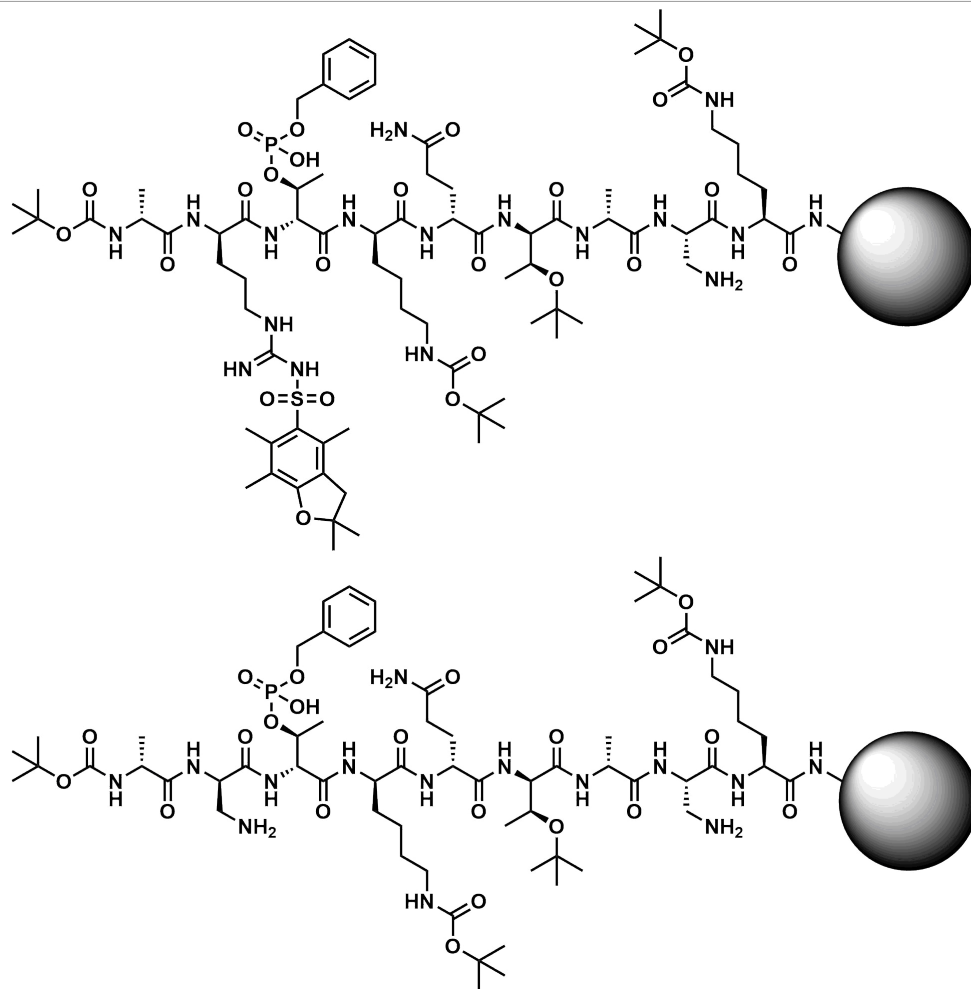


Abbildung 23: Struktur der Reaktionsintermediate am Harz der Verbindungen **24** (oben) und **25** (unten).

Durch diese Änderung konnte **25** erfolgreich synthetisiert werden, während **24** weiterhin nicht synthetisierbar war. Der einzige Unterschied während der Synthese dieser beiden Verbindungen war, dass in der Sequenz von **24** ein Arginin befand, das während der Kupplung an der sterisch anspruchsvollen Pbf-Schutzgruppe gebunden ist. (Abbildung 23) Diese könnte zum Beispiel dafür sorgen, dass die Poren im Harz sterisch stark genug abgeschirmt werden, um die Diffusion des GCPs zum freien Amin zu verhindern.

Um diese Hypothese zu kontrollieren könnte zum Einen ein Harz mit einem noch größeren *mesh* oder für die letzte Kupplung DCM als Lösungsmittel verwendet werden. Diese beiden Optionen führen beide zu größeren Porengrößen, sei es einerseits durch das Harz direkt oder andererseits dadurch, dass das Harz mit dem DCM mehr aufquillt. Bei der ersten Änderung würde sich durch den erhöhten Diffusionsweg die Gesamtreaktionszeit erhöhen. Genauso müsste die Reaktionszeit

beim DCM weiter verlängert werden, da bei Raumtemperatur gearbeitet werden müsste.^[112]

Zum Anderen könnte die Synthesestrategie angepasst werden. So könnte Fmoc-geschütztes Dap(GCP) direkt in die Struktur eingebaut oder statt Fmoc-Dap(Alloc)-OH Alloc-Dap(Fmoc)-OH verwendet werden. Hierbei würde erst GCP an der Seitenkette gekuppelt werden, bevor die Hauptkette weiter gebaut wird. Daher müssten Abspaltbedingungen für die Alloc-Schutzgruppe verwendet werden, die orthogonal zum Boc-GCP sind.

Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.2. wurden diese Änderungen der Synthese von **24** nicht durchgeführt.

Ferner wurden von den Verbindungen **22** und **23** ITCs mit Survivin durchgeführt. Dafür wurde Survivin von Annika Lennartz isoliert und gereinigt. Die angegebenen Survivin Konzentrationen beziehen sich auf die Monomer Konzentration. Aus diesem Grunde bedeutet zum Beispiel eine Stöchiometrie von 1, dass zwei Liganden an einem Survivindimer binden.

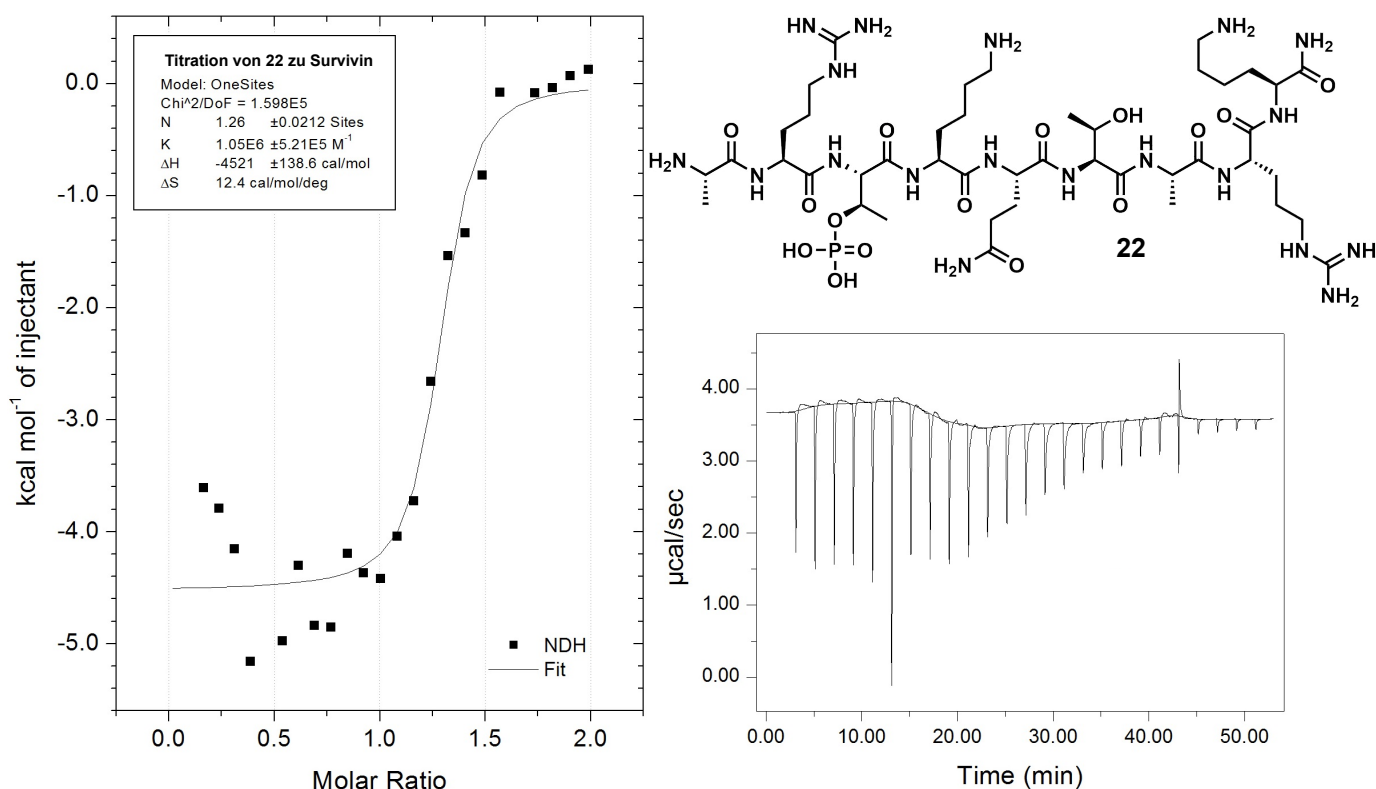


Abbildung 24: ITC von **22** (1 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. oben Rechts: Struktur von **22**.

Wie in der Roh-ITC von **22** in Abbildung 24 zu erkennen ist, gab es zwei Probleme in der Messung. Zum einen ist die Basislinie nicht gerade; Ursächlich dafür könnte zum Beispiel eine Veränderung der Raumtemperatur sein. Außerdem gab es zwei fehlerhafte Signale in der Position 6 und 21. Das erste der beiden Signale zeichnet sich dadurch aus, dass es deutlich stärker ist, als alle anderen Signale. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass Teile der vorgelegten Survivin-Lösung durch eine Luftblase voneinander getrennt waren, die sich erst im Verlauf der Titration aufgelöst hat, weshalb bei dieser Injektion das Signal deutlich höher ausfällt. Beim Zweiten fehlerbehafteten Signal könnte eine Luftblase in der Glasspritze injiziert worden sein, was den endothermen Ausschlag erklären würde. Da diese beiden Signale nicht in der Nähe des Wendepunkts der Titrationskurve liegen, wird die durch die Regression bestimmte Assoziationskonstante vergleichsweise genau sein. Ebenso dürfte diese Umstände nicht die Differenz der beiden Asymptoten beeinflussen, weshalb die Reaktionsenthalpie ebenfalls wenig von diesen Fehlern beeinflusst wird. Der K_D liegt dementsprechend $0,95 \pm 0,47 \mu\text{M}$. Der stöchiometrische Faktor N ist mit $1,26 \pm 0,02$ deutlich größer als 1, liegt damit aber immer noch innerhalb der Literaturwerte für die 12er Peptide. Deren Stöchiometrie lag in dem pH-Wertbereich von 6,8 bis 8,2 zwischen 1,03 bei pH 7,2 und 1,23 bei pH 8,2 mit keiner eindeutigen Abhängigkeit von pH-Wert. ΔH liegt bei $-4.521 \pm 139 \text{ cal/mol}$ und $-T\Delta S$ bei ungefähr 3697 cal/mol .

Dies liegt relativ nah an den literaturbekannten thermodynamischen Bindungsparametern der 12er Peptiden bei pH 6,8 ($K_D = 1,45 \pm 0,03 \mu\text{M}$; $N = 1,26 \pm 0,02$; $\Delta H = -4.521 \pm 139 \text{ cal/mol}$; $-T\Delta S = 3.697 \text{ cal/mol}$).^[72]

Zwar scheint das 9er Peptid **22** um zirka 35% besser zu binden als das korrespondierende 12er Peptid, aber auf Grund der relativ schwachen Datenlage, dem leicht anderem pH-Wert und den bereits diskutierten Fehleranfälligkeiten während der ITC sollte dies nicht überbewertet werden.

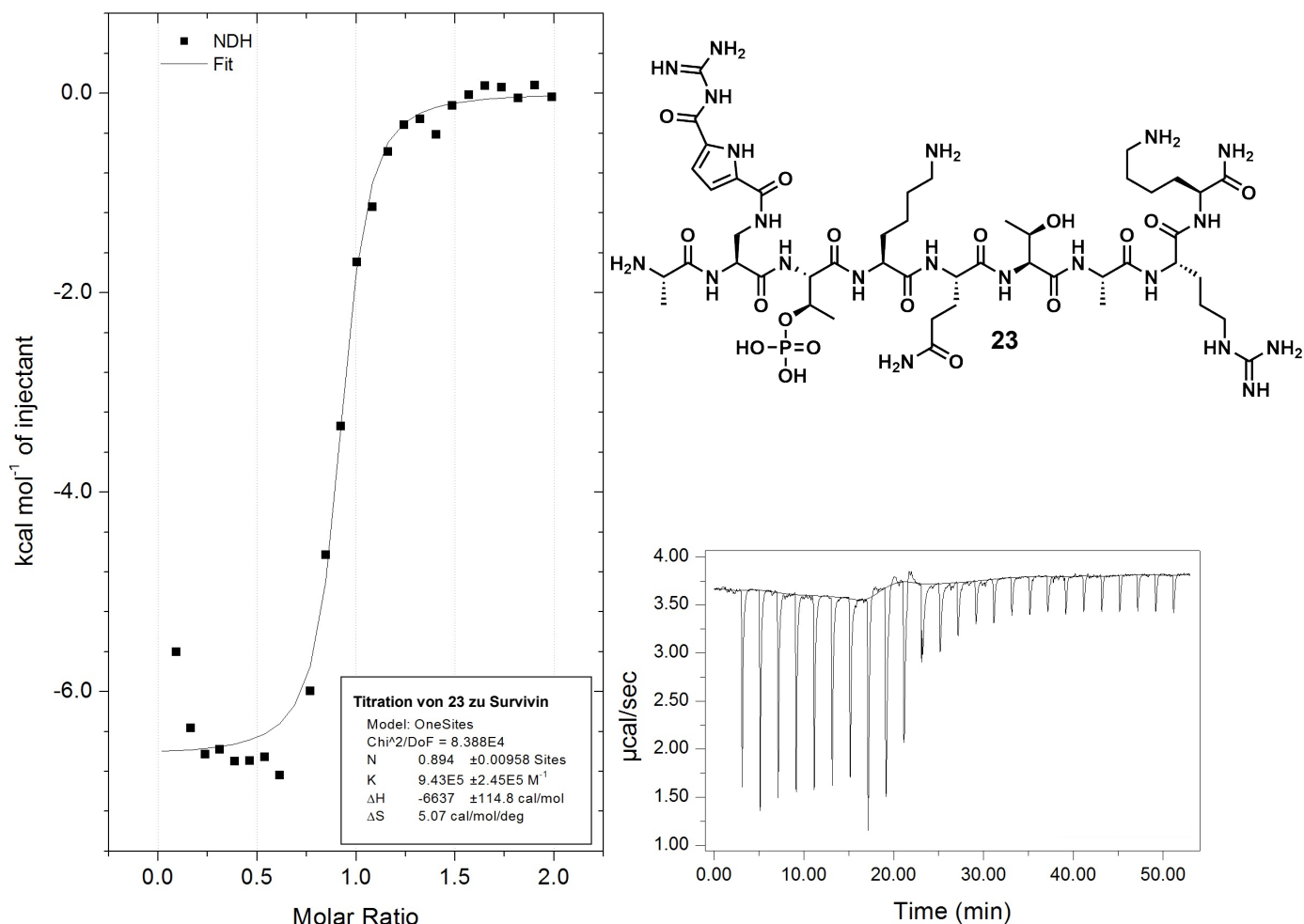


Abbildung 25: ITC von **23** (1 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **23**.

Ebenso wie die Roh-ITC von **22** gab es ähnliche Messprobleme mit **23** in Abbildung 25. Während die kurvige Basislinie weniger ins Gewicht fällt, scheinen die Signale der Position 8 bis 10 deutlich größer zu sein als die davor. Diese Signale liegen um den Wendepunkt der Titrationskurve, wodurch der berechnete stöchiometrische Faktor N und die Assoziationskonstante K_A beeinflusst werden. Ersterer liegt mit $0,89 \pm 0,01$ immerhin näher an der erwarteten Stöchiometrie von 1. Dies ist dahingehend zu erwarten, da die Distanz zwischen den beiden BIR-Domänen vom Survivindimer groß genug ist, um beide Domänen als separate Bindungstaschen betrachten zu können. Ebenso liegt die Reaktionsenthalpie ΔH mit -6.637 ± 115 cal/mol und $-T\Delta S$ mit 1.512 cal/mol in der zu erwarteten Größenordnung. Wird der K_D der Verbindung **23** zu Survivin mit $1,06 \pm 0,28$ μM mit

dem der Verbindung **22** verglichen, fällt auf, dass beide ungefähr gleich stark an Survivin binden und die Verbindung **23** tendenziell sogar etwas schwächer als das unmodifizierte Peptid **22**.

Zwar kann GCP prinzipiell stärker an Carboxylaten und Phosphaten binden als Arginin, besitzt dafür jedoch eine aromatische, planare und rigidere Struktur als die Seitenkette des Arginins. Dementsprechend mag die Länge des Dap(GCP)s auf einer zweidimensionalen Fläche dem des Arginins ähnlich sein, jedoch kann Letzteres wegen seiner Flexibilität mehrere Konformationen annehmen. Dies wird wahrscheinlich die Ursache sein, warum in dieser Position sich diese beiden Effekte ausgleichen und zu keiner Verstärkung der Bindung durch GCP führen.

Da die Ergebnisse des folgenden Kapitels deutlich vielversprechender waren, wurde auf weitere Kontrollexperimente mit **22** und **23** verzichtet und die Substitution des Arginins R8 durch Dap(GCP) nicht weiter untersucht.

4.2. Kombination des Histon fünf Peptids mit GCP-Dap(GCP)

Das Konzept der Liganden **26** bis **28** beruht auf die Kombination des literaturbekannten **L1**^[8] mit den ersten fünf Aminosäuren des N-Terminus' von Histon H3. Diese binden räumlich nah zueinander, jedoch teilen sich das Alanin des H3s mit dem Methylester von **L1** eine Bindungstasche. Um diese räumliche Überlappung zu kompensieren, wurden die Verbindungen **27** und **28** entworfen, in denen schrittweise zuerst das Alanin bei **27**, und danach ebenfalls das Arginin in **28** deletiert wurden. Zwar besteht **28** somit nur noch aus drei der ursprünglich fünf Aminosäuren der ursprünglichen Peptidsequenz, jedoch wurde das Arginin prinzipiell durch Dap(GCP) ausgetauscht. Dies wiederum sollte eventuelle Bindungsverluste kompensieren könnten.

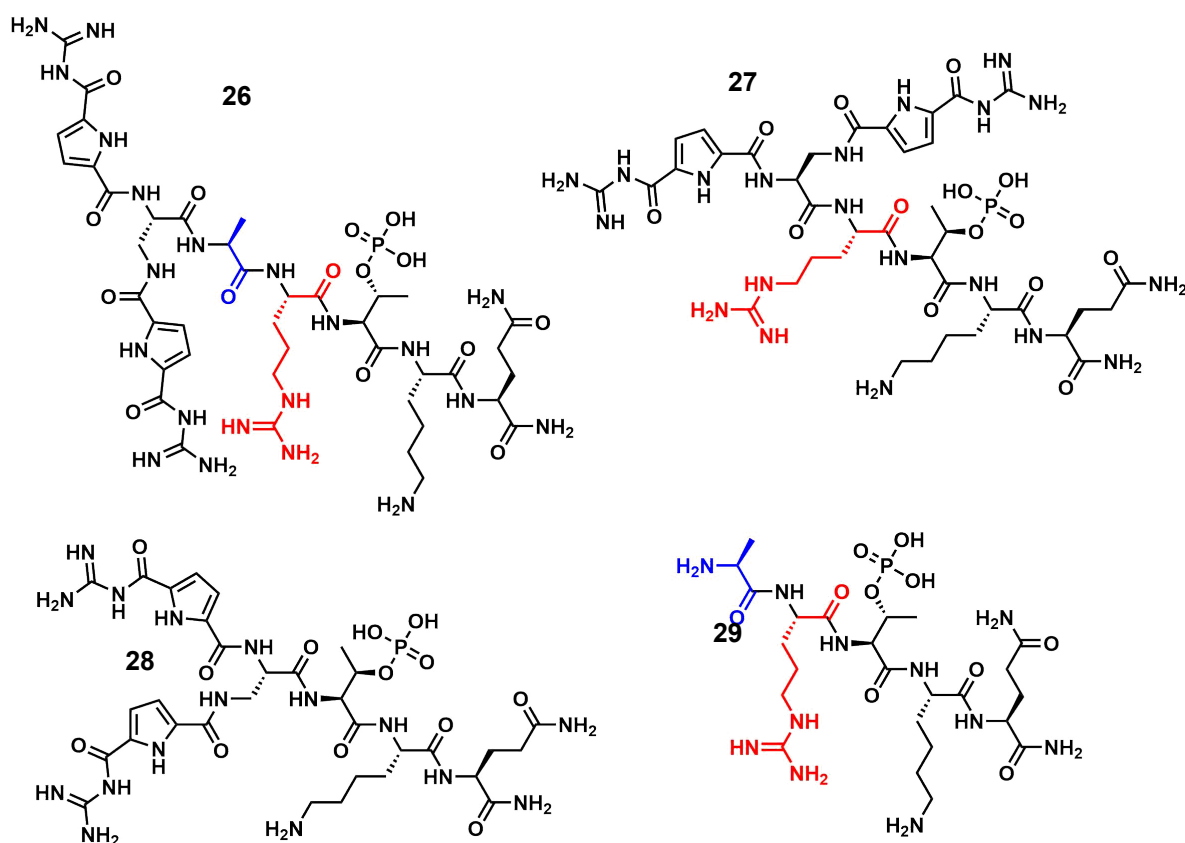


Abbildung 26: Struktur der Verbindungen **26** bis **29**. Das in **27** und **28** deletierte Alanin wurde blau, das zusätzlich in **28** deletierte Arginin rot markiert.

Außerdem ist zu erwähnen, dass anstelle des literaturbekannten 4er Peptids nicht nur das entsprechende 5er Peptid als Grundlage gewählt, sondern auch am C-Terminus die Carbonsäure durch ein Carbonsäureamid substituiert wurde. Die erste Änderung wurde als Vorsichtsmaßnahme durchgeführt, da eine eventuelle Dephosphorylierung der Peptidsequenz zu einer Verringerung der Bindungsstärke

dieser kurzen Peptidsequenz führen würde. Vergleicht man die literaturbekannten Kristallstrukturen der phosphorylierten Histon-Sequenz mit der Unphosphorylierten, konnte bei der Letzteren zusätzlich der C-Terminus des Glutamins in der Kristallstruktur lokalisiert werden^[72]. Aus diesem Grund wurde als Gegenmaßnahme für eine potentielle Dephosphorylierung zusätzlich das Glutamin mit eingebaut. Eine solche Dephosphorylierung wurde jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet. (Siehe Abbildungen 113 bis 120 im Anhang).

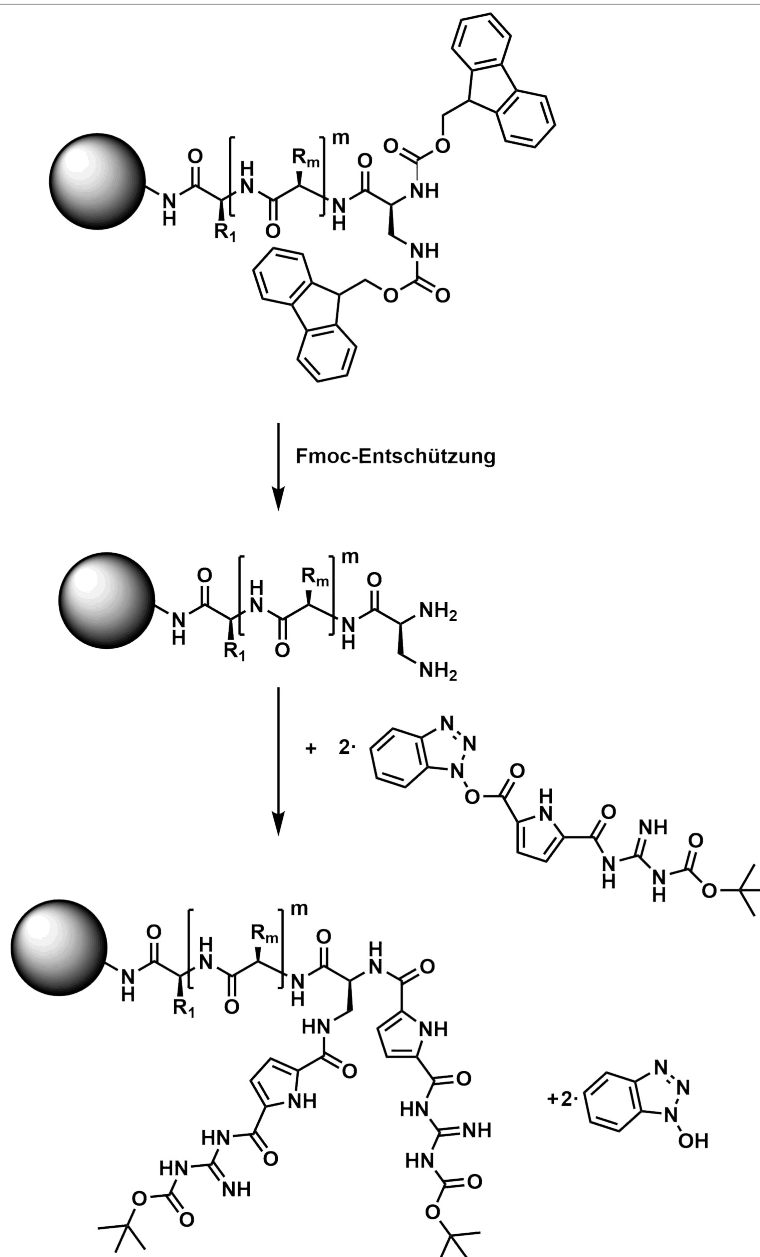
Die Änderung zum Carbonsäureamid erleichterte dagegen die Synthese, da der erste Kupplungsschritt an den entsprechenden Harzen nicht nur aufwendiger war, sondern auch die für die Synthese am besten geeigneten Kupplungsreagenzien zur Epimerisierung des Aminosäureaktivesters führen konnten.^[112]

Diese beiden Änderungen machten die Kontrollverbindung **29** notwendig.

Die Synthese-Strategie für die Verbindungen **26-28** ähneln der für die Verbindungen **23** bis **25**. Jedoch wird an Stelle eines an der Seitenkette orthogonal geschützter Diaminopropionsäure DAP innerhalb der Sequenz eine doppelt Fmoc-geschützte Diamino-Propionsäure am Ende der Sequenz eingeführt. An dieser endständigen Aminosäure wurde anschließend zwei GCP-Einheiten gekuppelt (Schema 4).

Sowohl die Synthese als auch die Isolierung von **26** bis **28** verliefen reibungslos mit Ausbeuten im niedrigen einstelligen Milligrammbereich ($\approx 2-5$ mg) und mit Reinheiten über 95%.

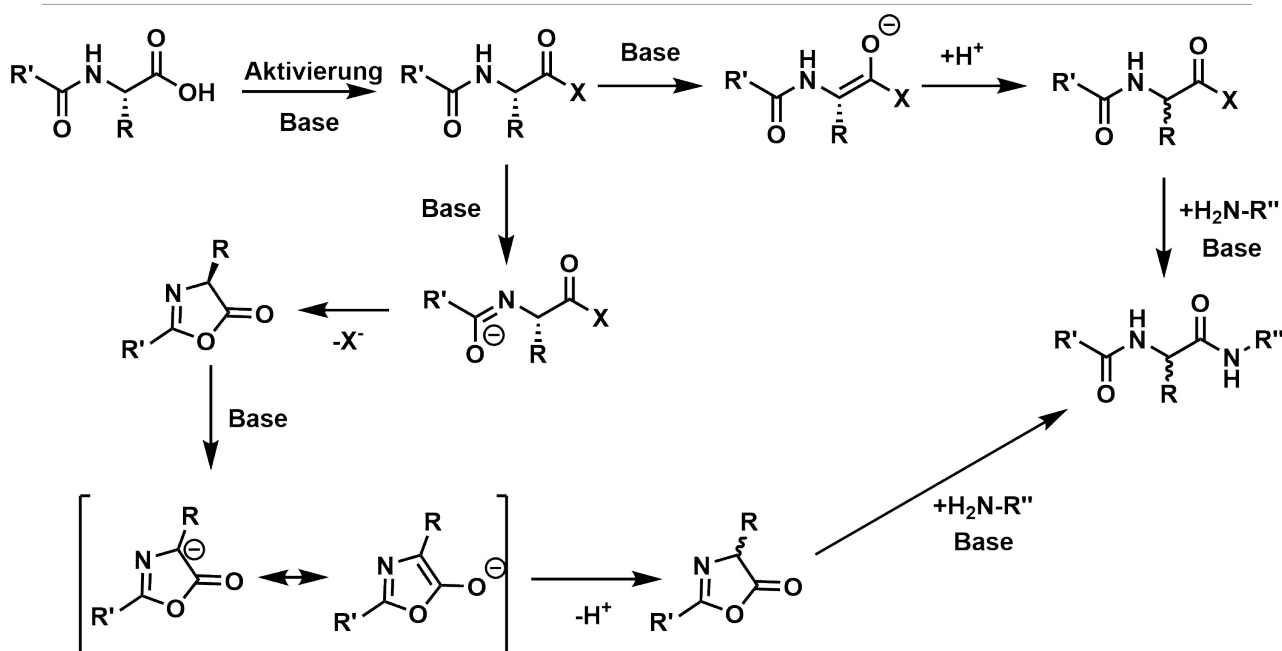
Die Verbindung **29** wurde extern von der Firma *Invatis Peptides* synthetisiert und analysiert.



Schema 4: Synthese-Strategie der Verbindungen **26-28**.

Weiterhin war es notwendig die Diastereomeren-Reinheit der Verbindungen zu beweisen. Zwar wurde während der Synthese nur die entsprechenden *L*-Aminosäurebausteine verwendet, diese können jedoch als Aktivester bei inkorrektter Handhabung zur korrespondierenden *R*-Aminosäure epimerisieren.

Diese Diastereomere können in der Massenspektrometrie überhaupt nicht, in der NMR-Spektroskopie kaum, in der HPLC (*high performance liquid chromatography*) hingegen gut nachgewiesen werden. Die meisten Diastereomere lassen sich mittels präparativer HPLC von einander trennen. Ausnahmen bilden hier Racemate, in denen **alle** Stereozentren invertiert wurden.^{[113],[114],[115]}



Schema 5: Literaturbekannte Mechanismen zur Racemisierung einer Aminosäure während der Peptidkupplung.^[112]

In der Literatur sind dazu zwei Mechanismen der Epimerisierung bekannt. Im ersten Mechanismus bildet sich nach dem Deprotonierung am Amid aus dem Aktivester ein cyclisches Lactam, wodurch in α -Position deprotoniert werden kann. Das daraus entstehende Enolation besitzt Analog keine Stereoinformation und kann bei anschließender Reprotonierung sowohl wieder das *L*- als auch das *D*-Epimer bilden. Eine Racemisierung durch diesen Mechanismus kann ausgeschlossen werden, da die mit 2,4,6-Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin) eine relativ schwache Base verwendet, und diese gleichzeitig in äquimolaren Mengen zur Aminosäure eingesetzt wurde. Dadurch wird es äußerst unwahrscheinlich, dass die beiden für diese Reaktion zusätzlich benötigten Deprotonierungen stattfinden.

Im zweiten Mechanismus wird der Aktivester direkt in α -Position von einer Base deprotoniert, wodurch der entsprechende Aktivester ebenfalls epimerisiert. Diese Epimerisierung kann zwar nie vollständig inhibiert, aber durch eine gut geplante Synthese reduziert werden. Die Faktoren, mit denen sich die Epimerisierungen am Meisten beeinflussen lassen, sind die Wahl des Kupplungsreagenz, der Base und der Basenmenge.

Die Kupplungsreagenzien lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Zum Einen Kupplungsreagenzien, die bereits ein HOBt-Derivat beinhalten, wie HBTU oder PyBOP und zum Anderen die Reagenzien, bei denen das HOBt noch zugesetzt

werden sollte wie zum Beispiel EDC·HCl. Namentlich Letztere neigen mehr dazu Epimere zu bilden, wenn die Base im Überschuss vorliegt.^[112]

Während für die Kupplung der meisten Aminosäuren tertiäre Amine wie DIPEA oder Et₃N als Basen einsetzbar sind, sollte für Serin und Cystein die deutlich schwächere Base 2,4,6-Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin) verwendet werden. Die zuletzt genannte Base wurde deswegen auch trotz des Mangels an Serin und Cystein für sämtliche Kupplungen verwendet.^[112]

Die Basenmenge ist ein Faktor mit zweierlei Einfluss auf die Kupplungsreaktion. Eine höhere Basenkonzentration beschleunigt die Reaktionen. Dies trifft nicht nur auf die Kupplung an sich, sondern auch auf die Epimerisierungsreaktion zu, infolge dessen wird dazu geraten, die Base und die Aminosäure in den selben Äquivalenten hinzu zu geben. Wie bereits erwähnt, wurde ebenfalls im Verlauf dieser Arbeit diesem Umstand Rechnung getragen.^[112]

Um die Wirksamkeit dieser Vorsichtsmaßnahmen zu beweisen, wird im folgenden beispielhaft an **27** dessen Diastereomerenreinheit mittels 135Dept-¹³C-NMR bewiesen. (Gesamtes Spektrum: Abbildung 101 im Anhang) Diese Messungen wurden in einem Gemisch von 9:1 H₂O/D₂O durchgeführt. Der Anteil an nicht deuteriertem Wasser, ermöglicht es in den ebenfalls durchgeführten ¹H-NMR und Korrelationsspektren ebenfalls, die Signale der an Stickstoff-gebundenen Wasserstoffatome, zum Beispiel des Peptidrückrats, zu detektieren werden. Des Weiteren unterdrückt Wasser als sehr polares Lösungsmittel die Bildung von Sekundärstrukturen bei den kürzeren Peptiden. Außerdem kann Wasser mittels Lyophilisierung wieder rückstandslos von dem Produkt wieder getrennt werden. Dies ist besonders wichtig, da besonders hohe Konzentrationen der synthetisierten Peptide für die ¹³C-NMR-Spektroskopie benötigt werden, um auch mögliche Verunreinigungen von Diastereomeren detektieren zu können.

Im 135Dept-¹³C-NMR werden die Signale der ¹³C-Atome durch ihre benachbarten ¹H-Atome induziert. Dabei weisen die Signale von Kohlenstoffatome mit ungerader Anzahl an Wasserstoffbindungen ein positives, die mit gerader Anzahl an Wasserstoffbindungen ein negatives Vorzeichen auf, wobei quartäre Kohlenstoffatome nur schwache negative Signale ergeben. Dies hilft nicht nur bei der Unterscheidung einzelner Kohlenstoffatome sondern erhöht zusätzlich die

Sensitivität der Messung, wodurch mögliche Verunreinigungen trotz geringer Probenmenge besser zu erkennen sind.^[113]

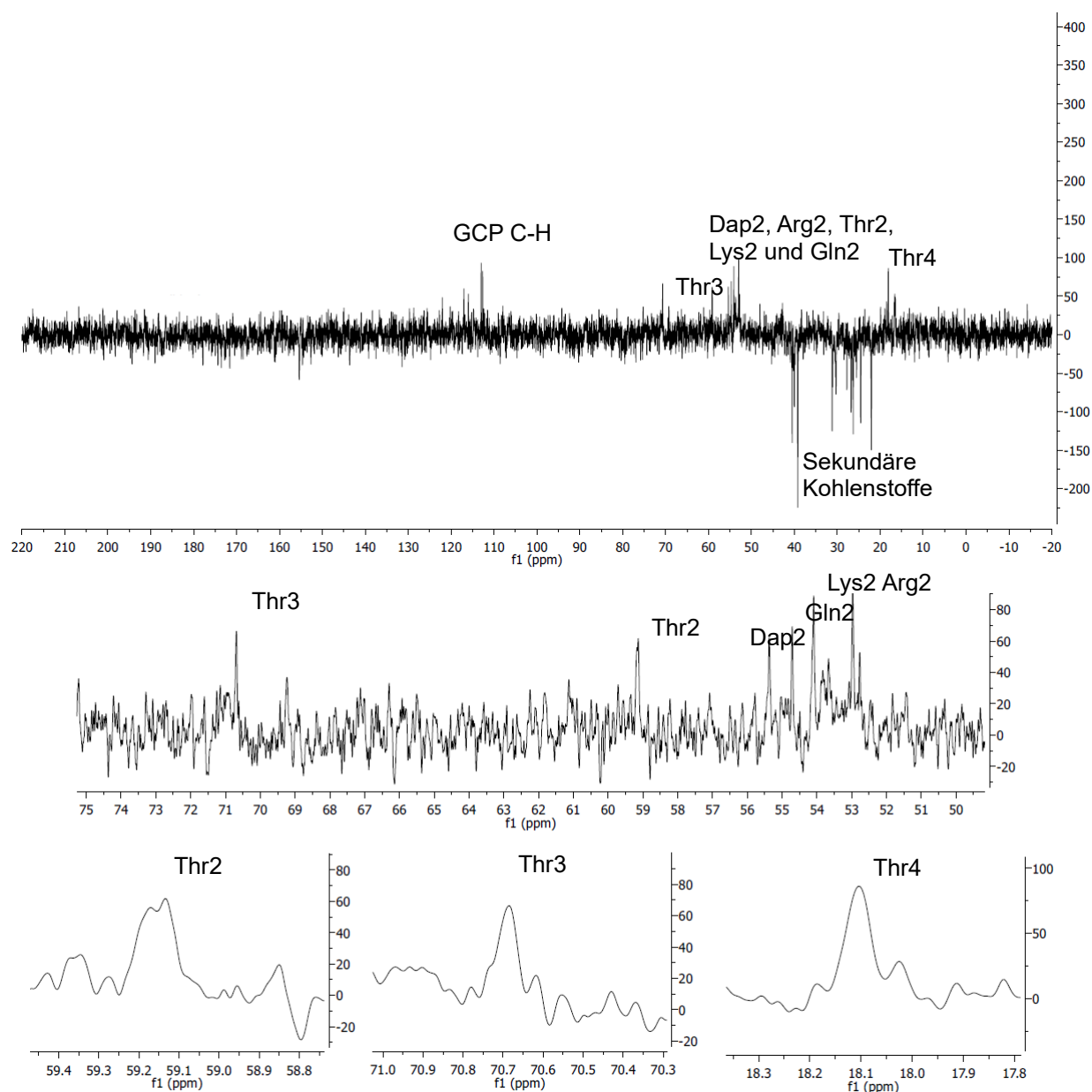


Abbildung 27: 135Dept.¹³C-NMR der Verbindung **27**. Obere Reihe gesamtes C¹³-NMR. Mittlere Reihe Vergrößerung für den Bereich von 50 bis 75 ppm. Untere Reihe Vergrößerung für die einzelnen Signale des phosphorylierten Thr. Kohlenstoffatome gekennzeichnet durch Nummerierung der Kohlenstoffkette der entsprechenden Aminosäure. Für eine komplette Auswertung des ¹³C-NMRs siehe Abbildung 103 im Anhang.

Eine Inversion des Stereozentrums ließe sich durch einen mehrfachen Signalsatz des entsprechenden Kohlenstoffatoms nachweisen. Dementsprechend sind die Signale der α -Kohlenstoffatome Dap2, Arg2, Thr2, Lys2 und Gln2, sowie das ebenfalls chirale Thr3, von besonderer Relevanz. (Abbildung 27) Dabei ist eine

Dopplung von Thr2 deutlich zu erkennen, die bei den anderen Signalen des Threonins nicht, beziehungsweise nicht in dieser Intensität, zu erkennen ist. Bei der Auswertung der ^{13}C -NMRs der Verbindungen von **26** und **28** spalteten ebenfalls nur die Signale der Threonin-Kohlenstoffe auf. (Abbildung 28) Während die Aufspaltung bei **28** wegen der aus der geringen Konzentration geringeren Auflösung nur in Andeutungen erkennbar ist, kann bei **26** eindeutig eine Dopplung der Signale für Thr2, Thr3 und in sehr geringen Maße auch Thr4 erkannt werden.

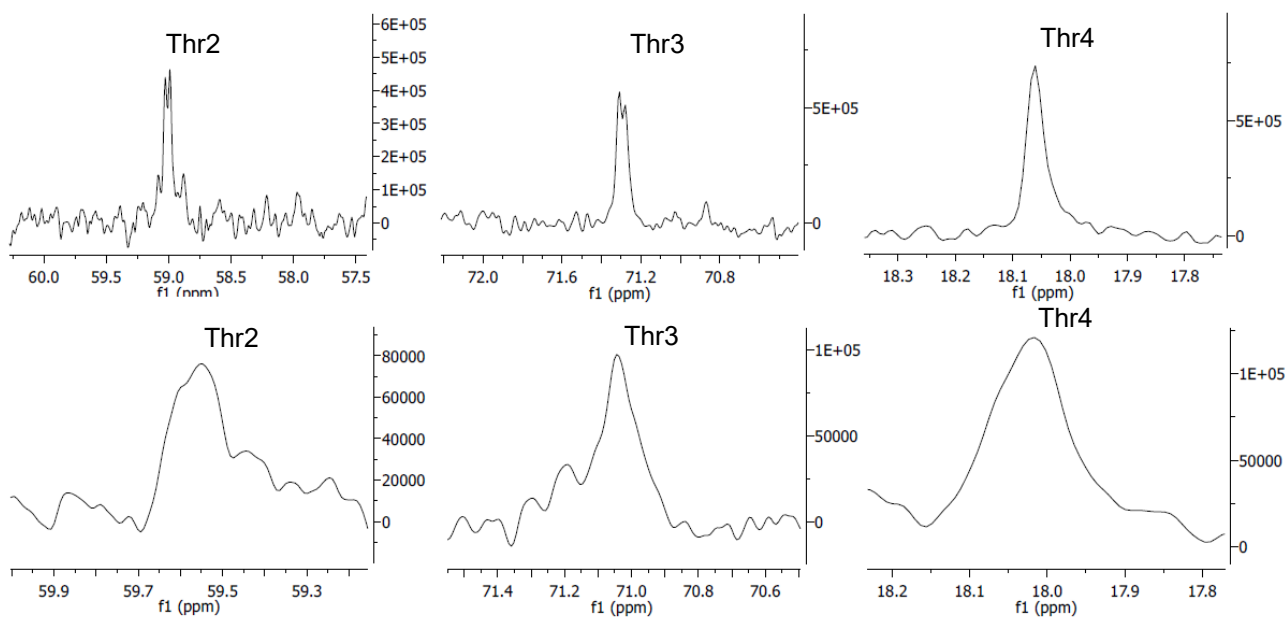


Abbildung 28: Vergrößerung der ^{13}C -NMR-Signale des Threonins der Verbindungen **26** (oben) und **28** (unten).

Zum Einen ist es seltsam, dass scheinbar nur die Signale der Kohlenstoffatome des phosphorylierten Threonins bei allen Verbindungen einen doppelten Signalsatz besitzen, zum Anderen ließe sich so weder die der Methylgruppe Thr4 durch eine Inversion des Stereozentrums erklären, noch warum auch das β -Kohlenstoff der Verbindung **26** eindeutig zwei Signale bildet. Letzteres ist verwunderlich, da eine Deprotonierung in dieser Position deutlich unwahrscheinlicher ist und nicht in der Literatur beschrieben wird. Dazu kommt außerdem, dass sich die Signale dublettartig in zwei ungefähr gleich große Signale aufspalten. Dies würde eine Konzentrationsverhältnis von ungefähr 1:1 der beiden Diastereomere implizieren. Eine mögliche Dephosphorylierung konnte einerseits durch die Massenspektrometrie ausgeschlossen werden, andererseits wäre die Änderung in der chemischen Verschiebung in diesem Fall deutlich höher.

Zur Kontrolle wurden die ^{13}C -NMR Spektren von Thr-OMe (Abbildung 29) und phosphorylierten Thr (Abbildung 30) aufgenommen.

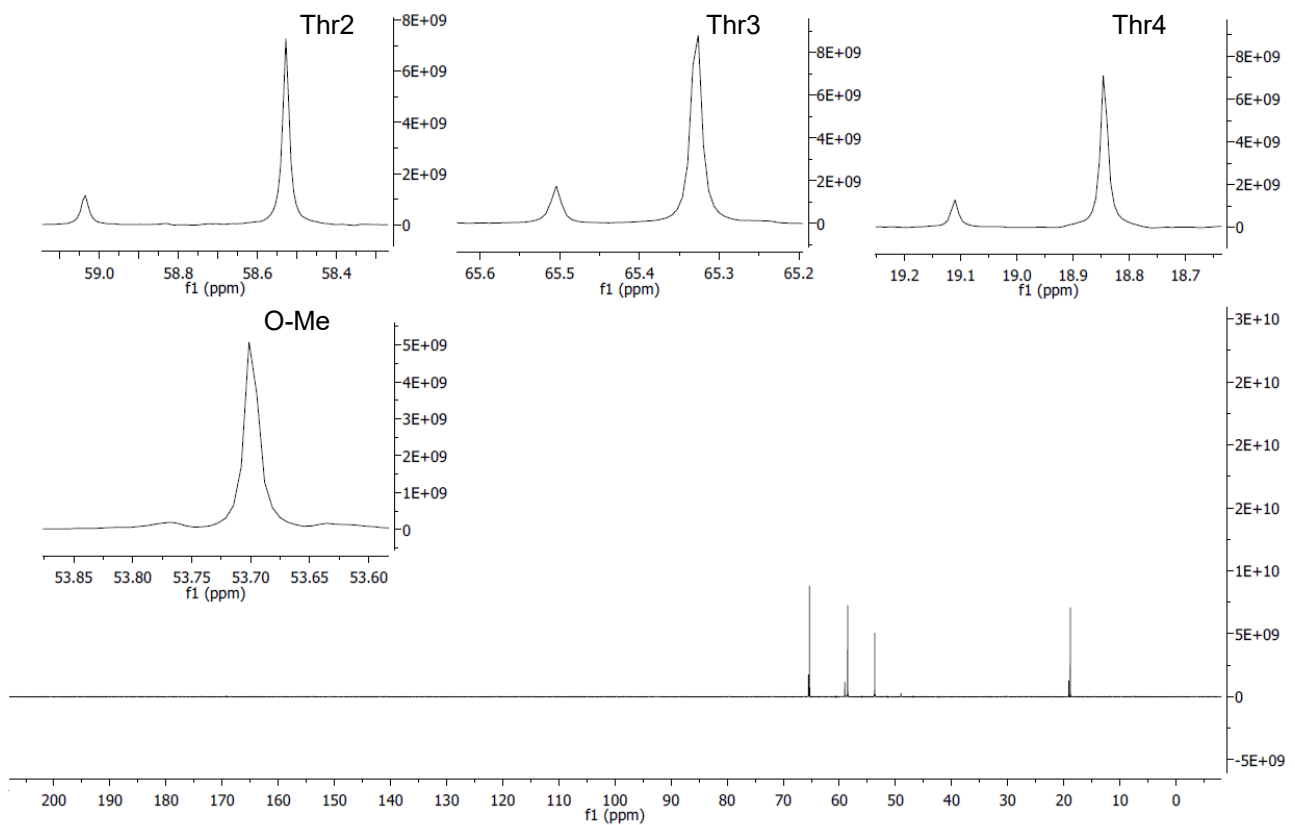


Abbildung 29: ^{13}C -NMR von Thr-OMe. Die Vergrößerungen sind mit der Nummerierung des korrespondierenden Kohlenstoffatoms beschriftet. Die kleineren Peaks in den Vergrößerungen stammen von dem teilweise vorhandenen freien Carbonsäure.

Die Signale der Kohlenstoffatome des Threonins besitzen keinen mehrfachen Signalsatz. Die Probe scheint mit der freien Carbonsäure verunreinigt zu sein. Dies stellt eine typische Alterungserscheinung von Carbonsäureestern dar und stört die spektroskopische Untersuchung nicht.

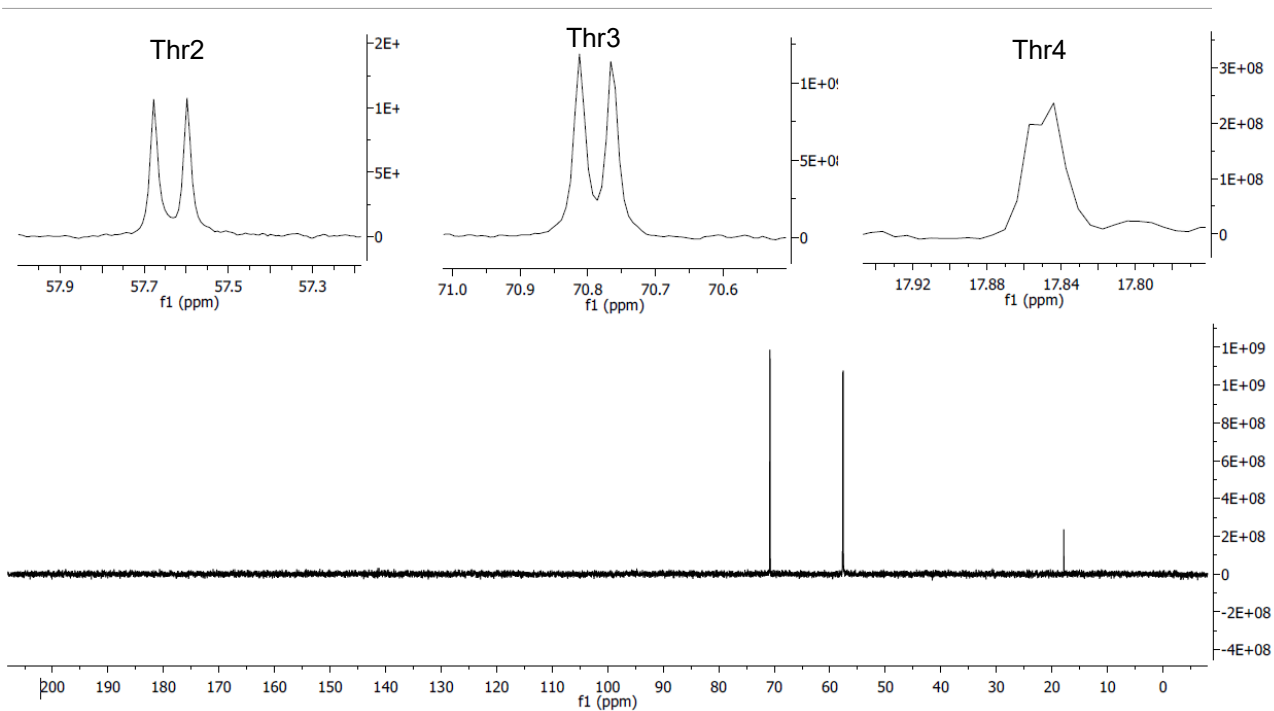


Abbildung 30: ^{13}C -NMR vom phosphorylierten Threonin. Die Vergrößerungen sind mit der Nummerierung des korrespondierenden Kohlenstoffatoms beschriftet.

Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum des sauberen phosphorylierten Threonin analog zu den Verbindungen **26** bis **28** einen deutlich ausgeprägten dublettartigen Signalsatz auf. Insbesondere ist auch eine Aufspaltung in der Methylgruppe des Threonins zu erkennen, die gegen eine Inversion der Stereozentren sprechen würde.

Da dieser Effekt beim unphosphorylierten Threoninmethylester nicht auftritt, muss die Phosphatgruppe für diese Wirkung verantwortlich sein. Phosphor ist eines der wenigen Elemente im Periodensystem, das nur ein natürlich vorkommendes Isotop besitzt. Dieses ^{31}P -Isotop besitzt einen Kernspin von $\frac{1}{2}$, weshalb es bei den ^{13}C -NMR, welches nur ^1H -entkoppelt ist, mit den vorhandenen ^{13}C -Atomen koppeln kann. Somit handelt es sich bei den Signalen um Dubletts. Die Kopplungskonstanten betragen $^2J(\text{C}_{\text{Thr3}},\text{P}) = 7,59 \text{ Hz}$ und $^3J(\text{C}_{\text{Thr2}},\text{P}) = 4,72 \text{ Hz}$. Die Literaturwerte für das vergleichbare Triethylphosphat liegen mit $^2J(\text{C},\text{P}) = 6 \text{ Hz}$ und $^3J(\text{C},\text{P}) = 7 \text{ Hz}$ in der selben Größenordnung.^[113]

Dementsprechend sind die Verbindungen **26-28** diastereomerenrein. Die Bildung eines racematischen Gemisches ist durch das Threonin der Sequenz sehr unwahrscheinlich. Threonin und Isoleucin sind die beiden einzigen proteinogenen Aminosäuren, die ebenfalls ein chirales β -Kohlenstoffatom besitzen, die sich schwer

epimerisieren lassen. Zusätzlich wurde durch sorgfältige Abwägung der Reaktionsbedingungen die Epimerisierung einzelner Aminosäuren reduziert. Eventuelle Diastereomere wurden mittels HPLC von dem Hauptprodukt abgetrennt. Durch diese Maßnahmen ist die Bildung eines racematischen Gemisches, welches in biologisch relevanten Mengen vorliegen könnte, statistisch sehr unwahrscheinlich. Von den Verbindungen **26** bis **29** wurden sowohl die Bindungsparameter mittels ITC, als auch die Bindungsstelle mittels NMR-Titration bestimmt. Letztere wurde von Christine Beuck mit N¹⁵-angereichertem Survivin durchgeführt.

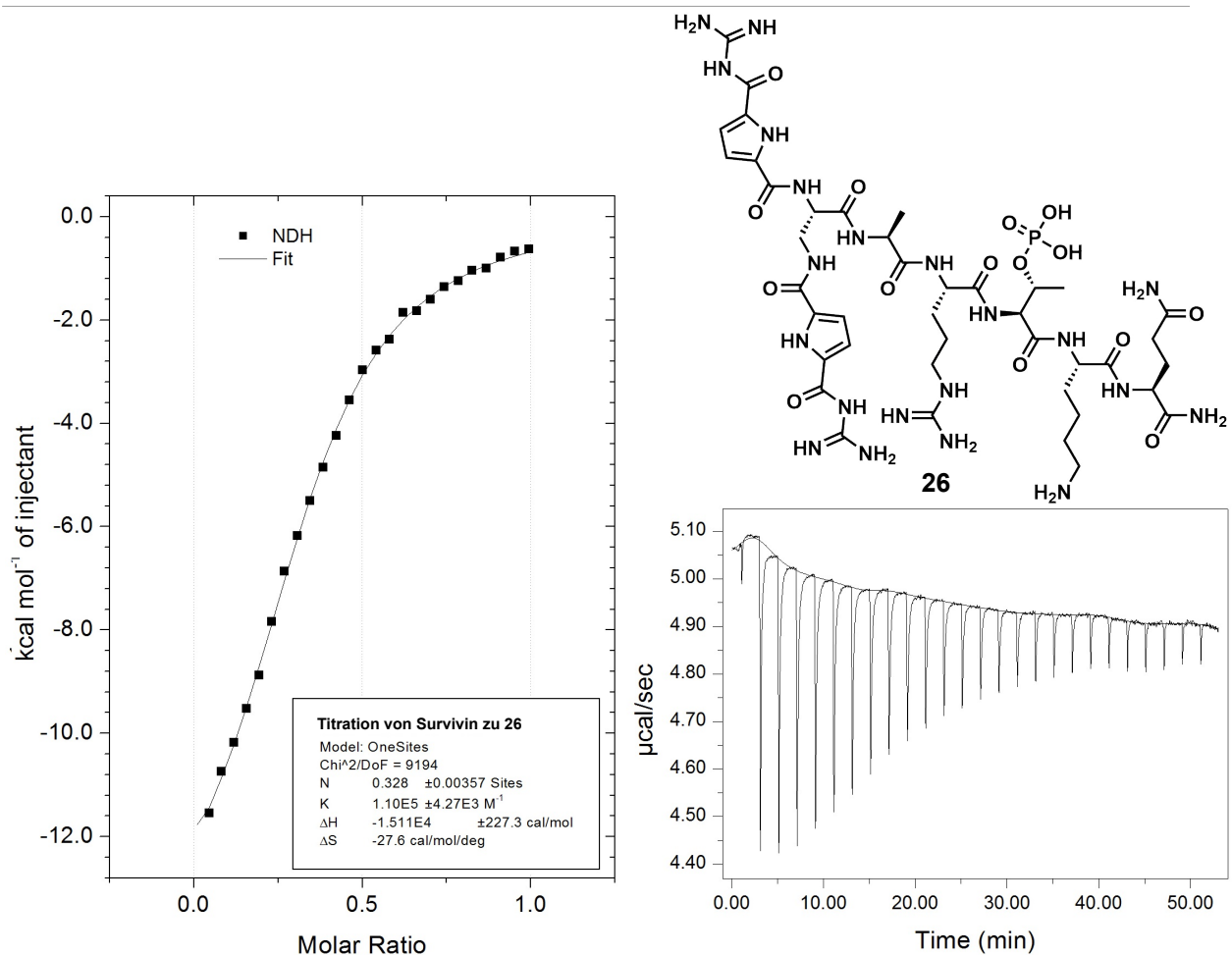


Abbildung 31: ITC von Survivin (0,5 mM) zu **26** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben Rechts: Struktur von **26**.

Die erste Titration von Survivin mit **26** wurde mit einer Konzentration in der Spritze von 0,5 mM durchgeführt. (Abbildung 31) Zwar sind die Signale sehr klar und die Titrationskurve sehr gut, jedoch erreicht die Titration zum Ende keine eindeutige Asymptote, weshalb die restlichen Titrationsen stattdessen mit einer Konzentration von 0,75 mM statt 0,5 mM durchgeführt wurden. Die Bindungsparameter weisen jedoch eine sehr geringe Abweichung auf. Dessen Stöchiometrie ist mit $0,328 \pm 0,004$ im Vergleich zu der Literaturverbindung L1 deutlich reduziert. Jedoch ist dieser Wert weit entfernt von der erwarteten 2:1 Stöchiometrie zwischen dem Liganden und dem Survivin-Dimer. Dieser Umstand ist dahingehend eigenartig, da das Survivin-Dimer zwei BIR-Domänen besitzt und somit zwei Liganden binden könnte. Voraussetzung jedoch ist, dass **26** auch an der BIR-Domäne bindet, dies wird bei Auswertung der NMR-Titration weiter diskutiert. Die Stöchiometrie von **26** lässt hingegen darauf schließen, dass statistisch nur an knapp zwei Drittel aller

Dimere ein Molekül **26** bindet. Da die bestimmte Stöchiometrie von der Position des Wendepunktes der Kurve abhängt, könnte diese Abweichung von der erwarteten Stöchiometrie ein Indiz für einen Fehler beim Erstellen der Verdünnungsreihe sein. In diesem Fall wären die restlichen thermodynamischen und kinetischen Konstanten tendenziell ebenfalls zu klein. Die Dissoziationskonstante K_D liegt mit einem Wert von $9,09 \pm 0,35 \mu\text{M}$ knapp eine Größenordnung unter der Bindungskonstante des literaturbekannten 4er Peptids. Die Reaktionsenthalpie ΔH ist mit $-15.110 \pm 227 \text{ cal/mol}$ stark exotherm und $-\Delta S$ beträgt 8.229 cal/mol . Diese Werte sind aber auf Grund der fehlenden, beziehungsweise schwer zu bestimmenden Asymptote der Endwerte der Titrationskurve, mit einem größeren Fehler als mathematisch angegeben behaftet. Die Reaktionsenthalpie wird aus der Differenz zwischen den Asymptoten der Anfangs- und Endwerte bestimmt. Ein eventueller Fehler derer führt direkt zu einem Fehler in der Berechnung der Entropie.

Es wurde eine weitere Kontrolltitration mit einer Survivin-Konzentration von 0,75 mM durchgeführt. Diese ist dargestellt in der Abbildung 32 und besitzt an den Positionen 9, 10 und 12 drei sehr starke Titrationsfehler an relevanten Positionen. Die Fehler wurden für die Berechnung entfernt.

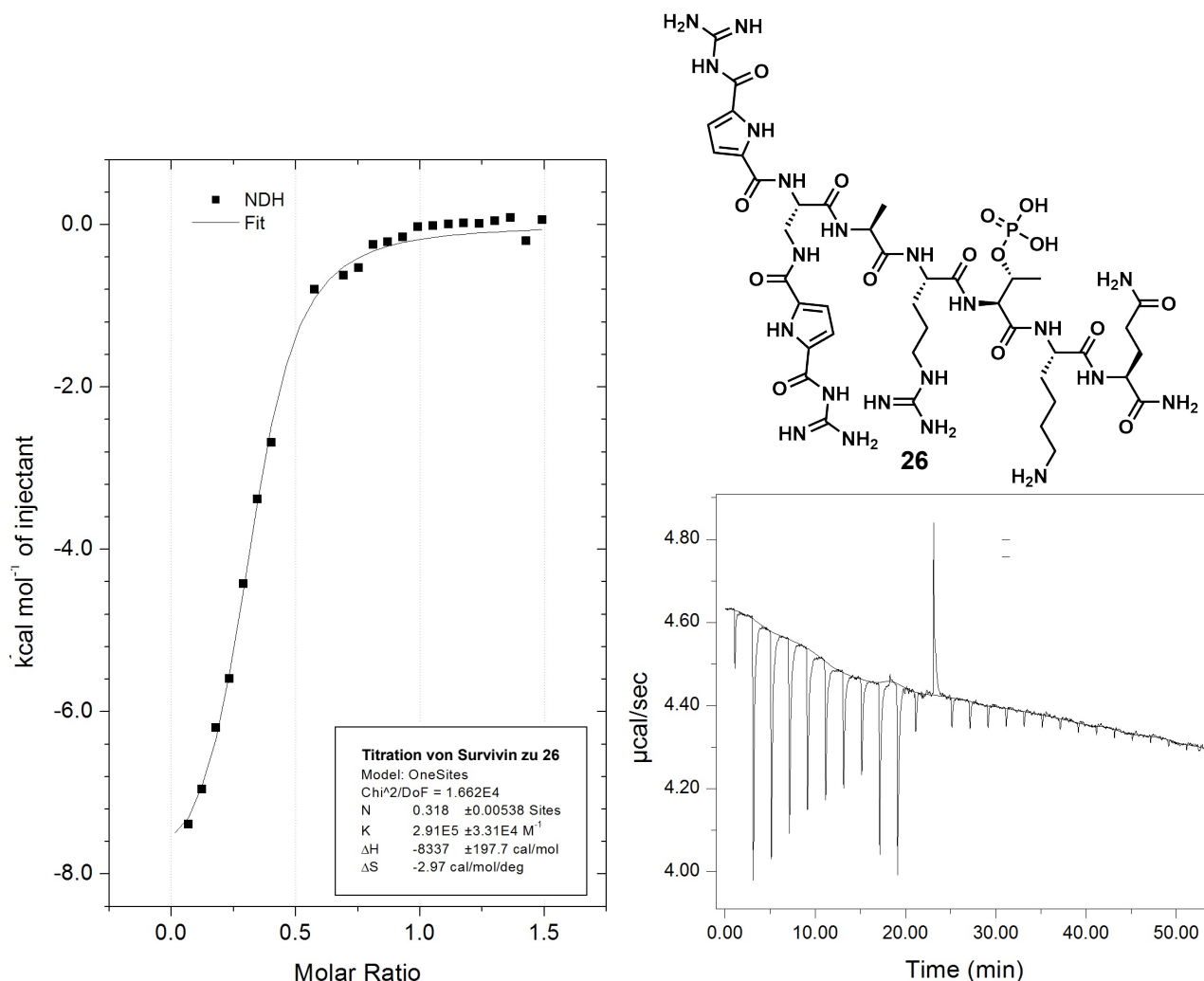


Abbildung 32: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **26** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5)). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **26**.

Die Bindungsparameter dieser Titration ähneln der der vorherigen Titration ($N = 0,318 \pm 0,005$; $K_D = 3,43 \pm 0,39 \mu\text{M}$; $\Delta H = -8.337 \pm 198 \text{ cal/mol}$; $-\Delta S = 886 \text{ cal/mol}$). Durch die Entfernung der fehlerhaften Messpunkte wird die Krümmung der Kurve undefiniert. Dies führt zum Einen direkt zu einem Fehler in der Dissoziationskonstante als auch zu einer höheren Ungenauigkeit der Position des Wendepunkts. Ersteres beeinträchtigt ebenfalls die Berechnung der Entropie. Diese beträgt ein Zehntel des vorherigen Wertes. Ursache dafür ist wahrscheinlich

die bereits diskutierte fehlende Asymptote der ersten Titration und der Fehler in der Bindungskonstante dieser Titration. Die Stöchiometrie ist ebenfalls mit ungefähr 0,32 geringer als erwartet, was auf den bereits erwähnten Fehler in der Verdünnungsreihe schließen lässt. Dieser wird in bei der ITC von **27** weiter diskutiert.

Im Anschluss an die ITC wurde eine NMR-Titration von **26** von Christine Beuck an N15 angereicherten Survivin durchgeführt. (Abbildung 33)

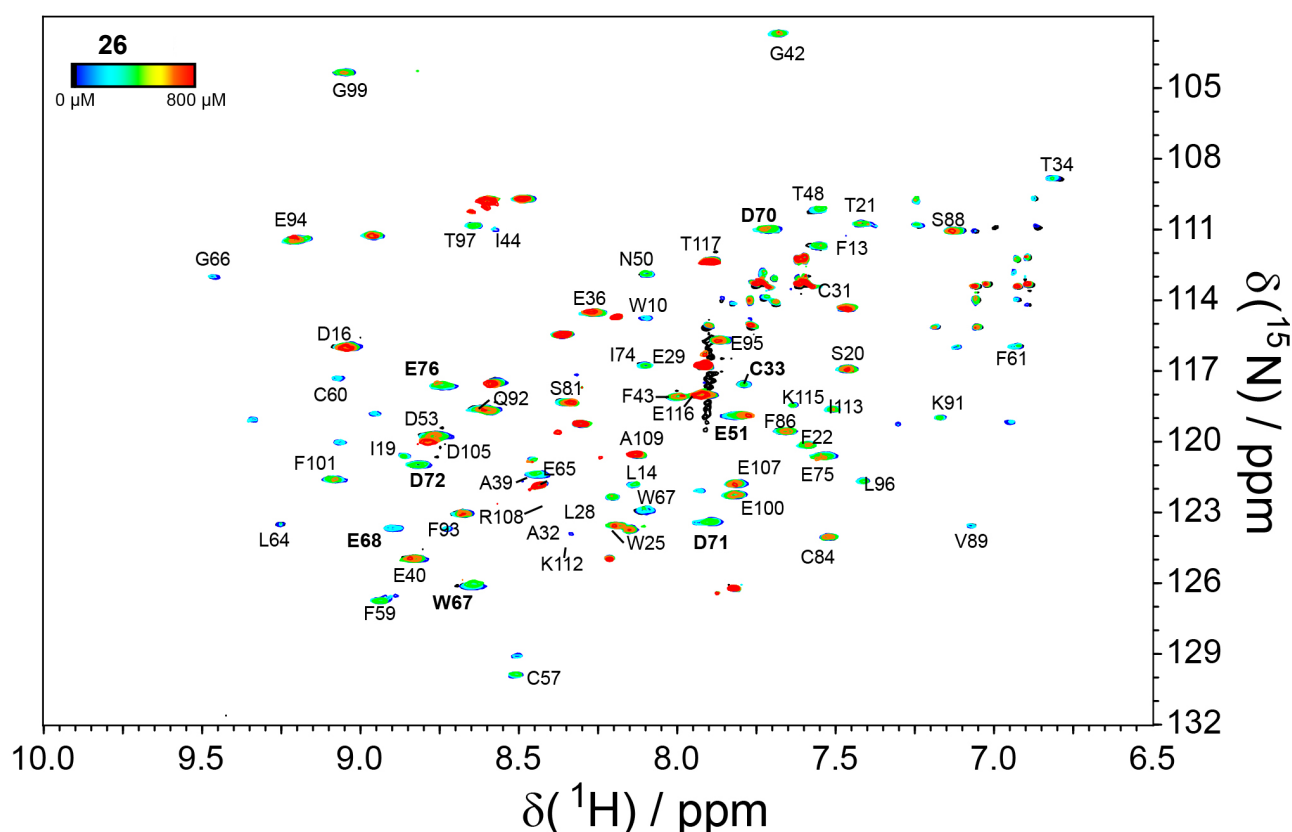


Abbildung 33: ^1H - ^{15}N Korrealionsspektrum der NMR-Titration von 15 mM **26** zu 794 μM ^{15}N -markierten Survivin-120. Kleine Volumina der Stammlösung von **26** wurde zum Survivin gegeben bis zur Äquimolarität. Messung durchgeführt von Christine Beuck.

Die Zugabe eines Liganden zu Survivin kann die Signale des Survivins auf zwei verschiedene Weisen beeinflussen. Die Signale können einerseits an relativer Intensität verlieren (Abbildung 34), andererseits kann sich ihre chemische Verschiebung verändern. (Abbildung 35) Die relative Intensität der Survivin-Signale nahm bereits bei geringen Mengen von **26** ab. Bei einer Konzentration von 200 μM von **26** sank zum Beispiel die Intensität vom Signal des Tryptophans W67 bereits auf

unter 50% seines ursprünglichen Wertes. Die Seitenkette dieser Aminosäure ist Teil der hydrophoben Bindungstasche des Alanins der Histon H3 Bindungssequenz. Ebenso erfährt auch die Glutaminsäure E76, die ebenfalls ein Teil dieser Tasche ist, eine Abschwächung der Signalintensität.

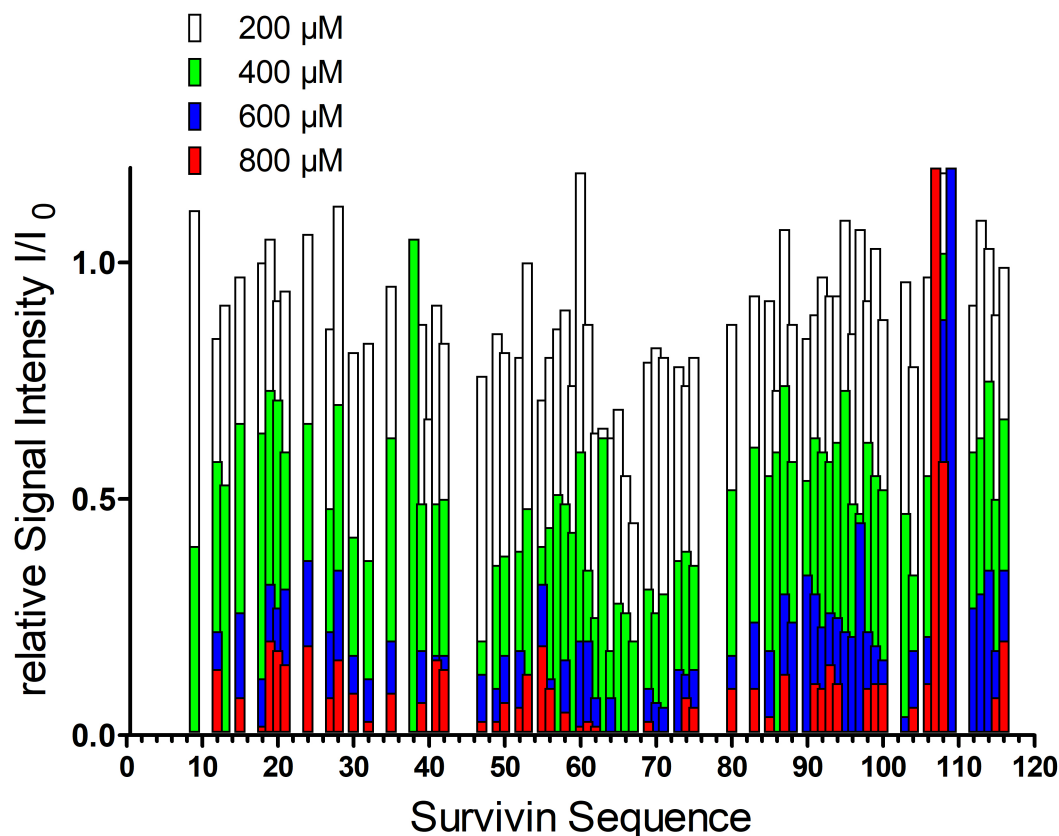


Abbildung 34: Relative Intensitäten der Survivin-Signale getrennt nach den korrespondierenden Aminosäuren und in Abhängigkeit der Zugabe des Liganden **26**. Abbildung erstellt von Christine Beuck.

Insbesondere die Signale der Aminosäuren zwischen Position 58 bis 68 wurden durch die Titration stark beeinflusst. Diese Aminosäuren sind Bestandteile der BIR-Domäne von Survivin, ein Indiz dafür, dass **26** an dieser Domäne bindet. Auf Grund der selektiven Natur der Bindungssequenz, welche die Grundlage dieses Liganden bildet, kann davon ausgegangen werden, dass diese Verbindung regioselektiv an Survivin bindet.

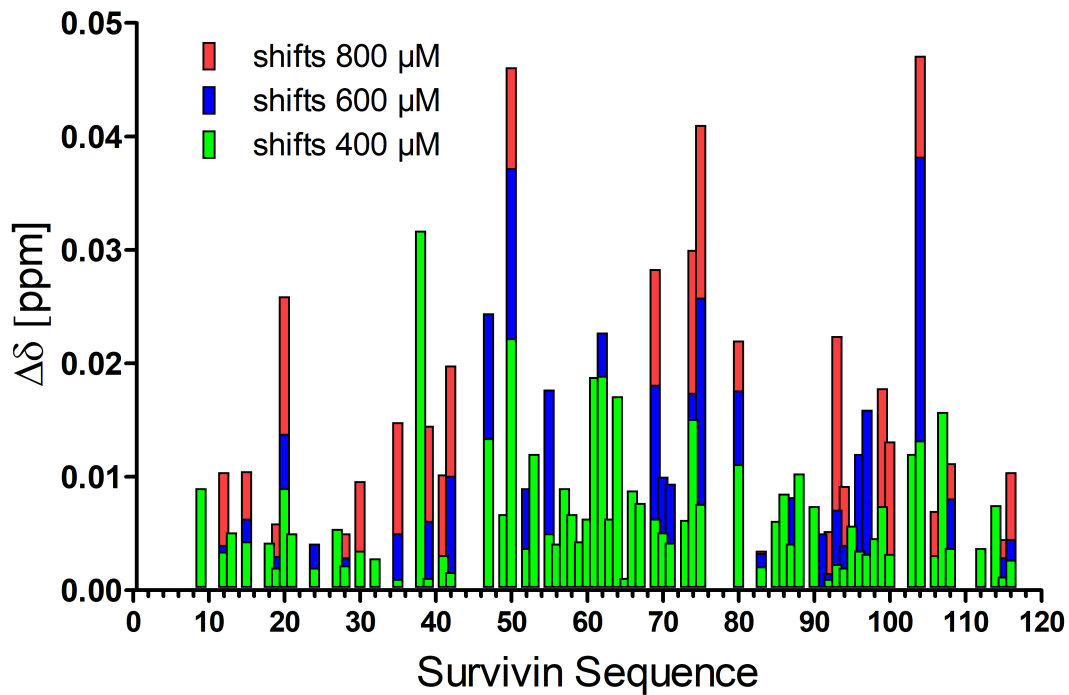


Abbildung 35: Verschiebung der chemischen Verschiebung der Survivin-Signale durch die Titration von **26**. Signale die keine Angaben für höhere Konzentrationen von **26** haben, hatten entweder eine sehr geringe Intensität oder konnten anderweitig nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. Abbildung erstellt von Christine Beuck.

Zusätzlich sind viele Asparaginsäuren und Glutaminsäuren (E68, D70, D71, D72, E75 und E76) jenseits der Position des N-Terminus' der Histon H3 Sequenz betroffen. An dieser Stelle befinden sich die beiden GCP-Einheiten von **26**, was ein Beleg dafür ist, dass auch diese zur Bindung an Survivin einen Beitrag leisten. (Abbildung 36)

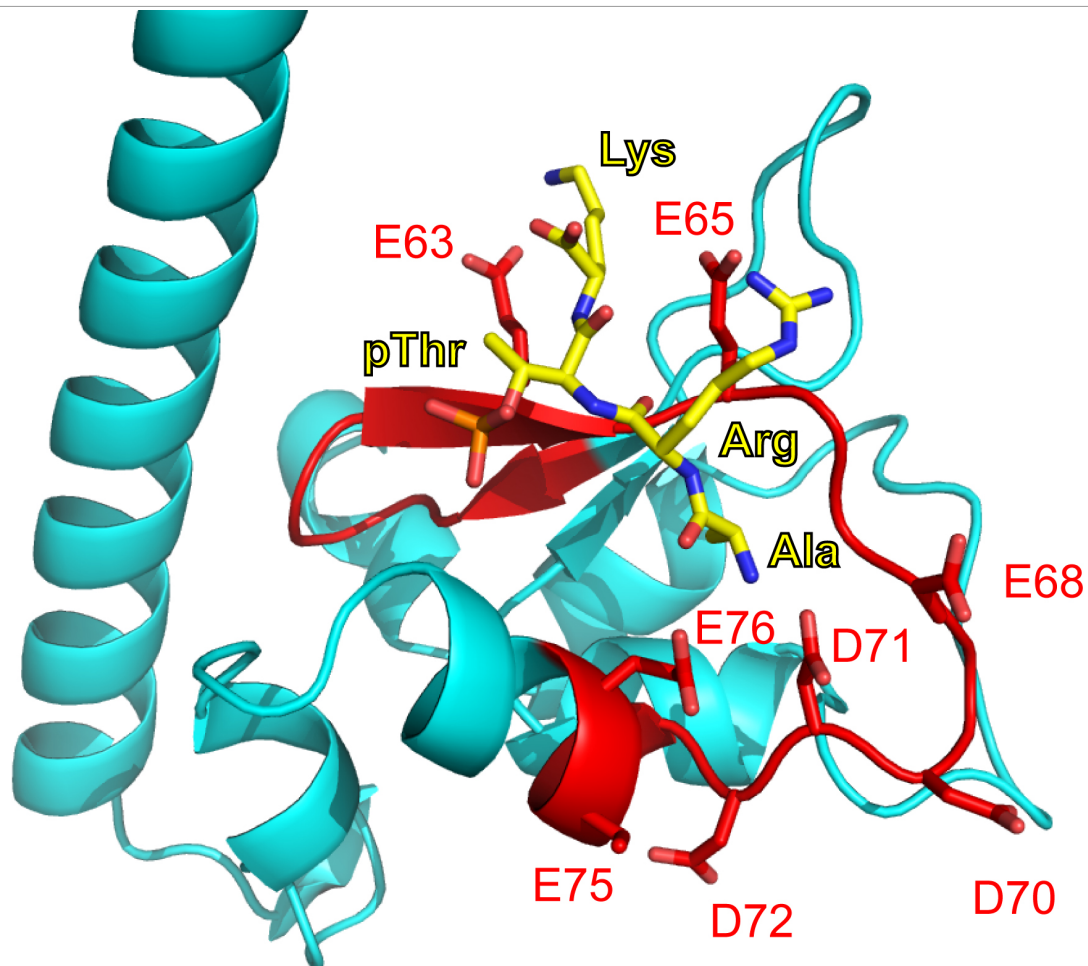


Abbildung 36: Visualisierte Darstellung der an der Bindung zu **26** beteiligten Aminosäuren. In türkis und rot: Kristallstruktur von Survivin. In rot : Aminosäuren von Survivin, die einen Effekt während der Titration mit **26** zeigten. In Gelb: Histon-H3 N-Terminus, basierend auf der Kristallstruktur^[72]. Abbildung gefertigt von Christine Beuck.

Obwohl die Verbindung **26** an der BIR-Domäne bindet, scheint die Stöchiometrie nicht 1:1 sondern eher 1:2 zu sein. Dies ist ein Indiz für eine negative Kooperativität für die Bindung eines zweiten Liganden. Dementsprechend müssen die beiden BIR-Domänen als nicht identisch betrachtet werden. Jedoch deutet der sigmoidaler Kurvenverlauf der ITC darauf hin, dass die Bindungskonstante für die Bindung eines zweiten Äquivalents des Liganden deutlich schwächer, als die des ersten Äquivalents ist. Dieser Effekt wurde bei den literaturbekannten 4er und 12er Peptiden nicht beobachtet. Deren Stöchiometrie liegt zwischen 1,05 bis 1,35^[72]. Im biologischen Kontext bedeutet dies, dass die Bindung eines Liganden die Struktur des Proteins so ändern würde, dass die Bindung des zweiten Liganden erschwert wird. Da die Histon H3 nicht am Survivin-Dimer, sondern an dem einzelnen Survivin als Teil des CPC bindet, sollte diese geringere Stöchiometrie keiner potentiellen

Wirkung des Liganden **26** auf die Protein-Protein-Interaktion des CPCs mit Histone H3 im Wege stehen. Deshalb wurde diese Bindungsstelle für alle Titrations dieser Arbeit ignoriert.

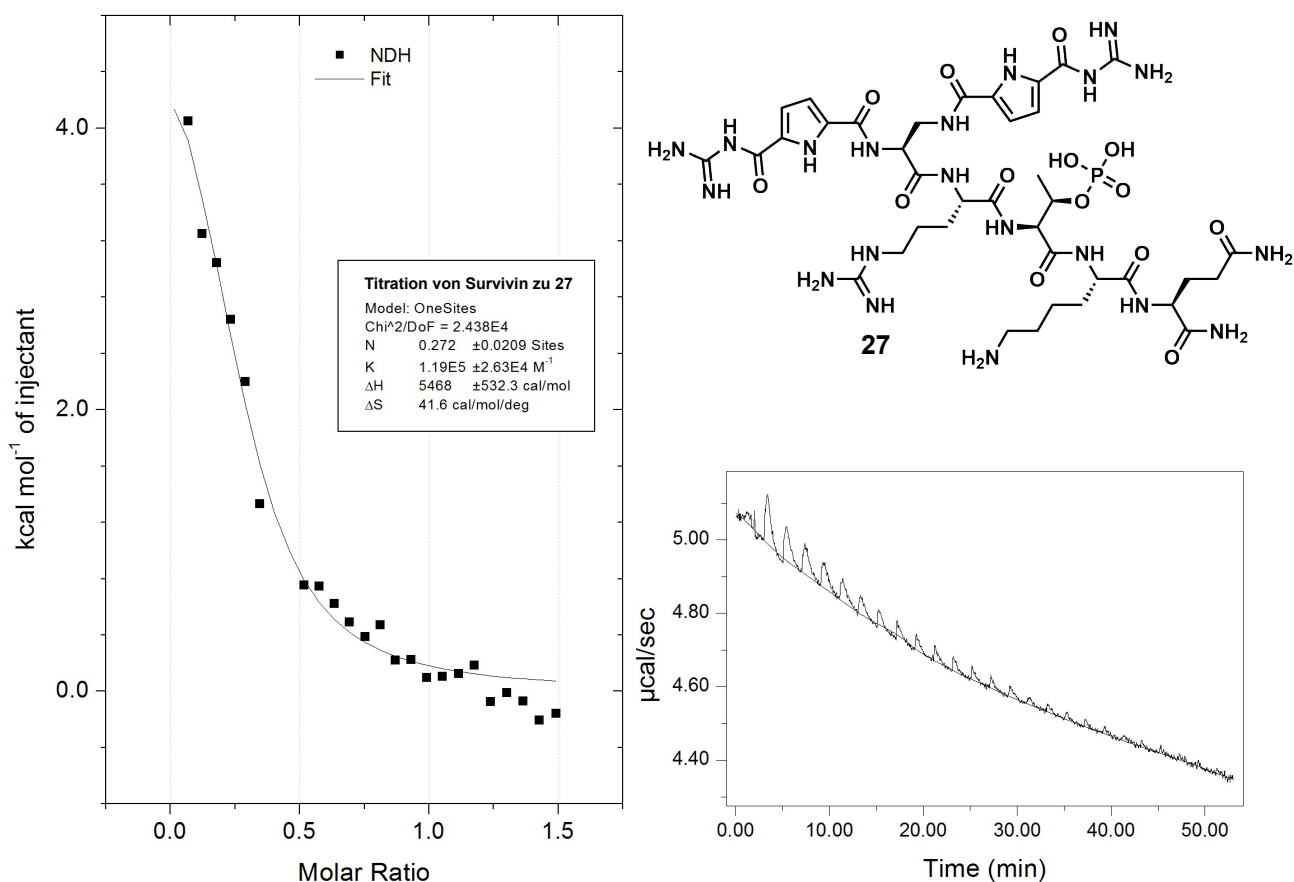


Abbildung 37: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **27** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **27**.

Die ITC Titration von **27** weist zwei deutliche Unterschiede zu den vorherigen ITCs auf. Zum Einen ist die Reaktion zwischen **27** schwach endotherm, und zum anderen sind die Signale deutlich breiter. Die endotherme Reaktion ist dahingehend problematisch, da diese deutlich schwächer als die Krümmung der Basislinie ist und diese Wärmetönung (neben der Zeit) der einzige direkte Messwert der ITC-Messung ist. Diese geringe Wärmetönung sorgt unter anderen dafür, dass die letzten Signale in der Roh-ITC kaum von der Basislinie zu unterscheiden sind. Dieser Umstand führt mit den breiteren Signalen zu einer höheren Ungenauigkeit der Ergebnisse. Um das Problem der geringen Signalintensität zu umgehen, müssten sowohl die Konzentration des Survivins, als auch die von **27** um den selben Faktor erhöht werden. Dies ist jedoch im Falle des Survivins nicht möglich, da sich dessen

Konzentration mit 0,75 mM bereits sehr nah an der Konzentration der Stammlösungen (ungefähr 1 mM) befindet. Eine Umkehrtitration mit höheren Konzentrationen wäre zwar denkbar, wurde aber wegen der später in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse der Verbindung **29** nicht durchgeführt.

Dementsprechend sollten die Reaktionsparameter ($N = 0,272 \pm 0,02$; $K_D = 8,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$; $\Delta H = 5.458 \pm 532 \text{ cal/mol}$; $-T\Delta S = -12.403 \text{ cal/mol}$) trotz ähnlicher Dissoziationskonstante wie **26** kritisch betrachtet werden. Durch die geringe Wärmetönung und der breiten Signale werden die Werte für die Dissoziationskonstante, der Enthalpie und somit auch der Entropie deutlich fehleranfälliger. Die Stöchiometrie ist davon im geringeren Umfang betroffen und liegt ebenfalls in der selben Größenordnung wie die von **26**. Dies lässt darauf schließen, dass es eine Ungenauigkeit bei der Konzentration des verwendeten Survivins gab. Um eine Verschiebung zu geringeren Stöchiometrien zu bewirken, müsste mehr Survivin in der Spritzenlösung vorhanden gewesen sein als angegeben. Dies lässt zum Beispiel auf einen Rechenfehler beim Ansetzen der Verdünnungsreihe schließen. Bei der NMR-Titrationen von **27** zu Survivin (Abbildung 38) war dessen Einfluss auf das Protein trotz ähnlicher Dissoziationskonstante deutlich geringer als der von **26**, was die Fehleranfälligkeit der ITC ebenfalls untermauert.

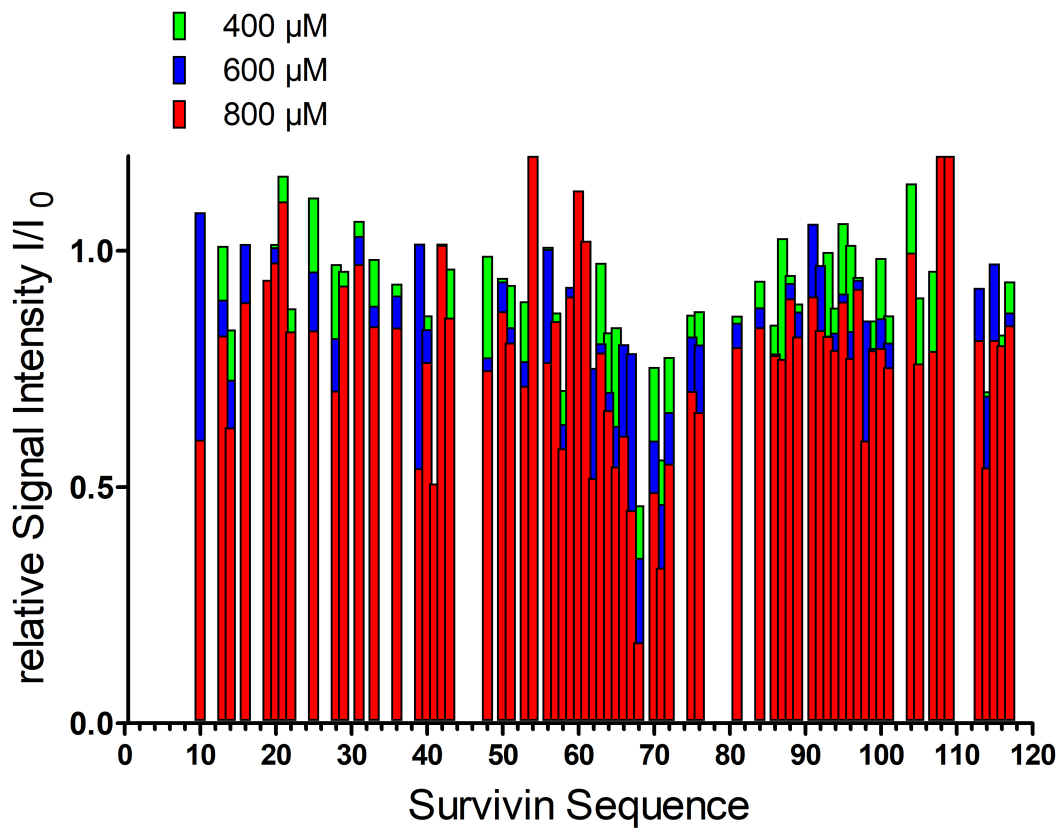


Abbildung 39: Relative Intensitäten der Survivin-Signale getrennt nach den korrespondierenden Aminosäuren und in Abhängigkeit der Zugabe des Liganden **27**. Abbildung erstellt von Christine Beuck.

Trotz des geringeren Effekts von **27** auf Survivin sind hier ebenfalls hauptsächlich die Aminosäuren der BIR-Domäne Survivins von der Zugabe des Liganden betroffen. (Abbildung 39) Deshalb kann auch hier davon ausgegangen werden, dass dieser Ligand an dieser Position an Survivin bindet.

Im Anschluss daran wurde eine ITC mit der Verbindung **28** durchgeführt, die in Abbildung 40 dargestellt ist.

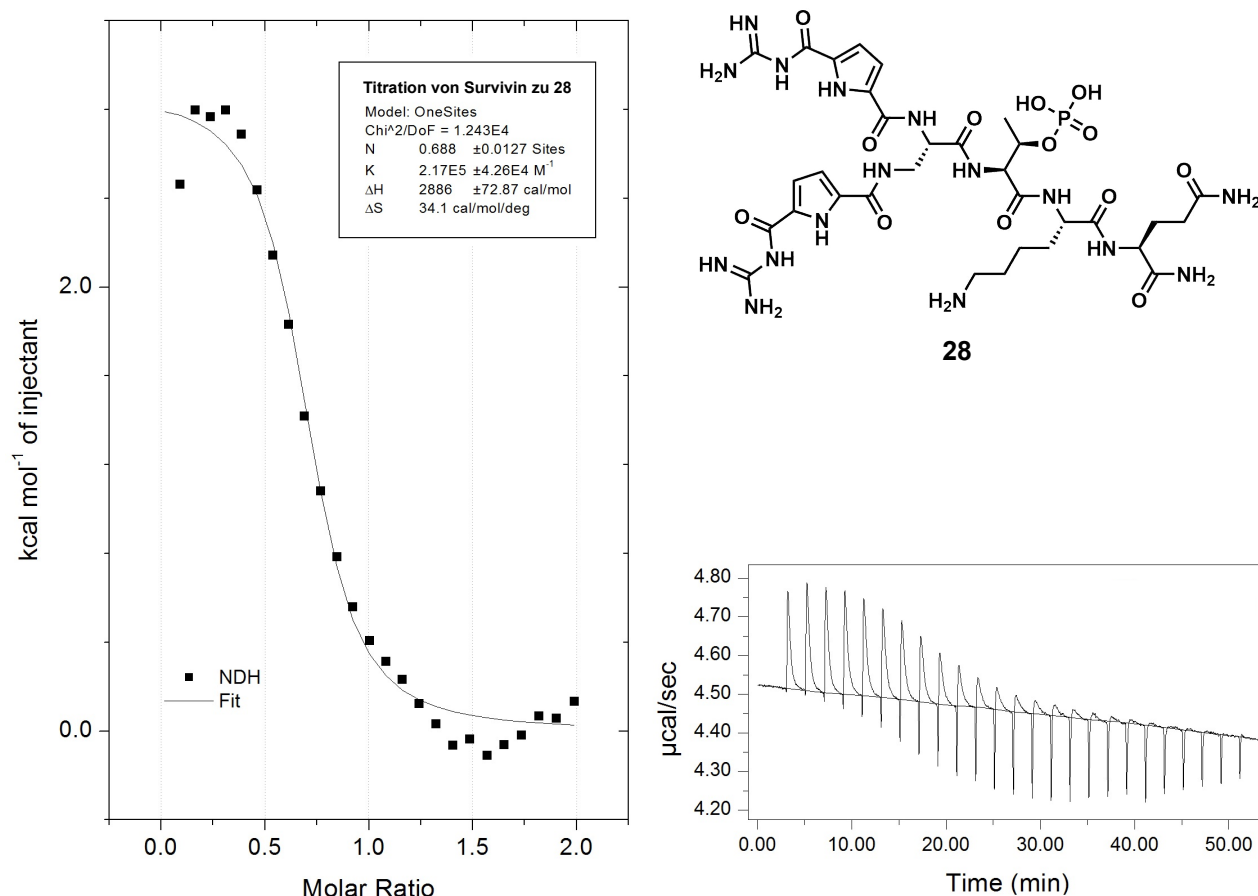
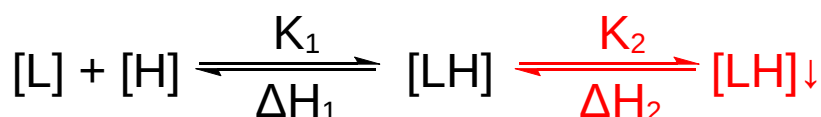


Abbildung 40: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **28** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **28**.

Die ITC von **28** unterscheidet sich gravierend von den anderer Verbindungen, da die Titration zwar zunächst endotherm beginnt, aber anschließend zunehmend exotherm wird. Für alle anderen restlichen Titrations wurde der Mittelwert der Blindmessungen von allen Werten der Messung abgezogen. Dadurch konnten einzelne Fehler in der Blindmessung ignoriert werden, ohne zeitgleich den korrelierenden Wert in der Titration entfernen zu müssen. Für den Fit der Verbindung **28** wurde hingegen der Mittelwert der letzten 5 Injektionen von den restlichen Werten abgezogen. Dies war in diesem Fall die einzige Möglichkeit, eine Kurve zu erhalten, die sich mit dem Bindungsmodell in Einklang bringen ließ. Zwar beinhaltet dieser Mittelwert die benötigten Verdünnungsenthalpien, die ansonsten über die Blindmessungen erhalten werden, jedoch muss zunächst eine Erklärung gefunden

werden, warum während dieser Titration scheinbar eine Änderung einer Reaktionskonstanten auftrat. Während der NMR Titration mit **28** zu Survivin wurde beobachtet, dass sich ab einem Konzentrationsverhältnis von ungefähr 1:1 ein unlöslicher Niederschlag bildete. Da sich nach der Filtration die Intensität aller Survivin-Signale verringerte, muss davon ausgegangen werden, dass **28** diesen Niederschlag mit Survivin bildet. Dieser Komplex wird sich auch während der ITC mit Survivin bilden, was dazu führen würde, dass zwar zunächst die Reaktionsisotherme gemessen, jedoch im experimentellen Verlauf ebenfalls die Dissolvatationsenthalpie des erwähnten Komplexes unweigerlich mitgemessen wurde. Dieser Effekt könnte zwar durch geringere Gesamtkonzentrationen von Ligand und Survivin reduziert werden, jedoch würde dadurch die gemessene absolute Wärmetönung weiter reduziert werden. Diese Wärmetönung ist bereits relativ gering; folglich würde die Zuverlässigkeit der zu bestimmenden Parametern darunter leiden. Selbst eine inverse Titration würde dieses Problem nicht lösen, da während der NMR-Titration in dieser Reihenfolge titriert, und dort dieses Phänomen entdeckt wurde.

Dementsprechend muss die Legitimität der Ergebnisse der ITC Messung von **28** wegen des vorher diskutierten Niederschlages stark angezweifelt werden.



Schema 6: Gleichgewichtsreaktion einer beispielhaften Komplexbildungsreaktion mit dem Liganden L und dem Gast H zu einem 1:1 komplex (in schwarz) mit anschließender Bildung eines unlöslichen Komplex (in rot). Mit K als Geschwindigkeitkonstante und ΔH als Reaktionsenthalpie der jeweiligen Reaktionsschritte.

Dieser Sachverhalt kann mit dem Schema 6 weiter erläutert werden: Wie bereits diskutiert können zum Beispiel mit Hilfe der ITC die Stöchiometrie, der Geschwindigkeitkonstante K und die Reaktionsenthalpie ΔH von einer Komplexbildungsreaktion bestimmt werden. In diesem Fall wird die bestimmte Geschwindigkeitskonstante Assoziationskonstante genannt. Dies bleibt solange eindeutig solange der Komplex [LH] während der gesamten Messung stabil bleibt. Sollte aber der Komplex während der Titration wie bei der Verbindung **28** beispielsweise ausfallen, wird nicht mehr nur die Assoziationskonstante K_1 sondern das Produkt von K_1 mit der Geschwindigkeitkonstante K_2 der Dissolvatisierung

gemessen. Analog dazu wird dazu wird ebenfalls die Summe der Enthalpien statt der Einzelenthalpien ΔH_1 und ΔH_2 gemessen.

Die gemessene Dissoziationskonstante der Verbindung **28** von $4,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ passt dementsprechend zwar in die Größenordnung der bisher bestimmten Liganden **26** und **27**, jedoch handelt es sich dabei um das Produkt von zwei nicht bekannten und identifizierbaren Faktoren, von denen nur eine die gesuchte Dissoziationskonstante ist. Diese lässt sich somit nicht exakt bestimmen.

Interessanterweise konnte in der NMR-Titration (Abbildung 41) bewiesen werden, dass die Regioselektivität von **28** (Abbildung 42) trotz der verkürzten Peptidsequenz immer noch intakt zu sein scheint.

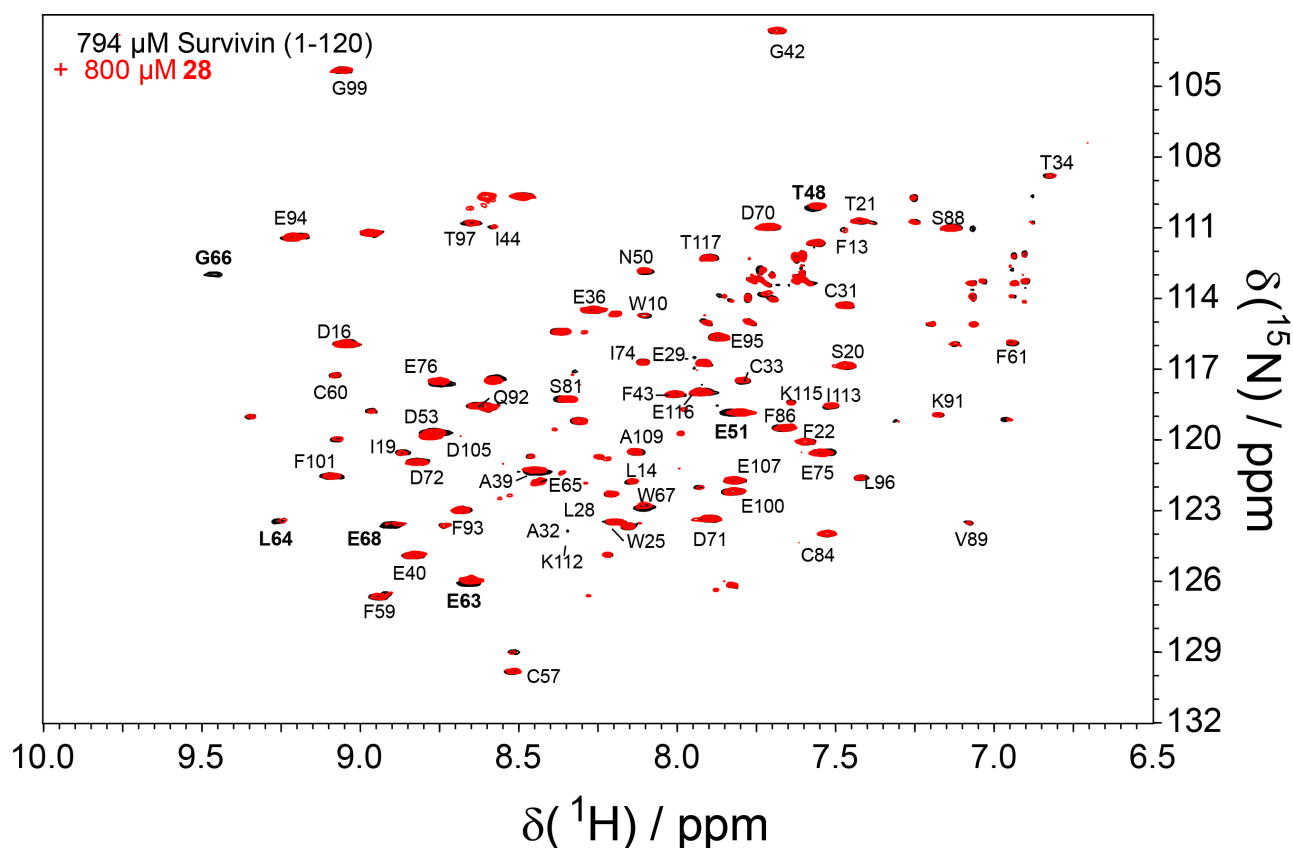


Abbildung 41: ^1H - ^{15}N Korrelationspektrum der NMR-Titration von 15 mM **28** zu 794 μM ^{15}N -markierten Survivin-120. Kleine Volumina der Stammlösung von **28** wurde zum Survivin gegeben bis zur Äquimolarität. Messung durchgeführt von Christine Beuck.

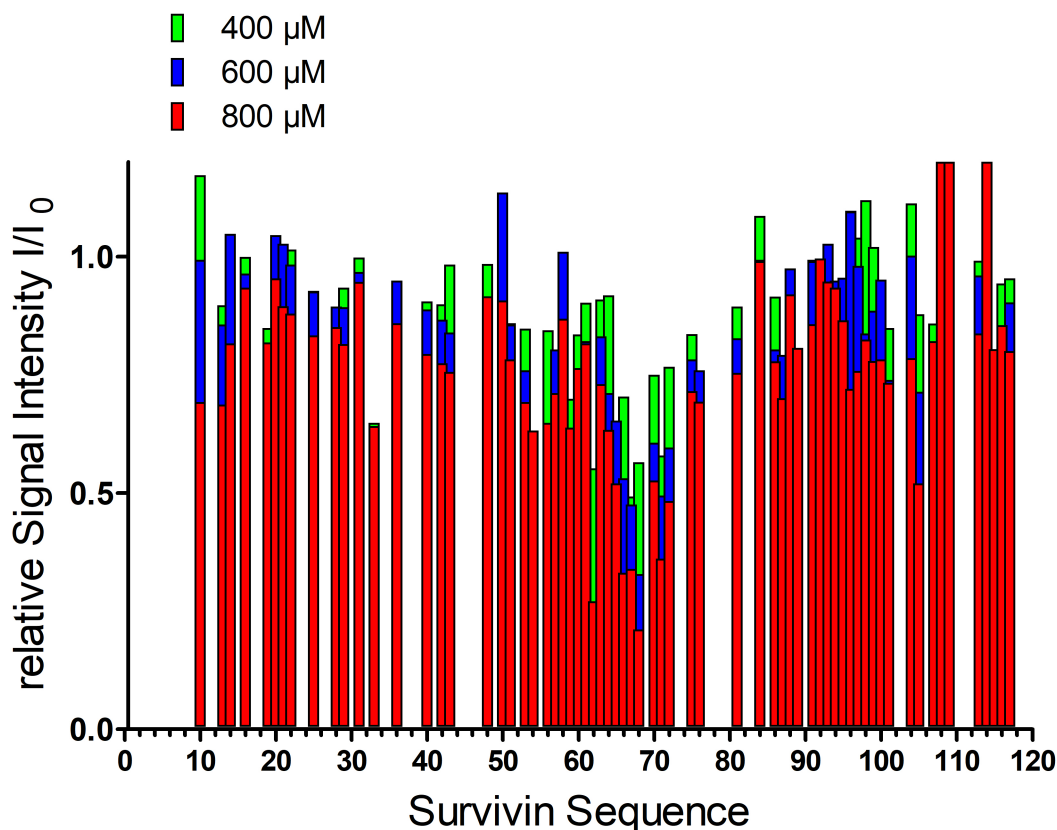


Abbildung 42: Relative Intensitäten der Survivin-Signale getrennt nach den korrespondierenden Aminosäuren und in Abhängigkeit der Zugabe des Liganden **28**. Abbildung erstellt von Christine Beuck.

In den Verbindungen **26** bis **28** wurde das erste Mal der N-Terminus einer Histone H3 Peptidsequenz mit Guanidiniumcarbonylpyrrol modifiziert. Das Resultat waren Liganden mit millimolarer Affinität zu Survivin, die um eine Größenordnung stärker als die literaturbekanntes 4er Sequenz bei pH 7,8 binden. Dieser Unterschied entspricht dem zu erwartenden Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Bindungsparameter von Verbindungen **27** und **28** schwierig bis gar nicht mittels ITC bestimmt werden konnten. Da diese Liganden jedoch auf dem Carbonsäureamid des 5er Peptids basieren, müssen zum Vergleich die Bindungsparameter der Verbindung **29** mittels ITC bestimmt werden.

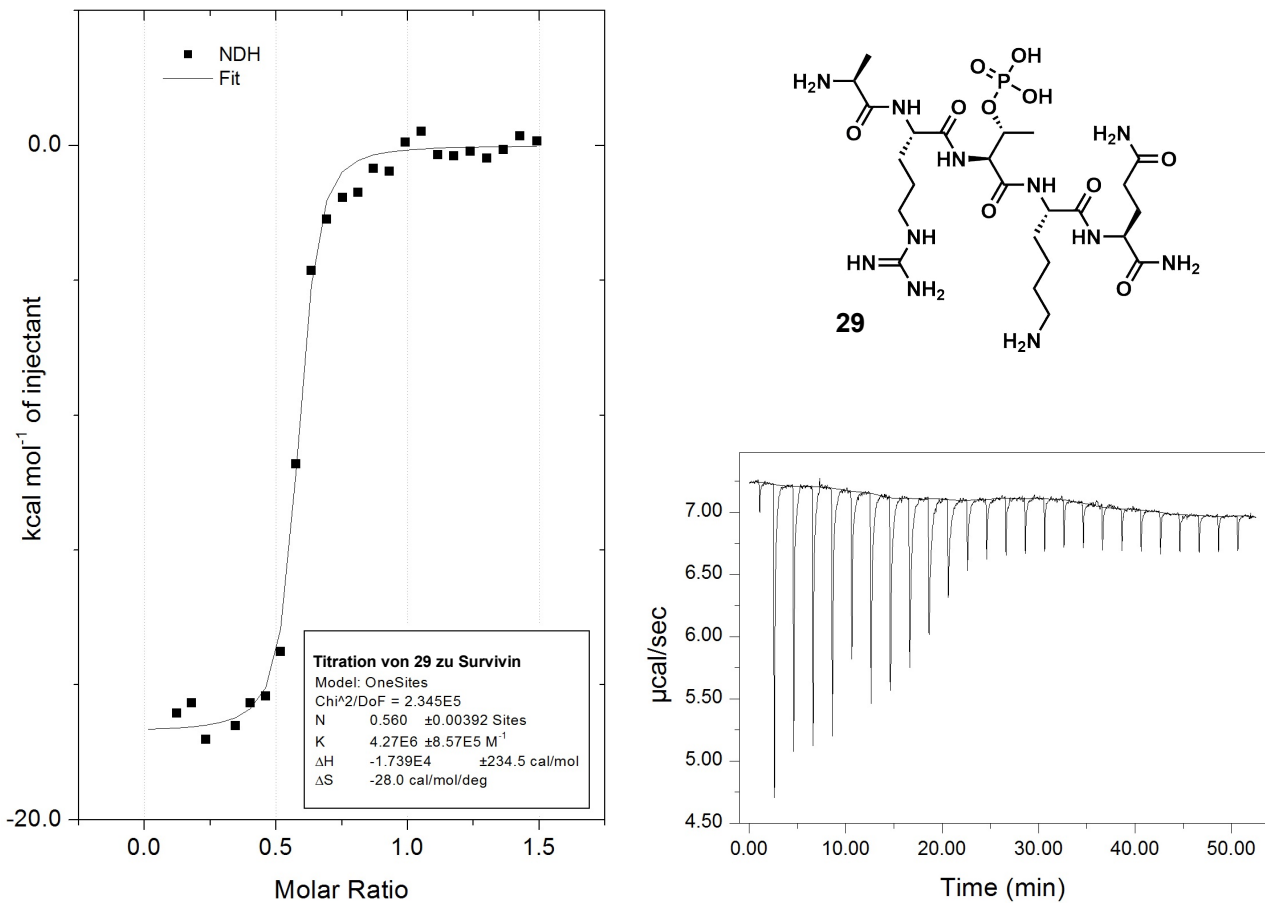


Abbildung 43: ITC von **29** (0,75 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **29**.

Bei der ersten ITC von **29** zu Survivin fallen wieder zwei fehlerhafte Injektionssignale, diesmal an Position 2 und 6 auf. Diese Signale liegen nicht in der Nähe des Wendepunktes, weshalb ein Einfluss auf die Bindungskonstante und die Stöchiometrie gering ausfällt. Sie werden lediglich einen leichten Einfluss auf die gemessene Bindungsenthalpie bewirken.

Die Dissoziationskonstante von **29** liegt mit $234,2 \pm 47,0$ nM eine Größenordnung unter sowohl allen literaturbekannten Peptiden, als auch unter allen bisher in dieser Arbeit beschriebenen Peptiden. Die Stöchiometrie spricht mit einem Wert von $0,560 \pm 0,004$ ebenfalls für einen 1:2 Komplex zwischen dem Liganden und Survivin. Die Reaktionsenthalpie ist mit -17.390 ± 235 cal/mol stark exotherm. $-\Delta S$ beträgt

8.348 cal/mol. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden weitere Titrations mit **29** und Survivin durchgeführt, welche beispielhaft an einer inversen Titration erläutert werden.

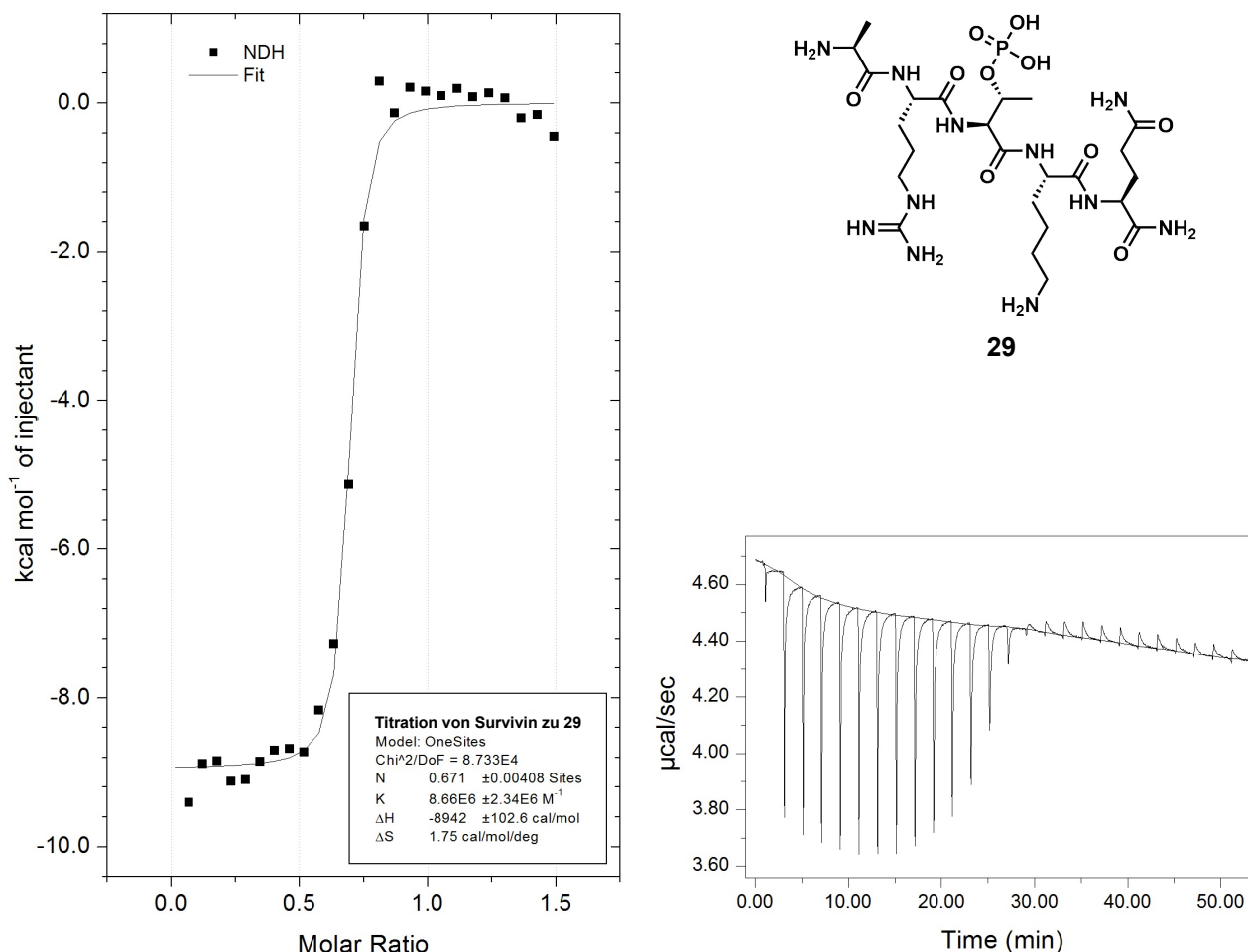


Abbildung 44: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **29** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), $MgCl_2$ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **29**.

Bei dieser Titration (Abbildung 44) wurden diesmal eine 0,1 mM Lösung von **29** vorgelegt zu der eine Lösung von Survivin mit einer Konzentration von 0,75 mM titriert wurde. Diese Titration weist eine gekrümmte Baseline auf, die jedoch kaum ins Gewicht fällt. Weiterhin gibt es kleine Schwankung in den Anfangs- und Endasymptoten. Dieser Fehler wird im Mittel bei der Enthalpie ausgeglichen. Sowohl die Stöchiometrie mit $0,671 \pm 0,004$, als auch die Dissoziationskonstante mit 115 ± 31 nM entsprechen den Werten der vorherigen Titration. Während die Reaktionsenthalpie mit -8.042 ± 103 cal/mol zwar ebenfalls exotherm, aber nur halb so groß zu der vorherigen Titration ist, weicht $-T\Delta S$ mit -522 cal/mol auch mit dem Vorzeichen von der vorherigen Titration ab. Für eine weitergehende Diskussion

werden die Ergebnisse aller Titrations der Verbindung **29** zu Rate geführt, die in der Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1: Zusammenfassung der mittels ITC bestimmten Reaktionsparameter der einzelnen Titrations für die Verbindung **29**. Die grau hinterlegten Titrations wurden in diesem Kapitel diskutiert. Die restlichen Titrationsdaten befinden sich im Anhang (Abbildung 77 und 78).

Titration	N	K_D (nM)	ΔH (cal/mol)	-TΔS (cal/mol)
29 zu Survivin 1	0,560 ± 0,004	234 ± 47	- 17.390 ± 235	8.348
29 zu Survivin 2	0,433 ± 0,007	233 ± 110	- 19.640 ± 577,6	10.584
Survivin zu 29 1	0,671 ± 0,004	115 ± 31	- 8.042 ± 103	- 522
Survivin zu 29 2	0,661 ± 0,003	61 ± 18	- 12.780 ± 119	2.943

Bei den verschiedenen Titrationsdaten, lassen sich zwei Tendenzen erkennen. Zum Einen betragen die Dissoziationskonstanten der Titrations, bei denen Survivin zum Liganden titriert wird, lediglich die Hälfte bis ein Drittel als der Konstanten der umgekehrten Titrationsreihenfolge. Des Weiteren sind die ermittelten Reaktionsenthalpien dieser Titrations mit einer sehr großen Abweichung behaftet. Während die Enthalpie der Titrations von **29** zu Survivin mit - 17.000 bis - 20.000 cal/mol relativ ähnlich zueinander sind, gibt es bei den inversen Titrations zwei unterschiedliche Werte. Während der erste Wert nur rund - 8.000 cal/mol beträgt, liegt der zweite Wert mit ungefähr - 13.000 cal/mol deutlich näher an der anderen Messreihe. Um herauszufinden, welcher dieser beiden Messwerte realistischer ist, werden zunächst die Messwerte der ersten Messreihe diskutiert.

Die Reaktionsenthalpie wird durch die Differenz der Anfangs- und der Endasymptote der Titrationskurve bestimmt. Diese unterscheiden sich ebenfalls deutlich bei den verschiedenen Messreihen. Hier wird es sich um einen Effekt des Puffers handeln, der mit einer Konzentration von 2,5 mM relativ gering ist. Die Verbindung **29** besitzt 3 äquivalente TFA, was bei einer Konzentration der 0,75 mM vom **27** wahrscheinlich zu einer Modifikation des pH-Wertes führt.

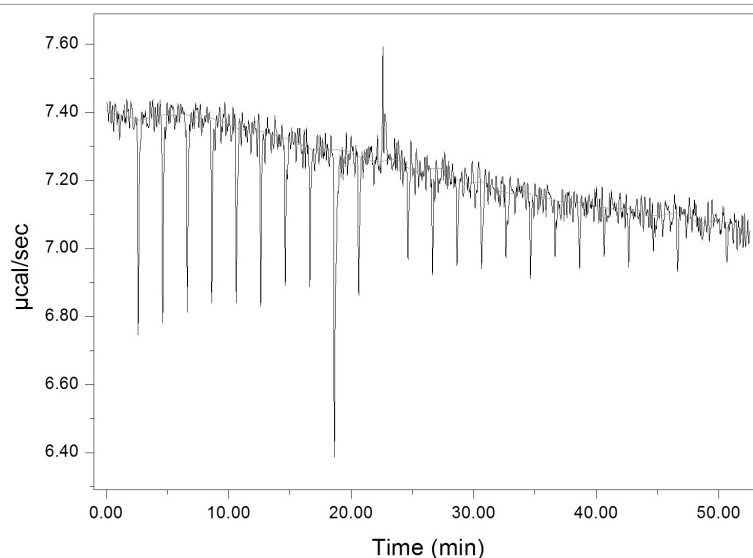


Abbildung 45: ITC von **29** (0,75 mM) zum Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl_2 (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5).

Dieser Effekt lässt sich in der Blindmessung der Verbindung **29** zum Puffer in Abbildung 45 erkennen. Von dieser Messung wurde der Mittelwert aller Werte mit Ausnahme der Positionen 9 und 11 gebildet und als Konstante abgezogen. Eine lineare Approximation dieser Messwerte wäre zwar genauer gewesen, wurde aber wegen des vergleichsweise geringen Unterschieds unterlassen. Dementsprechend wurden den ersten Werten ein zu kleiner Betrag und den letzten Werten ein zu kleiner Wert abgezogen, wodurch die Enthalpie bei diesen Titrationen etwas kleiner ist als angegeben. Dies würde ungefähr der inversen Titration mit der Enthalpie von - 13.000 cal/mol entsprechen, weshalb der Fehler bei der in Abbildung 44 gezeigten Titration zu suchen ist.

Bei den inversen Titrationen muss vielmehr nach einer Ursache gesucht werden, die die gemessene Wärmetönung bei den beiden gezeigten, eigentlich identischen Messungen weniger stark ausfallen lässt. Ein Verdünnungsfehler der Stammlösungen kann ausgeschlossen werden, da eine Lösung mit einer geringeren Konzentration als angegeben zwar eine geringere Wärmetönung erzeugen, aber auch die Stöchiometrie verfälschen würde. Letztere ist aber bei beiden Messungen nahezu identisch. Um dies wiederum mit dieser Hypothese erklären zu können, müssten die Lösungen des Liganden und des Survivins durch einen menschlichen Fehler um den selben Faktor verdünnt worden sein. Solche doppelten Fehler sind äußerst unwahrscheinlich. Viel wahrscheinlicher ist es dahingehend, dass die Referenzzelle bei der ersten Zelle nicht vollständig gefüllt war oder Luftblasen

enthielt. Im Gegensatz zur Messzelle wird die Referenzzelle nicht während der Messung gerührt, wodurch solche Fehler während der Durchführung schwer zu detektieren sind. Eine geringere Menge an Wasser sorgt dafür, dass für die Referenzzelle weniger Wärme zugeführt werden muss, um auf der konstanten Temperatur zu bleiben. Dies würde dazu führen, dass bei einer exothermen Reaktionsenthalpie, bei der Wärme aus dem Titrationsgefäß entfernt werden muss, schneller der Soll-Wert der Referenzzelle erreicht wird, wenn diese nicht vollständig mit Wasser gefüllt ist. Dementsprechend ist die Reaktionsenthalpie von der ersten Titration von Survivin zu **29** zu gering. Die Änderung der Entropie dieser Messung ist dementsprechend ebenfalls von diesem Fehler betroffen.

Um die Bindungselektivität von **29** mit denen von **26-28** vergleichen zu können wurde diese ebenfalls mittels einer NMR-Titration untersucht. (Abbildung 46)

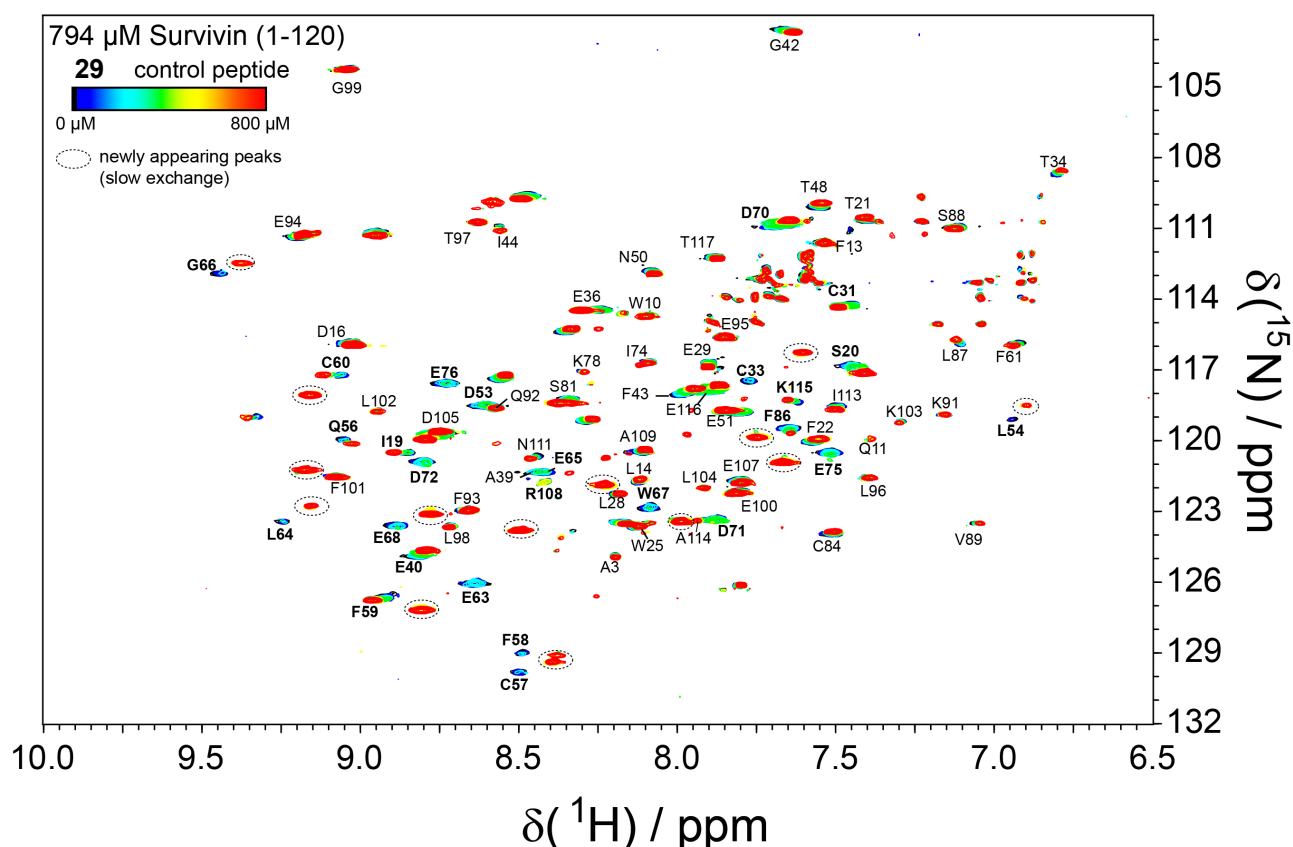


Abbildung 46: ^1H - ^{15}N Korrelationsspektrum der NMR-Titration von 15 mM **29** zu 794 μM ^{15}N -markierten Survivin-120. Kleine Volumina der Stammlösung von **29** wurde zum Survivin gegeben bis zur Äquimolarität. Messung durchgeführt von Christine Beuck.

Diese Titration unterscheidet sich jedoch dahingehend von den Titrations der anderen Verbindungen, dass sich hier einige Signales nicht in ihrer chemischen Verschiebung mit steigender Ligandenkonzentration kontinuierlich verschieben,

sondern gänzlich verschwinden und stattdessen mit einer anderen Verschiebung im Spektrum erscheinen. Dieses Phänomen führt auf den *slow exchange* zurück. In der Regel sind NMR-Messungen in der zeitlichen Größenordnung deutlich langsamer als die meisten physikochemischen Reaktionen inklusive der Komplexbildung. Dies sorgt dafür, dass es keine getrennten Signale für den Komplex und in diesem Falle dem ungebundenen Survivin gibt, sondern nur einen Mittelwert. Dieser Mittelwert sorgt für die Verschiebung der Signale in den Korrelationsspektren der Verbindungen **26** bis **28**. Ist jedoch die Reaktion entweder langsam genug oder liegt das Gleichgewicht sehr stark auf der Seite des Komplexes, können der Komplex und das freie Survivin als getrennte Signale isoliert werden. Dies macht es jedoch sehr schwierig die neu erschienenen Signale den korrespondierenden Aminosäuren zuzuordnen. Dies ist weiterhin ein Indiz für eine sehr starke Bindung der Verbindung **29** zu Survivin. Anhand der verschwundenen Signale von dem Tryptophan W97, der Asparaginsäure D71, den Glutaminsäuren E51, E65, E63 und E76 sowie dem Leucin L64 konnte jedoch festgestellt werden, dass **29** an der BIR-Domäne des Survivins bindet. (Abbildung 47)

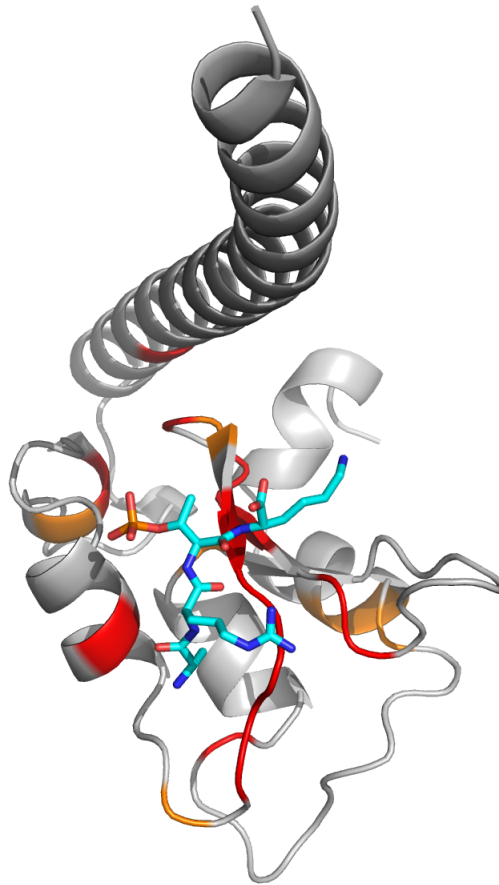


Abbildung 47: Darstellung der literaturbekannten Kristallstruktur von Survivin mit dem Histon H3 N-Terminus^[72]. In grau: Tertiärstruktur des Survivins, in Hellblau Struktur des Histon-Peptids. Aminosäuren des Survivins, dessen Signale verschwanden, sind rot eingefärbt. Aminosäuren, die einen Shift in ihrer chemischen Verschiebung aufwiesen, orange. Abbildung erstellt von Christine Beuck.

Zwar lässt sich eindeutig beweisen, dass die ersten vier Aminosäuren von **29** wie erwartet an der BIR-Domäne von Survivin binden, aber es lässt sich nicht genau bestimmen, an welcher Stelle das Glutamin mit seiner Seitenkette, das scheinbar für die starke Erhöhung der Bindungsstärke verantwortlich ist, genau bindet. Hierfür wäre eine Kristallstruktur des Komplexes von Survivin mit **29** hilfreich.

Da die Liganden **26** bis **29** allesamt stark an Survivin binden, wurden im Anschluss an die ITC-Experimente toxikologische Untersuchungen an HeLa-Zellen durchgeführt. (Abbildung 48)

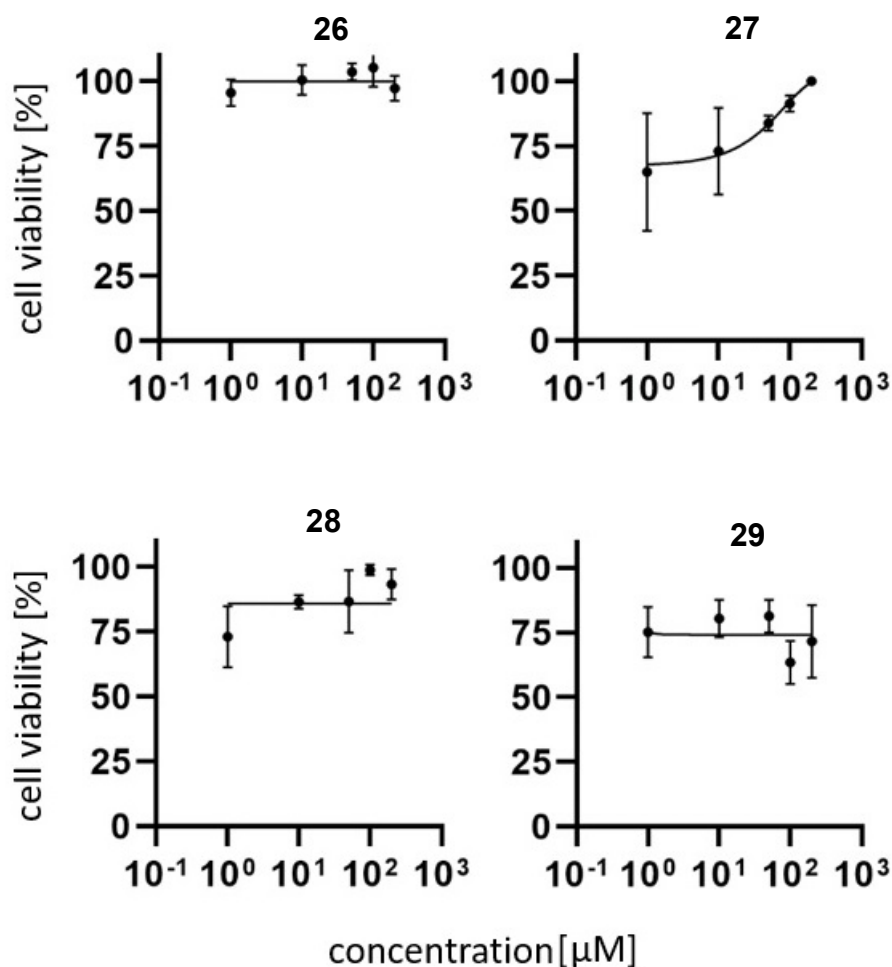


Abbildung 48: Zellviabilität von HeLA-Zellen nach der Behandlung verschiedener Konzentrationen von **26** bis **29**. Durchgeführt von Paul Stahl.

Obwohl die Verbindungen **26** bis **28** mit niedriger millimolarer und **29** sogar in nanomolarer Affinität besser und sehr wahrscheinlich auch regioselektiver an Survivin binden als die literaturbekannte Verbindung **L1**, scheint keine der Verbindungen eine konzentrationsabhängige toxikologische Wirkung zu haben. Die Verbindung **26** scheint keine Wirkung zu zeigen während die Zellviabilität von **28** konstant bei ungefähr 80% und die von **17** bei ungefähr 75% zu liegen scheint. In der Tat scheint die Verbindung **27** sogar bei höheren Konzentrationen weniger toxisch zu sein als bei geringeren Konzentrationen, wobei insbesondere die Werte für eine Konzentration von 1 und 10 μM eine sehr hohe Fehler besitzen. Da die Verbindungen *in vivo* keinen Effekt zu haben scheinen, wurde von weiteren biologischen Experimenten abgesehen.

Stattdessen warf insbesondere die Verbindung **29** weitere Fragen auf. Zum Einen wird ferner untersucht, welchen Einfluss die fünfte Aminosäure der Sequenz auf die

Bindungsstärke der Sequenz hat. Zum Anderen wurden weitere Methoden versucht, um die Sequenz mit GCP zu modifizieren.

4.3. Untersuchung des Einflusses der fünften Aminosäure der Histon Bindungssequenz

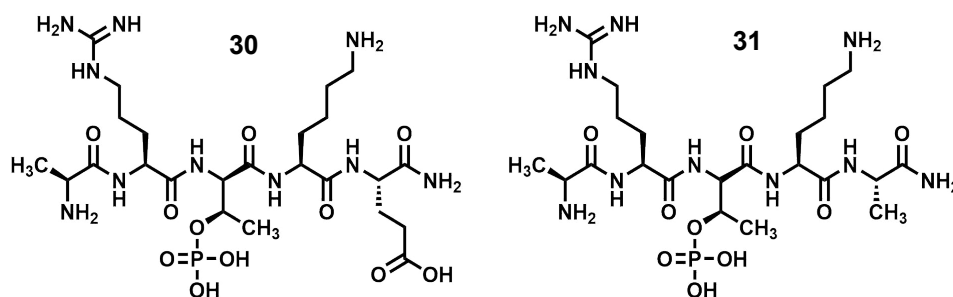


Abbildung 49: Struktur der Peptide **30** und **31**.

Um den Einfluss der fünften Aminosäure auf die Bindungsstärke des Peptids **29** zu untersuchen wurden die Peptide **30** und **31** (Strukturen in Abbildung 49) ebenfalls bei der Firma Invatis Peptides bestellt. Bei der Verbindung **30** wurde das Glutamin durch eine Glutaminsäure ausgetauscht, während die Verbindung **31** als Kontrollverbindung an dieser Stelle ein Alanin besitzt.

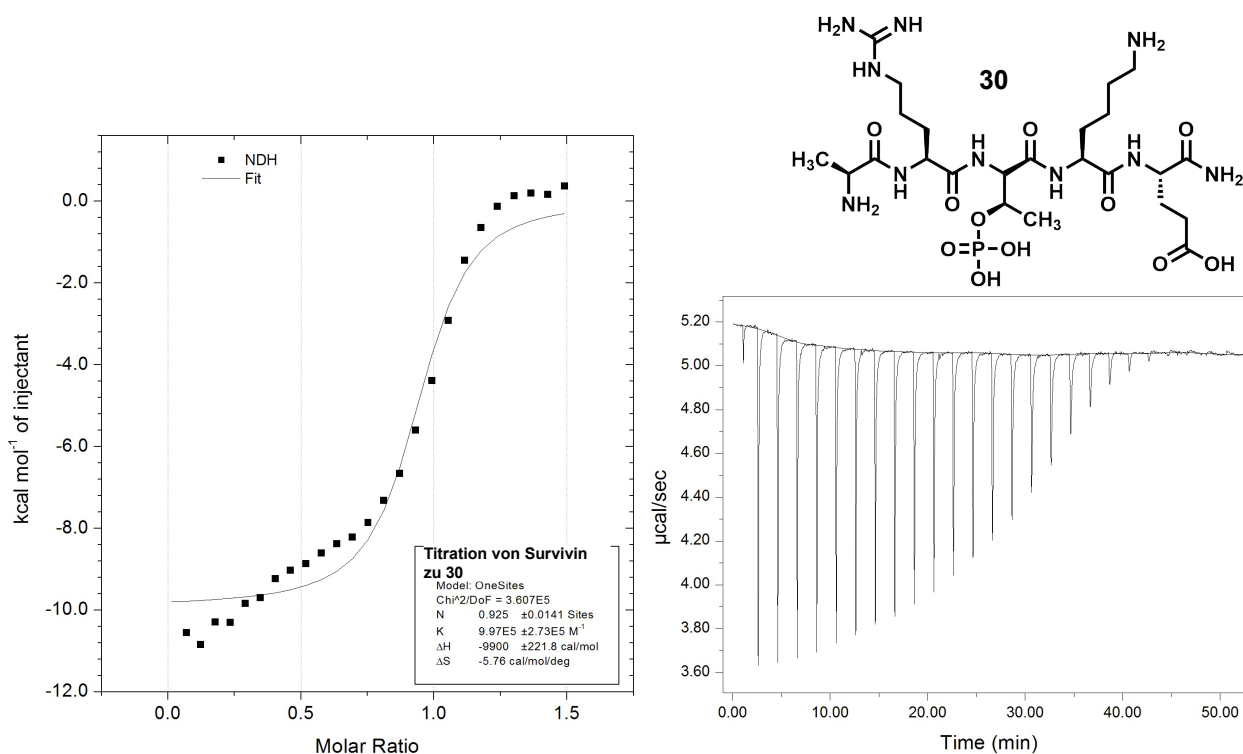


Abbildung 50: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **30** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **30**.

Während die Roh-ITC der Verbindung **30** in Abbildung 50 gut aussieht, fällt bei der Bindungsisotherme ein quasi linearer Bereich bis zum Molenbruch von ungefähr

Interessanter hingegen erscheint die ITC der Vergleichsverbindung **31** in Abbildung 51. Zwar gibt es zu Beginn der Messung direkt drei Ausreißer an den Positionen 2 bis 4, jedoch verlief der Rest der ITC bis auf das erhöhte Grundrauschen der Basislinie (ab ungefähr 30 Minuten) sehr gut. Letzteres ist wahrscheinlich auf äußere Einflüsse während der Titration zurückzuführen. Bei den beiden betroffenen Peaks handelt es sich exakt um diejenigen, die bei dem Molenbruch von ungefähr 0,8 stark vom Trend der restlichen Werte abweichen. Diese Messpunkte wirken sich kaum auf die Bestimmung der Reaktionsenthalpie und der Stöchiometrie aus. Lediglich ein Einfluss auf die Dissoziationskonstante ist zu erwarten, da sich diese Punkte am Übergang der Anfangsasympote zur Kurve befinden.

Die Stöchiometrie der Verbindung **31** liegt ebenfalls mit $N = 1,05 \pm 0,01$ bei ungefähr 1. Die Dissoziationskonstante befindet sich hingegen mit 147 ± 84 nM in der selben Größenordnung wie die Verbindung **29**. Die Enthalpie ist ebenfalls mit ungefähr -8900 cal/mol vergleichsweise schwach; auch die Entropie $-T\Delta S$ fällt mit -394 ebenfalls sehr gering aus.

Wird lediglich die Dissoziationskonstante betrachtet, scheint der Einfluss der Seitenkette des Glutamins nur gering zu sein, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die im Vergleich zu dem literaturbekannten 4er-Peptid erhöhte Bindungsaffinität im wesentlichen durch die Verlängerung des Peptidgerüsts von vier auf fünf Aminosäuren bewirkt wurde. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Seitenkette des Glutamins zu substituieren. Dabei scheinen unpolare bis ungeladene polare Seitengruppen bevorzugt zu sein, so dass zum Beispiel das Glutamin durch eine Aminosäure mit einem Azid in der Seitenkette ersetzt werden könnte. Diese würde sich z.B. für eine weitere Funktionalisierung durch eine Cu(I)-katalysierte Huisgencycloaddition eignen.

Des Weiteren ist die unterschiedliche Stöchiometrie auffällig. Während alle 5er Peptide **26** bis **29** mit Glutamin als 5. Aminosäure eine Stöchiometrie von 0,3 bis 0,5 aufweisen, liegt die Stöchiometrie der Verbindungen ohne Glutamin sowohl **22** und **23** als auch die der 5er Peptide **30** und **31** zwischen 0,9 und 1,2. Die literaturbekannten 12er und 4er Peptide binden ebenfalls mit Stöchiometrien um 1.^[72] Diese Diskrepanz lässt die Hypothese aufkommen, ob das Glutamin einen Einfluss auf die andere BIR-Domäne haben könnte und somit zu einer negativen Kooperativität führt. Jedoch sind einerseits die verschiedenen BIR-Domänen

räumlich voneinander getrennt und andererseits die Datenlage der Titrationsen relativ dünn. NMR-Titrationsen wären in diesem Falle nur unter den Umständen geeignet, falls sich die Signale der Aminosäuren in zwei eindeutig voneinander unterscheidbare Signale auftrennen würden. Dieser Effekt lässt sich bei der vorliegenden Datenlage nicht erkennen. Unabhängig davon gibt es keinen konkreten Beweis in Form von bildgebenden Verfahren für diese Hypothese.

4.4. Modifizierung des Histon fünfer Peptids mit GCP und Dap(GCP)

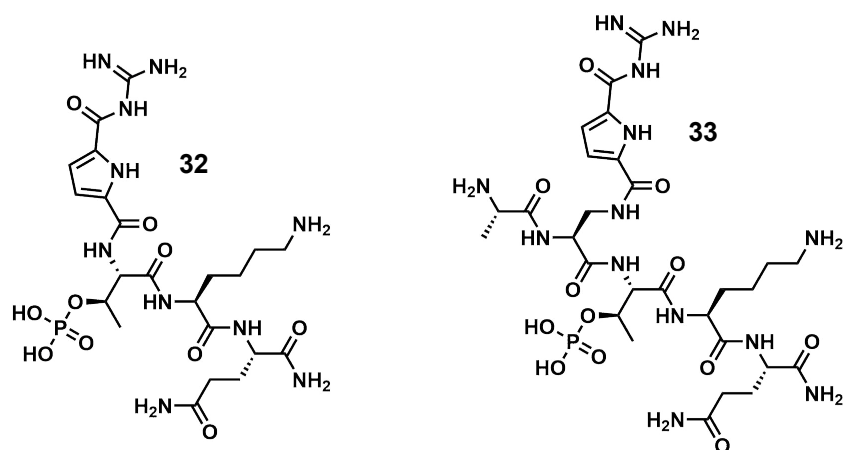


Abbildung 52: Struktur der Verbindungen **32** und **33**.

Darüber hinaus erfolgte der Versuch einer Modifikation des 5er Peptid **29** mit GCP; dies führte zu den Strukturen **32** und **33**. (Abbildung 52) Bei der Struktur von **32** wurde das Alanin und das Arginin durch GCP ersetzt, während bei **33** lediglich das Arginin durch Dap(GCP) substituiert wurde. **32** wurde analog zu den Verbindungen **26** bis **28** synthetisiert, während **33** analog zur Verbindung **23** synthetisiert wurde. Beide Verbindungen konnten mit Ausbeuten im hohen ein- bis zweistelligen Milligrammbereich isoliert werden (**32**: 8,3 mg, 12,1% Ausbeute; **33**: 12,7 mg, 14,0% Ausbeute).

Von den Verbindungen **32** und **33** wurden zunächst ITC durchgeführt, um ihre Bindungseigenschaften zu überprüfen.

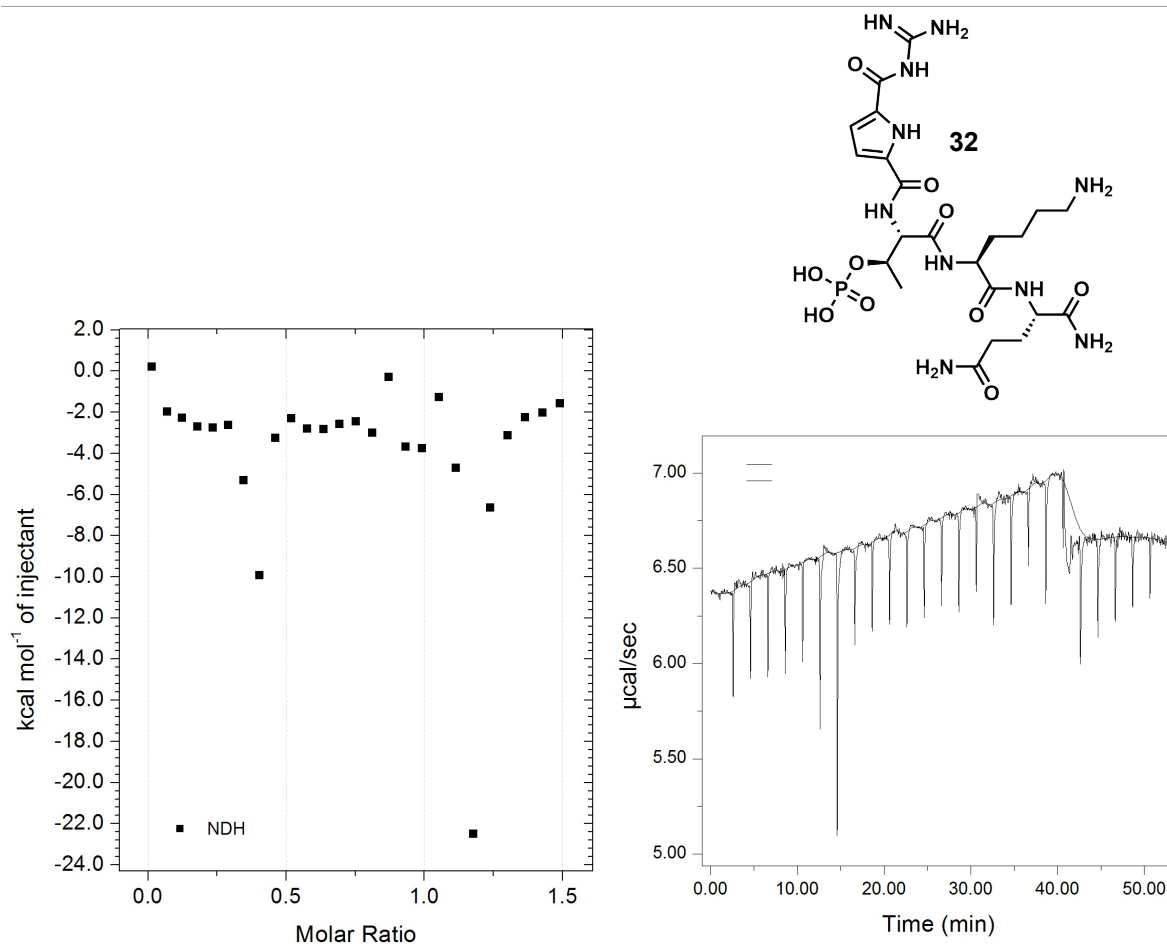


Abbildung 53: ITC von **32** (0,75 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **32**.

Die Rohtitration von **32** (Abbildung 53) lässt jedoch vermuten, dass hier keine signifikante Bindung an Survivin stattfindet, selbst wenn die Fehler in der Titration beachtet werden. Diese beinhaltet zwar zwei deutlich größere Peaks in den Positionen 6 und 7 und eine geplatze Luftblase an der Position 20, aber der Rest der Injektionspeaks haben eine konstante Wärmetönung, was gegen eine Bindung von **32** zu Survivin spricht.

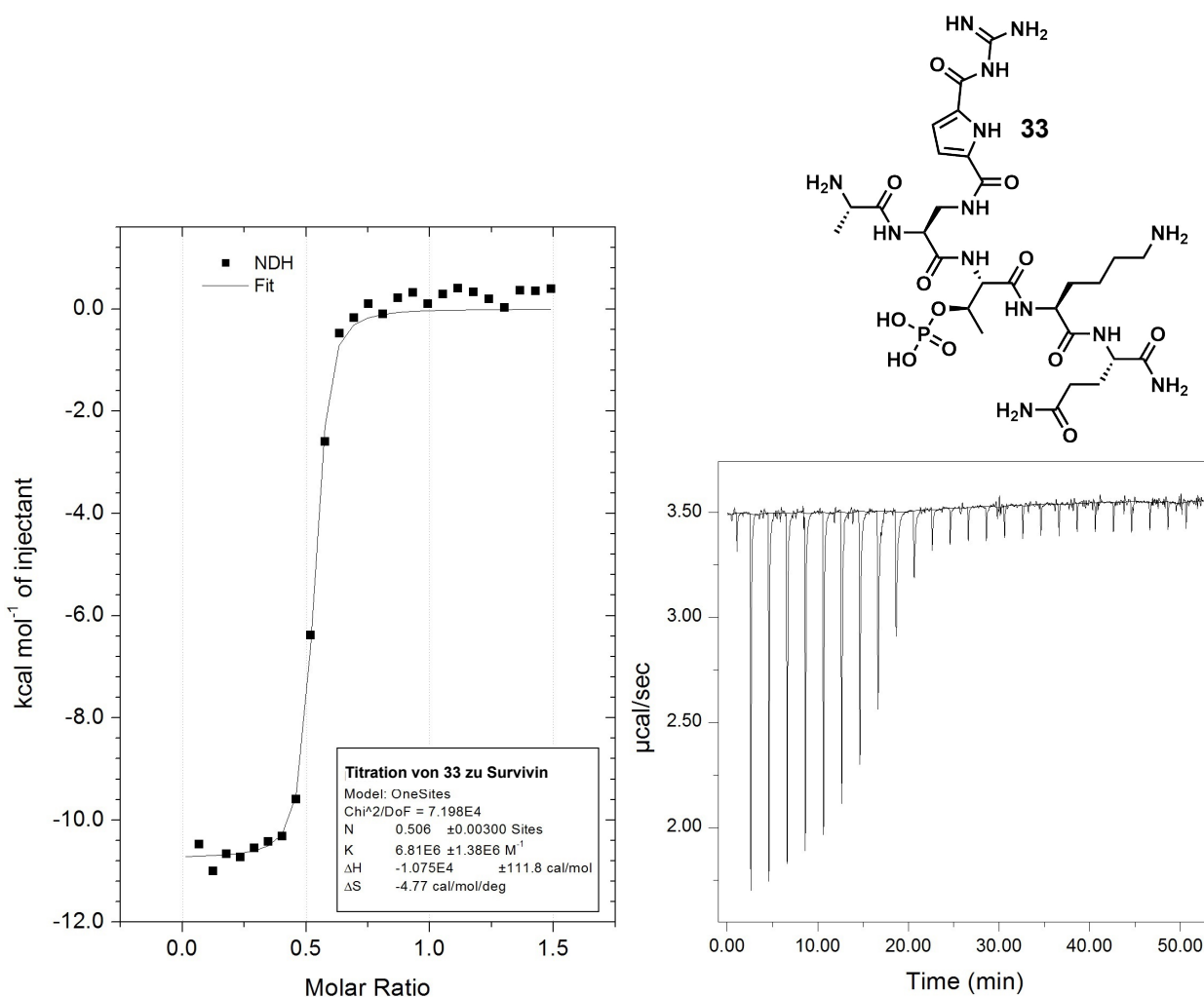


Abbildung 54: ITC von **33** (0,75 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **33**.

Im Folgenden wurde die Verbindung **33** mit Survivin (Abbildung 54) vermessen, die im Vergleich zu **32** ein eindeutiges Bindungsverhalten zeigt. Bei dieser Messung scheint lediglich die Basislinie der ITC kleineren Schwankungen ausgesetzt zu sein. Diese haben lediglich einen sehr geringen Einfluss auf die bestimmten Bindungsenthalpie und -entropie der Messung. Die Dissoziationskonstante liegt mit 147 ± 30 nM in der selben Größenordnung wie **29**. Außerdem beträgt die Stöchiometrie mit $0,506 \pm 0,003$ ebenfalls ein Ligand pro Survivin-Dimer wie es für die anderen Liganden, die auf den 5er Peptid basieren, üblich zu sein scheint. Ebenso ähnelt die Enthalpie mit 10.750 ± 112 cal/mol der Enthalpie der unmodifizierten Sequenz **29**. -TΔS beträgt 1.422 cal/mol.

Analog zur Verbindung **29** wurden ebenfalls inverse Titrations durchgeführt. (Abbildung 55) Wie bereits bei der vorherigen Messung, gibt es hier ebenfalls sehr große Schwankungen in der Basislinie. Dies hat hier jedoch einen größeren Einfluss auf die Messung, da der Injektionspeak der Survivinlösung kaum eine Wärmetönung verursacht. Deren Wärmetönung ist zwar immer noch detektierbar, aber befindet sich in der selben Größenordnung wie die Schwankungen. Im Zuge dessen streuen die letzten Punkte der Titration; die Endassymptote lässt sich ungenauer bestimmen, worunter ebenfalls die Genauigkeit der Enthalpie und Entropie leidet. Analog zu den Titrations von **29** liegt die Stöchiometrie mit $0,661 \pm 0,007$ etwas höher als bei der Titration von **33** zu Survivin. Die Dissoziationskonstante beträgt 121 ± 57 nM und ähnelt genauso wie die Enthalpie ΔH von -12.440 ± 254 cal/mol denen der vorherigen Titrations. $-T\Delta S$ besitzt wie bereits, diskutiert, immer eine höhere Varianz, weshalb sich dieser Wert mit 3.011 cal/mol deutlich von der anderen Titration unterscheidet.

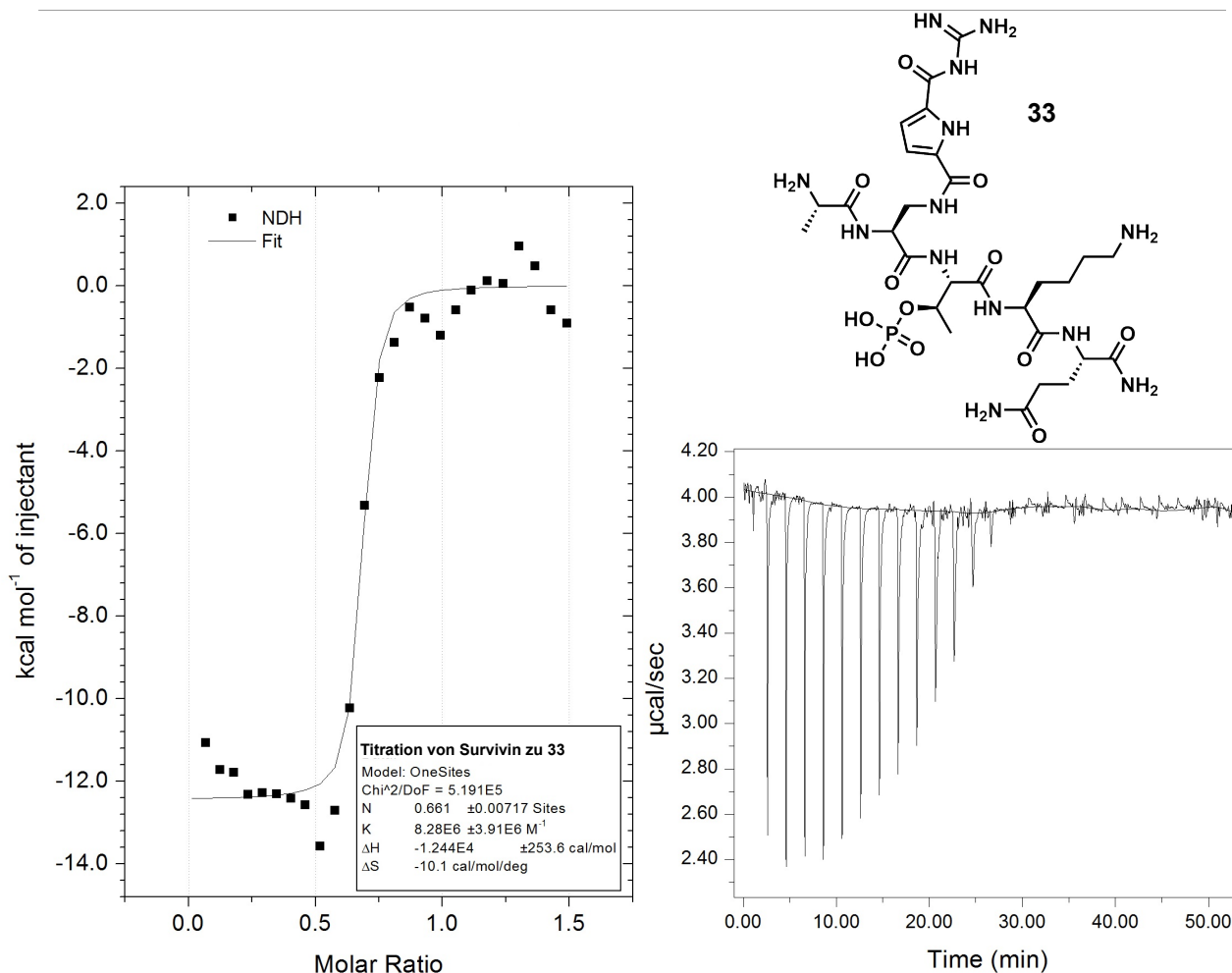


Abbildung 55: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **33** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **33**.

Die Restlichen Titrations wurden in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der mittels ITC bestimmten Reaktionsparameter der einzelnen Titrations. Die grau hinterlegten Titrations wurden in diesem Kapitel diskutiert. Die restlichen Titrationsdaten befinden sich im Anhang (Abbildung 79 und 80).

Titration	N	K _D (nM)	ΔH (cal/mol)	-TΔS (cal/mol)
33 zu Survivin 1	0,506 ± 0,003	147 ± 30	-10.750 ± 112	1.422
33 zu Survivin 2	0,532 ± 0,003	105 ± 29	-11.580 ± 143	2.060
Survivin zu 33 1	0,661 ± 0,007	121 ± 57	-12.440 ± 254	3.011
Survivin zu 33 2	0,582 ± 0,007	43 ± 34	-12.190 ± 315	2.140

Insgesamt scheinen die beiden Messreihen mit dem Liganden **33** geringer voneinander abzuweichen wie die Korrespondierenden von **29**. Die Ursache hierfür

ist wahrscheinlich, dass die Blindmessung von **33** (Abbildung 56) eine geringere lineare Steigung als die der **29** aufweist. Somit gehört **33** zu den stärksten in der literaturbekannten Liganden für Survivin.

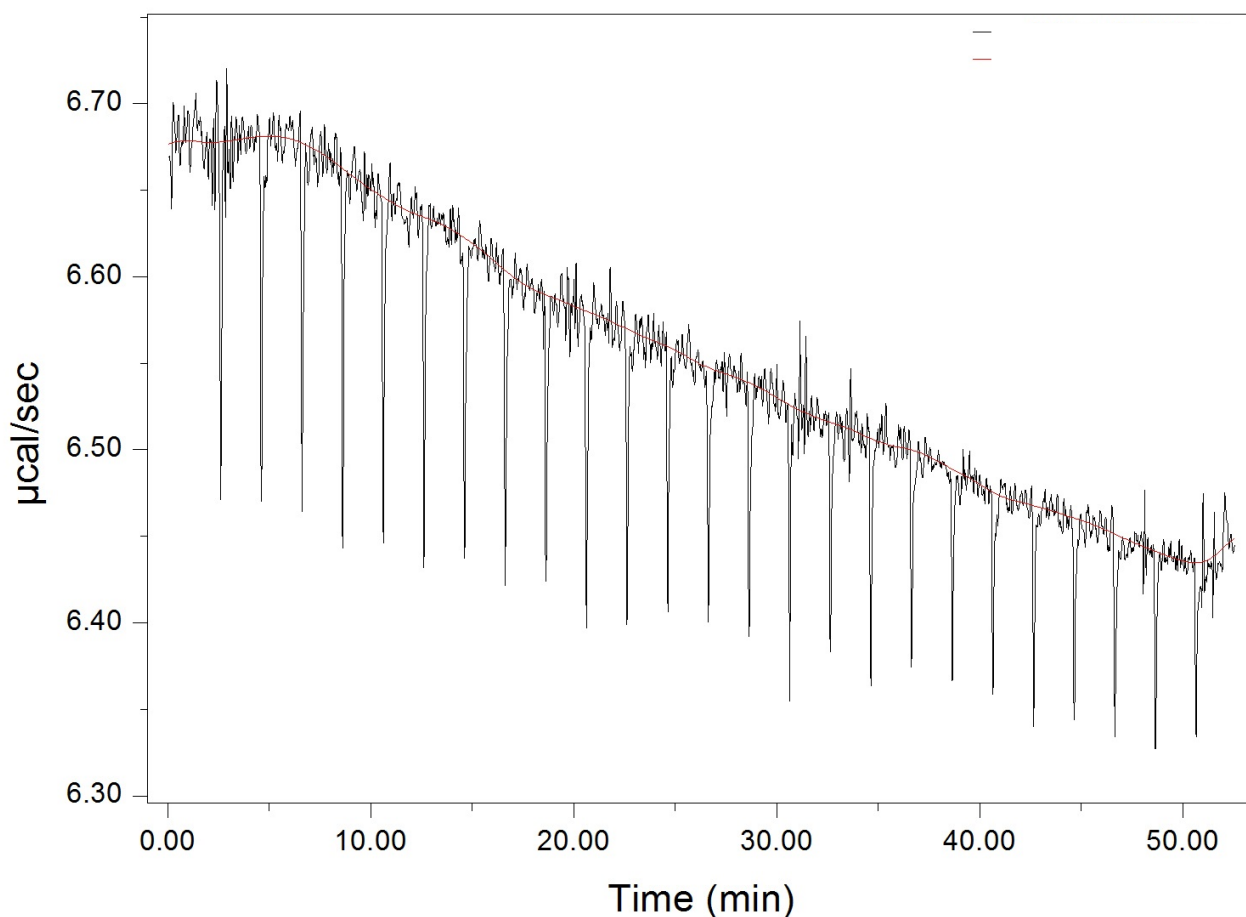


Abbildung 56: ITC-Rohtitration von **33** zum Puffer.

Ferner musste bewiesen werden, dass die Verbindung **33** nicht nur mit der gleichen Bindungsstärke, sondern auch an der selben Region von Survivin wie **29** bindet. Hierfür wurde ebenfalls eine NMR-Titration mit ^{15}N -markierten Survivin-120 durchgeführt. (Abbildung 57) Analog zu der Titration mit **29** findet während dieser Titration auch ein slow exchange statt.

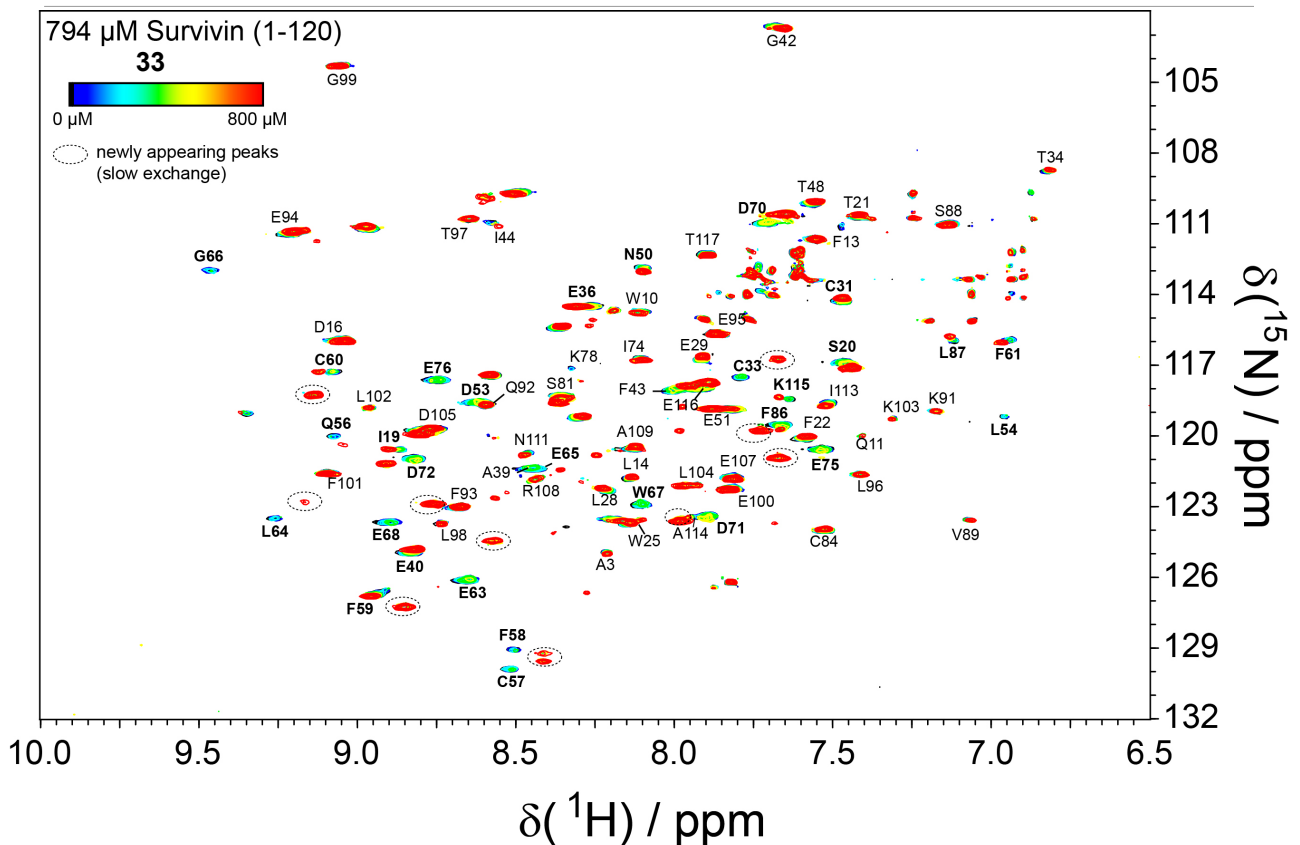


Abbildung 57: ^1H - ^{15}N Korrealionsspektrum der NMR-Titration von 15 mM **33** zu 794 μM ^{15}N -markierten Survivin-120. Kleine Volumina der Stammlösung von **33** wurde zum Survivin gegeben bis zur Äquimolarität. Messung durchgeführt von Christine Beuck.

Ebenso wie die Verbindung **29** scheint das Alanin der Sequenz regulär sowohl an der hydrophoben Bindungstasche aus dem Leucin L64, der Glutaminsäure E76 und dem Tryptophan W67, als auch an der Asparaginsäure D71 und der Glutaminsäure E76 zu binden. Ebenso verschwinden die Peaks der Bindungspartner des Arginins und Lysins, die Glutaminsäuren E65 beziehungsweise E63, bei höheren Konzentrationen. Ersteres beweist, dass die Substitution von dem Arginin in dieser Position durch Dap(GCP) keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Peptidsequenz mit Survivin hat. Dies deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.

Da somit bewiesen wurde, dass auch die Verbindung **33** regioselektiv und stark an Survivin bindet, wurde ebenfalls die Zelltoxizität dieser Verbindung bestimmt.

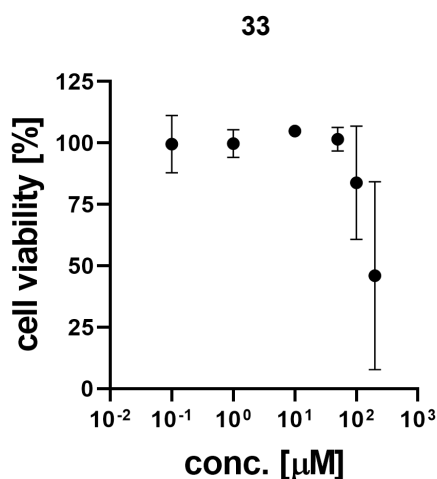


Abbildung 58: Zellviabilität von HeLA-Zellen nach der Behandlung verschiedener Konzentrationen von **33**. Durchgeführt von Paul Stahl.

Allerdings ist die Zelltoxizität der Verbindung **33** gering. (Abbildung 58) Zwar scheint die Verbindung bei Konzentrationen von ungefähr 0,2 mM eine Erhöhung der Toxizität aufzuweisen, jedoch ist die Varianz dieser Werte ebenfalls besonders hoch.

Dementsprechend scheint es ein Problem mit dem Übergang der *in vitro* zu *in vivo* Experimente zu geben. Die simpelste Erklärung hierfür wäre, dass die Verbindungen nicht durch die Zellmembran in die Zelle gelangen können. Das Molekulargewicht der Verbindungen **26**, **27**, **28**, **29** und **33** beträgt unprotoniert zwischen 1124,08 und 681,69 Da. Damit sollten die Moleküle klein genug sein, um passiv durch die Zellmembran zu diffundieren, zumal die Struktur der Moleküle nicht rigide ist. Lediglich die maximale Ladung der Moleküle von 4 bei den Verbindungen **26** und **27** beziehungsweise 3 bei den Verbindungen **28**, **29** und **33** würde die Diffusion verlangsamen. Sogar die Diffusion in den Zellkern, wo die zu inhibierende Histon H3-Survivin Interaktion stattfindet, sollten mit den Molekulargewichten, die deutlich kleiner als 60 kDa sind, kein Problem darstellen. Zwar ist eine mangelnde Diffusion die einfachste Erklärung, jedoch scheint sie nicht schlüssig genug zu sein um als alleinige Ursache die mangelnde Zelltoxizität erklären zu können.

4.5. Potentielle Verbesserungen der Liganden

Zwar binden fast alle in dieser Arbeit vorgestellten Liganden mit einer mikro- bis sogar nanomolarer Affinität an Survivin, jedoch scheint keiner der Liganden einen eindeutigen Effekt auf die Zellviabilität von HeLA-Zellen zu haben. Da alle dieser Verbindungen Peptide sind, stellen sie somit ebenfalls potentielle Substrate für die Proteasen in den Zellen dar. Die Serin-Proteasen Trypsin und Elastase sind hierfür in diesem Zusammenhang interessant, da diese Proteine oder Peptide am C-Terminus von Arginin oder Lysin beziehungsweise Alanin und Glycin spalten können. Die Verbindungen **26** bis **29** sowie **33** besitzen alle ein Lysin, die Verbindungen **26**, **29** und **33** ein Alanin und die Verbindungen **26**, **27** und **29** sogar ein Arginin. Daher sind alle Verbindungen ein potentielles Substrat für Trypsin und unter anderem sind auch die beiden Verbindungen mit der stärksten Bindungsaffinität **29** und **33** ebenfalls Substrate für Elastase. Infolgedessen würde der Anteil der intakten Sequenzen in der Zelle ständig reduziert werden, und die Verbindungen könnten ihre potentiell toxikologische Wirkung nicht entfalten.

Der vielversprechendste nächste Optimierungsschritt wäre dementsprechend die Verbindung **33** weniger anfällig für die oben genannten Enzyme zu machen. Der theoretisch einfachste Weg hierfür wäre, das Peptidrückgrat zu methylieren. Die methylierte Peptidbindung ist weniger polar und sollte somit resistenter gegenüber den Enzymen sein. Allerdings sollte bedacht werden, dass dies zum Einen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Liganden und Survivin verhindert, und zum Anderen die Synthese dadurch anspruchsvoller wird. Die entsprechenden α -N-methylierten Aminosäuren sind kommerziell erhältlich, benötigen jedoch stärkere Kupplungsreagenzien wie HATU oder PyAOP für die nächste Kupplung. Des Weiteren kann diese erfolgreiche Kupplung nicht mit dem Kaiser-Test kontrolliert werden, da dieser bei sekundären Aminen ebenfalls negativ ausfällt. Eine andere Optimierungsmöglichkeit wäre die Substitution oder Modifikation des Arginins, des Lysins und/oder des Alanins. (Abbildung 59) Es konnte bereits bewiesen werden, dass Arginin durch Dap(GCP) ersetzt werden kann. Lysin könnte einerseits durch Ornithin ersetzt oder die Seitenkette modifiziert werden. Am ϵ -Amin des Lysins könnte stattdessen eine hydrophobe Gruppe wie zum Beispiel Cbz oder Benzoyl eingeführt werden. Erstere konnte bereits bei der Inhibierung von Taspase erfolgreich verwendet werden.^[116] Da die ionische Wechselwirkung der Seitenkette

des Lysins in der Kristallstruktur kaum eine Wirkung auf die Bindung zu Survivin hat, wäre dies eine gute Möglichkeit, gleichzeitig die Verbindung für die Diffusion durch die Zellmembran hydrophober zu machen und die Resistenz gegenüber Trypsin zu erhöhen. Alternativ kann das Lysin ebenfalls durch eine an der Seitenkette mit GCP-modifizierte Aminosäure ersetzt werden. Hier würden sich Diaminopropionsäure, 2,4-Diaminobutansäure oder Ornithin anbieten, deren Modifikation bereits in der Literatur^[12] beschrieben wurde.

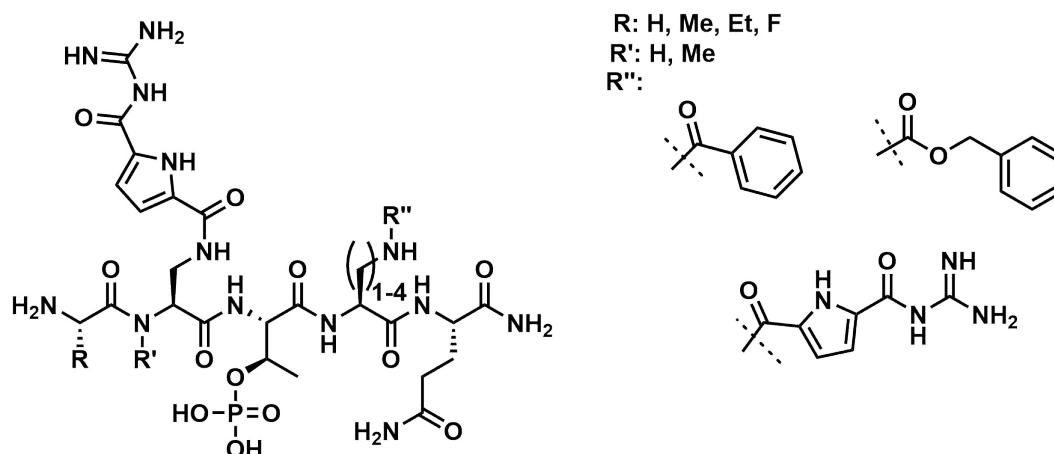


Abbildung 59: Strukturen von möglichen Liganden mit potentiell erhöhter Zellviabilität.

Eine Substitution des Alanins wäre dahingehend deutlich schwieriger, da hier eine Möglichkeit gefunden werden müsste, die zwar in der Methyl-Bindungstasche von Survivin, aber nicht oder zu mindestens schwächer in der Methyl-Bindungstasche von Elastase bindet. Mögliche Kandidaten hierfür wären Glycin, *L*-Homoalanin und *L*-Fluorglycin, jedoch wäre eine methylierte-Amidbindung an dieser Position eine akzeptable Alternative. (Abbildung 59)

5. Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Einfluss der Substitution eines Arginins auf die Bindungsstärke der neueren Peptidsequenz des N-Terminus von Histon H3 auf Survivin untersucht. Dazu wurden die Verbindungen **22** und **23** synthetisiert. (Abbildung 60)

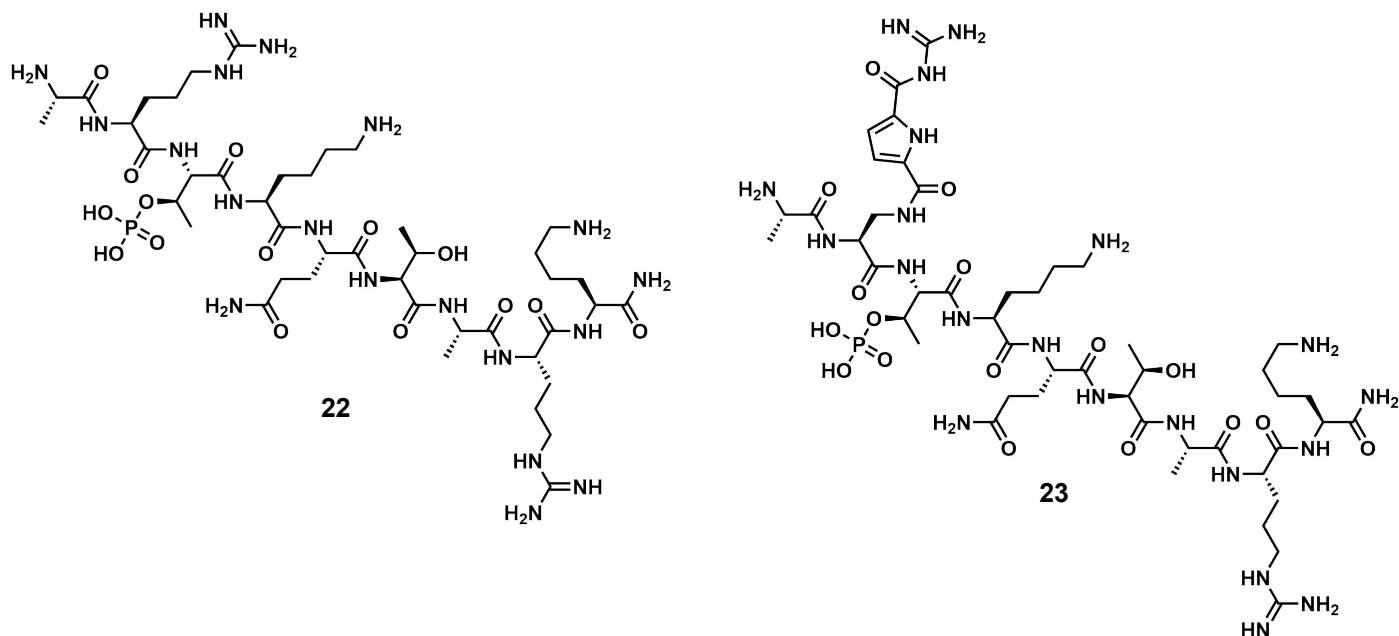


Abbildung 60: Struktur der Verbindungen **22** und **23**.

Beide Verbindungen wurden mittels ITC auf ihre Bindungseigenschaften zu Survivin untersucht, jedoch unterschieden sie sich kaum in ihren Dissoziationskonstanten (**22**: $K_D \approx 1,45 \mu\text{M}$; **23**: $K_D \approx 1,06 \mu\text{M}$; beide bei pH 6,5 mit $N \approx 1$). Dementsprechend kann in dieser Position Arginin durch Dap(GCP) ersetzt werden und scheint keinen Einfluss auf die Bindungsstärke des Peptids zu Survivin zu haben.

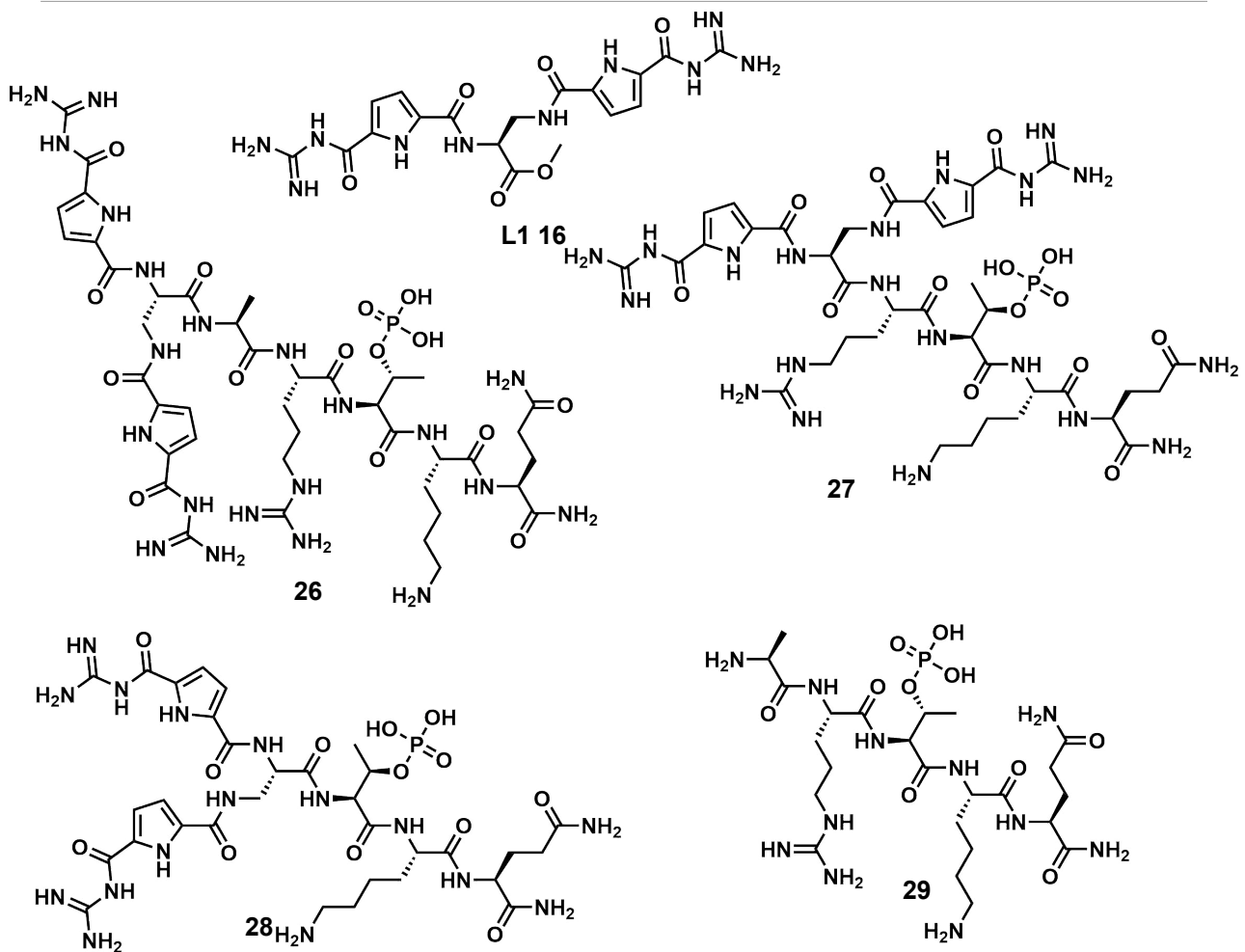


Abbildung 61: Struktur der literaturbekannten Verbindung **L1** und den in dieser Arbeit etablierten Verbindungen **26** bis **29**.

Durch die Kupplung eines literaturbekannten Liganden **L1** an eine selektiv an Survivins BIR-Domäne bindende Aminosäuresequenz, konnten durch die Kombination der ersten drei bis fünf Aminosäuren der Histon H3 Bindungssequenz, (Abbildung 61) die Liganden **26** bis **28** ($K_D = 3,4 - 9,09 \mu\text{M}$, $N \approx 0,5$) synthetisiert werden, die **L1** in der Bindungsstärke übertreffen ($K_D = 158 \mu\text{M}$, $N = 2$ bis 3). Ebenso konnte die Stöchiometrie dieser Verbindungen auf einem Ligand pro Survivin-Dimer reduziert werden; die Regioselektivität blieb konserviert. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Kontrollpeptid **29** ($K_D = 61 - 234 \text{ nM}$, $N \approx 0,5$) ungefähr eine Größenordnung stärker bindet als die stärkste literaturbekannte Peptidsequenz H3(1-12)T3ph ($K_D = 1,45 \mu\text{M}$, $N \approx 1$)^[72] bei einem vergleichbaren pH-Wert (6,8 statt 6,5), obwohl diese Peptidsequenz sieben Aminosäuren länger ist. Ferner halbierte sich die Stöchiometrie der Bindung von 2 auf ungefähr 1 Ligand pro Survivin-Dimer bei den Verbindungen **26** bis **29**. Mittels NMR-Titrations konnte bewiesen werden,

dass **26** bis **29** allesamt an der BIR-Domäne von Survivin binden. Obwohl diese Liganden sehr stark an Survivin binden, scheinen sie keinen Einfluss auf die Zellviabilität von HeLa-Zellen zu haben. Zur weiteren Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden die Peptide **30** und **31** (Abbildung 62) ebenfalls mit Survivin titriert.

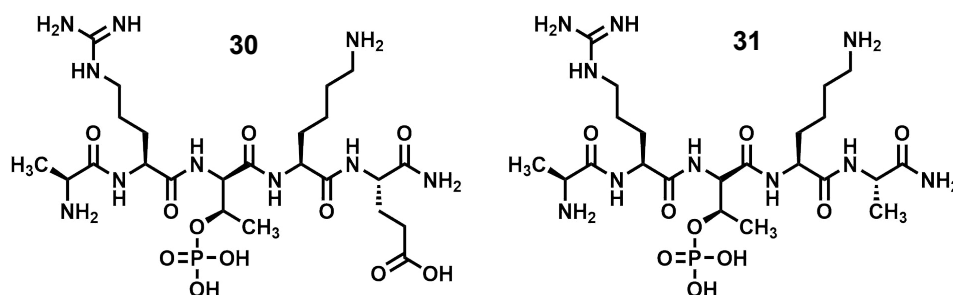


Abbildung 62: Struktur der Peptide **30** und **31**.

Bei den Verbindungen **30** und **31** wurde das Glutamin von **29** gegen eine Glutaminsäure beziehungsweise ein Alanin ausgetauscht. Somit konnte der Einfluss sowohl der Seitenkette des Glutamins, als auch der Verlängerung der literaturbekannten 4-er Sequenz um eine Aminosäure, auf die Bindungseigenschaften untersucht werden. Die Stöchiometrien von **30** und **31** entsprachen mit Werten um 1 den literaturbekannten Peptiden. Dies lässt den Schluss zu, dass die verringerte Stöchiometrie auf einen Einfluss der Seitenkette des Glutamins bei **26** bis **29** zurückzuführen ist. Während **30** mit einem K_D von ungefähr $1,00 \mu\text{M}$ um den Faktor 10 bis 100 schlechter an Survivin bindet als **29**, bleibt die Bindungsaffinität bei **31** ($K_D = 147 \text{ nM}$) in der selben Größenordnung wie **29**. Dies impliziert, dass die Seitenkette des Glutamins für eine Verringerung der Stöchiometrie der Bindung zu Survivin verantwortlich ist, während die Verlängerung der Peptidkette die Bindungsstärke erhöht. Um diesen Sachverhalt zu beweisen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

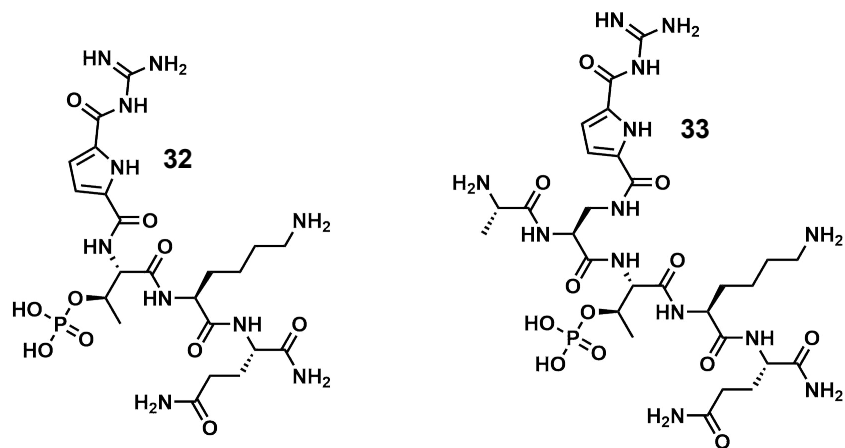


Abbildung 63: Struktur der Verbindungen **32** und **33**.

Abschließend wurde versucht, **29** mit GCP zu modifizieren. Bei der Verbindung **32** wurde das Alanin und das Arginin der Sequenz durch GCP ersetzt, während bei **33** analog zur Verbindung **26** Dap(GCP) statt des Arginins verwendet wurde. (Abbildung 63) **32** zeigt keinerlei Bindungsverhalten mehr gegenüber Survivin, wohingegen die Bindungsaffinität von **33** (43-148 nM, $N \approx 0,5$) in der selben Größenordnung wie die von **29** ist. Diese Erkenntnis entspricht ebenfalls den vergleichbaren Erkenntnissen von **22** und **23**, die sich ebenfalls nur in dem Dap(GCP) unterscheiden. Ebenso wie **29** bindet **33** an der BIR-Domäne von Survivin, und scheint aber keinen bis einen sehr geringen Einfluss auf die Zellviabilität zu haben. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der Peptidstruktur der Verbindungen, welche durch Enzyme innerhalb der Zelle verdaut werden können, weshalb die kommenden Optimierungen auf eine Erhöhung der Halbwertszeit der Verbindungen in Zellen zielen sollten.

6. Summary

The peptides **22** and **23** were synthesized to investigate the influence of arginine substitution on the Histone H3 binding sequence. The arginine in position 2 was replaced with Dap(GCP), a literature known arginine mimetic. (Figure 64)

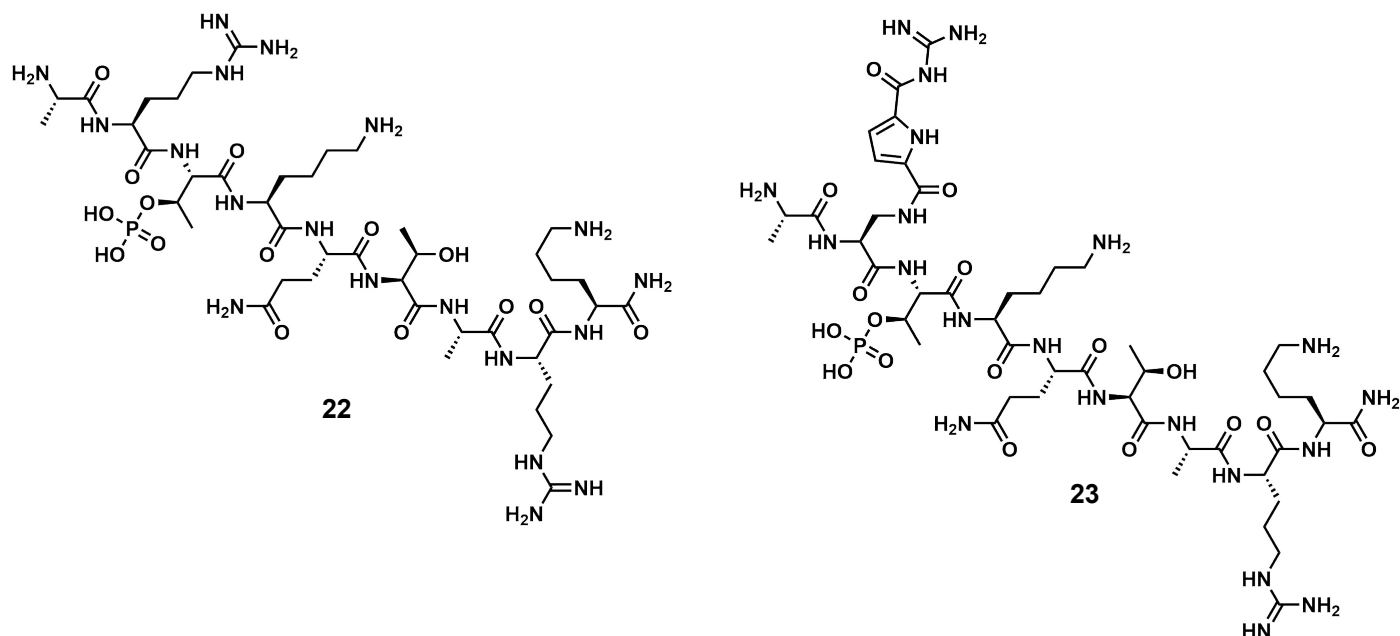


Figure 64: Structure of the compounds **22** and **23**.

The binding-affinity of both compounds towards survivin were measured via ITC. The dissociation constants K_D of them were nearly identical (**22**: $K_D \approx 1.45 \mu\text{M}$; **23**: $K_D \approx 1.06 \mu\text{M}$; both were measured at pH 6.5 and resulted in a stoichiometry of $N \approx 1$). So the substitution of arginine at this exact position leads to no significant improvement of the binding-affinity.

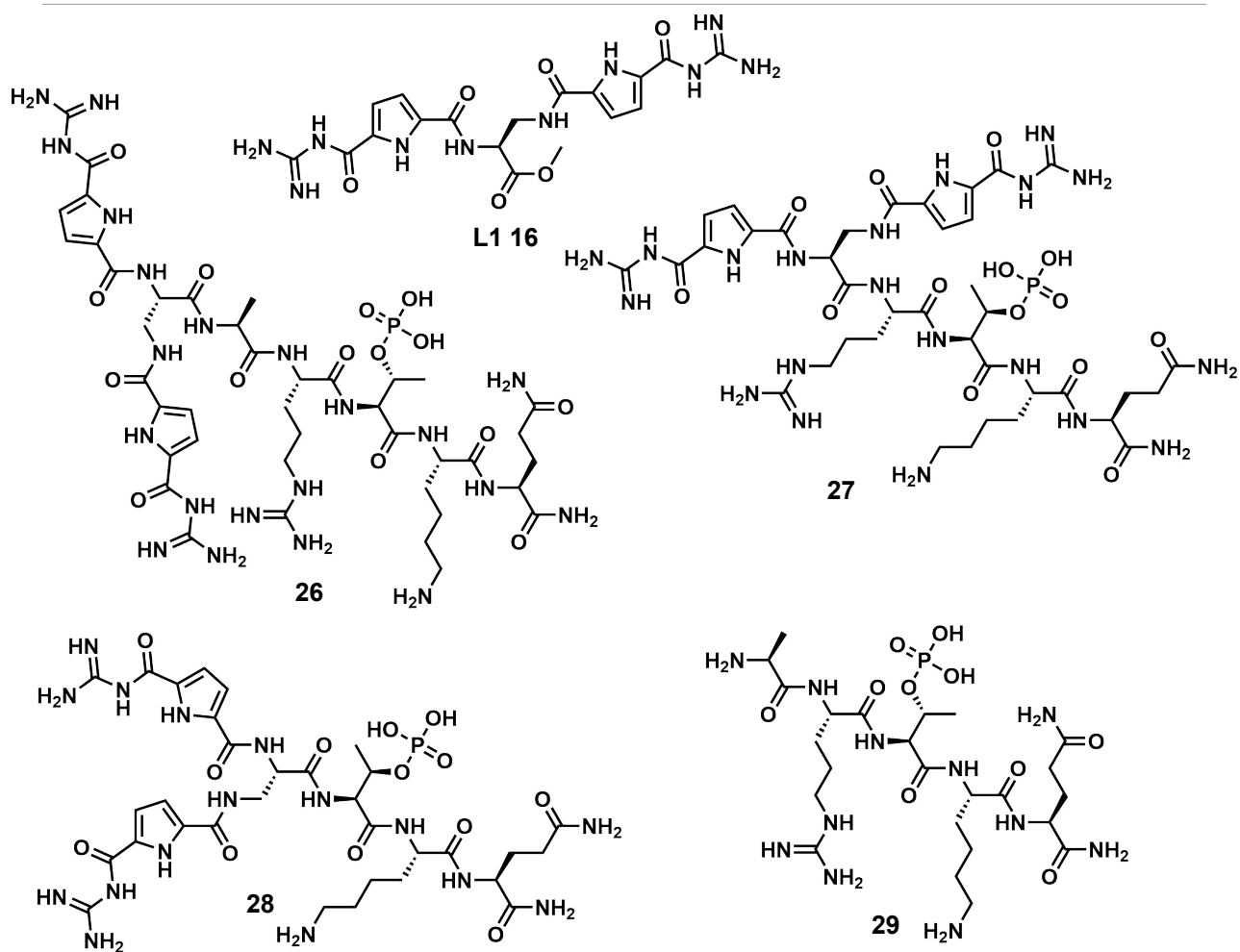


Figure 65: structure of the literature-known ligand **L1** and the compounds **26** to **29**, which were established in this thesis.

The literature-known ligand **L1**, which binds selectively at the BIR-domain of Survivin, was combined with the first three to five amino acids of the Histone H3 binding sequence leading to the structures **26** to **28**. (Figure 65) All of these three compounds bind stronger towards Survivin ($K_D = 3.4 - 9.09 \mu\text{M}$, $N \approx 0.5$) than **L1** ($K_D = 158 \mu\text{M}$, $N = 2 - 3$). Furthermore, the stoichiometry of this binding was reduced to a 1:2 ratio with the Survivin dimer instead and the regioselectivity was conserved. But the control compound **29** binds one order of magnitude stronger towards Survivin ($K_D = 61 - 234 \text{ nM}$, $N \approx 0.5$) than **26** to **28**, leaving even the strongest literature known peptide based ligand H3(1-12)T3ph ($K_D = 1.45 \mu\text{M}$, $N \approx 1$)^[72] behind. This peptide was measured at a pH of 6.8 which is comparable to the pH of 6.5 used during all titrations in this thesis and their peptide sequence includes seven amino-acids more than **29**. While the binding-site of the ligands **26** to **29** was confirmed via NMR Titration to be the same BIR domain as the literature known peptides, the

stoichiometry of these newly established ligands is only half of the one known to literature. But even with these strong binding characteristics the ligands **26** to **28** failed to show any effects of decreasing the cell viability of HeLa-cells. For further investigation the compounds **30** and **31** (Figure 66) were also titrated against Survivin.

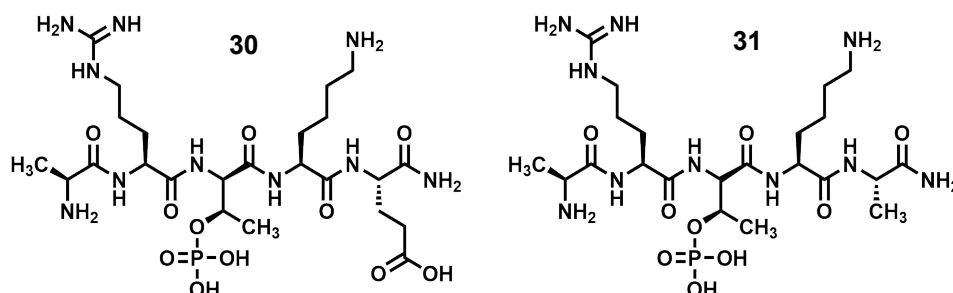


Figure 66: structure of the peptide **30** and **31**.

The glutamine of **29** was replaced with a glutamic acid in **30** and an alanine in **31** so the influence of glutamine's side chain as well as the effect of the elongated peptide sequence can be investigated. Both compounds bind towards Survivin with a stoichiometry of $N \approx 1$, which is more in line with the stoichiometry of the literature known peptides and indicates that glutamine's side chain might be responsible for the reduced stoichiometry of the ligands **26** to **29**. While the binding affinity of **30** ($K_D \approx 1.00 \mu\text{M}$) decreased around one to two orders of magnitude, **31** binds as strong as **29** towards Survivin ($K_D = 147 \text{ nM}$). The elongation of the peptide sequence seems to be the reason for the increased binding strength of **29** while the glutamine might be the reason for the reduced stoichiometry. Further experiments are required to prove this hypothesis.

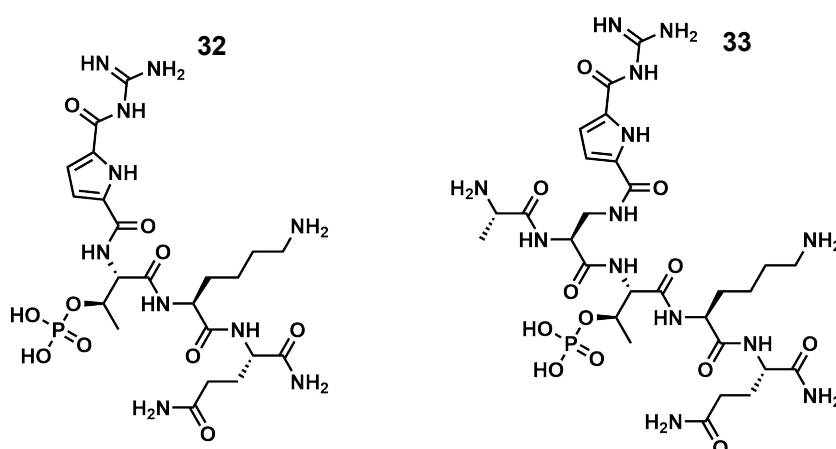


Figure 67: structure of the compounds **32** and **33**.

At last the compounds **32** and **33** were synthesized as an attempted to further optimize **29**. (Figure 67) In **32** the alanine and arginine of **29** were replaced with GCP while in **33** only the arginine was replaced with Dap(GCP). Although **32** does not bind towards Survivin in any noticeable manners, **33** does bind with the same affinity towards Survivin (43-148 nM, $N \approx 0.5$) as **29**. This result is in line with the comparison between **22** and **23**, which also only differ in the substitution of arginine with Dap(GCP). While NMR titration could proof that **33** binds to survivin's BIR domain, it did not effect cell viability. The peptide structure of the compounds makes them also substrates for enzymes *in vivo*, which is most likely the reason for the lack of activity. Further optimisation of the ligands established in this thesis is needed to enhance their toxicological effect. These should focus on modifying the peptides to increase their half-life time in cells.

7. Experimentalteil

Die verwendeten Aminosäure-Bausteine wurden von den Firmen Bachem, Iris Biotech, TCI, Fluorochem oder abcr produziert. Das PyBOP wurde von Fluorochem hergestellt und die verwendeten Lösungsmittel sowie das 2,4,6-Trimethyl-Collidin stammten von den Firmen VWR oder Merck. Erstere wurden in p.a.-Qualität verwendet.

Als Puffer wurde für die ITC-Messung ein HEPES-Puffer verwendet. Für 50 mL Pufferlösung wurden 162,7 mg HEPES (2,5 mM), 3,58 mg TCEP (0,05 M), 23,8 mg $MgCl_2$ (1 mM) und 138,5 mg NaCl (20 mM) in rund 40 mL Reinstwasser gelöst, welches durch Ultrafiltration hergestellt wurde. Diese Lösung wurde im Anschluss mit einer 0,1 M Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt und anschließend auf 50 mL aufgefüllt.

Eine MicroCal iTC200 der Firma Malvern wurde für die ITC- Messungen verwendet. Alle zwei Minuten wurde 1 μ L aus der Spritze zu 400 μ L Stammlösung in der Zelle titriert. Diese Injektionen wurden 52mal wiederholt, wobei die erste Injektion nur mit dem halben Volumen durchgeführt wurde. Die Temperatur betrug 25 °C. Der Mittelwert aller Werte der Blindmessungen gebildet und als konstanten Wert von den Rohdaten abgezogen. Diese Werte wurden mit einer geskripteten Version von Origin von OriginLab ausgewertet.

Für die Reinheitsbestimmungen wurde eine HPLC der Firma *DIONEX* mit einer P680 HPLC Pumpe, einem UVD 3404 System und einem ASI 100 Automated Sample Injection Modul verwendet. Die verwendete Säule war eine mit RP18-Material gefüllte Säule der Firma *YMC* (Länge 150 mm, Durchmesser: 4,6 mm, Partikelgröße: 15 μ m, Porengröße: 12 nm).

Eine präparative HPLC der Firma *SCPA* wurde zur Reinigung der Rohprodukte verwendet. Diese ist ausgerüstet mit einer P 2,1 L Pumpe und einer Mischkammer der Firma Knauer, einem MCS UV/NIR-Spektrometer der Firma *TIDAS* und einem Probensammler LABOCOL Varlo-4000 der Firma *LABOMATIC*. Maximal 2 mL einer wässrigen Lösung des Rohprodukts wurde manuell über ein 6-Wege Ventil injiziert. Die verwendete RP18-Säule stammt von der Firma *Actus* (Länge: 150 mm, Durchmesser: 20 mm, Partikelgröße: 5 μ m, Porengröße: 12 nm).

Die NMR Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem *Bruker* DRX 500 mit 600 MHz und referenziert auf TMS durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde sowohl die Software „*Maestro Nova*“ von *Mestrelab Research* als auch „*Spectrum Processor*“ von *ACD-Labs* verwendet.

Die Proben für die Massenspektrometrie wurden direkt und unverdünnt von den Fraktionen der präparativen HPLC entnommen. Für die hochauflösenden Massen wurde ein *SL Bruker Maxis 4G* verwendet, dessen Spektren mit der „*Data Analysis*“ Software von *Bruker* ausgewertet wurden.

Die Synthese des verwendeten Boc-GCP-O⁻ ⁺HNEt₃ (Abbildung 68) wurde nach der Literaturvorschrift^[26] durchgeführt und wird hier nicht weiter beschrieben.

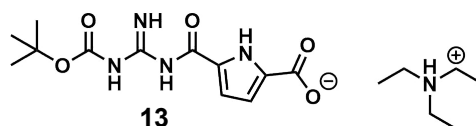


Abbildung 68: Struktur von Boc-GCP-O⁻ ⁺HNEt₃.

7.1. Allgemeine Synthesevorschrift für die mikrowellen-gestützte Festphasen-Peptidsynthesen

Die Mikrowellensynthesen wurden an einem CEM Discover SPS in speziellen Kunststoffgefäßen mit poröser Fritte durchgeführt. Die Temperatur wurde mittels einer Glasfasertemperatursensor während des Prozesses kontrolliert, und um die Durchmischung zu gewährleisten, wurde durch einen PTFE Schlauch mit 2 mm Durchmesser kontinuierlich Argon in das Reaktionsgemisch geströmt.

Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Die Maximaltemperatur betrug 60 °C und es wurde mit einer Leistung von 20 W geheizt. Die Fmoc-Entschützung wurde einmal anderthalb Minuten und einmal fünf Minuten lang durchgeführt. Verwendet wurde eine 20%-ige Lösung von Piperidin in DMF. Für die Kupplungen wurden die Aminosäuren (3 Äq.) mit PyBOP (3 Äq.) und Collidin (3 Äq.) für 20 beziehungsweise 30 Minuten in 5 mL DMF erhitzt. Zwischen den Kupplungs- und Entschützungsschritten wurde das Harz viermal mit je 10 mL DMF gewaschen. Alloc-Entschützungen wurden durchgeführt in 4 mL DCM, dem 10 mg Pd(PPh₃)₄ und 1 mL H₃SiPh hinzugefügt wurden. Diese Reaktion wurde für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der letzten Kupplung wurde das Harz viermal mit je 10 mL DMF, 10 mL DCM und 10 mL Aceton gewaschen. Das geschrumpfte Harz wurde bis zu zwei Tage bei Raumtemperatur vor der Abspaltung gelagert.

Abspaltung des Peptids:

Als Abspalllösung wurde eine 95%-ige TFA-Lösung mit 5% Wasser verwendet. Je 5 mL dieser Lösung wurden mit 0,5 mL TIS versetzt und zweimal 2 h mit dem Harz gerührt. Das Harz wurde mit 10 mL Wasser gewaschen und alle Lösungen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in kalten Diethylether gefällt. Der überschüssige Ether wurde abdekantiert und der Rest bei verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch gelöst, das den Mengenverhältnissen der Startbedingungen der entsprechenden Präparativen HPLC entsprach. Diese Lösung wurde vor der Injektion in die präparative HPLC filtriert.

7.2. Synthese von 22

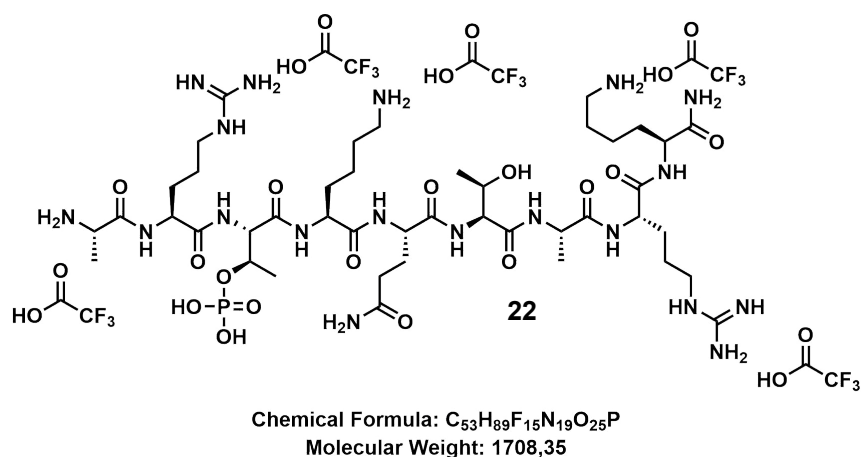


Abbildung 69: Struktur des TFA-Salz' von **22**.

Für diese Synthese wurde die allgemeine Synthesevorschrift der Mikrowellensynthese mit 200 mg Rink Amid Harz (mesh 80-100, Beladung 0,8 mmol/g, 0,16 mmol, 1 Äq.) verwendet. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe vom Harz nach Vorschrift entfernt. Anschließend wurden folgende Aminosäure-Bausteine (je 0,48 mmol, 3 Äq.) mit jeweils 250 mg PyBOP (0,48 mmol, 3 Äq) und 0,06 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,48 mmol, 3 Äq.) gekuppelt.

Tabelle 3: Massen und Reaktionszeit der für **22** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	311	30
Fmoc-Ala-OH	149	20
Fmoc-Thr(tBu)-OH	191	20
Fmoc-Gln-OH	177	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	246	30
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	311	30
Boc-Ala-OH	91	20

Das Peptid wurde anschließend nach Vorschrift von Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt ($H_2O/ACN + 0,1\%$ TFA; isokratisch 95% H_2O ; $t_R = 5,4$ min). Erhalten wurden 2,4 mg (1,4 μ mol, Ausbeute 0,875%) eines weißen Feststoffs mit 96,0% Reinheit.

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,21 (d, *J* = 6,16 Hz, 3 H, CH₃ (γ Thr)) 1,33 (br dd, *J*=11,15, 6,16 Hz, 3 H, CH₃ (γ pThr)) 1,36 - 1,50 (m, 7 H, 2x CH₃ (β Ala), 2x CH₂ (γ Lys)) 1,60 - 1,72 (m, 12 H, 2x CH₂ (β Lys), 2x CH₂ (δ Lys), 2x CH₂ (γ Arg)) 1,72 - 1,88 (m, 6 H, CH₂ (β Gln), 2x CH₂ (β Arg)), 2,34 - 2,42 (m, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 3,01 (s, 6 H, 2x NH₃ (Lys)) 3,12 - 3,18 (m, 4 H, 2x CH₂ (δ Arg)) 3,18 - 3,26 (m, 4 H, 2x CH₂ (ε Lys)) 4,09 - 4,14 (m, 1 H, CH (α Ala)) 4,14 - 4,22 (m, 1 H, CH (α Arg)) 4,24 - 4,42 (m, 6 H, 2x CH (α Lys), CH (α Gln), CH (α Thr), CH (α Ala), CH (α Arg)) 4,42 - 4,48 (m, 1 H, CH (α pThr)) 4,49 - 4,58 (m, 1 H, CH (β Thr)) 5,21 - 5,27 (m, 1 H, CH (β pThr)) 6,86 - 6,94 (m, 1 H, NH) 7,08 - 7,15 (m, 1 H, NH) 7,15 - 7,26 (m, 2 H, NH) 7,42 - 7,62 (m, 2 H, NH) 7,64 - 7,74 (m, 1 H, NH) 7,80 - 7,90 (m, 1 H, NH) 7,89 - 7,97 (m, 1 H, NH) 7,98 - 8,06 (m, 1 H, NH) 8,26 - 8,43 (m, 3 H, NH) 8,45 - 8,63 (m, 2 H, NH) 8,73 - 8,78 (m, 1 H, NH) 8,87 - 8,97 (m, 1 H, NH) 8,91 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (151 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 16,6 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 16,7 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 17,9 (d, *J*=2,21 Hz, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 19,0 (s, 1 C, CH₃ (γ Thr)), 21,6 (m, 2 C, 2x CH₂ (β Arg)), 22,1 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 22,4 (s, 2 C, 2x CH₂ (γ Lys)), 23,6 (s, 2 C, 2x CH₂ (γ Arg)), 24,4 (s, 2 C, CH₂ (β Lys)) 26,5 (s, 2 C, CH₂ (δ Lys)), 30,5 (s, 2 C, 2x CH₂ (ε Lys)), 40,7 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 44,8 (s, 2 C, 2x CH₂ (δ Arg)), 49,9 (s, 1 C, CH (α Ala)), 53,0 (s, 1 C, C_αH), 53,2 (s, 1 α, C_αH) 53,4 (s, 1 C, C_αH), 53,5 (s, 1 C, C_αH) 53,9 (s, 1 C, C_αH) 54,1 (s, 2 C, C_αH) 56,3 (s, 1 C, CH (α pThr)) 59,3 (s, 1 C, CH (β Thr)), 67,3 (s, 1 C, CH (β pThr)) 115,4 (s, 5 C, 5x CF₃ (TFA)), 157,0 (s, 1 C, C_{Carbonyl}) 161,0 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 162,9 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 163,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 169,9 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 170,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,5 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,6 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 174,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 176,5 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 177,9 (s, 1 C, C_{Carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 2841 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2347 (C=O).

ESI-HRMS m/z (%): 380 [M+3H]³⁺ (100), 570 [M+2H]²⁺ (22). Berechnet für C₄₃H₈₄N₁₉O₁₅P [M+3H]³⁺: 380,2117 gefunden: 380,2065; berechnet für C₄₃H₈₄N₁₉O₁₅P [M+2H]²⁺: 569,8139 gefunden: 569,8054.

7.3. Synthese von 23

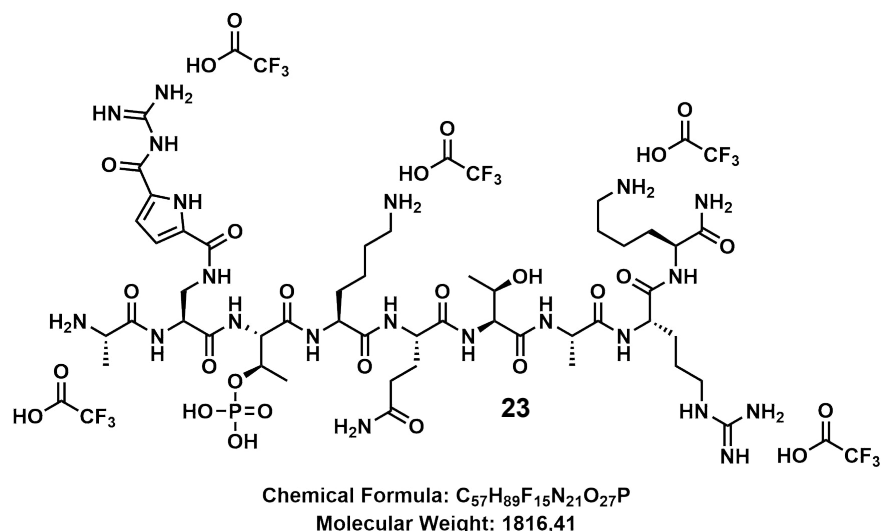


Abbildung 70: Struktur des TFA-Salz' von **23**.

Die Synthese von **23** wurde zunächst analog zu der von **22** mit 200,00 mg Rink Amid (mesh 80-100, Beladung 0,8 mmol/g, 0,16 mmol, 1 Äq.) durchgeführt, jedoch mit folgenden Aminosäuren-Bausteinen:

Tabelle 4: Massen und Reaktionszeit der für **23** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	311	30
Fmoc-Ala-OH	149	20
Fmoc-Thr(tBu)-OH	191	20
Fmoc-Gln-OH	177	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	246	30
Fmoc-Dap(Alloc)-OH	191	20
Boc-Ala-OH	91	20

Anschließend wurde zweimal eine Alloc-Entschützung durchgeführt und das Harz sechsmal mit je 10 mL DCM gewaschen. Dann wurde eine letzte Kupplung mit 397 mg Boc-GCP-O⁻ HNEt₃ (0,48 mmol, 3 Äq.), 250 mg PyBOP (0,48 mmol, 3 Äq) und 0,06 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,48 mmol, 3 Äq.) in 5 mL DMF für 30 Minuten durchgeführt. Das Peptid wurde nach Vorschrift abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 90% bis 70% H₂O über 25 min; t_R =

7,4 min). Erhalten wurden 2,8 mg des weißen Pulvers (1,5 μ mol, 0,96% Ausbeute) mit 94,9 % Reinheit.

Schmelzpunkt: 165,9 °C (zers.)

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,20 (br d, J = 6,46 Hz, 3 H, CH₃ (γ Thr)), 1,29 - 1,35 (m, 3 H, CH₃ (γ pThr)), 1,37 - 1,55 (m, 12 H, 2x CH₃ (β Ala), 2x CH₂ (γ Lys), CH₂ (γ Arg)), 1,61 - 1,71 (m, 6 H, 2x CH₂ (δ Lys), CH₂ (β Arg)), 1,72 - 1,85 (m, 6 H, 2x CH₂ (β Lys), CH₂ (β Gln)), 1,93 - 2,12 (m, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 2,29 - 2,45 (m, 2 H, CH₂ (β Dap)), 2,99 (br s, 4 H, 2x CH₂ (ϵ Lys)), 3,16 - 3,22 (m, 2 H, CH₂ (δ Arg)), 3,72 - 3,91 (m, 2 H, CH (α Ala), CH (α Arg)), 4,11 - 4,21 (m, 2 H, CH (α Ala), CH (α Dap)), 4,23 - 4,38 (m, 3 H, 2x CH (α Lys), CH (α Gln)), 4,50 - 4,57 (m, 1 H, CH (α Thr)), 4,63 - 4,69 (m, 1 H, CH (α pThr)), 6,80 - 6,90 (m, 1 H, CH (GCP)), 6,98 - 7,07 (m, 1 H, NH), 6,98 - 7,04 (m, 1 H, NH), 6,98 - 7,04 (m, 1 H, NH), 6,98 - 7,06 (m, 1 H, NH), 6,99 - 7,03 (m, 1 H, NH), 6,99 - 7,02 (m, 1 H, NH), 6,99 - 7,06 (m, 1 H, NH), 7,08 - 7,16 (m, 1 H, CH(GCP)), 7,18 (br s, 1 H, NH), 7,19 - 7,21 (m, 1 H, NH), 7,41 - 7,53 (m, 1 H, NH), 7,58 - 7,70 (m, 1 H, NH), 7,79 - 7,90 (m, 1 H, NH), 8,06 - 8,25 (m, 2 H, NH₂), 8,28 - 8,40 (m, 2 H, NH₂), 8,41 - 8,53 (m, 2 H, NH₂), 8,63 - 8,67 (m, 1 H, NH), 8,81 - 8,87 (m, 1 H, NH).

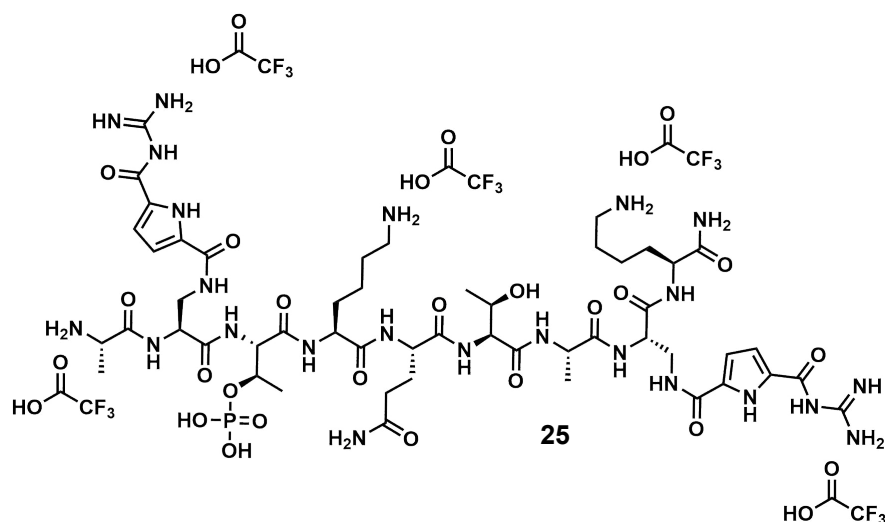
¹³C-NMR (151 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 16,7 (s, 2 C, CH₃ (β Ala)), 18,0 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 19,0 (s, 1 C, CH₃ (γ Thr)), 22,1 (s, 2 C, 2x CH₂ (γ Lys)), 24,4 (s, 1 C, CH₂ (γ Arg)), 26,5 (s, 2 C, 2x CH₂ (β Lys)), 26,8 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 28,2 (s, 1 C, CH₂ (β Arg)), 30,3 (s, 1 C, CH₂ (δ Lys)), 30,5 (s, 2 C, 2x CH₂ (δ Lys)), 31,1 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,5 (s, 2 C, 2x CH₂ (ϵ Lys)), 39,7 (s, 1 C, CH₂ (β Dap)), 40,7 (s, 1 C, CH₂ (δ Arg)), 49,3 (s, 1 C, CH (α Lys)), 49,9 (s, 1 C, CH (α Ala)), 53,3 (s, 2 C, 2x CH (α Lys, α Arg)), 54,7 (s, 1 C, CH (α Ala)), 59,4 (s, 1 C, CH (α Gln)), 59,6 (s, 1 C, CH (α Dap)), 67,2 (s, 1 C, CH (α Thr)), 71,1 (s, 1 C, CH (α pThr)), 112,6 (s, 1 C, CH (β Thr)), 115,4 (s, 5 C, 5x CF₃ (TFA)), 115,7 (s, 1 C, CH (β pThr)), 119,3 (s, 1 C, CH (GCP)), 125,2 (s, 1 C, C_q (GCP)), 126,3 (s, 1 C, CH (GCP)), 126,7 (s, 1 C, C_q (GCP)), 157,0 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 161,0 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 162,3 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 162,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 163,1 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 171,1 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 171,3 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 171,6 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 171,7 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 173,6 (s, 2 C, C_{carbonyl}), 173,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 174,8 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 174,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 175,0 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 176,5 (br d, J = 3,32 Hz, 2 C, C_{carbonyl}), 177,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3386 (NH), 3037 (CH arom.), 2877 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2349 (C=O), 1677 (NH Peptid), 1668 (NH Peptid), 1650 (NH Peptid), 1633 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 416 [M+3H]³⁺ (100), 312 [M+4H]⁴⁺ (32), 624 [M+2H]²⁺ (28).

Berechnet für C₄₇H₈₄N₂₁O₁₇P [M+3H]³⁺: 416,2103 gefunden: 416,0959; berechnet für C₄₇H₈₄N₂₁O₁₇P [M+2H]²⁺: 623,8119 gefunden: 623,6781.

7.4. Synthese von 25



Chemical Formula: $C_{61}H_{89}F_{15}N_{23}O_{29}P$
Molecular Weight: 1924,46

Abbildung 71: Struktur des TFA-Salz' von **25**.

Die Synthese von **25** wurde zunächst genauso wie **22** mit 200 mg Rink Amid Harz (mesh 100-200, Beladung 0,4 mmol/g, 0,8 mmol, 1 Äq.) mit folgenden Aminosäure-Bausteinen jedoch mit jeweils 125 mg PyBOP (0,24 mmol, 3 Äq.) und 0,03 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,24 mmol, 3 Äq.) durchgeführt:

Tabelle 5: Massen und Reaktionszeit der für **25** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	112	20
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	99	20
Fmoc-Ala-OH	75	20
Fmoc-Thr(tBu)-OH	95	20
Fmoc-Gln-OH	88	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	112	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	123	30
Fmoc-Dap(Alloc)-OH	99	20
Boc-Ala-OH	45	20

Daraufhin wurde zweimal eine Alloc-Entschützung durchgeführt und das Harz sechsmal mit je 10mL DCM gewaschen. Die letzte Kupplung wurde mit 397 mg Boc-GCP-O⁻ ⁺HNEt₃ (0,48 mmol, 6 Äq.), 250 mg PyBOP (0,48 mmol, 6 Äq) und 0,06 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,48 mmol, 6 Äq.) in 5 mL DMF für 30 Minuten durchgeführt.

Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz wurde dieses mittels präparativer HPLC gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 95% bis 85% H₂O über 25 min; t_R = 7,0 min). Erhalten wurden 4,1 mg eines weißen Pulvers (2,1 µmol, 2,63% Ausbeute) mit 86,0% Reinheit.

Schmelzpunkt: 196,5 °C (zers.)

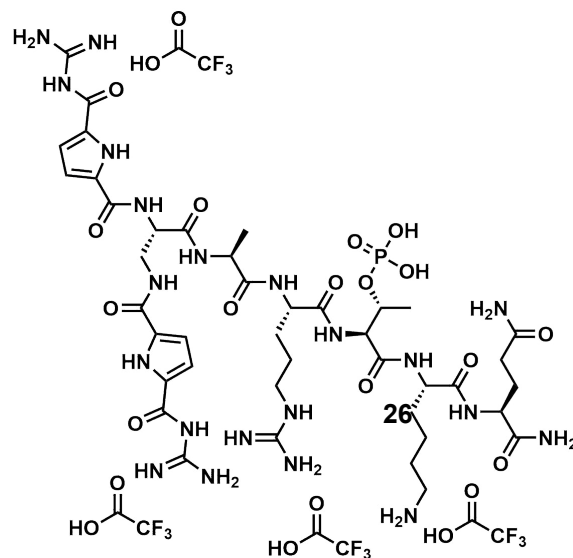
¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,10 - 1,15 (m, 3 H, CH₃ (β Ala)), 1,25 - 1,31 (m, 3 H, CH₃ (β Ala)), 1,32 - 1,44 (m, 11 H, CH₃ (β Thr), 2x CH₂ (γ Lys), 2x CH₂ (δ Lys)), 1,47 - 1,50 (m, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,61 - 1,70 (m, 6 H, 2x NH₃⁺ (Lys)), 1,71 - 1,87 (m, 6 H, 2x CH₂ (β Lys), CH₂ (β Gln)), 2,27 - 2,40 (m, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 2,91 - 3,02 (m, 7 H, NH₃⁺ (Ala), 2x CH₂ (ε Lys)), 3,68 - 3,82 (m, 4 H, 2x CH₂ (β Dap)), 3,83 - 3,92 (m, 1 H, CH (α Ala)), 4,09 - 4,18 (m, 2 H, 2x CH (α Lys)), 4,23 - 4,37 (m, 4 H, 2x CH (α Dap), CH (α Gln), CH (α Ala)), 5,87 - 5,98 (m, 1 H, CH (β pThr)), 6,77 - 6,88 (m, 4 H, 2x N_{Pyrrrol}H, 2x CH (GCP)), 7,01 - 7,16 (m, 4 H, NH₂ (Gln), CH (GCP)), 7,46 - 7,62 (m, 2 H, NH), 7,77 (m, 1 H, NH), 7,81 (m, 1 H, NH), 8,15 - 8,19 (m, 1 H, NH), 8,33 - 8,39 (m, 2 H, NH₂), 8,39 - 8,45 (m, 2 H, NH₂), 8,47 - 8,53 (m, 2 H, NH₂) 8,53 - 8,57 (m, 1 H, NH) 8,80 - 8,88 (m, 1 H, NH).

¹³C-NMR (151 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 16,4 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 16,7 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 18,1 (s, 1 C, CH₃ (γ Thr)), 18,9 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 22,1 (s, 2 C, 2x CH₂ (γ Lys)), 26,4 (s, 2 C, 2x CH₂ (δ Lys)), 26,7 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 30,2 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 30,5 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 31,1 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,5 (s, 2 C, 2x CH₂ (β Dap)), 39,7 (s, 1 C, CH₂ (ε Lys)), 40,5 (s, 1 C, CH₂ (ε Lys)), 49,3 (s, 1 C, CH (α Ala)), 50,2 (s, 1 C, CH (α Ala)), 53,4 (s, 2 C, 2x CH (α Lys)), 53,7 (s, 1 C, 2 C, 2x CH (α Dap)), 54,1 (s, 1 C, CH (α Gln)), 59,5 (s, 1 C, CH (α Thr)), 60,1 (s, 1 C, CH (α pThr)), 67,2 (s, 1 C, CH (β Thr)), 70,6 (s, 1 C, CH (β pThr)), 112,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 112,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 126,5 (s, 1 C, C_q (GCP)), 126,5 (s, 1 C, C_q (GCP)), 131,1 (s, 1 C, C_q (GCP)), 131,2 (s, 1 C, C_q (GCP)), 155,6 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 161,2 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 162,3 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 170,8 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,2 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,4 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,5 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 172,0 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,9 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 175,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 176,4 (s, 1 C, C_{Carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3280 (NH), 3093 (CH arom.), 2971 (CH aliph.), 2938 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2337 (C=O), 1678 (NH Peptid), 1670 (NH Peptid), 1651 (NH Peptid), 1633 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 452 [M+3H]³⁺ (100), 339 [M+4H]⁴⁺ (86), 678 [M+2H]²⁺ (27).
Berechnet für C₅₁H₈₄N₂₃O₁₉P [M+3H]³⁺: 452,2090 gefunden: 452,2100; berechnet für
C₅₁H₈₄N₂₃O₁₉P [M+4H]⁴⁺: 339,4086 gefunden: 339,4098; berechnet für
C₅₁H₈₄N₂₃O₁₉P [M+2H]²⁺: 677,8098 gefunden: 677,8105.

7.5. Synthese von 26



Chemical Formula: $C_{49}H_{70}F_{12}N_{21}O_{23}P$
Molecular Weight: 1580,18

Abbildung 72: Struktur des TFA-Salz' von **26**.

Die Allgemeine Vorschrift für die Mikrowellen-Synthese wurde verwendet. Hierfür wurden 200 mg Rink Amid-Harz (mesh 80-100, Beladung 0,8 mmol/g, 0,16 mmol, 1 Äq.) und für jede der folgenden Kupplung mit je 250 mg PyBOP (0,48 mmol, 3 Äq.) und 0,06 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,48 mmol, 3 Äq.) und folgenden Aminosäure-Bausteinen (0,48 mmol, 3 Äq.) in 5 mL DMF durchgeführt:

Tabelle 6: Massen und Reaktionszeit der für **26** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Gln-OH	177	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	246	30
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	311	30
Fmoc-Ala-OH	149	20
Fmoc-Dap(Fmoc)-OH	263	20

Zuletzt wurden zwei weitere Fmoc-Entschützung durchgeführt und 382 mg Boc-GCP-O HNEt₃ (0,96 mmol, 6 Äq.) mit 500 mg PyBOP (0,96 mmol, 6 Äq.) und 0,12 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,96 mmol, 6 Äq.) für 30 Minuten in 5 mL DMF gekuppelt. Das Peptid wurde nach Vorschrift abgespalten und mittels präparativer HPLC

gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 90% bis 88% H₂O über 25 min; t_R = 15,6 min). Erhalten wurden 2,1 mg des TFA Salzes (1,3 μmol, Ausbeute: 0,8 %) mit 97,8% Reinheit.

Schmelzpunkt: 189,3 °C (zers.)

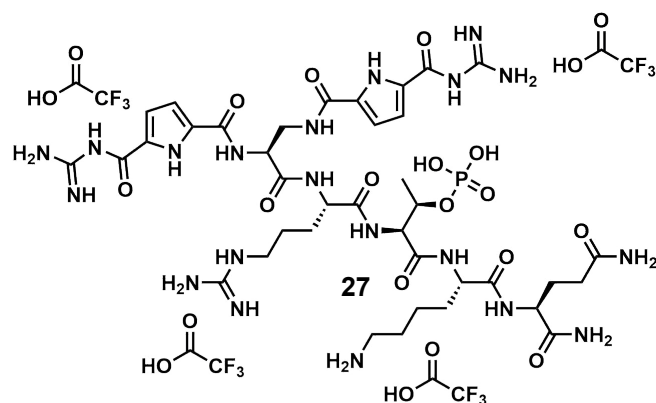
¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,32 (s, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,40 (br d, J=7,15 Hz, 3 H, CH₃ (β Ala)), 1,42 - 1,48 (m, 2 H, CH₂ (γ Lys)), 1,52 - 1,63 (m, 2 H, CH₂ (δ Lys)), 1,63 - 1,72 (m, 2 H, CH₂ (γ Arg)), 1,74 - 1,83 (m, 2 H, CH₂ (β Lys)), 1,83 - 1,92 (m, 2 H, CH₂ (β Arg)), 1,93 - 2,17 (m, 2 H, CH₂ (β Gln)), 2,34 - 2,39 (m, 1 H, CH₂ (γ Gln)), 2,96 - 3,02 (m, 3 H, CH₂ (γ Gln), CH₂ (ε Lys)), 3,11 - 3,18 (m, 2 H, CH₂ (δ Arg)), 3,86 - 3,90 (m, 2 H, CH₂ (β Dap)), 4,22 - 4,40 (m, 5 H, 5x C_αH), 4,60 - 4,66 (m, 1 H, CH (α pThr)), 4,66 - 4,72 (m, 1 H, CH (β pThr)), 6,89 - 6,92 (m, 1 H, CH (GCP)), 6,95 - 6,98 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,14 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,16 - 7,20 (m, 1 H, CH (GCP)).

¹³C-NMR (151 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 16,4 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 18,0 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 22,0 (s, 1 C, CH₂ (γ Lys)), 24,4 (s, 1 C, CH₂ (γ Arg)), 26,3 (s, 1 C, CH₂ (β Arg)), 26,8 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 28,0 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 30,4 (s, 1 C, CH₂ (δ Lys)), 31,2 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,2 (s, 2 C, CH₂ (ε Lys), CH₂ (δ Arg)), 40,5 (s, 1 C, CH₂ (β Dap)), 49,9 (s, 1 C, CH (α Ala)), 50,0 (s, 1 C, CH (α Arg)), 52,9 (s, 1 C, CH (α Gln)), 53,6 (s, 1 C, CH (α Lys)), 53,9 (s, 1 C, CH (α Dap)), 58,8 (s, 1 C, CH (α pThr)), 71,4 (s, 1 C, CH (β pThr)), 112,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 113,1 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,6 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,7 (s, 2 C, CH (GCP)), 126,1 (s, 1 C, C_q (GCP)), 126,4 (s, 1 C, C_q (GCP)), 130,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 131,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 155,2 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 156,7 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 160,8 (s, 2 C, C_{Carbonyl}), 161,8 (s, 4 C, C_{Carbonyl}), 162,5 (s, 2 C, C_{Carbonyl}), 171,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,4 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,6 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 174,0 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 174,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 175,8 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 177,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3284 (NH), 3068 (CH arom.), 2974 (CH aliph.), 2941 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2337 (C=O), 1695 (NH Peptid), 1670 (NH Peptid), 1653 (NH Peptid), 1635 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 375 [M+3H]³⁺ (100), 563 [M+2H]²⁺ (17). Berechnet für C₄₁H₆₆N₂₁O₁₅P [M+3H]³⁺: 375,5001 gefunden: 375,3639; berechnet für C₄₁H₆₆N₂₁O₁₅P [M+2H]²⁺: 562,7465 gefunden: 562,5801.

7.6. Synthese von 27



Chemical Formula: $C_{46}H_{65}F_{12}N_{20}O_{22}P$
Molecular Weight: 1509,10

Abbildung 73: Struktur des TFA-Salz' von **27**.

Die Synthese von **27** wurde analog zu der von **26** durchgeführt, lediglich mit folgenden Aminosäure-Bausteinen:

Tabelle 7: Massen und Reaktionszeit der für **27** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Gln-OH	177	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	246	30
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	311	30
Fmoc-Dap(Fmoc)-OH	263	20

Danach wurde ebenfalls analog eine weitere Kupplung mit den doppelten Äquivalenten an Boc-GCP-O HNEt₃ durchgeführt. Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz wurde es mittels präparativer HPLC gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 90% bis 87% H₂O über 20 min; t_R = 13,8 min). Erhalten wurden 3,2 mg des Produktes (2,1 µmol, Ausbeute: 1,3 %) als weißes Pulver mit einer Reinheit von 100,0%.

Schmelzpunkt: 166,3 °C (zers.)

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,29 (br d, *J* = 6,26 Hz, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,38 - 1,52 (m, 2 H, CH₂ (γ Lys)), 1,53 - 1,70 (m, 4 H, CH₂ (β Arg)), CH₂ (β Lys)), 1,71 - 2,02 (m, 2 H, CH₂ (γ Arg)), 2,03 - 2,15 (m, 2 H, CH₂ (β Gln)), 2,33 (br

t, $J = 7,63$ Hz, 2 H, CH_2 (γ Gln)), 2,90 - 3,01 (m, 2 H, CH_2 (ϵ Lys)), 3,07 - 3,15 (m, 2 H, CH_2 (δ Arg)), 3,84 - 3,98 (m, 2 H, CH_2 (β Dap)), 4,22 - 4,40 (m, 4 H, 4x $C_\alpha H$), 4,42 - 4,49 (m, 1 H, CH (α pThr)), 4,65 - 4,72 (m, 1 H, CH (β pThr)), 6,84 - 6,88 (m, 1 H, CH (GCP)), 6,95 - 7,01 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,10 - 7,19 (m, 2 H, 2x CH (GCP)), 8,09 - 8,18 (m, 1 H, NH), 8,21 - 8,27 (m, 1 H, NH), 8,31 - 8,38 (m, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (151 MHz, H_2O/D_2O 9/1) δ (ppm) = 18,1 (s, 1 C, CH_3 (γ pThr)), 22,1 (s, 1 C, CH_2 (γ Lys)), 24,6 (s, 1 C, CH_2 (γ Arg)), 26,3 (s, 1 C, CH_2 (β Arg)), 26,8 (s, 1 C, CH_2 (β Lys)), 27,8 (s, 1 C, CH_2 (β Gln)), 30,3 (s, 1 C, CH_2 (δ Lys)), 31,2 (s, 1 C, CH_2 (γ Gln)), 39,2 (s, 1 C, CH_2 (ϵ Lys)), 40,0 (s, 1 C, CH_2 (δ Arg)), 40,5 (s, 1 C, CH_2 (β Dap)), 53,0 (s, 1 C, CH (α Arg)), 54,1 (s, 1 C, CH (α Gln)), 54,71 (s, 1 C, CH (α Lys)), 55,38 (s, 1 C, CH (α Dap)), 59,18 (s, 1 C, CH (α pThr)), 70,7 (s, 1 C, CH (β pThr)), 112,6 (s, 1 C, CH (GCP)), 113,0 (s, 1 C, CH (GCP)), 116,0 (s, 1 C, CH (GCP)), 117,0 (s, 1 C, CH (GCP)).

IR(ATR) (cm^{-1}) = 3280 (NH), 3095 (CH arom.), 2974 (CH aliph.), 2939 (CH aliph.), 2359 ($C=O$), 2339 ($C=O$), 1670 (NH Peptid), 1653 (NH Peptid), 1635 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 352 [$M+3H$] $^{3+}$ (100), 527 [$M+2H$] $^{2+}$ (20). Berechnet für $C_{38}H_{61}N_{20}O_{14}P$ [$M+3H$] $^{3+}$: 351,8211 gefunden: 351,8325; berechnet für $C_{38}H_{61}N_{20}O_{14}P$ [$M+2H$] $^{2+}$: 527,2280 gefunden: 527,2455.

7.7. Synthese von 28

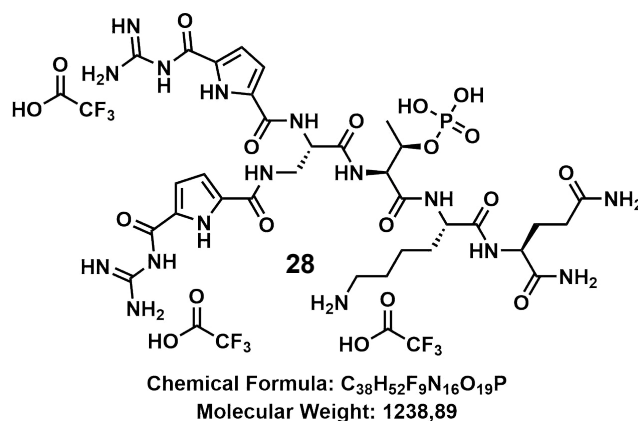


Abbildung 74: Struktur des TFA-Salz' von 28.

Die Synthese von 28 wurde analog zu 26 aber mit folgenden Aminosäure-Bausteinen durchgeführt:

Tabelle 8: Massen und Reaktionszeit der für 28 verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Gln-OH	177	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	225	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	246	30
Fmoc-Dap(Fmoc)-OH	263	20

Nach der Kupplung mit den doppelten Äquivalenten an Boc-GCP-O HNEt₃ wurde das Peptid vorschriftsgemäß vom Harz abgespalten. Anschließend wurde es mittels präparativer HPLC gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 92% bis 90% H₂O über 30 min; t_R = 8,8 min). Erhalten wurden 4,6 mg des Produkt (3,7 µmol, Ausbeute: 2,3 %) als weißes Pulver mit 99,2% Reinheit.

Schmelzpunkt: 187,9 °C (zers.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ (ppm) = 1,27 - 1,34 (m, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,38 - 1,50 (m, 2 H, CH₂ (γ Lys)), 1,64 - 1,71 (m, 2 H, CH₂ (β Gln)), 1,76 - 1,89 (m, 2 H, CH₂ (β Lys)), 1,92 - 2,14 (m, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 2,29 - 2,36 (m, 2 H, CH₂ (δ Lys)), 2,99 (br t, J=7,24 Hz, 2 H, CH₂ (ε Lys)), 3,89 - 3,93 (m, 2 H, CH₂ (β Dap)), 4,26 (dd, J=9,63, 5,04 Hz, 1 H, CH (α Lys)), 4,31 (dd, J=8,25, 5,87 Hz, 1 H, CH (α Gln)), 4,41 - 4,45 (m, 1 H, CH (α Dap)), 4,57 - 4,64 (m, 1 H, CH (α pThr)), 4,91 (s, 1 H, CH (β pThr)),

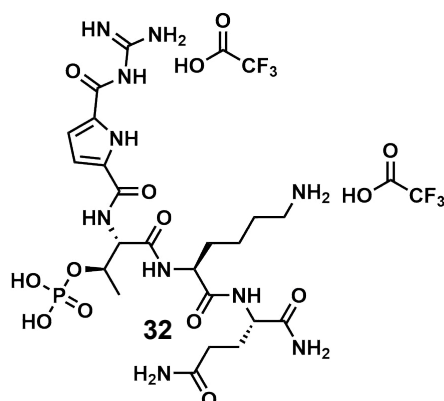
6,85 (s, 1 H, CH (GCP)), 6,94 (s, 1 H, CH (GCP)), 7,11 (s, 1 H, CH (GCP)), 7,13 (s, 1 H, CH (GCP)).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) δ (ppm) = 18,0 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 22,1 (s, 1 C, CH₂ (γ Lys)), 26,4 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 26,9 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 31,2 (s, 1 C, CH₂ (δ Lys)), 34,8 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,5 (s, 1 C, CH₂ (ε Lys)), 44,8 (s, 1 C, CH₂ (β Dap)), 53,0 (s, 1 C, CH (α Gln)), 54,0 (s, 2 C, CH (α Lys), CH (α Dap)), 59,6 (s, 1 C, CH (α pThr)), 71,0 (s, 1 C, CH (β pThr)), 112,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 113,4 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,4 (s, 2 C, 2x CH (GCP)), 117,4 (s, 2 C, C_q (GCP)), 155,5 (s, 2 C, C_{carbonyl}), 160,9 (s, 2 C, C_{carbonyl}), 162,9 (s, 2 C, C_{carbonyl}), 171,3 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 173,7 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 175,9 (s, 2 C, C_{carbonyl}), 177,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3288 (NH), 3095 (CH arom.), 2974 (CH aliph.), 2937 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2339 (C=O), 1670 (NH Peptid), 1653 (NH Peptid), 1635 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 449 [M+2H]²⁺ (100). Berechnet für C₃₂H₄₉N₁₆O₁₃P [M+2H]²⁺: 449,1774 gefunden: 449,1774.

7.8. Synthese von 32



Chemical Formula: $C_{26}H_{39}F_6N_{10}O_{14}P$
Molecular Weight: 860,62

Abbildung 75: Struktur des TFA-Salz' von **32**.

Für die Synthese von **32** wurden 200 mg des Rink-Amid Harzes (100-200 mesh, Beladung 0,4 mmol/g, 0,08 mmol, 1 Äq.) verwendet. Für jede Kupplung wurde jeweils 125 mg PyBOP (0,24 mmol, 3 Äq.), 0,03 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,24 mmol, 3 Äq.) und den entsprechenden Aminosäure-Baustein (0,24 mmol, 3 Äq.) in 5 ml DMF verwendet.

Tabelle 9: Massen und Reaktionszeit der für **32** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Gln-OH	88	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	112	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	123	30
Boc-GCP-O ⁻ HNEt ₃	95	30

Daraufhin wurde das Peptid nach Vorschrift vom Harz abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt ($H_2O/ACN + 0,1\%$ TFA; 95% H_2O isokratisch; $t_R = 13,4$ min). Das Produkt konnte als weißes Pulver (8,3 mg, 9,6 μ mol, Ausbeute: 12,1%) mit einer Reinheit von 98,04% isoliert werden.

Schmelzpunkt: 179,3 °C (zers.)

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 1,36 - 1,40 (m, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,41 - 1,53 (m, 2 H, CH₂ (γ Lys)), 1,64 - 1,74 (m, 2 H, CH₂ (β Gln)), 1,76 - 1,91 (m, 2 H, CH₂ (β Lys)), 1,93 - 2,13 (m, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 2,27 - 2,33 (m, 2 H, CH₂ (δ Lys)), 2,96 - 3,04 (m, 2 H, CH₂ (ε Lys)), 4,29 (m, 1 H, CH (α Lys)), 4,34 - 4,41 (m, 1 H, CH (α Gln)), 4,49 (m, 1 H, CH (α pThr)), 4,60 - 4,66 (m, 1 H, CH (β pThr)), 6,80 (br s, 1 H, NH (GCP)), 7,02 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,09 - 7,13 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,14 (m, 1 H, CH (GCP)), 7,45 - 7,59 (m, 1 H, NH), 7,67 (s, 1 H, NH), 8,10 (br s, 2 H, NH), 8,38 (m, 1 H, NH), 8,65 (m, 1 H, NH), 8,79 (m, 1 H, NH).

¹³C-NMR (151 MHz, H₂O/D₂O 9/1) δ (ppm) = 18,2 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 22,1 (s, 1 C, CH₂ (γ Lys)), 26,4 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 26,9 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 30,2 (s, 1 C, CH₂ (δ Lys)), 31,2 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,6 (s, 1 C, CH₂ (ε Lys)), 53,1 (s, 1 C, CH (α Gln)), 53,9 (s, 1 C, CH (α Lys)), 60,1 (s, 1 C, CH (α pThr)), 71,4 (s, 1 C, CH (β pThr)), 113,5 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,6 (s, 1 C, CH (GCP)), 126,6 (s, 1 C, C_q (GCP)), 130,8 (s, 1 C, C_q (GCP)), 155,5 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 160,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 162,3 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 171,8 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 173,7 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 176,0 (s, 1 C, C_{carbonyl}), 177,9 (s, 1 C, C_{carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3284 (NH), 3095 (CH arom.), 2974 (CH aliph.), 2939 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2341 (C=O), 1670 (NH Peptid), 1635 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 317 [M+2H]²⁺ (100), 633 [M+H]⁺ (17). Berechnet für C₂₂H₃₇N₁₀O₁₀P [M+2H]²⁺: 317,1289 gefunden: 317,1293; berechnet für C₂₂H₃₇N₁₀O₁₀P [M+H]⁺: 633,2505 gefunden: 633,2501.

7.9. Synthese von 33

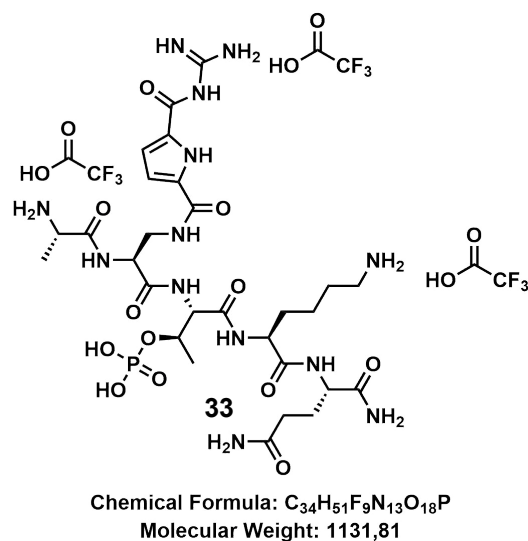


Abbildung 76: Struktur des TFA-Salz' von **33**.

Die Synthese von **33** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift mit 200 mg Rink Amid (mesh 100-200, Beladung 0,4 mmol/g, 0,08 mmol, 1 Äq.) durchgeführt. Dafür wurden für jeden Kupplungsschritt 124,8 mg PyBOP (0,24 mmol, 3 Äq.), 0,03 mL 2,4,6-Trimethylpyridin (0,24 mmol, 3 Äq.) und den entsprechenden Aminosäure-Baustein in 5 mL DMF verwendet.

Tabelle 10: Massen und Reaktionszeit der für **33** verwendeten Aminosäure-Bausteine in chronologischer Reihenfolge.

Aminosäure-Baustein	Masse (mg)	Reaktionszeit (min)
Fmoc-Gln-OH	88	20
Fmoc-Lys(Boc)-OH	112	20
Fmoc-Thr(PO(OBnz)OH)-OH	123	30
Fmoc-Dap(Alloc)-OH	99	20
Boc-Ala-OH	45	20

Nach diesen Schritten wurde zweimal eine Alloc-Entschützung durchgeführt und das Harz anschließend sechsmal mit je 10 mL DCM gewaschen. Eine weitere Kupplung unter den oben genannten Bedingungen, jedoch mit 95 mg Boc-GCP-O⁻ ⁺HNEt₃ (0,24 mmol, 3 Äq.) statt eines Aminosäure-Bausteins wurde mit einer Reaktionszeit von 30 min durchgeführt. Anschließend würde das Peptid vorschriftsgemäß abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (H₂O/ACN + 0,1% TFA; Gradient 95% bis 90% H₂O über 30 min; t_R = 10,4 min). Erhalten wurden 12,7 mg eines weißen Pulvers (11,2 µmol, Ausbeute: 14,0 %) mit einer Reinheit von 100%.

Schmelzpunkt: 192,7 °C (zers.)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ (ppm) = 1,27 - 1,32 (m, 3 H, CH₃ (β pThr)), 1,37 - 1,48 (m, 5 H, CH₂ (γ Lys), CH₃ (β Ala)), 1,77 (m, 2 H, 2 H, CH₂ (β Lys)), 1,80 - 1,89 (m, 2 H, CH₂ (β Gln)), 1,31 - 2,15 (m, 2 H, CH₂ (δ Lys)), 2,34 (br t, 7,48 Hz, 2 H, CH₂ (γ Gln)), 2,95 - 3,03 (m, 2 H, CH₂ (ε Lys)) , 3,72 - 3,92 (m, 2 H, CH₂ (β Dap)), 4,10 - 4,16 (m, 1 H, CH (α Ala)), 4,17 - 4,20 (m, 1 H, CH (α Lys)), 4,23 - 4,27 (m, 1 H, CH (α Gln)), 4,27 - 4,31 (m, 1 H, CH (α Dap)), 4,37 - 4,43 (m, 1 H, CH (α pThr)), 4,55 - 4,89 (m, 1 H, CH (β pThr)), 6,84 - 6,92 (br d, *J*=4,11 Hz, 1 H, CH (GCP)), 7,13 (br d, *J*=4,11 Hz, 1 H, CH (GCP)).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) δ (ppm) = 16,7 (s, 1 C, CH₃ (β Ala)), 18,2 (s, 1 C, CH₃ (γ pThr)), 22,1 (s, 1 C, CH₂ (γ Lys)), 26,3 (s, 1 C, CH₂ (β Lys)), 26,8 (s, 1 C, CH₂ (β Gln)), 30,0 (s, 1 C, CH₂ (δ Lys)), 31,2 (s, 1 C, CH₂ (γ Gln)), 39,2 (s, 2 C, CH₂ (ε Lys), CH₂ (β Dap)), 49,1 (s, 1 C, CH (α Ala)), 52,7 (s, 1 C, CH (α Gln)), 52,9 (s, 1 C, CH (α Lys)), 53,7 (s, 1 C, CH (α Dap)), 60,9 (s, 1 C, CH (α pThr)), 69,7 (s, 1 C, CH (β pThr)), 112,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 115,7 (s, 1 C, CH (GCP)), 162,4 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,1 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,6 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 171,8 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 173,6 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 175,8 (s, 1 C, C_{Carbonyl}), 177,8 (s, 1 C, C_{carbonyl}).

IR(ATR) (cm⁻¹) = 3282 (NH), 3093 (CH arom.), 2974 (CH aliph.), 2939 (CH aliph.), 2359 (C=O), 2339 (C=O), 1670 (NH Peptid), 1635 (NH Peptid).

ESI-HRMS m/z (%): 396 [M+2H]³⁺ (100), 264 [M+3H]³⁺ (50), 790 [M+H]⁺ (4).
Berechnet für C₂₈H₄₈N₁₃O₁₂P [M+2H]²⁺: 395,6714 gefunden: 395,6714; berechnet für C₂₈H₄₈N₁₃O₁₂P [M+3H]³⁺: 264,1197 gefunden: 264,1162.

8. Literaturverzeichnis

- 1: WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; **2020**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1267643/retrieve>
- 2: A. Rafatmanesh, M. Behjati, N. Mobasser, M. Sarvizadeh, T. Mazoochi, und M. Karimian (**2020**), The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer. *J. Cell Physiol.*, 235(2): 725-744.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29027>
- 3: S. Fukuda und L. M. Pelus (**2006**), Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5): 1087-1098.
<http://mct.aacrjournals.org/content/5/5/1087.abstract>
- 4: S. K. Knauer, W. Mann und R. H. Stauber (**2007**), Survivin's Dual Role: An Export's View. *Cell Cycle*, 6(5): 518-521. <https://doi.org/10.4161/cc.6.5.3902>
- 5: F. Li, I. Aljahdali, X. Ling (**2019**), Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study?. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38 (1): 368. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1362-1>
- 6: D. Martínez-García, N. Manero-Rupérez, R. Quesada, L. Korrodi-Gregório, V. Soto-Cerrato (**2018**), Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer. *Medicinal Research Reviews*, 39(3): 887-909. <https://doi.org/10.1002/med.21547>
- 7: J. Du, A. E. Kelly, H. Funabiki und D. J. Patel (**2012**), Structural Basis for Recognition of H3T3ph and Smac/DIABLO N-terminal Peptides by Human Survivin. *Structure*, 20(1): 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.12.001>
- 8: C. Vallet, D. Aschmann, C. Beuck, M. Killa, A. Meiners, M. Mertel, M. Ehlers, P. Bayer, C. Schmuck, M. Giese, and S. K. Knauer (**2020**), Functional Disruption of the Cancer-Relevant Interaction between Survivin and Histone H3 with a Guanidiniocarbonyl Pyrrole Ligand. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59(14): 5597-5571.
<https://doi.org/10.1002/anie.201915400>
- 9: D. Aschmann, C. Vallet, S. K. Tripathi, Y. B. Ruiz-Blanco, M. Brabender, C. Schmuck, E. Sanchez-Garcia, S. K. Knauer, M. Giese (**2022**), Selective Disruption of Survivin's Protein-Protein Interactions: A Supramolecular Approach Based on

Guanidiniocarbonylpyrrole. ChemBioChem, 23(5): e202100618.

<https://doi.org/10.1002/cbic.202100618>

10: M. Giese, J. Niemeyer und J. Voskuhl, (2020), Guanidiniocarbonyl-Pyrroles (GCP) – 20 Years of the Schmuck Binding Motif. ChemPlusChem, 85(5): 985-997.

<https://doi.org/10.1002/cplu.202000142>

11: C. Schmuck und V. Bickert (2007), Oxoanion Binding by Flexible Guanidiniocarbonyl Pyrrole–Ammonium Bis-Cations in Water. J. Org. Chem., 72: 6832-6839.

<https://doi.org/10.1021/jo070981z>

12: C. Schmuck und L. Geiger (2005), Design and synthesis of a new class of arginine analogues with an improved anion binding site in the side chain. Chem. Commun., 6: 772-774.

<http://dx.doi.org/10.1039/B415543B>

13: O. Safarowsky, B. Windisch, A. Mohry, F. Vögtle (2000), Nomenclature for catenanes, rotaxanes, molecular knots, and assemblies derived from these structuralelements. Journal für praktische Chemie, 342(5): 437-444.

[https://doi.org/10.1002/1521-3897\(200006\)342:5<437::AID-PRAC437>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3897(200006)342:5<437::AID-PRAC437>3.0.CO;2-7)

14: H.-J. Schneider (2009), Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes.

Angew. Chem. Int. Ed., 48(22): 3924-3977. <https://doi.org/10.1002/anie.200802947>

15: M. Fleischer und C. Schmuck (2014), Transforming polyethylenimine into apH-switchable hydrogel by additional supramolecular interactions. Chem. Commun., 50: 10464.

<https://doi.org/10.1039/C4CC03281K>

16: M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer und C. Schmuck (2015), A Tailor-Made Specific Anion-Binding Motif in the Side Chain Transforms a Tetrapeptide into an Efficient Vector for Gene Delivery. Angew. Chem. Int. Ed., 54: 2941-2944.

<https://doi.org/10.1002/anie.201410429>

17: H. Y. Kuchelmeister, A. Gutschmidt, S. Tillmann, S. Knauer und C. Schmuck (2012), Efficient gene delivery into cells by a surprisingly small three-armed peptideligand. Chem. Sci., 3: 996-1002.

<https://doi.org/10.1039/C2SC01002J>

18: S. Junghänel, S. Karczewski, S. Bäcker, S. K. Knauer und C. Schmuck (2017), A Systematic Structure–Activity Study of a New Type of Small Peptidic Transfection Vector Reveals the Importance of a Special Oxo-Anion-Binding Motif for Gene Delivery. ChemBioChem, 18: 2268-2279.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201700433>

19: H. Jiang, X.-Y. Hu, S. Mosel, S. K. Knauer, C. Hirschhäuser, und C. Schmuck (2019), A Branched Tripeptide with an Anion-Binding Motif as a New Delivery Carrier for Efficient Gene Transfection. *ChemBioChem*, 20: 1410-1416.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201800728>

20: Q.-Q. Jiang, L. Bartsch, W. Sicking, P. R. Wich, D. Heider, D. Hoffmann und C. Schmuck (2013), A new approach to inhibit human β -tryptase by proteinsurface binding of four-armed peptide ligands with two different sets of arms. *Org. Biomol. Chem.*, 11: 1631-1639. <https://doi.org/10.1039/C3OB27302D>

21: Q.-Q. Jiang, W. Sicking, M. Ehlers und C. Schmuck (2015), Discovery of potent inhibitors of human β -tryptase from pre-equilibrated dynamic combinatorial libraries. *Chem. Sci.*, 6: 1792. <https://doi.org/10.1039/C4SC02943G>

22: A. Gigante, E. Sijbesma, P. A. Sanchez-Murcia, X. Hu, D. Bier, S. Becker, S. Knauer, F. Gago, Ch. Ottmann und C. Schmuck (2020), A Supramolecular Stabilizer of the 14-3-3 ζ /ER α Protein-Protein Interaction with a Synergistic Mode of Action. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59: 5284. <https://doi.org/10.1002/anie.201914517>

23: A. Gigante, J.-N. Grad, J. Briels, M. Bartel, D. Hoffmann, C. Ottmann und C. Schmuck (2019), A new class of supramolecular ligands stabilizes 14-3-3 protein-protein interactions by up to two orders of magnitude. *Chem. Commun.*, 55: 111. <https://doi.org/10.1039/C8CC07946C>

24: M. Ehlers, J.-N. Grad, S. Mittal, D. Bier, M. Mertel, L. Ohl, M. Bartel, J. Briels, M. Heimann, Ch. Ottmann, E. Sanchez-Garcia, D. Hoffmann und C. Schmuck (2018), Rational Design, Binding Studies, and Crystal-Structure Evaluation of the First Ligand Targeting the Dimerization Interface of the 14-3-3 ζ Adapter Protein. *ChemBioChem*, 19: 591-595. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700588>

25: L. Bartsch, M. Bartel, A. Gigante, J. Iglesias-Fernández, Y. B. Ruiz-Blanco, Ch. Beuck, J. Briels, N. Toetsch, P. Bayer, E. Sanchez-Garcia, Ch. Ottmann, und C. Schmuck (2019), Multivalent Ligands with Tailor-Made Anion Binding Motifs Stabilizers of Protein-Protein Interactions. *ChemBioChem*, 20: 2921 - 2926. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900288>

- 26: C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T.s Rehm und U. Machon (**2008**), A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of N-Protected 5-(Guanidinocarbonyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic Acids. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(2): 324-329.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.200700756>
- 27: C. Schmuck und D. Rupprecht (**2007**), The Synthesis of Highly Functionalized Pyrroles: A Challenge in Regioselectivity and Chemical Reactivity. *Synthesis*, (20): 3095-3110. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990783>
- 28: A. A. Jeyaprakash, C. Basquin, U. Jayachandran und E. Conti (**2011**), Structural Basis for the Recognition of Phosphorylated Histone H3 by the Survivin Subunit of the Chromosomal Passenger Complex. *Structure*, 19(11): 1625-1634.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.002>
- 29: S. Ruchaud, M. Carmena und W. C. Earnshaw (**2007**), The Chromosomal Passenger Complex: One for All and All for One. *Cell*, 131(2): 230-231.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.002>
- 30: M. Carmena, M. Wheelick, H. Funabiki und W. C. Earnshaw (**2012**), The Chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12): 789-803.
<https://doi.org/10.1038/nrm3474>
- 31: A. M. Aljaberi, J. R. M. Webster und S. P. Wheatley (**2015**), Mitotic activity of survivin is regulated by acetylation at K129. *Cell Cycle*, 14(11): 1738-1747.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1033597>
- 32: G. Troiano, A. Guida, G. Aquino, G. Botti, N. S. Losito, S. Papagerakis, M. C. Pedicillo, F. Ionna, F. Longo, M. Cantile, A. Pennella, L. Lo Russo, G. Di Gioia, M. A. Marigiò, L. Lo Muzio und G. Pannone (**2018**), Integrative Histologic and Bioinformatics Analysis of BIRC5/Survivin Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9): 2664.
<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2664>
- 33: S. W. Muchmore, J. Chen, C. Jakob, D. Zakula, E. D. Matayoshi, W. Wu, H. Zhang, F. Li, S.-C. Ng und D. C. Altieri (**2000**), Crystal Structure and Mutagenic Analysis of the Inhibitor-of-Apoptosis Protein Survivin. *Molecular Cell*, 6(1): 173-182.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00019-5)

- 34: M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida und I. W. Mattaj (**1997**), CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell*, 90(6): 1051-1060.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80371-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80371-2)
- 35: U. Kutay und S. Güttinger (**2005**), Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in Cell Biology*, 15(3): 121-124.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.005>
- 36: G. Ambrosini, C. Adida und D. C. Altieri (**1997**), A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8): 917-921.
<https://doi.org/10.1038/nm0897-917>
- 37: V. Vaira, C. W. Lee, H. L. Goel, S. Goel, S. Bosari, L. R. Languino und D.C. Altieri (**2007**), Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene*, 26(19): 2678-2684. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210094>
- 38: M. Miliaraki, P. Briassoulis, S. Ilija, A. Polonifi, M. Mantzourani, E. Briassouli, K.Vardas, S. Nanas, A. Pistiki, M. Theodorakopoulou, T. Tavladaki, A. M. Spanaki, E. Kondili, H. Dimitriou, S. Tsiodras, D. Georgopoulos, A. Armaganidis, G. Daikos und G. Briassoulis (**2021**), Survivin and caspases serum protein levels and survivin variants mRNA expression in sepsis. *Scientific Reports*, 11(1): 1049.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78208-2>
- 39: R. M. A. Barrett, T. P. Osborne und S. P. Wheatley (**2009**), Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle*, 8(2): 278-283. <https://doi.org/10.4161/cc.8.2.7587>
- 40: N. R. Wall, D. S. O'Connor, J. Plescia, Y. Pommier und D. C. Altieri (**2003**), Suppression of Survivin Phosphorylation on Thr34 by Flavopiridol Enhances Tumor Cell Apoptosis. *Cancer Res*, 63(1): 230-235.
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/1/230/2502958/ch0103000230.pdf>
- 41: Ch. Sun, D. Nettlesheim, Zh. Liu und E. T. Olejniczak (**2005**), Solution Structure of Human Survivin and Its Binding Interface with Smac/Diablo. *Biochemistry*, 44(1): 11-17. <https://doi.org/10.1021/bi0485171>
- 42: G. Vader, R. H. Medema und S. M.A. Lens (**2006**), The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*, 173(6): 833-837.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200604032>

-
- 43: L. Capalbo, E. Montembault, T. Takeda, Z. I. Bassi, D. M. Glover und P. P. D'Avino (**2012**), The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biology*, 2(5): 120070. <https://doi.org/10.1098/rsob.120070>
- 44: S. K Knauer, C. Bier, N. Habtemichael und R. H. Stauber (**2006**), The Survivin–Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO reports*, 7: 1259-1265. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400824>
- 45: A. Berezov, Z. Cai, J. A. Freudenberg, H. Zhang, X. Cheng, T. Thompson, R. Murali, M. I. Greene und Q. Wang (**2012**), Disabling the mitotic spindle and tumor growth by targeting a cavity-induced allosteric site of survivin. *Oncogene*, 31: 1938–1948. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.377>
- 46: R. Colnaghi und S. P. Wheatley (**2010**), Liaisons between Survivin and Plk1 during Cell Division and Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29): 22592-22604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065003>
- 47: S. P. Wheatley, R. M. Barrett, P. D. Andrews, R. H. Medema, S. J. Morley, J. R. Swedlow und S. M.A. Lens (**2007**), Phosphorylation by Aurora-B Negatively Regulates Survivin Function During Mitosis. *Cell Cycle*, 6(10): 1220-1230. <https://doi.org/10.4161/cc.6.10.4179>
- 48: Q. P. Vong, K. Cao, H. Y. Li, P. A. Iglesias und Y. Zheng (**2005**), Chromosome Alignment and Segregation Regulated by Ubiquitination of Survivin. *Science*, 310(5753): 1499-1504. <https://doi.org/10.1126/science.1120160>
- 49: M. Carmena, S. Ruchaud und W. C. Earnshaw (**2009**), Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6): 796-805. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.008>
- 50: F. Wang, J. Da, J. R. Daum, E. Niedzialkowska, B. Banerjee, P. T. Stukenberg, G. J. Gorbsky und J. M. G. Higgins (**2010**), Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis. *Science*, 330 (6001): 231-235. <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.1189435>
- 51: E. Petsalaki, T. Akoumianaki, E. J. Black, D. A. F. Gillespie und G. Zachos (**2011**), Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J Cell Biol*, 195(3): 449-466. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104023>

- 52: J. D. Bishop und J. M. Schumacher (**2002**), Phosphorylation of the Carboxyl Terminus of Inner Centromere Protein (INCENP) by the Aurora B Kinase Stimulates Aurora B Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31): 27577 - 27580. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200307200>
- 53: F. Sessa, M. Mapelli, C. Ciferri, C. Tarricone, L. B. Areces, T. R. Schneider, P. T. Stukenberg und A. Musacchio (**2005**), Mechanism of Aurora B Activation by INCENP and Inhibition by Hesperadin. *Molecular Cell*, 18(3): 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.031>
- 54: F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio und D. C. Altieri (**1998**), Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396: 580-584. <https://www.nature.com/articles/25141>
- 55: D. R. Matson, P. B. Demirel, T. Stukenberg und D. J. Burke (**2012**), A conserved role for COMA/CENP-H/I/Nkinetochore proteins in the spindle checkpoint. *Genes & Dev.*, 26: 542-547. <http://genesdev.cshlp.org/content/26/6/542.abstract>
- 56: M. Maldonado und T. M. Kapoor (**2011**), Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat Cell Biol* , 13: 475-782. <https://doi.org/10.1038/ncb2223>
- 57: Zh. Xu, H. Ogawa, P. Vagnarelli, J. H. Bergmann, D. F. Hudson, S. Ruchaud, T. Fukagawa, W. C. Earnshaw und K. Samejima (**2009**), INCENP–aurora B interactions modulate kinase activity and chromosome passenger complex localization. *J Cell Biol*, : 637-653. <https://doi.org/10.1083/jcb.200906053>
- 58: S. Hümmer und T. U. Mayer (**2009**), Cdk1 Negatively Regulates Midzone Localization of the Mitotic Kinesin Mklp2 and the Chromosomal Passenger Complex. *Current Biology*, 19(7): 607-612. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.046>
- 59: K. Ramadan, R. Bruderer, F. M. Spiga, O. Popp, T. Baur, M. Gotta und H. H. Meyer (**2007**), Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature*, 450: 1258-1262. <https://doi.org/10.1038/nature06388>
- 60: T. Zimniak, V. Fitz, H. Zhou, F. Lampert, S. Opravil, K. Mechtler, P. Stolt-Bergner und S. Westermann (**2012**), Spatiotemporal Regulation of Ipl1/Aurora Activity by

Direct Cdk1 Phosphorylation. *Current Biology*, 22(9): 787-793.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.007>

61: M. E. Douglas, T. Davies, N. Joseph und M. Mishima, (2010), Aurora B and 14-3-3 Coordinately Regulate Clustering of Centralspindlin during Cytokinesis. *Current Biology*, 20(10): 927-933. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.055>

62: A. Eberharter und P. B. Becker (2002), Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*, 3(3): 224-229.

<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf053>

63: F. Hans und S. Dimitrov (2001), Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20: 3021-3027. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204326>

64: T. Kouzarides (2007), Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

65: D. Rossetto, N. Avvakumov und J. Côté (2012), Histone phosphorylation. *Epigenetics*, 7 (10): 1098-1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>

66: E. A. Nigg (2001), Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 21-32. <https://doi.org/10.1038/35048096>

67: J. Dai und J. M.G. Higgins (2005), Haspin: A Mitotic Histone Kinase Required for Metaphase Chromosome Alignment. *Cell Cycle*, 4(5): 665-668.

<https://doi.org/10.4161/cc.4.5.1683>

68: A. E. Kelly, C. Ghenoiu, J. Z. Xue, Ch. Zierhut, H. Kimura und H. Funabiki (2010), Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B. *Science*, 330(6001): 235-239.

<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1189505>

69: J. C. Melms, S. Vallabhaneni, C. E. Mills, C. Yapp, J.-Y. Chen, E. Morelli, P. Waszyk, S. Kumar, D. Deming, N. Moret, S. Rodriguez, K. Subramanian, M. Rogava, A. N.R. Cartwright, A. Luoma, S. Mei, T. J. Brinker, D. M. Miller, A. Spektor, D. Schadendorf, N. Riggi, K. W. Wucherpfennig, P. K. Sorger und B. Izar (2020), Inhibition of Haspin Kinase Promotes Cell-Intrinsic and Extrinsic Antitumor Activity. *Cancer Res*, 80(4): 798-810. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/80/4/798>

70: H. Polioudaki, Y. Markaki, N. Kourmouli, G. Dialynas, P. A. Theodoropoulos, P. B. Singh und S. D. Georgatos (2004), Mitotic phosphorylation of histone H3 at

threonine 3. FEBS Letters, 560(1-3): 39-44. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00060-2)

71: F. Wang, N. P. Ulyanova, M. S. van der Waal, D. Patnaik, S. M. A. Lens und J. M. G. Higgins (2011), A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Current Biology*, 21 (12): 1061-1069. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.016>

72: E. Niedzialkowska, F. Wang, P. J. Porebski, W. Minor, J. M. G. Higgins und P. T. Stukenberg (2012), Molecular basis for phosphospecific recognition of histone H3 tails by Survivin paralogues at inner centromeres. *Molecular Biology of the Cell*, 23 (8) : 1457-1466. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-11-0904>

73: Q. Cheng, X. Ling, A. Haller, T. Nakahara, K. Yamanaka, A. Kita, H. Koutoku, M. Takeuchi, M. G. Brattain und F. Li (2012), Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(2): 179-197. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388737/>

74: N. Nakamura, T. Yamauchi, M. Hiramoto, M. Yuri, M. Naito, M. Takeuchi, K. Yamanaka, A. Kita, T. Nakahara, I. Kinoyama, A. Matsuhisa, N. Kaneko, H. Koutoku, M. Sasamata, H. Yokota, S. Kawabata und K. Furuichi (2012), Interleukin Enhancer-binding Factor 3/NF110 Is a Target of YM155, a Suppressant of Survivin. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(7): M111.013243-1 - M111.013243-6. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.013243>

75: T. Yamauchi, N. Nakamura, M. Hiramoto, M. Yuri, H. Yokota, M. Naitou, M. Takeuchi, K. Yamanaka, A. Kita, T. Nakahara, I. Kinoyama, A. Matsuhisa, N. Kaneko, H. Koutoku, M. Sasamata, M. Kobori, M. Katou, S. Tawara, S. Kawabata und K. Furuichi (2012), Sepantronium Bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54nrb complex, which is required for survivin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4): 711-716. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.103>

76: T. Iwasa, I. Okamoto, M. Suzuki, T. Nakahara, K. Yamanaka, E. Hatashita, Y. Yamada, M. Fukuoka, K. Ono und K. Nakagawa (2008), Radiosensitizing Effect of YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, in Non-Small Cell Lung

Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research*, 14(20): 6496-6504.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0468>

77: H. Tang, H. Shao, Ch. Yu und J. Hou (**2011**), Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochemical Pharmacology*, 82(3): 1066-1072. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.064>

78: T. G. Glaros, L. H. Stockwin, M. E. Mullendore, B. Smith, B. L. Morrison und D. L. Newton (**2012**), The “survivin suppressants” NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(1): 207-212. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1868-0>

79: M. Hong, M.-Q. Ren, J. Silva, A. Paul, W. D. Wilson, C. Schroeder, P. Weinberger, J. Janik und Z. Hao (**2017**), YM155 inhibits topoisomerase function. *Anticancer Drugs*, 12(2): 142-152. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27754993>

80: T. Iwasa, I. Okamoto, K. Takezawa, K. Yamanaka, T. Nakahara, A. Kita, H. Koutoku, M. Sasamata, E. Hatashita, Y. Yamada, K. Kuwata, M. Fukuoka und K. Nakagawa (**2010**), Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *British Journal of Cancer*, 103(1): 36-42. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605713>

81: T. Nakahara, M. Takeuchi, I. Kinoyama, T. Minematsu, K. Shirasuna, A. Matsuhisa, A. Kita, F. Tominaga, K. Yamanaka, M. Kudoh und M. Sasamata (**2007**), M155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Research*, 67(17): 8014-8021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1343>

82: Y.-S. Na, S.-J. Yang, S.-M. Kim, K.-A. Jung, J.-H. Moon, J.-S. Shin, D. H. Yoon, Y. S. Hong, M.-H. Ryu, J.-L. Lee, J. S. Lee und T. W. Kim (**2012**), YM155 Induces EGFR Suppression in Pancreatic Cancer Cells. *PLOS ONE*, 7(6): e38625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038625>

83: K. Yamanaka, T. Nakahara, T. Yamauchi, A. Kita, M. Takeuchi, F. Kiyonaga, N. Kaneko und M. Sasamata (**2011**), Antitumor Activity of YM155, a Selective Small-Molecule Survivin Suppressant, Alone and in Combination with Docetaxel in Human Malignant Melanoma Models. *Clinical Cancer Research*, 17(16): 5423-5431. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3410>

- 84: K. Yamanaka, M. Nakata, N. Kaneko, H. Fushiki, A. Kita, T. Nakahara, H. Koutoku und M. Sasamata (2011), YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. *International Journal of Oncology*, 575(3): 569-575. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1077>
- 85: T. Satoh, I. Okamoto, M. Miyazaki, R. Morinaga, A. Tsuya, Y. Hasegawa, M. Terashima, S. Ueda, M. Fukuoka, Y. Ariyoshi, T. Saito, N. Masuda, H. Watanabe, T. Taguchi, T. Kakiyama, Y. Aoyama, Y. Hashimoto und K. Nakagawa (2009), Phase I Study of YM155, a Novel Survivin Suppressant, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* , 15(11): 3872-3880. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1946>
- 86: A. W. Tolcher, A. Mita, L. D. Lewis, Ch. R. Garrett, E. Till, A. I. Daud, A. Patnaik, K. Papadopoulos, Ch. Takimoto, P. Bartels, A. Keating und S. Antonia (2008), Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J Clin Oncol.*, 26(32): 5198-5203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879696/>
- 87: R.J. Kelly, A. Thomas, A. Rajan, G. Chun, A. Lopez-Chavez, E. Szabo, S. Spencer, C.A. Carter, U. Guha, S. Khozin, S. Poondru, C. Van Sant, A. Keating, S.M. Steinberg, W. Figg und G. Giaccone (2013), A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 24(10): 2601-2606. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt249>
- 88: K. P. Papadopoulos, J. Lopez-Jimenez, S. E. Smith, J. Steinberg, A. Keating, C. Sasse, F. Jie und A. Thyss (2016), A multicenter phase II study of sepantronium bromide (YM155) plus rituximab in patients with relapsed aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 57(8): 1848-1855. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1113275>
- 89: M. R. Clemens, O. A. Gladkov, E. Gartner, V. Vladimirov, J. Crown, J. Steinberg, F. Jie und A. Keating (2015), Phase II, multicenter, open-label, randomized study of YM155 plus docetaxel as first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 149(1): 171-179. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3238-6>

- 90: R. Kudchadkar, S. Ernst, B. Chmielowski, B. G. Redman, J. Steinberg, A. Keating, F. Jie, C. Chen, R. Gonzalez und J. Weber (2015), A phase 2, multicenter, open-label study of sepantronium bromide (YM155) plus docetaxel in patients with stage III (unresectable) or stage IV melanoma. *Cancer Medicine*, 4(5): 643-650. <https://doi.org/10.1002/cam4.363>
- 91: G. Giaccone, P. Zatloukal, J. Roubec, K. Floor, J. Musil, M. Kuta, R. J. van Klaveren, S. Chaudhary, A. Gunther und S. Shamsili (2009), Multicenter Phase II Trial of YM155, a Small-Molecule Suppressor of Survivin, in Patients With Advanced, Refractory, Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(27): 4481-4486. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.1862>
- 92: K. D. Lewis, W. Samlowski, J. Ward, J. Catlett, L. Cranmer, J. Kirkwood, D. Lawson, E. Whitman und R. Gonzalez (2011), A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Investigational New Drugs*, 29(1): 161-166. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9333-6>
- 93: A.W. Tolcher, D.I. Quinn, A. Ferrari, F. Ahmann, G. Giaccone, T. Drake, A. Keating und J.S. de Bono (2012), A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Annals of Oncology*, 23(4): 968-973. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr353>
- 94: B. D. Cheson, N. L. Bartlett, J. M. Vose, A. Lopez-Hernandez, A. L. Seiz, A. T. Keating und S. Shamsili (2012), A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*, 118(12): 3128-3134. <https://doi.org/10.1002/cncr.26510>
- 95: W. G. Herrington, D. C. Talbot, M. M. Lahn, J. T. Brandt, S. Callies, R. Nagle, Ch. G. Winearls und I. S. D. Roberts (2011), Association of Long-term Administration of the Survivin mRNA-Targeted Antisense Oligonucleotide LY2181308 With Reversible Kidney Injury in a Patient With Metastatic Melanoma. *American Journal of Kidney Diseases*, 57(2): 300-303. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.09.024>
- 96: B. Z. Carter, R.-Y. Wang, W. D. Schober, M. Milella, D. Chism und M. Andreeff (2003), Targeting Survivin Expression Induces Cell Proliferation Defect and Subsequent Cell Death Involving Mitochondrial Pathway in Myeloid Leukemic Cells. *Cell Cycle*, 2(5): 486-491. <https://doi.org/10.4161/cc.2.5.500>

97: H. P. Erba, H. Sayar, M. Juckett, M. Lahn, V. Andre, S. Callies, S. Schmidt, S. Kadam, J. T. Brandt, D. Van Bockstaele und M. Andreeff (2013), Safety and pharmacokinetics of the antisense oligonucleotide (ASO) LY2181308 as a single-agent or in combination with idarubicin and cytarabine in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia (AML). *Invest New Drugs*, 31: 1023-1034.

<https://doi.org/10.1007/s10637-013-9935-x>

98: R. A. Carrasco, N. B. Stamm, E. Marcusson, G. Sandusky, P. Iversen und B. K. R. Patel (2011), Antisense Inhibition of Survivin Expression as a Cancer Therapeutic. *Mol Cancer Ther*, 10(2): 221–232. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0756>

99: R. Natale, F. Blackhall, D. Kowalski, R. Ramlau, G. Bepler, F. Grossi, Ch. Lerchenmüller, M. Pinder-Schenck, J. Mezger, S. Danson, S. M. Gadgeel, Y. Summers, S. Callies, V. André, M. Das, M. Lahn, D. Talbot (2014), Evaluation of Antitumor Activity Using Change in Tumor Size of the Survivin Antisense Oligonucleotide LY2181308 in Combination with Docetaxel for Second-Line Treatment of Patients with Non–Small-Cell Lung Cancer: A Randomized Open-Label Phase II Study. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(11): 1704-1708.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000285>

100: D. C. Talbot, M. Ranson, J. Davies, M. Lahn, S. Callies, V. André, S. Kadam, M. Burgess, Ch. Slapak, A. L. Olsen, P. J. McHugh, J. S. de Bono, J. Matthews, A. Saleem und P. Price (2010), Tumor Survivin Is Downregulated by the Antisense Oligonucleotide LY2181308: A Proof-of-Concept, First-in-Human Dose Study. *Clin Cancer Res*, 16 (24): 6150–6158. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1932>

101: M. Tanioka, H. Nokihara, N. Yamamoto, Y. Yamada, K. Yamada, Y. Goto, T. Fujimoto, R. Sekiguchi, K. Uenaka, S. Callies und T. Tamura (2011), Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68: 505–511.

<https://doi.org/10.1007/s00280-010-1506-7>

102: P. Wiechno, B. G. Somer, B. Mellado, P. L. Chłosta, J. M. C. Grau, D. Castellano, Ch. Reuter, M. Stöckle, J. Kamradt, J. Pikiel, I. Durán, S. Wedel, S. Callies, V. André, K. Hurt, J. Brown, M. Lahn und B. Heinrich (2014), A Randomised Phase 2 Study Combining LY2181308 Sodium (Survivin Antisense Oligonucleotide) with First-line Docetaxel/Prednisone in Patients with Castration-resistant Prostate

Cancer. *European Urology*, 65(3): 516-520.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.10.039>

103: A. Saleem, J. C. Matthews, M. Ranson, S. Callies, V. André, M. Lahn, C. Dickinson, Ch. Prenant, G. Brown, A. McMahon, D. C. Talbot, T. Jones und P. M. Price (2011), Molecular Imaging and Pharmacokinetic Analysis of Carbon-11 Labeled Antisense Oligonucleotide LY2181308 in Cancer Patients. *Theranostics*, 1: 290-301.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21772926>

104: Y. Hirohashi, T. Torigoe, A. Maeda, Y. Nabeta, K. Kamiguchi, T. Sato, J. Yoda, H. Ikeda, K. Hirata, N. Yamanaka und N. Sato (2002), An HLA-A24-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitope of a Tumor-associated Protein, Survivin. *Clin Cancer Res* 1, 8(6): 1731-1739.

<https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/8/6/1731/2084381/1731.pdf>

105: T. Tsuruma, F. Hata, T. Torigoe, T. Furuhashi, S. Idenoue, T. Kurotaki, M. Yamamoto, A. Yagihashi, T. Ohmura, K. Yamaguchi, T. Katsuramaki, T. Yasoshima, K. Sasaki, Y. Mizushima, H. Minamida, H. Kimura, M. Akiyama, Y. Hirohashi, H. Asanuma, Y. Tamura, K. Shimozawa, N. Sato und K. Hirata (2004), Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med*, 2(1): 19.

<https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-19>

106: I. Honma, H. Kitamura, T. Torigoe, A. Takahashi, T. Tanaka, E. Sato, Y. Hirohashi, N. Masumori, T. Tsukamoto und N. Sato (2009), Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 58: 1801-1807.

<https://doi.org/10.1007/s00262-009-0691-x>

107: T. Tanaka, H. Kitamura, R. Inoue, S. Nishida, A. Takahashi-Takaya, S. Kawami, T. Torigoe, Y. Hirohashi, T. Tsukamoto, N. Sato und N. Masumori (2013), Potential Survival Benefit of Anti-Apoptosis Protein: Survivin-Derived Peptide Vaccine with and without Interferon Alpha Therapy for Patients with Advanced or Recurrent Urothelial Cancer—Results from Phase I Clinical Trials. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: 262967.

<https://doi.org/10.1155/2013/262967>

108: A. Miyazaki, J. Kobayashi, T. Torigoe, Y. Hirohashi, T. Yamamoto, A. Yamaguchi, H. Asanuma, A. Takahashi, Y. Michifuri, K. Nakamori, I. Nagai, N. Sato und H.

Hiratsuka (2010), Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Science*, 102(2): 324-329. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01789.x>

109: H. Kameshima, T. Tsuruma, T. Torigoe, A. Takahashi, Y. Hirohashi, Y. Tamura, T. Tsukahara, S. Ichimiya, T. Kanaseki, Y. Iwayama, N. Sato, K. Hirata (2011), Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients. *Cancer Science*, 102(6): 1181-1187. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01918.x>

110: H. Kameshima, T. Tsuruma, G. Kutomi, H. Shima, Y. Iwayama, Y. Kimura, M. Imamura, T. Torigoe, A. Takahashi, Y. Hirohashi, Y. Tamura, T. Tsukahara, T. Kanaseki, N. Sato und K. Hirata (2013), Immunotherapeutic benefit of α -interferon (IFN α) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Science*, 104(1): 124-129. <https://doi.org/10.1111/cas.12046>

111: A. Meiners, S. Bäcker, I. Hadrović, Ch. Heid, Ch. Beuck, Y. B. Ruiz-Blanco, J. Mieres-Perez, M. Pörschke, J.-N. Grad, C. Vallet, D. Hoffmann, P. Bayer, E. Sánchez-García, T. Schrader und S. K. Knauer (2021), Specific inhibition of the Survivin–CRM1 interaction by peptide-modified molecular tweezers. *Nature Communications*, 12(1): 1505. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21753-9>

112: Bachem (2020), Solid Phase Peptid Synthesis. Global Marketing, Bachem AG. <https://www.bachem.com/download/180/brochures/213490/solid-phase-peptide-synthesis.pdf>

113: M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, S. Bienz, L. Bigler und T. Fox (2012), *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, 8. Ausgabe.

114: D. Carr (2020), *A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC*. ACE(R) HPLC Columns. https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_Peptides.pdf

115: E. Valeur und M. Bradley (2009), Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.*, 38: 606-631. <https://doi.org/10.1039/B701677H>

116: A. Höing, A. Zimmermann, L. Moews, M. Killa, M. Heimann, A. Hensel, J. Voskuhl und S. K. Knauer (**2022**), A Bivalent Supramolecular GCP Ligand Enables Blocking of the Taspase1/Importin α Interaction. ChemMedChem, 17(1): e202100640. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100640>

9. Anhang

9.1. ITC

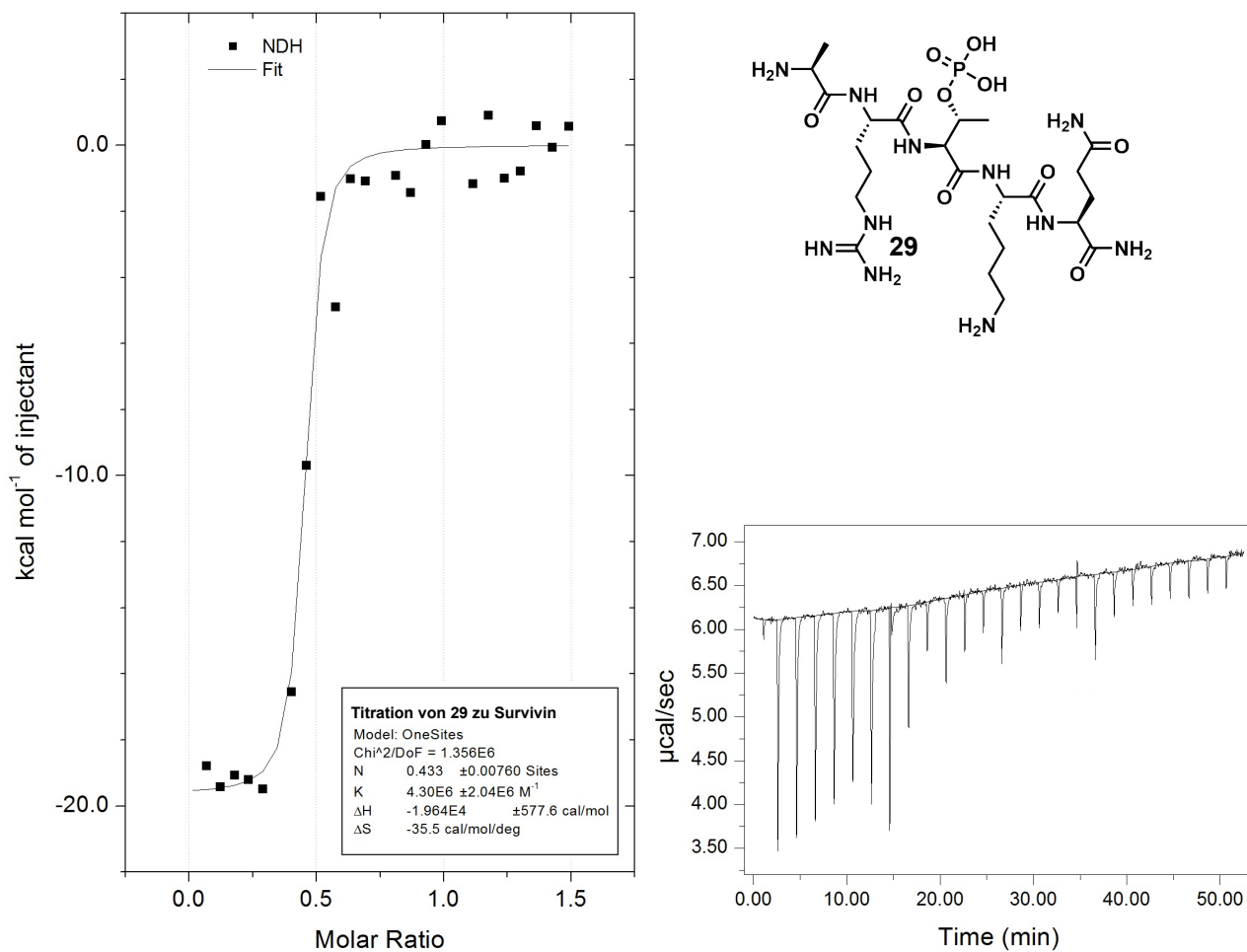


Abbildung 77: ITC von **29** (0,75 mM) zu Survivin (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **29**.

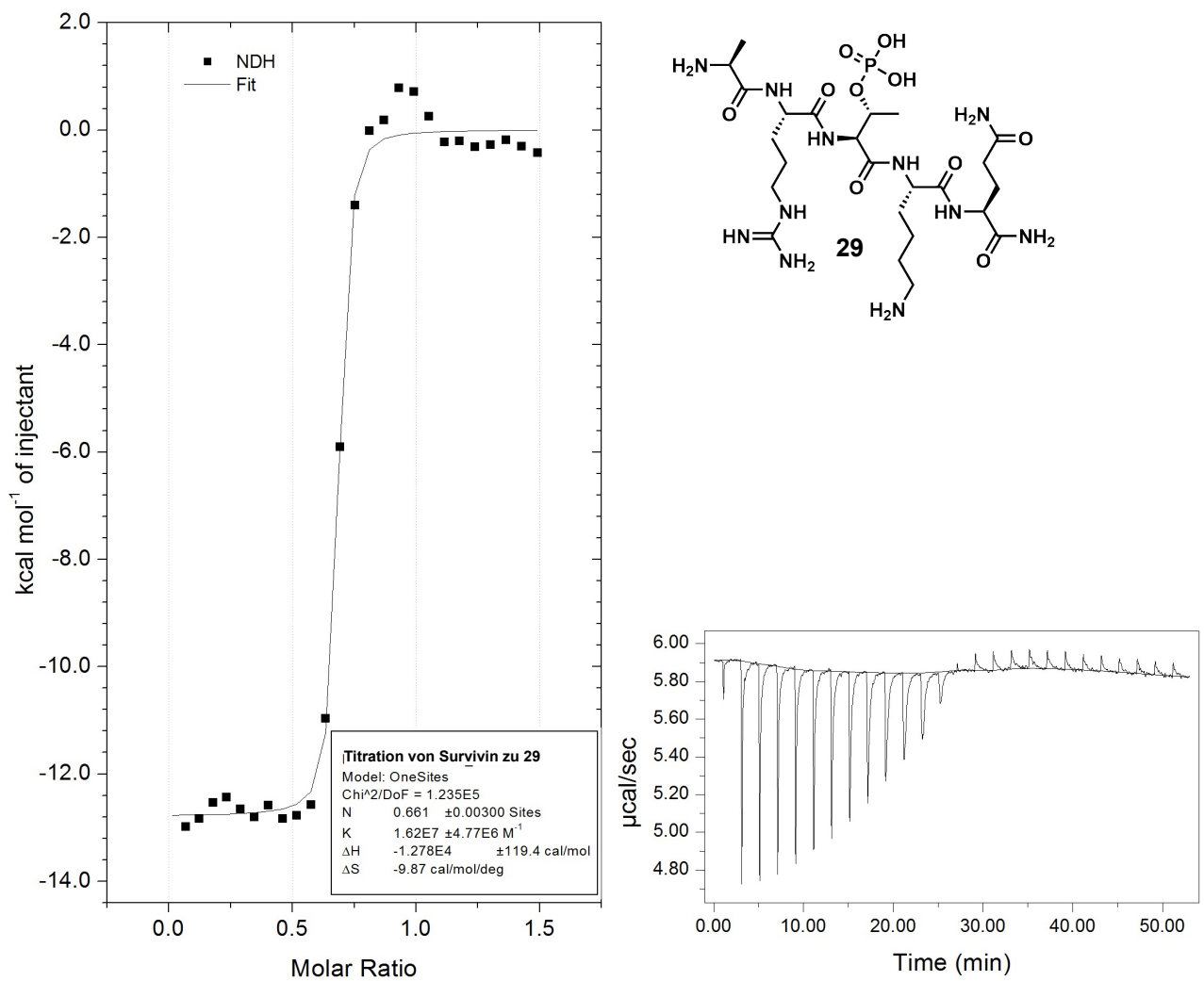


Abbildung 78: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **29** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **29**.

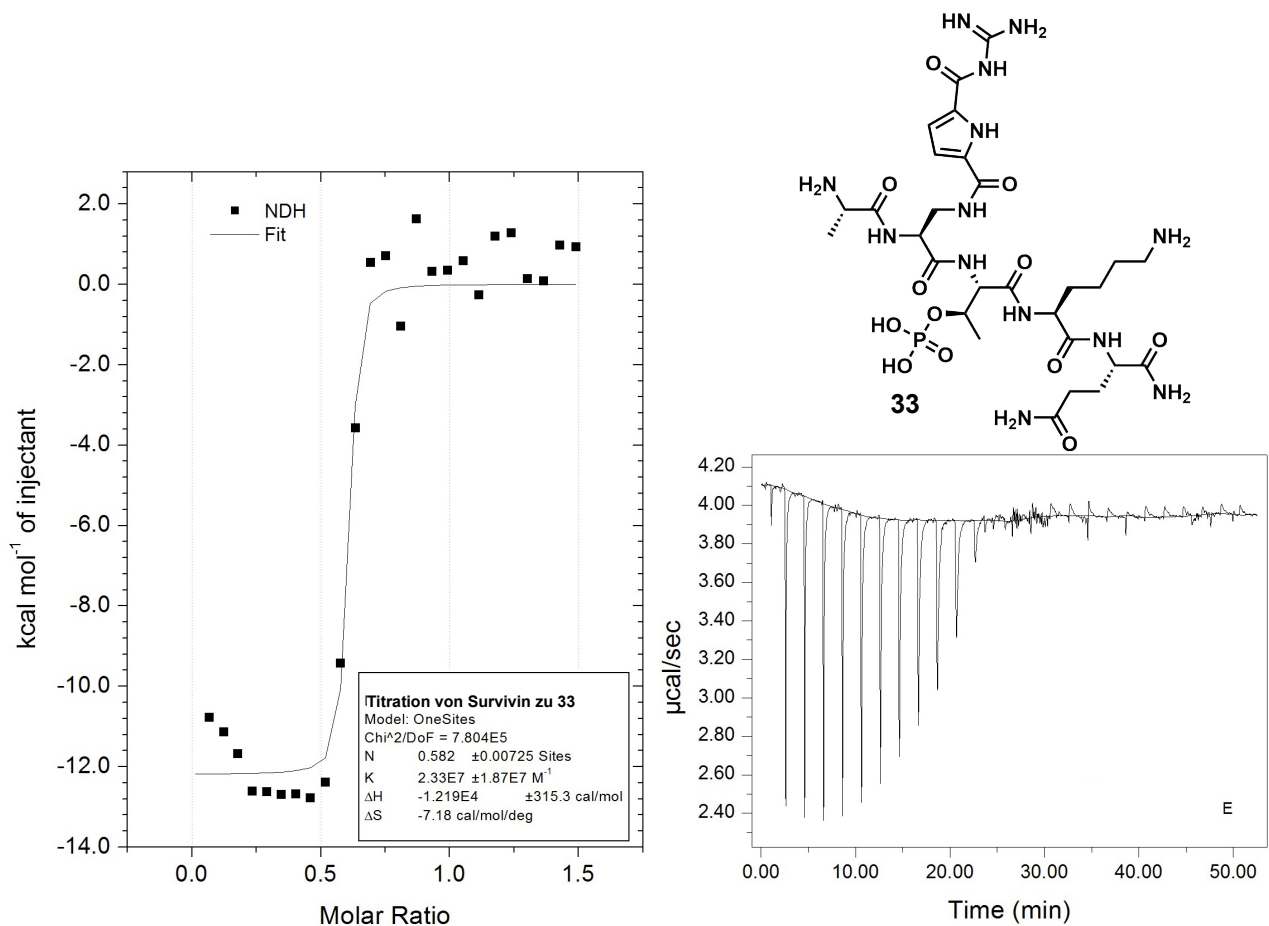


Abbildung 80: ITC von Survivin (0,75 mM) zu **33** (0,1 mM) in Puffer (HEPES (2,5 mM), TCEP (0,05 M), MgCl₂ (1 mM) und NaCl (20 mM), pH 6,5). Links: Integrierte Peaks der Roh-ITC mit Fit und thermodynamischen Daten. Unten rechts: Roh-ITC. Oben rechts: Struktur von **33**.

9.2. HPLC-Chromatogramme

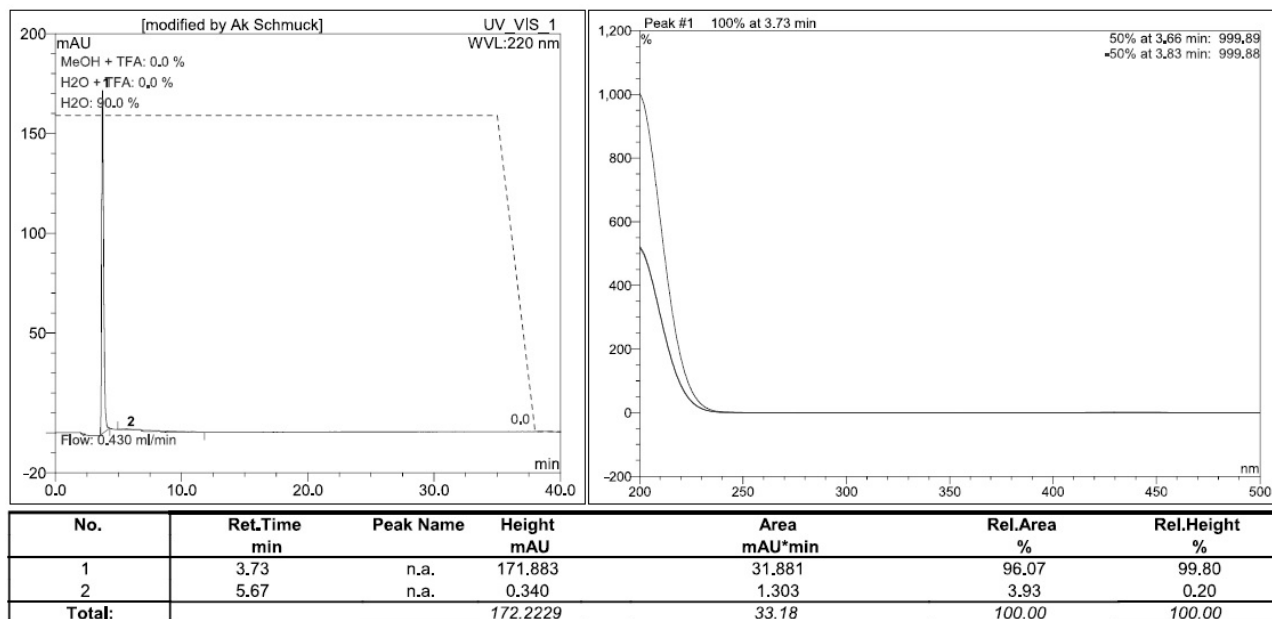


Abbildung 81: links: HPLC Chromatogramm von **22**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

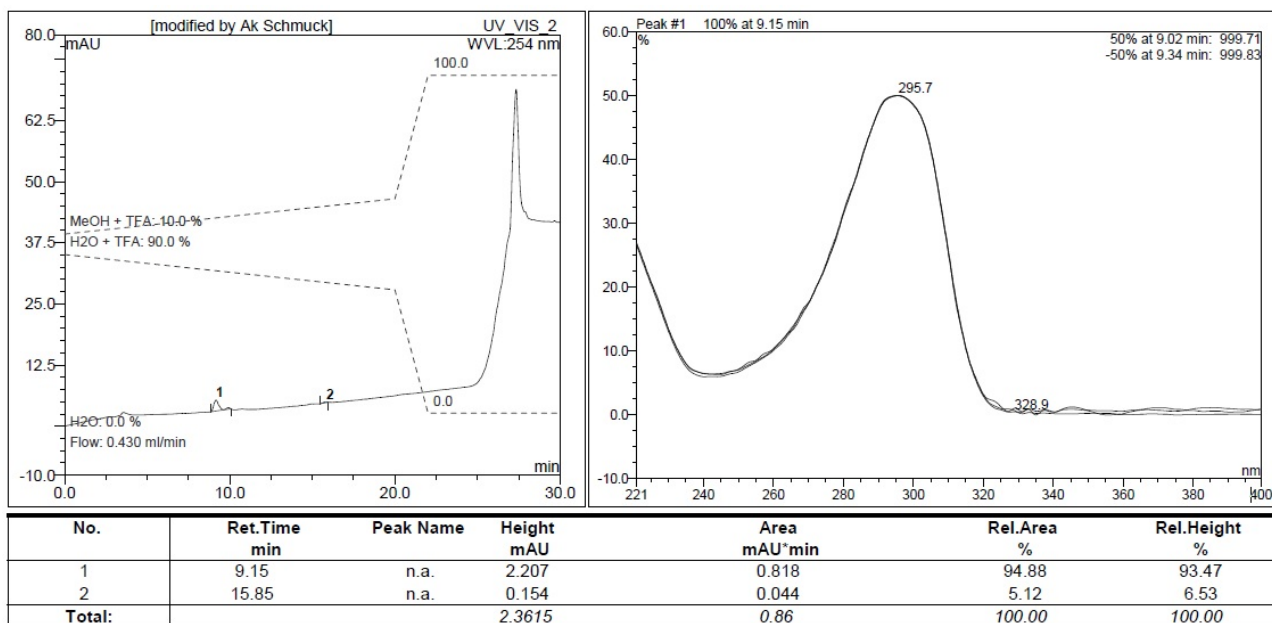


Abbildung 82: links: HPLC Chromatogramm von **23**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

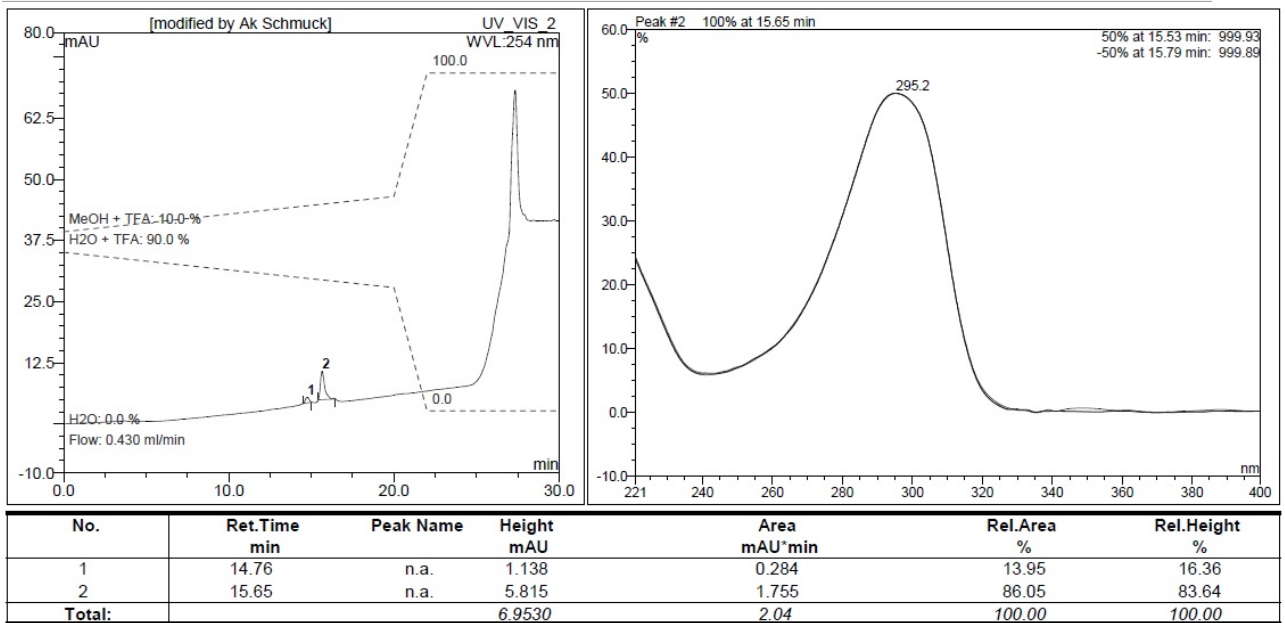


Abbildung 83 links: HPLC Chromatogramm von **25**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

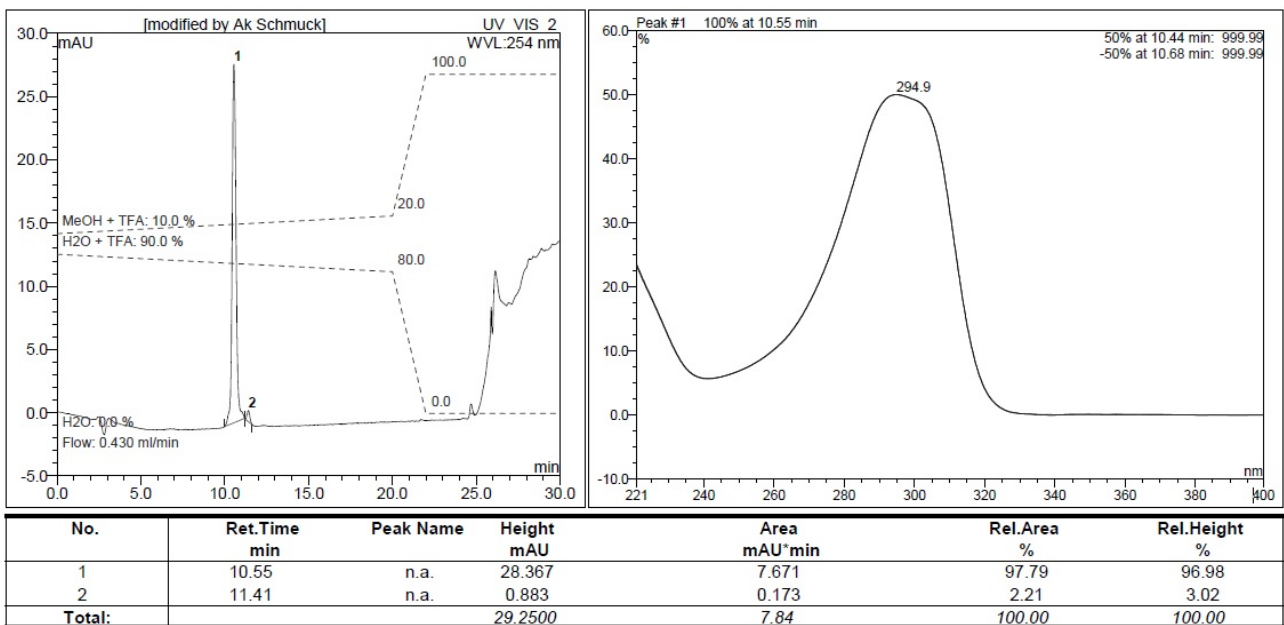


Abbildung 84: links: HPLC Chromatogramm von **26**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

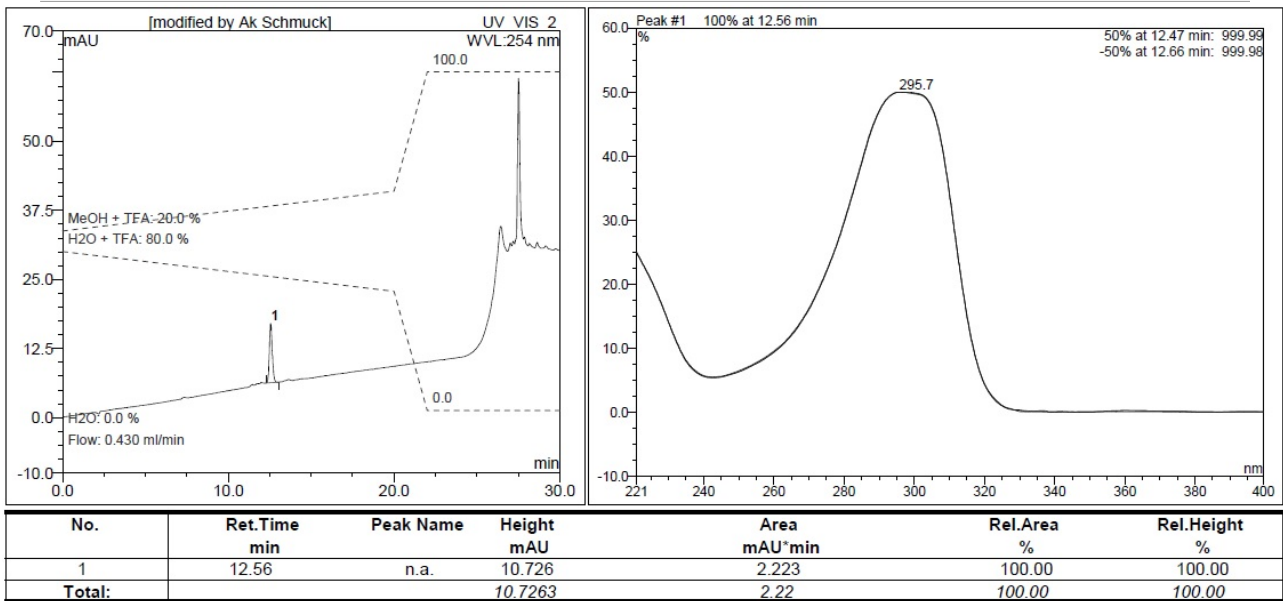


Abbildung 85: links: HPLC Chromatogramm von **27**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

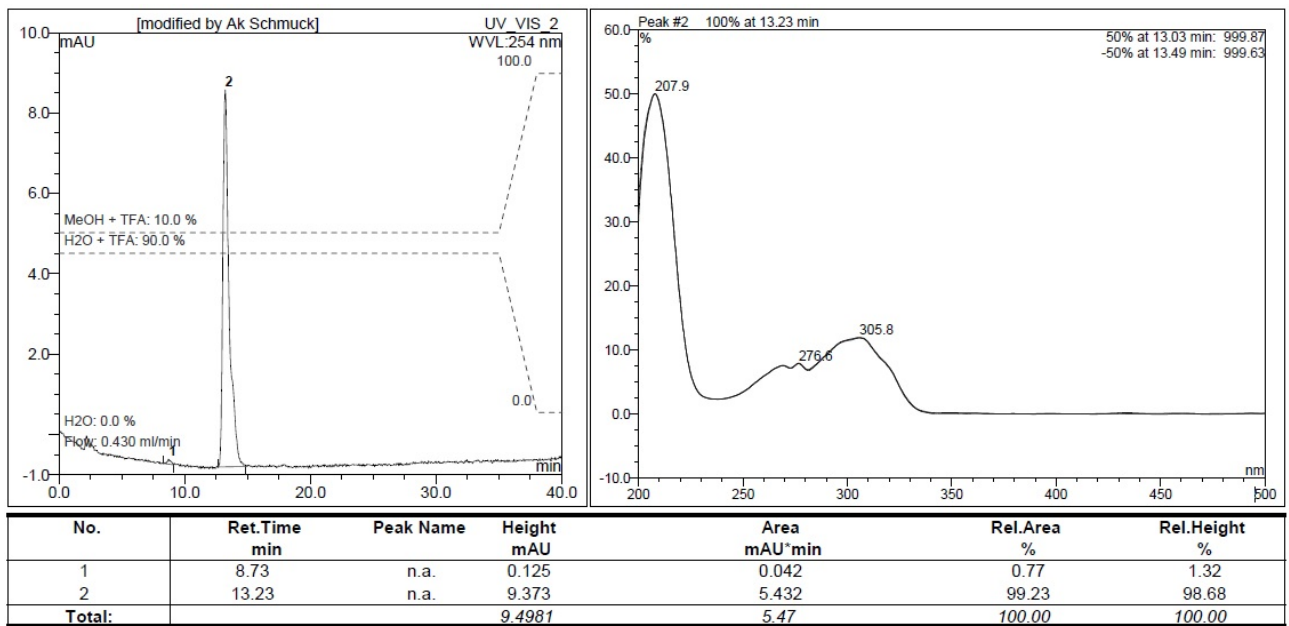


Abbildung 86: links: HPLC Chromatogramm von **28**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

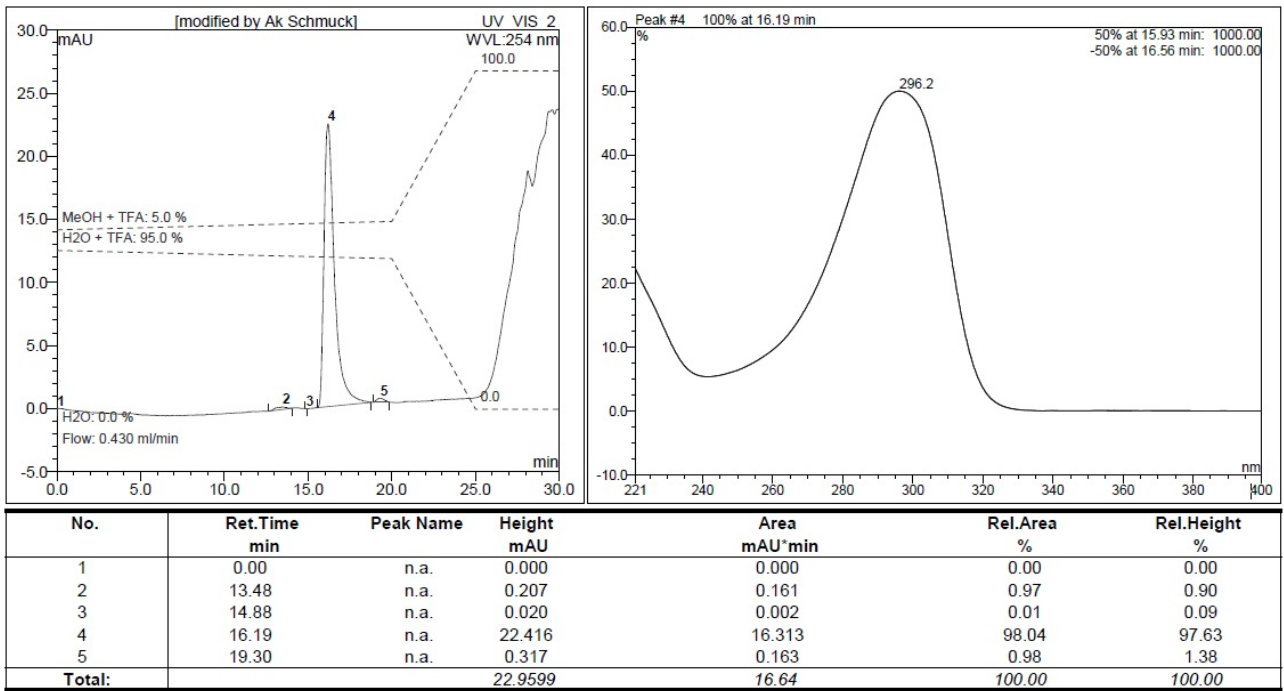


Abbildung 87: links: HPLC Chromatogramm von **32**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

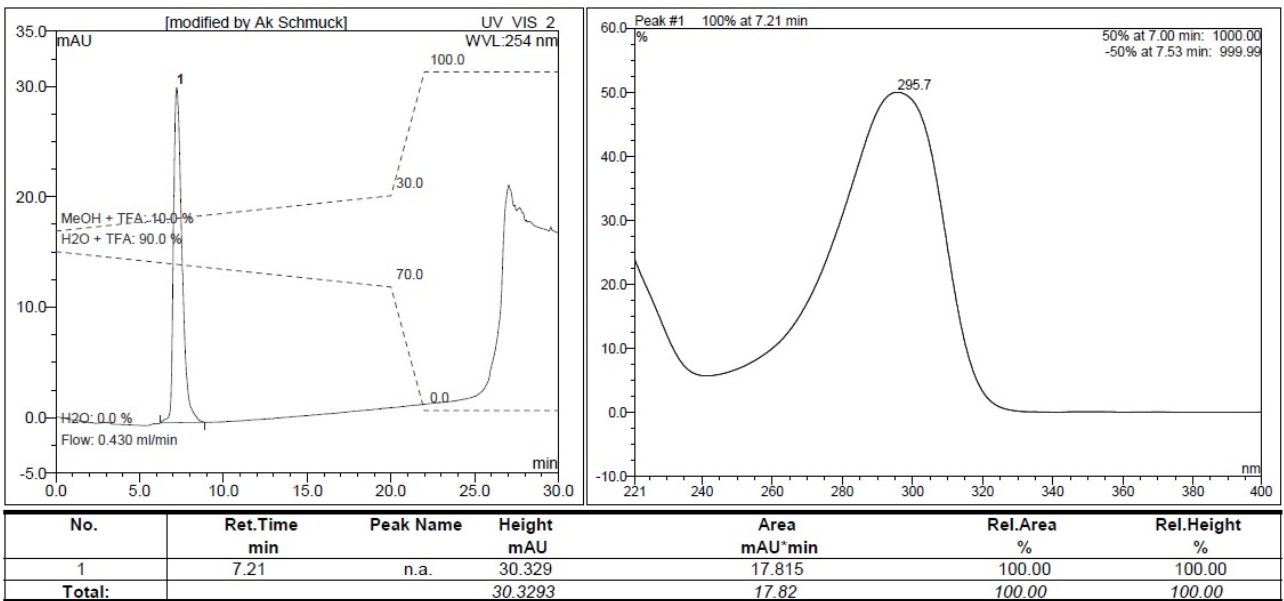


Abbildung 88: links: HPLC Chromatogramm von **33**; rechts UV-Spektrum des Hauptpeaks. Unten: Reinheit der Verbindung.

9.3. ¹H-NMR-Spektren

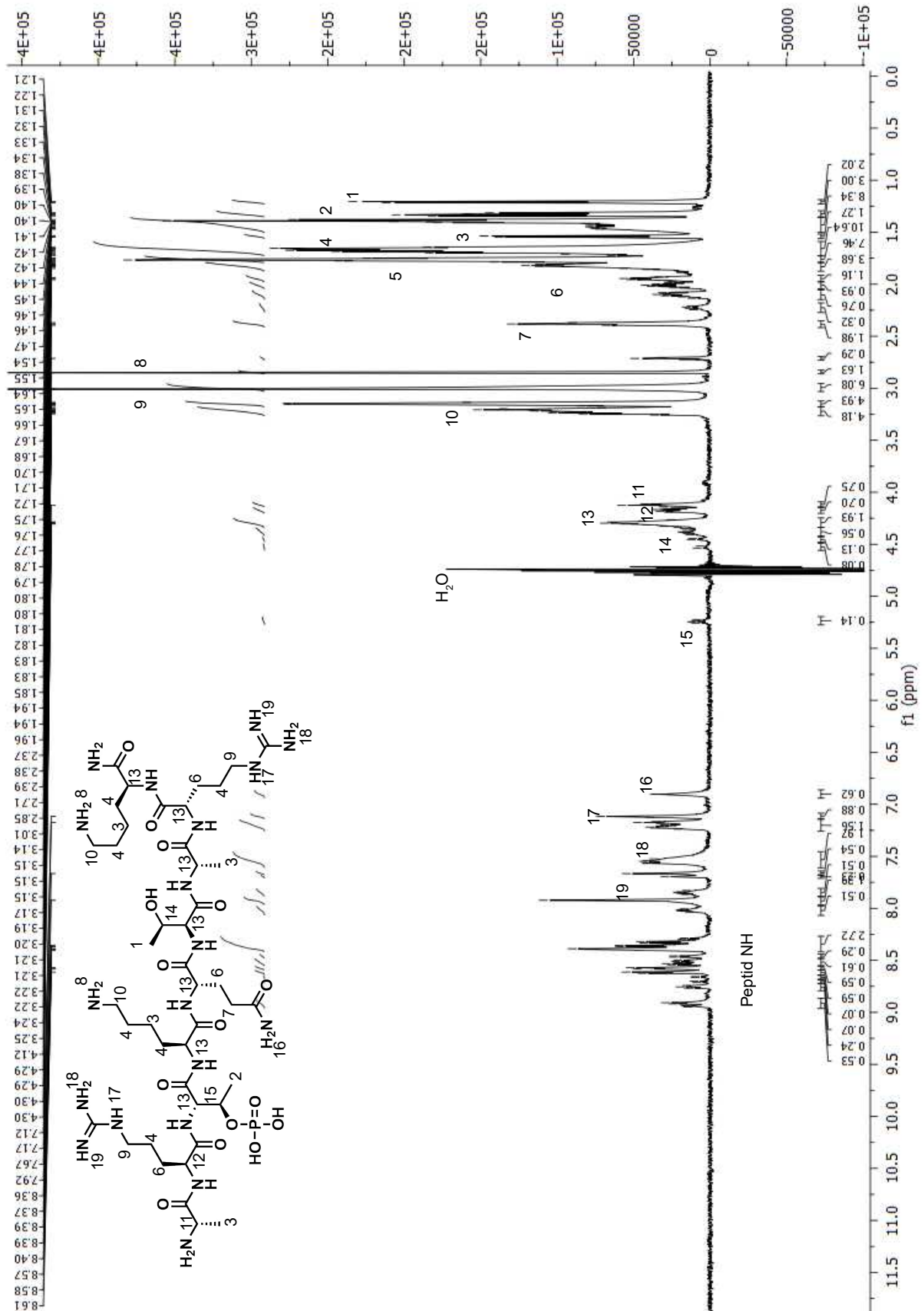


Abbildung 89: ¹H-NMR des TFA-Salz' von **22** in H₂O/D₂O (9/1). Wasserpeak bei 4,75 automatisch entfernt.

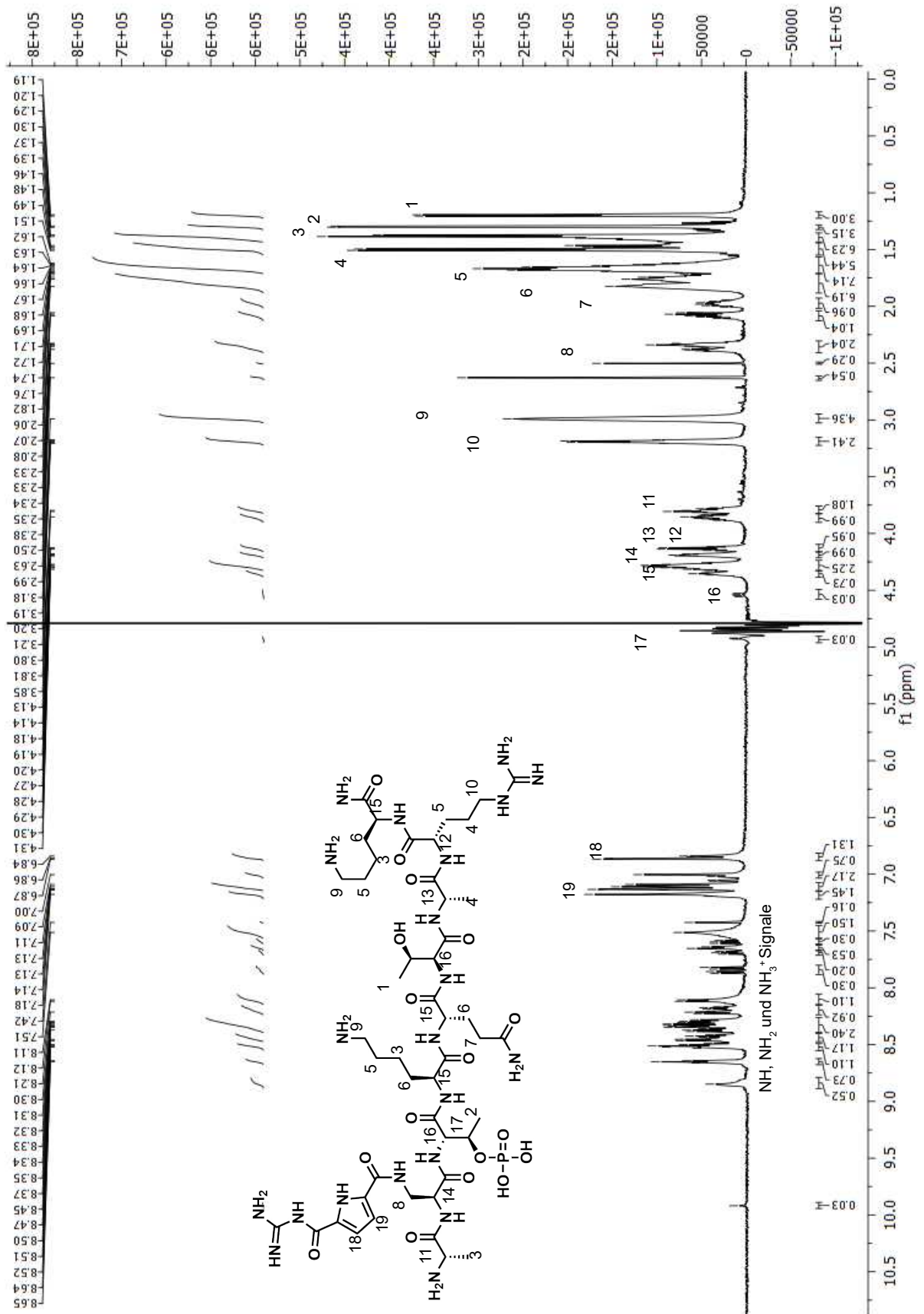


Abbildung 90: ¹H-NMR des TFA-Salz' von 23 in H₂O/D₂O (9/1). Wasserpeak bei 4,75 automatisch entfernt.

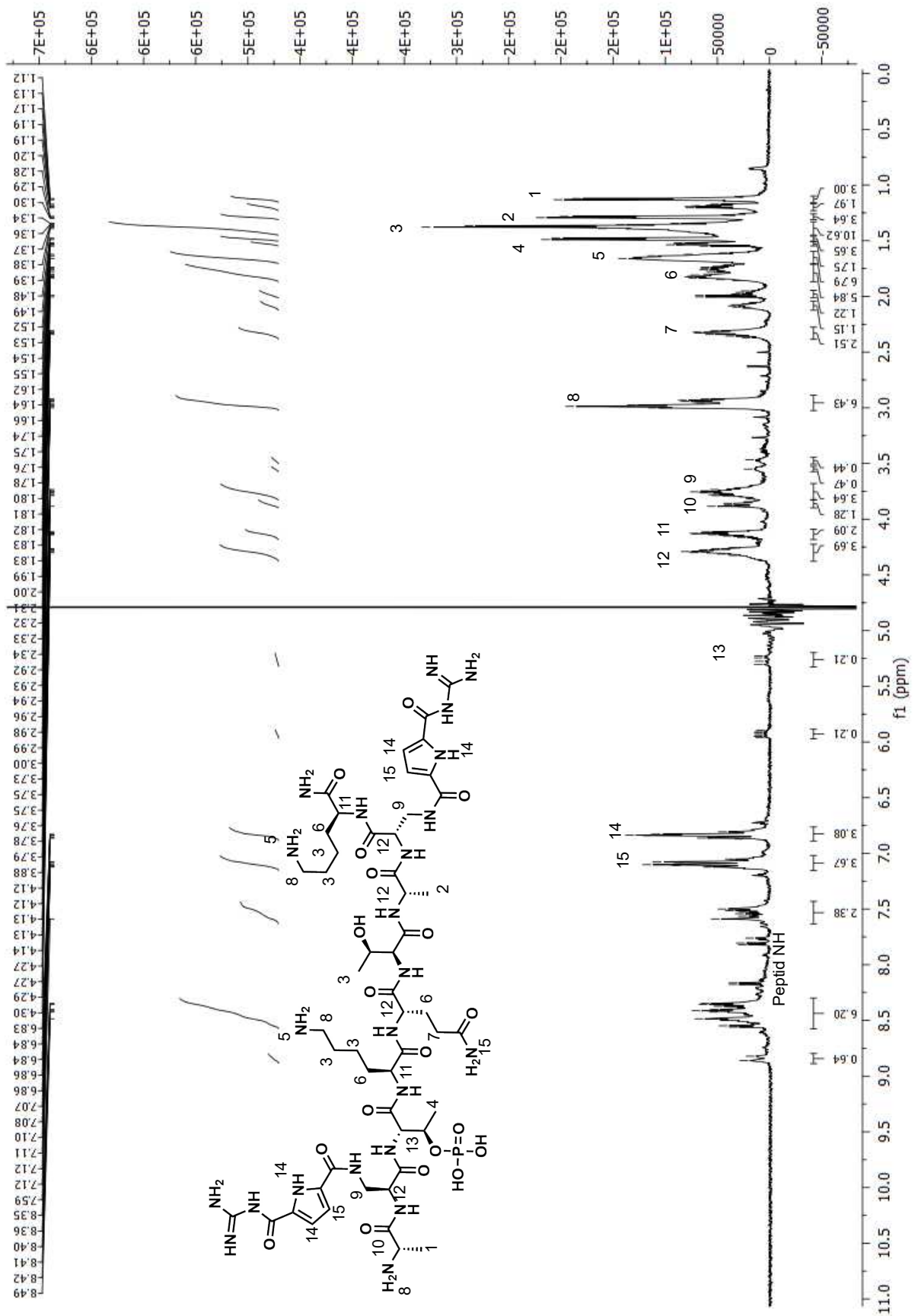


Abbildung 91: ¹H-NMR des TFA-Salz' von **25** in H₂O/D₂O (9/1). Wasserpeak bei 4,75 automatisch entfernt.

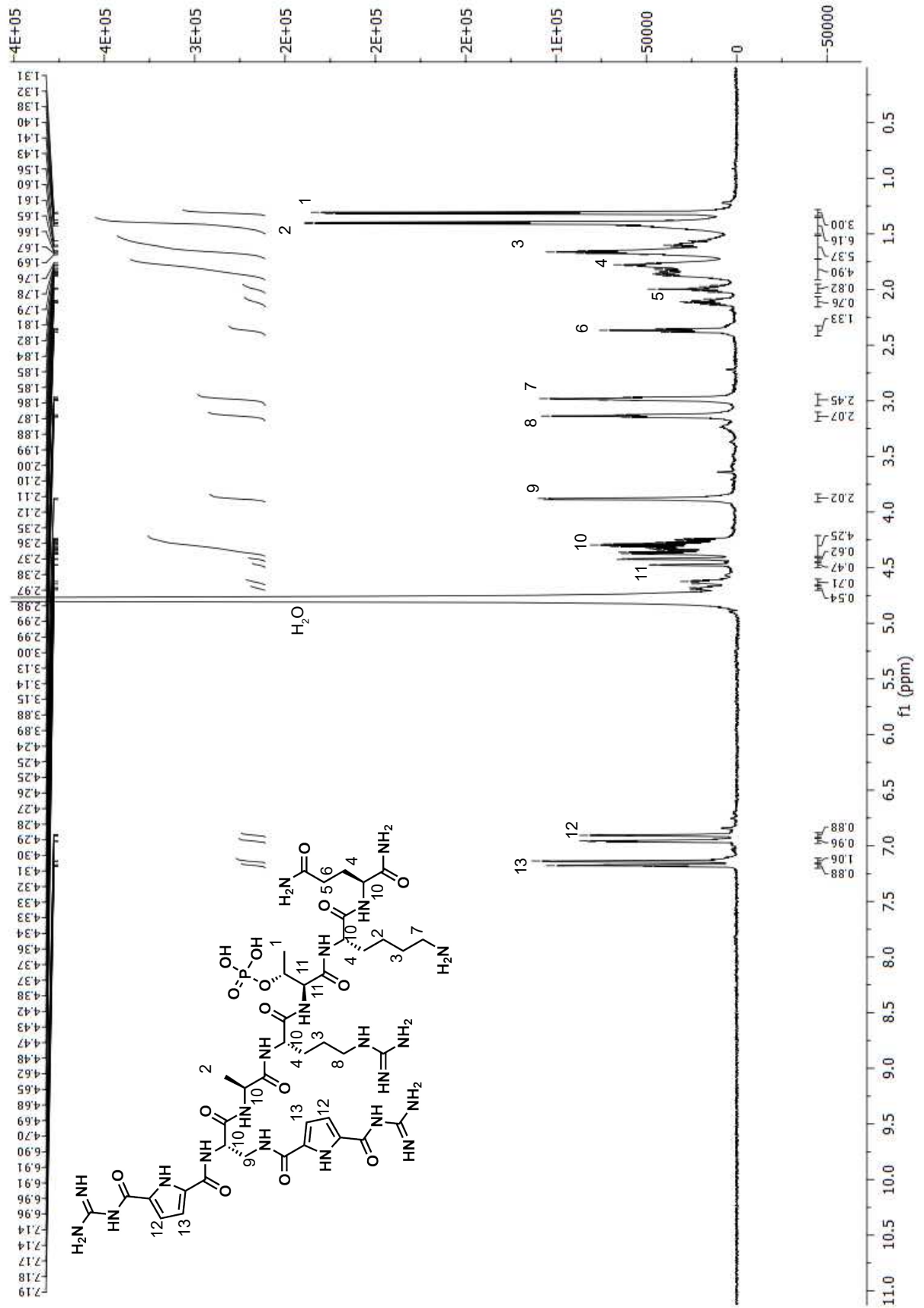


Abbildung 92: $^1\text{H-NMR}$ des TFA-Salz' von **26** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

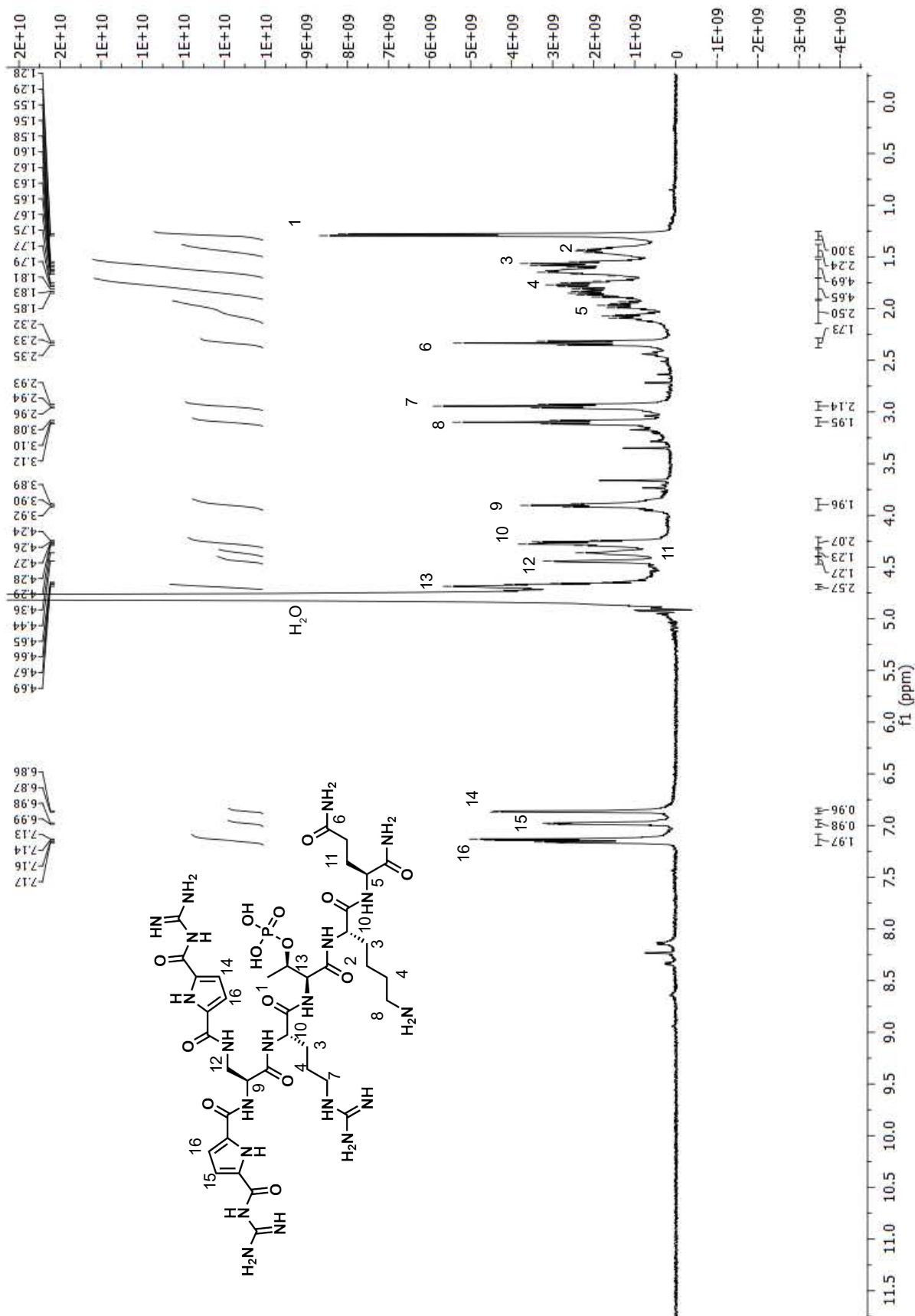


Abbildung 93: $^1\text{H-NMR}$ des TFA-Salz' von **27** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

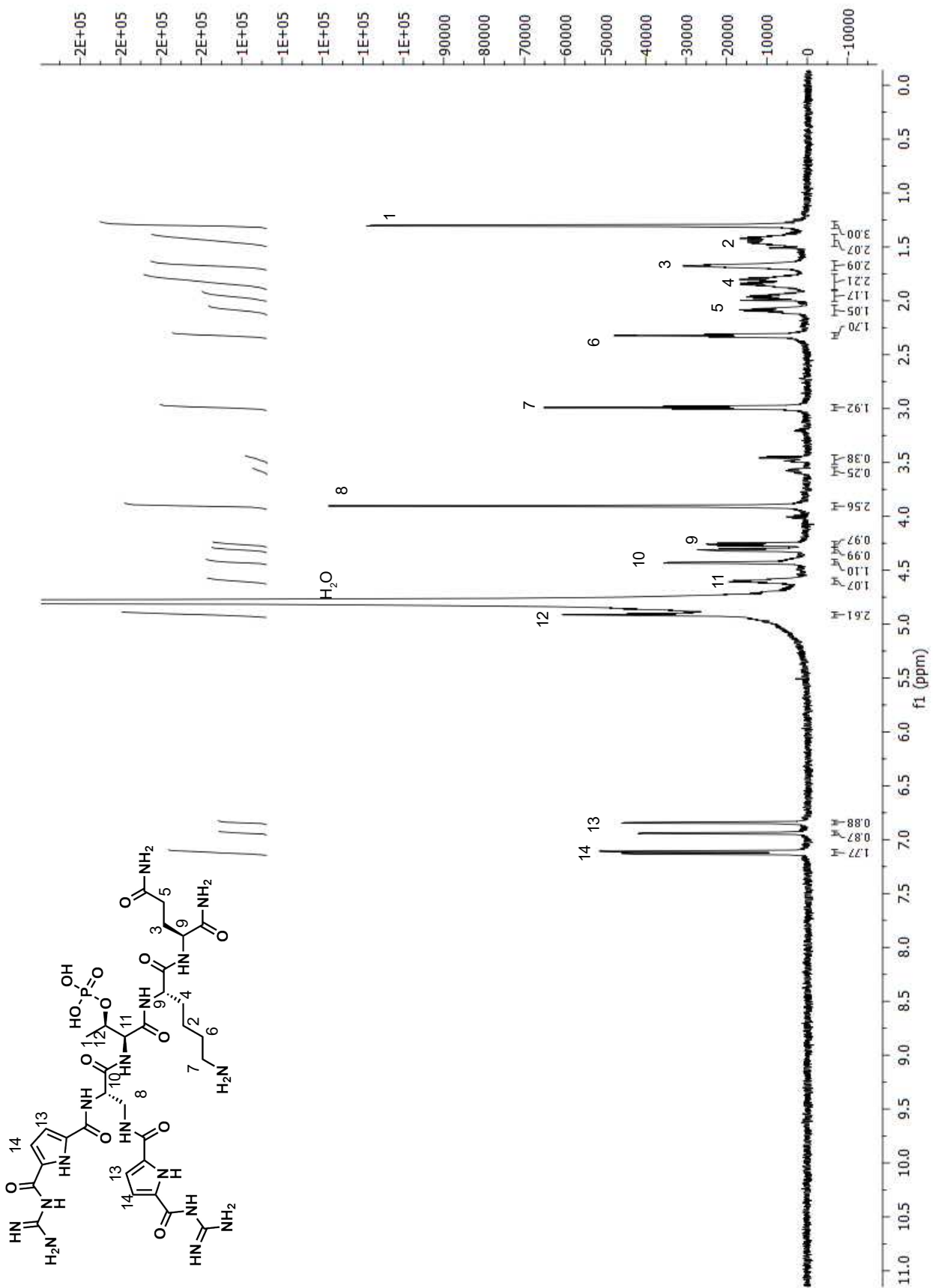


Abbildung 94: $^1\text{H-NMR}$ des TFA-Salz' von **28** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

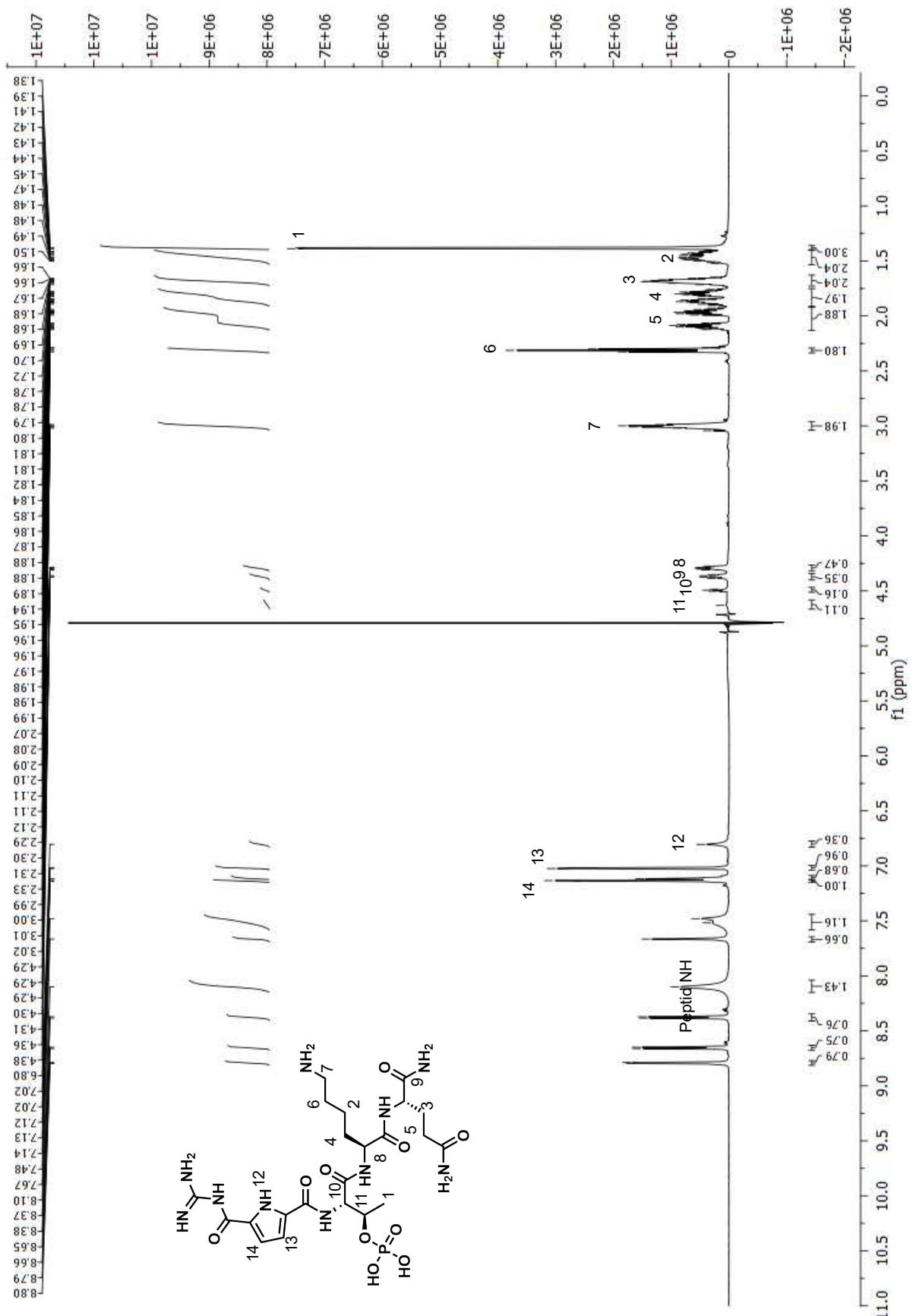


Abbildung 95: ¹H-NMR des TFA-Salz' von **32** in H₂O/D₂O (9/1). Wasserpeak bei 4,75 automatisch entfernt.

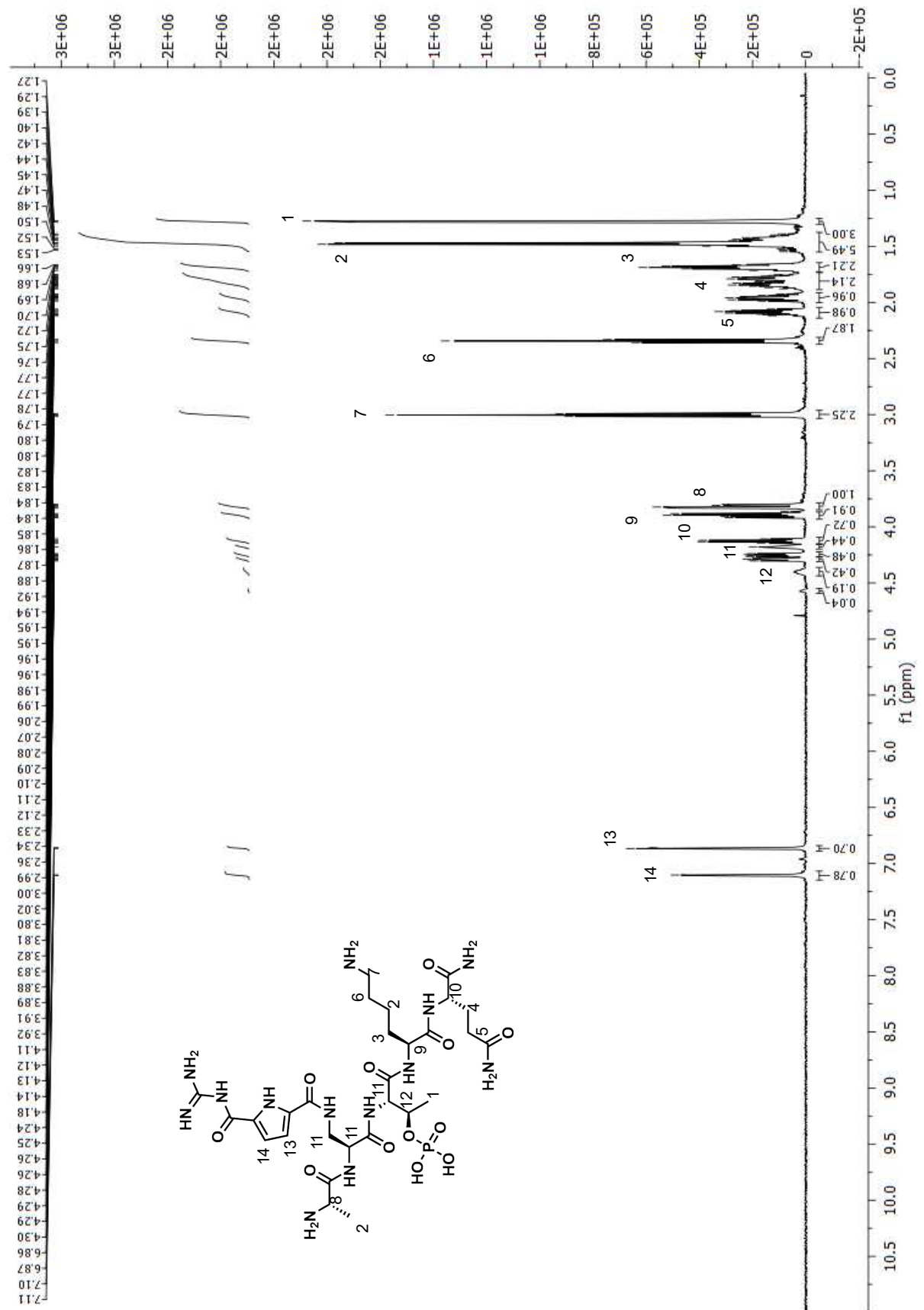


Abbildung 96: $^1\text{H-NMR}$ des TFA-Salz' von **33** in D_2O .

9.4. ¹³C-NMR-Spektren

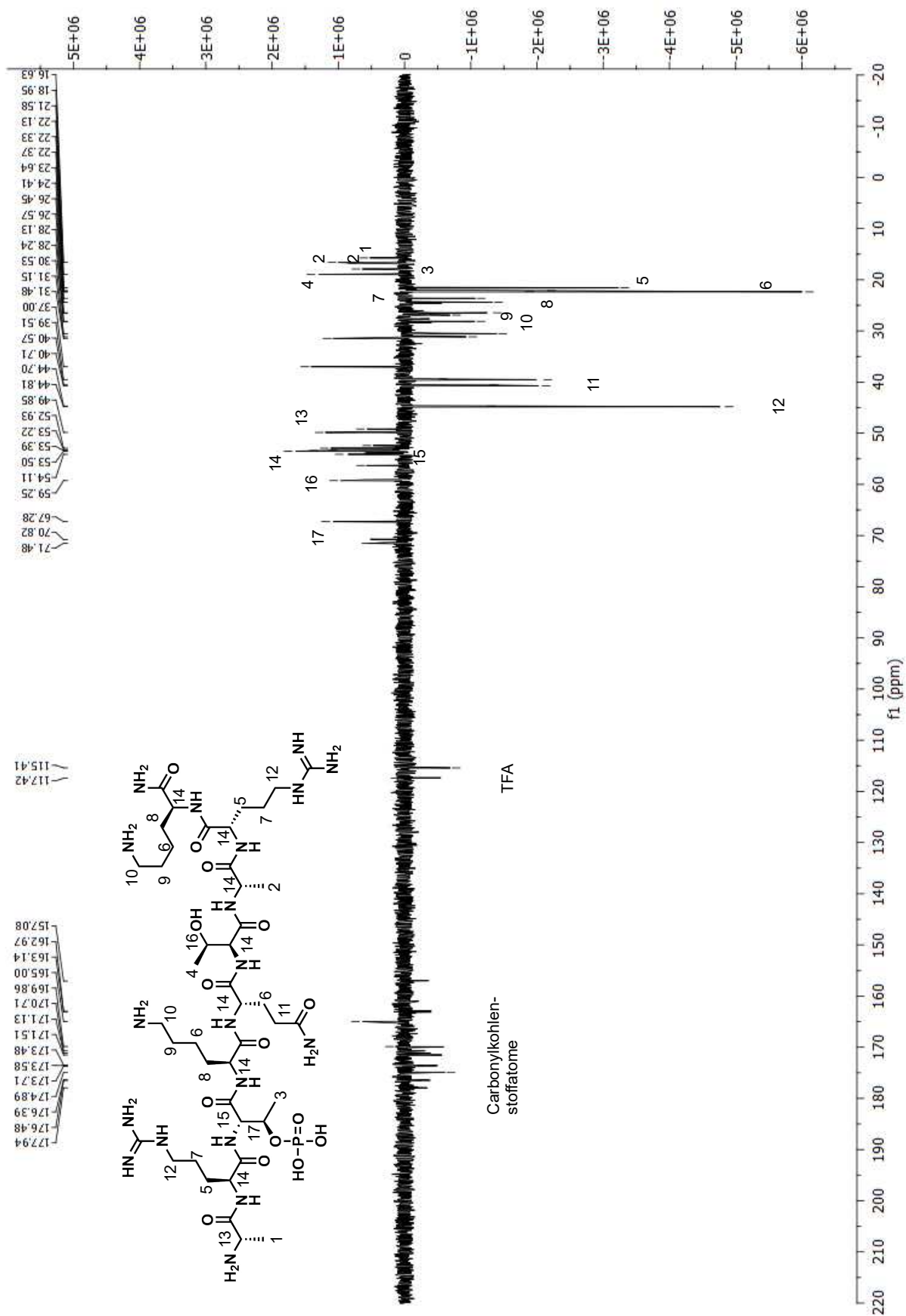


Abbildung 97: ¹³C-NMR DEPT 135° des TFA-Salz' von **22** in H₂O/D₂O (9/1).

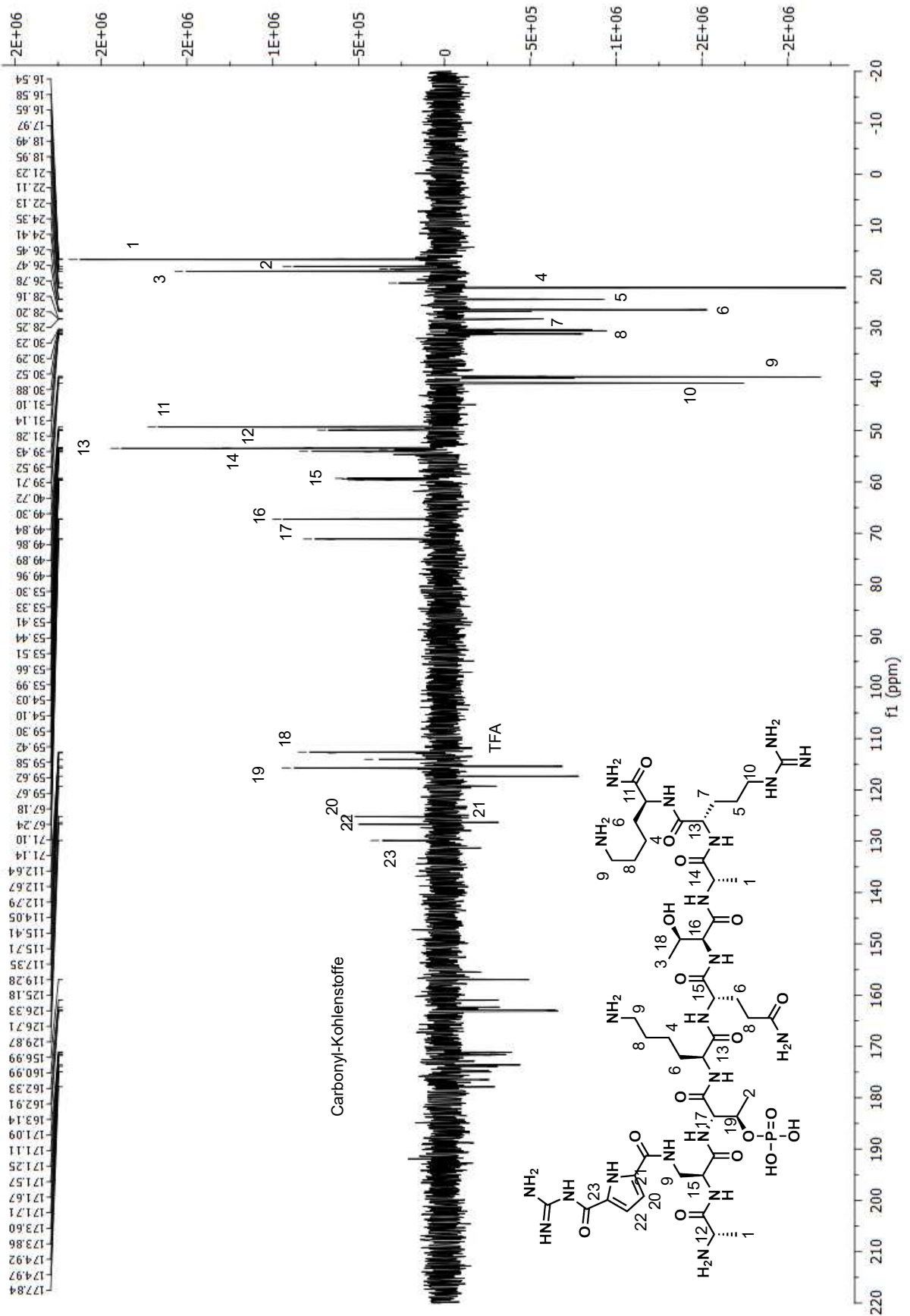


Abbildung 98: ^{13}C -NMR DEPT 135° des TFA-Salz' von **23** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

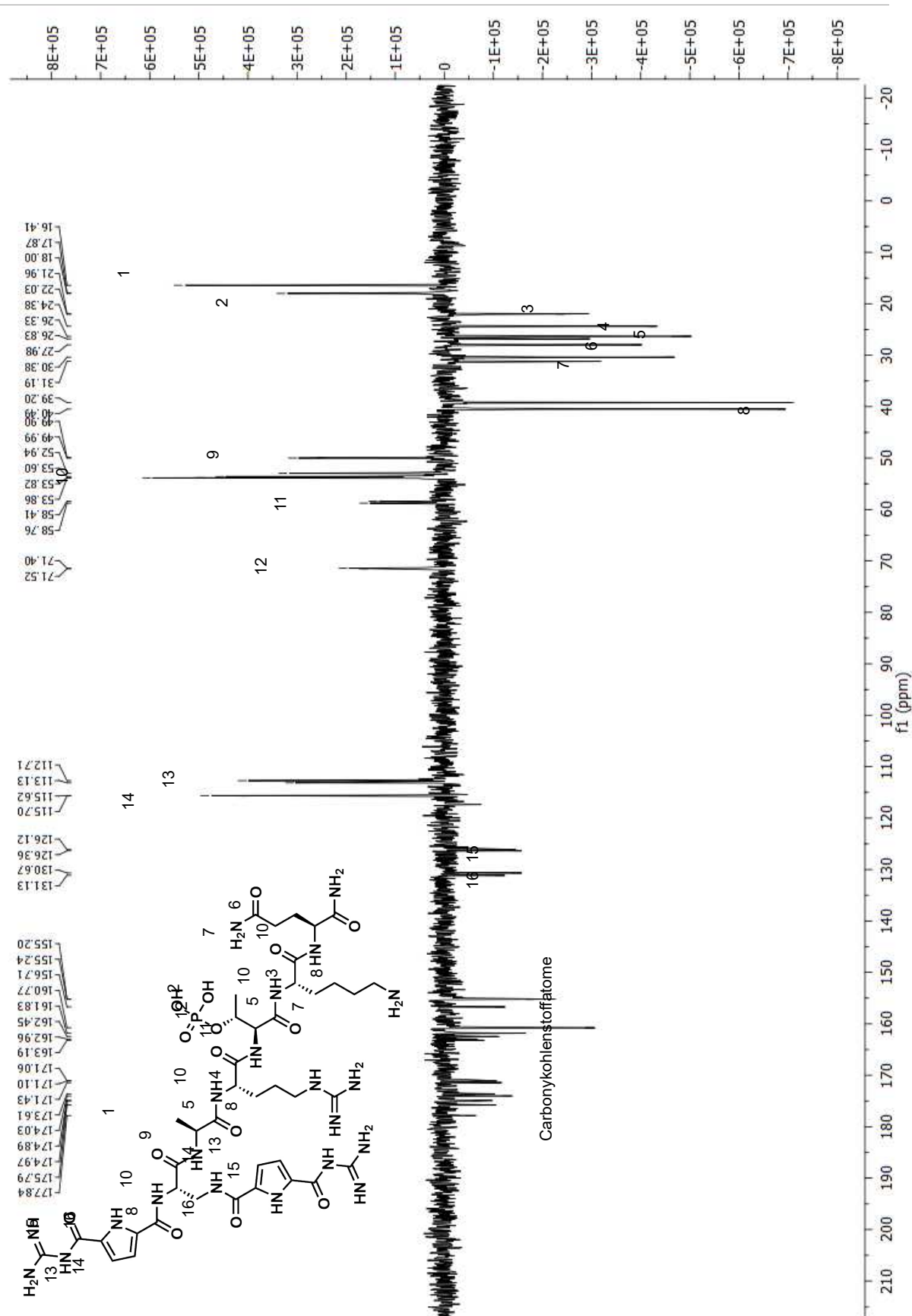


Abbildung 100: ^{13}C -NMR DEPT 135° des TFA-Salz' von **26** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

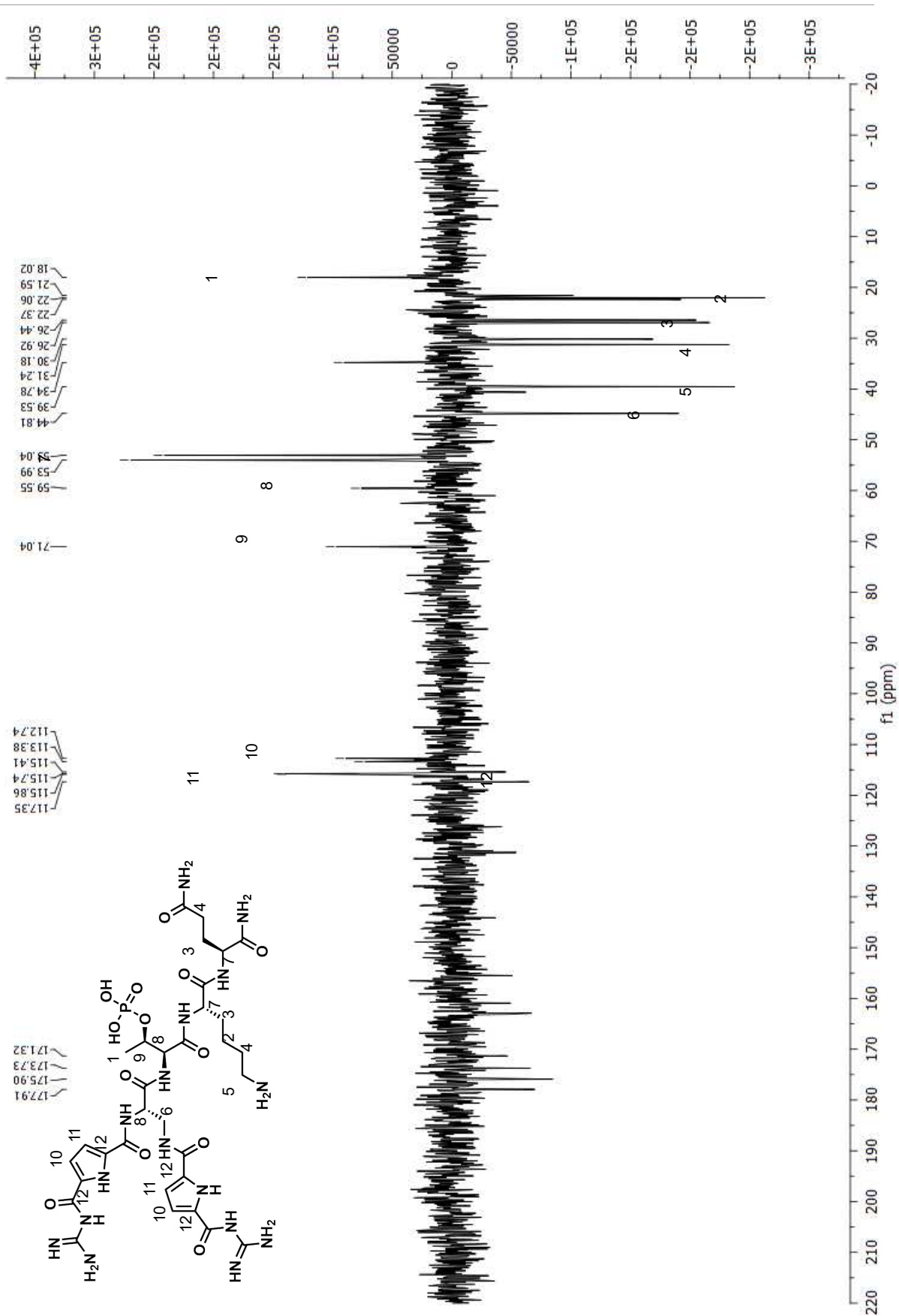


Abbildung 102: ^{13}C -NMR DEPT 135° von **28** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

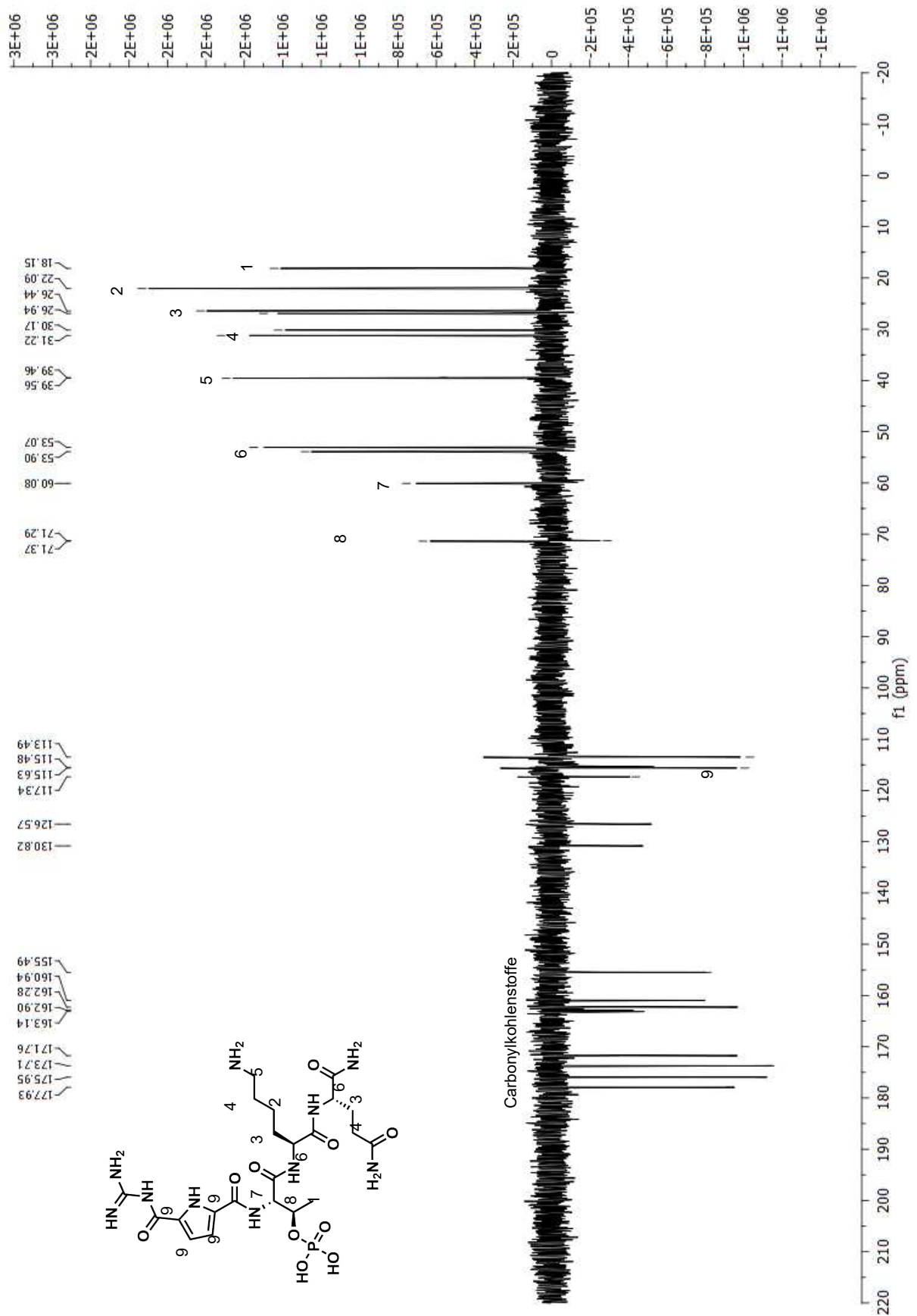


Abbildung 103: ^{13}C -NMR DEPT 45° des TFA-Salz' von **32** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1).

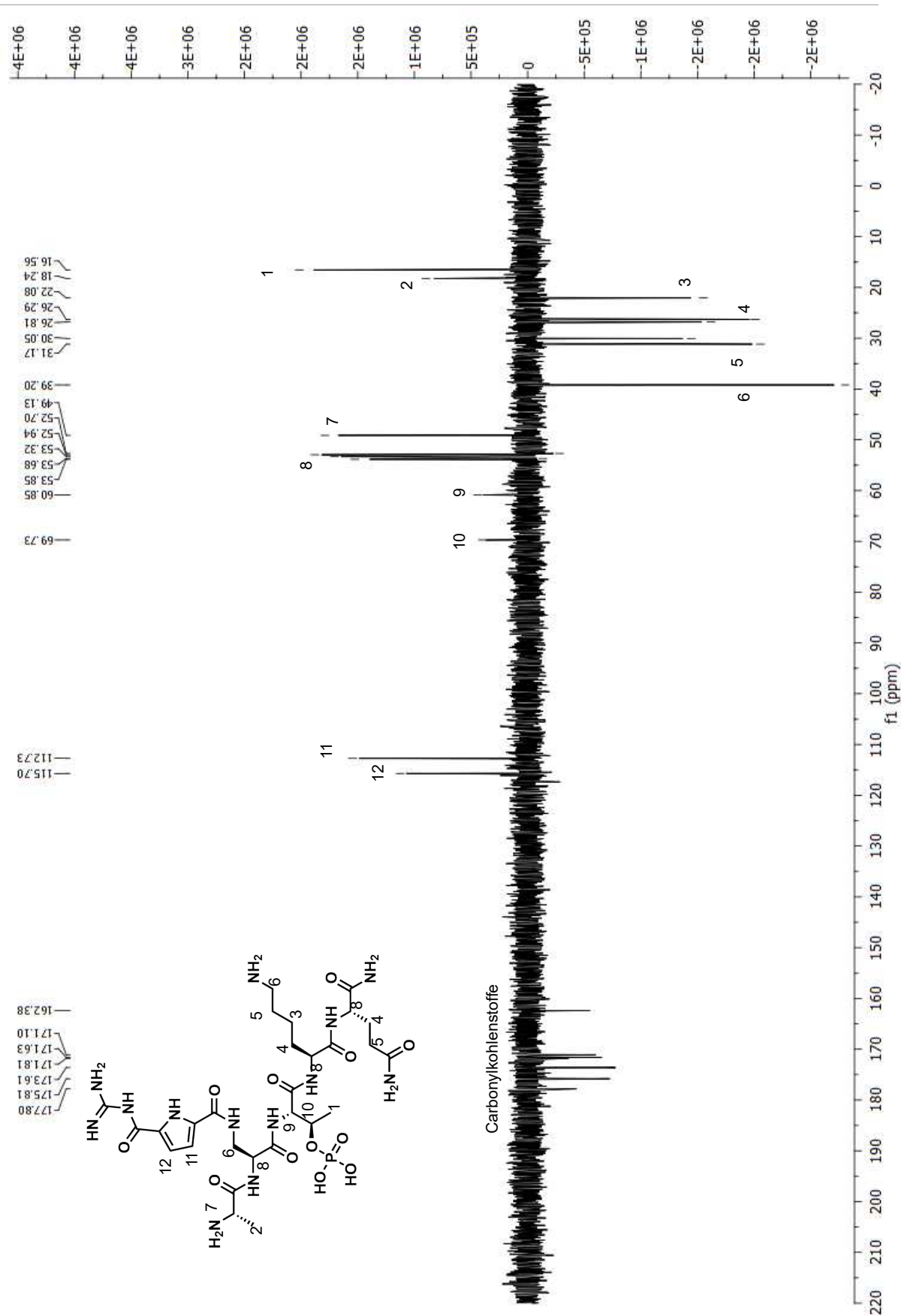


Abbildung 104: ^{13}C -NMR DEPT 135° des TFA-Salz' von **33** in D_2O .

9.5. IR-Spektren

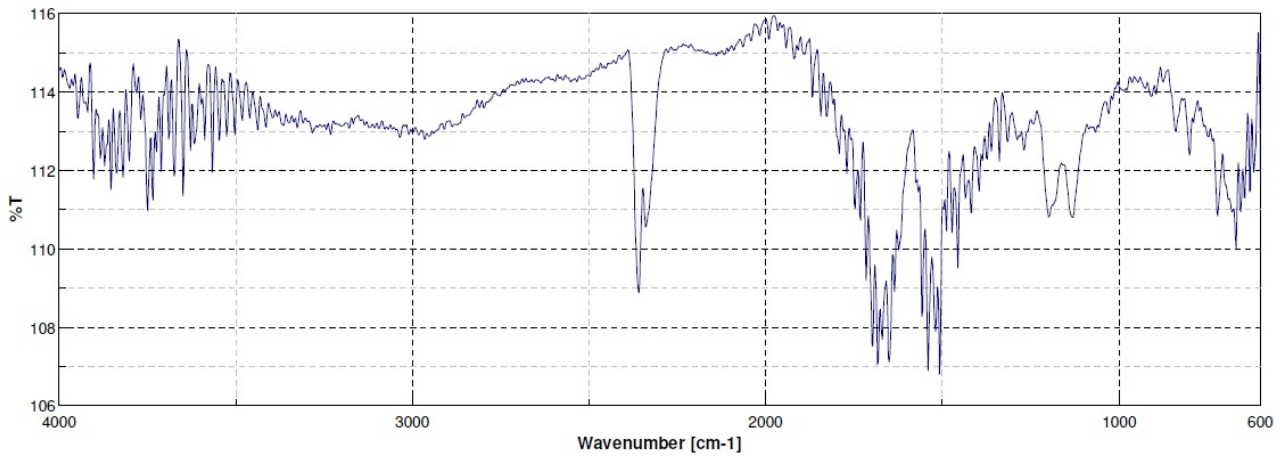


Abbildung 105: IR-Spektrum von 22.

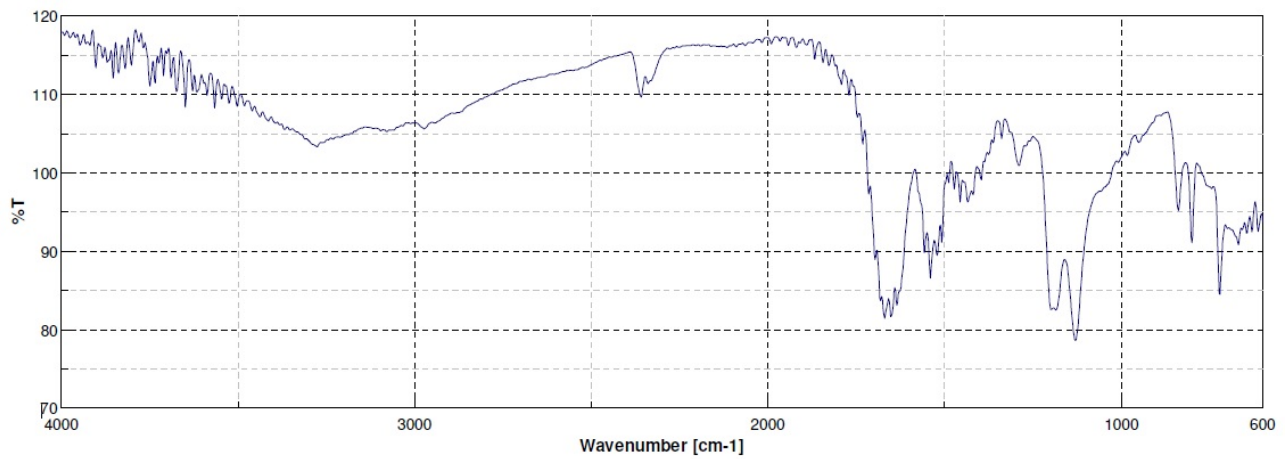


Abbildung 106: IR-Spektrum von 23.

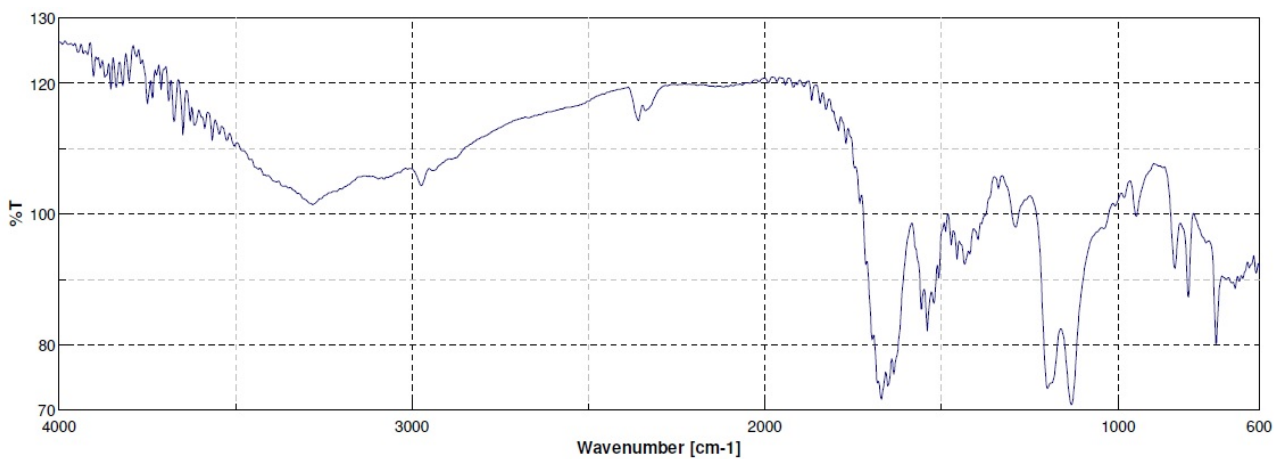


Abbildung 107: IR-Spektrum von 25.

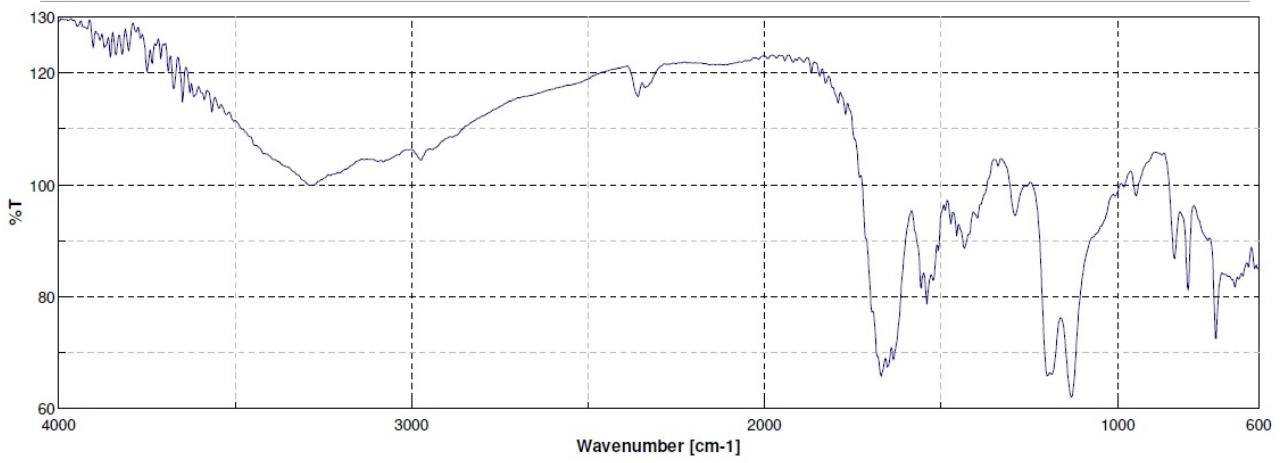


Abbildung 108: IR-Spektrum von 26.

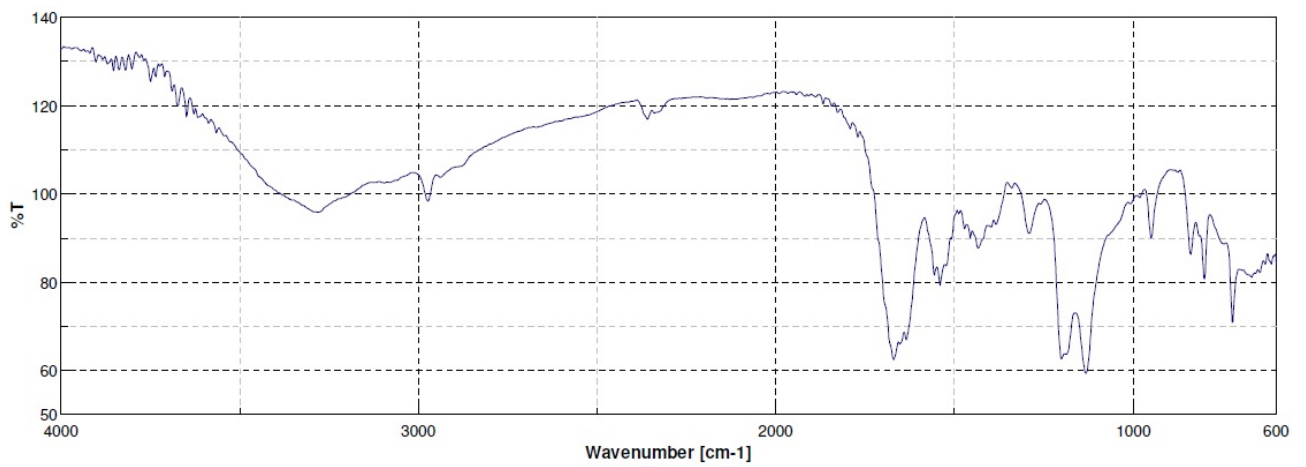


Abbildung 109: IR-Spektrum von 27.

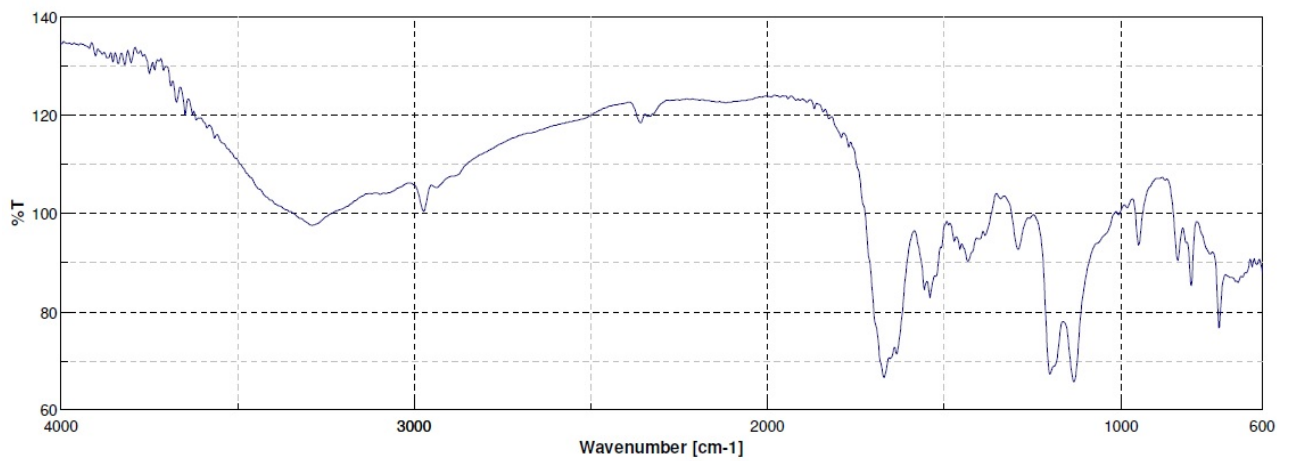


Abbildung 110: IR-Spektrum von 28.

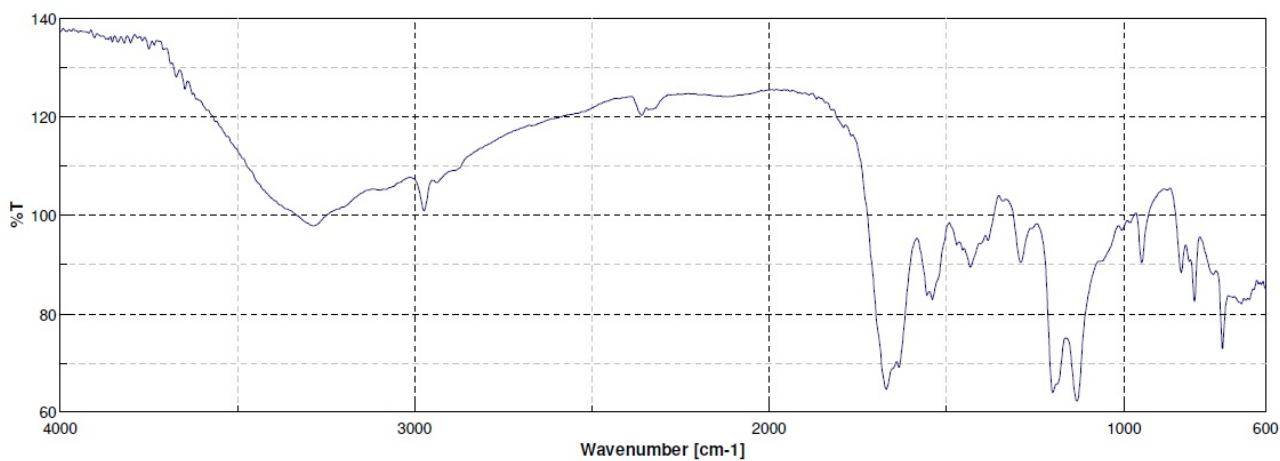


Abbildung 111: IR-Spektrum von 32.

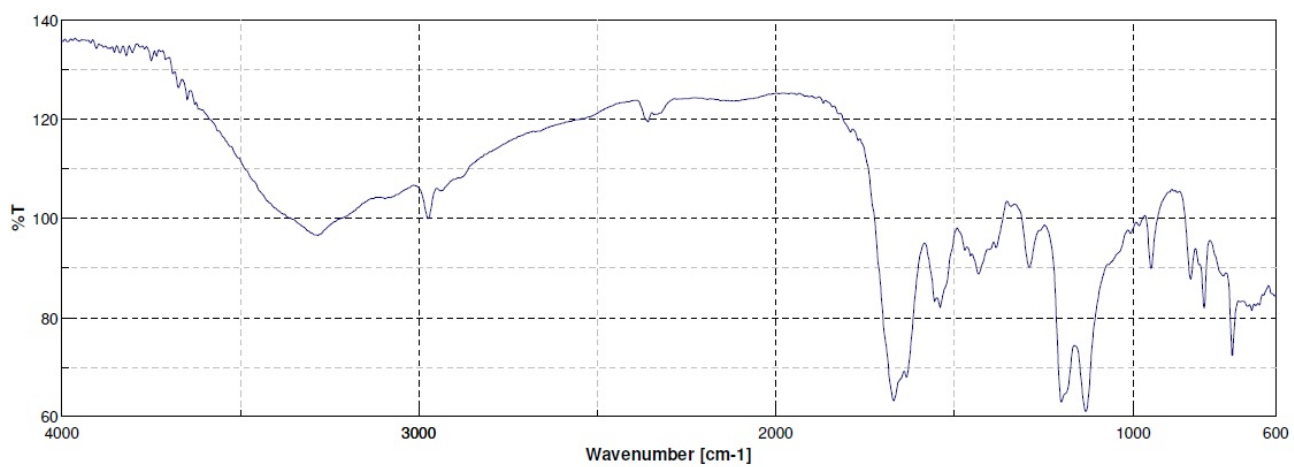


Abbildung 112: IR-Spektrum von 33.

9.6. HR-MS Spektren

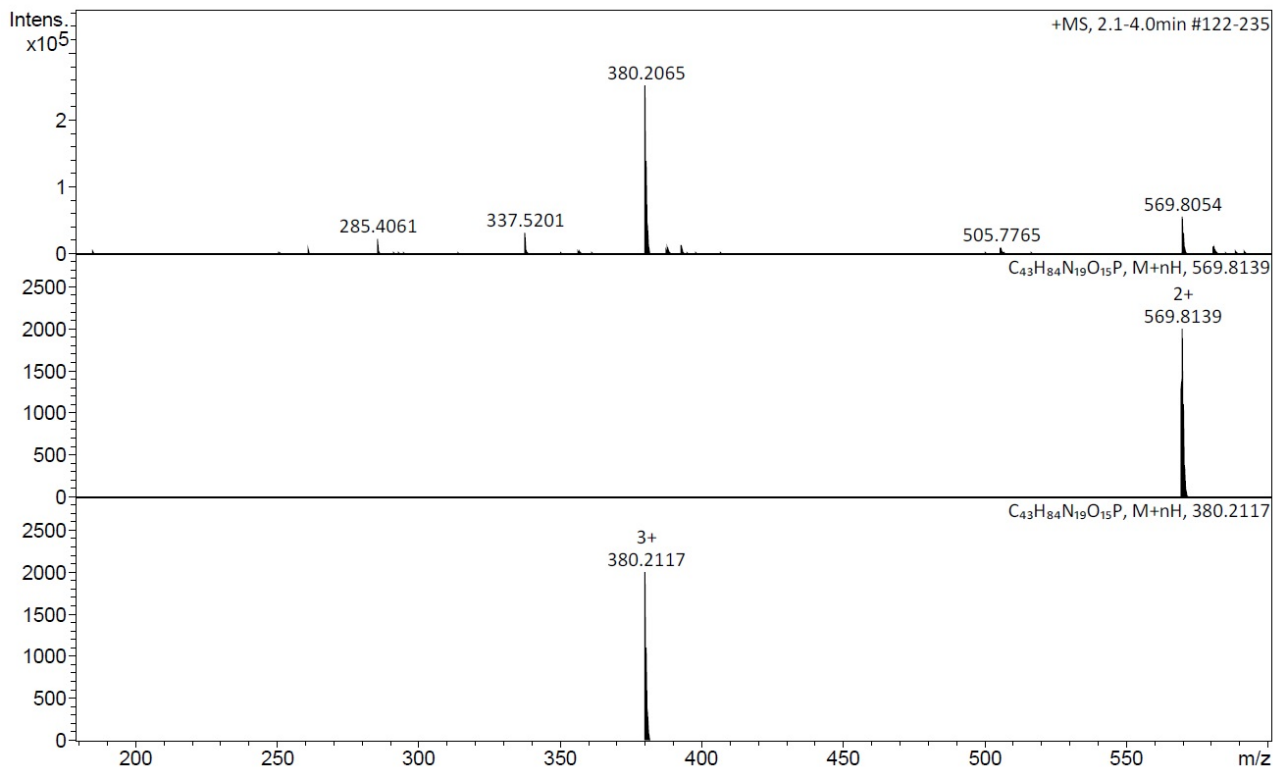


Abbildung 113: HR-MS von **22**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$.

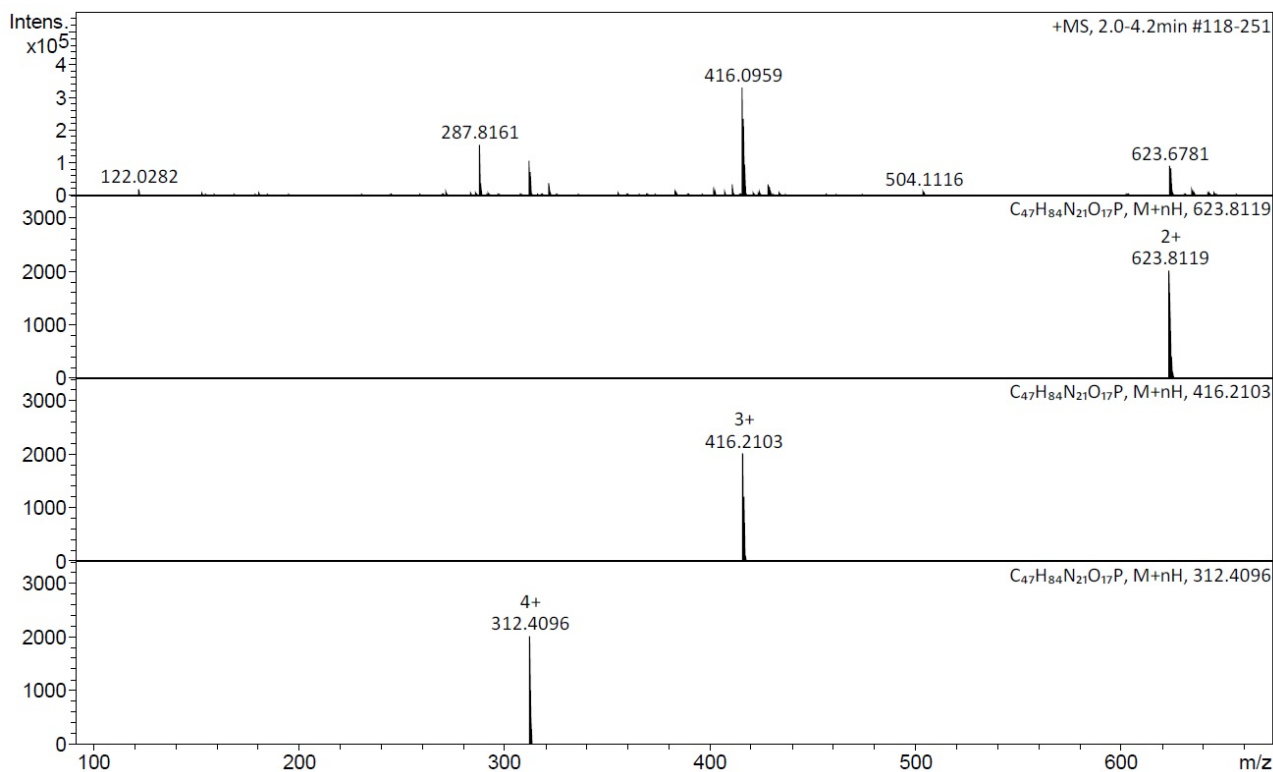


Abbildung 114: HR-MS von **23**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$. Vierte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+4H]^+$.

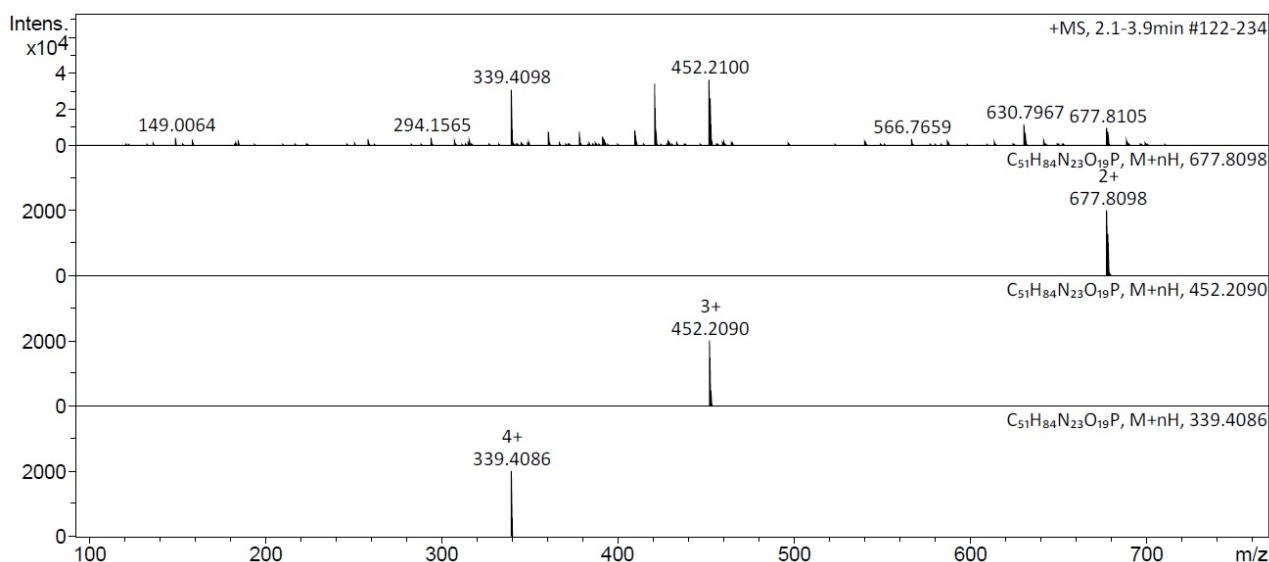


Abbildung 115: HR-MS von **25**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$. Vierte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+4H]^+$.

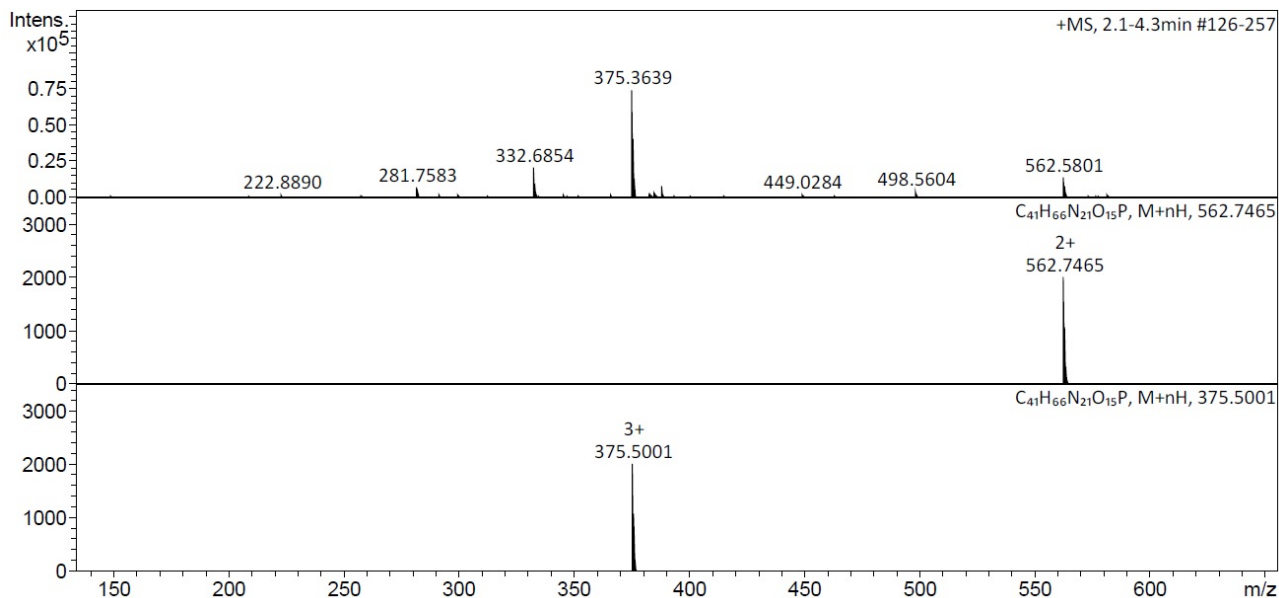


Abbildung 116: HR-MS von **26**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$.

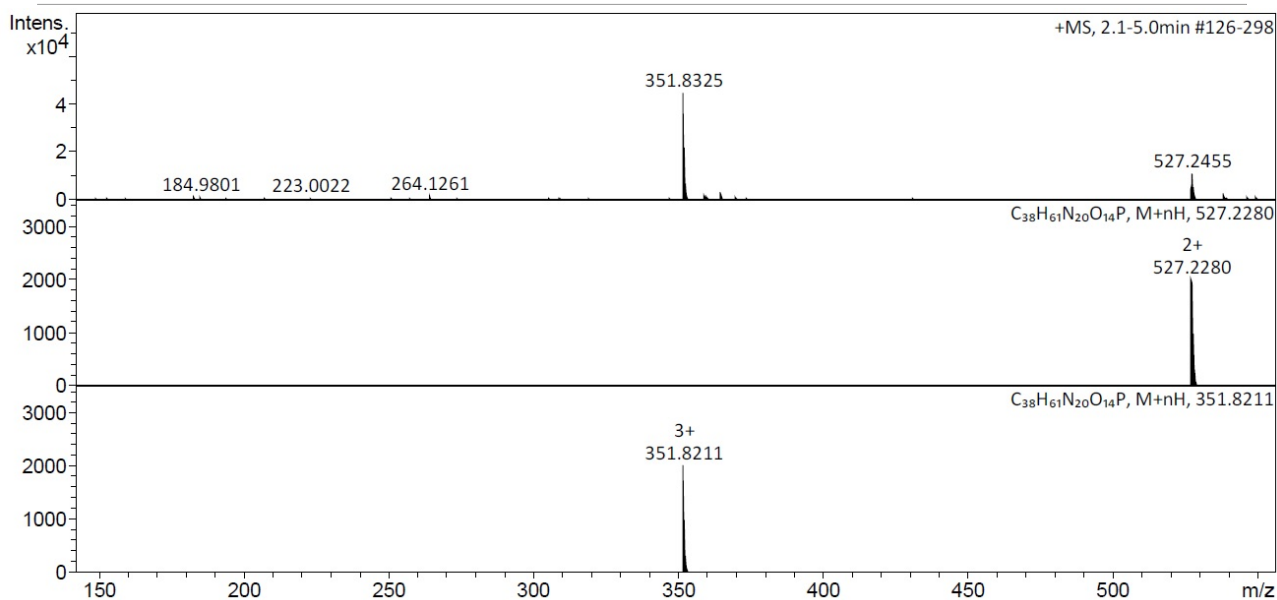


Abbildung 117: HR-MS von **27**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$.

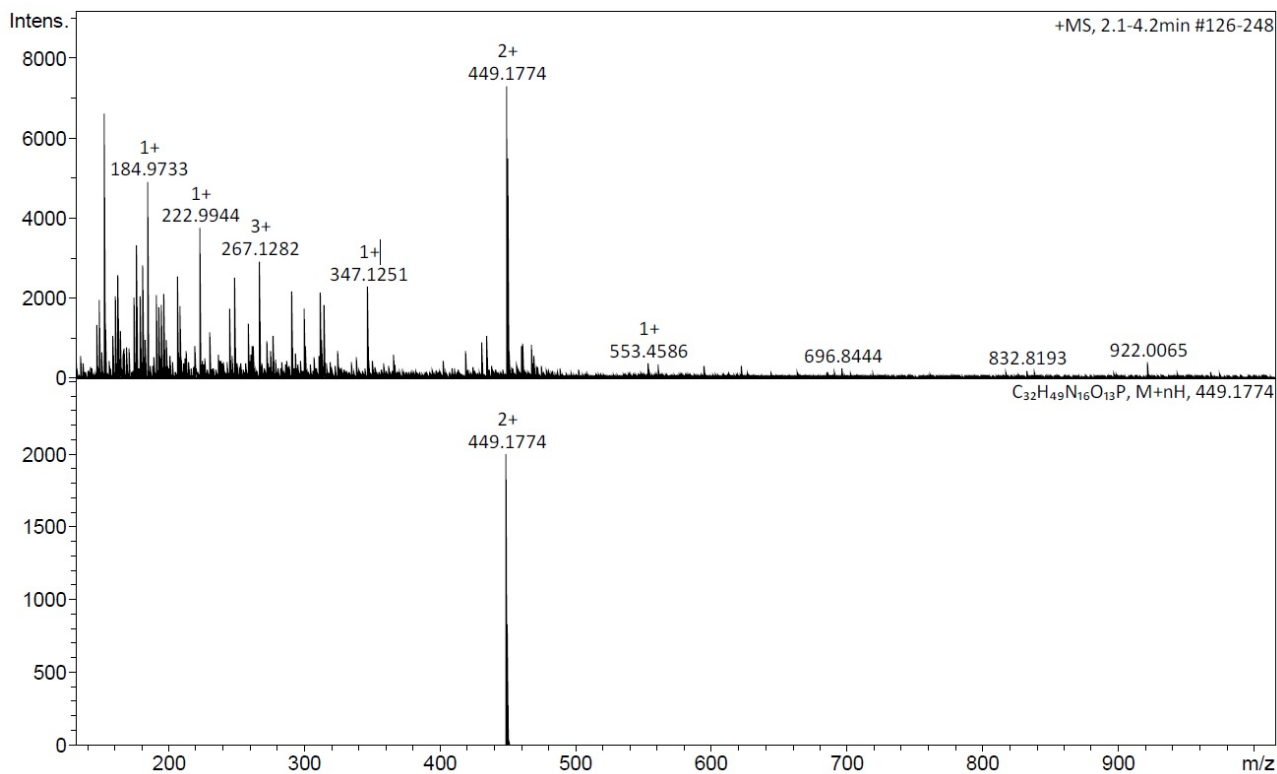


Abbildung 118: HR-MS von **28**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$.

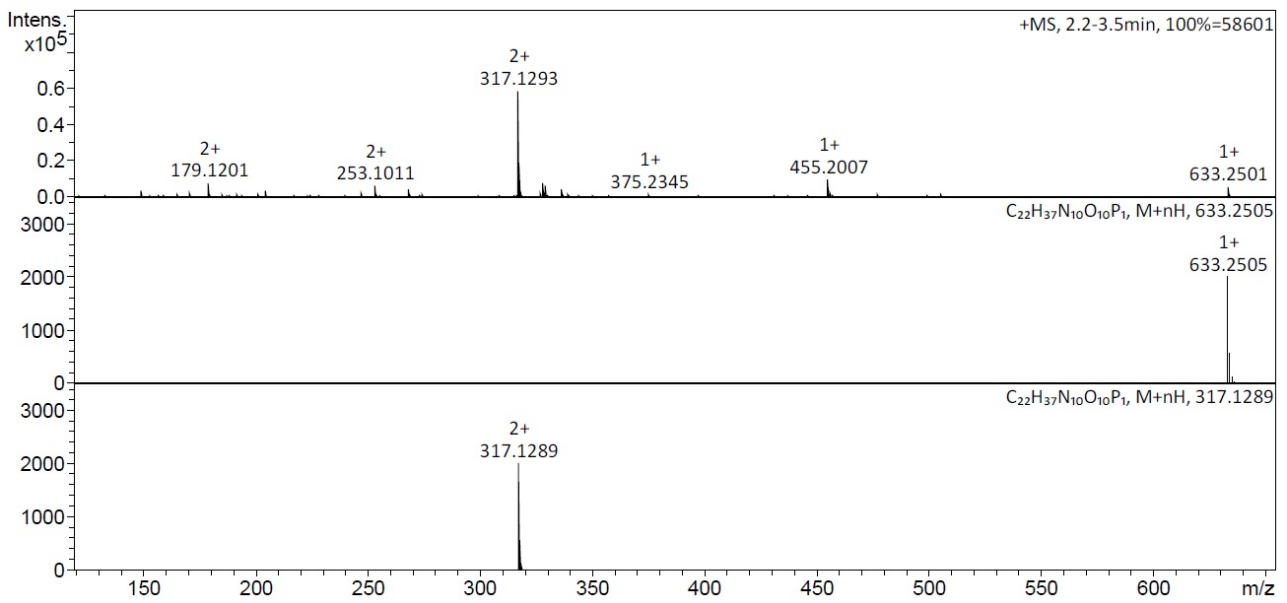


Abbildung 119: HR-MS von **32**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$.

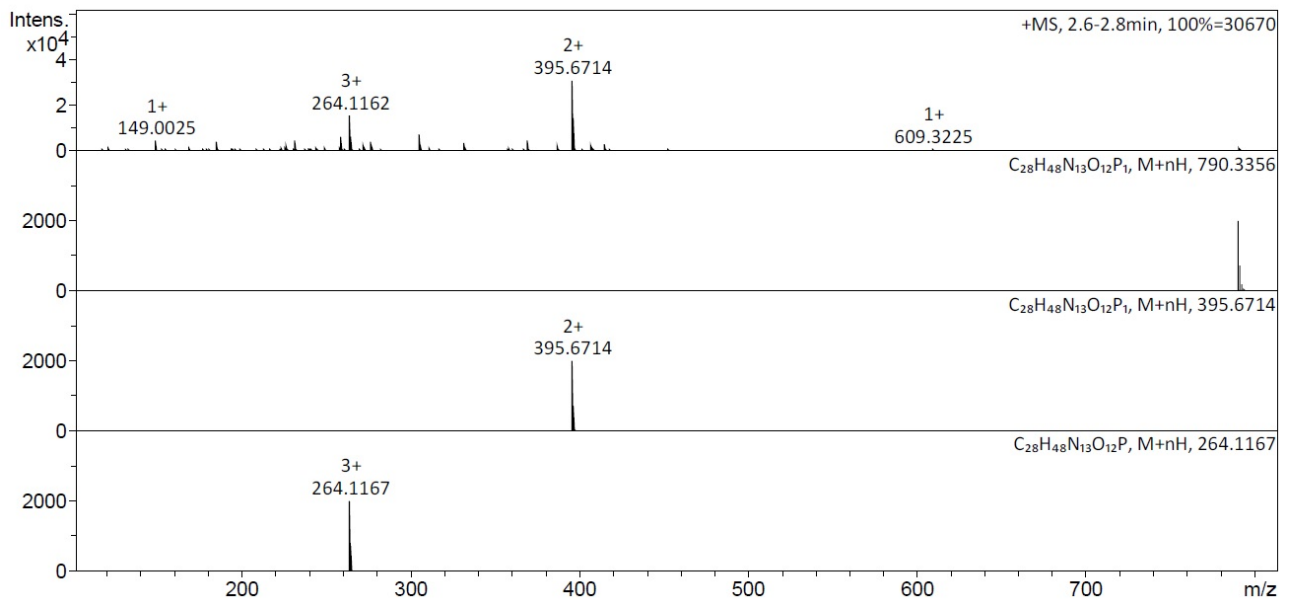


Abbildung 120: HR-MS von **33**. Erste Reihe: aufgenommenes Spektrum. Zweite Reihe: simuliertes Spektrum für $[M+H]^+$. Dritte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+2H]^+$. Vierte Reihe: Simuliertes Spektrum für $[M+3H]^+$.

9.7. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AIDS	Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom
Alloc	Allyloxycarbonyl
A569-Zellen	Eine Art von Lungenkrebszellen
BIR-Domäne	<i>baculovirus IAP repeat</i> -Domäne
Bcl-2-Proteine	<i>B-cell lymphoma 2</i> -Proteine
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bub1	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1</i>
BubR1	<i>Bub1-related kinase</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cdk1	<i>Cyclin dependent kinase 1</i>
CHMPS	<i>charged multivesikular Body proteins</i>
Chk1	Checkpointkinase 1
CPC	<i>chromosom passanger complex</i>
Ck2	<i>casein kinase 2</i>
Crm1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimidhydrochlorid
ESCRT-III	<i>endosomal sorting complexes required for transport III</i>
Et ₃ N	Triethylamin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl

GTPase Ran	<i>guanosine triphosphate kinase Ras-related nuclear protein</i>
GCP	Guanidiniocarbonylpyrrol
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCT116-Zellen	Eine Art von Darmkrebszellen
HP1	hetero chromatin protein
HeLa-Zellen	eine Zelllinie von Gebärmutterhalskrebszellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRPC	<i>hormone resistant prostate cancer</i>
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
INCENP	<i>inner centromere protein</i>
IAP	Inhibitor der Apoptose Proteine
NMR	Kernspinresonanz
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NMM	N-Methylmorphelin
M	mol/L
MAD3/Bub1b	siehe BubR1
Mad1 und Mad2	<i>Mitotic arrest deficient 1 und 2</i>
MDA-MB-231-Zellen	Eine Brustkrebszelllinie
Mklp2	<i>mitotic kinesin-like protein 2</i>

MPS1	<i>monopolar spindle protein 1</i>
MPA	Mycobaterium proteasomal ATPase
mRNS	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PC-3	eine Prostata Krebszelllinie
Plk1	polo-like kinase
PPC-1	eine Prostata Krebszelllinie
PPIs	Protein-Protein-Interaktionen
PLA	<i>proximity lligation assay</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
PyAOP	7-Aza-benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
sgo1/sgo2	Shogushin 1&2
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i>
SUMO	<i>small ubitiquin-related modifier</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phospin
TFA	Trifluoressigsäure/Trifluoracetat
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
WHO	World Health Organization
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

9.7.1 Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
2,4-Diaminobutansäure*	Dab	/
Diaminopropionsäure*	Dap	/
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Ornithin*	Orn	/
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

*: nicht-proteinogene Aminosäure