



Doctoral Thesis

Photoaktivierbare Dolichol-Derivate Synthese, enzymatische Phosphorylierung und Photoaffinitätsmarkierung

Author(s):

Grassi, Damian

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002077598> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 13126

Photoaktivierbare Dolichol-Derivate

Synthese, enzymatische Phosphorylierung und Photoaffinitätsmarkierung

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

Doktor der Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

ZÜRICH

vorgelegt von

DAMIAN GRASSI

Dipl. Chemiker (Universität Zürich)

geboren am 4. August 1967

von Rancate (TI)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. J. Brunner, Referent

Prof. Dr. M. Aebi, Korreferent

Prof. Dr. A. Vasella, Korreferent

Zürich, 1999

Zusammenfassung

Die Photosonden **63** und **64** sind Analoge der Lipide Dolichol (Dol) und Dolichylphosphat (Dol-P), die in Eukaryonten als essentielle Intermediate im Prozess der *N*-Glycosylierung im Endoplasmatischen Reticulum auftreten.

Diese Photosonden wurden aus den Bausteinen **69**, **71**, **86** und **91** hergestellt. Der Aufbau der Polyisoprenkette wurde durch Alkylierung des Hydroxysulfonyldianions von **91** mit dem Acrylsäurederivat **69** begonnen. Das Kopplungsprodukt wurde in das entsprechende Allylchlorid übergeführt und erneut mit dem Dianion von **91** gekoppelt. Nach der dreimaligen Einführung des Bausteins **91** wurde der Kettenaufbau durch die Verknüpfung des so erhaltenen Tetraterpenylchlorids mit dem Farnesylphenylsulfon **71** abgeschlossen.

Schlüsselschritt der Synthese von **63** und **64** war die reduktive Desulfonierung von **99** mit LiEt₃BH in der Gegenwart von [PdCl₂(dppp)], die das Undecaprenyl-Derivat **66** in 51% Ausbeute lieferte.

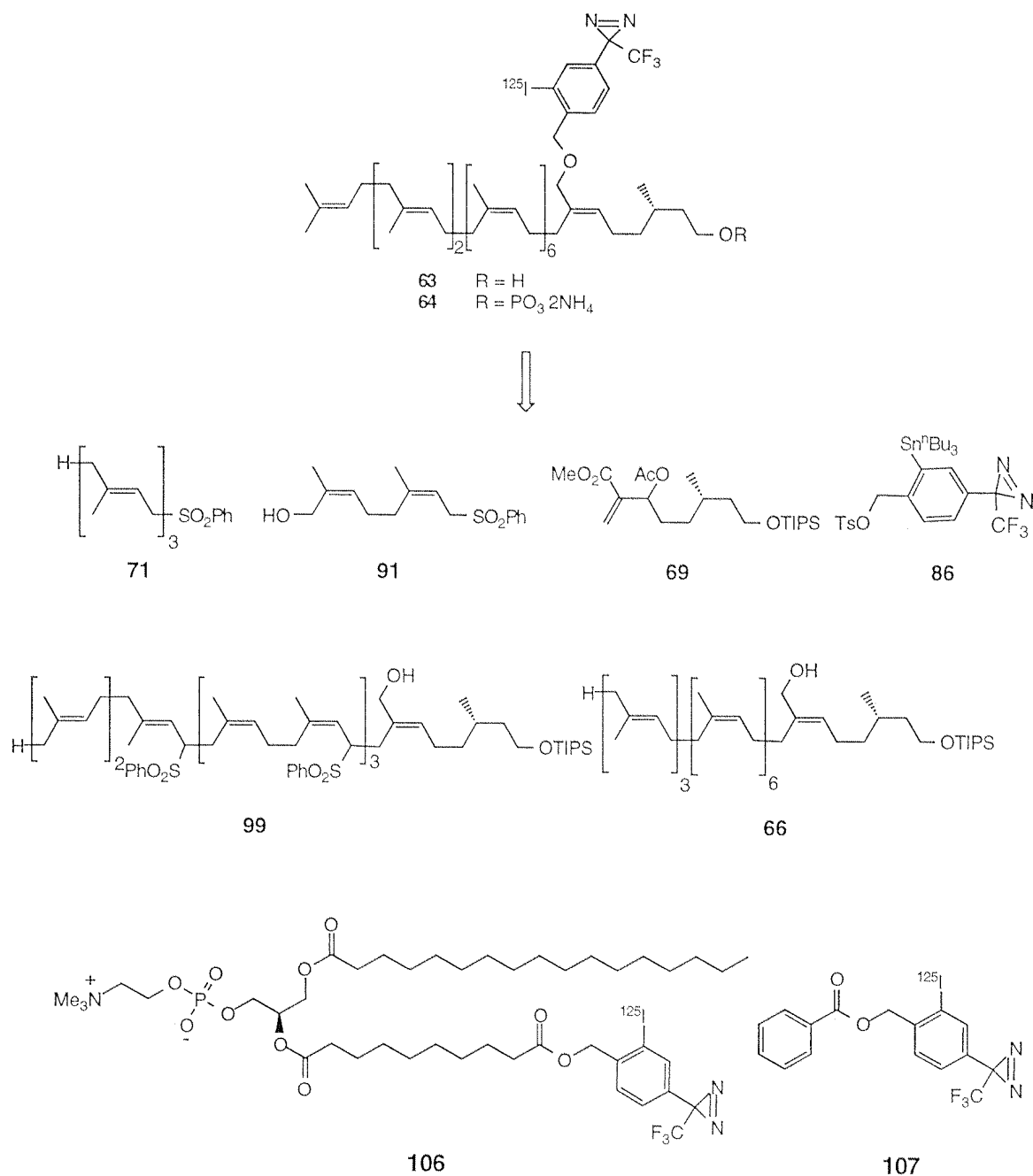
Die photoreaktive Gruppe, ein 3-(Trifluoromethyl)-3-aryldiazirin, wurde durch Alkylierung der hydroxylierten Methylgruppe der β -Prenyleinheit von **66** mit dem Tosylat **86** eingeführt. Die Tributylstannyl-Gruppe wurde darauf in einer elektrophilen aromatischen Substitution durch ¹²⁵I ersetzt.

Die Photosonde **63** ist ein Substrat der Dolicholkinase und daher ein funktionelles Analoges von natürlichem Dol. In Hefemikrosomen ist seine scheinbare Affinität für die Kinase ca. 170 mal kleiner als die von natürlichem Dol der gleichen Kettenlänge.

Die Photosonden **63** und **64** wurden in rohen Mikrosomen der Hefe zur Untersuchung der Wechselwirkung von Dol/Dol-P mit Membranproteinen eingesetzt. Die bereits bekannten Photosonden **106** und **107** dienten bei diesen Photoaffinitäts-Markierungsexperimenten als Referenzverbindungen.

Die vier Photosonden (**63**, **64**, **106** und **107**) markierten eine grosse Anzahl verschiedener Proteine, wobei die nach der Auftrennung der Proteine erhaltenen Markierungsmuster grösstenteils identisch waren. Die Photosonden **63** und **64** bewirkten keine spezifische Markierung von Membranproteinen.

Dieses Resultat wurde durch Konkurrenzexperimente bestätigt, in denen die Markierungsexperimente in der Gegenwart der entsprechenden natürlichen Substrate durchgeführt wurde. Die Markierungsmuster wurden dadurch nicht beeinflusst, d.h. es wurde keine Konkurrenz zwischen den Photosonden und den natürlichen Substraten um die Wechselwirkung mit einzelnen Membranproteinen beobachtet.



Summary

The photochemical probes **63** and **64** are analogues of dolichol (dol) and dolichylphosphate (dol-P). These lipids are obligatory intermediates in the *N*-linked glycosylation pathway in the endoplasmic reticulum.

The photolabels **63** and **64** were synthesised from the building blocks **69**, **71**, **86**, and **91**. The assembly of the polyprenyl chain was started by the alkylation of the hydroxysulfonyl dianion of **91** with the acrylic acid derivative **69**. The coupling product

was transformed into the corresponding allyl chloride and again coupled with the dianion of **91**. After the introduction of three units of **91** the chain assembly was completed by coupling the tetraterpenoid intermediate with farnesylphenyl sulfone.

The key reaction in the synthesis of **63** and **64** was the reductive desulfonylation of **99** with LiEt₃BH in the presence of [PdCl₂(dppp)], which gave the undecaprenyl derivative **66** in 51% yield.

The photoreactive 3-(trifluoromethyl)-3-aryldiazirine group was connected to the terpene **66** by alkylation of the hydroxylated methyl group of the β-prenyl unit with the tosylate **86**. The radiolabelled [¹²⁵I]-substituent was introduced by the electrophilic aromatic substitution of the tributylstannyl group by ¹²⁵I.

The photoreagent **63** is a substrate for the dolichol kinase and hence a functional analogue of natural dol. In crude microsomes of yeast it is about 170 times less stimulatory to the kinase than the authentic substrate of the same chain length.

The photoprobes **63** and **64** were used to investigate the interaction of dol/dol-P with membrane proteins. In these photoaffinity labelling experiments in crude membranes of yeast the known photoreagents **106** and **107** served as reference compounds. The photoprobes labelled numerous membrane proteins whereby the labelling pattern were essentially identical. The photoprobes **63** and **64** showed no specific labelling of proteins. These results were confirmed by competition experiments in which the labelling was carried out in the presence of the corresponding natural substrates. This did not influence the labelling pattern, to say, there is no detectable competition between the photoreagents and the natural substrates for the interaction with certain proteins.