

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät Chemie und Pharmazie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Synthese und Etablierung  
eines photolabilen Linkers  
zur Metabolitanreicherung  
  
und  
  
Synthese und Einsatz von  
Naturstoffderivaten als  
molekulare Sonden für  
Activity-Based Protein Profiling**

vorgelegt von

**Ronald Frohnafel, geb. Orth**

aus Arad, Rumänien

2010

## **Erklärung**

Die vorliegende Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Professor Dr. Stephan A. Sieber betreut und von Herrn Professor Dr. Thomas Carell vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München vertreten.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 15.10.2010

---

Ronald Frohnafel, geb. Orth

Dissertation eingereicht am: 15.10.2010

1. Gutachter: Professor Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Professor Dr. Stephan A. Sieber

Mündliche Prüfung am: 10.12.2010

Meiner Frau Sabine

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

### Beiträge in rezensierten Fachjournalen

R. Orth, S. A. Sieber (2009) A Photolabile Linker for the Mild and Selective Cleavage of Enriched Biomolecules from Solid Support. *J. Org. Chem.* 74(21):8476–8479.

R. Orth, M. Pitscheider, S. A. Sieber (2010) Chemical Probes for Labeling of the Bacterial Glucosaminidase NagZ via the Huisgen Cycloaddition. *SYNTHESIS* 13:2201-2206.

R. Orth, T. Böttcher, S. A. Sieber (2010) The biological targets of acivicin inspired 3-chloro- and 3-bromodihydroisoxazole scaffolds. *ChemComm* eingereicht.

### Beiträge als Buchkapitel

S. A. Sieber, T. Böttcher, I. Staub, R. Orth (2010) Small Molecules as Versatile Tools for Activity-Based Protein Profiling Experiments. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*; L. Mander, H.-W. Lui, Eds.; Elsevier: Oxford, volume 9:629-674.

---

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis.....   | 5  |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 11 |
| 1 Allgemeine Einleitung.....  | 15 |
| 1.1 Hintergrund zum aktivitätsbasierenden Protein Profiling (ABPP) .....  | 15 |
| 1.2 Aufbau einer aktivitätsbasierenden Sonde für ABPP .....   | 16 |
| 1.3 In vitro ABPP und in vivo ABPP .....  | 19 |
| 1.4 Nachweis und Identifikation von Zielproteinen im ABPP.....  | 21 |
| 1.5 Identifikation von Zielproteinen durch Massenspektrometrie .....  | 22 |
| 2 Projekt I - Einleitung .....  | 24 |
| 3 Projekt I - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung .....   | 26 |
| 4 Projekt I - Ergebnisse und Diskussion .....   | 29 |
| 4.1 Synthese des Phenacyl Linkers <b>1</b> .....  | 29 |
| 4.2 Synthese des trifunktionalen Linkers <b>7</b> .....   | 31 |
| 4.3 Photolyse des Phenacyl Bausteins <b>3</b> .....   | 32 |
| 4.4 Photolyse des Phenacyl Linkers <b>1</b> in Lösung.....  | 35 |
| 4.5 Photolyse des Phenacyl Linkers <b>1</b> an Avidin-Agarosebeads .....  | 36 |
| 4.6 Reinigung von <i>N</i> -(Lysyl)hexinamid oder <i>N</i> -Benzylhexinamid durch den<br>Phenacyl Linker <b>1</b> ..... | 37 |
| 4.6.1 Reinigung von Proteinen durch den Phenacyl Linker <b>1</b> .....  | 41 |
| 5 Projekt I - Zusammenfassung und Ausblick .....  | 44 |
| 6 Projekt II - Einleitung.....  | 45 |
| 7 Projekt II - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung.....   | 48 |
| 8 Projekt II - Ergebnisse und Diskussion .....  | 51 |
| 8.1 Synthese der Glycopeptidsonden <b>13, 14</b> und <b>15</b> .....  | 51 |
| 8.2 In vitro Markierung gereinigter Glycosidasen durch die Sonden <b>13, 14</b> und <b>15</b> .....                     | 56 |
| 8.3 In vivo und in vitro Proteommarkierung durch die Sonden <b>13, 14</b> und <b>15</b> .....                           | 61 |
| 9 Projekt II - Zusammenfassung und Ausblick .....   | 61 |
| 10 Projekt III - Einleitung .....   | 62 |
| 11 Projekt III - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung .....  | 63 |
| 12 Projekt III - Ergebnisse und Diskussion.....   | 65 |
| 12.1 Synthese der Sonden .....  | 65 |
| 12.2 In vivo Proteommarkierung .....  | 67 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 12.3    | Identifizierung und Charakterisierung markierter Zielproteine durch<br>Massenspektrometrie.....  | 71 |
| 12.4    | Inhibitionsstudien .....   | 74 |
| 13      | Projekt III - Zusammenfassung und Ausblick.....  | 77 |
| 14      | Zusammenfassung .....  | 78 |
| 15      | Summary .....  | 82 |
| 16      | Experimenteller Teil.....  | 86 |
| 16.1    | Allgemeine Methoden .....  | 86 |
| 16.2    | Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasenpeptidsynthese .....  | 87 |
| 16.2.1  | Kaisertest.....  | 87 |
| 16.2.2  | Fmoc-Entschützung.....   | 88 |
| 16.2.3  | Kopplung von Aminosäuren und anderen Verbindungen.....   | 88 |
| 16.2.4  | Kopplung der ersten Aminosäure an einen Linker.....  | 89 |
| 16.2.5  | Abspaltung und Etherfällung der synthetischen Peptide.....   | 89 |
| 16.3    | Synthesen .....  | 89 |
| 16.3.1  | Synthese des 4'-Azido-2-biotinoylacetophenon <b>2</b> .....  | 89 |
| 16.3.2  | Synthese des Triazols <b>3</b> .....   | 90 |
| 16.3.3  | Synthese von Fmoc-5-Ava-Lys(Mtt)-Lys( <i>p</i> -Azidobenzoyl)-(Rink Amid)-MBHA<br>Harz <b>4</b> .....  | 91 |
| 16.3.4  | Synthese des Phenacyl Linkers <b>1</b> –Kopplung ans festphasengebundene Peptid <b>4</b> ,<br>Reinigung und TAMRA Kopplung.....  | 92 |
| 16.3.5  | Synthese des trifunktionalen Linkers <b>7</b> .....  | 93 |
| 16.3.6  | Synthese von NHS-Hexinoat <b>10</b> .....  | 94 |
| 16.3.7  | Synthese von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-glucofuranose <b>16</b> .....   | 94 |
| 16.3.8  | Synthese von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranose <b>18</b> .....   | 95 |
| 16.3.9  | Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucofuranosyl-1-<br>chlorid <b>20</b> .....  | 96 |
| 16.3.10 | Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-glucofuranosyl-1-bromid <b>17</b> .....  | 97 |
| 16.3.11 | Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-bromid <b>19</b> .....  | 97 |
| 16.3.12 | Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucofuranosyl-1-<br>azid <b>23</b> .....  | 98 |
| 16.3.13 | Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-glucofuranosyl-1-azid <b>21</b> und<br>Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-1-azid <b>22</b> ..... | 99 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 16.3.14 | Synthese von <i>N</i> <sup>α</sup> -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glucopyranosyl)-6-azahistidin <b>24</b> und <i>N</i> <sup>α</sup> -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranosyl)-6-azahistidin <b>25</b> und <i>N</i> <sup>α</sup> -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- <i>N</i> -(2-acet-amido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-6-azahistidin <b>26</b> ..... 100 | 100 |
| 16.3.15 | Synthese des festphasengebundenen Peptids Gly-Phe(p-Bz)-Gly-Lys(Hex)-Rink-MBHA Harz <b>27</b> ..... 103  | 103 |
| 16.3.16 | Synthese von Glycopeptid <b>13</b> , <b>14</b> und <b>15</b> ..... 103   | 103 |
| 16.3.17 | Synthese von Glyoxalsäurealdoxim <b>40</b> ..... 105   | 105 |
| 16.3.18 | Synthese von Dibromformaldoxim <b>41</b> ..... 105   | 105 |
| 16.3.19 | Synthese von Dichlorformaldoxim <b>42</b> ..... 106  | 106 |
| 16.3.20 | Synthese von 3-Brom-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>43</b> ..... 106   | 106 |
| 16.3.21 | Synthese von <i>cis</i> -3-Brom-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin <b>44a</b> und <i>cis</i> -3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazolin <b>44b</b> ..... 107   | 107 |
| 16.3.22 | Synthese von <i>cis</i> -3-Brom-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>45a</b> und <i>cis</i> -3-Brom-5-ethyl-4-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>45b</b> ..... 108   | 108 |
| 16.3.23 | Synthese von <i>cis</i> -3-Brom-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin <b>46a</b> und <i>cis</i> -3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazolin <b>46b</b> ..... 109   | 109 |
| 16.3.24 | Synthese von 3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>47</b> ..... 110  | 110 |
| 16.3.25 | Synthese von <i>cis</i> -3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin <b>48a</b> und <i>cis</i> -3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazolin <b>48b</b> ..... 111   | 111 |
| 16.3.26 | Synthese von <i>cis</i> -3-Chlor-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>49a</b> und <i>cis</i> -3-Chlor-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin <b>49b</b> ..... 112   | 112 |
| 16.3.27 | Synthese von <i>cis</i> -3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin <b>50a</b> und <i>cis</i> -3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazolin <b>50b</b> ..... 113   | 113 |
| 16.3.28 | Synthese von (3-Brom-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>32</b> ..... 114   | 114 |
| 16.3.29 | Synthese von <i>cis</i> -(3-Brom-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>33a</b> und <i>cis</i> -(3-Brom-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>33b</b> ..... 114   | 114 |
| 16.3.30 | Synthese von <i>cis</i> -(3-Brom-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>34a</b> und <i>cis</i> -(3-Brom-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>34b</b> ..... 116   | 116 |
| 16.3.31 | Synthese von <i>cis</i> -(3-Brom-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>35a</b> und <i>cis</i> -(3-Brom-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>35b</b> ..... 117   | 117 |
| 16.3.32 | Synthese von (3-Chlor-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>36</b> ..... 118  | 118 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| 16.3.33   | Synthese von <i>cis</i> -(3-Chlor-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>37a</b> und <i>cis</i> -(3-Chlor-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>37b</b> ..... | 119 |
| 16.3.34   | Synthese von <i>cis</i> -(3-chloro-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>38a</b> und <i>cis</i> -(3-chloro-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>38b</b> ..... | 120 |
| 16.3.35   | Synthese von <i>cis</i> -(3-Chlor-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat <b>39a</b> und <i>cis</i> -(3-Chlor-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat <b>39b</b> ..... | 121 |
| 16.4      | Chemische Methoden .....   | 122 |
| 16.4.1    | Photolyse des Phenacylesters <b>3</b> .....  | 122 |
| 16.4.2    | Photolyse des Phenacyl Linkers <b>1</b> in Lösung.....   | 124 |
| 16.4.3    | Photolyse des Phenacyl Linkers <b>1</b> an Avidin-Agarosebeads .....   | 124 |
| 16.4.4    | Reinigung von <i>N</i> -(Lysyl)hexinamid durch den Phenacyl Linker <b>1</b> .....  | 125 |
| 16.4.5    | Reinigung von <i>N</i> -Benzylhexinamid durch den Phenacyl Linker <b>1</b> .....   | 126 |
| 16.4.6    | Reinigung von H30 Protein durch den Phenacyl Linker <b>1</b> .....   | 127 |
| 16.5      | Biochemische und Molekularbiologische Methoden .....   | 128 |
| 16.5.1    | Verwendete Lösungen, Puffer und Medien.....  | 128 |
| 16.5.1.1  | Lösungen .....   | 129 |
| 16.5.1.2  | Puffer.....  | 129 |
| 16.5.1.3  | Flüssigmedien.....   | 130 |
| 16.5.1.4  | Festmedium .....   | 130 |
| 16.5.2    | Verwendete Bakterienstämme.....  | 131 |
| 16.5.3    | Kultivierung verwendeter Bakterien .....   | 131 |
| 16.5.4    | Herstellung eines Kryostocks.....  | 132 |
| 16.5.5    | Proteompräparation bakterieller Proteome.....  | 132 |
| 16.5.6    | Proteompräparation aus HeLa-Zellen .....   | 133 |
| 16.5.7    | Bradford-Test .....  | 133 |
| 16.5.8    | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....  | 134 |
| 16.5.8.1  | Herstellung von Polyacrylamidgelen .....   | 134 |
| 16.5.8.2  | Durchführung der SDS-PAGE und Fluoreszenzaufnahme eines Gels .....   | 135 |
| 16.5.9    | Präparation genomischer DNA .....  | 135 |
| 16.5.10   | PCR .....  | 135 |
| 16.5.10.1 | Primerdesign.....  | 135 |
| 16.5.10.2 | Durchführung der PCR.....  | 137 |
| 16.5.11   | Agarose Gelelektrophorese .....  | 139 |
| 16.5.11.1 | Herstellung von Agarosegelen .....   | 139 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 16.5.11.2 | Durchführung der Agarosegelelektrophorese und Fluoreszenzaufnahme eines Gels.....   | 139 |
| 16.5.12   | Agarose Gelbandenextraktion .....   | 139 |
| 16.5.13   | BP Reaktion.....  | 140 |
| 16.5.14   | LR Reaktion .....   | 140 |
| 16.5.15   | Plasmidpräparation.....   | 141 |
| 16.5.16   | Vektortransformation .....  | 141 |
| 16.5.17   | Analytische <i>in vitro</i> Proteommarkierung .....   | 141 |
| 16.5.18   | Präparative <i>in vitro</i> Proteommarkierung .....   | 142 |
| 16.5.19   | Analytische <i>in vitro</i> Proteommarkierung mit der Sonde <b>15</b> .....   | 143 |
| 16.5.20   | Analytische <i>in vivo</i> Proteommarkierung .....  | 143 |
| 16.5.21   | Präparative <i>in vivo</i> Proteommarkierung .....  | 144 |
| 16.5.22   | Analytische <i>in vitro</i> Proteommarkierung mit den Sonden <b>13</b> , <b>14</b> und <b>15</b> .....  | 145 |
| 16.5.23   | Präparative <i>in vitro</i> Proteommarkierung mit der Sonde <b>15</b> .....   | 145 |
| 16.5.24   | Analytische <i>in vivo</i> Proteommarkierung mit der Sonde <b>15</b> .....  | 145 |
| 16.5.25   | Präparative <i>in vivo</i> Proteommarkierung mit der Sonde <b>15</b> .....  | 145 |
| 16.5.26   | Detektionslimit von NagZ, YihQ oder LacZ durch Glycopeptid <b>15</b> .....  | 146 |
| 16.5.27   | Diskriminierung von NagZ durch die Glycopeptide <b>13</b> , <b>14</b> und <b>15</b> .....   | 146 |
| 16.5.28   | Messung des IC <sub>50</sub> an NagZ.....   | 147 |
| 16.5.29   | Analytische <i>in vivo</i> Proteommarkierung mit den Sonden <b>32</b> bis <b>39</b> .....   | 147 |
| 16.5.30   | Präparative <i>in vivo</i> Proteommarkierung mit den Sonden <b>32</b> und <b>34</b> .....   | 148 |
| 16.5.31   | Identifizierung von Zielenzymen und Charakterisierung durch Massenspektrometrie.....  | 148 |
| 16.5.32   | Rekombinante Expression.....  | 151 |
| 16.5.33   | Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie.....   | 152 |
| 16.5.34   | Massenspektrometrische Analyse der markierten Aldehyd Alkohol Dehydrogenase (AADH).....   | 153 |
| 16.5.35   | IC <sub>50</sub> -Bestimmung der Aldehyd Alkohol Dehydrogenase (AADH) .....   | 154 |
| 16.5.36   | Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der Verbindungen <b>32</b> , <b>33</b> , <b>34</b> , <b>36</b> , <b>37</b> gegen verschiedene Bakterien ..... | 155 |
| 16.5.37   | Markierung der $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) mit der Verbindung <b>32</b> .....  | 156 |
| 16.5.38   | Markierung rekombinanter Enzyme.....  | 156 |
| 17        | Danksagung .....  | 158 |
| 18        | Literaturverzeichnis.....   | 159 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|                  |     |
|------------------|-----|
| LEBENSLAUF ..... | 165 |
|------------------|-----|

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| A                  | Nukleobase Adenin  |
| ABPP               | <i>activity-based protein profiling</i><br>(aktivitätsbasierendes Protein Profiling) |
| abs.               | absolut  |
| Ac                 | Acetyl   |
| Ac <sub>2</sub> O  | Acetanhydrid   |
| APS                | Ammoniumpersulfat  |
| Ar                 | Aryl   |
| arom.              | aromatisch   |
| AU                 | <i>arbitrary unit</i>  |
| ber.               | berechnet  |
| B                  | nicht näher erläuterte Base, Biotin  |
| BHB                | <i>Brain Heart Broth</i>   |
| BOP                | Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-<br>phosphoniumhexafluorophosphat          |
| bp                 | <i>base pairs</i> (Basenpaare)   |
| BP                 | Benzophenon  |
| BSA                | Bovines Serumalbumin   |
| C                  | Nukleobase Cytosin   |
| CH <sub>3</sub> CN | Acetonitril  |
| d                  | Dublett  |
| Da                 | Dalton   |
| DCM                | Dichlormethan  |
| dd                 | Doppel-Dublett   |
| DEI                | Desorption Elektronenstoß Ionisation   |
| DIPEA              | <i>N</i> -Diisopropylethylamin   |
| DMF                | <i>N,N</i> -Dimethylformamid   |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)                                       |
| DTT                | 1,4-Dithio-DL-threitol   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                  |   |
|------------------|---|
| EI               | Elektronenstoß Ionisation                             |
| eq               | Äquivalent(e)   |
| ESI              | Elektrospray Ionisation                               |
| Et               | Ethyl   |
| EtBr             | Ethidiumbromid  |
| fc               | finale Konzentration                                  |
| Fmoc             | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl                            |
| Fmoc-(AA)-OH     | beliebige $N^{\alpha}$ -Fmoc geschützte Aminosäure    |
| G                | Nukleobase Guanin                                     |
| Gal              | D-Galactose   |
| GC               | Gaschromatographie                                    |
| gef.             | gefunden  |
| Glc              | D-Glucose   |
| GlcNAc           | <i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin                         |
| h                | Stunde(n)   |
| HOBt             | 1- <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol                      |
| HPLC             | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>            |
| HV               | Hochvakuum  |
| Hz               | Hertz   |
| IC <sub>50</sub> | mittlere inhibitorische Konzentration                 |
| IGFS             | <i>in-gel fluorescence scanning</i>                   |
| IPTG             | β-Isopropylthiogalactopyranosid                       |
| J                | skalare Kopplungskonstante                            |
| kb               | Kilobasen   |
| konz.            | konzentriert  |
| l                | Liter   |
| LB               | Luria Bertani   |
| LC               | <i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatographie) |
| m                | Multipllett, Masse                                    |
| M                | Molar / Molare Masse                                  |
| mA               | Miliampère  |
| MBHA             | 4-Methylbenzhydrylamin                                |
| Me               | Methyl  |
| MeOH             | Methanol  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| m/z               | Verhältnis Masse zu Ladung   |
| MHz               | Megahertz  |
| MIC               | <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (minimale Hemmkonzentration)               |
| min               | Minute(n)  |
| MRSA              | Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i> Stamm                          |
| MS                | Massenspektrometrie / Massenspektrometer   |
| Mtt               | 4-Methoxy-trityl   |
| m/v               | <i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)                                       |
| MW                | <i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)   |
| NAc               | <i>N</i> -Acetamido  |
| nm                | nanometer  |
| NMR               | <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)                               |
| o                 | ortho  |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte gemessen als Absorption bei 600 nm                                 |
| p                 | <i>para</i>  |
| PBS               | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)                      |
| PCR               | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)                        |
| PEGA              | PolyethylenGlycol Polyacrylamid Copolymer  |
| Ph                | Phenyl   |
| ppm               | parts per million  |
| Pra               | Propargylglycin  |
| PyBOP             | Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris-(pyrrolidino)-phosphonium-hexafluorophosphat |
| q                 | Quartett   |
| quint.            | Quintett   |
| R <sub>f</sub>    | Retentionsfaktor   |
| R <sub>t</sub>    | Retentionszeit   |
| Rink Amid         | 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-aminomethyl)-phenoxy Harz                                 |
| RP                | <i>reversed phase</i>  |
| rpm               | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)                             |
| RT                | Raumtemperatur   |
| s                 | Singulett / Sekunde  |
| SDS               | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)                               |
| SPPS              | <i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)                    |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| PAGE            | Polyacrylamid Gelelektrophorese  |
| sp.             | Species  |
| t               | Triplett   |
| T               | Nukleobase Thymin  |
| T <sub>m</sub>  | Schmelztemperatur  |
| TAE             | Tris-Acetat-EDTA   |
| TAMRA           | Tetramethylrhodamin  |
| TBTA            | Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin  |
| TBTU            | <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-tetrafluoroborat- <i>N</i> -oxid |
| <sup>t</sup> Bu | <i>tert</i> -Butyl   |
| TCM             | Chloroform   |
| TCEP            | Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid  |
| TEA             | Triethylamin   |
| TEMED           | <i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin  |
| Tf              | triflyl / trifluormethansulfonyl   |
| TFA             | Trifluoressigsäure   |
| THF             | Tetrahydrofuran  |
| Tris            | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol   |
| u               | <i>unit</i>  |
| UV              | Ultraviolett   |
| V               | Volt   |
| v/v             | <i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)   |
| δ               | chemische Verschiebung   |
| τ               | Transmission   |

# 1 Allgemeine Einleitung

## 1.1 Hintergrund zum aktivitätsbasierenden Protein Profiling (ABPP)

Im Juli 2010 waren etwa 1140 Genomsequenzierungen abgeschlossen.<sup>[1]</sup> Sie lieferten eine Vielzahl an Information über die untersuchten prokaryotischen und eukaryotischen Genome. Allerdings kann durch bloße Sequenzierung den genom-codierten Proteinen keine Funktion zugewiesen werden. Das Ziel der Proteomik besteht darin, diese Wissenslücke zu schließen. Hierfür steht eine Vielzahl an etablierten Methoden zur Verfügung, um Informationen über die molekulare, zelluläre und (patho)physiologische Funktion des betreffenden Proteins zu erhalten: So kann mit Hilfe der etablierten zweidimensionalen Gelelektrophorese die Änderung in der Häufigkeit eines Proteins und dessen Zusammensetzung in Proteinkomplexen im Proteom nachgewiesen werden.<sup>[2-4]</sup> Neben der Häufigkeit eines Proteins ist dessen Aktivität in einer Zelle reguliert. Dies geschieht unter physiologischen Bedingungen häufig durch posttranslationale Modifikationen an Proteinen.<sup>[5, 6]</sup> Dabei kann es sich zum Beispiel um Phosphorylierung, proteolytische Prozessierung, Glycosylierung, Acetylierung und die Verknüpfung mit prosthetischen Gruppen handeln.<sup>[7]</sup> Zudem kann die Regulation der Proteinaktivität durch nicht kovalente Bindung zelleigener Aktivatoren oder Inhibitoren reguliert werden. Deshalb korrelieren Häufigkeit und Aktivität eines Proteins oft nicht miteinander.<sup>[8]</sup> Somit ist nicht die Häufigkeit sondern die Aktivität eines Proteins im Proteom für dessen Funktion entscheidend. Allerdings kann die Aktivität eines Enzyms im Proteom nicht mit den klassischen genomischen und proteomischen Analysemethoden erfasst werden.<sup>[9]</sup> Um dennoch aktivitätsbezogene Analysen von Proteinen in Proteomen durchführen zu können, wurde das aktivitätsbasierende Protein Profiling (ABPP)<sup>[10]</sup> entwickelt. Wegbereitend hierfür war die Forschung von *Walker et al.*<sup>[11, 12]</sup> und *Powers et al.*<sup>[13, 14]</sup>. Diese Arbeiten wurden von *Bogyo et al.*<sup>[15]</sup> und *Cravatt et al.*<sup>[16, 17]</sup> weiterentwickelt.<sup>[18, 19]</sup> Bei dieser chemisch-biologischen Methode können Proteine anhand ihrer Häufigkeit und Aktivität nachgewiesen und identifiziert werden (Abbildung 1). Hierfür werden Moleküle, die eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum einzelner Enzymklassen aufweisen, verwendet. Sie sind zudem mit einer Reportergruppe<sup>[20]</sup>, z.B. einem Fluoreszenzfarbstoff oder *Tag* zur Anreicherung, kovalent verbunden, um eine Detektion zu erleichtern. Diese Moleküle, Sonden genannt, binden das aktive Zentrum eines Zielenzym und ermöglichen dadurch dessen Fluoreszenznachweis oder dessen Reinigung. Inaktive Proformen von Enzymen<sup>[10]</sup> und

Inhibitor-gebundene Enzyme<sup>[21-25]</sup>, deren aktives Zentrum blockiert oder unzugänglich ist, können die Sonden nicht binden. Sie werden deshalb auch nicht visualisiert.

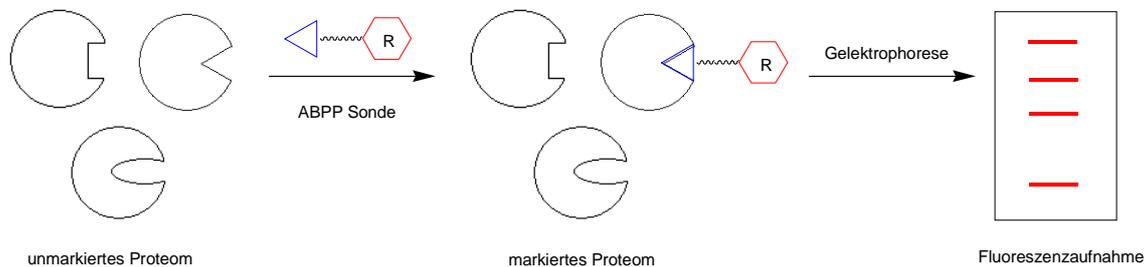


Abbildung 1: Methodik des ABPP. R: fluoreszente Reportergruppe.

Somit ermöglicht ABPP den Nachweis aktiver Enzyme geringer Häufigkeit in komplexen Proteomen aufgrund der funktionellen Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Enzymen. Dieser Punkt stellt einen wichtigen Unterschied zu den herkömmlichen Methoden der Molekularbiologie, Proteinbiochemie und Proteomik dar. Durch ABPP markierte Enzyme können massenpektrometrisch identifiziert werden. In der Vergangenheit war es durch ABPP schon möglich, einige pathogeneseassoziierte Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität und Funktion zu charakterisieren. Dabei kann ABPP entweder ungerichtet<sup>[26, 27]</sup> oder spezifisch<sup>[10, 21, 28]</sup> gegen Enzymklassen eingesetzt werden. Außerdem war es durch ABPP möglich, zelluläre Angriffsziele von Naturstoffen aufzuklären.<sup>[29]</sup> Hierfür müssen modifizierte Naturstoffe als Sonden verwendet werden. Die so gewonnenen Ergebnisse ermöglichen erst die Entwicklung neuer zielgerichteter Wirkstoffe zur Erforschung physiologischer und pathologischer Prozesse und zur Bekämpfung von Krankheiten.

## 1.2 Aufbau einer aktivitätsbasierenden Sonde für ABPP

Eine Sonde ist ein Molekül, das im ABPP zum aktivitätsbasierenden Nachweis und zur Anreicherung von Proteinen benötigt wird. Die Zusammensetzung einer Sonde richtet sich nach ihrer Zielanwendung. Denn ist eine Sonde zu reaktiv, so mangelt es ihr an Selektivität, da sie Enzyme ungerichtet und unspezifisch markiert. Ist eine Sonde jedoch vermindert reaktiv, so markiert sie Enzyme zwar selektiv, doch riskiert man nur eine unvollständige

Markierung aller möglichen Zielenzyme. Dadurch würden nicht alle Zielenzyme detektiert werden.

In der Regel besteht eine Sonde aus drei Elementen: einer reaktiven Gruppe, einem Verbindungsstück, einer Reportergruppe oder einer Gruppe zur Reinigung markierter Enzyme (Abbildung 2A).

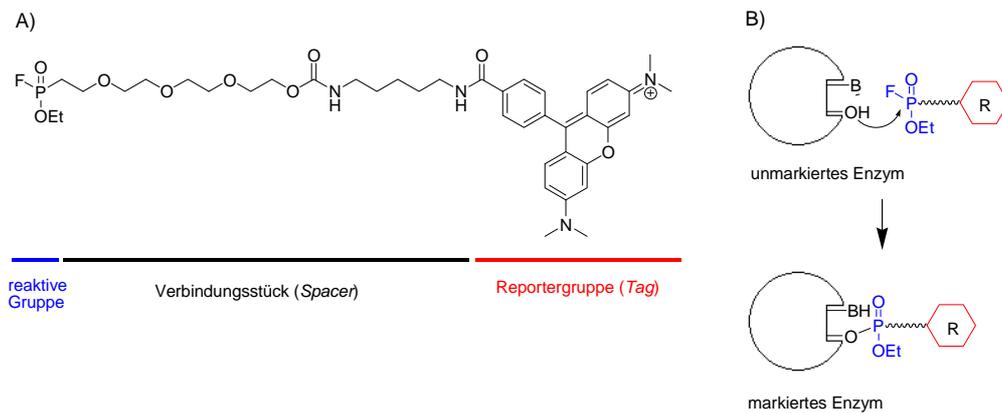


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Sonde anhand der von Cravatt et al. eingeführten FP-Sonde für ABPP.<sup>[10, 21, 28]</sup> B: Base, R: Reportergruppe.

Die reaktive Gruppe einer Sonde kann speziell auf ihre Reaktion mit dem aktiven Zentrum eines Zielenzyms zugeschnitten sein. Dabei ist die Wahl der reaktiven Gruppe für ein ABPP Experiment bedeutend. Mittlerweile gibt es verschiedene Leitstrukturen, die im ABPP als reaktive Gruppe eingesetzt wurden. Dazu zählen unter anderem Fluorophosphonate<sup>[10, 21, 28]</sup>, Sulfonate<sup>[27]</sup>,  $\alpha$ -Chloracetamide<sup>[30, 31]</sup>, Michael-Akzeptoren<sup>[32-34]</sup>,  $\beta$ -Lactone<sup>[35, 36]</sup> oder  $\beta$ -Lactame<sup>[37, 38]</sup>, Epoxide<sup>[39]</sup>, Vinylsulfone, Diazomethylketone,  $\alpha$ -Haloketone, Acyloxymethylketone.<sup>[40-46]</sup> Sonden, die diese reaktiven Gruppen enthalten, binden kovalent an das aktive Zentrum von Enzymen (Abbildung 2B). Dabei ermöglichen sie eine abgestufte und differenzierte Umsetzung von Enzymklassen bedingt durch ihre unterschiedliche Reaktivität. Fluorophosphonate reagieren hoch spezifisch mit Enzymen der Serinhydrolasefamilie. Während Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone,  $\alpha$ -Haloketone oder Acyloxymethylketone überwiegend mit Cysteinproteasen reagieren. Dagegen reagieren  $\alpha$ -Chloracetamide und Michael-Akzeptoren weitgehend ungerichtet. Im Fall der Michael Akzeptoren wie Zimtaldehyd<sup>[32, 34]</sup> oder Arylvinylnsulfonate und Arylvinylnsulfone<sup>[47]</sup> konnte deren Reaktivität sogar auf Phosphatasen reduziert werden. Dies geschah durch Optimierung der jeweiligen Sondenstruktur.

Neben den kovalent bindenden reaktiven Gruppen, gibt es auch solche, die nicht kovalent wechselwirken. Solch reversibel bindende Gruppen können aber über einen zusätzlichen photoreaktiven Kreuzlinker wie Benzophenon<sup>[48]</sup> oder Diazirin<sup>[49]</sup> mit ihren Zielenzymen kovalent verküpft werden.<sup>[23, 50, 51]</sup> Allerdings ist hierfür eine UV Bestrahlung der markierten Enzyme notwendig. Mit Hilfe der photoreaktiven Kreuzlinker konnten Hydroxamat-<sup>[23, 50, 52-54]</sup> bzw. Hydroxyethylen Dipeptid<sup>[55]</sup>-basierende Sonden im ABPP zur Markierung von Metalloproteasen, Histondeacetylasen bzw. Protein Kinasen eingesetzt werden.

Die reaktive Gruppe ist direkt mit dem zweiten Sondenteilstück kovalent verbunden. Hierbei handelt es sich um ein Verbindungsstück, das auch *Spacer* genannt wird. Es besteht meist aus einem hydrophoben Alkylrest oder einem eher hydrophilen PolyethylenGlycolrest. Dessen Länge und Hydrophobizität hängt von den Eigenschaften des Zielenzym ab. Durch Variation im Aufbau des *Spacers* kann er auf den Raum im aktiven Zentrum eines Zielenzym angepasst werden.

Der *Spacer* ist direkt kovalent an das dritte Teilstück einer Sonde gebunden. Bei diesem handelt es sich um eine Reportergruppe<sup>[20]</sup> oder eine Gruppe zur Reinigung markierter Enzyme. Letzteres wird auch *Tag* genannt. Radioaktive Reportergruppen<sup>[56-58]</sup> wurden wegen ihrer umständlichen Handhabung und Gefährlichkeit durch Fluoreszenzmarker, wie zum Beispiel Tetramethylrhodamin (TAMRA) ersetzt. Der Einsatz von Fluoreszenzmarkern hat den Vorteil, dass fluoreszenzmarkierte Zielproteine auch in kleinsten Mengen nachgewiesen werden können. Als Gruppen zur Reinigung von markierten Zielenzymen haben sich Biotin-Tags bewährt. Diese ermöglichen eine schnelle und einfache Reinigung an Avidin-Agarosebeads durch einfaches Waschen. Durch die sehr starke Wechselwirkung von Biotin mit Avidin ( $K_A = 10^{14} - 10^{15}$ )<sup>[59]</sup> verbleiben nur markierte Zielenzyme an den Beads.

Allerdings schränken kovalent gebundene, sterisch anspruchsvolle Tags die Anwendung einer Sonde im ABPP ein. Denn ein sterisch anspruchsvoller Tag kann sich negativ auf die Wechselwirkung zwischen Sonde und Zielenzym auswirken. Außerdem kann er durch seine Hydrophobizität die Löslichkeit einer Sonde in wässrigen Puffern negativ beeinflussen und dadurch eine Umsetzung der ungelösten Sonde durch ihr Zielenzym in wässrigem Puffer unterbinden. So kann eine Sonde, durch ihre oftmals geringe Membranpermeabilität, nur zur *in vitro* Untersuchung von Zelllysaten verwendet werden. Von Nachteil ist dabei, dass durch die vorangegangene Zellyse das komplexe regulatorische System einer Zelle zerstört wird. So kann dadurch die natürliche Orientierung von Proteinen und deren Regulation durch Interaktionspartner verändert sein. Zusätzlich kann die Enzymaktivität durch Freisetzung von Aktivatoren oder Inhibitoren zusätzlich beeinflusst sein.<sup>[60]</sup>

Um diese Probleme zu umgehen, kann der *Tag* nachträglich an die Sonde kovalent gekoppelt werden. Dies ermöglicht die *in vivo* Markierung von Zielenzymen intakter, lebender Zellen und deren Nachweis nach erfolgter Zellyse und Kopplung des Tags. Diese kann mit Hilfe der bioorthogonalen Cu(I)-katalysierten *Huisgen* [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie; Abbildung 3A)<sup>[61, 62]</sup> oder der bioorthogonalen Staudinger Ligation (Abbildung 3B) von Aziden und Methylester modifizierten Triphenylphosphinen erreicht werden.<sup>[60, 62-67]</sup>

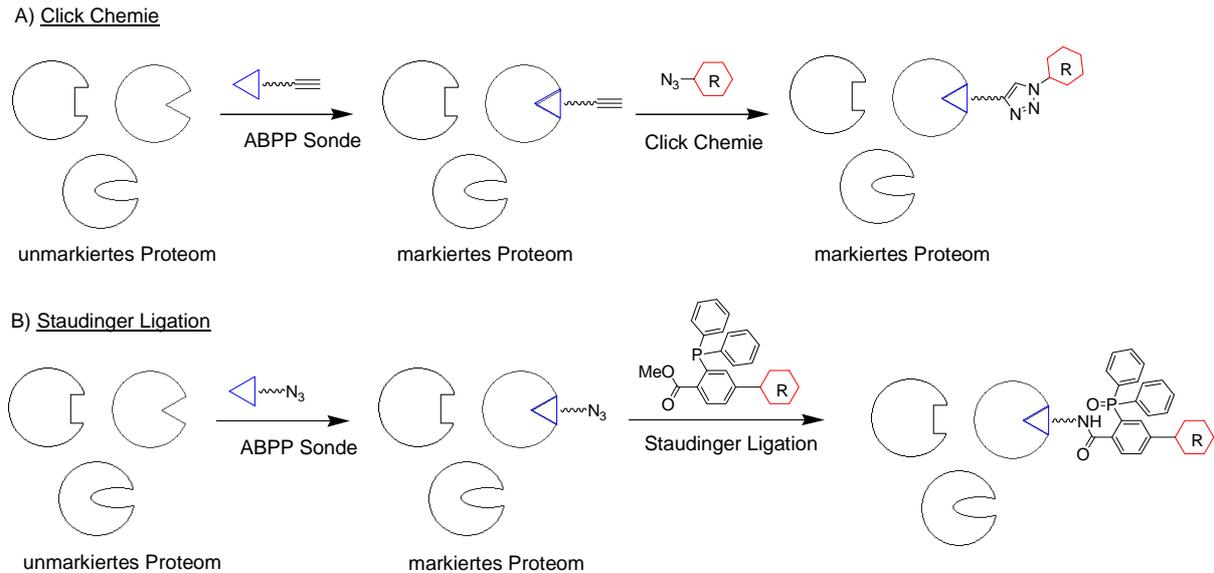


Abbildung 3: Bioorthogonale Strategien zur Modifizierung sondengebundener Proteine mit einer Reportergruppe. A) Kupfer(I) katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (Click Chemie), B) Staudinger Ligation, R: Reportergruppe.

Eine chemoselektive, kupferfreie Variante der [3+2] Cycloaddition wurde von *Bertozzi et al.* veröffentlicht.<sup>[68]</sup> Beide bioorthogonale Reaktionen zeigen eine geringe Reaktivität gegenüber anderen Biomolekülen wie DNA oder Proteinen. Zudem sind beide Reaktionen in wässrigen Puffern bei Raumtemperatur durchführbar.

### 1.3 *In vitro* ABPP und *in vivo* ABPP

Um aktivitätsbezogene Analysen von Proteinen in Proteomen durchführen zu können, wurde das aktivitätsbasierende Protein Profiling (ABPP) entwickelt.

In einem *in vitro* ABPP-Markierungsexperiment wird eine Sonde (siehe Kapitel 1.2) mit einem Proteom inkubiert (Abbildung 4A). Während der Inkubation wird die reaktive Gruppe der Sonde im aktiven Zentrum des Zielproteins umgesetzt. Dadurch wird die Sonde kovalent an ihr Zielprotein gebunden. Nach Einführung eines Fluoreszenzmarkers durch Cu(I) katalysierte *Huisgen* [3+2] Cycloaddition (Click-Chemie) oder Staudinger Ligation, werden markierte Proteine durch SDS-Gelelektrophorese gekoppelt mit einer bildgebenden Fluoreszenzaufnahme getrennt visualisiert. Das in einem *in vitro* ABPP-Markierungsexperiment getestete Proteom wird im Vorfeld durch Zellaufschluss erhalten. Es beinhaltet eine Vielzahl verschiedener Enzyme, die delokalisiert und dadurch möglicherweise dereguliert vorliegen. Es spiegelt nicht das komplexe regulatorische System einer intakten Zelle wieder. Deshalb ist es möglich, dass ein Enzym, welches durch *in vitro* Markierung nachgewiesen wurde, unter physiologischen Bedingungen nicht markiert wird. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde das *in vivo* ABPP etabliert (Abbildung 4B).<sup>[16]</sup> Dabei wird in einem *in vivo* ABPP-Markierungsexperiment die Sonde direkt mit lebenden Zellen inkubiert. Somit sollten nur physiologisch relevante Zielenzyme markiert werden. Nach Zelllyse wird mit den markierten Proteomen analog zum *in vitro* ABPP verfahren.

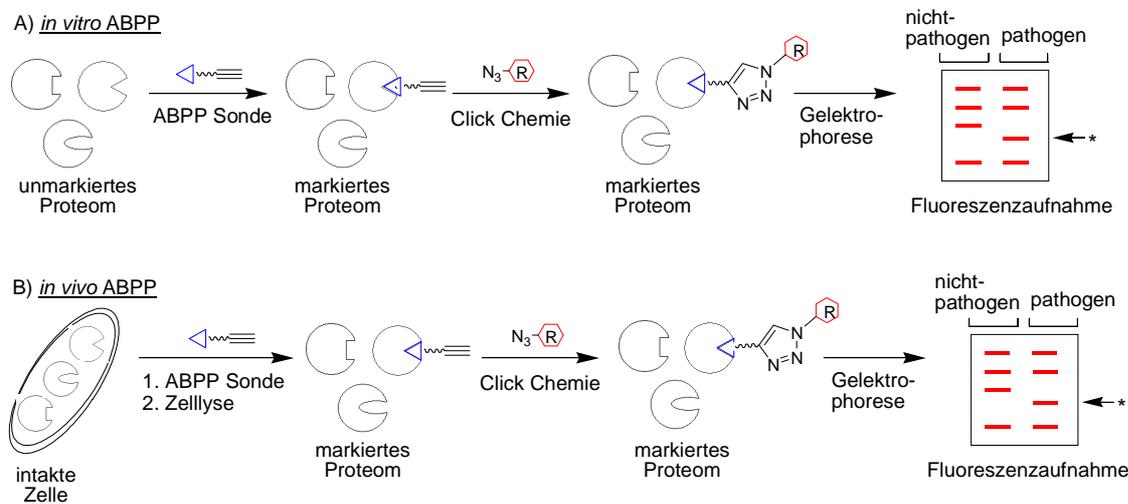


Abbildung 4: Schema eines *in vitro* (A) und *in vivo* (B) ABPP-Standardexperiments. R: Reportergruppe, \*: pathogeneseassoziiertes Protein.

Durch *in vitro* bzw. *in vivo* ABPP ist eine schnelle vergleichende Analyse von Zellzuständen aufgrund ihrer Enzymaktivität möglich. Zudem können pathogeneseassoziierte Enzyme identifiziert werden. Hierfür werden zum Beispiel Proteome pathogener und nicht-pathogener Bakterien mit ABPP untersucht. Abweichungen in der Aktivität bestimmter Enzyme beim

Vergleich beider Proteome werden nach SDS-PAGE mit gekoppelter Fluoreszenzaufnahme deutlich. Diese Enzyme könnten pathogeneassoziiert sein und zukünftig Therapie- und Diagnostikziele darstellen (Abbildung 4). Anhand von ABPP konnten bereits wichtige Enzyme von Krebs-, bakteriellen Infektions-<sup>[36-38, 69, 70]</sup> und Stoffwechselkrankheiten identifiziert werden.

## 1.4 Nachweis und Identifikation von Zielproteinen im ABPP

Um die in einem ABPP Experiment markierten Zielenzyme nachzuweisen, wurden mehrere Methoden entwickelt.<sup>[71]</sup> Die wohl ausgereifteste Methode ist das „in-gel fluorescence scanning“ (IGFS)<sup>[28]</sup>. Diese analytische Methode zeichnet sich durch ihre einfache Handhabung und ihren Probendurchsatz aus. Bei dieser Methode wird zunächst das untersuchte Proteom durch eindimensionale Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt die Visualisierung der markierten Zielproteine mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners. Nicht markierte Proteine können nicht visualisiert werden, weil nur markierte Zielproteine über die Sonde kovalent an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind (Abbildung 5).

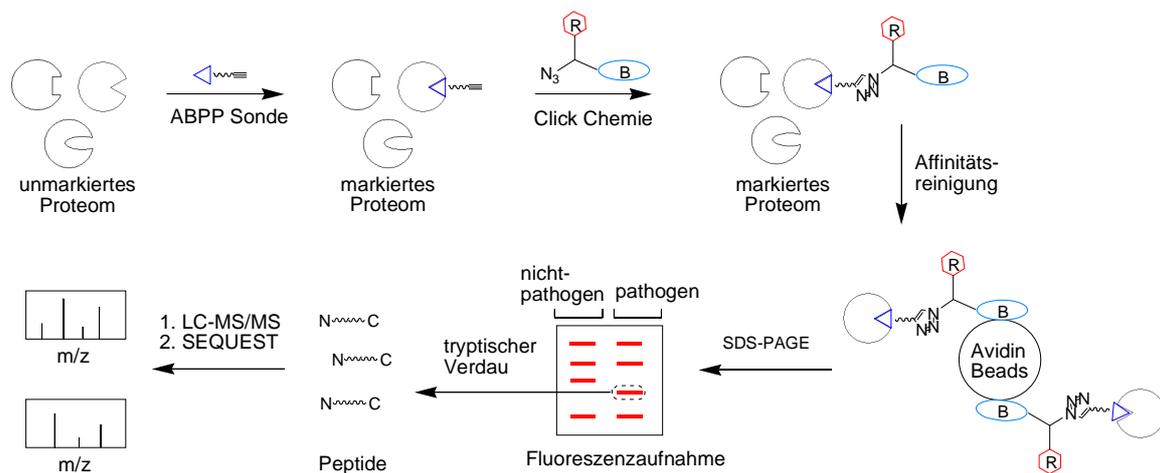


Abbildung 5: Schema zur Identifikation von markierten Zielproteinen über Kopplung von ABPP, IGFS und Massenspektrometrie. B: Biotinrest, R: Reportergruppe, ---: pathogeneassoziiertes Protein.

Um die Identität eines Zielproteins aufzuklären, wird die entsprechende Gelbande aus dem Gel herausgeschnitten. Das darin enthaltene, markierte Zielprotein wird enzymatisch verdaut.

Die resultierenden Peptidfragmente werden aus dem Gelstück extrahiert und über eine Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (LC-MS) analysiert.<sup>[50]</sup> Da man zur Identitätsaufklärung eines Zielproteins größere Mengen des Proteins benötigt, wird das ABPP Experiment im präparativen Maßstab durchgeführt und das markierte Zielprotein zunächst über Biotin-Avidin Wechselwirkung an Avidin-Agarosebeads angereichert, bevor mit der eindimensionalen Gelelektrophorese nach Standard weiterverfahren wird.

Nachteile der IGFS Methode sind unter anderem die begrenzte Auflösung der eindimensionalen Gelelektrophorese, das Detektionslimit des Fluoreszenzscanners, sowie die Tatsache, dass manche Zielenzyme präparativ nicht anreicherbar sind, so dass deren Identifikation durch LC-MS nicht möglich ist. Doch hierbei handelt es sich um Ausnahmen.

Neben dem IGFS sind noch weitere gelfreie Methoden, wie zum Beispiel die „tandem orthogonal proteolysis (TOP)“-Methode<sup>[72]</sup>, Antikörper-basierende Methoden<sup>[73, 74]</sup> und das MudPIT Verfahren<sup>[75]</sup>, entwickelt worden. Vorteilhaft ist deren erhöhte Sensitivität oder die Möglichkeit zur Bestimmung des sondenmarkierten Aminosäurerestes eines Zielenzym.<sup>[72, 73, 76]</sup>

### 1.5 Identifikation von Zielproteinen durch Massenspektrometrie

Ein durch ABPP markiertes Zielprotein wird zunächst durch IGFS detektiert und seine entsprechende Gelbande aus dem Gel herausgeschnitten. Nach enzymatischem Verdau des Zielproteins werden die Peptide extrahiert und durch ein gekoppeltes Chromatographie-Massenspektrometriesystem (LC-MS) analysiert (Abbildung 5).

Im Chromatographieschritt werden dabei die Peptide gemäß ihrer Polarität getrennt. Dies geschieht durch ihre Wechselwirkung mit der apolaren stationären Umkehrphase (*reversed phase*) unter einem Wasser-Acetonitril Gradienten. Die eluierten Peptide werden durch Nanospray-Elektrospray Ionisation (ESI) als positive oder negative Ionen in die Gasphase überführt. Dies geschieht, indem der Flüssigkeitsstrom aus der LC durch eine Kapillare mit angelegter Hochspannung zunächst ionisiert wird um dann als feine Aerosole im Vorvakuum zum Gegenpol entlang des elektrischen Feldes beschleunigt zu werden. Dabei verdampft das Lösungsmittel. Dies bewirkt eine Erhöhung der Ladungsdichte bis zum Raleigh-Limit. Folglich kommt es gemäß dem *Charged Residue*-Modell zur *Coulomb*-Explosion der Aerosoltröpfchen in noch kleinere Tröpfchen, in denen sich jeweils nur noch ein ionisiertes

Peptid befindet.<sup>[77, 78]</sup> Diese Peptide werden im Hochvakuum von einem Massenanalysator (MS/MS, Orbitrap oder Fouriertransformation Ionenzyklotronresonanz) nachgewiesen. Ihre ermittelten Peptidmassen werden unter Verwendung einer Software auf Basis des SEQUEST Algorithmus gegen eine ausgewählte Genomdatenbank mit ihren berechneten Peptidfragmenten abgeglichen.<sup>[79]</sup> Dies ermöglicht die Identifikation der Zielproteine einer ABPP-Sonde im Proteom eines Organismus und ermöglicht so das Auffinden neuer Therapie- und Diagnostikziele durch ABPP, die eine Rolle bei Krebs-, bakteriellen Infektions- und Stoffwechselkrankheiten darstellen.

## 2 Projekt I - Einleitung

Um die molekularen Grundlagen von Krebs-, bakteriellen Infektions- und Stoffwechselkrankheiten zu verstehen, ist es notwendig, pathogeneseassoziierte Proteine und Metabolite einer Zelle zu identifizieren und zu charakterisieren. Um diese Herausforderung zu meistern, wurden neue Methoden in den Bereichen Chemie, Biologie und analytische Chemie entwickelt. Dabei hat sich die Massenspektrometrie als Schlüsseltechnologie zur Identifikation und Charakterisierung von Proteinen und Metaboliten prokaryotischer und eukaryotischer Zellen hervorgetan.<sup>[80-82]</sup> Obwohl die Massenspektrometrie hoch sensitiv ist, müssen Proteine und Metabolite, die in einer Zelle nur in geringer Häufigkeit vorkommen, angereichert werden, um überhaupt mittels Massenspektrometrie nachweisbar zu sein. Zur Anreicherung von Proteinen in komplexen Proteomen wurden Methoden wie „isotope coded affinity tagging“ (ICAT)<sup>[83]</sup> und aktivitätsbasierendes Protein Profiling (ABPP)<sup>[84]</sup> entwickelt. Beide Methoden benutzen biotinylierte Verbindungen, die kovalent an Zielproteine binden und dadurch deren Anreicherung an Avidin bzw. Streptavidin Agarosebeads ermöglichen. Obwohl diese Anreicherungsmethode standardmäßig in der Proteomik angewendet wird, hat sie mehrere Nachteile: Zum einen werden harsche, denaturierende Bedingungen zur Zerstörung der starken Biotin/Avidin Wechselwirkung verwendet. Dadurch lösen sich neben den angereicherten Zielproteinen noch zusätzlich Avidin-Monomere sowie unspezifisch gebundene Proteine hoher Häufigkeit oder endogen biotinylierte Proteine, die ebenfalls unspezifisch an die Beads binden. All diese Proteine verunreinigen die MS-Probe und erfordern eine zeitaufwendige Validierung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden spaltbare Linker verwendet, die keine Abspaltung von Zielproteinen durch Avidin Hitzedenaturierung benötigen. Stattdessen können sie unter sauren Bedingungen<sup>[85, 86]</sup>, unter basischen Bedingungen<sup>[87]</sup>, oxidativ<sup>[88]</sup> oder proteolytisch<sup>[72, 89]</sup> gespalten werden. Dabei kommt es auch bei säurespaltbaren oder Disulfid verbrückten Linkern zur unselektiven oder verfrühten Proteinabspaltung.<sup>[85, 90]</sup> *Bogyo et al.* entwickelten einen Linker speziell für ABPP.<sup>[45, 90]</sup> Dabei handelt es sich um einen Diazobenzen Linker (Abbildung 6A), der durch das milde Reduktionsmittel Natriumdithionit chemoselektiv in die entsprechenden Aniline gespalten wird (Abbildung 6B).

## Projekt I - Einleitung

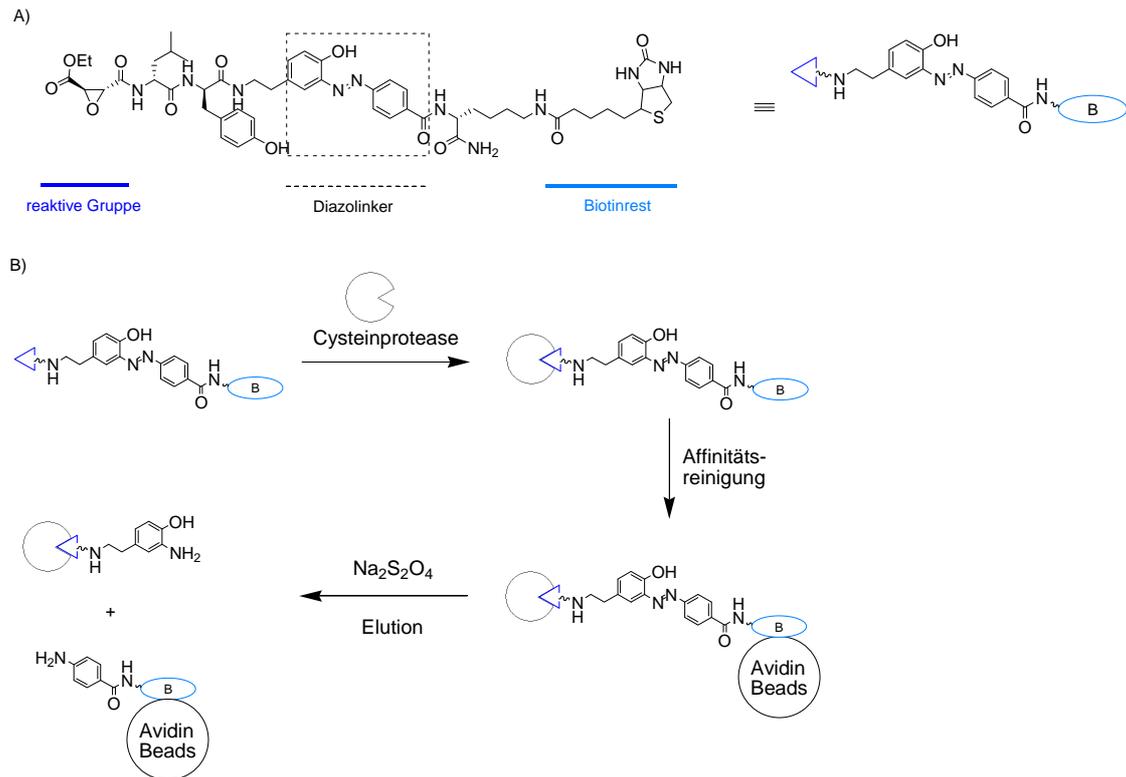


Abbildung 6: Einsatz des von Bogoy et al. entwickelten Diazobenzol Linkers im ABPP. B: Biotinrest.

Die Verwendung des Diazobenzol Linkers oder des proteolytisch spaltbaren Linkers erhöhen die Datenqualität der Massenspektrometrie, da sie beide mild und selektiv spaltbar sind. Daher stellen sie eine Verbesserung gegenüber den konventionellen hitzelablen Linkern dar. Dennoch ist zu deren Spaltung die Zugabe eines Reduktionsmittels oder weiteren Protease immer noch notwendig. Letzteres führt wiederum zu einer Kontamination der zu analysierenden MS Probe. Um diesen Nachteil zu umgehen, sollte in dieser Arbeit ein Linker etabliert werden, der ohne Zusatz von weiteren Chemikalien oder Enzymen selektiv spaltbar ist. Diese Vorgabe könnte mit einem photolabilen Linker, der unter Lichteinstrahlung zerfällt, erreicht werden.

### 3 Projekt I - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, einen neuen Linker zur Anreicherung von Proteinen oder Metaboliten zu entwickeln. Dieser soll im Gegensatz zu etablierten Linkern (siehe Kapitel 2) unter milden Bedingungen und ohne Zusatz von Chemikalien oder Enzymen selektiv spaltbar sein. Deshalb soll der neue Linker photolabil sein und durch Lichteinstrahlung selektiv und definiert gespalten werden. Kernelement des neuen Linkers soll eine photolabile Phenacyl ester Gruppe darstellen, die zentral in das Linkermolekül eingebaut ist (Abbildung 7A). Diese zerfällt nach photochemischer Aktivierung (Abbildung 7B).<sup>[91, 92]</sup> Für eine effektive Anreicherung soll er zudem eine Reportergruppe und einen Biotinrest besitzen.

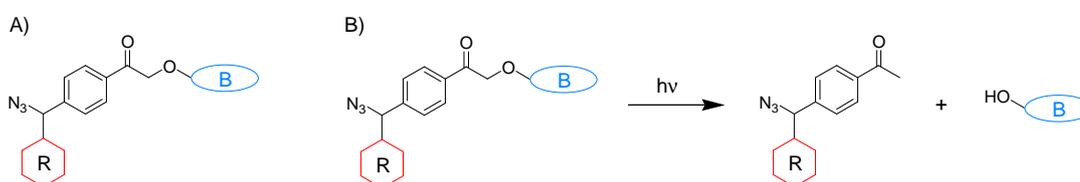


Abbildung 7: Schema des zu synthetisierenden, photolabilen Linkers (A) und Schema seiner Photolyse (B). R: Reportergruppe, B: Biotinrest.

Die Synthese des photolabilen Phenacyl Linkers soll konvergent sein. Dabei sollen das Linkerrückgrat und die photolabile Einheit zunächst getrennt voneinander synthetisiert werden, um die Synthese zu erleichtern. Abschließend sollen beide Bausteine kovalent miteinander verknüpft werden, so dass der vollständige Phenacyl Linker neben der lichtinduziert spaltbaren Phenacyl ester Gruppe noch eine Azidfunktion trägt, die die Verknüpfung alkinfunktionalisierter Zielproteine durch Cu(I)-katalysierten *Huisgen* [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie) ermöglicht. Außerdem soll er einen Biotinrest tragen, der die Reinigung kovalent gebundener Zielproteine mit Hilfe von Avidin-Agarosebeads ermöglicht.

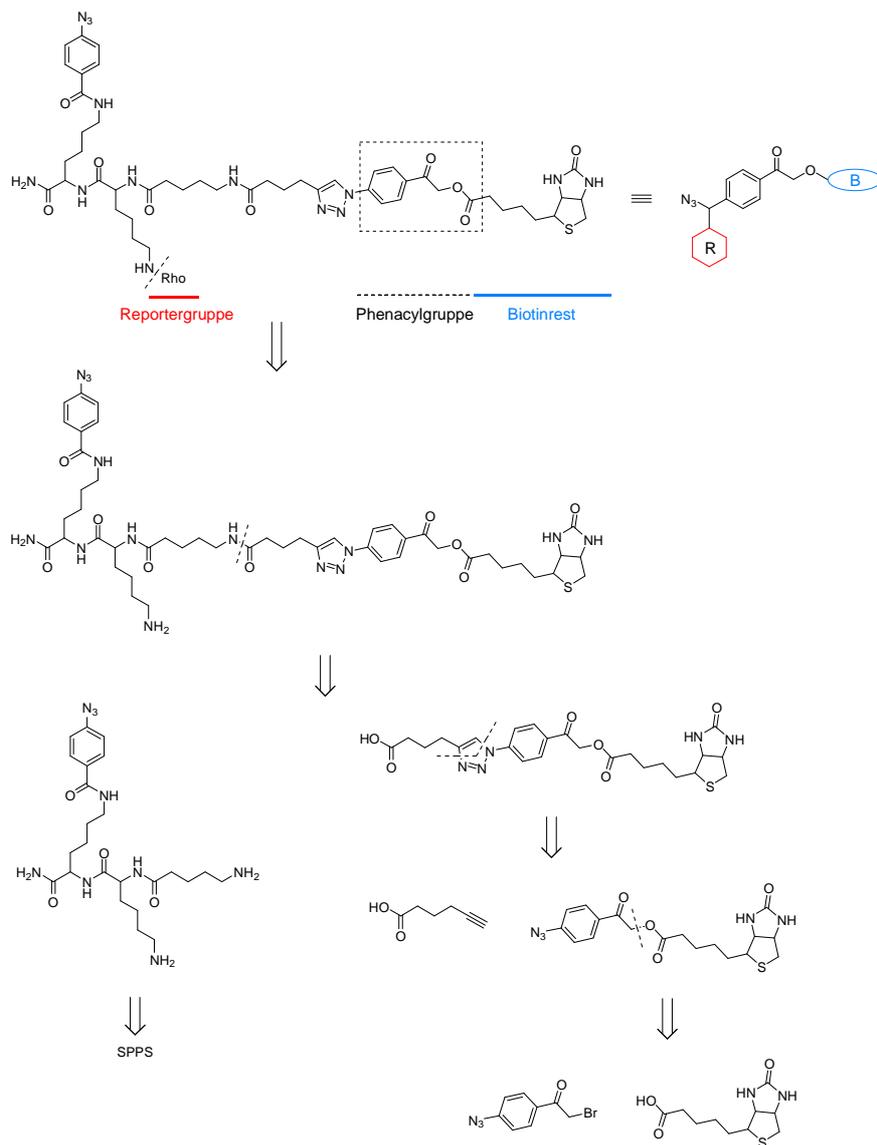


Abbildung 8: Schema der Retrosynthese des photolabilen Phenacyl Linkers. B: Biotinrest, R: Reportergruppe, Rho: Rhodaminrest.

Neben der Synthese des Phenacyl Linkers gilt es, dessen optimale Spaltbedingungen zu ermitteln. Darauf aufbauend soll eine Methode entwickelt werden, die mit Hilfe des Phenacyl Linkers eine effiziente Anreicherung von Proteinen nach Vorbild des ABPP (siehe Kapitel 1.3) bzw. von Metaboliten nach Vorbild der METPR-Methode<sup>[93, 94]</sup> ermöglicht (Abbildung 9). In beiden Fällen sollen zunächst alkinmodifizierter Biomoleküle durch Umsetzung mit dem Azidrest des Linkers durch Cu(I)-katalysierten *Huisgen* [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie)<sup>[16, 61, 62]</sup> kovalent an den Linker gekoppelt werden. Im Anschluss soll dann die Anreicherung des Biomoleküls über den Biotinrest des Linkers erfolgen. Dies soll durch Wechselwirkung des Biotinrestes mit den Avidin-Agarosebeads geschehen. Dadurch verbliebe das Biomolekül nicht-kovalent gebunden an den Beads. Die

Abspaltung eines angereicherten Biomoleküls von den Beads soll lichtinduziert verlaufen. Hierfür soll die photolabile Phenacyl-Gruppe des Linkers mit Licht geeigneter Wellenlänge und Intensität bestrahlt werden, um so die Photospaltung des Linkers zu erreichen. Dies hätte die Freisetzung des angereicherten Biomoleküls zur Folge, ohne dass hierfür die Zugabe zusätzlicher Chemikalien oder Enzyme notwendig wäre (Abbildung 9).

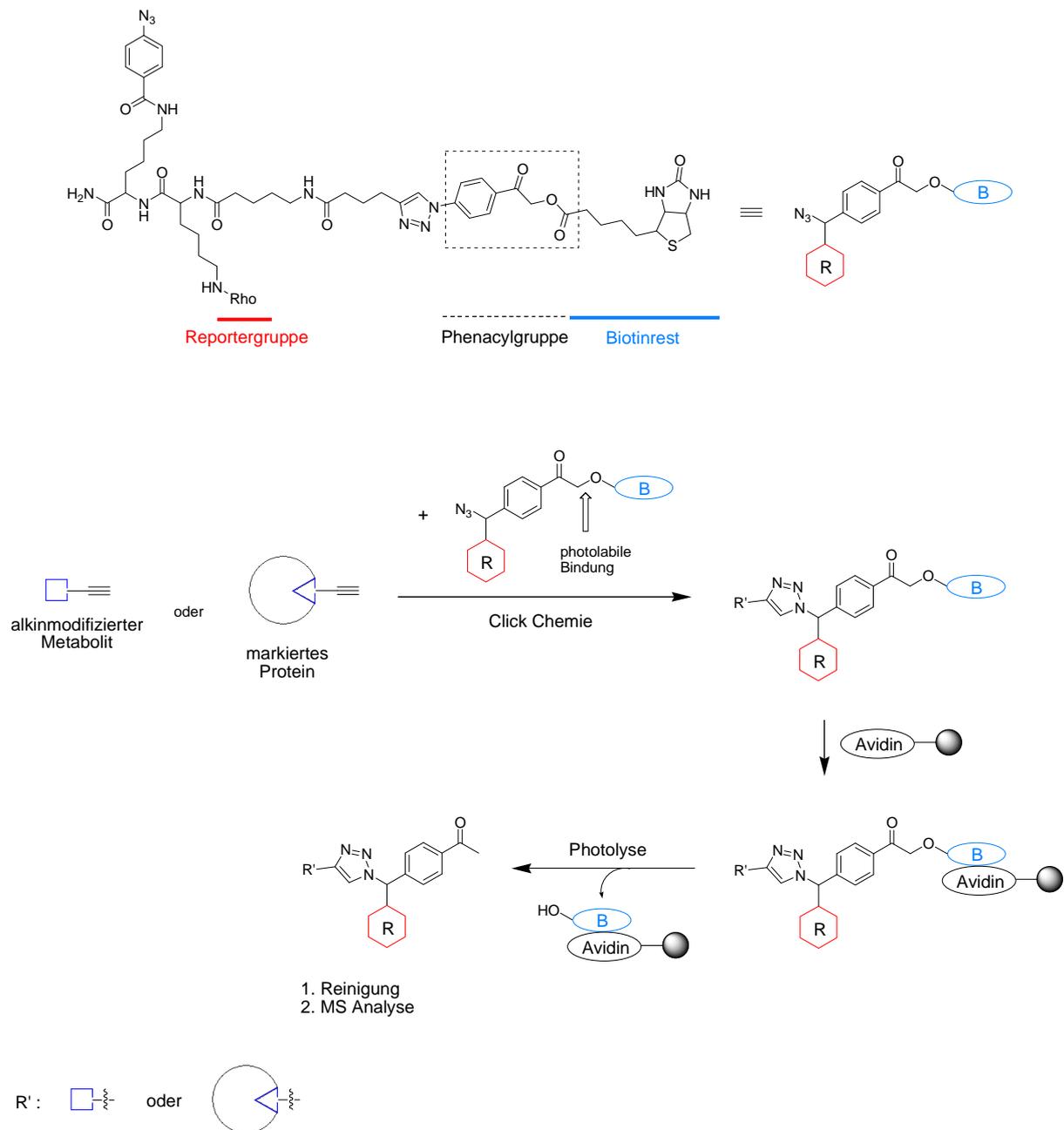


Abbildung 9: Strategie zur Anreicherung von Proteinen oder Metaboliten mit Hilfe eines photolabilen Phenacyl Linkers. B: Biotinrest, Rho: Rhodaminrest, R: Reportergruppe.

## 4 Projekt I - Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese des Phenacyl Linkers 1

Anhand der entworfenen Synthesestrategie (Abbildung 8) wurde der Phenacyl Linker 1 in einer konvergenten Synthese aufgebaut.

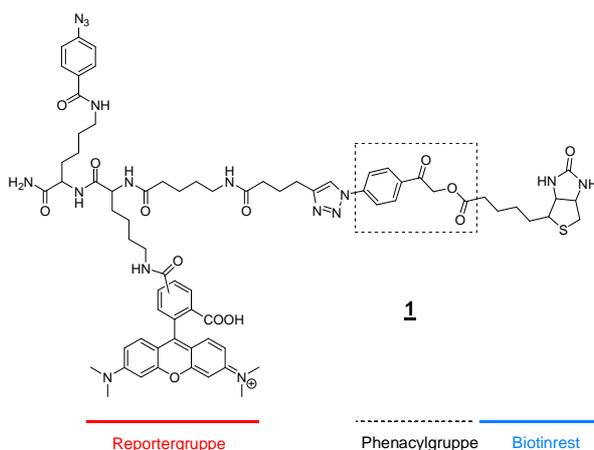


Abbildung 10: Strukturformel des Phenacyl Linkers 1, der als Gemisch zweier Isomere vorliegt.

Ausgehend von Biotin wurde der photolabile Teil des Phenacyl Linkers 1 aufgebaut. Dessen photolabiles Kernelement ist ein Phenacylester. Die Phenacylestergruppe wurde ausgewählt, da sie im Hinblick auf die spätere Anwendungen des Linkers (Abbildung 9) mehrere Vorteile besitzt.<sup>[95]</sup> Sie ist gegenüber vielen Funktionalitäten unreaktiv und dennoch selektiv spaltbar. Sie wurde bereits als chemische Schutzgruppe in der organischen Synthese etabliert.<sup>[96, 97]</sup> Mittlerweile werden mit Hilfe von Phenacylester auch biologische Sachverhalte untersucht. Dabei werden sie oft zur gesteuerten Freisetzung biologischer Stimulantien oder Inhibitoren verwendet.<sup>[98, 99]</sup> Die Quantenausbeute von Phenacylestern ist sehr hoch ( $\Phi > 0.9$ ).<sup>[95, 100]</sup> Der Zerfall von Phenacylestern ist photochemisch aktiviert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Wasser den Zerfall beschleunigt.<sup>[95]</sup>

Um das photolabile Phenacylester Kernelement zu erhalten, wurde Biotin mit 4'-Azido-2-bromacetophenon verestert (Abbildung 11).<sup>[101]</sup> Die Reaktion fand unter milden Bedingungen statt. Wasserfreies  $K_2CO_3$  wurde als Brønstedt Base verwendet. Diese musste unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch gemörsert werden, um eine höhere Ausbeute von 60% zu erzielen.

Andernfalls kam es zu erheblichen Ausbeuteeinbußen. Die Verwendung anderer Basen z.B. DIPEA führte nicht zur gewünschten Veresterung.

Um den photolabilen Baustein **2** überhaupt mit dem Peptidteil des Linkers mittels Amidbindung verknüpfen zu können, wurde der Ester **2** mit einer Säurefunktion ausgestattet (Abbildung 11). Hierfür wurde der Ester **2**, welcher einen Azidrest trägt, mit Hexinsäure in einer Clickreaktion umgesetzt. Diese konnte nur in DMSO unter Verwendung von Cu(II)SO<sub>4</sub> und Natriumascorbat durchgeführt werden, weil der polare Biotinester **3** sich nur in DMSO löste. Andere gängige organische Lösungsmittel, z. B. Chloroform konnten hierfür nicht verwendet werden. Von Vorteil bei dieser Verknüpfung durch Click-Chemie ist, dass andere Funktionalitäten der Edukte nicht stören, so dass keine weiteren Schutzgruppen erforderlich sind. Außerdem kommt es durch Click-Chemie in der Regel zum selektiven Umsatz der Edukte zum 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol.<sup>[62, 102, 103]</sup> Zudem ist der Triazolring starr und kann im Gegensatz zu Amidbindungen nicht durch Hydrolyse gespalten werden,<sup>[102]</sup> womit die Stabilität des Produkts **3** erhöht wird.

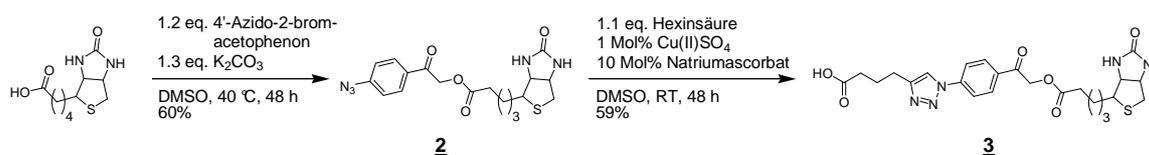


Abbildung 11: Synthese des photolabilen Bausteins **3**.

Der Peptidteil des Phenacyl Linkers **4** wurde mittels SPPS<sup>[104]</sup>-Standardprotokoll nach Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Strategie<sup>[105]</sup> synthetisiert (Abbildung 12). Ausgehend vom MBHA-Harz<sup>[106]</sup> mit Rink Amid-Linker<sup>[107]</sup> wurde das gewünschte festphasengebundene Peptid **4** aufgebaut. Nach dessen Fmoc-Entschützung zu **5** wurde der photolabile Baustein **3** gekoppelt (Abbildung 12). Diese Kopplung verlief quantitativ unter Verwendung von TBTU<sup>[108]</sup>/HOBt<sup>[109]</sup> und DIPEA<sup>[110, 111]</sup>. Die Verwendung von PyBOP<sup>[112]</sup>/HOBt war in diesem Fall nicht notwendig, obwohl PyBOP/HOBt zur Kopplung raumerfüllender Reste an die Festphase in der Literatur empfohlen wird.<sup>[113-115]</sup> Um den vollständigen Phenacyl Linker **1** zu erhalten, musste **6** noch mit einer fluoreszenten Gruppe ausgestattet werden. Dies geschah durch Kopplung eines voraktivierten Rhodamin Farbstoffes (NHS-TAMRA; Abbildung 12). Hierfür wurde das Peptid **6** zunächst vollständig entschützt und von der Festphase abgespalten. Dies gelang durch die Verwendung von TFA in einem Reaktionsschritt, da sowohl die Aminoschutzgruppe Mtt als auch der Linker TFA labil sind.

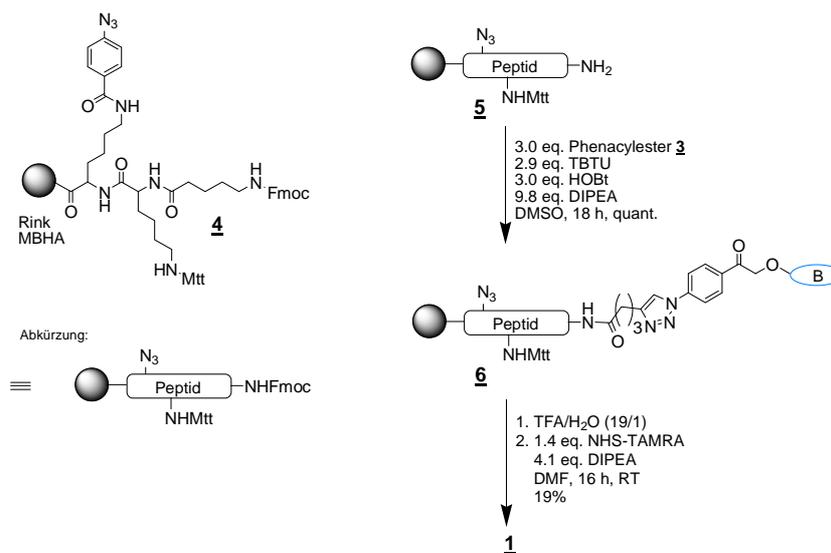


Abbildung 12: Darstellung des Phenacyl Linkers **1**.

An dieses Peptid wurde der NHS aktivierte Farbstoff in Lösung gekoppelt. Nach Reinigung mittels HPLC erhielt man den Phenacyl Linker **1** in guter Ausbeute von 19%.

## 4.2 Synthese des trifunktionalen Linkers **7**

Um den neuen, photolabilen Phenacyl Linker **1** mit dem standardmäßig verwendeten trifunktionalen Linker **7** vergleichen zu können, musste letzterer synthetisiert werden. Dies geschah gemäß *Speers & Cravatt*.<sup>[116]</sup> Hierfür wurde zunächst das Peptidrückgrat des trifunktionalen Linkers an der Festphase aufgebaut. Nach anschließender Kopplung des fluoreszenten Bausteins erhielt man den trifunktionalen Linker **7** (Abbildung 13).

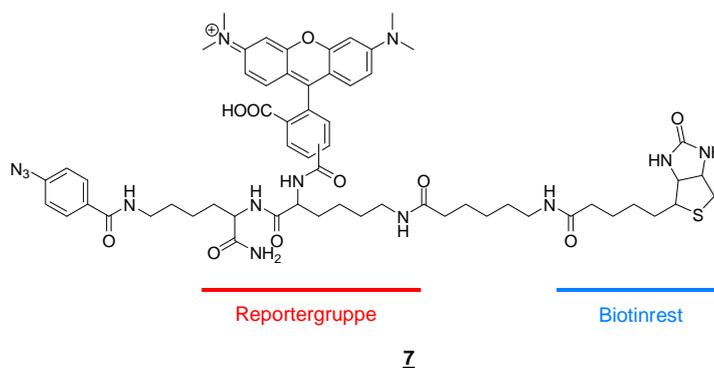


Abbildung 13: Strukturformel des trifunktionalen Linkers **7**, der als Gemisch zweier Isomere vorliegt.

Ausgehend vom Fmoc-Rink Amid MBHA Harz<sup>[106]</sup> wurde die gewünschte Peptidsequenz des trifunktionalen Linkers **7** aufgebaut. Die Kopplung der einzelnen Fmoc-geschützten Aminosäurereste erfolgte mittels TBTU<sup>[108]</sup>/HOBt<sup>[109]</sup> und DIPEA<sup>[110, 111]</sup> vermittelten SPPS<sup>[104]</sup>-Standardprotokoll nach Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Strategie<sup>[105]</sup>. In Analogie zur Synthese des Phenacyl Linkers **1** (siehe Kapitel 4.1) wurde das Peptid vor Kopplung des fluoreszenten Bausteins vollständig entschützt und von der Festphase abgespalten. Der NHS-aktivierte TAMRA Baustein, welcher als Gemisch zweier Isomeren vorlag, wurde in Lösung gekoppelt. Dabei konnte der trifunktionale Linker **7** in hoher Gesamtausbeute von 21% gewonnen werden.

### 4.3 Photolyse des Phenacyl Bausteins **3**

Der Phenacyl Linker **1** sollte bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge fragmentieren (siehe Kapitel 3). Um die optimale Wellenlänge der Photolyse zu ermitteln, wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Abbildung 14).

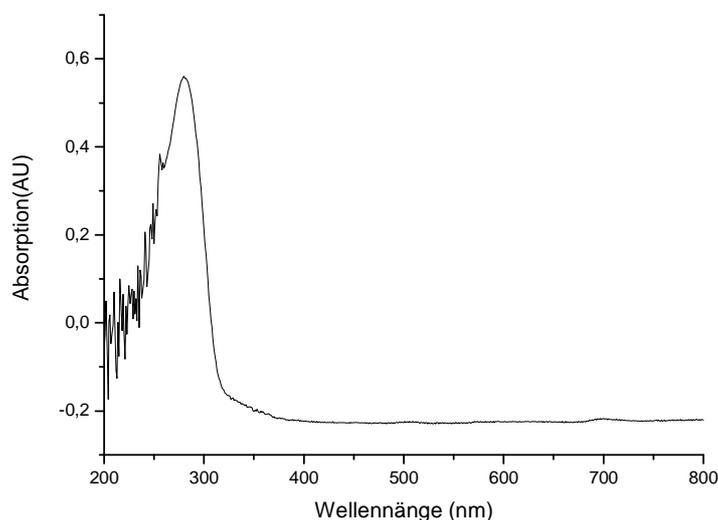


Abbildung 14: Absorptionsspektrum des photolabilen Bausteins **3**.

Hierfür wurde nicht der gesamte Phenacyl Linker **1** verwendet, sondern nur der photolabile Baustein **3**. Denn nur so war es möglich, die Anregungswellenlänge der photolabilen

Phenacylgruppe ohne Anwesenheit zusätzlich absorbierender Seitenreste zu bestimmen. Denn die Verwendung des kompletten Phenacyl Linkers **1** hätte ein Absorptionsspektrum ergeben, das zusätzlich zum photolabilen Teil auch auf dem des zugehörigen aromatischen Peptidrestes beruht. Der Baustein **3** absorbierte Licht im Bereich der Wellenlänge 233 nm bis 309 nm. Das Absorptionsmaximum lag bei 280 nm (Abbildung 14).

Aufgrund dieser Daten sollte es möglich sein, **3** mit Hilfe der vorliegenden Lichtquelle, einer Xe-Lampe, anzuregen. Um die optimalen Photolysebedingungen für diese Verbindung zu ermitteln, wurde der Baustein **3** unter verschiedenen Bedingungen bestrahlt (Abbildung 15).

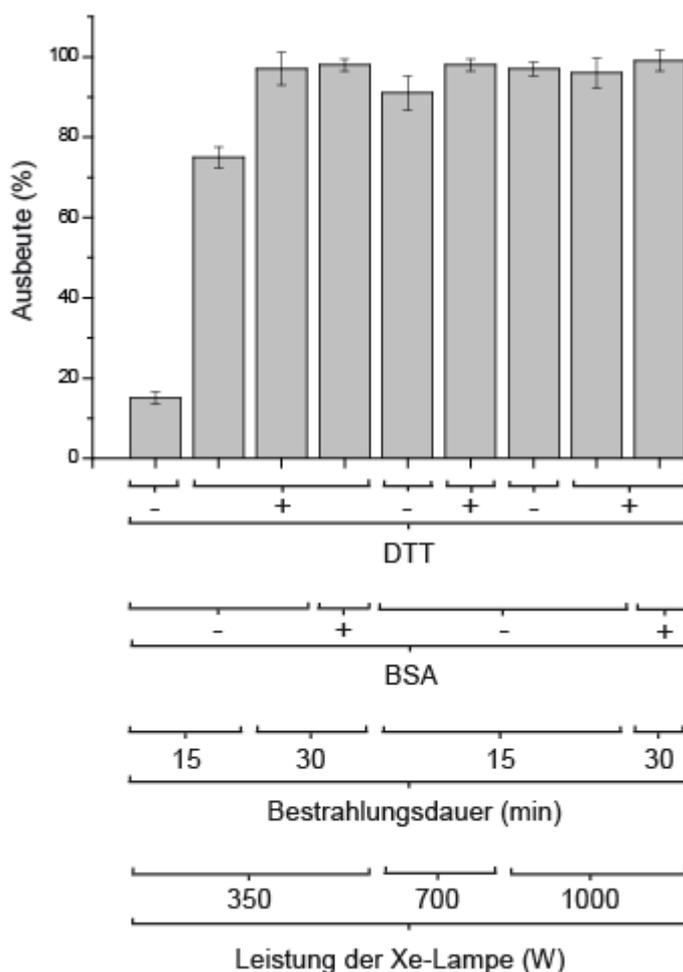


Abbildung 15: Untersuchte Bedingungen zur Bestrahlung des Bausteins **3**. +: DTT bzw. BSA im Ansatz vorhanden, -: DTT bzw. BSA nicht im Ansatz vorhanden.

Hierfür wurde ein Xe-Lampe mit  $\gamma\Phi C1$ -Filter verwendet. Dieser ist für Licht von  $\lambda = 240$  bis 400 nm durchgängig, was den Absorptionsbereich des Bausteins **3** mit einschließt (siehe oben). Nach Bestrahlung wurden das Produkt der Photolysen mittels HPLC getrennt. Die

Integrale der einzelnen Peaks wurden bestimmt und in Relation zum Kontrollpeak der unbestrahlten Verbindung **3** gesetzt. Dadurch war es möglich, die prozentuale Effizienz der Photolysereaktion zu ermitteln (Abbildung 15). Diese nahm mit steigender Lampenleistung und längerer Bestrahlungsdauer zu. Die Zugabe von DTT zum Reaktionsansatz führte ebenfalls zu einer höheren Produktausbeute.

Durch Bestrahlung entstand das erwartete Photolyseprodukt **8** (Abbildung 16). Es konnte nach Bestrahlung mittels ESI-MS nachgewiesen werden.

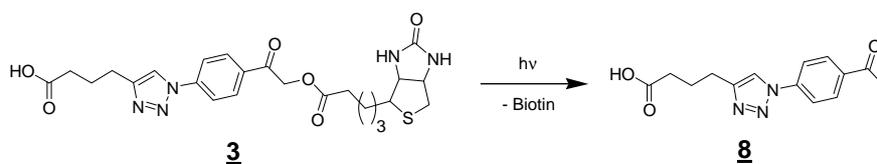


Abbildung 16: Photolyse des Bausteins **3** zu Produkt **8** anhand der in Abbildung 15 aufgeführten Photolysebedingungen.

Diese Ergebnisse übertreffen die Arbeit von *Holmes*.<sup>[117]</sup> Dieser scheiterte nämlich bei dem Versuch, effiziente Spaltbedingungen für Phenacyl ester in Lösung zu etablieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Holmes*<sup>[117]</sup> und *Rinnova et al.*<sup>[118]</sup> zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Bestrahlungstests, dass der Zusatz von DTT generell höhere Produktausbeuten erzielt. Dabei fungiert DTT als Scavenger und neutralisiert die durch Photolyse gebildeten Radikale, was die Bildung unerwünschter Nebenprodukte reduziert.<sup>[117, 118]</sup> Die Verwendung anderer Scavenger wie Phenol, Thioanisol oder Essigsäure kommt mit Hinblick auf die Durchführbarkeit der Photolyse in wässrigen Pufferlösungen nicht in Frage.<sup>[117, 119]</sup> Denn es könnte bei deren Verwendung zu Löslichkeitsproblemen oder starken pH-Wert Abweichungen im Puffersystem kommen. Die in dieser Arbeit getesteten Photolysebedingungen zeigten, dass verlängerte Bestrahlungszeiten und höhere Lampenleistungen teilweise nur geringfügig höhere Produktausbeuten lieferten. Diese wurden durch Anwesenheit von freiem BSA im Ansatz nicht beeinträchtigt (Abbildung 15). Dieses Protein wurde als Additiv ausgewählt, da es kostengünstig kommerziell erhältlich ist. BSA lag im Bestrahlungsansatz vor, um die Photolyse des Bausteins **3** in Anwesenheit von Proteinen zu untersuchen. Da die Anwesenheit von BSA im Reaktionsansatz kein Hindernis für eine effiziente Photolyse des photolabilen Bausteins **3** ist, zeigt sich, dass mit Hinblick auf die Anwendung dieses Bausteins **3** zur Reinigung von Proteinen relativ milde Bedingungen zur Photolyse gewählt werden können.

#### 4.4 Photolyse des Phenacyl Linkers **1** in Lösung

Es sollte getestet werden, ob der gesamte Phenacyl Linker **1** durch Bestrahlung fragmentiert. In Kapitel 4.3 wurde gezeigt, dass die Phenacyleinheit **3** bei einer Bestrahlung mit einer Xe-Lampe bei 350 W in DTT-haltiger Lösung fragmentiert. Diese Bedingungen wurden auch für die Bestrahlung des Phenacyl Linkers **1** in Lösung getestet. Sie stellten sich jedoch als unbrauchbar heraus, da es zur unkontrollierten Fragmentierung mit unbekanntem Nebenprodukten kam.

Die optimalen Spaltbedingungen für den Phenacyl Linker **1** in Lösung waren 1 min Bestrahlung mit einer 15 W Handlampe bei 254 nm und einem Probenabstand von 1 cm in DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4). Diese konnten durch eine verlängerte Bestrahlungszeit von 5 min nicht optimiert werden. Nach Bestrahlung wurden die Produkte mittels HPLC getrennt. Die Integrale der einzelnen Peaks wurden bestimmt und in Relation zum Kontrollpeak der unbestrahlten Verbindung **7** gesetzt (Abbildung 17).

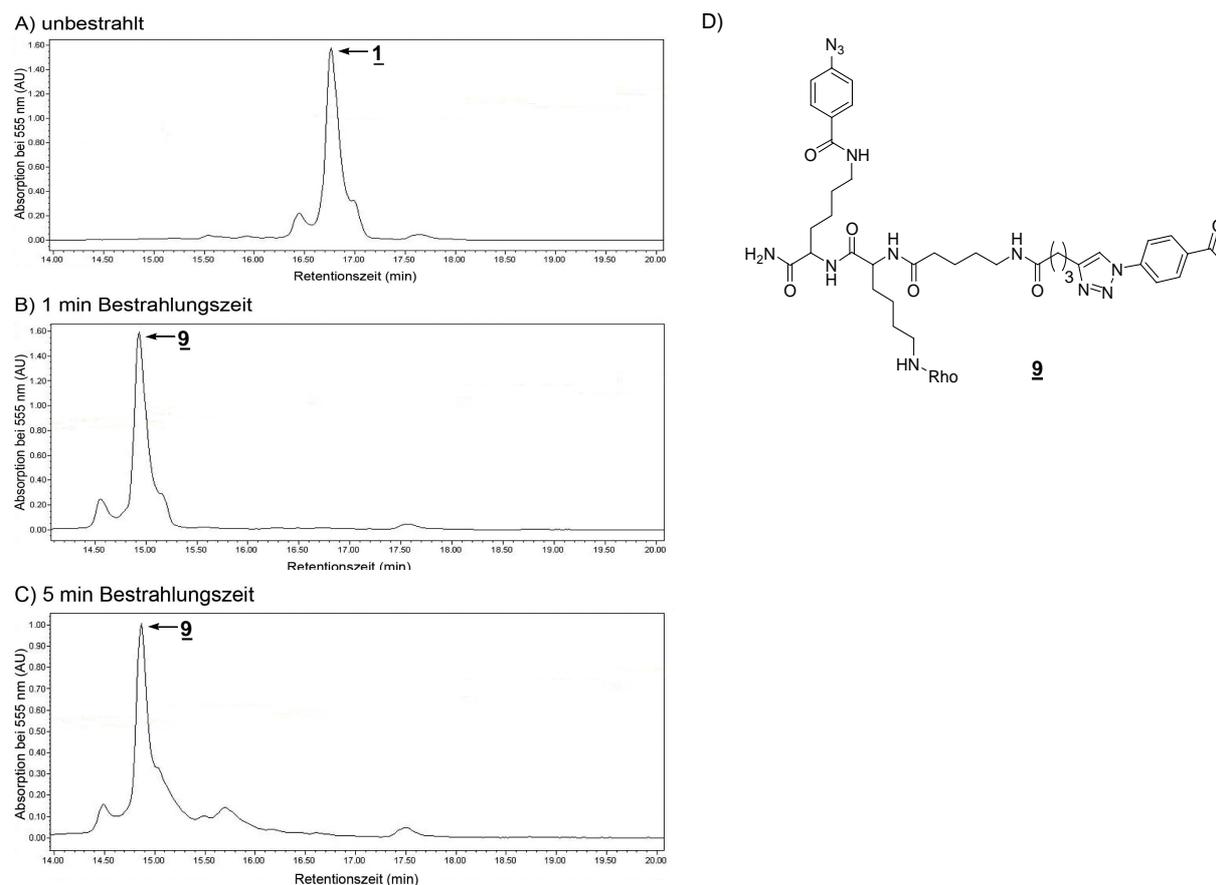


Abbildung 17: HPLC Chromatogramm nach Photolyse des Phenacyl Linkers **1** in Lösung. A) unbestrahlt, B) nach 1 min Bestrahlungszeit, C) nach 5 min Bestrahlungszeit, D) Strukturformel des Photolyseprodukts **9**.

Unbestrahlter Linker **7** wurde als Kontrollverbindung herangezogen, da er standardmäßig verwendet wird und denselben Fluoreszenzfarbstoff wie Linker **1** beinhaltet. Durch den direkten Vergleich beider Linker **1** und **7** war es möglich, die prozentuale Effizienz der Photolysereaktion zu ermitteln. Demnach konnten  $89\pm 2\%$  des Phenacyl Linkers **1** durch 1 min Bestrahlung gespalten werden. Das Spaltprodukt **9** konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 17). Es erfolgte demnach ein C-O Bindungsbruch, wodurch Biotin freigesetzt wurde.

Mildere Abspaltbedingungen zur Reduzierung unerwünschter Nebenprodukte führten zu keinem besseren Ergebnis. Da man bei der verwendeten Handlampe nicht die Leistung von 15 W ändern kann, sollte die Lichtintensität, welche die Probe tatsächlich erreicht, durch Vergrößerung des Probenabstandes zur Lampe verringert werden. Eine Vergrößerung des Probenabstandes sollte somit zu mildereren Abspaltbedingungen führen. Deshalb wurden die Spaltbedingungen für den Phenacyl Linker **1** in Lösung mit 5 min Bestrahlung mit einer 15 W Handlampe bei 254 nm und einem Probenabstand von 20 cm in DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) getestet. Doch dies resultierte in Effizienzeinbußen. Es wurden nur noch  $75\pm 11\%$  des Phenacyl Linkers **1** gespalten. Somit empfiehlt sich, unter diesen Bedingungen die Phenacyl Linker **1**-haltigen Proben in geringem Abstand zur Lampe zu bestrahlen.

#### **4.5 Photolyse des Phenacyl Linkers **1** an Avidin-Agarosebeads**

Da der Phenacyl Linker **1** in Lösung durch Bestrahlung spaltbar war (siehe Kapitel 4.4), sollte nun die Photolyse an der Festphase untersucht werden. Hierfür wurde der Phenacyl Linker **1** zunächst unter Lichtausschluss an Avidin-Agarose Beads gebunden. Dies geschah über nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen dem Biotinrest des Linkers und dem Avidin der Beads. Nach Bestrahlung wurden die Produkte durch HPLC getrennt. Die Integrale der einzelnen Peaks wurden bestimmt und in Relation zum Kontrollpeak des hitzeabgespaltenen trifunktionalen Linkers **7** gesetzt. Dieser wurde als Kontrollverbindung herangezogen, da er standardmäßig verwendet wird und denselben Fluoreszenzfarbstoff wie Linker **1** beinhaltet. Durch den direkten Vergleich beider Linker **1** und **7** war es möglich, die prozentuale Effizienz der Photolysereaktion zu ermitteln.

Unter Verwendung der in Lösung optimalen Photolysebedingungen (siehe Kapitel 4.4) (1 min Bestrahlungszeit bei  $\lambda = 254$  nm in DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) und 1 cm Probenabstand)

konnten 69±4% des Phenacyl Linkers im Vergleich zur Kontrolle abgespalten werden. Dieses System aus verwendetem Phenacyl Linker **1** und den gewählten Photolysebedingungen übertrifft das von *Wang* etablierte System.<sup>[120]</sup> Dieser scheiterte bei dem Versuch, geeignete Photolysebedingungen für seinen auf Propionylphenylelessigsäure-basierenden Phenacyl Linker zu finden, weshalb dieser Linker nicht photoaktiviert, sondern durch Zugabe von Chemikalien gespalten wurde.<sup>[121, 122]</sup>

Im Vergleich zur Spaltung in Lösung (siehe Kapitel 4.4) war die Photolyseeffizienz dieses Phenacyl Linkers **1** an den Beads deutlich vermindert. Zur Aufreinigung von Metaboliten über den Phenacyl Linker an der Festphase wäre sie jedoch ausreichend.

#### **4.6 Reinigung von *N*-(Lysyl)hexinamid oder *N*-Benzylhexinamid durch den Phenacyl Linker **1****

Da der Phenacyl Linker **1** sowohl in Lösung (siehe Kapitel 4.4) als auch an Avidin-Agarosebeads (siehe Kapitel 4.5) spaltbar war, sollte nun mit Hinblick auf seinen Einsatz im Forschungsbereich *Metabolomik*<sup>[123]</sup> getestet werden, ob der Phenacyl Linker **1** zur Reinigung kleiner Moleküle verwendet werden kann. Aktuell ist man auf eine effiziente Reinigung kleiner Moleküle im Forschungsbereich *Metabolomik* dringend angewiesen. Denn in der *Metabolomik* untersucht man alle endogenen kleinen Moleküle eines biologischen Systems. So konnten mit Hilfe der *Metabolomik* bereits Biomarker<sup>[80]</sup> und enzymatische Signalwege<sup>[124]</sup> menschlicher Krankheiten aufgedeckt werden. Dabei ist es eine Herausforderung, nur diejenigen Moleküle in hoher Reinheit zu isolieren, welche ähnliche physikochemische Eigenschaften haben.<sup>[123, 125, 126]</sup> Allerdings ist die effiziente Reinigung von polaren Metaboliten sehr aufwendig und schwierig, da sie nur ungenügend mit einem Umkehrphasenmaterial wechselwirken und oft neben HPLC noch durch zusätzliche Chromatographietechniken mit beschränkter Kapazität gereinigt werden müssen.<sup>[125-127]</sup> Um dieses Problem zu umgehen, entwickelten *Carlson* und *Cravatt* die METPR-Methode (Abbildung 18).<sup>[93, 94]</sup> Mit Hilfe dieser Methode können polare Metabolite einfach an einer funktionalisierten Festphase gereinigt werden. So ermöglichte zum Beispiel eine mit Maleimid funktionalisierte Festphase eine effiziente Reinigung von Thiolen, da diese durch Umsatz mit der Maleimidylgruppe kovalent an die Festphase gebunden wurden.

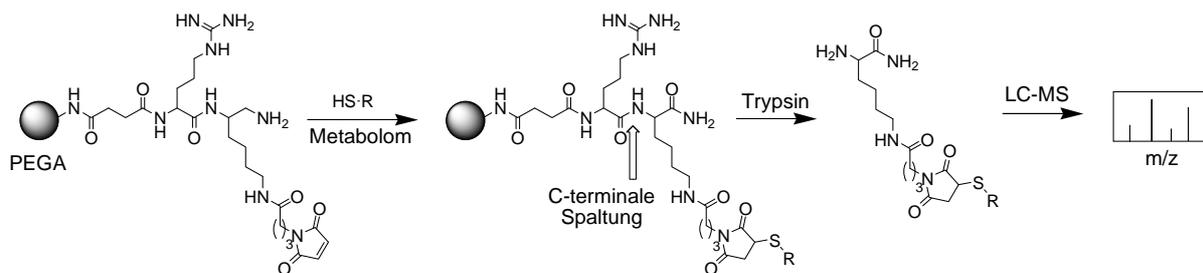


Abbildung 18: Schema zur METPR-Methode.

Nachteil dieser Methode ist, dass man zur Metabolitreinigung eine entsprechend funktionalisierte Festphase herstellen muss, und die Abspaltung der festphasengebundenen, gereinigten Metabolite durch Trypsinierung erfolgt. Letzteres bewirkt eine Kontamination der MS-Probe mit dem Protein Trypsin. Von Vorteil wäre deshalb eine Methode, die eine effiziente Metabolitreinigung mit anschließender Photolyse erlaubt. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die METPR-Methode abgewandelt (Abbildung 19). In Anlehnung an die METPR-Methode wurde eine „Metabolitangel“, nämlich NHS-Hexinoat **10** verwendet. Es wurde gemäß der Synthesvorschrift von *Disney & Childs-Disney* synthetisiert.<sup>[128]</sup> NHS-Hexinoat **10** soll das Zielmetabolit L-Lysin oder Benzylamin in Lösung kovalent binden und durch nachfolgende Umsetzung mit dem Phenacyl Linker **1** das Zielmetabolit an die Festphase binden, damit dieses effizient gereinigt werden kann. L-Lysin wurde ausgewählt, da es nach *Chalcraft et al.* ein Standardmetabolit für MS-Untersuchungen ist.<sup>[129]</sup> Deshalb wurden im Vorfeld L-Lysin und Benzylamin getrennt voneinander mit NHS-Hexinoat **10** umgesetzt. Das entstandene *N*-(Lysyl)hexinamid bzw. *N*-Benzylhexinamid sollte als Metabolit Mimik dienen. Beide Amide wurden mit dem Phenacyl Linker **1** in einer [2+3] Cycloaddition nach *Huisgen* umgesetzt. Dabei versagte das bereits etablierte Standard Clickprotokoll, welches TCEP und CuSO<sub>4</sub> verwendet. Wahrscheinlich zerstörte das TCEP den Phenacyl Linker **1** vorzeitig durch Reduktion seiner labilen C-O Bindung. Deshalb wurde die Click-Reaktion mit Cu(I)Br ohne TCEP quantitativ durchgeführt. Dies geschah nach Anleitung von *Carell* und Mitarbeitern<sup>[130]</sup> und erforderte die Lösung von Cu(I)Br in DMSO/*t*-BuOH (3:1). Cu(I)Br war nur in dieser Lösungsmittelmischung vollständig löslich. Dabei wurde der Ligand TBTA zusammen mit Cu(I)Br zum Schutz von Cu(I) unter aeroben wässrigen Bedingungen verwendet.<sup>[131]</sup> Der so modifizierte Phenacyl Linker **1** wurde an Avidin-Agarosebeads gebunden. Durch Bestrahlung wurde der modifizierte Linker wieder freigesetzt. Nach Bestrahlung wurden die einzelnen Photolyseprodukte durch HPLC getrennt. Die Integrale der einzelnen Peaks wurden bestimmt und in Relation zum Kontrollpeak des

hitzeabgespalteten trifunktionalen Linkers **7** gesetzt. Dieser wurde als Kontrollverbindung herangezogen, da er standardmäßig verwendet wird und denselben Fluoreszenzfarbstoff wie Linker **1** beinhaltet. Durch den direkten Vergleich beider Linker **1** und **7** war es möglich, die prozentuale Effizienz der Photolysereaktion zu ermitteln.

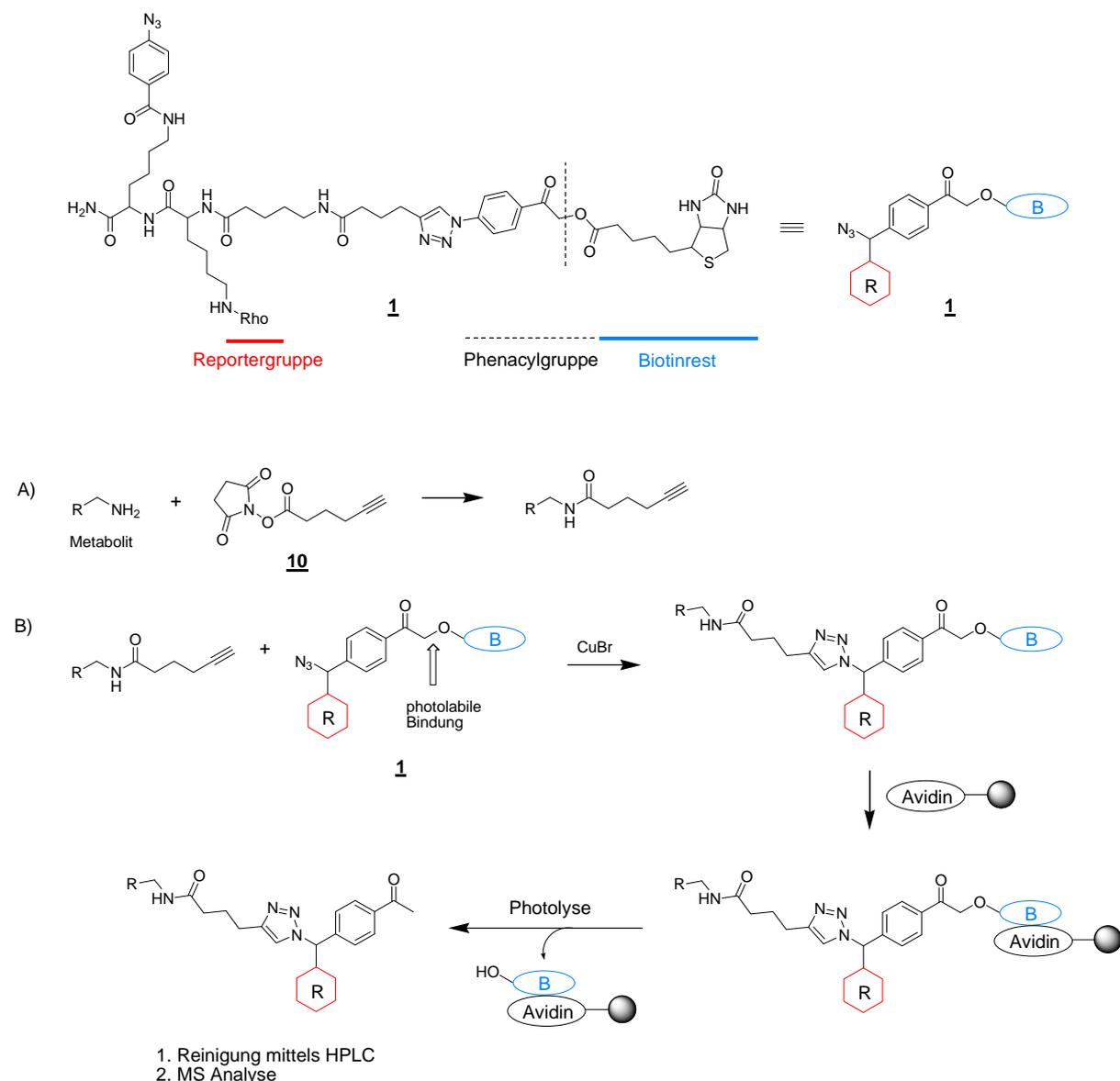


Abbildung 19: Schema der Reinigung von Metaboliten durch den Phenacyl Linker **1**. R: Reportergruppe, B: Biotinrest.

Als optimale Spaltbedingungen kristallisierten sich 7 min Bestrahlungszeit bei einer Wellenlänge von 254 nm und 350 W Leistung der Xe-Lampe in DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) heraus.  $68\pm 6\%$  des Lysyl- bzw  $70\pm 16\%$  des Benzyl-modifizierten Linkers konnten im Vergleich zur Hitzekontrolle mit dem trifunktionalen Linker **7** gespalten werden.

Diese gewählten Abspaltbedingungen beinhalten eine längere Bestrahlungszeit mit höherer Lampenleistung als die zur Spaltung des Phenacyl Linkers **1** in Lösung (4.4) oder an Avidin-Agarosebeads (4.5). Die höhere Abspaltungsenergie ist eventuell auf die Anwesenheit eines zusätzlichen Triazolrings im modifizierten Linker **1** nach Clickreaktion (Abbildung 19B) zurückzuführen. Aufgrund der höheren Bestrahlungsenergie wurden die zwei Produkte **11** und **12** gebildet (Abbildung 20). Beide resultieren aus der Umsetzung des intermediären Radikals unmittelbar nach Zerfall der C-O Bindung mit einem Wassermolekül. Dadurch entstand neben dem Methylketon das  $\alpha$ -Hydroxyketon Produkt. Beide konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

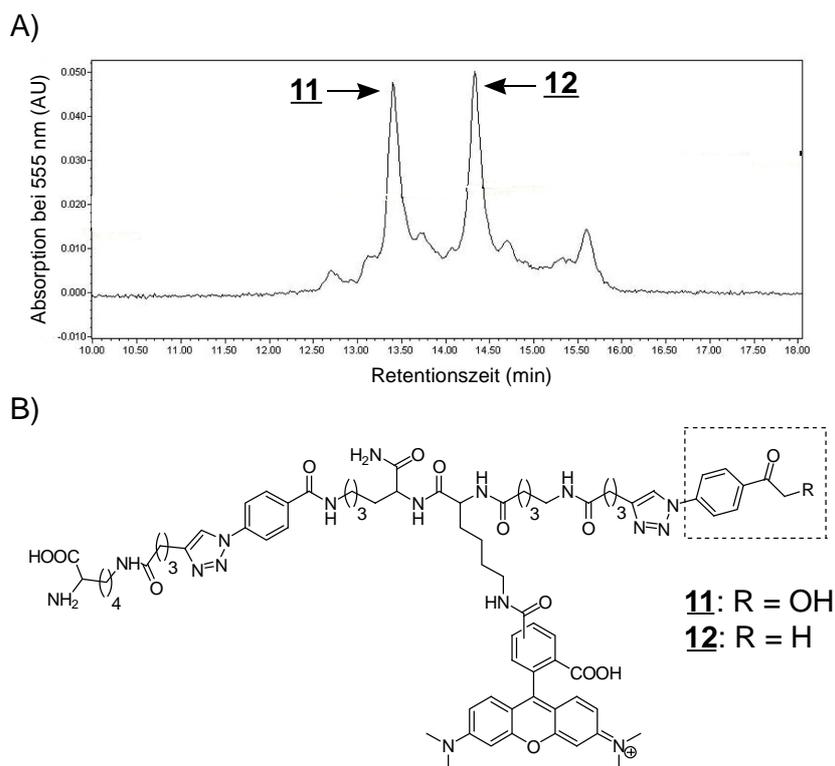


Abbildung 20: HPLC Chromatogramm und Strukturformel beider Produkte **11** und **12** des Lysyl-modifizierten Phenacyl Linkers nach UV-Belichtung.

Die Existenz des  $\alpha$ -Hydroxyketon Produkts **11** und des Methylketon Produkts **12** stimmt mit dem in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismus des photochemisch induzierten Zerfalls (Photolyse) von Phenacylestern überein.<sup>[100]</sup> Demnach wird die Carbonylgruppe des Phenacylesters durch Lichteinstrahlung angeregt. Die Existenz des angeregten Intermediates ist noch nicht eindeutig geklärt und wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert. Während *Givens* ein kurzlebiges, reaktives Triplett im angeregten Zustand beschreibt<sup>[98]</sup>, postulierten *Zhang et al.* ein reaktives Singulett<sup>[132]</sup>. Neuere Studien von *Conrad et al.* bestätigen jedoch das reaktive Triplett im angeregten Zustand.<sup>[133]</sup> Durch Anregung kommt es zum

homolytischen C-O Bindungsbruch. Das entstehende C-Radikal abstrahiert in wässrigem Puffer ein H-Atom von einem Lösungsmittelmolekül. Dadurch entsteht wiederum ein Hydroxyl-Radikal welches auch an ein weiteres C-Radikal addieren kann. Dadurch entstehen unter Teilnahme des Lösungsmittels Wasser die beiden nachgewiesenen Produkte der Photolyse (Abbildung 21).

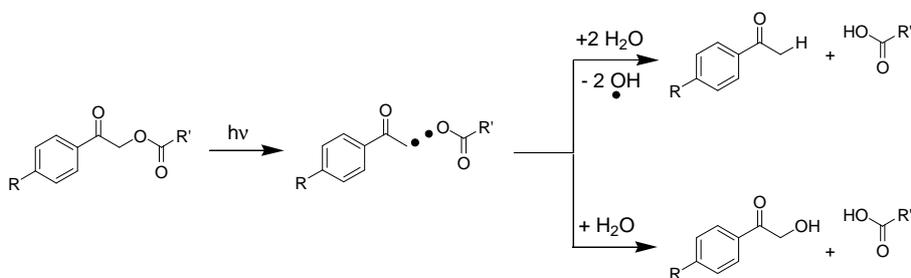


Abbildung 21: Schema des photochemisch induzierten Zerfalls von Phenacylestern.<sup>[134]</sup> R, R': nicht näher erläuterte Reste.

#### 4.6.1 Reinigung von Proteinen durch den Phenacyl Linker 1

Wie in Kapitel 4.6 gezeigt wurde, können kleine organische Moleküle mit Hilfe des Phenacyl Linkers 1 gereinigt werden. Nun sollte getestet werden, ob eine Proteinreinigung mittels Phenacyl Linker 1 zum Nachweis und zur Identifikation von Zielproteinen durch ABPP (siehe Kapitel 1.4) möglich ist (Abbildung 22). Hierfür wurde ein zuvor gereinigtes, rekombinantes Enzym H30 durch eine ABPP-Sonde namens DEA markiert. (H30 und DEA wurden von *Isabell Staub* im Rahmen ihrer Dissertation hergestellt und freundlicherweise für dieses Experiment zur Verfügung gestellt.) Im Anschluss wurde das markierte H30 Protein mit Hilfe der Alkinfunktion der DEA Sonde mit dem Phenacyl Linker 1 in einer [2+3] Cycloaddition nach *Huisgen* umgesetzt und mittels Avidin-Agarosebeads gereinigt. Die Abspaltung des gereinigten Enzyms von den Beads sollte durch Bestrahlung des Phenacyl Linkers 1 herbeigeführt werden.

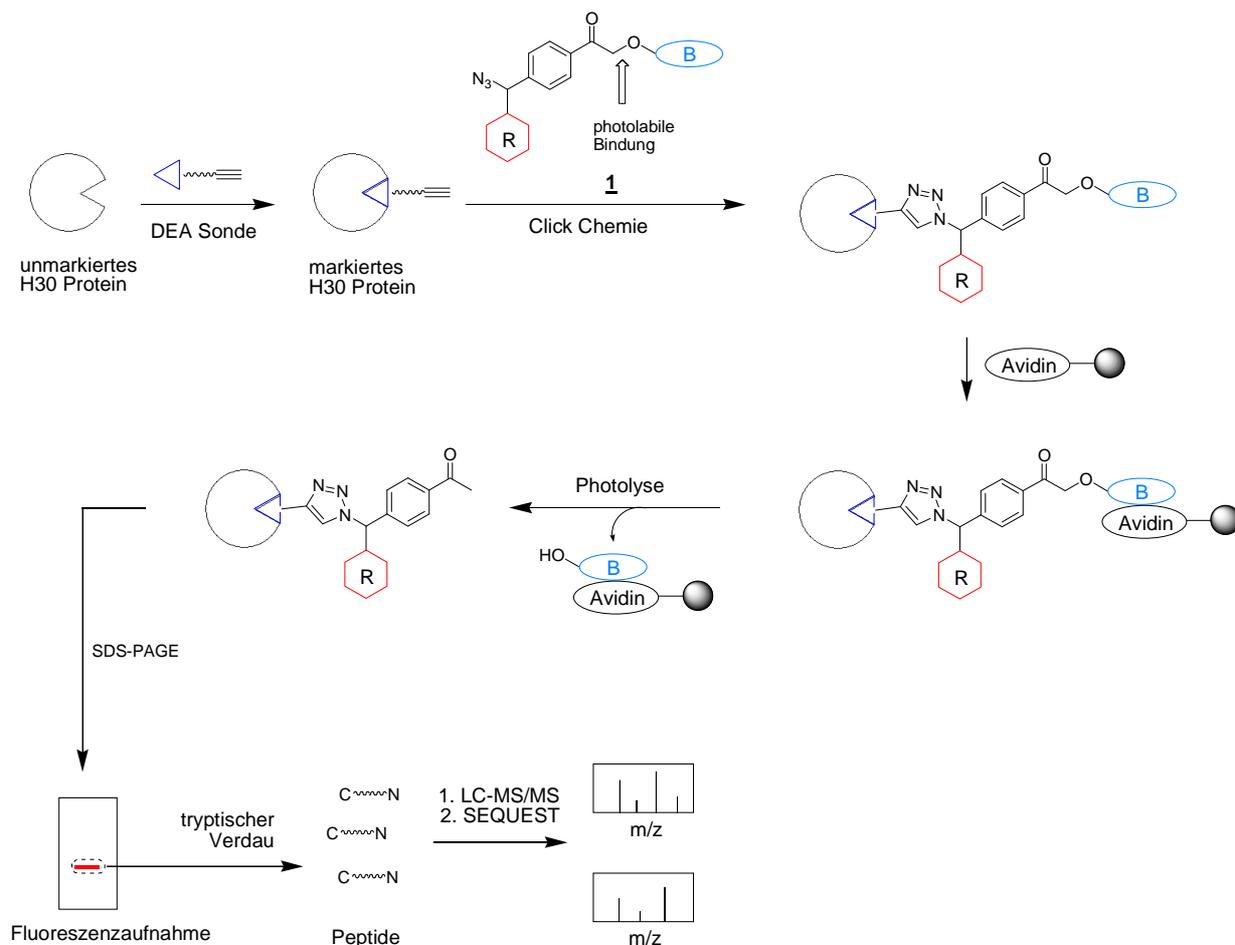


Abbildung 22: Schema der Reinigung eines Enzyms durch den Phenacyl Linker 1. R: Reportergruppe, B: Biotinrest.

In Anlehnung an die optimalen Bestrahlungsbedingungen zur Reinigung kleiner organischer Moleküle (siehe Kapitel 4.6) wurden alle Proben mit Hilfe einer Xe-Lampe bei 350 W Leistung in DTT-haltiger Abspaltlösung bestrahlt. Variiert wurden die Bestrahlungszeiten, die Lichtfilter und die Zusammensetzung der Abspaltlösung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die getesteten Bestrahlungszeiten, Lichtfilter ( $\gamma\Phi c1$  Filter ( $\tau > 0.2$  von 235 nm bis 410 nm,  $\gamma\Phi c2$  Filter ( $\tau > 0.2$  von 280 nm bis 380 nm) und Abspaltlösungen.

| Enzym | ABPP-Sonde | Bestrahlungszeit (min) | Lichtfilter     | Abspaltpuffer                         |
|-------|------------|------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| H30   | DEA        | 7; 30; 180; 720        | $\gamma\Phi c2$ | DMSO/2mM DTT in PBS (6/4)             |
| H30   | DEA        | 30                     | $\gamma\Phi c2$ | H <sub>2</sub> O/2mM DTT in PBS (6/4) |
| H30   | DEA        | 30                     | $\gamma\Phi c1$ | H <sub>2</sub> O/2mM DTT in PBS (6/4) |
| H30   | DEA        | 120                    | $\gamma\Phi c1$ | DMSO/2mM DTT in PBS (6/4)             |

Obwohl das H30 Protein durch die DEA Sonde markiert und an die Beads gebunden werden konnte (Abbildung 23A), bewirkte keine der verwendeten Bedingungen dessen lichtinduzierte Abspaltung von den Beads (Abbildung 23D bis F). Selbst nach Hitzedenaturierung der Beads konnte von bestrahlten Beads kein markiertes H30 Protein abgespalten werden.

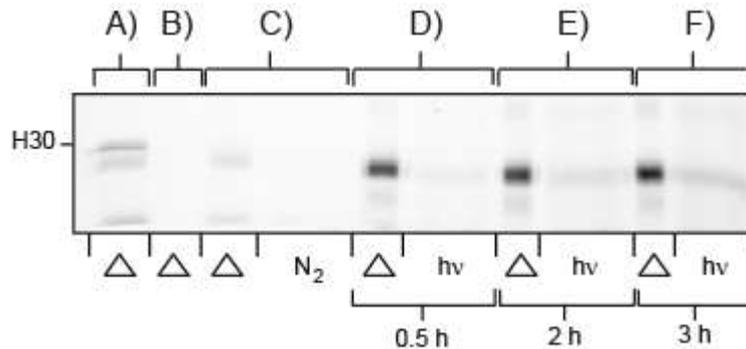


Abbildung 23: Nachweis von H30 Protein. A) Funktionskontrolle: Überstand nach Hitzeabspaltung ( $\Delta$ ) von sondenmarkiertem H30 Protein von Avidin Agarose Beads; B) Kontrolle unspezifischer Anreicherung: Überstand nach Hitzeabspaltung ( $\Delta$ ) von Avidin Agarose Beads, welche im Vorfeld nur mit H30 Protein inkubiert waren; C) Kontrolle unspezifischer Abspaltung: Eine Suspension von Avidin Agarose Beads mit gebundenem, sondenmarkiertem H30 Protein wurden durch Stickstoffzuleitung gemischt. Der Überstand wurde aufs Gel aufgetragen ( $N_2$ ). Der Überstand nach Hitzeabspaltung von den Beads ( $\Delta$ ) wurde ebenfalls aufgetragen. D) bis F) Test der photoinduzierten Abspaltung: Eine Suspension von Avidin Agarose Beads mit gebundenem, sondenmarkiertem H30 Protein wurden durch Stickstoffzuleitung gemischt und dabei für 0.5 h (D), 2 h (E) bzw. 3 h (F) mit einer Xe-Lampe bei einer Leistung von 350 W bestrahlt. Dabei wurde der  $\gamma\Phi c2$  Filter ( $\tau >0.2$  von 280 nm bis 380 nm) verwendet. Der Überstand nach Photolyse (hv) sowie der Überstand nach Hitzeabspaltung ( $\Delta$ ) von den Beads wurde aufgetragen.

Die Ursache für dieses Phänomen konnte nicht aufgeklärt werden. Die Annahme, das Protein sei zwar lichtinduziert von den Beads abgespalten worden, aber aufgrund des Ausbleichens des Farbstoffes durch die Bestrahlung (Photobleaching) nicht mehr nachweisbar, konnte durch Silberfärbung des Gels widerlegt werden. Denn nach Färbung des Gels mit Hilfe dieser hochsensitiven Nachweismethode, war kein abgespaltenes Enzym in den bestrahlten Ansätzen nachweisbar. Eventuell kam es durch die Bestrahlung zu Nebenreaktionen, die ein Verbleiben des Proteins an den Beads bewirkten. Aufgrund dieser Annahme wurden weitere Arbeiten zu diesem Experiment eingestellt.

## 5 Projekt I - Zusammenfassung und Ausblick

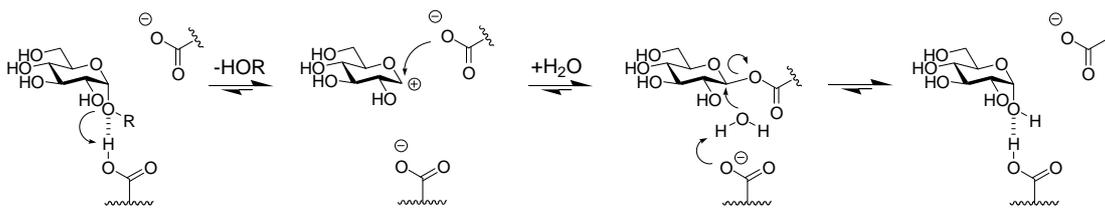
Die Ergebnisse des in Kapitel 4.6 vorgestellten Modellsystems zeigen, dass es sich bei dem photospaltbaren Phenacyl Linker **1** um ein attraktives Werkzeug zur Reinigung von Metaboliten an der Festphase handelt. Vorteile dieses neuen Systems zur Metabolitanreicherung sind seine einfache Handhabung, schnelle Reaktionszeiten der einzelnen Schritte, milde Abspaltbedingungen und reduzierte Kontamination im Vergleich zur herkömmlichen Methode, welche den trifunktionalen Linker **7** verwendet. Aufgrund dieser Vorteile könnte der Phenacyl Linker **1** im automatisierten Metabolit/Metabolom Screening verwendet werden.

Um die Reinigung von Proteinen zu ermöglichen, müssten Derivate des Phenacyl Linkers **1** vorliegen deren Anregungswellenlänge über 300 nm liegt. Dies würde UV Photoschäden während der Abspaltung an den zu reinigenden Proteinen unterbinden und so deren Abspaltung ermöglichen. Möglich wäre die Verschiebung der Anregungswellenlänge durch Substitution des Phenacylringsystems von **1** mit auxo- bzw. antiauxochromen Gruppen.

## 6 Projekt II - Einleitung

Glycosidasen und Glycosyltransferasen katalysieren die Hydrolyse bzw. die Bildung einer glycosidischen Bindung. In der Natur existieren Glycosidasen in einer Bandbreite von Organismen. So treten sie in Mikroorganismen bis hin zum Menschen auf. Glycosidasen sind in über 100 Familien nach Strukturähnlichkeiten eingeteilt.<sup>[135]</sup> Es gibt zwei Klassen von Glycosidasen, die aufgrund ihres Mechanismus unterschieden werden. Unter Beachtung der stereochemischen Konfiguration am anomeren Zentrum eines Zuckersubstrats, kann der Reaktionsmechanismus unter Inversion oder Retention verlaufen. Beide Mechanismen sind eingehend untersucht.<sup>[136-138]</sup> Deshalb unterscheidet man zwischen invertierenden oder retendierenden Glycosidasen.<sup>[138]</sup> Retendierende Glycosidasen katalysieren in einem zweistufigen Mechanismus (Abbildung 24A). Im ersten Schritt wird zunächst der exozyklische Sauerstoff der glycosidischen Bindung durch die Carboxylfunktion eines Aminosäurerestes im aktiven Zentrum des Enzyms protoniert. Dadurch entsteht zunächst ein Oxocarbenium-Intermediat. Dieses reagiert mit der Carboxylfunktion eines weiteren Aminosäurerestes am anomeren Zentrum zu einem Glycosyl-Enzym Intermediat. Im zweiten Schritt kommt es zur basenkatalysierten Hydrolyse des Intermediates zum Hemiacetal, was eine Retention der anomeren Konfiguration bewirkt. Invertierende Glycosidasen katalysieren in einem einzigen basenkatalysierten Reaktionsschritt eine Hydrolyse am anomeren Zentrum (Abbildung 24B).

### A) Retention



### B) Inversion

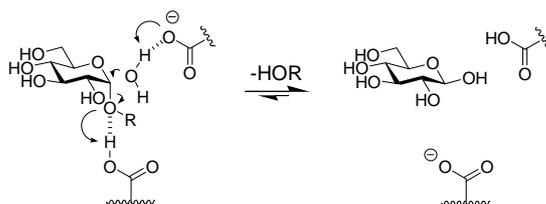


Abbildung 24: Schema zum Mechanismus retendierender und invertierender Glycosidasen. R: nicht näher erläuteter Rest.

Aufgrund ihrer essentiellen Funktion im Metabolismus, antibakterieller Verteidigung und Pathogenese<sup>[139-141]</sup> ist es wichtig, die Aktivität und Funktion von Glycosidasen durch proteomische Untersuchungsmethoden wie ABPP zu untersuchen.<sup>[142]</sup> Denn die Ergebnisse solcher Untersuchungen könnten die Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Verfahren darstellen. Das *ab initio* Sondendesign für Glycosidasen ist kompliziert. Denn viele Glycosidasen besitzen ein taschenförmiges aktives Zentrum, das zwar zahlreiche Wechselwirkungen mit seinem Substrat eingeht, aber kaum zusätzlichen Platz für raumerfüllende ABPP-Sonden oder deren Tags bietet.<sup>[138]</sup> Einige aktivitätsbasierende Sonden wurden bereits zur Markierung von Glycosidasen entwickelt.<sup>[57, 143-154]</sup>

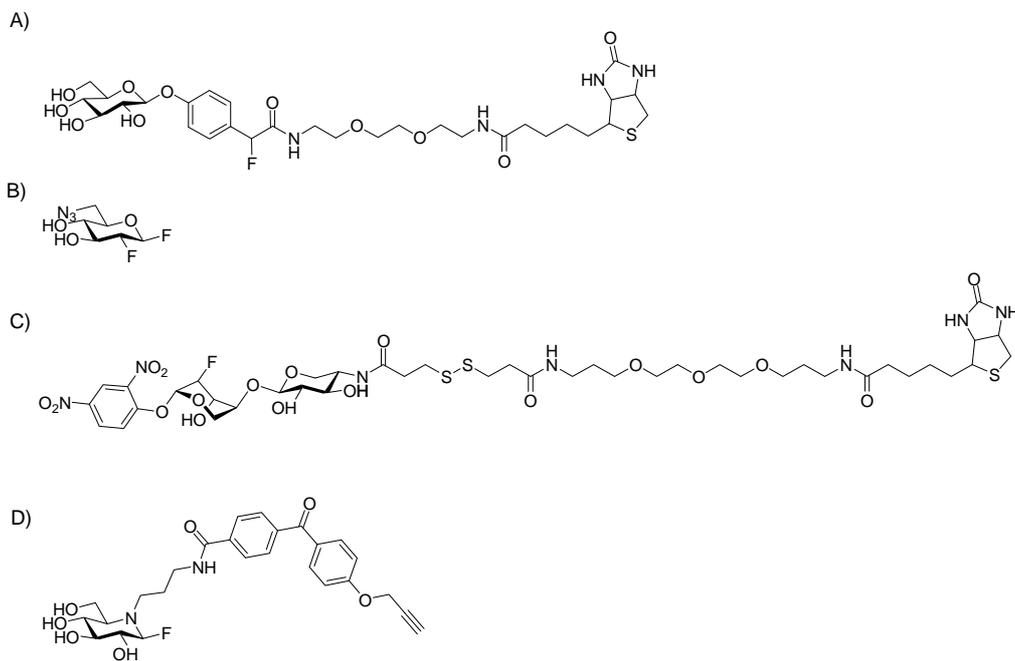


Abbildung 25: Strukturformeln einiger aktivitätsbasierender Sonden zur Markierung von Glycosidasen.

Tsai *et al.* gelang es 2002, erste Studien mit einer Glycosidase Sonde (Abbildung 25 A) durchzuführen.<sup>[144]</sup> Bei dieser handelte es sich um eine mit Biotinrest funktionalisierte *p*-Hydroxybenzylfluoridgruppe, die über eine  $\beta$ -glycosidische Bindung kovalent mit einem Glucoserest verknüpft ist. Durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung kommt es innerhalb dieser Sonde zu einer 1,6-Eliminierung unter Bildung eines reaktiven Quinonmethids. Dieses bindet kovalent ans aktive Zentrum einer Glycosidase. Nachteilig ist, dass es in komplexen Proteomen zum *Cross-Labeling* mit anderen Proteinen kommt, wodurch der Einsatz dieser Sonde zu proteomischen Studien eingeschränkt ist.<sup>[155]</sup> Voadlo *et al.* verwenden zur spezifischen Markierung von  $\beta$ -Glycosidasen ein azidfunktionalisiertes Zuckerfluorid

(Abbildung 25 B) als aktivitätsbasierte Sonde.<sup>[145, 156]</sup> Diese hat den Vorteil, dass sie klein genug ist, um in das taschenförmige aktive Zentrum von  $\beta$ -Glycosidasen zu binden. Sie inaktiviert  $\beta$ -Glycosidasen mechanismusbasiert, indem sie kovalent bindet und dadurch das Glycosyl-Enzym Intermediat arretiert. So markierte, retendierende  $\beta$ -Glycosidasen können dann visualisiert werden. Dies geschieht durch Staudinger Ligation der Azidgruppe der Sonde mit einer Reportergruppe. Unter Verwendung der Zuckerfluorid-Sonden konnten so Glycosidasen unterschiedlicher Familien markiert werden.  $\beta$ -Glycosidasen können mit Hilfe der von *Hekmat et al.* entwickelten Sonde (Abbildung 25 C) markiert werden.<sup>[148]</sup> Bei dieser handelt es sich um eine Sonde, deren Design auf einem 2,4-Dinitrophenyl-2-fluorzucker Inhibitor beruht und mit dem katalytischen Aminosäurerest invertierender  $\beta$ -Glycosidasen reagiert. Allerdings zeigten spätere Studien, dass dieser Sondentyp nicht spezifisch, sondern sowohl mit invertierenden als auch retendierenden  $\beta$ -Glycosidasen reagiert.<sup>[157]</sup> *Scherpenzeel et al.* gelang die Markierung von lysosomaler Glucocerebrosidase durch eine photoreaktive Iminozucker-Sonde (Abbildung 25 D).<sup>[158]</sup> Gegenwärtig sind noch zu wenige aktivitätsbasierte Sonden etabliert, um umfassende Studien von Glycosidasen in komplexen Proteomen durchführen zu können. Dies ist jedoch dringend notwendig, weil Glycosidasen aufgrund ihrer essentiellen Funktionen neue therapeutische oder diagnostische Ziele darstellen könnten.

## 7 Projekt II - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung

In Organismen spielen Glycosidasen eine entscheidende Funktion im Metabolismus, antibakterieller Verteidigung und Pathogenese. Deshalb ist es wichtig, die Aktivität und Funktion von Glycosidasen durch proteomische Untersuchungsmethoden wie ABPP zu untersuchen.<sup>[142]</sup> Gegenwärtig sind jedoch zu wenige aktivitätsbasierte Sonden etabliert, als dass solche Untersuchungen umfassend möglich sind. Deshalb ist es ein Ziel dieser Arbeit, neue zuckerbasierende ABPP-Sonden zu etablieren.

Grundlage für den Entwurf möglicher Sonden sind die von von *Yadav et al.* entwickelten potenten  $\beta$ -Galaktosidaseinhibitoren<sup>[159]</sup> gegen LacZ aus *E. coli* (Abbildung 26). Diese sind unter den zahlreichen bekannten potenten Glycosidaseinhibitoren<sup>[160-163]</sup> besonders interessant, weil sie trotz sterisch raumerfüllender *N*-Benzyl oder *N*-Phenyl Substituenten am anomeren Zentrum in der Lage sind, LacZ zu inhibieren. Dies könnte von Vorteil bei der Entwicklung von geeigneten ABPP-Sonden sein, indem essentielle, raumerfüllende Sonderelemente, wie reaktive Gruppe oder die Reportergruppe (siehe Kapitel 1.2), ebenfalls durch *N*-Substitution mit einem Zuckerrest verknüpft werden könnten.

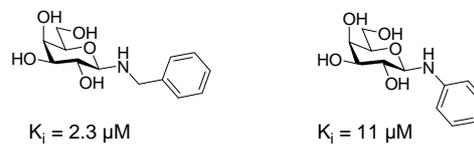


Abbildung 26: Strukturformeln der von *Yadav et al.* entwickelten  $\beta$ -Galaktosidaseinhibitoren<sup>[159]</sup>. Ihre  $K_i$ -Werte beziehen sich auf deren Inhibition von *E. coli* LacZ.

Zur Darstellung zuckerbasierender ABPP-Sonden sollen die physiologisch relevanten Zucker Glucose, Galactose und *N*-Acetylglucosamin modifiziert werden, so dass ihre Sonden einen Alkin- und Benzophenonrest tragen (Abbildung 27).



Dabei soll das Alkin- und Benzophenonhaltige Peptidrückgrat nach Standard-Festphasenpeptidsynthese (SPPS<sup>[104]</sup>) gemäß Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Strategie<sup>[105]</sup> synthetisiert werden. Der jeweilige Zuckerbaustein soll zunächst getrennt geschützt werden. Nach seiner Aktivierung am anomeren Zentrum soll er stereoselektiv und regioselektiv an das festphasengebundene Peptidrückgrat gekoppelt werden. Dabei darf es nicht zur vorzeitigen Entschützung des Peptidrückgrates kommen. Nach erfolgter Entschützung an der Festphase, Abspaltung und Reinigung sollten die Glycopeptidsonden erhältlich sein.

Ein alternativer Syntheseweg wäre die direkte Kopplung des Zuckerazides an ein festphasengebundenes Peptid mittels Click-Chemie. Diese Strategie soll nicht verfolgt werden, da laut Literatur die Ausbeute dieses Reaktionsschrittes unzureichend ist.<sup>[164]</sup>

Die Sonden sollen auf ihre Fähigkeit zur Markierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosidasen getestet werden. Hierfür sollen die Sonden zunächst mit gereinigten, rekombinant überexprimierten Glycosidasen getestet werden bevor sie in *in vitro* und *in vivo* ABPP eingesetzt werden.



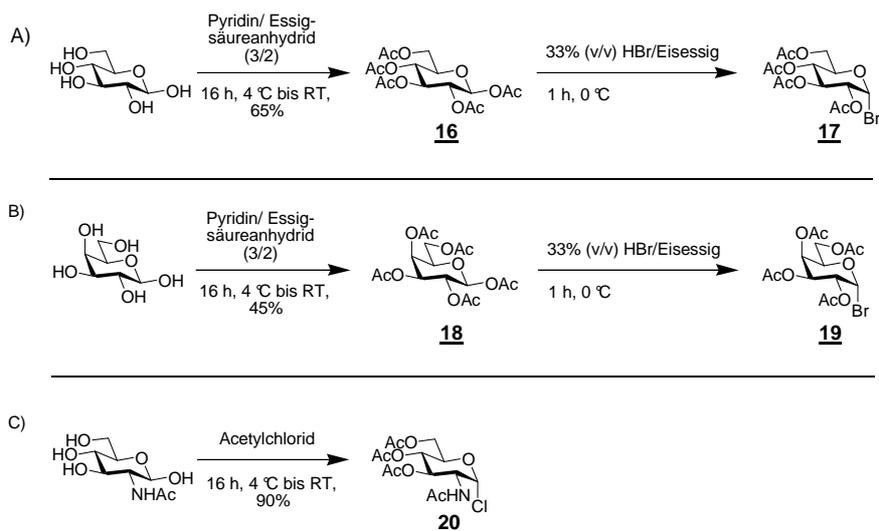


Abbildung 30: Schützung und Aktivierung von D-Glucose (A), D-Galactose (B) und N-Acetyl-D-glucosamin (C).

Aufgrund des anomeren Effektes lagen die Zuckerhalogenide **17**, **19**, **20** als  $\alpha$ -Halogenide vor. Dies ist jedoch nur für das Chlorid **20** durch NMR nachgewiesen, weil die Bromide **17** und **19** für eine ausreichende Charakterisierung zu instabil waren, was in der Fachliteratur bestätigt wird.<sup>[165]</sup> Durch Substitutionsreaktion mit Natriumazid unter Nachbargruppeneffekt wurden die entsprechenden  $\beta$ -konfigurierten Zuckerazide **21**, **22** und **23** hergestellt (Abbildung 31).

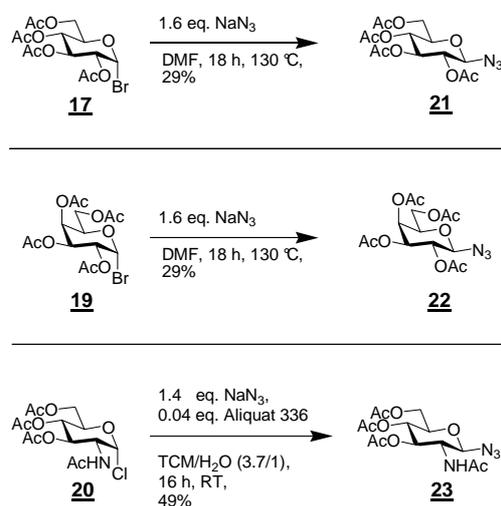


Abbildung 31: Darstellung der Zuckerazide **21**, **22** und **23**.

Bei der Umsetzung des geschützten Glucosaminylnchlorids **20** wurde die Phasentransferkatalyse eingesetzt. Sie verlief stereoselektiv nach  $S_N2$ -Mechanismus<sup>[166]</sup> unter Verwendung von Aliquat 336 als Phasentransferkatalysator.<sup>[167]</sup> Entgegen den Erwartungen

war eine analoge Überführung der geschützten Glucosyl- und Galactosylbromide **17** und **19** in die entsprechenden Azide mit Phasentransferkatalyse nicht möglich. Sie waren durch direkte Umsetzung mit  $\text{NaN}_3$  zugänglich. Dabei wurden weder Säuren noch Edelmetallkatalysatoren verwendet, da diese den Anomerisierungsprozess zum ungewünschten  $\alpha$ -Glucosyl- bzw.  $\alpha$ -Galactosylazid beschleunigen.<sup>[168]</sup>

Die erhaltenen Zuckerazide **21**, **22** und **23** wurden in einer [2+3] Cycloaddition nach *Huisgen* mit Fmoc-Propargylglycin umgesetzt (Abbildung 32).

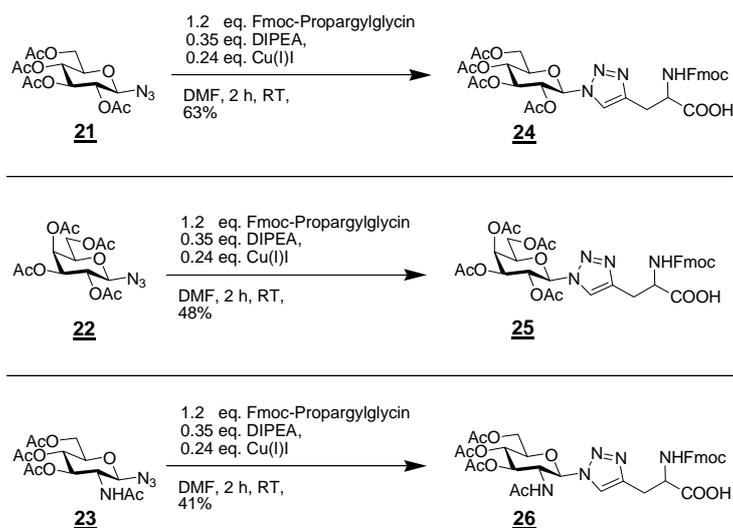


Abbildung 32: Darstellung der Triazolbausteine **24**, **25** und **26** mittels Click-Chemie.

Die Anwendung der Click-Chemie erlaubte hierbei die chemo-selektive Umsetzung verschiedener Zuckerazide zum entsprechenden 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol **24**, **25**, **26** [62, 102, 103] unter gleichen, milden Reaktionsbedingungen. Eine zeitaufwendige Optimierung der Reaktionsbedingungen für jedes der Zuckerazide entfiel. Ein weiterer Vorteil der Click-Chemie ist hier die orthogonale Natur beider Reaktionspartner ohne Störung der Kopplungsreaktion durch andere funktionelle Gruppen. Im Gegensatz zu Amidverknüpfungen, ist der Triazolring nicht durch Hydrolyse spaltbar<sup>[102]</sup> und erhöht somit die Stabilität des Produkts.

Eine alternative Synthesestrategie, den Zuckerbaustein direkt über eine Amidbindung an das spätere Peptidrückgrat zu koppeln, wurde verworfen, da hierfür eine Reduktion der Zuckerazide **21**, **22** und **23** zum entsprechenden Amin notwendig wäre. Dieser Schritt ist problematisch und mit einer zeitaufwendigen Optimierung aller Reaktionsbedingungen verbunden, da es bei der Reduktion von Zuckeraziden oft zur Anomerisierung des Halbaminals zum ungewünschten  $\alpha$ -Glycosid kommt.<sup>[169]</sup>

Eine weitere alternative Synthesestrategie, den Zuckerbaustein direkt an das festphasengebundene Peptid mittels Click-Chemie zu binden, wurde ebenfalls verworfen, da laut *Bouillon et al.* bei diesem Reaktionsschritt an der Festphase lange Reaktionszeiten und eine unvollständige Umsetzung zu erwarten sind.<sup>[170]</sup> Zur Verkürzung der Reaktionszeit kann in diesem Fall auch keine Synthesemikrowelle eingesetzt werden, da *Katritzky et al.* zeigten konnten, dass unter diesen Reaktionsbedingungen die Regioselektivität der Click-Chemie beeinträchtigt ist. Denn sie erhielten neben dem gewünschten 1,4- noch das ungewünschte 1,5-substituierte [1,2,3]-Triazol.<sup>[171]</sup>

Bei der Umsetzung der Zuckerazide **21**, **22** und **23** mit Fmoc-Propargylglycin wurde Cu(I)iodid als Katalysator verwendet (Abbildung 32), da es im Gegensatz zu Cu(I)Br und Cu(II)SO<sub>4</sub> sehr gut in DMF löslich ist. Cu(I) ist mit der Fmoc-Schutzgruppe kompatibel und führt laut *Tornoe et al.* auch beim Umsatz von Zuckeraziden mit Fmoc-Propargylglycin regioselektiv zu 1,4-substituierte [1,2,3]-Triazolen.<sup>[64]</sup> Um bekannte Nebenreaktionen wie die Bildung von Bis-Triazolen, 5-Hydroxytriazolen und Diacetylenen<sup>[62]</sup> zu vermeiden, wurde DIPEA als Base verwendet. Bei erfolgreicher Click-Reaktion kam es zu einer Grünfärbung des Reaktionsansatzes. Deren Intensität mit fortschreitender Reaktionsdauer deutlich zunahm. Eine unerwünschte Nebenreaktion der freien  $\alpha$ -Carboxylgruppe des Fmoc-Propargylglycins fand nicht statt. Die so hergestellten Triazolbausteine **24**, **25** und **26** konnten somit in der FestphasenGlycopeptidsynthese eingesetzt werden (Abbildung 33). Hierfür wurde die freie Säuregruppe des Triazolbausteins mit PyBOP<sup>[112]</sup> voraktiviert und quantitativ an das harzgebundene Peptid **27** gekoppelt. Letzteres wurde ausgehend vom MBHA-Harz<sup>[106]</sup> mit Rink Amid-Linker<sup>[107]</sup> nach SPPS<sup>[104]</sup>-Standardprotokoll gemäß Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Strategie<sup>[105]</sup> unter Verwendung von TBTU<sup>[108]</sup>/HOBt<sup>[109]</sup> und DIPEA<sup>[110, 111]</sup> als Kopplungsreagenz synthetisiert. Zur Kopplung der Triazolbausteine wurde allerdings PyBOP<sup>[112]</sup> TBTU<sup>[108]</sup> als Kopplungsreagenz vorgezogen, da es sich zur Kopplung raumerfüllender Bausteine an die Festphase vorteilig erwies.<sup>[113-115]</sup>



## 8.2 *In vitro* Markierung gereinigter Glycosidasen durch die Sonden **13**, **14** und **15**

Die synthetisierten Glycopeptidsonden **13**, **14** und **15** sollten Glycosidasen spezifisch markieren. Dies sollte experimentell überprüft werden. Da jedoch keine gereinigten Glycosidaselösungen mit hoher spezifischer Aktivität kommerziell erhältlich waren, wurden die drei rekombinanten Glycosidasen NagZ, YihQ und LacZ in dieser Arbeit hergestellt und gereinigt. Hierfür wurde für jede der Glycosidasen ein Klon hergestellt, der in der Lage war, diese rekombinant zu überexprimieren. Nach erfolgter Zellyse wurde die jeweilige rekombinante Glycosidase mittels Strep-Tag durch Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Reinigung lagen alle rekombinanten Glycosidasen mit einem terminalen Strep-Tag versehen rein vor. Eine Kontrolle des Reinheitsgrades der so erhaltenen Glycosidaselösungen mittels SDS-PAGE zeigte nach Coomassie Färbung keine Verunreinigungen.

Die rekombinanten Glycosidasen NagZ, YihQ und LacZ dienten als Modellglycosidasen. Ausgewählt wurden sie nach dem Kriterium ihrer bekannten Substratspezifität: NagZ<sup>[172, 173]</sup> ist eine retendierende exo- $\beta$ -Glucosaminidase<sup>[174]</sup> der Glycosyl Hydrolase 3 Familie<sup>[175, 176]</sup>. Diese Glycosyl Hydrolasen spielen eine entscheidende Rolle im Peptidoglykanrecycling Gram-negativer Bakterien sowie bei der Regulation der AmpC vermittelten  $\beta$ -Lactamresistenz.<sup>[177, 178]</sup> Ihr natürliches Substrat ist *N*-Acetylglucosamyl- $\beta$ -1,4-(1,6)-anhydromuraminsäure.<sup>[179]</sup> YihQ ist eine retendierende exo- $\alpha$ -Glucosidase der Glycosyl Hydrolase 3 Familie.<sup>[180]</sup> LacZ ist eine retendierende exo- $\beta$ -Galaktosidase der Glycosyl Hydrolase 2 Familie.<sup>[181-183]</sup> Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität sollten alle drei Glycosidasen unterschiedliche Substrate mit unterschiedlichen Konfigurationen am anomeren Zentrum gezielt erkennen und selektiv umsetzen. Bei Markierung der Glycosidasen durch die Sonden **13**, **14** und **15** erwartet man die selektive Markierung einer Glycosidase durch eine Sonde mit substratähnlichem Zuckerrest. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die rekombinanten Glycosidasen NagZ, YihQ und LacZ mit allen Glycopeptidsonden **13**, **14** und **15** getestet (Abbildung 35).

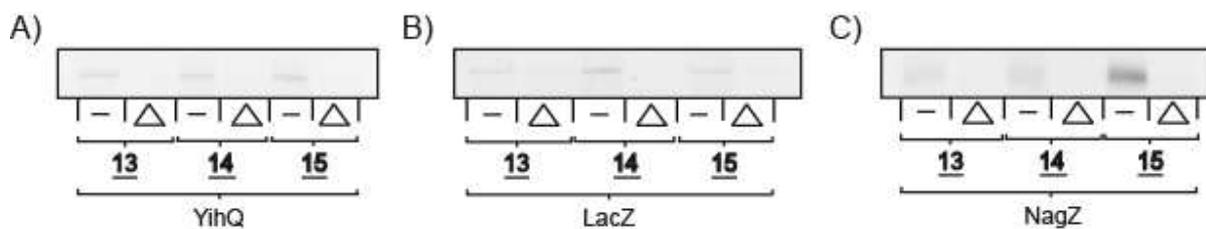


Abbildung 35: Markierung der Glycosidasen NagZ, YihQ und LacZ durch die Sonden **13**, **14** und **15**. -: natives Protein,  $\triangle$ : Hitzekontrolle.

YihQ und LacZ wurden von allen Sonden äußerst schwach markiert. Im Fall von YihQ stimmt dies mit der Erwartungshaltung überein, da dieses Enzym aufgrund seiner Substrat- bzw.  $\alpha$ -Konfigurationsspezifität die  $\beta$ -konfigurierten Sonden **13**, **14** und **15** unzureichend erkennt. Die generelle äußerst schwache Markierung von YihQ, liegt daran, dass Glycosidasen nicht ausnahmslos substrat- bzw. konfigurationsspezifisch sind. Im Fall von LacZ ist die äußerst schwache Markierung durch alle Sonden entgegen der Erwartungshaltung. Gemäß seiner  $\beta$ -Spezifität hätte LacZ durch die Sonde **14** aufgrund ihres substratähnlichen  $\beta$ -konfigurierten Galactosylrestes deutlich und selektiv gegenüber den anderen Sonden markiert werden müssen. Über die Ursache dieses Ergebnisses kann nur spekuliert werden. Eventuell stört der Peptidrest von **14** die korrekte Orientierung der Sonde im aktiven Zentrum von LacZ. Dadurch würde der Galactosylrest der Sonde **14** nicht als Substrat erkannt. Dies hätte zur Folge, dass alle Sonden LacZ äußerst schwach markierten, da alle Sonden solch einen Peptidrest haben. NagZ wurde nur von der Sonde **15** stark markiert. Im Gegensatz dazu markierten die anderen Sonden **13** und **14** NagZ äußerst schwach. Im Fall von NagZ stimmt die starke Markierung durch **15** mit der Erwartungshaltung überein, da dieses Enzym aufgrund seiner Substrat- bzw. Konfigurationsspezifität die  $\beta$ -konfigurierte Sonde **15** mit zugehörigem Glucosaminyrest erkennt. Die anderen Zuckerreste der beiden übrigen Sonden **13** und **14** werden nicht als Substrate erkannt. Daher zeigen sie nur eine sehr schwache Markierung.

Aufgrund der starken Markierung von NagZ durch Sonde **15** wurde nur deren Markierung näher untersucht. In einem Markierungsexperiment wurde die eingesetzte Menge an NagZ variiert. Dabei zeigte sich, dass Sonde **15** selbst in geringer Konzentration (50  $\mu$ M) in der Lage war, sehr geringe NagZ Mengen (10 bis 25 ng) pro Ansatz nachzuweisen. Dies suggeriert eine hohe Bindeaffinität der Sonde zu NagZ.

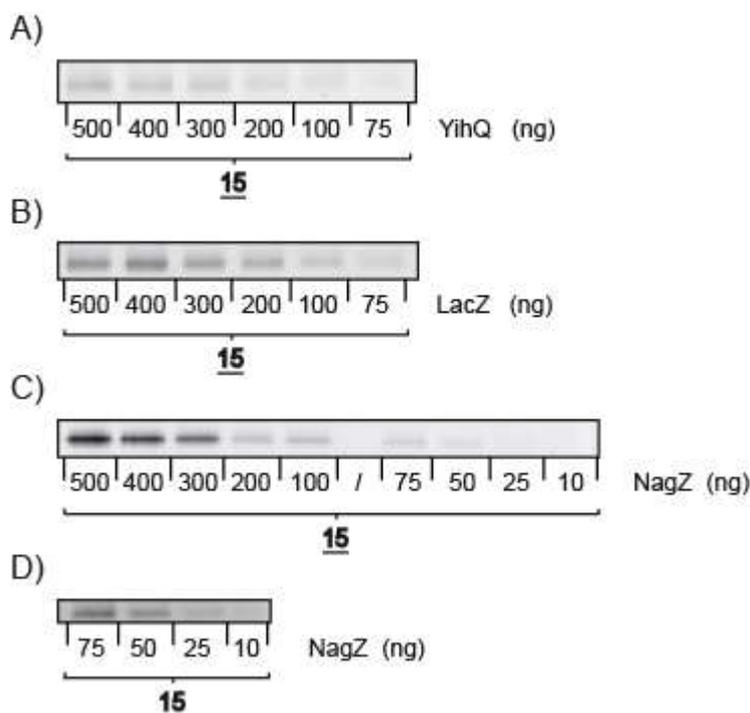


Abbildung 36: Titration der Glycosidasen YihQ, LacZ und NagZ gegen Sonde 19/: freie Bahn.

Um die Wechselwirkung von NagZ durch die Sonde 15 näher zu untersuchen, wurde eine  $IC_{50}$ -Messung durchgeführt. Diese sollte klären, ob NagZ durch Bindung der Sonde 15 in ihrer Enzymaktivität beeinträchtigt wird. Hierfür wurde NagZ zunächst mit der Sonde 15 umgesetzt, bevor das Substratanaloga 4'-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid 31 ( $pNO_2PhGlcNac$ )<sup>[184]</sup> zum Ansatz zugegeben wurde. In PBS-Puffer (pH 7.4) entsteht durch enzymatische Hydrolyse des Substratanalogas *p*-Nitrophenolat als gelb fluoreszentes Produkt. Dieses kann mittels UV-Spektrophotometer nachgewiesen werden.

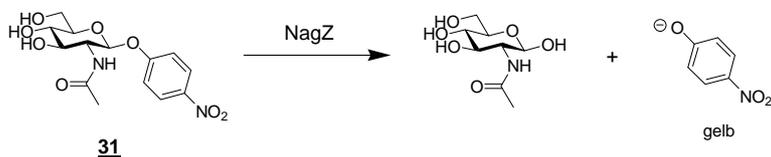


Abbildung 37: Reaktionsschema der  $IC_{50}$  Messung.

Sollte die Sonde 15 durch Aminosäurereste im aktiven Zentrum von NagZ umgesetzt werden, so wäre das Enzym nicht mehr in der Lage, nachfolgend sein Substratanaloga zu hydrolysieren. Die Enzymaktivität käme zum Erliegen. Stattdessen beobachtete man eine deutliche

Zunahme der NagZ Aktivität um  $72\pm 1\%$  durch Inkubation mit der Sonde **15**. Dabei muss es sich um eine allosterische Aktivierung des NagZ handeln. Demnach bindet die Zuckersonde **15** nicht in das aktive Zentrum von NagZ, sondern in dessen bisher unbekanntes allosterisches Zentrum. Dadurch käme es zu geringen strukturellen Veränderungen an der Kontaktfläche des allosterischen Zentrums. Diese könnten innerhalb eines Enzyms auf dessen aktives Zentrum übertragen werden. Dadurch wäre dessen katalytisches Zentrum leichter zugänglich und die Substratbindungsstelle günstiger angeordnet. Dies würde die nachgewiesene, erhöhte NagZ Enzymaktivität bewirken.

Kontrollexperimente zeigten, dass NagZ den substratanalog Glucosaminyrest von **15** deutlich von dem Glucosyl- bzw. Galactosylrest von **13** und **14** unterscheidet. Denn die Verwendung der Sonden **13** und **14**, resultierte nicht in einer starken Steigerung der NagZ Aktivität. Bei Verwendung der Sonde **13**, welche einen Glucosylrest trägt, kam es lediglich zu einer Steigerung der Enzymaktivität um  $26\pm 2\%$ . Bei Verwendung der Sonde **14**, welche einen Galactosylrest trägt, kam es lediglich zu einer Steigerung der Enzymaktivität um  $16\pm 5\%$ . Wurde das AGlycon der Sonden verwendet, so blieb die NagZ Aktivität nahezu unverändert ( $0\pm 2\%$ ). Diese Experimente zeigten, dass NagZ eine deutliche Präferenz gegenüber dem Glucosaminyrest der Sonde **15** aufzeigt. Zur Erkennung des Zuckerrestes scheinen dessen Position 4 und besonders Position 2 (NHAc substituiert) von Bedeutung zu sein. Denn nur in diesen Positionen unterscheiden sich die verwendeten Zuckerreste der Sonden **13**, **14** und **15**. Der jeweilige Zuckerrest der Sonden ist allein für deren Wirkung verantwortlich, da das AGlycon sich als wirkungslos herausstellte. Dennoch ist es wichtig, dass die Sonde **15** unversehrt vorliegt. Deren Glucosaminyrest muss mit dem Peptidrest verknüpft sein, um eine Steigerung der Aktivität zu erzielen. Denn die Inkubation von NagZ mit dem Zuckersubstrat Glucosamin, führte zu einer Hemmung der Enzymaktivität um  $6\pm 2\%$ . Dies entspricht einer klassischen Substratinhibition. Die Art der Verknüpfung von Zucker- und Peptidrest über einen 1,4-disubstituierten Triazolring könnte ebenfalls von Bedeutung sein, wurde aber nicht eindeutig geklärt.

Die Aktivierung von NagZ durch die Sonde **15** ist überraschend. Denn **15** inhibiert das aktive Zentrum von NagZ nicht durch dessen kovalente Bindung, obwohl sie in ihrem Aufbau den Vorgaben einer aktivitätsbasierten Sonde für ABPP entspricht. Vielmehr scheint sie NagZ allosterisch zu aktivieren. Der so modifizierte Aminosäurerest von NagZ konnte nicht identifiziert werden. Neueste Studien von *Asgarali et al.*<sup>[185]</sup> unterbinden die zukünftige Verwendung der Sonde **15** als Wirkstoff gegen  $\beta$ -Lactam resistente Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*. Denn laut Modelvorstellung reguliert NagZ *in vivo* deren  $\beta$ -

Lactam-Resistenz, indem das Produkt der NagZ Katalyse, das 1,6-anhydro-*N*-Acetylmuramylpeptid, die chromosomale Transkription der  $\beta$ -Lactamase AmpC induziert (Abbildung 38).

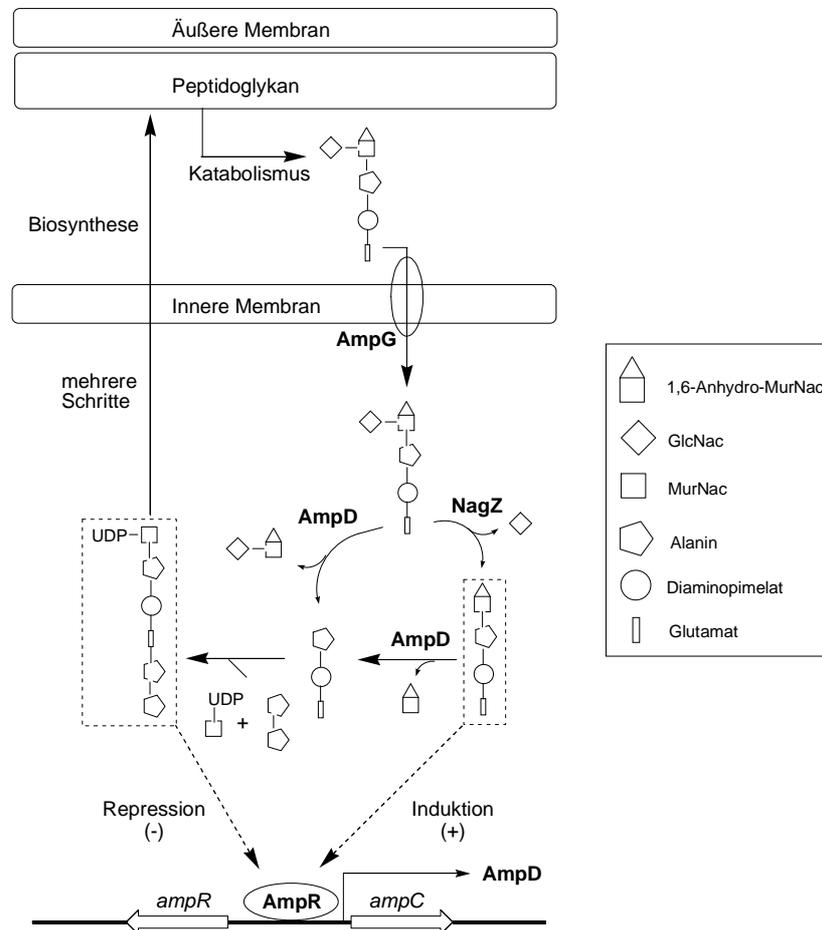


Abbildung 38: Schema der NagZ regulierten  $\beta$ -Lactamresistenz in *Pseudomonas aeruginosa* nach Asgarali et al. [185]

Folglich käme es bei Inkubation von *Pseudomonas aeruginosa* mit der Sonde **15** zu einer verstärkten AmpC Expression, was die  $\beta$ -Lactam Resistenz begünstigen würde. Allerdings nehmen Asgarali et al. nur an, dass NagZ *in vivo* 1,6-anhydro-*N*-Acetylmuramylpeptid produziert. Ihre These könnte mit Hilfe des NagZ Aktivators Sonde **15** in einem geeigneten Testsystem überprüft werden. Allerdings übersteigt die Etablierung eines solchen Systems die Kapazitäten dieser Arbeit, so dass darauf mit Hinblick auf ausbleibenden Erfolg im Kampf gegen *Pseudomonas aeruginosa* verzichtet wurde.

### 8.3 *In vivo* und *in vitro* Proteommarkierung durch die Sonden 13, 14 und 15

Da die Glycopeptidsonde 15 in der Lage war, die gereingte Glycosidase NagZ *in vitro* zu markieren (siehe Kapitel 8.2), sollen nun die Markierungseigenschaften der Sonden 13, 14 und 15 in diversen Proteomen getestet werden. Hierfür wurde unterschiedlich vorgegangen. Zur *in vivo* Proteommarkierung wurden lebende Bakterienzellen zunächst mit einer Sonde versetzt, lysiert und dann die Proteommarkierung bestimmt. Jedoch konnte keine der Glycopeptidsonden 13, 14 und 15 *in vivo* markieren. Dies war zu erwarten, weil dieser Sondentyp als polares Glycopeptid nicht durch die Zellmembran diffundieren kann. Ferner ist sein aktiver Transport durch die Zellmembran auch ausgeschlossen, da er keinerlei Substratähnlichkeit für bekannte Transportenzyme besitzt. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde die *in vitro* Proteommarkierung durchgeführt. Dabei muss eine Sonde nicht durch die Zellmembran lebender Zellen gelangen um zu markieren. Sondern die Sonde wurde mit bakteriellen Zelllysaten versetzt. Bei diesem Ansatz gab es somit keine Diffusionsbarriere. Demnach kam es bei diesem Ansatz zwar zur Proteommarkierung, allerdings konnte mit Hilfe des SEQUEST Algorithmus kein Zielprotein durch MS-Analyse zweifelsfrei identifiziert werden.

## 9 Projekt II - Zusammenfassung und Ausblick

Die gereinigte, rekombinante Glycosidase NagZ konnte von der Glycopeptidsonde 15 erfolgreich markiert werden. Der substratähnliche Glucosaminyrest von 15 war hierfür entscheidend. Die Markierung von NagZ durch 15 war allosterisch und führte zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms. Deshalb könnte die Sonde 15 zur selektiven Markierung von  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidasen und zur Untersuchung von Glycosidaseabhängigen Signalwegen benutzt werden.

## 10 Projekt III - Einleitung

In der Evolution wurden Naturstoffe auf ihre Wirkung zum Beispiel gegen menschlichen Krebs oder bakterielle Infektionen bereits optimiert. Daran gemessen ist es in sehr kurzer Zeit schwer möglich, Wirkstoffe mit vergleichbarer Potenz in synthetischen Zufallsbibliotheken zu ermitteln.<sup>[186, 187]</sup> Deshalb sind die reaktiven Elemente von Naturstoffen, wie zum Beispiel  $\beta$ -Lactone oder  $\beta$ -Lactame, bereits privilegierte Strukturen, deren fein abgestimmte Reaktivität ihre Anwendung als molekulare Werkzeuge oder pharmakologische Wirkstoffe ermöglicht.<sup>[29, 188-190]</sup> Ihre Reaktivität ist gegenüber ihren molekularen Zielen bereits präzise abgestimmt. Sie reagieren in der Regel spezifisch und selektiv an ausgewählten Zielstrukturen. Diese können unter anderem auch Proteine und deren Komplexe darstellen. Naturstoffe können entweder an das aktive oder allosterische Zentrum kovalent oder nicht-kovalent binden und dadurch die Aktivität eines Zielproteins beeinflussen. Um Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften eines Naturstoffes zu nehmen, bietet es sich an, dessen Leitstruktur bedarfsgerecht abzuändern. Durch chemische Synthese eines Naturstoffes kann die Struktur seines Grundgerüsts verändert werden. Dies erlaubt eine systematische Darstellung einer Vielzahl von Naturstoffderivaten. All diese Derivate können in ihrem Bindungsverhalten, Reaktivität, Selektivität und Spezifität variieren und so im Vergleich zum unveränderten Naturstoff ein verändertes Spektrum an Zielproteinen aufweisen.

Antibiotika, die auf Naturstoffen basieren, wurden in den letzten Jahrzehnten erfolgreich gegen Krankheiten verwendet. Jedoch nimmt ihre Effektivität dramatisch ab. Der Grund liegt im Aufkommen multiresistenter Bakterienstämme. Eine der Ursachen für diese Situation ist die begrenzte Anzahl und Bandbreite an therapeutischen Zielen. Für diese entwickelten multiresistente Bakterien Resistenzstrategien im Laufe der Jahre.<sup>[191]</sup> Deshalb ist es notwendig, neue bioaktive Naturstoffe und ihre Angriffsziele zu identifizieren und zu charakterisieren, um sie gegen multiresistente Bakterien einzusetzen.

## 11 Projekt III - Themenstellung, Synthese- und Methodenplanung

Ein Ziel der aktuellen bakteriellen Infektionsforschung ist es, neue therapeutische Ansätze im Kampf gegen multiresistente Bakterien herauszufinden. Hierfür müssen zunächst neue bioaktive Naturstoffe und ihre Angriffsziele identifiziert und charakterisiert werden. Naturstoffe wie  $\beta$ -Lactame<sup>[37, 38]</sup>,  $\beta$ -Lactone<sup>[35, 36, 69, 70]</sup> und Michael-Akzeptoren<sup>[34]</sup> inhibieren bakterielle Enzyme, die für die Viabilität und Pathogenese von Bakterien entscheidend sind. Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist es ein Ziel dieser Arbeit, durch den Einsatz eines weiteren elektrophilen Naturstoffes dessen Zielenzyme in pathogenen Bakterien zu identifizieren. Hierfür soll nur das elektrophile Leitstrukturelement eines Naturstoffes so modifiziert werden, dass es als Sonde im ABPP<sup>[17, 192]</sup> eingesetzt werden kann. Ein solches Leitstrukturelement besitzt der Naturstoff Acivicin, der von *Streptomyces sviveus* produziert wird.<sup>[193]</sup> Seine Biosynthese ausgehend von Ornithin ist bekannt.<sup>[194]</sup> Acivicin verfügt über einen elektrophilen 3-Chlor-dihydroisoxazolring.<sup>[193]</sup> Studien von Jayaram *et al.* weisen Acivicin als Glutamin Antimetabolit Antibiotika mit Anti-Tumor Aktivität aus.<sup>[195]</sup> Obwohl bislang keine detaillierte Analyse von Zielenzymen durchgeführt wurde, zeigten *in vitro* Experimente, dass Acivicin glutaminabhängige Amidotransferasen<sup>[196]</sup>, Glutamat Synthase (GltS)<sup>[197]</sup> und die  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase ( $\gamma$ -GTT)<sup>[198, 199]</sup> inhibiert. Dies geschieht durch kovalente Modifikation eines Cysteinrestes bzw. eines Threoninrestes im aktiven Zentrum des jeweiligen Zielenzym (Abbildung 39).<sup>[200-204]</sup>

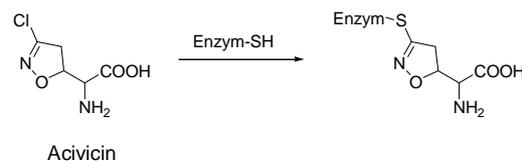


Abbildung 39: Umsetzung von Acivicin durch ein Zielenzym nach Chittur *et al.*<sup>[204]</sup>

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, das Spektrum an Acivicin-Zielproteinen im Proteom lebender Bakterien mit Hilfe von *in vivo* ABPP (siehe Kapitel 1.3) aufzuklären. Um dies zu erreichen, müssen zunächst Sonden (siehe Kapitel 1.2) synthetisiert werden, die das privilegierte 3-Halo-dihydroisoxazol Kernstrukturelement des Acivicins beinhalten. Dabei soll getestet werden, ob Sonden mit Chloridrest oder Bromidrest in Position 3 des Dihydroisoxazolrings unterschiedliche Zielenzyme markieren. Zudem soll getestet werden, ob unterschiedliche Reste in Position 4 des Dihydroisoxazolrings einen Einfluss auf das Markierungsverhalten des

Sondentyps haben. Deshalb wurden 10 verschiedene 3-Chlor- und 3-Brom-dihydroisoxazolsonden zum Einsatz in ABPP zur Synthese vorgeschlagen (Abbildung 40).

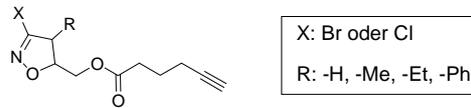


Abbildung 40: Strukturen möglicher 3-Halo-isoxazolsonden zum Einsatz in ABPP.

Zur Synthese des Heterozyklus in Lösung soll Glyoxalsäure zunächst in das entsprechende Glyoxalsäurealdoxim überführt werden, bevor es mit Dihaloformaldoxim zum 3-Halo-5-(hydroxymethyl)-dihydroisoxazol umgesetzt wird. Dieses soll durch Umsatz mit Hexinsäurechlorid zur entsprechenden ABPP-Sonde (1.2) verestert werden. Die fertige Sonde verfügt somit über alle notwendigen Bestandteile. Ihr elektrophiler 3-Halo-dihydroisoxazolring dient als reaktive Gruppe der kovalenten Verknüpfung mit einem Zielprotein. Ihr Alkinrest dient der kovalenten Verknüpfung mit einer Reportergruppe über die Cu(I)-katalysierte *Huisgen* [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie).<sup>[61, 62]</sup>

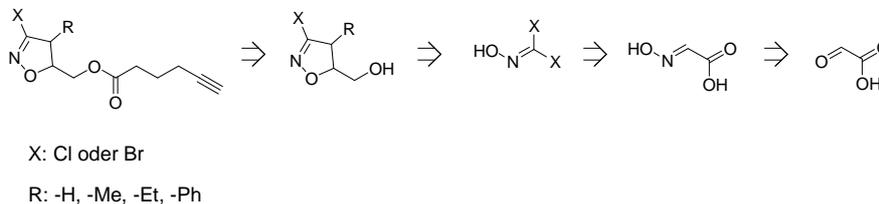


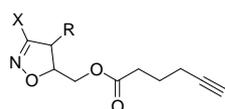
Abbildung 41: Schema der Retrosynthese der 3-Halo-dihydroisoxazolsonden.

Die Sonden sollen zur Identifizierung aller Acivicin-Zielproteine im Proteom lebender Bakterienzellen verwendet werden. Hierfür sollen sie in *in vivo* ABPP getestet werden. Dabei soll ein Vergleich der Sondenmarkierungen zwischen dem Proteom multiresistenter, pathogener und nicht-pathogener Bakterien Aufschluss über pathogenese-assoziierte Zielenzyme bringen. Diese Zielenzyme könnten neue molekulare Angriffsziele im Kampf gegen multiresistente Bakterien darstellen.

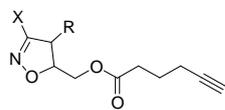
## 12 Projekt III - Ergebnisse und Diskussion

### 12.1 Synthese der Sonden

Um das Repertoire an ABPP-Sonden mit elektrophilem Grundgerüst zu erweitern, sollten Sonden mit Dihydroisoxazol-Grundgerüst hergestellt werden (Abbildung 42). Kernelement dieses neuen Sondentyps sollte ein substituierter 3-Halo-dihydroisoxazolring sein. Dieser soll unterschiedliche Substituenten in Ringposition 3 und 4 tragen, um die Reaktivität und Markierung der einzelnen Sonden untereinander zu testen und zu vergleichen. Jede der Sonden sollte zudem einen Alkinrest beinhalten. Dieser ermöglicht den Fluoreszenznachweis von Zielproteinen nach entsprechender Umsetzung (siehe Kapitel 1.2).



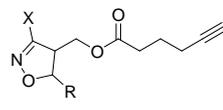
**32:** X = -Br, R = -H    **36:** X = -Cl, R = -H



**33a:** X = -Br, R = -Me    **37a:** X = -Cl, R = -Me

**34a:** X = -Br, R = -Et    **38a:** X = -Cl, R = -Et

**35a:** X = -Br, R = -Ph    **39a:** X = -Cl, R = -Ph



**33b:** X = -Br, R = -Me    **37b:** X = -Cl, R = -Me

**34b:** X = -Br, R = -Et    **38b:** X = -Cl, R = -Et

**35b:** X = -Br, R = -Ph    **39b:** X = -Cl, R = -Ph

Abbildung 42: Übersicht über die Strukturformeln angestrebter Sonden.

Die Synthese der Zielsonden **32** bis **35** und **36** bis **39** startete mit der Darstellung von Glyoxalsäurealdoxim **40** (Abbildung 43). Dieses war durch Umsetzung von Glyoxalsäure mit Hydroxylamin zugänglich und wurde gemäß eines einfachen, etablierten Protokolls<sup>[205]</sup> in guter Ausbeute von 71% erhalten. Das Glyoxalsäurealdoxim **40** reagierte mit Br<sub>2</sub> oder N-Chlorsuccinimid zu Dibrom-<sup>[206]</sup> oder Dichlorformaldoxim **41** bzw. **42**. Beide Formaldoxime waren instabil und wurden daher umgehend für die nachfolgende Cycloadditionsreaktion verwendet. In dieser reagierten sie mit einem ungesättigten Alkohol zu den entsprechenden Alkoholen **43** bis **46** bzw. **47** bis **50** in niedrigen Ausbeuten. Dabei wird aus dem

Dihaloformaldoxime und  $K_2CO_3$  *in situ* das entsprechende Halonitriloxid gebildet, welches mit dem eingesetzten Alken reagiert.<sup>[207]</sup> Je nach verwendetem Alkohol variierte die Ausbeute dieser Cycloadditionsreaktion zwischen 2 und 36%. Die getrennte Darstellung der Alkohole **43** bis **46** bzw. **47** bis **50** über Dibrom- bzw. Dichlorformaldoxim **41** bzw. **42** war notwendig, da sich die notwendigen Chloridverbindungen **47** bis **50** nicht wie durch *Pinto et al.* publiziert aus dem entsprechenden Bromid **43** bis **46** darstellen lassen.<sup>[208]</sup>

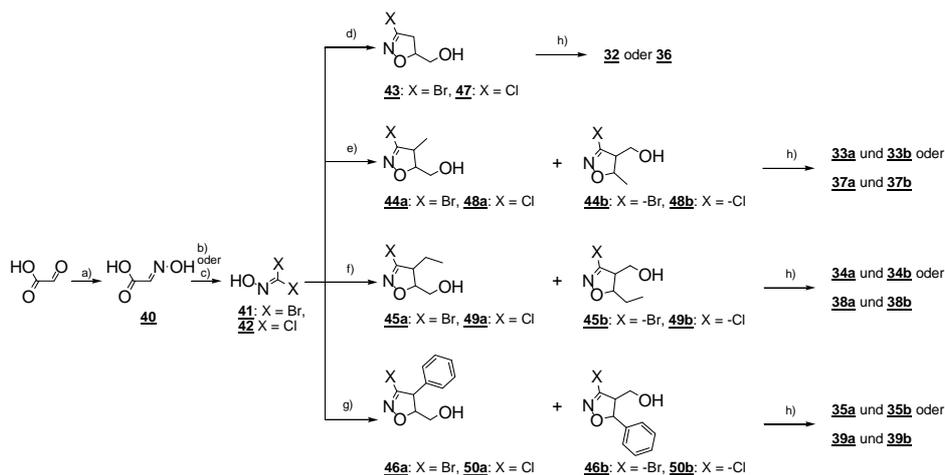


Abbildung 43: Syntheseübersicht über die dargestellten Sonden **36** bis **39** und **41** bis **44**. a) 1.0 eq.  $NH_2OH$ ,  $H_2O$ , 16 h, RT, b) für Dibromformaldoxim **41**: 1.0 eq.  $Br_2$ ,  $H_2O$ , 3 h, 0 °C bis RT, c) für Dichlorformaldoxim **42**: 1.9 eq. N-Chlor-succinimid, DME, 10 min, 110 °C bis RT, d) 4.4 eq. Allylalkohol, 5.9 eq.  $K_2CO_3$ , EtOAc, 24 h, rt, e) 4.4 eq. *cis/trans*-Crotylalkohol, 5.9 eq.  $K_2CO_3$ , EtOAc, 24 h, RT, f) 4.4 eq. *cis*-2-Penten-1-ol, 5.9 eq.  $K_2CO_3$ , EtOAc, 24 h, RT, g) 4.4 eq. *trans*-Zimtalkohol, 5.9 eq.  $K_2CO_3$ , EtOAc, 24 h, RT, h) 2 eq. Hexinsäurechlorid, DCM, 2 eq. TEA, 16h, RT.

Um bei dieser *syn*-Cycloadditionsreaktion überhaupt Produkt zu erhalten, war es bei dieser Reaktion wichtig, die Reihenfolge der Zugabe der Reaktanden zu beachten. Hochreaktives Dihaloformaldoxim **41** bzw. **42** wurde mit dem gelösten Alkohol versetzt. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von frisch gemörsertem  $K_2CO_3$  zum Reaktionsansatz. Eine Abänderung dieser Folge oder der Reaktionsbedingungen unterband die Produktbildung. Von Nachteil bei dieser Reaktion war, dass sie weder stereoselektiv noch regioselektiv ist.<sup>[206, 207]</sup> Dies führte dazu, dass die Alkohole **43** und **47** als racemisches Enantiomergemisch vorlagen, während die Alkohole **44** bis **46** bzw. **48** bis **50** zudem als racemisches Regioisomergemisch mit Variation an Ringposition 4 und 5 vorlagen. NMR Messungen ergaben, dass diese immer *cis*-konfiguriert waren. Die einzelnen Verbindungen der Gemische konnten nicht durch Silica-Säulenchromatographie voneinander getrennt werden. Zudem ist eine destillative Reinigung

ausgeschlossen, weil *De Amici et al.* berichten, dass eine Reinigung des Alkohols mittels Destillation zur Produktzersetzung führt.<sup>[209]</sup> Eine aufwendige Optimierung der Trennungen wurde aus Zeitgründen nicht verfolgt. Deshalb wurden die Isomere der Alkohole **43** bis **50** nicht getrennt, sondern zu den gewünschten Sonden **32** bis **39** in hoher Ausbeute verestert. Dies geschah durch Umsetzung mit Hexinsäurechlorid. Je nach Verbindung wurden hierbei mäßige bis hohe Ausbeuten nach Silica-Säulenchromatographie erhalten.

## 12.2 *In vivo* Proteommarkierung

Die dargestellten Sonden **32** bis **39** lagen als Mischungen ihrer Enantiomere bzw. ihrer enantiomeren Regioisomere vor. Da keine Informationen über das Markierungsvermögen dieses neuen 3-Haloisoxazol-Sondentyps vorlagen, wurden die einzelnen Sonden ohne vorherige Trennung ihrer Isomere als ABPP-Sonden eingesetzt, um herauszufinden, ob sie überhaupt in der Lage sind Proteine zu markieren. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass die Verwendung solcher Mischungen eines Sondentyps die Chance erhöht, eine Proteinmarkierung beobachten zu können. Durch diese Vorgehensweise ist der Entdeckungsprozess von Zielproteinen der 3-Haloisoxazolsonden wesentlich beschleunigt. Bei Entdeckung und Identifizierung vielversprechender Zielproteine können die zugehörigen Sonden zunächst getrennt werden, um dann in erneuten Proteommarkierungen deren aktive Form zu bestimmen.

Zur *in vivo* Proteommarkierung wurden die Mischungen der Sonden **32** bis **39** mit lebenden Bakterien inkubiert (Abbildung 44). Es wurden sowohl nicht-pathogene Organismen wie *B. licheniformis*, *P. putida*, *L. welshimeri* als auch pathogene Organismen wie *S. aureus* NCTC und *S. aureus* Mu50 getestet. Es stellte sich heraus, dass eine zweistündige Inkubation der Zellen mit finaler Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  an Sondenmischung eine optimale Proteommarkierung bewirkte. Nach Inkubation wurden die Zellen lysiert und die markierten Proteine mit Rhodaminazid über Click-Chemie verknüpft. Nach SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme zeigte sich, dass nur wenige Proteine eines jeden untersuchten Proteoms spezifisch markiert wurden. Diese variieren je nach verwendetem Sondentyp. Dies ist wahrscheinlich auf deren unterschiedliche Substituenten an Ringposition 4 und 5 zurückzuführen. Hingegen hatte der Unterschied zwischen 3-Chlor- und 3-Bromsubstituent des Rings keine Auswirkung auf das Markierungsprofil eines Sondentyps.

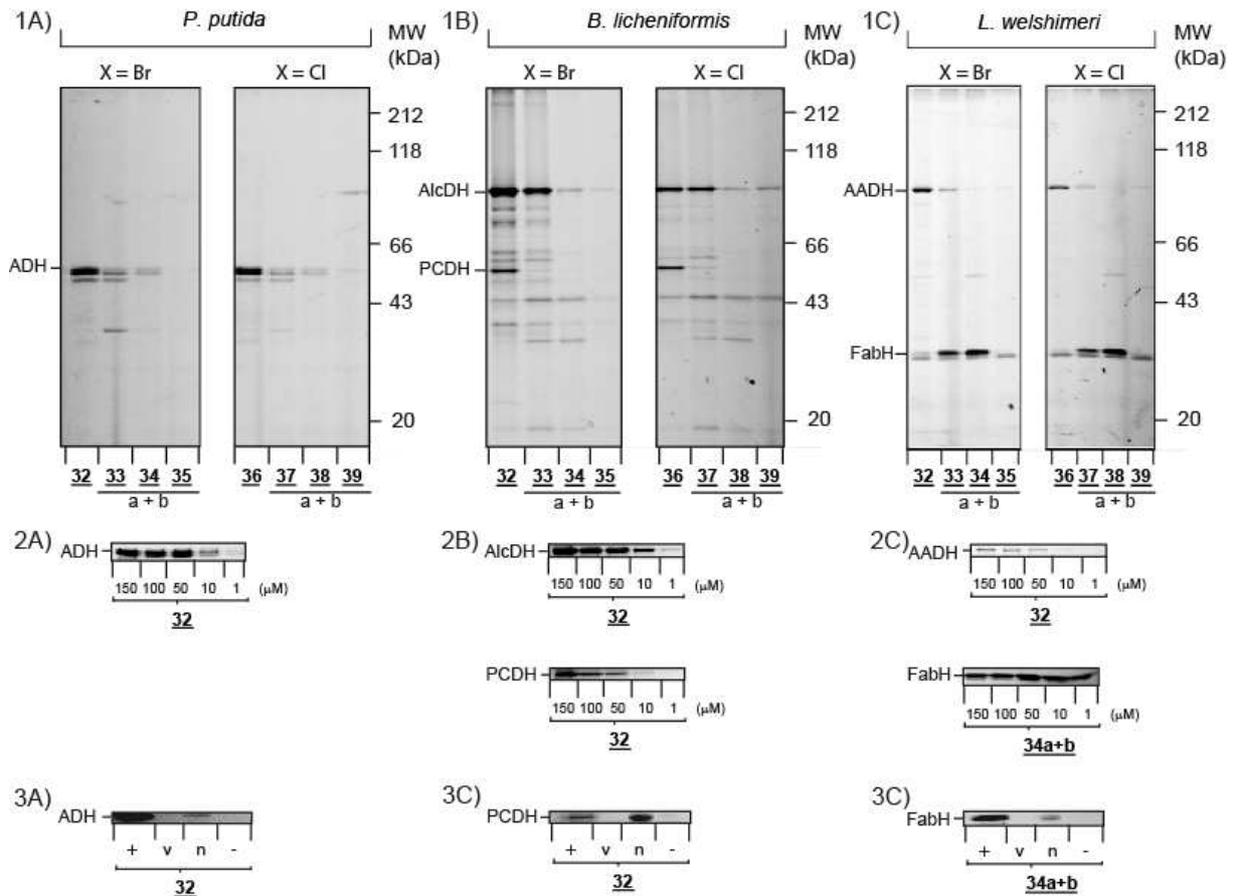


Abbildung 44: 1) In vivo Proteommarkierung von *P. putida* (1A), *B. licheniformis* (1B), *L. welshimeri* (1C) durch Sonde 32 bis 39. Aldehyd Dehydrogenase (ADH, 53.1 kDa) wurde in *P. putida*, Alkohol Dehydrogenase (AlcDH, 95.0 kDa) und 1-Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase (PCDH, 56.7 kDa) wurden in *B. licheniformis*, Aldehyd-Alkohol Dehydrogenase (AADH, 94.6 kDa) und 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase 3 (FabH, 34.0 kDa) wurden in *L. welshimeri* nachgewiesen. 2) Titration von Sonde 32 und 34 in in vivo Proteommarkierungen. Die finale Sondenkonzentration ist in μM angegeben. 3) C) In vitro Markierung von rekombinant überexpressierten Zielproteinen (+: Positivkontrolle unter Verwendung von nativem Proteom, v: vor Induktion, n: nach Induktion, -: Hitzekontrolle unter Verwendung von induziertem Proteom).

In *S. aureus* markierten die Enantiomere des Sondentyps 32, welche keinen Substituenten an Ringposition 4 haben, nur zwei verschiedene Enzyme. Im Gegensatz dazu markierten die enantiomeren Regioisomere des Sondentyps 34, welche einen Ethylrest an Ringposition 4 oder 5 tragen, nur ein anderes Enzym mit geringerem Molekulargewicht (Abbildung 45).

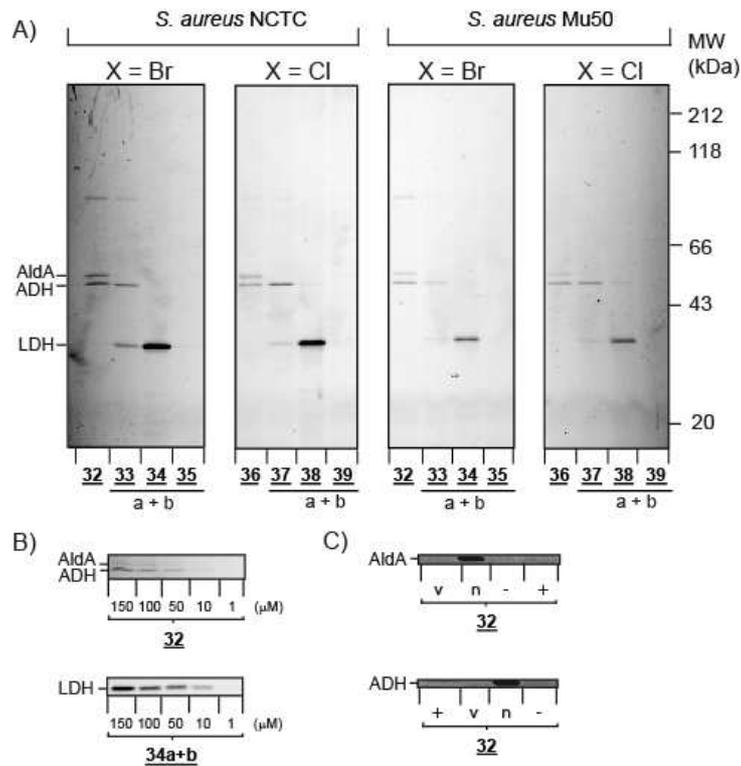


Abbildung 45: A) In vivo Proteommarkierung von pathogenem *S. aureus* NCTC und *S. aureus* Mu50 durch die Sonden **32** bis **39**. Aldehyd Dehydrogenase (AldA, 53.6 kDa), Aldehyd Dehydrogenase (ADH, 51.7 kDa) und L-Lactat Dehydrogenase (LDH, 29.4 kDa) wurden in *S. aureus* NCTC nachgewiesen. B) Titration von Sonde **32** und **34** in in vivo Proteommarkierungen. Die finale Sondenkonzentration ist in  $\mu\text{M}$  angegeben. C) In vitro Markierung von rekombinant überexprimierten Zielproteinen (+: Positivkontrolle unter Verwendung von nativem Proteom, v: vor Induktion, n: nach Induktion, -: Hitzekontrolle unter Verwendung von induziertem Proteom).

Sonden mit Methylseitenkette (**33** bzw. **37**) markierten wiederum Enzyme, die einer Kombination der beiden Sondentypen **32** bzw. **36** und **34** bzw. **37** entsprach. Die Phenylsubstituierten Sonden **35** und **39** markierten keine Proteine in den meisten Proteomen (Abbildung 44 und Abbildung 45). Wahrscheinlich verhindert ihr sterisch raumerfüllender Phenylrest deren Umsetzung durch Zielenzyme. Der Vergleich zwischen Bromid- (**32** bis **35**) und Chlorid- substituierten Sonden (**36** bis **39**) beweist, dass chloridsubstituierte Sonden eine Proteinmarkierung mit leicht geringerer Intensität verursachen (Abbildung 44 und Abbildung 45). Dies könnte durch die verminderte Elektronegativität des Chlorsubstituenten gegenüber dem Bromidsubstituenten bedingt sein. Denn dadurch sollten die chloridsubstituierten Verbindungen eine leicht geringere Elektrophilie und damit einhergehende Reaktivität in Position 3 im Vergleich zu den bromidsubstituierten Verbindungen aufweisen. Allerdings kommt es durch die Halogenvariation nicht zu einer Veränderung der Proteommarkierung, wie der Vergleich der Proteommarkierungen zwischen *S. aureus* NCTC und Mu50 offenbart

(Abbildung 45). Um etwaige Unterschiede im Markierungsverhalten der Regioisomere **33a+b** und **34a+b** zu überprüfen, wurden deren einzelne Regioisomere mittels HPLC getrennt und erneut zur *in vivo* Markierung des Proteoms der pathogenen Bakterien *S. aureus* NCTC und *S. aureus* Mu50 sowie der nicht-pathogenen Bakterien *P. putida*, *B. licheniformis* und *L. welshimeri* verwendet (Abbildung 46).

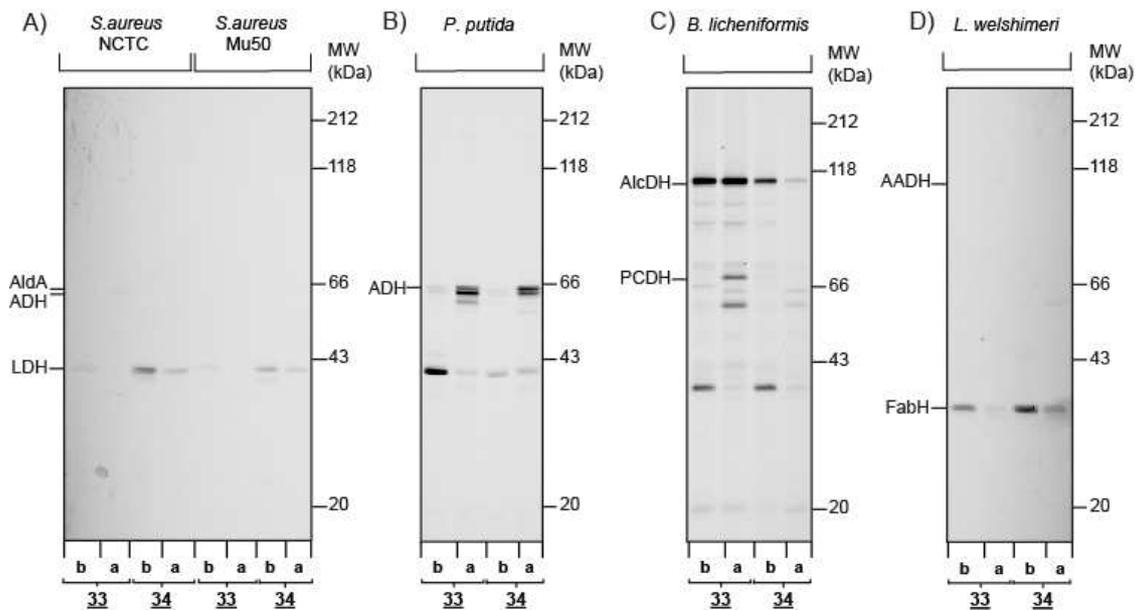


Abbildung 46: *In vivo* Proteommarkierung von (A) pathogenem *S. aureus* NCTC und *S. aureus* Mu50 und nicht-pathogenen (B) *P. putida*, (C) *B. licheniformis* und (D) *L. welshimeri* durch die Regioisomere a oder b der Sonden **33** und **34**. In *S. aureus* NCTC und *S. aureus* Mu50 wurden Aldehyd Dehydrogenase (AldA, 53.6 kDa), Aldehyd Dehydrogenase (ADH, 51.7 kDa) und L-Lactat Dehydrogenase (LDH, 29.4 kDa) nachgewiesen. Aldehyd Dehydrogenase (ADH, 53.1 kDa) wurde in *P. putida*, Alkohol Dehydrogenase (AlcDH, 95.0 kDa) und 1-Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase (PCDH, 56.7 kDa) wurden in *B. licheniformis*, Aldehyd-Alkohol Dehydrogenase (AADH, 94.6 kDa) und 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase 3 (FabH, 34.0 kDa) wurden in *L. welshimeri* nachgewiesen. Die Zuordnung der Banden zu den einzelnen Regioisomeren erfolgte von Dr. Thomas Böttcher aufgrund seiner ergänzenden NMR Messungen, der in dieser Arbeit getrennten Regioisomere.

Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Regioisomere eine erstaunliche Selektivität gegenüber bestimmten Zielenzymen aufweisen. So markierte die Sonde **33b**, die einen Methylrest an Ringposition 5 trägt, im *S. aureus* Proteom das Enzym Lactat Dehydrogenase (LDH). Befindet sich jedoch an Ringposition 5 eine Estergruppe (Sonde **33a**), so wurde stattdessen das Enzym Aldehyd Dehydrogenase (ADH) markiert. Ein ähnliches Markierungsmuster gilt für die Markierungen von *P. putida* und *L. welshimeri* Proteom. In *L. welshimeri* wurde durch

die Sonden **33b** und **34b** ausschließlich das Enzym 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase (FabH) markiert, während die Sonde **33a** nur das Enzym Aldehyd-Alkohol Dehydrogenase (AADH) markierte.

### 12.3 Identifizierung und Charakterisierung markierter Zielproteine durch Massenspektrometrie

Die Identifizierung markierter Zielenzyme (Abbildung 44 und Abbildung 45) war durch präparative *in vivo* Proteommarkierung möglich. Hierfür wurden die Proteome mit einer Sonde inkubiert und markierte Proteine mit dem biotinyliertem trifunktionalen Linker **7** in einer Click-Reaktion umgesetzt. Solch modifizierte Proteine konnten durch Biotin/Avidin Wechselwirkung an Avidin Agarose-Beads angereichert werden. Nach Hitzeabspaltung von den Beads wurden die markierten Zielenzyme durch SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme detektiert und gereinigt. Nach Trypsinverdau konnten die Peptide der markierten Zielenzyme massenspektrometrisch durch Orbitrap MS und unter Verwendung des SEQUEST Algorithmus analysiert werden. Die Identität einiger Zielproteine konnte so ermittelt werden.

Im Gegensatz zur Erwartungshaltung wurde keine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase markiert, weder *in vivo* im komplexen Proteom noch *in vitro* mit gereinigter, rekombinanter  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. Letzteres war ein Geschenk von Dr. Markus Gerhard (MRI) und lag bereits als aktives, autoprozessiertes Protein vor. Dies konnte durch SDS-PAGE gesondert bestätigt werden. Denn im Fall der gereinigten, rekombinanten  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase waren nur 40 kDa- und 20 kDa-Untereinheiten nachweisbar. Nach *Suzuki* und *Kumagai* entstehen diese erst durch intramolekulare Autoprozessierung aus dem inaktiven 60 kDa Proenzym.<sup>[198]</sup> Daher sind Zweifel an der *in vivo* Nichtmarkierung der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, wonach es *in vivo* nur deshalb nicht markiert wurde, weil es als unprozessiertes Proenzym in der Bakterienzelle vorliegen könnte, unwahrscheinlich.

Stattdessen wurden sieben Proteine der Enzymfamilie der Dehydrogenasen (DH) durch die Sonden **32** und **34** markiert. Darunter befanden sich zum Beispiel Pyrrolin-5-carboxylat DH (PCDH), Aldehyd DH (ADH) und die Aldehyd Alkohol DH (AADH). Dies legt nahe, dass die verwendeten Sondenstrukturen und -reaktivitäten geeignet zur Markierung dieser wichtigen Enzymfamilie sind. Das Substrat der PCDH, Pyrrolin-5-carboxylat- (Abbildung 47)

ähnelt strukturell dem verwendeten Sondentyp **32** und **36**. Daher mag man vermuten, dass die Erkennung von **32** und **36** und des Substrats im Enzym auf ähnlichen Aminosäureresten beruht.

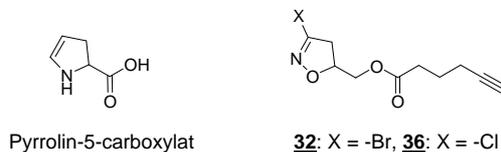


Abbildung 47: Strukturformel des PCDH Substrats Pyrrolin-5-carboxylat und des Sondentyps **32** und **36**.

Um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu überprüfen, sollten weitere unabhängige Kontrollen durchgeführt werden. Hierfür wurden die wichtigsten, massenspektrometrisch identifizierten Zielenzyme rekombinant überexprimiert und mit den zugehörigen Sonden **32** bzw. **34** markiert. Jedes der rekombinanten Zielenzyme wurde markiert. Dies geschah aktivitätsbasiert, da zugehörige Hitzekontrollen mit denaturiertem Protein keine Markierung zeigten (Abbildung 44 und Abbildung 45).

Um die Markierung durch den Dihydroisoxazol-Sondentyp detaillierter zu untersuchen, wurde das bisher uncharakterisierte Enzym AADH ausgewählt. Hierfür wurde AADH mit dem Enantiomeregemisch der Sonde **32** inkubiert. Das markierte Enzym wurde tryptisch gespalten. Die so erhaltenen Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde nach dem Peptidfragment, welches den durch Sondenumsatz modifizierten Aminosäurerest trägt, gesucht. Der Vergleich zwischen den erhaltenen Peptidfragmenten ergab, dass Cysteinrest 255 der AADH kovalent mit dem Dihydroisoxazolrest modifiziert war (Abbildung 48). Dies bekräftigt die Eingangshypothese, dass die Proteinmarkierung durch diesen Sondentyp durch nukleophilen Angriff eines Aminosäurerestes an Position 3 des elektrophilen 3-Halo-dihydroisoxazolring unter einhergehendem Additions-Eliminierungs-Mechanismus verläuft (Abbildung 39). Die hier nachgewiesene Acylierung eines Cysteinrestes stimmt mit dem Oxidationsmechanismus vieler Aldehyd DH überein. Bei diesen greift ein Cysteinrest ebenfalls nukleophil ein Aldehydmolekül im ersten Katalyseschritt an.

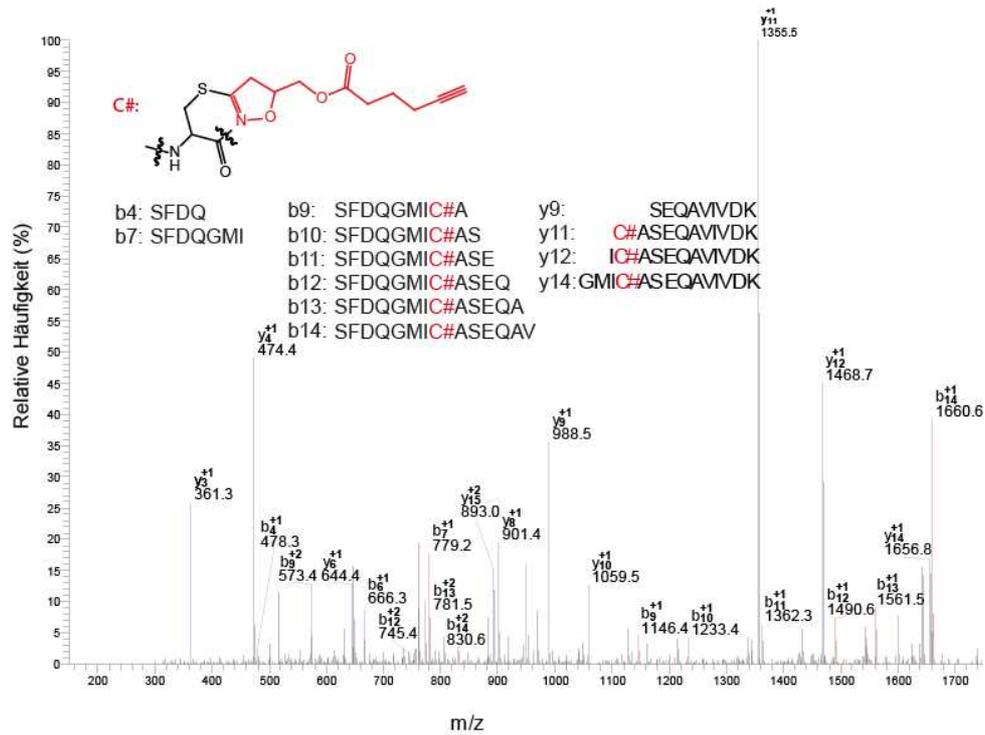


Abbildung 48: Nachweis des modifizierten C255 (C#) der AADH durch MS.

Alle hier identifizierten Enzyme spielen eine Rolle im Primärmetabolismus von Bakterien. Sie sind an einer Vielzahl wichtiger zellulärer Vorgänge, wie zum Beispiel dem Glutamat und Prolin Metabolismus im Fall der PCDH oder dem Alkohol Metabolismus im Fall der AADH und LDH, beteiligt. Lediglich FabH ist das einzige identifizierte Zielenzym, das nicht zur Dehydrogenase Familie gehört. Es ist eine Acyltransferase, die in der bakteriellen Fettsäuresynthese eine entscheidende Funktion hat. Gegenwärtig wird FabH als vielversprechendes Zielprotein für neue Antibiotika gehandelt.<sup>[210]</sup>

Tabelle 2: Liste der identifizierten Zielenzyme.

| Organismus                    | identifiziertes Enzym                        | Zugangsnummer | Enzymklasse    | Funktion                         | Enzym nachgewiesen durch Sonde |
|-------------------------------|--|---------------|----------------|----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 1-Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase (PCDH) | Q65NN2        | Oxidoreductase | Glutamat und Prolin Metabolismus | <u>32</u>                      |

|                               |  |        |                 |                                |              |
|-------------------------------|--|--------|-----------------|--------------------------------|--------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | Alkohol Dehydrogenase (AlcDH)                      | Q65CW1 | Oxidoreduktase  | Alkohol Metabolismus           | <u>32</u>    |
| <i>Listeria welshimeri</i>    | Aldehyd-alkohol Dehydrogenase (AADH)               | A0AJ86 | Oxidoreduktase  | Alkohol / Aldehyd Metabolismus | <u>32</u>    |
| <i>Listeria welshimeri</i>    | 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase 3 (FabH) | A0AKV5 | Acyltransferase | Fettsäure Biosynthese          | <u>34a+b</u> |
| <i>Pseudomonas putida</i>     | Aldehyd Dehydrogenase (ADH)                        | Q88CA3 | Oxidoreduktase  | Aldehyd Metabolismus           | <u>32</u>    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Aldehyd Dehydrogenase (AldA)                       | Q2G1J0 | Oxidoreduktase  | Aldehyd Metabolismus           | <u>32</u>    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Aldehyd Dehydrogenase (ADH)                        | Q2FWX9 | Oxidoreduktase  | Aldehyd Metabolismus           | <u>32</u>    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | L-Lactat Dehydrogenase (LDH)                       | Q2G218 | Oxidoreduktase  | Glycolyse                      | <u>34a+b</u> |

## 12.4 Inhibitionsstudien

Da in dieser Arbeit die kovalente Modifizierung der AADH durch Umsatz von 32 nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 12.3), sollte nun getestet werden, ob durch Umsatz der Sonde auch die Enzymaktivität verändert wird. Hierfür wurde das Enzym mit der Sonde vorinkubiert. Nach Zugabe des Substrats Acetaldehyd und des Kofaktors NADH/H<sup>+</sup> wurde die Reaktion gestartet. Aktive AADH sollte Acetaldehyd zum Ethanol reduzieren. Dabei sollte NADH/H<sup>+</sup> als Reduktionsmittel dienen. Dessen Oxidation zum NAD<sup>+</sup> konnte

photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden. Tatsächlich konnte so eine Inhibition von AADH durch Umsetzung von Sonde **32** nachgewiesen werden. Durch Zugabe von **32** wurde die AADH mit einem  $IC_{50}$  von  $10.82 \pm 1.47 \mu M$  inhibiert (Abbildung 49A). Dagegen bewirkte die Zugabe der Sonden **33**, **34** und **35** nur eine schwache Inhibition mit  $IC_{50}$  Werten  $>100 \mu M$  (Abbildung 49B). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem AADH-Markierungsverhalten der einzelnen Sondentypen (Abbildung 45). So konnte nur Sonde **32** AADH sowohl intensiv markieren als auch stark inhibieren, was bei den Sonden **33**, **34** und **35** nicht der Fall war.

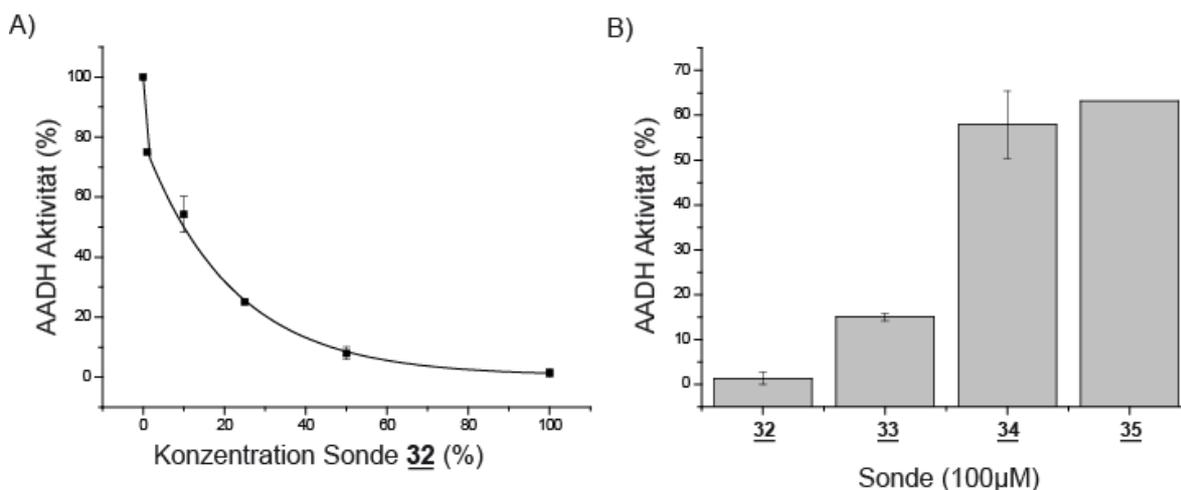


Abbildung 49: (A)  $IC_{50}$  Messung von AADH mit Sonde **32**. (B) Messung der AADH Aktivität bei Zugabe von  $100 \mu M$  (fc) Sonde.

Die gute Zellpermeabilität der Sonden sowie die Modifikation und Inhibition des aktiven Zentrums im Fall der AADH warfen die Frage auf, ob die dargestellten Sonden **32** bis **39** antibakteriell waren. Denn durch die Inhibition der Zielenzyme in essentiellen Biosynthesen (Tabelle 2) wäre ein antibakterieller Effekt der Sonden annehmbar. Um dies zu überprüfen, wurden Bakterien mit der Sonde **32**, **33**, **34**, **36** bzw. **37** inkubiert und deren Wachstum mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Jedoch wirkte kein Sondentyp bis zu einer finalen Konzentration von  $500 \mu M$  bei *S. aureus*, *Listeria welshimeri*, *Bacillus licheniformis* und *Pseudomonas putida* antibakteriell.

Da Acivicin ein irreversibler  $\gamma$ -GT Inhibitor ist, sollte getestet werden, ob dieses Enzym auch von dem Sondentyp **32**, welcher Acivicin strukturähnlich ist, *in vitro* markiert werden kann.

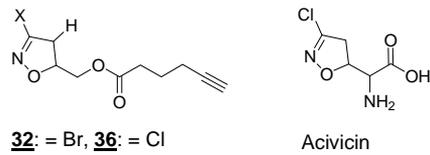


Abbildung 50: Strukturformel von Acivicin und Sondentyp **32** und **36**.

Hierfür wurde gereinigtes, rekombinantes  $\gamma$ -GT mit dem Sondentyp **32** inkubiert, mit Rhodaminazid in einer Click-Reaktion umgesetzt und nach SDS-PAGE eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt. Obwohl die beiden Verbindungen strukturähnlich sind, konnte keine Markierung gereinigter, rekombinanter  $\gamma$ -GT durch den Sondentyp **32** erzielt werden.

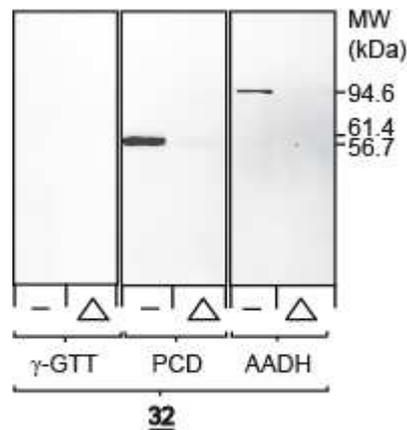


Abbildung 51: Markierung von  $\gamma$ -GT, PCDH und AADH durch die Sonde **32**. -: natives Protein,  $\triangle$ : Hitzekontrolle.

Dieses Resultat verdeutlicht, dass selbst geringe Strukturvariationen des Grundgerüsts von Acivicin und der Sonde **32** deren Zielpräferenzen deutlich verändern.

## 13 Projekt III - Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine kleine Bibliothek an 3-Chlor- und 3-Bromdihydroisoxazolen (**32** bis **39**) synthetisiert. Es gelang einige Regioisomere einiger Verbindungen durch Reinigung zu trennen. Entgegen der Literaturhaltung (siehe Kapitel 11) markierten Sonden dieses Grundgerüsts weder Amidotransferasen noch  $\gamma$ -GT. Stattdessen markierten die Sonden überwiegend Enzyme der Dehydrogenase Familie. Anhand der AADH konnte gezeigt werden, dass die Sonde **32** einen nukleophilen Cysteinrest des Enzyms markiert. Dies geschieht höchstwahrscheinlich über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Die Selektivität der Sonden **32** bis **39** gegenüber ihren Zielenzymen ist sehr hoch, da bereits geringe Strukturunterschiede, wie zum Beispiel Methyl- bzw. Ethylsubstitution, für das Markierungsverhalten ausschlaggebend sind. Diese strukturelle Feinabstimmung beim Markierungsverhalten konnte bereits bei  $\beta$ -Lactonsonden<sup>[35, 36, 69, 70]</sup> und  $\beta$ -Lactamsonden<sup>[37, 38]</sup> beobachtet werden. Obwohl die Sonden nicht antibiotisch wirkten, könnten sie zukünftig zur Identifizierung noch unbekannter Dehydrogenasen in anderen Organismen verwendet werden.

## 14 Zusammenfassung

In der Proteomik gibt es eine Vielzahl an etablierten Methoden, um Informationen über die molekulare, zelluläre und (patho)physiologische Funktion eines genom-codierten Proteins zu erhalten. Darunter hat sich das aktivitätsbasierende Protein Profiling (ABPP) besonders hervorgetan. Es ermöglicht aktivitätsbezogene Analysen von Proteinen in komplexen Proteomen aufgrund der funktionellen Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Proteinen. Im ABPP werden kleine reaktive Moleküle verwendet, die als sogenannte Sonden spezifisch in die aktiven Zentren aktiver Enzyme binden können. Durch anschließende Modifikation mit einem Fluoreszenzmarker wird so die Visualisierung von Enzymaktivitäten in komplexen Proteomen ermöglicht (Abbildung Z 1).

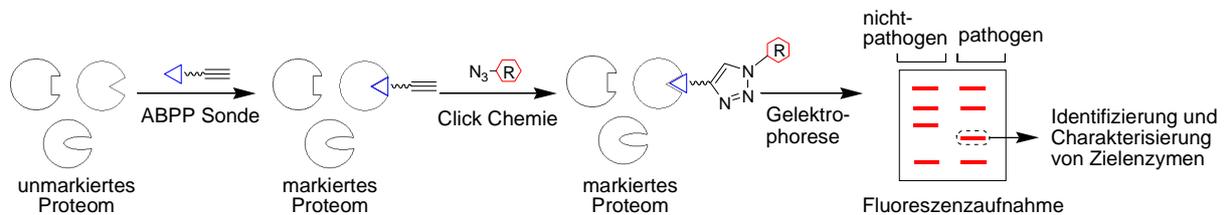


Abbildung Z 1: In dieser Arbeit angewendete Methodik des ABPP. R: Reportergruppe.

Durch ABPP konnten anhand vergleichender Analyse von Proteomen pathogener und nicht-pathogener Organismen, bereits Enzyme identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei Krebs-, bakteriellen Infektions- und Stoffwechselkrankheiten spielen.

Um die molekularen Grundlagen dieser Krankheiten zu verstehen, ist es notwendig deren pathogenassoziierte Proteine und Metabolite zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierfür hat sich die Massenspektrometrie als Schlüsseltechnologie erwiesen. Diese erfordert einen hohen Reinheitsgrad der zu untersuchenden Proben. Andernfalls ist eine zeitaufwendige Validierung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modellsystem entwickelt, das es ermöglicht, ausgewählte Metabolite gezielt für massenspektrometrische Analysen in hoher Reinheit effizient anzureichern (Abbildung Z 2). Hierfür wurden ausgesuchte Zielmetaboliten zunächst alkinmodifiziert und dann durch Cu(I)-katalysierte *Huisgen* [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie) an den Phenacyl Linker **1** gekoppelt. Dieser ermöglichte eine Anreicherung an Avidin Agarose Beads. Die Abspaltung des so angereicherten Zielmetabolits geschah unter

## Zusammenfassung

milden Bedingungen durch Fragmentierung des photolabilen Linkers nach Bestrahlung mit Licht.

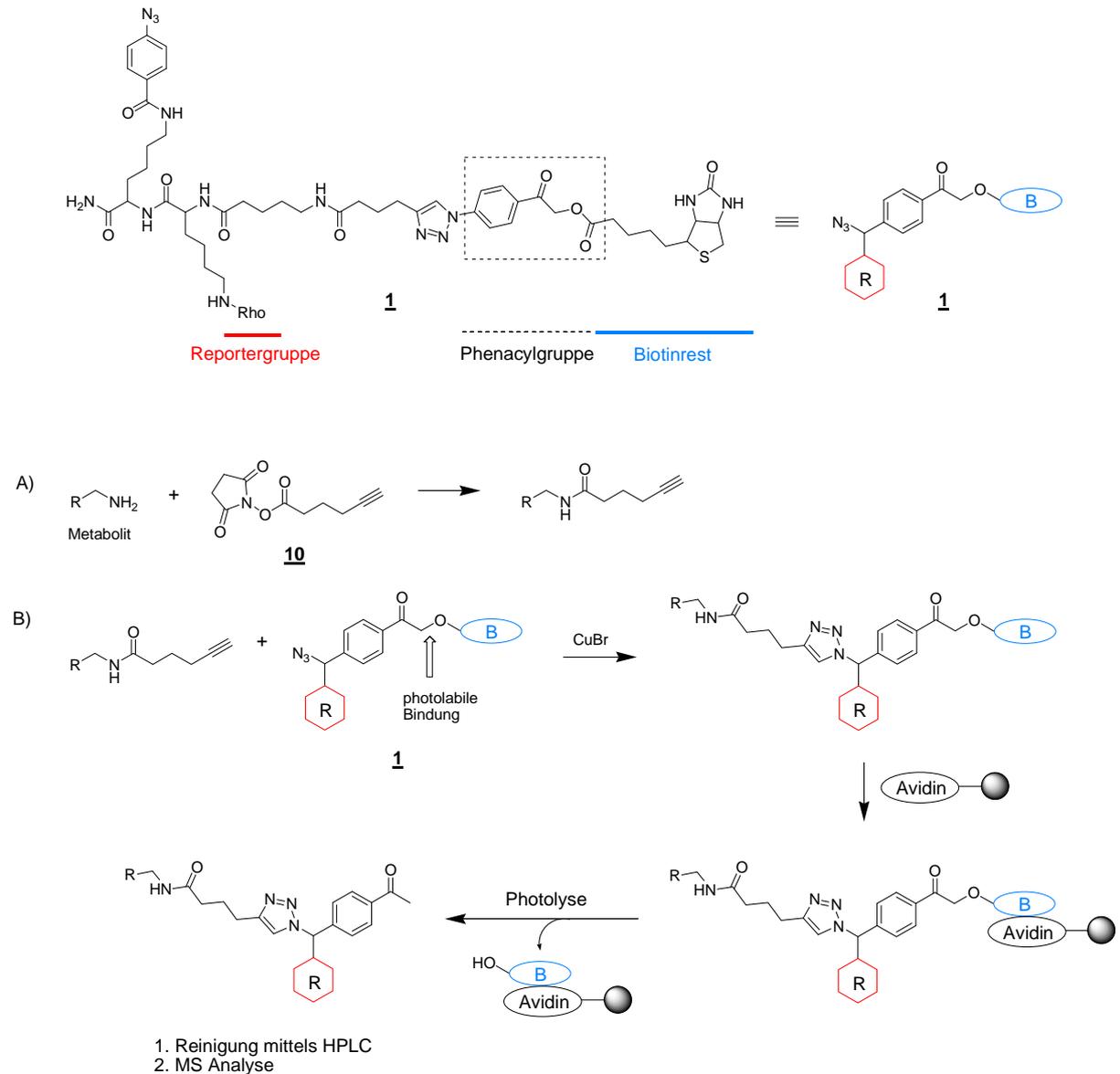


Abbildung Z 2: Schema der Reinigung von Metaboliten durch den Phenacyl Linker **1**. R: Reportergruppe, B: Biotinrest.

Vorteile dieses neuen Systems zur Metabolitanreicherung sind seine einfache Handhabung, schnelle Reaktionszeiten der einzelnen Schritte, milde Abspaltbedingungen und reduzierte Kontamination im Vergleich zur herkömmlichen Methode. Demnach könnte Phenacyl Linker **1** für ein automatisiertes Metabolit/Metabolom Screening verwendet werden.

Glycosidasen spielen eine entscheidende Funktion im Metabolismus diverser Organismen sowie bei der antibakteriellen Verteidigung und in Pathogenesevorgängen. Deshalb ist es wichtig, die Aktivität und Funktion von Glycosidasen durch proteomische Untersuchungsmethoden wie ABPP zu untersuchen. Denn die Ergebnisse solcher Untersuchungen könnten die Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Verfahren darstellen.

Gegenwärtig sind noch zu wenige aktivitätsbasierte Sonden etabliert, um umfassende Studien von Glycosidasen in komplexen Proteomen durchführen zu können. Deshalb wurden in dieser Arbeit die neuen zuckerbasierten ABPP-Sonden **13**, **14** und **15** etabliert (Abbildung Z 3). Ihr Markierungsverhalten wurde mit den drei rekombinanten Glycosidasen NagZ, YihQ und LacZ getestet.

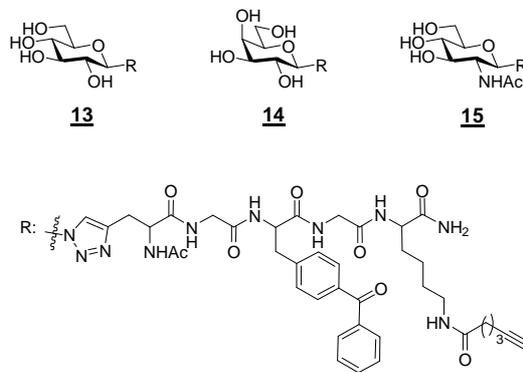
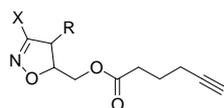


Abbildung Z 3: Strukturformeln der Sonden **13** bis **15**.

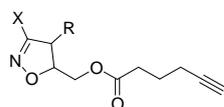
Dabei stellte sich heraus, dass die Sonde **15**, welche einen Glucosaminyrest trägt, eine deutliche Präferenz gegenüber der exo- $\beta$ -Glucosaminidase NagZ aufweist. Diese spielt eine entscheidende Rolle im Peptidoglykanrecycling Gram-negativer Bakterien sowie bei der Regulation der AmpC vermittelten  $\beta$ -Lactamresistenz. Überraschenderweise aktiviert die Sonde **15** NagZ durch Modifikation in einem bisher unbekanntem allosterischen Zentrum des Enzyms. Sonde **15** könnte zukünftig zur selektiven Markierung von  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidasen und zur Untersuchung von Glycosidaseabhängigen Signalwegen benutzt werden.

Ein Ziel der aktuellen bakteriellen Infektionsforschung ist es, neue therapeutische Ansätze im Kampf gegen multiresistente Bakterien zu finden. Hierfür müssen zunächst neue bioaktive Naturstoffe und ihre Angriffsziele identifiziert und charakterisiert werden.

Acivicin ist ein solcher Naturstoff mit Anti-Tumor Aktivität. Er besitzt einen elektrophilen 3-Chlor-dihydroisoxazolring. Da es gegenwärtig nur *in vitro* Studien über dessen Zielenzyme gibt, wurden in dieser Arbeit die neuen ABBP-Sonden **32** bis **39** mit dem 3-Halodihydroisoxazolring als neues Leitstrukturelement synthetisiert (Abbildung Z 4), um durch ABPP deren Zielproteine im Proteom lebender Bakterien aufzuklären.



**32**: X = -Br, R = -H    **36**: X = -Cl, R = -H



**33a**: X = -Br, R = -Me    **37a**: X = -Cl, R = -Me    **33b**: X = -Br, R = -Me    **37b**: X = -Cl, R = -Me

**34a**: X = -Br, R = -Et    **38a**: X = -Cl, R = -Et    **34b**: X = -Br, R = -Et    **38b**: X = -Cl, R = -Et

**35a**: X = -Br, R = -Ph    **39a**: X = -Cl, R = -Ph    **35b**: X = -Br, R = -Ph    **39b**: X = -Cl, R = -Ph

Abbildung Z 4: Strukturformeln der Sonden **32** bis **39**.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Sonden **32** bis **39** überwiegend Dehydrogenasen selektiv markieren. Dies galt sowohl für pathogene als auch nicht-pathogene Bakterien. Unter den markierten Dehydrogenasen befand sich auch eine bisher uncharakterisierte Aldehyd Alkohol Dehydrogenase. Durch Umsatz dieser Dehydrogenase mit der Sonde **32** konnte die Modifikationsweise des neuen Sondentyps bewiesen werden. Demnach wird der katalytische Cysteinrest 255 der Aldehyd Alkohol Dehydrogenase kovalent durch Umsatz von Sonde **32** modifiziert und die Enzymaktivität dadurch gehemmt. Obwohl die Sonden dieses neuen Leitstrukturtyps nicht antibiotisch wirkten, könnten sie zukünftig zur Identifizierung und Charakterisierung noch unbekannter Dehydrogenasen in anderen Organismen verwendet werden.

## 15 Summary

The research field of proteomics comprises many established methods to gather information about the molecular, cellular and (patho)physiological function of a genome-encoded protein. Amongst these, activity based protein profiling (ABPP) evolved to be of important significance. It enables the activity-based analysis of proteins in complex proteomes due to the functional discrimination between active and inactive proteins. ABPP uses small reactive molecules, so-called probes, which are able to bind specifically to active centres of active enzymes. Subsequent modification with a fluorescence tag enables the visualisation of enzyme activities in complex proteomes (Figure S 1).

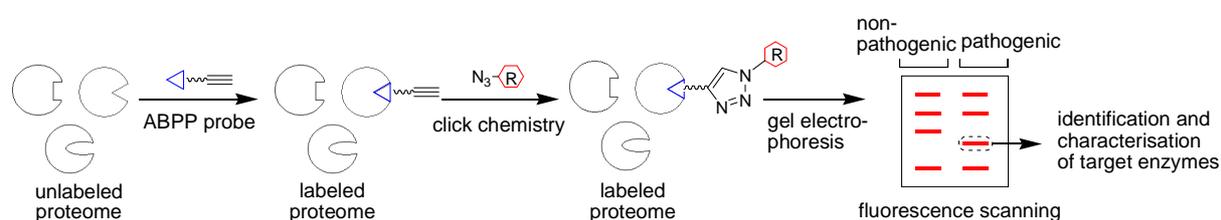


Figure S 1: Concept of ABPP as used in this study. R: reporter group.

By comparing proteomes of pathogenic and non-pathogenic organisms, the use of ABPP has revealed enzymes that play an important role in cancer, bacterial infections and metabolic diseases. In order to understand the molecular basics of all these diseases, it is necessary to identify and characterise pathogen-associated proteins and metabolites. For that purpose mass spectrometry turned out to be a key technology. It requires probes with a degree of high purity, in order to be able to avoid time-consuming validations of mass spectrometric results due to sample contamination.

In this work a new model system was developed, which enables the purification of selected metabolites with a degree of high purity and suitable for mass spectrometric analysis (Figure S 2). For that reason selected target metabolites were first modified with an alkyne and subsequently coupled to phenacyl linker **1** by Cu(I) catalysed *Huisgen* [3+2] azide-alkyne cycloaddition (click chemistry). This enabled their purification on avidin agarose beads. Cleavage of the purified target metabolite was performed under mild conditions by fragmentation of the photolabile linker after irradiation with light.

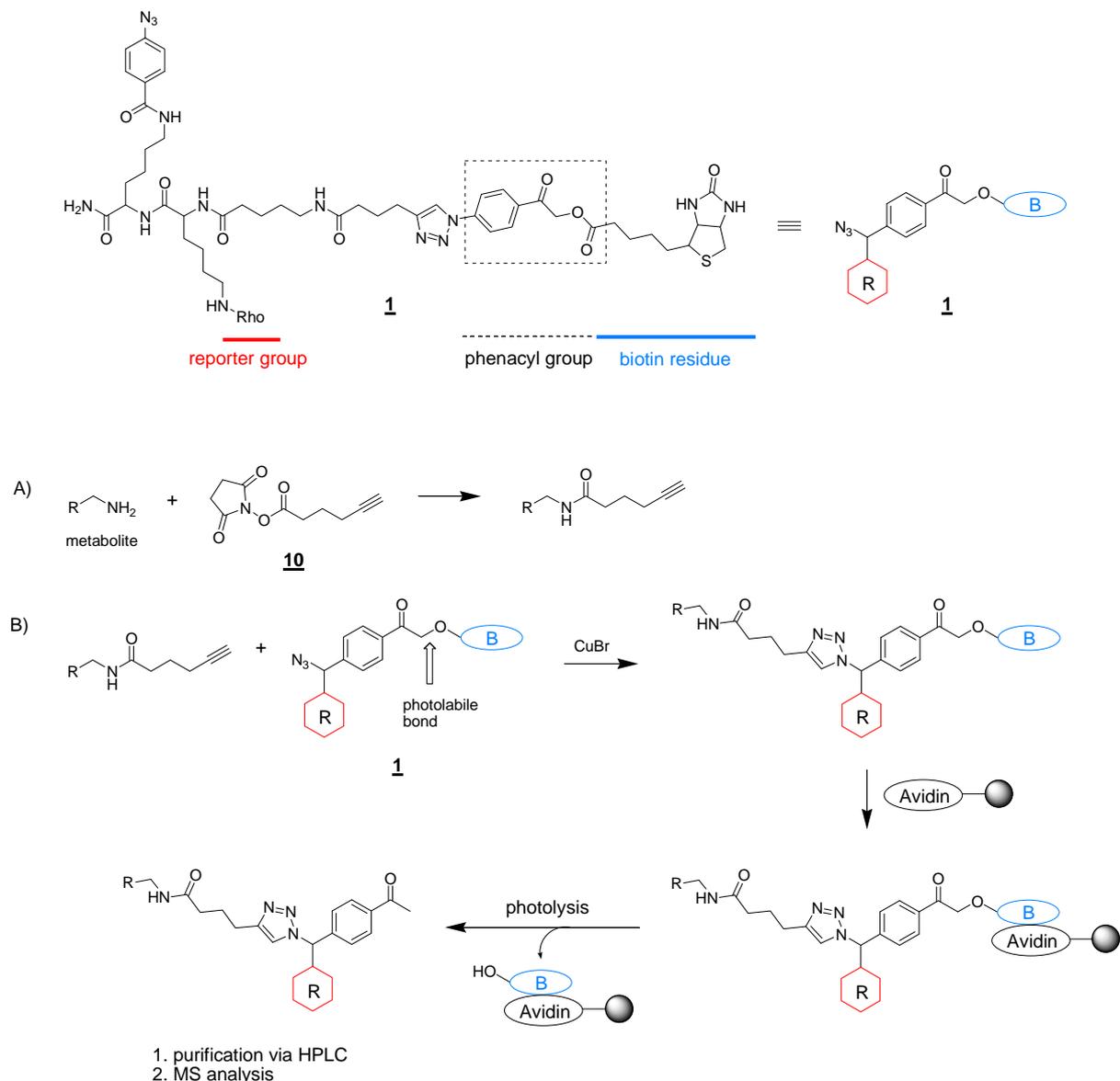


Figure S 2: Purification of metabolites via phenacyl linker **1**. R: reporter group, B: biotin residue.

Advantages of this new system for metabolite purification are its easy handling, fast reaction times of each reaction step, mild cleavage conditions and a reduced degree of contaminations in comparison to the conventional method. Therefore, phenacyl linker **1** could be used for automated metabolite/metabolome screening.

Glycosidases play a decisive role in the metabolism of diverse organisms, antibacterial defence and pathogenesis. Hence, it is important to analyze the activity and function of glycosidases by proteomic methods like ABPP. Obtained results may form the basis for the development of new therapeutic and diagnostic techniques. Currently, too few activity-based probes are established to be able to accomplish comprehensive studies on Glycosidases in

## Summary

complex proteomes. Therefore, new sugar-based ABPP probes **13**, **14** and **15** were synthesised in this work (Figure S 3). Their labeling properties were studied by using the recombinant glycosidases NagZ YihQ and LacZ.

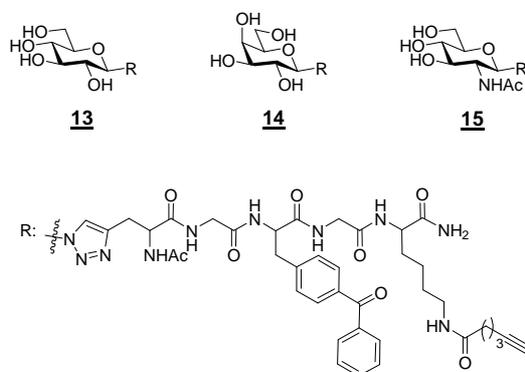


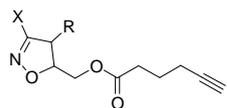
Figure S 3: Chemical structures of probes **13** to **15**.

Probe **15**, which carries a glucosaminyl residue, showed to label the exo- $\beta$ -glucosaminidase NagZ considerably. The latter plays an important role in peptidoglycan recycling of gram-negative bacteria and regulation of AmpC mediated resistance to  $\beta$ -lactams. Surprisingly, probe **15** activates NagZ by modifying its previously unknown allosteric center. In the future probe **15** could be used for the selective labeling of  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidases and for the examination of glycosidase-dependent signaling pathways.

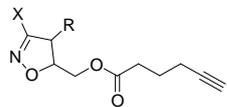
One aim of current research studies on bacterial infections is to develop new therapeutic approaches against multi-resistant bacteria. Hence, the biological active natural compounds and their targets are to be identified and characterised. Acivicin is such a natural compound with anti-tumor activity. It contains an electrophilic 3-chloro-dihydroisoxazole ring. Since Acivicin's target enzymes have only been studied *in vitro*, this work aimed to identify and characterize these targets in proteomes of living cells by developing the new ABPP probes **32** to **39**, which carry a 3-halo-dihydroisoxazole lead structure (Figure S 4). The current work demonstrated that probes **32** to **39** predominantly labeled dehydrogenases in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Amongst the labeled dehydrogenases, a previously uncharacterised, putative aldehyde alcohol dehydrogenase was identified. By labeling this dehydrogenase with **32**, the type of modification of this new probe was determined. According to this, the catalytic cysteine residue 255 of aldehyde alcohol dehydrogenase was modified by probe **32** and thereby inhibited its enzymatic activity.

## Summary

---



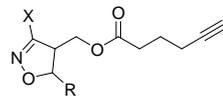
**32:** X = -Br, R = -H   **36:** X = -Cl, R = -H



**33a:** X = -Br, R = -Me   **37a:** X = -Cl, R = -Me

**34a:** X = -Br, R = -Et   **38a:** X = -Cl, R = -Et

**35a:** X = -Br, R = -Ph   **39a:** X = -Cl, R = -Ph



**33b:** X = -Br, R = -Me   **37b:** X = -Cl, R = -Me

**34b:** X = -Br, R = -Et   **38b:** X = -Cl, R = -Et

**35b:** X = -Br, R = -Ph   **39b:** X = -Cl, R = -Ph

Figure S 4: Chemical structures of probes **32** to **39**.

Although these probes turned out to be non-antibiotic, they could be further used for identification and characterisation of unknown dehydrogenases in other organisms.

---

## 16 Experimenteller Teil

### 16.1 Allgemeine Methoden

Alle in Reaktionen verwendeten, kommerziell erhältlichen Chemikalien waren vom Reinheitsgrad *puriss.* oder *p.a.* Sie wurden von Sigma Aldrich oder Novabiochem bezogen. Im Allgemeinen wurden nur absolutierte Lösungsmittel zur Synthese verwendet. Diese wurden im Vorfeld über Molekularsieb 4 Å getrocknet und unter Argonatmosphäre aufbewahrt.

Die zur Aufarbeitung und Reinigung verwendeten Lösungsmittel wurden im Vorfeld durch einfache Destillation gereinigt. Beim Experimentieren unter Schutzgas wurde immer Argon verwendet. Hierfür wurden im Vorfeld die Glasbehältnisse unter Hochvakuum dreimal bei 300 °C ausgeheizt und abwechselnd mit Argon geflutet.

Säulenchromatographie wurde als Standard mit Kieselgel der Korngrößenverteilung 0.035 bis 0.070 mm und der Porengröße 60 Å der Firma Acros Organics durchgeführt.

<sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Spektren wurden an einem Varian Mercury 200 (200 MHz), Varian NMR-System 300 (300 MHz), Varian NMR-System INOVA 400 (400 MHz), Varian Mercury 200 (200 MHz) oder NMR-System 600 (600 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und wurden in Relation zum jeweiligen deuterierten Lösungsmittelsignal bestimmt und beziehen sich auf Trimethylsilan (0 ppm). Die Multiplizitäten der Signale sind als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multipllett) oder deren Kombination angegeben.

Massenspektren über GC-MS wurden mit einem Varian 3400 Gaschromatographen gekoppelt mit einem Finnigan MAT 95 Massenspektrometer in EI Modus (70 eV, 250 °C Quelle) aufgenommen. Die Gaschromatographie erfolgte mit einer 25 m CS Supreme-5 Kapillartrennsäule (Innendurchmesser 0.25 mm, Filmdicke 0.25  $\mu$ m, Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) und Helium als Trägergas. Die Flussrate betrug 1.5 ml/min. Der Gradient startete bei 50 °C (1 min isotherm) und wurde auf 300 °C (4 min isotherm) mit einer Rate von 25 °C/min hochgeheizt. Für DEI Messungen wurden die Proben durch Direktverdampfung von einem Platinfaden mit einem Temperaturgradienten von 20 °C auf 1600 °C mit 120 °C/min in die Gasphase überführt und mittels EI ionisiert. ESI Spektren wurden an einem Thermo Finnigan LTQ FT mit einer Spaykapillarspannung von 4 kV aufgenommen. Für HPLC Analysen wurde ein Waters 2695 Separationsmodul mit einem Waters 2996 PDA Detektor verwendet. Für analytische Trennungen wurde eine X-Bridge<sup>TM</sup>

BEH130 C18 5  $\mu\text{m}$  (4.6 $\times$ 100 mm) Säule verwendet. Für präparative Trennungen wurde eine X-Bridge<sup>TM</sup> BEH130 C18 5  $\mu\text{m}$  (10 $\times$ 150 mm) Säule verwendet. Die Proteinanalytik unter Verwendung einer LTQ Orbitrap XL der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

Die Dünnschichtchromatogramme wurden mittels Aluminiumfertigfolien der Firma VWR erhalten. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm oder 366 nm und durch nachfolgendes Eintauchen in Reagenzlösung und Erhitzen im Heißluftstrom. Zum Anfärben wurde entweder 10% (m/v) Molybdätophosphorsäure in Ethanol oder 1.45% (m/v) Ninhydrin in *n*-Butanol/Essigsäure (33.33/1) oder 3.53% (m/v) 2,4-DNPH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz./H<sub>2</sub>O/Ethanol (1/1.33/3.33) als Färbereagenz verwendet. Angaben zur Laufmittelzusammensetzung sind als Volumenverhältnisse angegeben.

## 16.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasenpeptidsynthese

### 16.2.1 Kaisertest

Alle Reagenzien für diesen Test waren von höchster Qualität von Merck, Deutschland erworben.

#### Reagenz A:

Lösung 1: 1 ml 1mM KCN in 50 ml Pyridin (p. a.)

Lösung 2: 20 g Phenol (p.a.) in 5 ml Ethanol

Die 1:1 (v/v) Mischung der Lösung 1 und Lösung 2 ist Reagenz A.

#### Reagenz B:

2.5 g Ninhydrin in 50 ml abs. Ethanol

Eine geringe Menge Harz wurde in ein Glühröhrchen oder in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit zwei Tropfen des Reagenz A und einem Tropfen des Reagenz B versetzt. Als Negativkontrolle diente ein harzfreier Ansatz. Beide Ansätze wurden 5 min bei 100 °C

inkubiert. Das Vorhandensein freier Aminogruppen am Harz bewirkt eine Verfärbung des Testansatzes.

### 16.2.2 Fmoc-Entschützung

Zur Entschützung eines Fmoc-geschützten Aminosäurerestes wurde 20% (v/v) Piperidin/DMF verwendet. Die Entschützungslösung wurde nach fünfminütiger Reaktionszeit durch eine neue Lösung ersetzt. Nach weiteren 15 min Reaktionszeit wurde das Harz mit DMF (4×) und DCM (3×) gewaschen. Der Erfolg der Entschützung wurde mittels Kaisertest (siehe Kapitel 16.2.1) überprüft.

### 16.2.3 Kopplung von Aminosäuren und anderen Verbindungen

Alle Peptide wurden mittels Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Strategie synthetisiert. Hierfür wurden ausschließlich L-Aminosäuren verwendet. Bei der TBTU/HOBt vermittelten Kopplung wurde wie folgt vorgegangen: 4 eq der geschützten Aminosäure wurde mit 3.9 eq TBTU, 4 eq HOBt und 13 eq DIPEA in einem minimalen Lösungsmittelvolumen vereint. Nach fünfminütigem Schütteln bei RT wurde der Aktivierungsmix ( $\text{pH} \geq 9$ ) mit dem Harz versetzt. Es muss sichergestellt sein, dass die Suspension nicht zu viskos ist. Andernfalls wurde noch Lösungsmittel hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mindestens 2 Stunden geschüttelt. Vor Überprüfung der Kopplung mittels Kaisertest (siehe Kapitel 16.2.1), wurde das Harz mit DMF(3×) und DCM (2×) gewaschen. Im Fall eines positiven Ergebnisses wurde die Kopplung wiederholt.

Bei der Kopplung sterisch raumerfüllender Verbindungen wurde die PyBOP vermittelte Kopplung durchgeführt: Hierfür wurden 3 eq DIPEA sowie eine Mischung aus 3 eq geschütztem Baustein und 3 eq PyBOP gertennt in einem minimalen Lösungsmittelvolumen gelöst. Das Harz wurde zuerst mit der Verbindung/PyBOP-Lösung und unmittelbar danach mit der DIPEA-Lösung versetzt. Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurden erneut je 2 eq PyBOP und DIPEA hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 16 Stunden geschüttelt. Vor Überprüfung der Kopplung mittels Kaisertest (siehe Kapitel 16.2.1) wurde das Harz mit DMF

(3×) und DCM (2×) gewaschen. Im Fall eines positiven Kaisertests wurde zur zweiten Kopplung nur 1.5 eq der Verbindung verwendet.

#### 16.2.4 Kopplung der ersten Aminosäure an einen Linker

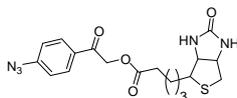
Die Kopplung der ersten Aminosäure an einen Rink-Linker geschah analog zu 16.2.3. Fiel nach zweimaliger Kopplung der Kaisertest positiv aus, so wurde ein Capping durchgeführt: Hierfür wurde das Harz zusammen mit Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (3/1/16) für 45 min bei RT geschüttelt. Die Capping-Reaktion wurde nach Waschen des Harzes mit DMF (2×) und DCM (3×) mit Hilfe des Kaisertests (siehe Kapitel 16.2.1) überprüft.

#### 16.2.5 Abspaltung und Etherfällung der synthetischen Peptide

Das trockene Harz wurde mit einem ausreichenden Volumen an Abspatlösung (40 ml pro g Harz) versetzt. Alle Peptide wurden mit TFA/H<sub>2</sub>O (19/1) abgespalten. Die Abspaltreaktion wurde 2 Stunden bei RT geschüttelt. Nach Zugabe von kaltem Et<sub>2</sub>O (10-faches Volumen der Abspatlösung) wurde der Ansatz 45 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 14000 g) wurde das Pellet mit Et<sub>2</sub>O (2×) gewaschen. Der Rückstand trocknete bei RT. Nach Lösen des Rückstandes in einer CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O Mischung konnte die Reinigung durch RP-HPLC erfolgen.

### 16.3 Synthesen

#### 16.3.1 Synthese des 4'-Azido-2-biotinoylacetophenon 2



Zu einer Lösung von 4'-Azido-2-bromacetophenon (500 mg, 2.08 mmol, 1.2 eq.) und Biotin (422.5 mg, 1.74 mmol, 1.0 eq.) in 2.6 ml absolutem DMSO wurde frisch gemörseretes K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

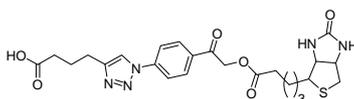
(312 mg, 2.26 mmol, 1.3 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden bei 40 °C unter Argon gerührt. Der Phenacylester (424.3 mg, 60%) wurde durch Säulenchromatographie mit TCM/MeOH (4/1) gereinigt. Man erhielt ihn als gelben Feststoff.

MALDI-MS  $m/z$  berechnet für  $C_{18}H_{21}N_5O_4S$  (M+H)<sup>+</sup>: 404.13, gefunden: 404.27 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (7/1), 600 MHz): δ = 7.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 7.07 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 5.31 (d,  $J$  = 16.4 Hz, 1 H), 5.24 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 1H), 4.50-4.46 (m, 1 H), 4.33-4.28 (m, 1 H), 3.16-3.11 (m, 1 H), 2.91-2.86 (m,  $J$  = 4.8 Hz, 1 H), 2.69 (d,  $J$  = 12.7 Hz, 1H), 2.52-2.41 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 3H), 1.67-1.60 (m, 1H), 1.55-1.44 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (7/1), 150 MHz): δ 191.1 (C), 173.1 (C), 163.9 (C), 145.9 (C), 130.4 (C), 129.7 (CH), 119.2 (CH), 65.7 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH), 60.1 (CH), 55.2 (CH), 40.43 (CH<sub>2</sub>), 40.35 (CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>).

### 16.3.2 Synthese des Triazols **3**



Zu einer Lösung von Phenacylester (424.3 mg, 1.05 mmol, 1.0 eq.) und Hexinsäure (127.29 µl, 1.27 mmol, 1.2 eq.) in 9.1 ml absolutem DMSO wurde 1 Mol-% Cu(II)SO<sub>4</sub> (2.62 mg gelöst in 1 ml H<sub>2</sub>O) und 10 Mol-% frisch angesetztes Natriumascorbat (20.80 mg gelöst in 105.2 µl H<sub>2</sub>O) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden bei RT unter Argon gerührt. Das Triazol (320 mg, 59%) wurde durch Säulenchromatographie mit TCM/MeOH (4/1) gereinigt.

MS (ESI)  $m/z$  berechnet für  $C_{24}H_{29}N_5O_6S$  (M-H)<sup>-</sup>: 514.174, gefunden: 514.176 (M-H)<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 12.04 (s, 1H), 8.73(s, 1H), 8.13 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 8.06 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6.36 (d,  $J$  = 29.2, 2H), 5.48 (s, 2H), 4.30-4.25 (m, 1H), 4.14-4.09 (m, 1H),

3.11-3.05 (m, 1H), 2.72 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.42 (t,  $J = 7.4$ , 2H), 2.30 (t,  $J = 7.2$ , 2H), 1.92-1.84 (m, 2H), 1.65-1.55 (m, 4H), 1.51-1.32 (m, 4H).

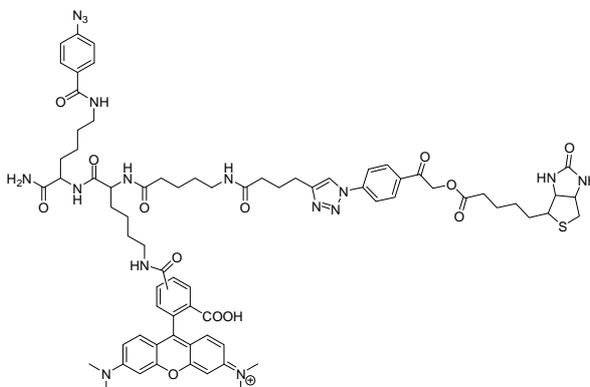
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 100 MHz):  $\delta$  192.4 (C), 174.6 (C), 172.8 (C), 163.1 (C), 148.4 (CH), 140.6 (C), 133.6 (CH), 130.2 (CH), 120.8 (CH), 120.0 (CH), 66.8 (CH<sub>2</sub>), 61.4 (CH), 59.6 (CH), 55.7 (CH), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (CH<sub>2</sub>), 24.9 (CH<sub>2</sub>), 24.8 (CH<sub>2</sub>), 24.5 (CH<sub>2</sub>).

### 16.3.3 Synthese von Fmoc-5-Ava-Lys(Mtt)-Lys(*p*-Azidobenzoyl)-(Rink Amid)-MBHA Harz 4

Fmoc-Rink Amid MBHA Harz (50mg, 36  $\mu\text{mol}$ ,  $B_{\text{H}} = 0.72$  mmol/g) wurde mit DMF (2 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Fmoc-Entschützung (16.2.2) geschah durch Schütteln des Harzes in 20% (v/v) Piperidin/DMF für 20 min bei RT. Entschütztes Harz wurde mit DMF (3 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Fmoc-Lys(Mtt)-OH wurde unter Verwendung von TBTU/HOBt gemäß SPPS-Standardprotokoll (siehe Kapitel 16.2.3) ans Harz gekoppelt. Das gewünschte festphasengebundene Peptid wurde mit Hilfe von SPPS-Standardprotokollen durch sich wiederholende Abfolgen von Kopplungs-, Wasch- und Entschützungsschritten aufgebaut. Hierfür wurden folgende *N*-geschützte Bausteine verwendet: *p*-Azidobenzoesäure, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-5-Amino-valeriansäure. Jeder Kopplungsschritt wurde mittels Kaisertest (siehe Kapitel 16.2.1) überprüft. Die gewünschte Peptidsequenz wurde durch ESI-MS bestätigt. Hierfür wurde eine geringe Menge an Fmoc-geschütztem Peptid vom Harz durch Versetzen mit TFA (siehe Kapitel 16.2.5) abgespalten.

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_6 (\text{M}+\text{H})^+$ : 740.388, gefunden: 740.388 (M+H)<sup>+</sup>.

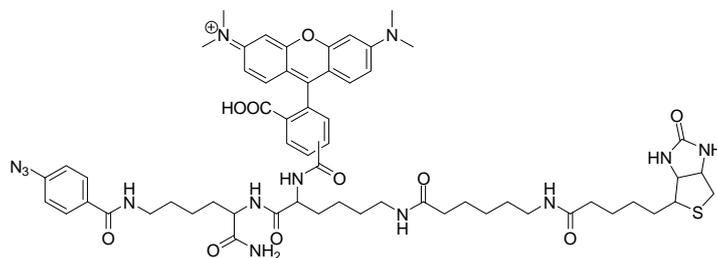
### 16.3.4 Synthese des Phenacyl Linkers **1**-Kopplung ans festphasengebundene Peptid **4**, Reinigung und TAMRA Kopplung



Eine Lösung von Triazol (11.1 mg, 21.6  $\mu\text{mol}$ ), TBTU (6.7 mg, 20.88  $\mu\text{mol}$ ), HOBt (2.9 mg, 21.6  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (12.2  $\mu\text{l}$ , 70.2  $\mu\text{mol}$ ) in DMF wurde für 10 min bei RT geschüttelt, bevor sie mit dem entschützten, festphasengebundenen Peptid (**4**) (10 mg, 5.3  $\mu\text{mol}$ ,  $B_H = 0.53$  mmol/g) versetzt wurde. Die Suspension wurde für 16 Stunden bei RT geschüttelt. Diese Kopplungsprozedur wurde dreimal wiederholt. Der Kaisertest fiel negativ aus. Nach Waschen mit DMF (3 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) wurde das Harz mit 100  $\mu\text{l}$  TFA/H<sub>2</sub>O (95/5) für 2 Stunden bei RT versetzt. Eiskalter Et<sub>2</sub>O (1ml) wurde hinzugegeben und die Suspension wurde für 45 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 17000 g) wurde das Pellet mit Et<sub>2</sub>O (2 $\times$ ) gewaschen und trocknete für 1 Stunde bei RT. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  absolutem DMF gelöst. DIPEA (3.8  $\mu\text{l}$ , 21.6  $\mu\text{mol}$ ) und eine Mischung aus (5)- und (6)-Carboxy-TAMRA-NHS Isomeren (3.80 mg, 7.2  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5 $\mu\text{m}$  (10 $\times$ 150 mm), linearer Gradient: 0 bis 100% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA in 60 min) getrennt. Man erhielt den Phenacyl Linker als violettes Pulver (1.4 mg, 18.52%). Es war möglich die beiden Isomere zu trennen. Alle Experimente wurden mit nur einem Isomer ( $t_R = 25.4$ min (42.1% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)) durchgeführt.

ESI-MS  $m/z$  berechnet für C<sub>73</sub>H<sub>87</sub>N<sub>16</sub>O<sub>13</sub>S (M)<sup>+</sup>: 1427.635, gefunden: 1427.632 (M)<sup>+</sup>.

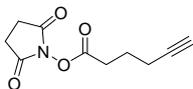
### 16.3.5 Synthese des trifunktionalen Linkers **7**



Fmoc-Rink Amid MBHA Harz (138.80 mg, 100.00  $\mu\text{mol}$ ,  $B_H = 0.72$  mmol/g) wurde mit DMF (2 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Fmoc-Entschützung (siehe Kapitel 16.2.2) geschah durch Schütteln des Harzes in 20% (v/v) Piperidin/DMF für 20 min bei RT. Entschütztes Harz wurde mit DMF (3 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Fmoc-Lys(Mtt)-OH wurde unter Verwendung von TBTU/HOBt gemäß SPPS-Standardprotokoll (16.2.3) ans Harz gekoppelt. Der Kaisertest war negativ (16.2.1). Mtt-Entschützung geschah durch Waschen des Harzes mit 2% (v/v) TFA/DCM (11 $\times$ 1 ml für je 2 min) und DCM (3 $\times$ ). Das gewünschte festphasengebundene Peptid wurde mit Hilfe von SPPS-Standardprotokollen durch sich wiederholende Abfolgen von Kopplungs-, Wasch- und Entschützungsschritten aufgebaut. Hierfür wurden folgende *N*-geschützte Bausteine verwendet: *p*-Azidobenzoesäure, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-Lys(biotinyl- $\epsilon$ -aminocaproyl)-OH. Jeder Kopplungsschritt wurde mittels Kaisertest (16.2.1) überprüft. Die gewünschte Peptidabfolge wurde durch ESI-MS bestätigt. Hierfür wurde ein geringe Menge an Fmoc-entschütztem Peptid vom Harz durch Versetzen mit TFA (16.2.5) abgespalten. (ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{S}$  ( $M+H$ ) $^+$ : 758.412, gefunden: 758.414 ( $M+H$ ) $^+$ ). Nach Fmoc-Entschützung (16.2.2) wurde das Peptid mit TFA vom Harz abgespalten (16.2.5). Man erhielt 16.8 mg Rohpeptid. Dieses wurde in absolutem DMF (900  $\mu\text{l}$ ) gelöst. DIPEA (11.6  $\mu\text{l}$ , 66.74  $\mu\text{mol}$ ) und eine Mischung aus (5)- und (6)-Carboxy-TAMRA-NHS Isomeren (11.2 mg, 21.22) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (Säule: XBridge<sup>TM</sup> BEH130 C18 5 $\mu\text{m}$  (10 $\times$ 150 mm), linearer Gradient: 0 bis 100%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  mit 0.1% TFA in 60 min) getrennt. Man erhielt den trifunktionalen Linker **7** als violettes Pulver (25.1 mg, 21.44  $\mu\text{mol}$ , 21.4% Gesamtausbeute).

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{N}_{13}\text{O}_{10}^{32}\text{S}_1$  ( $M+H$ ) $^+$ : 1170.55, gefunden: 1170.55 ( $M+H$ ) $^+$

### 16.3.6 Synthese von NHS-Hexinoat 10



NHS (95.2 mg, 0.83 mmol) und TEA (115  $\mu$ l, 0.83 mmol) wurden in 1 ml DMF/TCM (1/9) gelöst, bevor Hexynoylchlorid (91  $\mu$ l, 0.91 mmol) hinzugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Nach Zugabe von DCM (10 ml) wurde die Lösung mit 5% (m/v) NaHCO<sub>3</sub> (1 $\times$ ) and H<sub>2</sub>O (2 $\times$ ) extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. NHS-Hexinoat (91.4 mg, 53%) wurde durch Säulenchromatographie mit EtOAc/DCM (3/7) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.75 (EtOAc/DCM (3/7)).

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>: 227.103, gefunden: 227.102 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 2.83 (s, 4H), 2.77 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.34 (dt, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.00 (t, *J* = 2.6, 1H), 1.96 (m, 2H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 169.0 (C), 169.0 (C), 168.1 (C), 82.3 (C), 71.3 (CH), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>), 17.7 (CH<sub>2</sub>).

### 16.3.7 Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranose 16



Glucose (10.0 g, 55.51 mmol) wurde in 12.5 ml Pyridin/Essigsäureanhydrid (3/2) bei 4 °C gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf ihr halbes Volumen eingeeengt und mit Toluol codestilliert, um Essigsäure abzuscheiden. Nach Zugabe von DCM (10 ml), wurde die organische Phase mit Wasser (15 ml), 1 M HCl/H<sub>2</sub>O (15 ml) und Wasser (15 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde

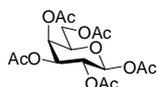
über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Man erhielt das Produkt (14.1 g, 36.12 mmol, 65.1%) als bernsteinfarbenes Öl.

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: 413.105, gefunden: 413.105 (M+Na)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.33 (d, J<sub>1,2</sub> = 3.69 Hz, 1H, H-1, Glc), 5.40 (dd, J<sub>2,3</sub> = 10.29 Hz, J<sub>3,4</sub> = 9.94 Hz, 1H, H-3, Glc), 5.13 (dd, J<sub>3,4</sub> = 9.81 Hz, J<sub>4,5</sub> = 9.81 Hz, 1H, H-4, Glc), 5.10 (dd, J<sub>1,2</sub> = 3.71 Hz, J<sub>2,3</sub> = 10.29 Hz, 1H, H-2, Glc), 4.27 (dd, J<sub>5,6a</sub> = 12.39 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 3.98 Hz, 1H, H-6a, Glc), 4.13-4.10 (m, 2H, H-5, H-6b, Glc), 2.17, 2.09, 2.03, 2.02, 2.01 (s, 15H, OAc).

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.59, 170.19, 169.61, 169.35, 168.71 (OCOCH<sub>3</sub>), 89.04 (C-1, Glc), 69.80 (C-3, Glc), 69.79 (C-5, Glc), 69.16 (C-2, Glc), 67.86 (C-4, Glc), 61.42 (C-6, Glc), 20.86, 20.68, 20.64, 20.55, 20.43 (OCOCH<sub>3</sub>).

### 16.3.8 Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-β-D-galactopyranose **18**



Galactose (1.0 g, 5.55 mmol) wurde in 12.5 ml Pyridin/Essigsäureanhydrid (3/2) bei 4 °C gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf ihr halbes Volumen eingengt und mit Toluol codestilliert, um Essigsäure abzuscheiden. Nach Zugabe von DCM (10 ml), wurde die organische Phase mit Wasser (15 ml), 1 M HCl/H<sub>2</sub>O (15 ml) und Wasser (15 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Man erhielt das Produkt (969.2 mg, 2.48 mol, 44.7%) als bernsteinfarbenes Öl.

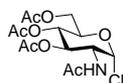
ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: 413.105, gefunden: 413.105 (M+Na)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6.33 (dd, J<sub>1,2</sub> = 1.82 Hz, J<sub>1,5</sub> = 1.22 Hz, 1H, H-1, Gal), 5.46 (dd, J<sub>2,3</sub> = 1.16 Hz, J<sub>3,4</sub> = 2.52 Hz, 1H, H-3, Gal), 5.30-5.29 (m, 2H, H-4, H-2, Gal), 4.34 –

4.29 (m, 1H, H-6a, Gal) , 4.08-4.04 (m, 2H, H-5, H-6b, Gal), 2.12, 2.12, 2.00, 1.98, 1.96 (s, 15H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.30, 170.09, 170.07, 169.82, 168.88 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 89.63 (C-1, Gal), 69.69 (C-3, Gal), 67.35 (C-5, Gal), 67.29 (C-2, Gal), 66.37 (C-4, Gal), 61.19 (C-6, Gal), 20.84, 20.62, 20.60, 20.56, 20.50 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

### 16.3.9 Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-chlorid 20



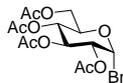
2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (1.0 g, 4.52 mmol) wurde in Acetylchlorid (4 ml) bei 4 °C unter Argon suspendiert und für 16 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 8 ml Chloroform wurde die Lösung mit Eiswasser extrahiert bis der pH Wert der wässrigen Phase neutral war. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingengt. Das Chlorid (1.48 g, 4.05 mmol, 89.6%) erhielt man als farblosen Feststoff.

$R_f$  = 0.46 (DCM/MeOH (30/1)).

HRMS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClO}_8$  ( $\text{M}$ ) $^+$ : 365.088 gefunden: 365.120 ( $\text{M}$ ) $^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6.17 (dd,  $J_{1,2}$  = 3.17 Hz,  $J_{1,5}$  = 8.15 Hz, 1H, H-1, GlcNac), 5.31 (dd,  $J_{2,3}$  = 9.49 Hz,  $J_{3,4}$  = 10.62 Hz, 1H, H-3, GlcNac), 5.20 (dd,  $J_{3,4}$  = 11.40 Hz,  $J_{4,5}$  = 8.13, Hz, 1H, H-4, GlcNac), 4.55 – 4.49 (m, 1H, H-2, GlcNac), 4.29 – 4.21 (m, 2H, H-6a, H-6b, GlcNac), 4.14 – 4.09 (m, 1H, H-5, GlcNac), 2.09, 2.04, 2.04, 1.97 (s, 12H, OAc).

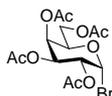
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.46 (C=O, NHAc), 170.56, 170.08, 169.11 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 93.59 (C-1, GlcNac), 70.85 (C-3, GlcNac), 70.08 (C-4, GlcNac), 66.88 (C-2, GlcNac), 61.10 (C-6, GlcNac), 53.45 (C-5, GlcNac), 23.08, 20.68, 20.68, 20.54 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

**16.3.10 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-bromid 17**

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (0.4 g, 1.025 mmol) wurde vorsichtig zu einer Lösung von 33% (v/v) HBr/Eisessig (5.7 ml) bei 0 °C gegeben. Die Lösung wurde eine Stunde bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Eiswasser (3×35 ml) extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Das Bromid 5 (472.4 mg, 1.025 mmol, 100%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (10/1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.86 (DCM/MeOH (10/1)).

Allerdings war dieses Produkt instabil. Deshalb war es nicht möglich, es ausreichend zu charakterisieren. Es wurde umgehend für weitere Synthesen eingesetzt.

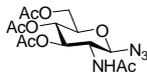
**16.3.11 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-bromid 19**

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranose (0.3 g, 768.56  $\mu$ mol) wurde vorsichtig zu einer Lösung von 33% (v/v) HBr/Eisessig (5.7 ml) bei 0 °C gegeben. Die Lösung wurde eine Stunde bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Eiswasser (3×35 ml) extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Das Bromid 9 (322.6 mg, 768.3  $\mu$ mol, 99.9%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (10/1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.86 (DCM/MeOH (10/1)).

Allerdings war dieses Produkt instabil. Deshalb war es nicht möglich, es ausreichend zu charakterisieren. Es wurde umgehend für weitere Synthesen eingesetzt.

### 16.3.12 Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-azid 23



2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-chlorid (1.48 g, 4.05 mmol, 1.0 eq.) wurde gelöst in 13.8 ml Chloroform und versetzt mit einer Lösung von  $\text{NaN}_3$  (0.372 g, 5.71 mmol, 1.39eq.) in Wasser (3.72 ml). Aliquat 336 (82.8  $\mu\text{l}$ , 0.17 mmol, 0.04 eq.) wurde hinzugegeben. Die Mischung wurde für 16 Stunden bei RT heftig gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 $\times$ 30 ml) extrahiert, getrocknet mit  $\text{MgSO}_4$  und eingengt. Das Azid 14 (0.744 g, 2.00 mmol, 49.4%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (30/1) gereinigt.

$R_f = 0.33$  (DCM/MeOH (30/1)).

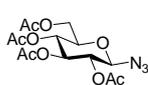
ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_8^+$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 373.128, gefunden: 373.136 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_{10}^-$  ( $\text{M}+\text{HCOO}$ ) $^-$ : 417.127, gefunden: 417.126 ( $\text{M}+\text{HCOO}$ ) $^-$ .

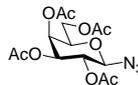
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.24$  (dd,  $J_{2,3} = 10.45$  Hz,  $J_{3,4} = 9.49$  Hz, 1H, H-3, GlcNAc), 5.09 (dd,  $J_{3,4} = 10.2$  Hz,  $J_{4,5} = 9.38$  Hz, 1H, H-4, GlcNAc), 4.76 (d,  $J_{1,2} = 9.28$  Hz, 1H, H-1, GlcNAc), 4.25 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.45$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.81$  Hz, 1H, H-6a, GlcNAc), 4.16 (dd,  $J_{5,6b} = 2.32$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.44$  Hz, 1H, H-6b, GlcNAc), 3.92 (ddd,  $J_{1,2} = 9.09$  Hz,  $J_{1,\text{NHAc}} = 9.09$  Hz,  $J_{2,3} = 10.45$  Hz, 1H, H-2, GlcNAc), 3.78 (ddd,  $J_{5,6b} = 2.26$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.75$  Hz,  $J_{4,5} = 9.98$  Hz, 1H, H-5, GlcNAc), 2.09, 2.03, 2.02, 1.97 (s, 12H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.99$  (C=O, NHAc), 170.67, 170.36, 169.25 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 88.40 (C-1, GlcNAc), 73.96 (C-5, GlcNAc), 72.08 (C-3, GlcNAc), 67.93 (C-4, GlcNAc), 61.79 (C-6, GlcNAc), 54.15 (C-2, GlcNAc), 23.26 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 20.72, 20.63, 20.58 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

**16.3.13** **Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-azid 21 und  
Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-1-azid 22**



**21**



**22**

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl-1-bromid **17** oder 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosyl-1-bromid **19** (je Edukt: 443.0 mg, 1.08 mmol, 1.0 eq.) und Natriumazid (109.86 mg, 1.69 mmol, 1.6 eq.) wurden in absolutem DMF (4 ml) gelöst und 18 Stunden bei 130 °C unter Rühren erhitzt. Das Natriumazid löste sich dabei nicht sofort. Zur abgekühlten Lösung wurde Chloroform (4 ml) hinzugegeben und diese Mischung filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser (10 ml) extrahiert, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zum Sirup eingengt. Die Azide **21** und **22** (**21**: 116.7 mg, 312  $\mu$ mol, 29.0%, **22**: 118.3 mg, 316  $\mu$ mol, 29.4%) wurden durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (30/1) gereinigt.

Verbindung **21**:

R<sub>f</sub> = 0.22 (DCM/MeOH (30/1)).

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>: 391.146, gefunden: 391.146 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.21 (dd,  $J_{2,3}$  = 9.48 Hz,  $J_{3,4}$  = 9.48 Hz, 1H, H-3, Glc), 5.09 (dd,  $J_{3,4}$  = 10.0 Hz,  $J_{4,5}$  = 9.47 Hz, 1H, H-4, Glc), 4.95 (dd,  $J_{1,2}$  = 8.86 Hz,  $J_{2,3}$  = 9.54 Hz, 1H, H-2, Glc), 4.65 (d,  $J_{1,2}$  = 8.86 Hz, 1H, H-1, Glc), 4.28 (dd,  $J_{5,6a}$  = 4.70 Hz,  $J_{6a,6b}$  = 12.49 Hz, 1H, H-6a, Glc), 4.16 (dd,  $J_{5,6b}$  = 2.31 Hz,  $J_{6a,6b}$  = 12.49 Hz, 1H, H-6b, Glc), 3.81 – 3.76 (m, 1H, H-5, Glc), 2.10, 2.07, 2.02, 2.00 (s, 12H, OAc).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 170.60, 170.11, 169.28, 169.19 (C=O, Ac), 87.89 (C-1, Glc), 73.96 (C-5, Glc), 72.55 (C-3, Glc), 70.58 (C-2, Glc), 67.81 (C-4, Glc), 61.33 (C-6, Glc), 20.70, 20.57, 20.57, 20.54 (OCOCH<sub>3</sub>).

Verbindung **22**:

$R_f = 0.22$  (DCM/MeOH (30/1)).

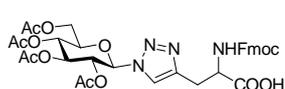
ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{14}H_{23}N_4O_9^+$  ( $M+NH_4$ ) $^+$ : 391.146, gefunden: 391.146 ( $M+NH_4$ ) $^+$ .

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{15}H_{20}N_3O_{11}^-$  ( $M+HCOO$ ) $^-$ : 418.110, gefunden: 418.110 ( $M+HCOO$ ) $^-$ .

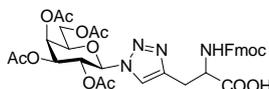
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 5.41$  (dd,  $J_{3,4} = 3.36$  Hz,  $J_{4,5} = 1.13$  Hz, 1H, H-4, Gal), 5.15 (dd,  $J_{1,2} = 8.75$  Hz,  $J_{2,3} = 10.40$  Hz, 1H, H-2, Gal) 5.03 (dd,  $J_{2,3} = 10.37$  Hz,  $J_{3,4} = 3.36$  Hz, 1H, H-3, Gal), 4.60 (d,  $J_{1,2} = 8.73$  Hz, 1H, H-1, Gal), 4.15 (m, 2H, H-6a, H-6b, Gal), 4.00 (ddd,  $J_{4,5} = 6.83$  Hz,  $J_{5,6a} = 6.57$  Hz,  $J_{5,6b} = 1.17$  Hz, 1H, H-5, Gal), 2.16, 2.08, 2.05, 1.97 (s, 12H, OAc).

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 170.36, 170.10, 169.98, 169.36$  (C=O, Ac), 88.26 (C-1, Gal), 72.82 (C-5, Gal), 70.68 (C-3, Gal), 67.99 (C-2, Gal), 66.80 (C-4, Gal), 61.20 (C-6, Gal), 20.68, 20.66, 20.62, 20.52 (OCOCH<sub>3</sub>).

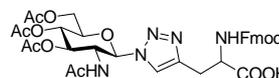
**16.3.14 Synthese von  $N^u$ -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- $N$ -(2,3,4,6-tetra- $O$ -acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-6-azahistidin 24 und  $N^u$ -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- $N$ -(2,3,4,6-tetra- $O$ -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-6-azahistidin 25 und  $N^u$ -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-7- $N$ -(2-acetamido-3,4,6-tri- $O$ -acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-6-azahistidin 26**



**24**



**25**



**26**

Azid 21, 22 oder 23 (für 24: 50.0 mg 21 (133.94  $\mu$ mol); für 25: 38.4 mg 22 (102.86  $\mu$ mol); für 26: 100.0 mg 23 (268.57  $\mu$ mol)) und Fmoc-Propargylglycin (54.0 mg, 161  $\mu$ mol, 1.19 eq) wurden gelöst in absolutem DMF (1.5 ml). 46  $\mu$ l absolutes DIPEA (47.1  $\mu$ mol, 0.35 eq) und Cu(I)iodid (6.15 mg, 32.3  $\mu$ mol, 0.24 eq.) wurden hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden bei RT gerührt und mit DCM (20 ml) versetzt. Die Lösung wurde mit 0.5 M HCl/H<sub>2</sub>O (10 ml) extrahiert. Das Triazol 24, 25 und 26 (24: 60.2 mg, 84.95  $\mu$ mol, 63.42%,

**25**: 35.1 mg, 49.53  $\mu\text{mol}$ , 48.1%, **26**: 77.3 mg, 109.23  $\mu\text{mol}$ , 40.6%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (20/1) gereinigt.

Verbindung **24**:

$R_f = 0.33$  (DCM/MeOH (20/1)).

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_{13}^+$  (M+H) $^+$ : 709.235, gefunden: 709.236 (M+H) $^+$ .

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}^-$  (M-H) $^-$ : 707.220, gefunden: 707.219 (M-H) $^-$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 8.08$  (s, 1H, Triazol), 7.85 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fluorenyl), 7.67 (dd,  $J = 5.1, 12.2$  Hz, 2H, Fluorenyl), 7.38 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fluorenyl), 7.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fluorenyl), 6.28 (d,  $J_{1,2} = 9.00$  MHz, 1H, H-1, Glc), 5.55 (dd,  $J_{1,2} = 9.48$  Hz,  $J_{2,3} = 9.48$  Hz, 1H, H-2, Glc), 5.48 (dd,  $J_{2,3} = 9.50$  Hz,  $J_{3,4} = 9.50$  Hz, 1H, H-3, Glc), 5.23-5.06 (m, 1H, H-4, Glc), 4.31 (ddd,  $J_{5,6b} = 2.20$  Hz,  $J_{5,6a} = 5.20$  Hz,  $J_{4,5} = 10.00$  Hz 1H, H-5, Glc), 4.25-4.14 (m, 4H, CH-NH-, Fluorenyl-CH-CH $_2$ , Fluorenyl-CH-CH $_2$ ), 4.11 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.60$  Hz,  $J_{5,6a} = 5.40$  Hz, 1H, H-6a, Glc), 4.00 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.50$  Hz,  $J_{5,6b} = 2.10$  Hz, 1H, H-6b, Glc), 3.10 (dd,  $J = 5.0$  Hz, 15.0 Hz, 1H, CH $_2$ -CNH), 2.97 (dd,  $J = 9.10, 15.00$ , 1H, CH $_2$ -CNH), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.94 (s, 3H, OAc), 1.91 (s, 3H, OAc), 1.71 (s, 3H, OAc).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173.26$  (COOH), 170.41, 169.97, 169.74, 168.77 (OCOCH $_3$ ), 156.36 (C=ONH), 144.24, 144.18, 144.15, 141.11 (Fluorenyl C, Triazol), 128.05, 127.49, 125.67, 122.49, 120.53 (Fluorenyl-C), 84.06 (C-1, Glc), 73.71 (C-5, Glc), 72.69 (C-3, Glc), 70.42 (C-2, Glc), 67.96 (C-4, Glc), 66.15 (CH $_2$ -CH), 62.14 (C-6, Glc), 54.17 (C-CNH), 47.01 (CH-CH $_2$ ), 27.62 (CH $_2$ -CNH), 20.89, 20.80, 20.67, 20.25 (OCOCH $_3$ ).

Verbindung **25**:

$R_f = 0.33$  (DCM/MeOH (20/1)).

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_{13}^+$  (M+H) $^+$ : 709.235, gefunden: 709.236 (M+H) $^+$ .

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}^-$  (M-H) $^-$ : 707.220, gefunden: 707.219 (M-H) $^-$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 8.03 (s, 1H, Triazol), 7.85 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fluorenyl), 7.67 (dd, *J* = 8.00 Hz, 16.36 Hz, 2H, Fluorenyl), 7.38 (ddd, *J* = 7.98 Hz, 7.48 Hz, 0.98 Hz, 2H, Fluorenyl), 7.29 (ddd, *J* = 7.45 Hz, 7.44 Hz, 0.98 Hz, 2H, Fluorenyl), 6.20 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 9.30 MHz, 1H, H-1, Gal), 5.55 (dd, *J*<sub>1,2</sub> = 9.43 Hz, *J*<sub>2,3</sub> = 9.43 Hz, 1H, H-2, Gal), 5.40 (m, 2H, H-3, Gal; H-4, Gal), 4.53 (m, 1H, H-5, Gal), 4.25-4.14 (m, 4H, *CH-NH-*, Fluorenyl-*CH-CH*<sub>2</sub>, Fluorenyl-*CH-CH*<sub>2</sub>), 4.07 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.49 Hz, *J*<sub>5,6a</sub> = 5.22 Hz, 1H, H-6a, Gal), 3.95 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.42 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> = 2.10 Hz, 1H, H-6b, Gal), 3.11 (dd, *J* = 4.91 Hz, 14.88 Hz, 1H, *CH*<sub>2</sub>-CNH), 2.98 (dd, *J* = 9.45, 14.65, 1H, *CH*<sub>2</sub>-CNH), 2.12 (s, 3H, OAc), 1.94 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.74 (s, 3H, OAc).

**<sup>13</sup>C-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.26 (COOH), 170.41, 169.98, 169.75, 168.78 (OCOCH<sub>3</sub>), 156.36 (C=ONH), 144.24, 144.19, 144.15, 141.11 (Fluorenyl C, Triazol), 128.06, 127.50, 125.67, 122.49, 120.53 (Fluorenyl-C), 84.51 (C-1, Gal), 73.71 (C-5, Gal), 70.91 (C-3, Gal), 68.03 (C-2, Gal), 67.78 (C-4, Gal), 66.15 (*CH*<sub>2</sub>-CH), 61.90 (C-6, Gal), 54.18 (C-CONH), 47.02 (*CH-CH*<sub>2</sub>), 27.60 (*CH*<sub>2</sub>-CNH), 20.90, 20.80, 20.68, 20.25 (OCOCH<sub>3</sub>).

Verbindung **26**:

R<sub>f</sub> = 0.16 (DCM/MeOH (20/1)).

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: 708.251, gefunden: 708.252 (M+H)<sup>+</sup>.

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub><sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: 706.235, gefunden: 706.237 (M-H)<sup>-</sup>.

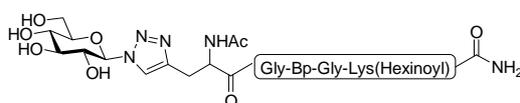
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 8.05 (d, *J* = 8.59 Hz, 1H, NHCO, ClcNAc), 7.90 (s, 1H, Triazol), 7.85 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fluorenyl), 7.65 (m, 2H, Fluorenyl), 7.38 (ddd, *J* = 7.54 Hz, 7.51 Hz, 0.95 Hz, 2H, Fluorenyl), 7.29 (ddd, *J* = 7.39 Hz, 7.39, 2.11 Hz, 2H, Fluorenyl), 6.04 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 9.81 MHz, 1H, H-1, GlcNAc), 5.31 (dd, *J*<sub>2,3</sub> = 10.21 Hz, *J*<sub>3,4</sub> = 9.62 Hz, 1H, H-3, Glc), 5.02 (dd, *J*<sub>4,3</sub> = 9.73 Hz, *J*<sub>4,5</sub> = 9.73 Hz, 1H, H-4, GlcNAc), 4.47 (m, 1H, H-5, GlcNAc), 4.25-4.14 (m, 5H, H-2, GlcNAc, *CH-NH-*, Fluorenyl-*CH-CH*<sub>2</sub>, Fluorenyl-*CH-CH*<sub>2</sub>), 4.11 (m, 1H, H-6a, GlcNAc), 3.97 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.50 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> = 1.80 Hz, 1H, H-6b, Glc), 3.10 (dd, *J* = 4.86 Hz, 14.31 Hz, 1H, *CH*<sub>2</sub>-CNH), 2.98 (dd, *J* = 7.85, 14.81, 1H, *CH*<sub>2</sub>-CNH), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.94 (s, 3H, OAc), 1.91 (s, 3H, OAc), 1.71 (s, 3H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173.26$  (COOH), 170.41, 169.98, 169.75 (OCOCH<sub>3</sub>), 156.37 (C=ONH), 144.24, 144.19, 144.15, 141.11 (Fluorenyl C, Triazol), 128.06, 127.50, 125.67, 122.49, 120.53 (Fluorenyl-C), 84.93 (C-1, ClcNAc), 73.74 (C-5, ClcNAc), 72.77 (C-3, ClcNAc), 68.46 (C-4, ClcNAc), 66.07 (CH<sub>2</sub>-CH), 62.10 (C-6, ClcNAc), 54.66 (C-CONH), 52.59 (C-2, ClcNAc), 47.12 (CH-CH<sub>2</sub>), 28.11 (CH<sub>2</sub>-CNH), 22.68 (C=ONHAc), 20.92, 20.84, 20.77 (OCOCH<sub>3</sub>).

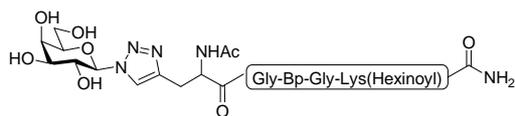
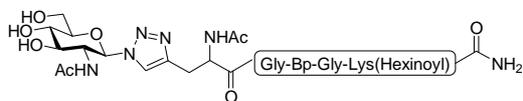
### 16.3.15 Synthese des festphasengebundenen Peptids Gly-Phe(*p*-Bz)-Gly-Lys(Hex)-Rink-MBHA Harz 27

Fmoc-geschütztes Rink Amid MBHA Harz (32.5 mg,  $B_H = 0.72$  mmol/g, 23.4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) wurde zweimal mit DMF und DCM gewaschen. Fmoc-Entschützung (siehe Kapitel 16.2.2) geschah durch Versetzen des Harzes mit 20% (v/v) Piperidin/DMF für 20 min und anschließendes Waschen mit DMF (4 $\times$ ) und DCM (3 $\times$ ). Fmoc-Lys(Mtt)-OH wurde gemäß SPPS-Standardprotokoll (siehe Kapitel 16.2.3) unter Verwendung von TBTU (3.9 eq), HOBt (4 eq.) und DIPEA (13 eq.) in DMF gekoppelt. Das Harz wurde mit DMF (3 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Mtt-Entschützung geschah durch Waschen des Harzes mit 2% (v/v) TFA/DCM (11 $\times$ 1 ml für je 2 min) und DCM (3 $\times$ ). Hexinsäure wurde gemäß dem oben erwähnten Standardprotokoll (siehe Kapitel 16.2.3) gekoppelt. Jeder der Bausteine Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe(*p*-Bz)-OH and Fmoc-Gly-OH wurde durch Abfolge von Fmoc-Entschützung und TBTU/HOBt vermittelter Kopplung an das Harz gekoppelt. Fmoc-Gly-Phe(*p*-Bz)-Gly-Lys(Hex)-Rink-MBHA Harz wurde unmittelbar vor der Synthese von 1, 2 und 3 Fmoc-entschützt (siehe Kapitel 16.2.2).

### 16.3.16 Synthese von Glycopeptid 13, 14 und 15



13


**14**

**15**

Eine Lösung des Triazols **24**, **25** oder **26** (**24**: 60.2 mg, 84.95  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.; **25**: 35.1 mg, 49.53  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.; **26**: 77.3 mg, 109.23  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.), PyBOP (für **24**: 88.4 mg, 2 eq.; für **25**: 51.6 mg, 2 eq.; für **26**: 113.7 mg, 2 eq.) und DIPEA (für **24**: 29.5  $\mu\text{l}$ , 2 eq.; für **25**: 17.2  $\mu\text{l}$ , 2 eq.; für **26**: 37.9  $\mu\text{l}$ , 2 eq.) wurde mit dem festphasengebundenen Peptid (10 mg resin, 5.0  $\mu\text{mol}$ ,  $B_H = 0.50$  mmol/g) versetzt (siehe Kapitel 16.2.3). Die Suspension wurde für 16 Stunden bei RT geschüttelt, bevor 2 eq. PyBOP und 2 eq. DIPEA hinzugegeben wurden. Diese Zugabe wurde wiederholt. Die quantitative Peptidkopplung wurde mittels negativem Kaisertest nachgewiesen. Das Harz wurde mit DMF (3 $\times$ ) und DCM (2 $\times$ ) gewaschen. Fmoc-Entschützung (siehe Kapitel 16.2.2) geschah durch Versetzen des Harzes mit 2 ml Piperidin/DMF (1/4) für 20 min bei RT. Das Harz wurde mit DMF (4 $\times$ ) und DCM (3 $\times$ ) gewaschen und anschließend in 2 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$ /DIPEA/DMF (3/1/16) für 45 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (2 $\times$ ) und DCM (3 $\times$ ) gewaschen bevor es in Hydrazinhydrat/THF/MeOH (1/4.5/4.5) für 75 min bei RT geschüttelt wurde. Nach Waschen mit DCM (6 $\times$ ) wurde das Harz mit 100  $\mu\text{l}$  TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (95/5) für 2 Stunden bei RT versetzt. Nach Zugabe von eiskaltem  $\text{Et}_2\text{O}$  (1ml) wurde die Suspension für 45 min bei  $-20$  °C inkubiert (siehe Kapitel 16.2.5). Nach Zentrifugation (2 min, 17000 g) wurde das Pellet mit  $\text{Et}_2\text{O}$  zweimal gewaschen und für 1 Stunde bei RT getrocknet. Das Rohprodukt wurde durch HPLC (Säule: XBridge<sup>TM</sup> BEH130 C18 5 $\mu\text{m}$  (10x150 mm), linearer Gradient: 0 bis 100%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  mit 0.1% TFA in 60 min, Flussrate: 5ml/min) gereinigt. Das Glycopeptid **15** wurde bei 30%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (18.43 min) eluiert, wobei Glycopeptid **13** und **14** bei 32% (18.62 min) bzw. 31% (18.67 min) eluiert wurden. Nach Gefriertrocknung erhielt man 4.0 mg (4.22  $\mu\text{mol}$ , 84.4%) **13**, 2.6 mg (2.75  $\mu\text{mol}$ , 55.0%) **14** and 3.7 mg (3.74  $\mu\text{mol}$ , 74.8%) **15**.

Verbindung **13**:

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_{13}^+$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 947.425, gefunden: 947.428 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

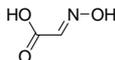
Verbindung **14**:

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_{13}^+$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> 947.425, gefunden: 947.428 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Verbindung **15**:

ESI-MS: m/z berechnet für  $C_{47}H_{62}N_{11}O_{13}^+$  (M+H)<sup>+</sup> 988.452, gefunden: 988.454 (M+H)<sup>+</sup>.

### 16.3.17 Synthese von Glyoxalsäurealdoxim **40**



Zu einer Lösung von 50% (v/v)  $NH_2OH / H_2O$  (13.65 g, 0.415 mol, 1.0 eq.) wurde unter Rühren ein Lösung von 50% (v/v) Glyoxalsäure /  $H_2O$  portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt wurde mit Diethylether (3×50 ml) extrahiert und die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert und eingengt. Glyoxalsäurealdoxim **40** (26.06 g, 0.292 mol, 70.5%) wurde als weißer Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 7.48$  (s, 1H, CHN).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta = 162.95$  (COOH), 141.42 (CHN).

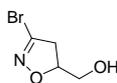
### 16.3.18 Synthese von Dibromformaldoxim **41**



26.06 g Glyoxalsäurealdoxim **40** (0.292 mol, 1.0 eq.) wurde in 520 ml  $H_2O$  gelöst und auf 4 °C abgekühlt bevor  $Br_2$  (20.84 ml, 0.292 mol, 1.0 eq.) zugetropft wurde. Die Temperatur der Lösung darf 8 °C nicht überschreiten. Nach Zugabe von  $Br_2$  wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung für weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Nach Extraktion mit Diethylether (3×150 ml) wurde die organische Phase mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung (100 ml) gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert und eingengt. Dibromformaldoxim (45.03 g, 0.222 mol, 76.0%) wurde als gelber Feststoff erhalten. Allerdings war dieses Produkt instabil. Deshalb war es nicht möglich, es ausreichend zu charakterisieren. Es wurde umgehend für weitere Synthesen eingesetzt.

**16.3.19 Synthese von Dichlorformaldoxim 42**

5.80 g Glyoxalsäurealdoxim 40 (65.09 mmol) wurde in 1,2-DME (63 ml) gelöst und auf 55 °C erhitzt bevor *N*-Chlorsuccinimid (16.86 ml, 124.48 mmol, 1.91 eq.) portionsweise zugegeben wurde. Nach Zugabe des *N*-Chlorsuccinimids wurde die Reaktionsmischung auf 110 °C für 10 min erhitzt. Dabei wurde sie stark gerührt. CO<sub>2</sub> wurde während des Heizens freigesetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT abgekühlt und filtriert. Das gelbe Filtrat wurde umgehend für weitere Syntheseschritte eingesetzt, weil das Produkt instabil war. Deshalb war es nicht möglich, es ausreichend zu charakterisieren.

**16.3.20 Synthese von 3-Brom-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin 43**

1 g Dibromformaldoxim 41 (4.93 mmol, 1.0 eq.) wurde zu einer Lösung von 1.25 ml Allylalkohol (21.63 mmol, 4.4 eq.) in 46.4 ml Ethylacetat zugegeben. Wasserfreies, frisch gemörsertes K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 g, 28.943 mmol, 5.9 eq.) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit H<sub>2</sub>O (130 ml) verdünnt und mit Diethylether (3 x 130 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Das Produkt (115.19 mg, 0.64 mmol, 13.0%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.24 (DCM/MeOH (40:1)).

GC: t<sub>R</sub> = 5.8 min.

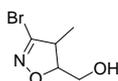
EI-MS: m/z berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>6</sub><sup>81</sup>BrNO<sub>2</sub> (M)<sup>+</sup> 180.956, gefunden: 180.959 (M)<sup>+</sup>.

EI-MS: m/z berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>6</sub><sup>79</sup>BrNO<sub>2</sub> (M)<sup>+</sup> 178.958, gefunden: 178.957 (M)<sup>+</sup>.

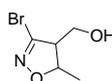
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.80 (dddd, *J* = 3.1 Hz, 4.1 Hz, 8.2 Hz, 10.9 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 3.88 (dd, *J* = 3.1 Hz, 12.5 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.65 (dd, *J* = 4.1 Hz, 12.5 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.26 (dd, *J* = 10.8 Hz, 17.2 Hz, 1 H, CBr-C(H)H), 3.19 (dd, *J* = 8.2 Hz, 17.2 Hz, 1 H, CBr-C(H)H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 137.8 (N=CBr), 81.9 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 63.0 (CH<sub>2</sub>OH), 42.6 (CBr-CH<sub>2</sub>).

### 16.3.21 Synthese von *cis*-3-Brom-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin **44a** und *cis*-3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazolin **44b**



**44a**



**44b**

Zur Synthese wurde *cis/trans*-But-2-en-1-ol verwendet und analog zur Synthese von **43** (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (334.79 mg, 1.73 mmol, 35.0%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.28 (DCM/MeOH (40:1)).

DEI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub><sup>81</sup>BrNO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 195.979, gefunden: 195.979 (M+H)<sup>+</sup>.

DEI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub><sup>79</sup>BrNO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> 193.981, gefunden: 193.980 (M+H)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von **44a/44b**: 1/1.3

*cis*-3-Bromo-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin **44a**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.33 (ddd, *J* = 3.1 Hz, 4.1 Hz, 8.5 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 3.90 (dd, *J* = 3.2 Hz, 12.6 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.68 (dd, *J* = 4.2 Hz, 12.6 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.36 (qd, *J* = 7.2 Hz, 8.5 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

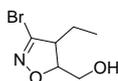
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 144.6 (N=CBr), 88.4 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 62.1 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 48.1 (CH-CH<sub>3</sub>), 16.1 (CH<sub>3</sub>).

*cis*-3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazoline **44b**:

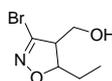
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.75 (qd,  $J$  = 6.3 Hz, 8.3, 1 H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 3.87 (dd,  $J$  = 5.6 Hz, 11.2 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.82 (dd,  $J$  = 3.8 Hz, 11.2 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.08 (ddd,  $J$  = 3.8 Hz, 5.6 Hz, 8.3 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 1.46 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 138.9 ( $\text{N=CBr}$ ), 80.9 ( $\text{CH-CH}_3$ ), 61.1 ( $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 60.5 ( $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 20.2 ( $\text{CH}_3$ ).

### 16.3.22 Synthese von *cis*-3-Brom-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin **45a** und *cis*-3-Brom-5-ethyl-4-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin **45b**



**45a**



**45b**

Zur Synthese wurde Dibromformaldoxim und *cis*-Pent-2-en-1-ol verwendet und analog zur Synthese von **43** (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (246.17 mg, 1.18 mmol, 24%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

$R_f$  = 0.32 (DCM/MeOH (40:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{10}^{81}\text{BrNO}_2$  ( $\text{M}^+$ ) 208.987, gefunden: 208.986 ( $\text{M}^+$ ).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{10}^{79}\text{BrNO}_2$  ( $\text{M}^+$ ) 206.989, gefunden: 206.988 ( $\text{M}^+$ ).

Verhältnis der Protonensignale von **45a/45b**: 1/1.2

*cis*-3-Brom-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin **44a**:

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.74 (ddd,  $J$  = 4.6 Hz, 5.4 Hz, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 3.83 (dd,  $J$  = 5.3 Hz, 12.6 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.81 (dd,  $J$  = 4.7 Hz, 12.6 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.32 (ddd,  $J$  = 4.5 Hz, 9.4 Hz, 10.0 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.97-1.63 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.09 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ )

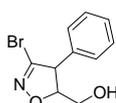
$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 144.6 ( $\text{N=CBr}$ ), 83.5 ( $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 58.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 54.3 ( $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 19.1 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 12.8 ( $\text{CH}_3$ ).

*cis*-3-Brom-5-ethyl-4-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin **44b**:

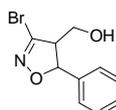
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.59$  (ddd,  $J = 5.0$  Hz, 9.0 Hz, 9.6 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.90 (dd,  $J = 5.6$  Hz, 11.6 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.85 (dd,  $J = 3.6$  Hz, 11.6 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.30 (ddd,  $J = 3.5$  Hz, 5.6 Hz, 9.4 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 1.97-1.63 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 140.1$  ( $\text{N=CBr}$ ), 85.6 ( $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 60.4 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 56.2 ( $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 21.8 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 10.9 ( $\text{CH}_3$ ).

### 16.3.23 Synthese von *cis*-3-Brom-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin **46a** und *cis*-3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazolin **46b**



**46a**



**46b**

Zur Synthese wurde Dibromformaldoxim und *trans*-Zimtalkohol verwendet und analog zur Synthese von **43** (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (202.00 mg, 0.79 mmol, 16%) wurde durch Säulenchromatographie mit  $\text{DCM/MeOH}$  (40:1) gereinigt.

$R_f = 0.48$  ( $\text{DCM/MeOH}$  (40:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}^{81}\text{BrNO}_2^+$  ( $\text{M+H}$ ) $^+$  257.995, gefunden: 257.991 ( $\text{M+H}$ ) $^+$ .

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}^{79}\text{BrNO}_2^+$  ( $\text{M+H}$ ) $^+$  255.996, gefunden: 255.996 ( $\text{M+H}$ ) $^+$ .

Verhältnis der Protonensignale von **46a/46b**: 1/3.

*cis*-3-Brom-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin **46a**:

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.42\text{-}7.22$  (m, 5 H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.67 (ddd,  $J = 3.1$  Hz, 3.7 Hz, 8.0 Hz, 1 H,  $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 4.45 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H,  $\text{CH-Phe}$ ), 3.96 (dd,  $J = 3.1$  Hz, 12.7 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ), 3.73 (dd,  $J = 3.8$  Hz, 12.7 Hz, 1 H,  $\text{C(H)HOH}$ ).

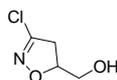
$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 136.63$  ( $\text{N=CBr}$ ), 128.57, 128.57, 126.44, 126.44, ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 127.68 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 90.14 ( $\text{CH-CH}_2\text{OH}$ ), 60.11 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 62.94 ( $\text{CH-Phe}$ ).

*cis*-3-Brom-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazoline **46b**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.42-7.22 (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 5.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, *CH*-Phe), 4.02 (dd, *J* = 5.0 Hz, 11.4 Hz, 1 H, *C(H)HOH*), 3.89 (dd, *J* = 3.6 Hz, 11.4 Hz, 1 H, *C(H)HOH*), 3.43 (ddd, *J* = 3.6 Hz, 5.0 Hz, 8.6 Hz, 1 H, *CH-CH*<sub>2</sub>OH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 136.63 (N=CBr), 128.57, 128.57, 126.44, 126.44, (CH, C<sub>arom.</sub>), 127.68 (C, C<sub>arom.</sub>), 86.85 (*CH*-Phe), 61.09 (*CH*<sub>2</sub>OH), 63.74 (*CH-CH*<sub>2</sub>OH).

### 16.3.24 Synthese von 3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin **47**



**47**

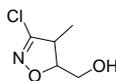
Zur Synthese wurde Dichlorformaldoxim verwendet (siehe Kapitel 16.3.19). Dabei wurde analog zu der Darstellung von **43** (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (27 mg, 199.19 μmol, 1.8%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.21 (DCM/MeOH (40:1)).

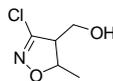
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.86 (dddd, *J* = 3.1 Hz, 4.1 Hz, 8.4 Hz, 10.7 Hz, 1 H, *CH-CH*<sub>2</sub>OH), 3.85 (dd, *J* = 3.1 Hz, 12.6 Hz, 1 H *C(H)HOH*), 3.64 (dd, *J* = 4.1, 12.6 Hz, *C(H)HOH*), 3.20 (dd, *J* = 10.7 Hz, 17.1 Hz, 1 H, CCl-*C(H)H*), 3.15 (dd, *J* = 8.4 Hz, 17.2 Hz, 1 H, CCl-*C(H)H*).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 149.5 (N=CCl), 82.6 (*CH-CH*<sub>2</sub>OH), 63.0 (*CH*<sub>2</sub>OH), 39.6 (CCl-*CH*<sub>2</sub>).

**16.3.25 Synthese von *cis*-3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin 48a und *cis*-3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazolin 48b**



**48a**



**48b**

Zur Synthese wurde Dichlorformaldoxim und *cis/trans*-But-2-en-1-ol (*cis/trans* = 1:19) verwendet und analog zur Synthese von 43 (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (270 mg, 1.81 mmol, 16.0%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

$R_f = 0.31$  (DCM/MeOH (40:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_5H_8^{35}ClNO_2$  (M)<sup>+</sup> 149.024, gefunden: 149.024 (M)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von 48a/48b: 1/1.

*cis*-3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-methyl-2-isoxazolin 48a:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.39$  (ddd,  $J = 3.2$  Hz, 4.0 Hz, 8.7 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH), 3.87 (dd,  $J = 3.3$  Hz, 12.2 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.65 (dd,  $J = 4.1$  Hz, 12.6 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.32 (qd,  $J = 7.1$  Hz, 8.5 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.30 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

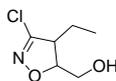
<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 130.1$  (N=CCl), 89.4 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 62.1 (CH<sub>2</sub>OH), 45.6 (CH-CH<sub>3</sub>), 15.5 (CH<sub>3</sub>).

*cis*-3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-methyl-2-isoxazolin 48b:

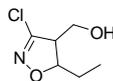
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.78$  (qd,  $J = 6.3$  Hz, 8.4 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 3.87 (dd,  $J = 5.2$  Hz, 11.3 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.80 (dd,  $J = 3.9$  Hz, 11.2 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.03 (ddd,  $J = 4.0$  Hz, 5.5 Hz, 8.9 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH), 1.43 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 128.3$  (N=CCl), 81.7 (CH-CH<sub>3</sub>), 60.1 (CH<sub>2</sub>OH), 58.9 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 20.3 (CH<sub>3</sub>).

**16.3.26 *cis*-Synthese von 3-Chlor-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin 49a und *cis*-3-Chlor-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin 49b**



**49a**



**49b**

Zur Synthese wurde Dichlorformaldoxim und *cis*-Pent-2-en-1-ol verwendet und analog zur Synthese von 43 (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (260.40 mg, 1.59 mmol, 14.2%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

$R_f = 0.37$  (DCM/MeOH (40:1)).

EI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_6H_{10}^{37}ClNO_2 (M)^+$  165.037, gefunden: 165.036 ( $M$ )<sup>+</sup>.

EI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_6H_{10}^{35}ClNO_2 (M)^+$  163.040, gefunden: 163.040 ( $M$ )<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von 49a/49b: 1/1.2.

*cis*-3-Chlor-4-ethyl-5-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin 49a:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.81$  (ddd,  $J = 4.3$  Hz, 5.7 Hz, 10.0 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH), 3.83 (dd,  $J = 5.6$  Hz, 12.5 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.81 (dd,  $J = 4.3$  Hz, 12.4 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.30 (ddd,  $J = 5.3$  Hz, 9.0 Hz, 10.2 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.97-1.78 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

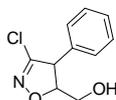
<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 134.80$  (N=CCl), 86.32 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 60.49 (CH<sub>2</sub>OH), 54.05 (CH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.57 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.82 (CH<sub>3</sub>).

*cis*-3-Chlor-5-ethyl-4-(hydroxymethyl)-2-isoxazolin 49b:

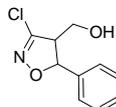
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.65$  (ddd,  $J = 4.9$  Hz, 9.0 Hz, 9.6 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.92 (dd,  $J = 5.6$  Hz, 11.6 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.88 (dd,  $J = 3.7$ , 11.6 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.27 (ddd,  $J = 3.7$ , 5.4, 9.8 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH), 1.97-1.78 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.09 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 127.67$  (N=CCl), 84.42 (CH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57.78 (CH<sub>2</sub>OH), 52.05 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 21.91 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.80 (CH<sub>3</sub>).

**16.3.27 Synthese von *cis*-3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin 50a und *cis*-3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazolin 50b**



**50a**



**50b**

Zur Synthese wurde Dichlorformaldoxim und *trans*-Zimtalkohol verwendet und analog zur Synthese von 14 (siehe Kapitel 16.3.20) vorgegangen. Das Produkt (594.2 mg, 2.81 mmol, 25.0%) wurde durch Säulenchromatographie mit DCM/MeOH (40:1) gereinigt.

$R_f = 0.46$  (DCM/MeOH (40:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{10}H_{10}^{35}ClNO_2 (M)^+$  211.040, gefunden: 211.040 (M)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von 50a/50b: 1/2.7.

*cis*-3-Chlor-5-(hydroxymethyl)-4-phenyl-2-isoxazolin 50a:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.42-7.25$  (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 4.73 (ddd,  $J = 3.2$  Hz, 3.6 Hz, 8.1 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH), 4.44 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H, CH-Phe), 3.96 (dd,  $J = 3.1$  Hz, 12.7 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.73 (dd,  $J = 3.7$  Hz, 12.7 Hz, 1 H, C(H)HOH).

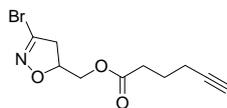
<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 139.09$  (N=CCl), 128.57, 128.57, 126.44, 126.44, (CH, C<sub>arom.</sub>), 127.68 (C, C<sub>arom.</sub>), 91.04 (CH-CH<sub>2</sub>OH), 62.22 (CH<sub>2</sub>OH), 57.52 (CH-Phe).

*cis*-3-Chlor-4-(hydroxymethyl)-5-phenyl-2-isoxazolin 50b:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.42-7.25$  (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 5.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, CH-Phe), 4.03 (dd,  $J = 5.0$  Hz, 11.3 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.90 (dd,  $J = 3.6$  Hz, 11.3 Hz, 1 H, C(H)HOH), 3.41 (ddd,  $J = 3.7$  Hz, 4.9 Hz, 8.7 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>OH).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 136.63$  (N=CCl), 128.57, 128.57, 126.44, 126.44, (CH, C<sub>arom.</sub>), 127.68 (C, C<sub>arom.</sub>), 86.09 (CH-Phe), 59.67 (CH<sub>2</sub>OH), 60.46 (CH-CH<sub>2</sub>OH).

**16.3.28 Synthese von (3-Brom-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat 32**



40 mg Alkohol **43a+b** (222.22  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in 1.4 ml DCM gelöst. 50.1  $\mu\text{l}$  Triethylamin (60.8  $\mu\text{l}$ , 444.44  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) und Hex-5-insäurechlorid (50.1  $\mu\text{l}$ , 444.44  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt (43.2 mg, 157.60  $\mu\text{mol}$ , 70.9%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

$R_f = 0.07$  (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

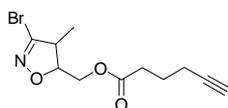
DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{81}\text{BrNO}_3^+$  (M+H) $^+$  276.005, gefunden: 276.005 (M+H) $^+$ .

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}^{79}\text{BrNO}_3^+$  (M+H) $^+$  274.007, gefunden: 274.007 (M+H) $^+$ .

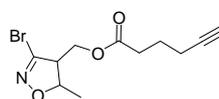
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.91$  (dddd,  $J = 4.0$  Hz, 5.2 Hz, 7.4 Hz, 11.0 Hz, 1 H, CH- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.28 (dd,  $J = 4.0$  Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.19 (dd,  $J = 5.2$ , 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.34 (dd,  $J = 10.9$  Hz, 17.3 Hz, 1 H, CBr-C(H)H), 3.05 (dd,  $J = 7.4$  Hz, 17.3 Hz, 1 H, CBr-C(H)H), 2.51 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, C(O)- $\text{CH}_2$ ), 2.28 (dt,  $J = 2.7$  Hz, 6.9 Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ - $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1.98 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1.86 ( $\psi$ -quint., 6.9 Hz, 2 H, C(O)- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 172.6$  (C=O), 136.8 (N=CBr), 83.0 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 78.8 (CH- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.3 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 64.2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 43.5 (CBr- $\text{CH}_2$ ), 32.6 (C(O)- $\text{CH}_2$ ), 23.4 (C(O)- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 17.8 ( $\text{CH}_2$ - $\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

**16.3.29 Synthese von *cis*-(3-Brom-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat 33a und *cis*-(3-Brom-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat 33b**



**33a**



**33b**

Zur Synthese wurde der Alkohol **44a+b** (siehe Kapitel 16.3.21) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (55.4 mg, 192.27  $\mu\text{mol}$ , 86.5%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

$R_f = 0.16$  (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}^{81}\text{BrNO}_3^+$  (M+H)<sup>+</sup> 290.021, gefunden: 290.015 (M+H)<sup>+</sup>.

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}^{79}\text{BrNO}_3^+$  (M+H)<sup>+</sup> 288.023, gefunden: 288.022 (M+H)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von **33a/33b**: 1/1.3.

Die Regioisomere wurden mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5 $\mu\text{m}$  (10x150 mm), linearer Gradient: 30 bis 60%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  mit 0.1% TFA in 80 min) getrennt. Regioisomer **33b** ( $t_R = 18.9$  min (37.1%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )) und Regioisomer **33a** ( $t_R = 25.4$  min (39.5%  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ )) wurden getrennt isoliert. Deren Zuordnung gelang *Dr. Thomas Böttcher* durch ergänzende NMR Messung von **33a** und **33b**.

*cis*-(3-Brom-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **33a**:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 4.50$  (ddd,  $J = 3.2$  Hz, 5.8 Hz, 8.0 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.28 (dd,  $J = 3.2$  Hz, 12.2 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.19 (dd,  $J = 5.6$  Hz, 12.0 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.39-3.31 (m, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 2.82 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 2.43 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.21 (dt,  $J = 2.5$  Hz, 7.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 1.70 ( $\psi$ -quint.,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 172.2$  (C(O)-CH<sub>2</sub>), 144.3 (N=CBr), 84.8 (CH-CH<sub>2</sub>O), 83.6 (C $\equiv$ CH), 71.8 (C $\equiv$ CH), 63.6 (CH<sub>2</sub>O), 48.4 (CH-CH<sub>3</sub>), 32.2 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.0 (CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 15.6 (CH<sub>3</sub>).

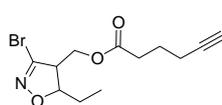
*cis*-(3-Brom-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **33b**:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 4.58$  (qd,  $J = 6.2$  Hz, 8.6 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 4.25 (dd,  $J = 3.8$  Hz, 11.7 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.19 (dd,  $J = 4.8$  Hz, 11.7 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.49 (ddd,  $J = 3.9$  Hz, 4.6 Hz, 8.6 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 2.81 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 2.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.20 (dt,  $J = 2.6$  Hz, 7.1 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C $\equiv$ CH), 1.69 ( $\psi$ -quint.,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.35 (d,  $J = 6.25$  Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

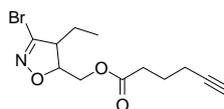
<sup>13</sup>C-NMR (360 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 172.0$  (C(O)-CH<sub>2</sub>), 139.4 (N=CBr), 83.5 (C $\equiv$ CH),

80.2 (CH-CH<sub>3</sub>), 71.7 (C≡CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>O), 57.0 (CH-CH<sub>2</sub>O), 32.1 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.3 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 19.4 (CH<sub>3</sub>), 17.0 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

**16.3.30 Synthese von *cis*-(3-Brom-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat 34a und *cis*-(3-Brom-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat 34b**



**34a**



**34b**

Zur Synthese wurde der Alkohol 45a+b (siehe Kapitel 16.3.22) verwendet und analog zur Synthese von 32 (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (36.3 mg, 120.14 μmol, 54.1%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.17 (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>17</sub><sup>81</sup>BrNO<sub>3</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 304.037, gefunden: 304.034 (M+H)<sup>+</sup>.

DEI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>17</sub><sup>79</sup>BrNO<sub>3</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 302.038, gefunden: 302.038 (M+H)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von 34a/34b: 1/1.2.

Die Regioisomere wurden mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5 μm (10x150 mm), linearer Gradient: 30 bis 60% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA in 80 min) getrennt. Regioisomer 34b (t<sub>R</sub> = 24.4 min (39.1% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)) und Regioisomer 34a (t<sub>R</sub> = 26.2 min (39.8% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)) wurden getrennt isoliert. Deren Zuordnung gelang Dr. Thomas Böttcher durch ergänzende NMR Messung von 34a und 34b.

*cis*-(3-Brom-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat 34a:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 4.87 (ddd, *J* = 3.3 Hz, 6.6 Hz, 9.9 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.27 (dd, *J* = 3.3 Hz, 12.3 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.17 (dd, *J* = 6.7 Hz, 12.3 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.53 (ddd, *J* = 4.9 Hz, 8.2 Hz, 9.8 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.81 (t, *J* = 2.7 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>-

$C\equiv CH$ ), 2.42 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H,  $C(O)-CH_2$ ), 2.20 (dt,  $J = 2.6$  Hz, 7.1 Hz, 2 H,  $CH_2-C\equiv CH$ ), 1.69 ( $\psi$ -quint.,  $J = 7.3$  Hz, 2 H,  $C(O)-CH_2-CH_2$ ), 1.68-1.53 (m, 2 H,  $CH_2-CH_3$ ), 0.99 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

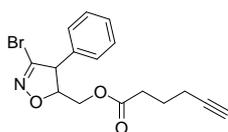
$^{13}C$ -NMR (360 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 171.9$  ( $C(O)-CH_2$ ), 144.0 ( $N=CBr$ ), 83.5 ( $C\equiv CH$ ), 80.4 ( $CH-CH_2O$ ), 71.7 ( $C\equiv CH$ ), 61.4 ( $CH_2O$ ), 53.1 ( $CH-CH_2-CH_3$ ), 32.2 ( $C(O)-CH_2$ ), 23.3 ( $C(O)-CH_2-CH_2$ ), 18.5 ( $CH_2-CH_3$ ), 17.0 ( $CH_2-C\equiv CH$ ), 11.9 ( $CH_3$ ).

*cis*-(3-Brom-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **34b**:

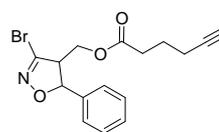
$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 4.56$  (ddd,  $J = 4.8$  Hz, 9.2 Hz, 9.8 Hz, 1 H,  $CH-CH_2-CH_3$ ), 4.23 (dd,  $J = 5.1$  Hz, 12.2 Hz, 1 H,  $C(H)HO$ ), 4.16 (dd,  $J = 3.6$  Hz, 12.2 Hz, 1 H,  $C(H)HO$ ), 3.72 (ddd,  $J = 3.7$  Hz, 4.9 Hz, 9.9 Hz, 1 H,  $CH-CH_2O$ ), 2.80 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1 H,  $CH_2-C\equiv CH$ ), 2.39 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H,  $C(O)-CH_2$ ), 2.19 (dt,  $J = 2.6$ , 7.1 Hz, 2 H,  $CH_2-C\equiv CH$ ), 1.75-1.64 (m, 4 H,  $C(O)-CH_2-CH_2$  and  $CH_2-CH_3$ ), 0.97 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (360 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 171.8$  ( $C(O)-CH_2$ ), 140.1 ( $N=CBr$ ), 84.4 ( $CH-CH_2-CH_3$ ), 83.4 ( $C\equiv CH$ ), 71.7 ( $C\equiv CH$ ), 58.6 ( $CH_2O$ ), 52.3 ( $CH-CH_2O$ ), 32.2 ( $C(O)-CH_2$ ), 23.2 ( $C(O)-CH_2-CH_2$ ), 21.3 ( $CH_2-CH_3$ ), 17.0 ( $CH_2-C\equiv CH$ ), 10.7 ( $CH_3$ ).

### 16.3.31 Synthese von *cis*-(3-Brom-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **35a** und *cis*-(3-Brom-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **35b**



**35a**



**35b**

Zur Synthese wurde der Alkohol **46a+b** (siehe Kapitel 16.3.23) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (41.4 mg, 128.22  $\mu$ mol, 53.2%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

$R_f = 0.17$  (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{16}H_{17}^{79}BrNO_3^+$  ( $M+H$ ) $^+$  350.038, gefunden: 350.038 ( $M+H$ ) $^+$ .

Verhältnis der Protonensignale von **35a/35b**: 1/3.1.

*cis*-(3-Brom-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **35a**:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.43-7.34 (m, 3 H, H<sub>arom</sub>), 7.22-7.20 (m, 2 H, H<sub>arom</sub>), 4.79 (ddd, *J* = 4.3 Hz, 5.0 Hz, 7.1 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.38 (dd, *J* = 4.3 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.30 (dd, *J* = 5.0 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H, CH-Phe), 2.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.27 (dt, *J* = 2.7 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.98 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.86 (ψ-quint., *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

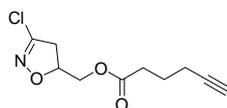
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.6 (C=O), 141.1 (C<sub>q</sub>), 135.7 (C<sub>q</sub>), 129.5 (2x CH<sub>arom</sub>), 128.7 (CH<sub>arom</sub>), 127.8 (2x CH<sub>arom</sub>), 86.9 (CH-CH<sub>2</sub>O), 82.9 (C≡CH), 69.4 (C≡CH), 63.6 (CH<sub>2</sub>O), 61.4 (CH-Phe), 32.6 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

*cis*-(3-Brom-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **35b**:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.43-7.34 (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 5.47 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, CH-Phe), 4.43 (dd, *J* = 3.7 Hz, 11.7 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.35 (dd, *J* = 5.6 Hz, 11.7 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.59 (ddd, *J* = 3.7 Hz, 5.6 Hz, 8.9 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 2.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.27 (dt, *J* = 2.7 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.99 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.85 (ψ-quint., *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.6 (C=O), 138.4 (C<sub>q</sub>), 137.8 (C<sub>q</sub>), 129.0 (2x CH<sub>arom</sub>), 129.0 (CH<sub>arom</sub>), 125.9 (2x CH<sub>arom</sub>), 85.8 (CH-Phe), 83.0 (C≡CH), 69.4 (C≡CH), 61.1 (CH<sub>2</sub>O), 60.1 (CH-CH<sub>2</sub>O), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.3 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

### 16.3.32 Synthese von (3-Chlor-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **36**



Zur Synthese wurde der Alkohol **47** (siehe Kapitel 16.3.24) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (11.5 mg, 101.89 μmol, 58.2%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

$R_f = 0.14$  (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

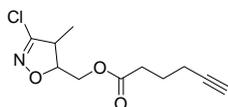
DEI-MS: m/z berechnet für  $C_{10}H_{12}^{37}ClNO_3 (M)^+$  230.058, gefunden: 230.052 (M)<sup>+</sup>.

DEI-MS: m/z berechnet für  $C_{10}H_{12}^{35}ClNO_3 (M)^+$  229.050, gefunden: 229.049 (M)<sup>+</sup>.

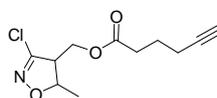
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.98 (dddd, J = 4.0 Hz, 5.2 Hz, 7.6 Hz, 11.0 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.29 (dd, J = 4.0 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.20 (dd, J = 5.2 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.30 (dd, J = 11.0 Hz, 17.2 Hz, 1 H, CCl-C(H)H), 3.01 (dd, J = 7.6 Hz, 17.2 Hz, 1 H, CCl-C(H)H), 2.52 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.28 (dt, J = 2.7 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.98 (t, J = 2.7 Hz, 1 H, C≡CH), 1.86 (ψ-quint., J = 7.1 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.6 (C=O), 148.6 (N=CCl), 83.0 (C≡CH), 79.5 (CHCH<sub>2</sub>O), 69.3 (C≡CH), 64.2 (CH<sub>2</sub>O), 40.5 (CCl-CH<sub>2</sub>), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

### 16.3.33 Synthese von *cis*-(3-Chlor-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **37a** und *cis*-(3-Chlor-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **37b**



**37a**



**37b**

Zur Synthese wurde der Alkohol **48a+b** (siehe Kapitel 16.3.25) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (16.9 mg, 69.35 μmol, 31.2%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.15 (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS: m/z berechnet für  $C_{11}H_{15}^{35}ClNO_3^+ (M+H)^+$  244.073, gefunden: 244.074 (M+H)<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von **37a/37b**: 1/1.1.

*cis*-(3-Chlor-4-methyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **37a**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.51 (ddd, *J* = 4.1 Hz, 5.3 Hz, 8.2 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.32 (dd, *J* = 4.1 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.23 (dd, *J* = 5.5 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.18 (qd, *J* = 7.2, 8.1 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 2.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.28 (dt, *J* = 2.7 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.98 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.86 (ψ-quint., *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

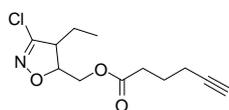
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.6 (C=O), 153.7 (N=CCl), 86.2 (CH-CH<sub>2</sub>O), 83.0 (C≡CH), 69.3 (C≡CH), 63.5 (CH<sub>2</sub>O), 47.0 (CH-CH<sub>3</sub>), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH), 15.7 (CH<sub>3</sub>).

*cis*-(3-Chlor-5-methyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **37b**:

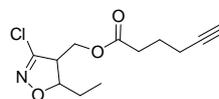
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.68 (qd, *J* = 6.3 Hz, 8.5 Hz, 1 H, CH-CH<sub>3</sub>), 4.34 (dd, *J* = 3.9 Hz, 11.6 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.24 (dd, *J* = 6.1 Hz, 11.6 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.20 (ddd, *J* = 3.9 Hz, 5.8 Hz, 8.3 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 2.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.28 (dt, *J* = 2.7 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.98 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.85 (ψ-quint., *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.47 (d, *J* = 6.3 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.6 (C=O), 148.9 (N=CCl), 82.9 (C≡CH), 81.9 (CHCH<sub>3</sub>), 69.4 (C≡CH), 60.9 (CH<sub>2</sub>O), 56.0 (CH-CH<sub>2</sub>O), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.3 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

### 16.3.34 Synthese von *cis*-(3-chloro-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **38a** und *cis*-(3-chloro-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **38b**



**38a**



**38b**

Zur Synthese wurde der Alkohol **49a+b** (siehe Kapitel 16.3.26) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (14.6 mg, 56.65 μmol, 25.5%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

R<sub>f</sub> = 0.18 (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{12}H_{17}^{35}ClNO_3^+$  ( $M+H$ )<sup>+</sup> 258.089, gefunden: 258.092 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Verhältnis der Protonensignale von **38a/38b**: 1/1.1.

*cis*-(3-Chlor-4-ethyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **38a**:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 4.93 (ddd,  $J$  = 3.9 Hz, 7.0 Hz, 10.1 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.45 (dd,  $J$  = 3.9 Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.26 (dd,  $J$  = 7.1 Hz, 12.0 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.34 (ddd,  $J$  = 5.1, 8.3, 9.9 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.54 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.31 (dt,  $J$  = 2.6 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.01 (t,  $J$  = 2.7 Hz, 1 H, C≡CH), 1.91-1.85 (m, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.80-1.54 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.12 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

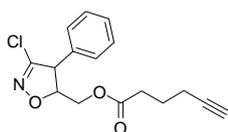
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 172.7 (C=O), 153.6 (N=C(Cl)), 83.0 (C≡CH), 81.8 (CHCH<sub>2</sub>O), 69.3 (C≡CH), 61.6 (CH<sub>2</sub>O), 52.2 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 18.8 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH), 12.3 (CH<sub>3</sub>).

*cis*-(3-Chlor-5-ethyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **38b**:

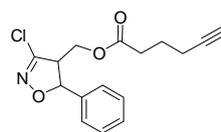
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 4.67 (ddd,  $J$  = 4.9 Hz, 9.0 Hz, 9.7 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.36 (dd,  $J$  = 6.1 Hz, 11.9 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.27 (dd,  $J$  = 4.0 Hz, 11.8 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.45 (ddd,  $J$  = 4.1 Hz, 6.1 Hz, 10.0 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 2.52 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.30 (dt,  $J$  = 2.6 Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.01 (t,  $J$  = 2.7 Hz, 1 H, C≡CH), 1.91-1.85 (m, 2H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.87-1.64 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.12 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 172.4 (C=O), 150.1 (N=C(Cl)), 85.9 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 82.9 (C≡CH), 69.3 (C≡CH), 58.6 (CH<sub>2</sub>O), 51.0 (CH-CH<sub>2</sub>O), 32.6 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.4 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 21.9 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 17.8 (CH<sub>2</sub>-C≡CH), 10.7 (CH<sub>3</sub>).

### 16.3.35 Synthese von *cis*-(3-Chlor-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **39a** und *cis*-(3-Chlor-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **39b**



**39a**



**39b**

Zur Synthese wurde der Alkohol **50a+b** (siehe Kapitel 16.3.27) verwendet und analog zur Synthese von **32** (siehe Kapitel 16.3.28) vorgegangen. Das Produkt (56.3 mg, 184.14  $\mu$ mol, 82.9%) wurde durch Säulenchromatographie mit *i*-Hexan/Ethylacetat (7:1) gereinigt.

$R_f = 0.29$  (*i*-Hexan/Ethylacetat (7:1)).

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{16}H_{17}^{37}ClNO_3^+$  (M+H)<sup>+</sup> 308.086, gefunden: 308.092 (M+H)<sup>+</sup>.

DEI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{16}H_{17}^{35}ClNO_3^+$  (M+H)<sup>+</sup> 306.089, gefunden: 306.089 (M+H)<sup>+</sup>.

*cis*-(3-Chlor-4-phenyl-2-isoxazolin-5-yl)methylhex-5-inoat **39a**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.43-7.35$  (m, 3 H, H<sub>arom</sub>), 7.23-7.21 (m, 2 H, H<sub>arom</sub>), 4.85 (ddd,  $J = 4.4$  Hz, 4.9 Hz, 7.3 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 4.38 (dd,  $J = 4.2$  Hz, 12.3 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.30 (dd,  $J = 5.0$  Hz, 12.1 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.24 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, CH-Phe), 2.52 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.27 (dt,  $J = 2.5, 6.7$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.98 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1 H, C≡CH), 1.86 ( $\psi$ -quint.,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 172.8$  (C=O), 151.5 (Cq), 135.4 (Cq), 129.5 (2x CH<sub>arom</sub>), 128.7 (CH<sub>arom</sub>), 127.8 (2x CH<sub>arom</sub>), 87.7 (CH-CH<sub>2</sub>O), 83.0 (C≡CH), 69.4 (C≡CH), 63.5 (CH<sub>2</sub>O), 58.8 (CH-Ph), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.3 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.7 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

*cis*-(3-Chlor-5-phenyl-2-isoxazolin-4-yl)methylhex-5-inoat **39b**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.43-7.35$  (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 5.53 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, CH-Phe), 4.45 (dd,  $J = 3.7$  Hz, 11.8 Hz, 1 H, C(H)HO), 4.37 (dd,  $J = 5.5$  Hz, 11.7 Hz, 1 H, C(H)HO), 3.57 (ddd,  $J = 3.7$  Hz, 5.5 Hz, 9.1 Hz, 1 H, CH-CH<sub>2</sub>O), 2.51 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>), 2.27 (dt,  $J = 2.6$  Hz, 6.9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.99 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, C≡CH), 1.85 ( $\psi$ -quint.,  $J = 7.1$  Hz, 2 H, C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 172.8$  (C=O), 148.6 (Cq), 138.3 (Cq), 129.1 (CH<sub>arom</sub>), 129.0 (2x CH<sub>arom</sub>), 125.9 (2x CH<sub>arom</sub>), 86.6 (CH-Phe), 83.0 (C≡CH), 69.4 (C≡CH), 60.7 (CH<sub>2</sub>O), 57.8 (CH-CH<sub>2</sub>O), 32.5 (C(O)-CH<sub>2</sub>), 23.3 (C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.7 (CH<sub>2</sub>-C≡CH).

## 16.4 Chemische Methoden

### 16.4.1 Photolyse des Phenacylestere **3**

50  $\mu$ l einer 2 mM (fc) Lösung des Phenacylestere **3** in 2 mM DTT/PBS oder in PBS gelöst wurden mit Licht einer Xe-Lampe bei einer Leistung von 350 W, 700 W oder 1000W unter

Verwendung eines  $\gamma\Phi c1$ -Filters, welcher für Licht von  $\lambda = 240$  bis  $400$  nm durchgängig ist, für  $15$  min oder  $30$  min bestrahlt. Zusätzlich war BSA ( $1$  mg/ml, fc) im Reaktionsansatz vorhanden. Nach Bestrahlung wurden die Ansätze mittels HPLC getrennt. (Säule: XBridge™ BEH130 C18  $5\mu\text{m}$  ( $4.6 \times 100$  mm), linearer Gradient:  $0$  bis  $95\%$   $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  mit  $0.1\%$  TFA in  $25$  min, Flussrate:  $0.5$  ml/min) gereinigt. Das Zerfallsprodukt **8** wurde bei  $53\%$   $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  ( $13.91$  min) eluiert wobei unbestrahlter Phenacylester **3** bei  $56\%$  ( $14.73$  min) eluiert wurden. Das Integral des Peaks von **8** wurde bestimmt und in Relation zum Kontrollpeak der unbestrahlten Verbindung **3** gesetzt. Dadurch war es möglich die prozentuale Effizienz der Photolysereaktion zu ermitteln (Tabelle 3).

Tabelle 3: Getestete Bedingungen zur Bestrahlung des Bausteins **3**. +: im Ansatz vorhanden, -: nicht im Ansatz vorhanden.

| Lampenleistung (W) | Zeitdauer (min) | DTT | BSA | Produktausbeute (%) |
|--------------------|-----------------|-----|-----|---------------------|
| 350                | 15              | -   | -   | $15 \pm 1.5$        |
| 350                | 15              | +   | -   | $75 \pm 2.5$        |
| 350                | 30              | +   | -   | $97 \pm 4.0$        |
| 350                | 30              | +   | +   | $98 \pm 1.5$        |
| 700                | 15              | -   | -   | $91 \pm 4.2$        |
| 700                | 15              | +   | -   | $98 \pm 1.5$        |
| 1000               | 15              | -   | -   | $97 \pm 1.6$        |
| 1000               | 15              | +   | -   | $96 \pm 3.6$        |
| 1000               | 30              | +   | +   | $99 \pm 2.5$        |

Die Fraktion des Zerfallsproduktes **8** der HPLC Trennung wurde mittels ESI-MS nachgewiesen.

ESI-MS: m/z berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}^{35}\text{ClN}_3\text{O}_3^-$  (M+Cl) $^-$   $308.079$ , gefunden:  $308.081$  (M+Cl) $^-$ .

ESI-MS: m/z berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}^{37}\text{ClN}_3\text{O}_3^-$  (M+Cl) $^-$   $310.076$ , gefunden:  $310.079$  (M+Cl) $^-$ .

### 16.4.2 Photolyse des Phenacyl Linkers 1 in Lösung

Phenacyl Linker 1 (5 nmol) wurde in 25  $\mu$ l DMSO/ 2 mM DTT in PBS (6/4) gelöst. Die Lösung wurde für 1 bzw. 5 min mit einer UV Handlampe (15 W, 254 nm) mit einem Abstand von 1 bzw. 20 cm bestrahlt. Unbestrahlter, gelöster Phenacyllinker (5 nmol) diente als Kontrolle. Der Überstände des Reaktions- und Kontrollansatzes wurden mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5  $\mu$ m (4.6 $\times$ 100 mm), linearer Gradient: 0 bis 95% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA in 25 min) analysiert. Das Spaltprodukt wurde bei 56.31% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O ( $t_R$ = 14.82 min) eluiert. Unbestrahlter Phenacyl linker wurde bei 62.98% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (16.573 min) eluiert. Um die Ausbeute an Spaltprodukt zu ermitteln, wurden die Integrale beider Peaks, welche den unbestrahlten bzw. bestrahlten Phenacyl Linker repräsentieren, miteinander gemäß Gleichung 1 ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Ausbeute an Spaltprodukt (\%)} = \frac{100 \cdot \int \text{bestrahltem Phenacyl Lin ker}}{\int \text{unbestrahltem Phenacyl Lin ker}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Bestrahlung für 5 min bei einem Abstand von 20 cm erzielte  $75 \pm 11\%$  an Spaltprodukt. Bestrahlung für 1 min bei einem Abstand von 1 cm erzielte  $89 \pm 2\%$  an Spaltprodukt. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>63</sub>H<sub>74</sub>N<sub>14</sub>O<sub>10</sub> (M+Formiat)<sup>-</sup>:1231.569, gefunden: 1231.564 (M+Formiat)<sup>-</sup>.

### 16.4.3 Photolyse des Phenacyl Linkers 1 an Avidin-Agarosebeads

Avidin-Agarosebeads (250  $\mu$ l Suspension) wurden mit PBS (3 $\times$ ) gewaschen und in PBS (700  $\mu$ l) suspendiert. Phenacyl Linker 1 (5 nmol) bzw. trifunktionaler Linker (eine Mischung von (5)-und (6)-Carboxytetramethyl Isomeren) (5 nmol), beide gelöst in DMSO/PBS (6/4) (49  $\mu$ l), wurden zugegeben. Die Suspension wurde für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Nach Waschen in PBS (3 $\times$ ) wurden die Beads in DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) (7.5 ml) resuspendiert. Phenacyllinker beinhaltende Beads wurden in 96-Well Plates verteilt (30  $\mu$ l pro Well) und für 1 min mit einer UV-Handlampe (15 W, 254 nm) bei einem Abstand von 1 cm

bestrahlt. trifunktionaler Linker beinhaltende Beads wurden für 7 min bei 96 °C inkubiert. Beide Überstände wurden lyophilisiert. Die Rückstände wurden in DMSO/H<sub>2</sub>O (6/4) (200 µl) gelöst und mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5µm (4.6x100 mm), linearer Gradient: 0 bis 95% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA in 25 min) analysiert. Das Spaltprodukt wurde bei 56.31% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (14.82 min) eluiert. Der trifunktionale Linker wurde bei 48.90% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (12.87 min) und 51.14% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (13.47 min) eluiert. Um die Ausbeute an Spaltprodukt (Gleichung 1) zu ermitteln, wurden die Integrale der Peaks, welche den unbestrahlten trifunktionalen Linker bzw. bestrahlten Phenacyl Linker repräsentieren, miteinander gemäß Gleichung 2 in Verhältnis gesetzt.

$$\text{Ausbeute an Spaltprodukt (\%)} = \frac{100 \cdot \int \text{bestrahltem Phenacyl Linker}}{\int \text{unbestrahltem Trifunktionaler Linker}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Bestrahlung erzielte  $69 \pm 4\%$  an Spaltprodukt im Vergleich zum hitzeabgespaltenem Produkt des trifunktionalen Linkers. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

ESI-MS: m/z berechnet für C<sub>63</sub>H<sub>74</sub>ClN<sub>14</sub>O<sub>10</sub> (M+Cl)<sup>-</sup>: 1221.541, gefunden: 1221.544 (M+Cl)<sup>-</sup>.

#### 16.4.4 Reinigung von N-(Lysyl)hexinamid durch den Phenacyl Linker 1

NHS-hexinoat **10** (32.5 nmol) and (L)-Lysin (130 nmol) wurden gelöst in 4 µl DMSO/PBS (1/4) und für 45 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 12.50 µl (DMSO/tBu(3/1))/PBS (4/1) wurde trifunktionaler Linker (650 nmol) oder Phenacyl Linker (650 nmol) zugegeben.

Außerdem wurden Ligand TBTA (143 nmol) und CuBr (143 nmol), beides unmittelbar vor Gebrauch in 4 µl DMSO/tBu (3/1) gelöst, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 35 min bei RT inkubiert. Gewaschene Avidin-Agarosebeads (100 µl Suspension) wurden in 240 µl (DMSO/tBu (3/1))/PBS (6/4) resuspendiert und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die Suspension wurde für 45 min bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit PBS (3x1ml), wurde die Photospaltung des Phenacyl Linkers durchgeführt: Die Beads wurden in 200 µl DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) suspendiert und für 7 min unter Verwendung einer Xe-Lampe (Thermo Oriel, Model 66921, P= 350 W bis 1000 W) mit yΦc2 Filter (τ >0.2 von 280 nm bis 380 nm) bestrahlt. Der Abstand zwischen Lampe und Probe betrug 10 cm. Trifunktionaler Linker

beinhaltende Beads wurden für 7 min bei 96 °C inkubiert. Die Überstände wurden direkt mittels HPLC (Säule: XBridge™ BEH130 C18 5µm (4.6x100 mm), linearer Gradient: 0 bis 95% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O mit 0.1% TFA in 25 min) analysiert. Das Photospaltprodukt wurde bei 51.91% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (13.66 min) und 55.10% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (14.50 min) eluiert. Der trifunktionale Linker wurde bei 48.26% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (12.70 min) und 51.11% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (13.45 min) eluiert. Jede Peakfraktion wurde von Hand gesammelt und mittels MALDI-MS analysiert, um die Identität der jeweiligen Verbindung aufzuklären. Das Photospaltprodukt, das bei 51.91% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (13.66 min) eluiert wurde, ist das Hydroxyketon Produkt. Das Photospaltprodukt, das bei 55.10% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (14.50 min) eluiert wurde, ist das Methylketon Produkt. Um die Gesamtausbeute an Spaltprodukt zu ermitteln, wurden die Integrale der Peaks, welche den unbestrahlten trifunktionalen Linker bzw. bestrahlten Phenacyllinker repräsentieren, miteinander gemäß Gleichung 2 in Verhältnis gesetzt. Die Bestrahlung erzielte 68 ± 6% an Photospaltprodukt im Vergleich zum hitzeabgespaltenem Produkt des trifunktionalen Linkers. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

MS (MALDI): m/z berechnet für das Methylketon Produkt C<sub>75</sub>H<sub>93</sub>N<sub>16</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup> (M)<sup>+</sup>: 1427.73, gefunden: 1426.99 (M)<sup>+</sup>.

MS (MALDI): m/z berechnet für das Hydroxyketon Produkt C<sub>75</sub>H<sub>94</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup> (M)<sup>+</sup>: 1443.72, gefunden: 1443.19 (M)<sup>+</sup>.

#### 16.4.5 **Reinigung von *N*-Benzylhexinamid durch den Phenacyl Linker 1**

Dieses Protokoll wurde durchgeführt wie in Kapitel 16.4.4 beschrieben. Benzylamin wurde statt L-Lysin verwendet. Das Photospaltprodukt wurde bei 60.15% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15.83 min) und 63.65% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (16.75 min) eluiert. Der trifunktionale Linker wurde bei 57.61% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15.16 min) und 59.89% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15.76 min) eluiert. Jede Peakfraktion wurde von Hand gesammelt und mittels MALDI-MS analysiert, um die Identität der jeweiligen Verbindung aufzuklären. Das Photospaltprodukt, das bei 60.15% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15.83 min) eluiert wurde, ist das Hydroxyketon Produkt. Das Photospaltprodukt, das bei 63.65% (v/v) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (16.75 min) eluiert wurde, ist das Methylketon Produkt. Um die Gesamtausbeute an Spaltprodukt zu ermitteln, wurden die

Integrale der Peaks, welche den unbestrahlten trifunktionalen Linker bzw. bestrahlten Phenacyllinker repräsentieren, miteinander gemäß Gleichung 2 in Verhältnis gesetzt. Die Bestrahlung erzielte  $70 \pm 16\%$  an Photospaltprodukt im Vergleich zum hitzeabgespaltenem Produkt des trifunktionalen Linkers. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

MS (MALDI): m/z berechnet für das Methylketon Produkt  $C_{76}H_{90}N_{15}O_{11}^+$  (M)<sup>+</sup>: 1388.69, gefunden 1388.13 (M)<sup>+</sup>.

MS (MALDI): m/z berechnet für das Hydroxyketon Produkt  $C_{76}H_{90}N_{15}O_{12}^+$  (M)<sup>+</sup>: 1404.68, gefunden 1404.23 (M)<sup>+</sup>.

#### 16.4.6 Reinigung von H30 Protein durch den Phenacyl Linker 1

In einem Reaktionsansatz wurden 32.25 pmol gereinigtes, rekombinantes H30 Protein (1 µg, 1 eq.; hergestellt und für dieses Experiment zur Verfügung gestellt von *Isabell Staub*) mit 500 pmol DEA Sonde (15.5 eq., hergestellt und für dieses Experiment zur Verfügung gestellt von *Isabell Staub*) versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 12.50 µl PBS wurde Phenacyl Linker 1 (650 pmol, 20.2 eq.) zugegeben. Außerdem wurden Ligand TBTA (143 nmol, 4434 eq.) und CuSO<sub>4</sub> (143 nmol, 4434 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 60 min bei RT inkubiert. Gewaschene Avidin-Agarosebeads (100 µl Suspension) wurden in 187.5 µl PBS resuspendiert und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die Suspension wurde für 45 min bei RT geschüttelt. Nach Waschen mit PBS (3×1ml), wurde die Photospaltung des Phenacyl Linkers durchgeführt: Die Beads wurden in 200 µl DMSO/ 2mM DTT in PBS (6/4) suspendiert und für 0.1 h, 0.5 h, 2 h, 3 h oder 12 h unter Verwendung einer Xe-Lampe (Thermo Oriel, Model 66921, P= 350 W bis 1000 W) mit  $\gamma\Phi c2$  Filter ( $\tau >0.2$  von 280 nm bis 380 nm) oder  $\gamma\Phi c1$  ( $\tau >0.2$  von 235 nm bis 410 nm) unter bestrahlt. Dabei stellte die ständige Zufuhr von Stickstoffgas sicher, dass alle Beads während der Bestrahlung ständig durchmischt wurden. Der Abstand zwischen Lampe und Probe betrug 10 cm. Nach Bestrahlung wurde der Überstand eines Bestrahlungsansatzes mit Probenpuffer (6×) versetzt, für 10 min bei 96 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die verbliebenen Beads wurden nach Waschen mit PBS (3×1ml) in 50 µl PBS resuspendiert mit 10 µl Probenpuffer (6×) versetzt, für 10 min bei 96 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Zudem

wurden mehrere Kontrollansätze erstellt: Ein Funktionskontrollansatz beinhaltete diesselben Mengen und Arten der Reagenzien eines Reaktionsansatzes. Auch die Durchführung war analog zum Reaktionsansatz. Allerdings wurde H30 Protein nicht durch Photolyse, sondern durch Hitzedenaturierung (10 min, 96 °C) von den Avidin Agarose Beads abgespalten. Der Überstand nach Hitzeabspaltung wurde mit Probenpuffer (6×) versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Der Kontrollansatz zur Überprüfung der unspezifischen H30 Anreicherung an Avidin Agarose Beads beinhaltete diesselbe Menge und an H30 Protein eines Reaktionsansatzes. Jedoch beinhaltete er weder DEA-Sonde noch Phenacyl Linker 1 oder Click Chemikalien. Bei der Inkubation des H30 Proteins mit den Avidin Agarose Beads und der Durchführung der nachfolgenden Wasch- und Hitzeabspaltungsschritte wurde analog zur Handhabung eines Reaktionsansatzes verfahren. Der Überstand nach Hitzeabspaltung wurde mit Probenpuffer (6×) versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Kontrolle zur Untersuchung der unspezifischen Abspaltung von festphasengebundenen H30 Protein von den Beads beinhaltete diesselben Mengen und Arten der Reagenzien eines Reaktionsansatzes. Auch die Durchführung war analog zum Reaktionsansatz. Allerdings wurde dieser Kontrollansatz nicht bestrahlt, sondern in Dunkelheit unter Stickstoffzufuhr durchmischt. Nach Durchmischung wurde der Überstand eines Kontrollansatzes mit Probenpuffer (6×) versetzt, für 10 bei 96 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die verbliebenen Beads wurden nach Waschen mit PBS (3×1ml) in 50 µl PBS resuspendiert mit 10 µl Probenpuffer (6×) versetzt, für 10 min bei 96 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

## 16.5 Biochemische und Molekularbiologische Methoden

### 16.5.1 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen für die Arbeit mit Bakterienkulturen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert (Porengröße 0.2 µm). Der pH-Wert einer Lösung wurde mit 2 M HCl oder 2 M NaOH eingestellt. pH-Werte der Lösungen sind, falls nicht anders vermerkt, immer für eine Temperatur von 25 °C angegeben.

### 16.5.1.1 Lösungen

|   |   |
|---|---|
| Kanamycin-Stammlösung:                    | 25 mg ml <sup>-1</sup> , sterilfiltriert.   |
| Ampicillin-Stammlösung:                   | 100 mg ml <sup>-1</sup> , sterilfiltriert.  |
| Carbenicillin-Stammlösung:                | 100 mg ml <sup>-1</sup> , sterilfiltriert.  |
| Anhydrotetracyclin:                       | 2 g/l in DMF, sterilfiltriert.  |
| Rhodaminazid-Stammlösung:                 | 193 mM in Methanol.   |
| trifunktionaler Linker-Stammlösung:       | 10 mM in DMSO.  |
| Phenacyl Linker <u>1</u> -Stammlösung:    | 10 mM in DMSO.  |
| Ligand TBTA-Stammlösung:                  | 17.7 mg TBTA in 400 µl DMSO.  |
| CuSO <sub>4</sub> -Stammlösung:           | 50 mM.  |
| APS Stammlösung:                          | 10% (m/v).  |
| Coomassie Färbelösung:                    | 0.25% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 9.2% (v/v) Essigsäure (konz.), 45.4% (v/v) Ethanol (abs.). |
| Coomassie Entfärbelösung:                 | 10% (v/v) Essigsäure (konz.), 20% (v/v) Ethanol (abs.).   |
| SDS-Stammlösung:                          | 10% (m/v).  |
| Trypsin-Stammlösung für<br>Proteinverdau: | 20µg in 50 mM Essigsäure (40 µl).   |

### 16.5.1.2 Puffer

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| PBS:                          | 136.9 mM NaCl, 10.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4. |
| DNA Auftragspuffer (6×):      | Bromphenolblau (250 mg), Xylencyanol (250 mg), Tris 100mM Lsg. (33 ml), Glycerin (60 ml), H <sub>2</sub> O (7 ml).     |
| Puffer E:                     | 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM Desthiobiotin, pH 8.0 (4 °C).  |
| Puffer W:                     | 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (4 °C).  |
| Sammelgelpuffer für SDS-PAGE: | 0.5 M Tris, pH 6.8.  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Trenngelpuffer für SDS-PAGE: | 3.0 Tris, pH 8.8.  |
| SDS Probenpuffer (6×):       | 189 mM Tris-HCl, 30% (v/v) Glycerin, 6% (m/v) SDS, 0.0075% (m/v) Bromphenolblau. |
| SDS Probenpuffer (2×):       | 63 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Glycerin, 2% (m/v) SDS, 0.0025% (m/v) Bromphenolblau.  |
| SDS Laufpuffer (1×):         | 24.8 mM Tris, 191.8 mM Glycin, 3.5 mM SDS, pH 8.3.                               |
| TAE Puffer (50×):            | 2.0 M Tris, 1.0 M Essigsäure, 0.1 M EDTA, pH 7.0.                                |
| Laufpuffer für Agarosegele:  | TAE Puffer (0.5×).   |
| Puffer für Agarosegele:      | TAE Puffer (1×).   |
| TE Puffer:                   | 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0.   |

### 16.5.1.3 Flüssigmedien

|             |  |
|-------------|--|
| LB Medium:  | 10g/l tryptisch verdautes Casein, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5. |
| BHB Medium: | 37 g Hirn-Herz Bouillon (Fluka) ad 1 l                                   |

### 16.5.1.4 Festmedium

|                 |   |
|-----------------|---|
| LB-Agarplatten: | LB Medium (500 ml, 16.5.1.3) mit Agar Agar (7.5 g) autoklaviert, nach Abkühlen ggf. mit Antibiotika-Stammlösung (siehe Kapitel 16.5.1.1) versetzt |
|-----------------|---|

### 16.5.2 Verwendete Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind all in dieser Arbeit verwendeten Bakterienspezies mit ihren zugehörigen Stämmen und deren Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

| Spezies                           | Stamm                | Bezugsquelle                 |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|
| <b><u>nicht-pathogen (S1)</u></b> |                      |                              |
| <i>Bacillus licheniformis</i>     | ATCC 14580           | DSMZ, Deutschland            |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | 168                  | DSMZ, Deutschland            |
| <i>Escherichia coli</i>           | K12                  | DSMZ, Deutschland            |
|                                   | BL21                 | Novagen, Deutschland         |
|                                   | Top10                | Invitrogen, Deutschland      |
| <i>Listeria welshimeri</i>        | SLCC 5334 serovar 6b | DSMZ, Deutschland            |
| <i>Pseudomonas putida</i>         | KT2440               | ATCC, USA                    |
| <b><u>pathogen (S2)</u></b>       |                      |                              |
| <i>Listeria monocytogenes</i>     | F2365                | Institut Pasteur, Frankreich |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | PAO1                 | Institut Pasteur, Frankreich |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | NCTC 8325            | Institut Pasteur, Frankreich |
|                                   | Mu50 (ATCC 700699)   | Institut Pasteur, Frankreich |

### 16.5.3 Kultivierung verwendeter Bakterien

Bakterien der Gattung *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Staphylococcus* wurden in LB Medium kultiviert. Bakterien der Gattung *Listeria* wurden in BHB Medium kultiviert. Das Wachstum erfolgte soweit nicht anders vermerkt bei 37 °C unter Schütteln (225 rpm). Es wurde nicht kontinuierlich kultiviert: Jede Übernachtskultur (16 Stunden Inkubation) wurde

aus ihrem entsprechenden Kryostock angeimpft. Jede Expressionskultur wurde aus ihrer zugehörigen Übernachtskultur angeimpft (1:100). Soweit erforderlich wurden transformierte *E. coli* B121 und *E. coli* Top10 in antibiotikahaltigem LB Medium kultiviert.

#### **16.5.4 Herstellung eines Kryostocks**

600 µl einer Übernachtskultur wurden mit 300 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

#### **16.5.5 Proteompräparation bakterieller Proteome**

Für die *in vitro* Markierungsexperimente wurden die Proteome verschiedener Bakterienstämme wie folgt hergestellt: Unter Verwendung einer entsprechenden Cryostock-Lösung wurden Übernachtskulturen (2×, 5 ml) angeimpft. Diese wurden für 16 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde zum Animpfen einer Flüssigkultur (1 l, LB oder BHB Medium) verwendet. Pro Liter Flüssigkultur wurden 10 ml Übernachtskultur verwendet. Die Flüssigkultur wurde für 16 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 1 Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 rpm, SLA-3000, 5 min) pelletiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und in 15 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mittels FRENCH<sup>®</sup> Press mit zugehöriger Druckzelle (Thermo Fisher Scientific) lysiert (5×, 500 bis 1200 psi, 4 °C). Zellfragmente und unlysierte Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, SLA-3000, 5 min) abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (18000 rpm, SS-34, 30 min). Der Überstand (entspricht cytosolischer Fraktion) wurde abgenommen. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert (entspricht Membranfraktion). Die Proteinkonzentration beider Fraktionen wurde mittels Bradford-Test ermittelt. Lag die Proteinkonzentration einer Fraktion unter 1 mg/ml, so wurde sie mit Hilfe von Amicon Zentrifugenröhrchen ankonzentriert. Alle Proteome wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 16.5.6 Proteompräparation aus HeLa-Zellen

HeLa Zellen (4. Passage, Kryostock von AK Carell) wurden in Antibiotikum-Antimycotikum-haltigem 10% (v/v) FBS/DMEM Medium (50 ml) resuspendiert und in Zellkulturflaschen (T-175) steril kultiviert (37 °C, 5.0% CO<sub>2</sub>). Bei Erreichen von ~ 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert (2×). Bei Erreichen von 95% Konfluenz wurden die Zellen wie folgt geerntet (7. Passage): Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit DBPS (2×, je 10 ml) gewaschen und mit Trypsinlösung (3 ml/Flasche) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation (37 °C, 5.0% CO<sub>2</sub>) wurde DMEM Medium (20 ml) zugegeben. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in DPBS (10 ml) resuspendiert und zentrifugiert (1000 rpm, 1 min). Das Pellet ( $27.4 \cdot 10^6$  Zellen) wurden in PBS (15 ml) resuspendiert und mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 4×15 s, 80% Leistung, Modus 5) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert (TLA-05 Rotor, 55000 rpm, 45 min). Der Überstand (entspricht derb cytosolischen Fraktion) wurde abgenommen. Das Pellet wurde in PBS (1 ml) resuspendiert (entspricht der Membranfraktion). Die Proteinkonzentration beider Fraktionen wurde ermittelt (siehe Kapitel 16.5.7). Die Fraktionen wurden bei -80 °C gelagert.

### 16.5.7 Bradford-Test

Roti<sup>®</sup>-Quant Stammlösung wurde 1:4 (v/v) mit deionisiertem H<sub>2</sub>O verdünnt und filtriert. Je 2 ml dieser Verdünnung wurden mit 40 ml Proteinlösung versetzt, gemischt und nach 2 min die Absorption der Mischung bei  $\lambda = 595$  nm gemessen. Als Proteinlösung wurde entweder Proteomlösung (siehe Kapitel 16.5.5) oder eine BSA-Eichlösung verwendet. BSA-Eichlösungen wurden unter Verwendung einer BSA-Stammlösung in H<sub>2</sub>O (2 mg/ml) wie folgt erstellt (Tabelle 5):

Tabelle 5: Herstellung der BSA-Eichlösungen.

| BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ ) | BSA-Stammlösung ( $\mu\text{l}$ ) |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 0.00                              | 40                                 | 0                                 |
| 0.25                              | 35                                 | 5                                 |
| 0.50                              | 30                                 | 10                                |
| 0.75                              | 25                                 | 15                                |
| 1.00                              | 20                                 | 20                                |
| 1.50                              | 10                                 | 30                                |

## 16.5.8 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 16.5.8.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden die in Tabelle 6 angegebenen Volumina verwendet. In der Regel wurden 10%ige Gele für alle Anwendungen hergestellt und verwendet.

Tabelle 6 Eingesetzte Volumina zur Herstellung von Polyacrylamidgelen.

| Acrylamid (%)    | H <sub>2</sub> O (ml) | Rotiphorese Gel 30 (ml) | Puffer (ml) | 10% (v/v) SDS/H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ ) | 10% (m/v) APS/H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ ) | TEMED ( $\mu\text{l}$ ) |
|------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|--|--|-------------------------|
| <b>Trenngel</b>  |                       |                         |             |  |  |                         |
| 10.0             | 14.4                  | 12.0                    | 9.0         | 360.0  | 150  | 15                      |
| 12.5             | 11.4                  | 15.0                    | 9.0         | 360.0  | 150  | 15                      |
| <b>Sammelgel</b> |                       |                         |             |  |  |                         |
| 3.75             | 7.35                  | 1.5                     | 3.0         | 120.0  | 60.0   | 12.0                    |

### 16.5.8.2 Durchführung der SDS-PAGE und Fluoreszenzaufnahme eines Gels

Analytische und präparative Gele wurden nach Probenauftragung in einer Gelelektrophoreseapparatur (peQLab, Modell 45-2020-i) unter Wasserkühlung bei 55 mA unter Anpassung der Spannung mit einer Consort EV261 Spannungsquelle betrieben. Bei analytischen Gelen dauerte der Trennvorgang 1.25 Stunden. Bei präparativen Gelen dauerte der Trennvorgang 6 bis 7 Stunden. Die Fluoreszenzaufnahme von SDS-Gelen erfolgte mit einem Fujifilm LAS-4000 Luminiscent Image Analyzer mit einer Fujinon VRF43LMD3 Linse und einem 575DF20 Filter oder mit einer Fujifilm LAS-3000 Fluoreszenz Dunkelkammer mit Fujinon VRF43LMD Linse, 605DF40 Filter und 520 nm EPI Anregungswellenlänge.

### 16.5.9 Präparation genomischer DNA

Bakterielle, genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Hierfür wurde eine Übernachtskultur (5 ml) des jeweiligen Bakterienstammes verwendet.

### 16.5.10 PCR

#### 16.5.10.1 Primerdesign

Das Primerdesign geschah gemäß Gateway<sup>®</sup> Technologie. Hierfür wurden die notwendigen *attb* Sequenzen berücksichtigt und an die jeweiligen 5'-Primerenden angefügt. Dabei wurde die *attb1* Sequenz (5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3') dem *vorwärts* Primer bzw. die *attb2* Sequenz (5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3') dem *rückwärts* Primer angefügt. Die Schmelztemperatur der Primer wurde aus deren Sequenzlänge und deren GC ohne die flankierenden *attb* Sequenzen ermittelt. Die maximale Schmelztemperaturdifferenz eines Primerpaares betrug 0.5 °C. Die Primer wurden Oligonukleotide von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert und

als Lösung (100 pmol/μl) erhalten. Alle in dieser Arbeit enthaltenen Primer sind in der nachfolgend aufgeführt.

NagZ aus *E. coli* K12

*vorwärts* Primer: 5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TGT GGG TCC AGT AAT GTT GGA-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GTG ACC TGC TTT CTC TTC C-3'

LacZ aus *E. coli* K12

*vorwärts* Primer: 5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAC CAT GAT TAC GGA TTC ACT-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTT TTG ACA CCA GAC CAA CTG-3'

YihQ aus *E. coli* K12

*vorwärts* Primer: 5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GGA TAC GCC ACG TCC ACA-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GAT GCT TTT TAA CGA CGC GAA C-3'

1-Pyrroline-5-carboxylat Dehydrogenase (PCDH) aus *B. licheniformis*

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAC AAC ACC TTA CAA ACA C-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA AAA CAT TTC GCT GAT CGT TTT-3'

Aldehyd Acohol Dhydrogenase Potein (AADH) aus *L. welshimeri*

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GGC AAT TAA AGA AAA TGC GGC-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA AAC CCC TTT GTA AGC TTC AA-3'

3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase 3 (FabH) aus *L. welshimeri*

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAA CGC AGG AAT TTT AG-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTT ACC CCA ACG AAT AAT-3'

Aldehyd Dehydrogenase (ADH) aus *P. putida*

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAC CAC CCT GAC CC-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA CAG CTT GAT CCA GGT C-3'

Aldehyd Dehydrogenase (AldA) aus *S. aureus* NCTC

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GGC AGT AAA CGT TCG A-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CTA GTA CAA ACC TTT TAA AGC-3'

Aldehyd Dehydrogenase (ADH) aus *S. aureus* NCTC

*vorwärts* Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAA TAT CAT TGA GCA AAA ATT TT-3'

*rückwärts* Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA ATT TTT AAA GAA AGC TTT GAT G-3'

### 16.5.10.2 Durchführung der PCR

Die PCR wurde unter Verwendung eines Accu Prime™ Pfx DNA Polymerase Kits entweder durch Zugabe isolierter genomischer DNA (siehe Kapitel 16.5.9) oder durch Zugabe intakter Bakterien aus Kryostocks (*Colony PCR*) durchgeführt. Standardmäßig wurden drei Endmengen an genomischer DNA (10, 30 und 50 ng) verwendet. Die Primerlösungen (siehe Kapitel 16.5.10.1) wurden unmittelbar vor Gebrauch mit deionisiertem Wasser auf 10 pmol/μl verdünnt. Die Zusammensetzung eines PCR-Standardansatzes ist in Tabelle 7 wiedergegeben:

## Experimenteller Teil

Tabelle 7 Zusammensetzung eines PCR-Standardansatzes.

| eingesetztes Volumen ( $\mu\text{l}$ ) | Komponente   |
|--|--|
| 2.5                                    | <i>Pfx</i> Puffer (10 $\times$ )                         |
| 11.5                                   | deionisiertes Wasser                                     |
| 1.0                                    | genomische DNA bzw. Kryostock                            |
| 4.0                                    | <i>vorwärts</i> Primer-Lösung (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )  |
| 4.0                                    | <i>rückwärts</i> Primer-Lösung (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) |
| 2.0                                    | <i>Pfx</i> DNA Polymerase                                |

Die PCR wurde mit Hilfe eines PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des nachfolgenden Protokolls (Tabelle 8) durchgeführt.

Tabelle 8 PCR-Standardtemperaturprotokoll.

| Programmschritt | Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Zeitdauer (min)  | Anzahl an Wiederholungen<br>(bestimmter<br>Programmschrittabfolgen) |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|---|
| 1.              | 96                                | 1:30             | 1   |
| 2.              | 94                                | 0:10             | 4 (von 2. bis 4.)   |
| 3.              | $T_m-2$                           | 0:15             | 4 (von 2. bis 4.)   |
| 4.              | 68                                | 1:00 pro 1000 bp | 4 (von 2. bis 4.)   |
| 5.              | 94                                | 0:10             | 6 (von 5. bis 7.)   |
| 6.              | $T_m-2$ und -0.2 pro<br>Zyklus    | 0:15             | 6 (von 5. bis 7.)   |
| 7.              | 68                                | 1:00 pro 1000 bp | 6 (von 5. bis 7.)   |
| 8.              | 96                                | 0:10             | 30 (von 8. bis 11.)   |
| 9.              | $T_m-0.5$                         | 0:15             | 30 (von 8. bis 11.)   |
| 10.             | 68                                | 1:00 pro 1000 bp | 30 (von 8. bis 11.)   |
| 11.             | 68                                | 7:00             | 30 (von 8. bis 11.)   |
| 12              | 4                                 | halten           | 1   |

## 16.5.11 Agarose Gelektrophorese

### 16.5.11.1 Herstellung von Agarosegelen

500 mg Agarose wurden in 50 ml TAE Gelpuffer (1×) suspendiert und mittels Mikrowelle solange erwärmt, bis sich die Agarose löste. 10 µl einer 1 g/l Ethidiumbromidlösung/H<sub>2</sub>O wurden zugegeben. Die Lösung (etwa 70 °C) wurde in den Gelträger mit engem Taschenmesser gegossen. Das Gel härtete für 30 min bei RT aus.

### 16.5.11.2 Durchführung der Agarosegelektrophorese und Fluoreszenzaufnahme eines Gels

Die Auftrennung der Probe wurde in einem B1A Gelektrophoresesystem (Owl Separation Systems, Portsmouth, USA) bei 95 V unter Angleichung der Stromstärke für 1 Stunde durchgeführt. Die DNA Banden wurden mit Hilfe eines IDA Image Documentation & Analysis Systems (raytest GmbH, Deutschland) bei 254 nm oder 312 nm visualisiert. Nach Trennungen im präparativen Maßstab wurde ausschließlich bei 312 nm für nicht länger als 15 s visualisiert. Gegebenfalls wurden DNA Banden auf gewünschter Laufhöhe mit einem Skalpell ausgeschnitten.

## 16.5.12 Agarose Gelbandenextraktion

Die DNA der ausgeschnittenen Agarosebanden (siehe Kapitel 16.5.11.2) wurde mit einem E.Z.N.A. MicroElute<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross, USA) extrahiert. Hierfür wurde gemäß Herstellerprotokoll vorgegangen: Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden mit einer ihrer Masse entsprechenden Volumen an *Binding Buffer* versetzt und für 7 min bei 60 °C inkubiert. Von Zeit zu Zeit wurden die Proben geschüttelt. Die Lösung wurde auf MicroElute<sup>®</sup> HighBind<sup>®</sup> DNA Säulen gegeben und für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit *XP2 Binding Buffer* (1×, 300 µl), *SPW Wash Buffer* (2×, je 700 µl) gewaschen. Nach Trocknen der Säule durch Zentrifugation

(2 min, 13000 rpm), wurde diese auf ein neues 1.5 ml Eppendorf Gefäß gesteckt und mit *Elution Buffer* (1×, 20 µl) für 2 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugieren (1 min, 13000 rpm) erhielt man eine DNA Lösung. Deren Konzentration wurde mittels NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (peQLab) durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 260$  nm ermittelt.

### 16.5.13 BP Reaktion

Die BP Reaktion wurde unter Verwendung des Gateway® BP Clonase II Enzym Mix durchgeführt. Hierbei wurde nach Herstellervorschrift verfahren: In die BP Reaktion wurden 100 fmol des jeweiligen gereinigten *attb* PCR Produkts (siehe Kapitel 16.5.12) eingesetzt. Zur Berechnung der entsprechenden Menge DNA in ng, wurde die Gleichung 3 verwendet:

$$m = N [bp] \cdot 0.666 [ng \cdot bp^{-1}] \quad \text{Gleichung 3}$$

$N$  entspricht der Länge des *attb* PCR Produktes in bp. Ein Standardansatz beinhaltete 100 fmol attB PCR Produkt, 50 fmol pDONP™201 Vektor sowie 2 µl Gateway® BP Clonase II Enzym Mix. Er wurde mit TE Puffer auf sein Gesamtvolumen von 11 µl ergänzt. Die Reaktion inkubierte mindestens 6 Stunden bei RT. Ein Abbruch der Reaktion durch Proteinase K Zugabe war nicht erforderlich.

### 16.5.14 LR Reaktion

Für die LR Reaktionsansatz beinhaltete 150 ng pDONR™201 Vektor, 150 ng pDEST007 und 2 µl des Gateway® LR Clonase II Enzym Mix. Er wurde mit TE Puffer auf sein Gesamtvolumen von 11 µl ergänzt. Die Reaktion inkubierte mindestens 6 Stunden bei RT. Ein Abbruch der Reaktion durch Proteinase K Zugabe war nicht erforderlich.

### 16.5.15 Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmiden erfolgte mittels E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I (D6943, Omega Bio-tek, Norcross, USA) aus je 5 ml Übernachtskultur der jeweiligen Klone. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (9000 rpm) pelletiert und in 250 µl Lösung I (RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung II und 3 min Inkubation bei RT, wurden 350 µl Lösung III zugegeben. Die Mischung inkubierte 10 min auf Eis. Das weiße Präzipitat wurde für 10 min bei 13000 rpm und RT pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte E.Z.N.A.<sup>TM</sup> High Bind<sup>®</sup> DNA Minisäule gegeben und zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Diese Säule wurde im Vorfeld durch Versetzen mit 100 µl Äquilibrierungspuffer und Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) äquilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit Puffer HB (1×, 500 µl), Waschpuffer (2×, je 700 µl) gewaschen. Die Säule wurde durch Zentrifugation (2 min, 13000 rpm) getrocknet. Zur Elution wurde die Säule auf ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, mit Elutionspuffer (1×, 30 µl) versetzt und zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Die Konzentration der erhaltenen DNA Lösung wurde mittels NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spektrophotometer (peQLab) durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 260$  nm ermittelt.

### 16.5.16 Vektortransformation

Die Transformation des jeweiligen Vektors erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* Zellen. Hierfür wurden 5 µl eines Klonierungsansatzes zu je 100 µl auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Mischung inkubierte für 20 min auf Eis, 45 s bei 42 °C im Wasserbad und 5 min auf Eis bevor 400 µl LB Medium (37 °C) zugegeben wurde. Die Bakteriensuspension wurde 1 Stunde bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten mit LB Medium und 25 µg ml<sup>-1</sup> Kanamycin oder 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin ausplattiert.

### 16.5.17 Analytische *in vitro* Proteommarkierung

Ein Testansatz (50 µl Gesamtvolumen) enthielt Proteom (1 mg/ml, fc) und ABPP Sonde (1 µl) in gewünschter Konzentration. Beides wurde zunächst mit PBS in einem Volumen von

43  $\mu\text{l}$  gemischt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Bei der Erstellung von Hitzekontrollansätzen wurde analog verfahren. Zusätzlich beinhalteten diese Kontrollansätze 0.86% (m/v) SDS. Jedoch wurde die SDS-haltige Proteomlösung vor Sondenzugabe 7 min bei 99 °C inkubiert. Die Sonde wurde erst nach Abkühlen auf RT zu den Kontrollansätzen pipettiert. Zu allen Ansätzen wurde Rhodaminazid (13  $\mu\text{M}$ , fc), frisch angesetztes TCEP in  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mM, fc) und (1 $\times$ , 100.0  $\mu\text{M}$ , fc) und  $\text{CuSO}_4$  (1 mM, fc) zugegeben. Alle Ansätze wurden 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Zugabe von SDS Auftragspuffer (2 $\times$  oder 6 $\times$ ) wurden die Proben ggf. bei -21 °C gelagert und anschließend mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### 16.5.18 Präparative *in vitro* Proteommarkierung

Ein Testansatz (2 ml Gesamtvolumen) enthielt Proteom (1 mg/ml, fc) und ABPP Sonde (2  $\mu\text{l}$ ) in gewünschter Konzentration. Beides wurde zunächst in PBS in einem Volumen von 1.892 ml gemischt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Kontrollansätze wurden analog erstellt, beinhalteten jedoch DMSO (2  $\mu\text{l}$ ) anstatt ABPP Sonde. Trifunktionaler Linker (30  $\mu\text{M}$ , fc), TCEP (0.52 mM, fc), Ligand (50  $\mu\text{M}$ , fc) und  $\text{CuSO}_4$  (0.5 mM, fc) wurden zu jedem Ansatz zugegeben. Alle Ansätze inkubierten für 1 Stunde bei RT. Jeder Ansatz wurde auf 2 $\times$ 500  $\mu\text{l}$  aufgeteilt und mit je 500  $\mu\text{l}$  Aceton (4 °C) versetzt. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurden alle Proben zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Methanol (je 200  $\mu\text{l}$ , 4 °C) mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 7 s, 10% Leistung, Modus 5) resuspendiert. Alle Proteinsuspensionen eines Ansatzes wurden vereinigt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Jedes Pellet wurde in Methanol (je 200  $\mu\text{l}$ , 4 °C) mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 7 s, 10% Leistung, Modus 5) resuspendiert. Alle Proteinsuspensionen eines Ansatzes wurden vereinigt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0.4% (m/v) SDS in PBS (je 1 ml) mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 7 s, 40% Leistung, Modus 5) gelöst. Die Lösung wurde zu Avidin-Agarosebead Suspension (50  $\mu\text{l}$  Suspension der Firma Sigma-Aldrich) pipettiert. Diese Suspension wurde im Vorfeld mit PBS (3 $\times$ , je 1 ml) gewaschen. Dabei wurden die Beads nur für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Proteom/Beads-Suspension wurde für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Dabei sanken die Beads nicht ab. Die Beads aller Ansätze wurden mit 0.4% (m/v) SDS in PBS (3 $\times$ , je 1 ml), 6 M Harnstoff in  $\text{H}_2\text{O}$  (2 $\times$ , je 1 ml) und PBS (3 $\times$ , je 1 ml)

gewaschen. Dabei wurden die Beads nur für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Beads jedes Ansatzes wurden in je 50 µl SDS Probenpuffer (2×) resuspendiert und für 7 min bei 99 °C inkubiert. Die Beads wurden pelletiert (13000 rpm, 2 min). Der jeweilige Überstand wurde abgenommen, bei -80 °C gelagert und anschließend mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### **16.5.19 Analytische *in vitro* Proteommarkierung mit der Sonde 15**

Der Versuch wurde gemäß 16.5.17 durchgeführt. Es wurden die Proteome (siehe Kapitel 16.5.5) von *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *E. coli*, *P. putida*, *L. welshimeri*, *S. aureus* NCTC und Mu50 (siehe Kapitel 16.5.2) und von HeLa Zellen (siehe Kapitel 16.5.7) verwendet. Die Sondenkonzentration 15 betrug 50 µM (fc). Alle Ansätze wurden während des Sondeninkubationschrittes 1 Stunde mit  $\lambda = 366$  nm auf Eis bestrahlt (15W, 1cm Abstand). Zur Probenauftrennung wurde jeweils ein 12.5%iges PAA-Gel (siehe Kapitel 16.5.8) verwendet.

### **16.5.20 Analytische *in vivo* Proteommarkierung**

2 ml stationärer Bakterienkultur von *Pseudomas putida*, *Bacillus licheniformis* and *Listeria welshimeri* oder 1 ml stationärer Kultur von *Staphylococcus aureus* NCTC und *Staphylococcus aureus* Mu50 wurden zentrifugiert (5 min, 16200 g). Die Zellen wurden mit PBS (2×, je 1 ml) gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Zu jedem Testansatz wurde Sonde hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert. Dabei wurden die Zellen von Zeit zu Zeit resuspendiert, um deren Pelletierung zu verhindern. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 16200 g) und mit PBS (3×, je 1 ml) gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert. Alle Zellen wurden getrennt mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 3 x 10 s, 60% Leistung, Modus 5) bei 4 °C lysiert. Alle Lysate wurden zentrifugiert (10 min, 16200 g). 43 µl des jeweiligen Überstandes (entspricht der cytosolischen Fraktion) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Rhodaminazid (13.0 µM, fc), TCEP (1.04 mM, fc), Ligand (100.0 µM, fc) und CuSO<sub>4</sub> (1.00 mM, fc) versetzt. Alle Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µl

Probenpuffer (2×) wurden jeweils zugegeben. 50 µl jedes Ansatzes wurden mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### 16.5.21 Präparative *in vivo* Proteommarkierung

10 ml stationärer Kultur von *Pseudomas putida*, *Bacillus licheniformis* und *Listeria welshimeri* oder 5 ml stationärer Kultur von *Staphylococcus aureus* NCTC und *Staphylococcus aureus* Mu50 wurden zentrifugiert (5 min, 16200 g). Die Zellen wurden mit PBS (1 ml) gewaschen bevor sie in 500 µl PBS resuspendiert wurden. Zu jedem Testansatz wurde Sonde hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert. Dabei wurden die Zellen von Zeit zu Zeit resuspendiert, um deren Pelletierung zu verhindern. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 16200 g) und mit PBS (3×, je 1 ml) gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert. Alle Zellen wurden getrennt mittels Ultraschall (Bandelin Sonopuls, 15 x 10 s, 60% Leistung, Modus 5) bei 4 °C lysiert. Jedes Lysat wurde mit Rhodamin Azid (3.59 µM, fc), TCEP (0.96 mM, fc), Ligand (92.08 µM, fc) und CuSO<sub>4</sub> (0.92 mM, fc) versetzt. Die Ansätze wurden 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl eiskaltem Aceton zu jedem Ansatz, wurden die Ansätze 15 min in Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 16200 g, 4 °C). Die Pellets wurden mit MeOH (2×, je 500 µl) gewaschen. Die Pellets wurden in 0.4% (m/v) SDS in PBS (je 1 ml) bei RT gelöst. 50 µl dieser Lösung wurde entfernt und mit 50 µl Probenpuffer (2×) versetzt, um später als Anreicherungskontrolle zu dienen. Die verbliebenen 950 µl wurden mit Avidin-Agarosebeads (50 µl Suspension) versetzt. Diese wurden zuvor mit PBS (3×, je 1 ml) gewaschen. Die Suspension wurde für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Die Beads wurden durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 400 g) und mit 0.4% SDS in PBS (3×, je 1ml), 6 M Harnstoff (2×, je 1 ml) und PBS (3×, je 1ml) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Die Beads wurden jeweils in 50 µl Probenpuffer (2×) resuspendiert. Alle Ansätze wurden für 6 min bei 99 °C inkubiert. Alle Ansätze wurden zentrifugiert (1 min, 16200 g). 50 µl jedes Kontroll- und Testansatzes wurden mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### **16.5.22 Analytische *in vitro* Proteommarkierung mit den Sonden 13, 14 und 15**

Der Versuch wurde gemäß 16.5.17 durchgeführt. Es wurde Proteom (siehe Kapitel 16.5.5) von *S. aureus* NCTC und Mu50 (siehe Kapitel 16.5.2) verwendet. Die Sondenkonzentration von 13, 14 und 15 betrug je 50  $\mu\text{M}$  (fc). Alle Ansätze wurden während des Sondeninkubationschrittes 1 Stunde mit  $\lambda = 366 \text{ nm}$  auf Eis bestrahlt (15 W, 1 cm Abstand).

### **16.5.23 Präparative *in vitro* Proteommarkierung mit der Sonde 15**

Der Versuch wurde gemäß 16.5.18 durchgeführt. Es wurde das Proteom (siehe Kapitel 16.5.5) von *E. coli*, *S. aureus* NCTC und Mu50 (siehe Kapitel 16.5.2) verwendet. *E. coli*-haltige Ansätze und *S. aureus*-haltige Ansätze beinhalteten 15 (50  $\mu\text{M}$ , fc). Alle Ansätze wurden während des Sondeninkubationschrittes 1 Stunde mit  $\lambda = 366 \text{ nm}$  auf Eis bestrahlt (15 W, 1cm Abstand). Zur Probenauffrennung wurde jeweils ein 10.0%iges PAA-Gel (siehe Kapitel 16.5.8) verwendet. Gelbanden von Zielproteinen wurden gereinigt und massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel 16.5.31).

### **16.5.24 Analytische *in vivo* Proteommarkierung mit der Sonde 15**

Der Versuch wurde gemäß 16.5.20 durchgeführt. Es wurden die Proteome (siehe Kapitel 16.5.5) von *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *E. coli*, *P. putida*, *L. welshimeri* (siehe Kapitel 16.5.2) verwendet. Die Sondenkonzentration von 15 betrug 200  $\mu\text{M}$  (fc). Alle Ansätze wurden während des Sondeninkubationschrittes 1 Stunde mit  $\lambda = 366 \text{ nm}$  auf Eis bestrahlt (15 W, 1 cm Abstand).

### **16.5.25 Präparative *in vivo* Proteommarkierung mit der Sonde 15**

Der Versuch wurde gemäß 16.5.21 durchgeführt. Es wurde das Proteom der Membranfraktion (siehe Kapitel 16.5.5) von *E. coli* und *P. putida* (siehe Kapitel 16.5.2) verwendet. Die

Sondenkonzentration von **15** betrug 200  $\mu\text{M}$  (fc). Alle Ansätze wurden während des Sondeninkubationschrittes 1 Stunde mit  $\lambda = 366 \text{ nm}$  auf Eis bestrahlt (15W, 1cm Abstand). Zur Probenauftrennung wurde jeweils ein 10.0%iges PAA-Gel (siehe Kapitel 16.5.8) verwendet. Gelbanden von Zielproteinen wurden gereinigt und massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel 16.5.31).

#### **16.5.26 Detektionslimit von NagZ, YihQ oder LacZ durch Glycopeptid 15**

Ein Reaktionsansatz (50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen, PBS pH 7.3) beinhaltete 50  $\mu\text{M}$  Glycopeptid **15** und 500, 400, 300, 200, 100, 75, 50, 25 oder 10 ng gereinigtes NagZ, YihQ oder LacZ. Jeder Ansatz wurde unter einer UV-Lampe ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ , 15 W, 1 cm Abstand) für 1 Stunde auf Eis bestrahlt. Rhodaminazid (0.33  $\mu\text{g}$ , 0.65 nmol), TCEP (15  $\mu\text{g}$ , 52.23 nmol), Ligand (2,65  $\mu\text{g}$ , 5.00 nmol) und  $\text{CuSO}_4$  (12.5 ng, 50 nmol) wurden zu jedem Ansatz schrittweise hinzugegeben. Alle Ansätze inkubierten für eine Stunde bei RT. Nach Zugabe von Probenpuffer (10  $\mu\text{l}$ , 6 $\times$ ) wurde jeder Ansatz mittels 10% (m/v) SDS-PAGE und anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

#### **16.5.27 Diskriminierung von NagZ durch die Glycopeptide 13, 14 und 15**

Ein Reaktionsansatz (50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen, PBS pH 7.3) beinhaltete 50  $\mu\text{M}$  Glycopeptid **13**, **14** oder **15** und 300 ng gereinigtes NagZ, YihQ oder LacZ. Jeder Ansatz wurde unter einer UV-Lampe ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ , 15 W, 1 cm Abstand) für 1 Stunde auf Eis bestrahlt. Rhodamin azid (0.33  $\mu\text{g}$ , 0.65 nmol), TCEP (15  $\mu\text{g}$ , 52.23 nmol), Ligand (2,65  $\mu\text{g}$ , 5.00 nmol) und  $\text{CuSO}_4$  (12.5 ng, 50nmol) wurden zu jedem Ansatz schrittweise hinzugegeben. Alle Ansätze inkubierten für eine Stunde bei RT. Nach Zugabe von Probenpuffer (10  $\mu\text{l}$ , 6 $\times$ ) wurde jeder Ansatz mittels 10%iger (m/v) SDS-PAGE und anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### 16.5.28 Messung des IC<sub>50</sub> an NagZ

Ein Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 100 µl, PBS pH 7.3) beinhaltete 5 mM *p*NO<sub>2</sub>PhGlucNac und 100 µM compound X, Y, bzw. Z. Ein Kontrollansatz (Gesamtvolumen 100µl, PBS pH 7.3) beinhaltete 5 mM *p*NO<sub>2</sub>PhGlucNac und 100 µM DMSO. Beide Ansätze wurden für 10 min bei 25 °C vorinkubiert. Die Reaktion verlief bei 37 °C und wurde durch Zugabe von gereinigtem NagZ (16.5.33, 2.10 µg/ml, fc) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde photometrisch durch Messung der Absorptionzunahme bei λ = 400 nm in beiden Ansätzen verfolgt. Die Änderung der Enzymaktivität wurde gemäß Gleichung 4 berechnet:

Gleichung 4

$$\frac{\text{Absorptionzunahme des Reaktionsansatzes}}{\text{Absorptionzunahme des Kontrollansatzes}} \cdot 100 = \text{Veränderung der Enzymaktivität [\%]}$$

Alle Messungen wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Zugabe der Verbindung X, Y, oder Z bewirkte folgende Veränderung der Enzymaktivität (Tabelle 9):

Tabelle 9 Änderung der NagZ Enzymaktivität in Abhängigkeit diverser Verbindungen.

| Verbindung | NagZ Enzymaktivität (%) | Standardabweichung (%) |
|------------|-------------------------|------------------------|
| GlcNac     | 94.0                    | 2.3                    |
| AGlycon    | 99.7                    | 2.0                    |
| <u>13</u>  | 125.9                   | 1.6                    |
| <u>14</u>  | 116.0                   | 5.2                    |
| <u>15</u>  | 172.1                   | 1.0                    |

### 16.5.29 Analytische *in vivo* Proteommarkierung mit den Sonden 32 bis 39

Der Versuch wurde gemäß Kapitel 16.5.20 durchgeführt. Es wurden die Proteome (siehe 16.5.5) von *Pseudomas putida*, *Bacillus licheniformis* and *Listeria welshimer*, *Staphylococcus*

*aureus* NCTC und *Staphylococcus aureus* Mu50i (siehe Kapitel 16.5.2) verwendet. Die Sondenkonzentration von 32 bis 39 betrug 150  $\mu\text{M}$  (fc).

### 16.5.30 Präparative *in vivo* Proteommarkierung mit den Sonden 32 und 34

Der Versuch wurde gemäß Kapitel 16.5.21 durchgeführt. Es wurde jeweils Proteom der Cytosolfraktion (siehe Kapitel 16.5.5) der Organismen verwendet. In *Pseudomonas putida* beinhaltenden Proben wurde Verbindung 32 mit einer finalen Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zugegeben. In *Bacillus lichemiformis* beinhaltenden Proben wurde Verbindung 32 mit einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zugegeben. In *Listeria welshimeri* and *S. aureus* beinhaltenden Proben wurde Verbindung 32 bzw. 34 mit einer finalen Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  zugegeben. Zur Probenauftrennung wurde jeweils ein 10.0%iges PAA-Gel (siehe Kapitel 16.5.8) verwendet. Gelbanden von Zielproteinen wurden gereinigt und massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel 16.5.31).

### 16.5.31 Identifizierung von Zielenzymen und Charakterisierung durch Massenspektrometrie

Interessante Proteinbanden wurden zusammen mit ihren Kontrollbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten (16.5.18 und 16.5.30). Alle ausgeschnittenen Gelbanden wurden bei RT mit Wasser (je 100  $\mu\text{l}$ ) für 15 min, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1) (je 200  $\mu\text{l}$ ) für 15 min,  $\text{CH}_3\text{CN}$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) für 10 min, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) für 5 min, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1) (je 200  $\mu\text{l}$ ) für 15 min und  $\text{CH}_3\text{CN}$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) für 10 min gewaschen. Alle Banden wurden mittels Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet und wurden dann mit frisch angesetzter 10 mM DTT in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) für 45 min bei 56 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelbanden sofort mit frisch angesetzter 55 mM Iodoacetamid in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Alle Banden inkubierten für 30 min im Dunkeln bevor sie bei RT mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1) (je 200  $\mu\text{l}$ ) und  $\text{CH}_3\text{CN}$  (je 100  $\mu\text{l}$ ) gewaschen wurden. Alle Banden wurden mittels Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet. Alle Gelbanden wurden mit einer frisch angesetzten Lösung von Trypsin in

25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (je 2.5 u in 100 µl) versetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Jeder Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit den Überständen der folgenden Waschschriffe vermischt. Alle Gelbanden wurden mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (je 100 µl) für 15 min, 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (je 100 µl), 5% (v/v) Formiat in H<sub>2</sub>O (je 100 µl) für 15 min und CH<sub>3</sub>CN (je 100 µl) gewaschen. Jede Mischung (500 µl) wurde mittels Vakuuzentrifuge bis zu einem Volumen von 20 µl eingengt. Die tryptisch verdauten Peptide wurden auf eine Dionex C18 Nano Trap Säule (100 µm) geladen, anschließend eluiert und über eine Dionex C18 PepMap 100 (3 µm) Säule getrennt. Die Analyse erfolgte durch Tandem Massenspektrometrie gefolgt durch hochauflösende Massenspektrometrie mit einem gekoppelten Dionex Ultimate 3000 LC-Thermo Finnegan Orbitrap XL MS System. Die Daten der Massenspektrometrie wurden mit dem SEQUEST Algorithmus gegen die entsprechenden Datenbanken mit Hilfe der Software „Bioworks“ abgesucht. Die Suche wurde auf tryptische Peptide mit maximal zwei ausgelassenen Schnittstellen, monoisotopischen Vorläuferionen und einer Peptidtoleranz unter 10 ppm begrenzt. Zusätzlich wurden Filter gesetzt, um die Suchergebnisse weiter einzugrenzen: Die Werte des „Xcorr gegen Ladungszustand“-Filters wurden für Xcorr Werte auf 1.5, 2.0 und 2.5 bzw. für die Werte des Ladungszustandes auf +1, +2, +3 gesetzt. Die Anzahl der verschiedenen Peptide wurde auf  $\geq 2$  und die Wahrscheinlichkeitsfilter für Peptide (p-Werte) auf  $< 0.001$  gesetzt. Diese Filtereinstellungen wurden ähnlich zu denen gesetzt, die bereits für die SEQUEST Analyse in der Literatur beschrieben sind.<sup>[211]</sup> Die maximalen p-Werte und XCorr-Werte eines jeden Laufes sowie die Gesamtanzahl an detektierten Peptidfragmenten sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10 Auflistung der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine. R: Anzahl der Versuchswiederholung, NP: Gesamtanzahl detektierter Peptidfragmente.

| Organismus                    | identifiziertes Enzym   | Swissprot Zugangsnummer | MW (kDa) | R | max. p-Wert            | max. Xcorr | NP |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|---|------------------------|------------|----|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 1-Pyrrolin-5-carboxylat | Q65NN2                  | 56.61    | 1 | 2.22·10 <sup>-15</sup> | 140.26     | 14 |
|                               | Dehydrogenase (PCDH)    |                         | 56.61    | 2 | 5.62·10 <sup>-10</sup> | 110.25     | 19 |

Experimenteller Teil

|                      |                  |        |       |   |            |        |    |
|----------------------|------------------|--------|-------|---|------------|--------|----|
|                      |                  |        | 56.61 | 3 | 7.00·10-07 | 50.25  | 5  |
|                      |                  |        | 56.61 | 4 | 1.88·10-08 | 60.21  | 6  |
| <i>Bacillus</i>      | Alcohol          | Q65CW1 | 94.94 | 1 | 2.53·10-13 | 190.35 | 19 |
| <i>licheniformis</i> | Dehydrogenase    |        |       |   |            |        |    |
|                      | (AlcDH)          |        | 94.94 | 2 | 3.33·10-15 | 270.33 | 27 |
|                      |                  |        | 94.94 | 3 | 6.66·10-14 | 240.35 | 24 |
| <i>Listeria</i>      | Aldehyde-        | A0AJ86 | 94.53 | 1 | 2.18·10-12 | 250.29 | 25 |
| <i>welshimeri</i>    | Alkohol          |        |       |   |            |        |    |
|                      | Dehydrogenase    |        | 94.53 | 2 | 4.24·10-11 | 300.26 | 30 |
|                      | (AADH)           |        |       |   |            |        |    |
| <i>Listeria</i>      | 3-Oxoacyl-[acyl- | A0AKV5 | 34.00 | 1 | 4.24·10-13 | 90.23  | 9  |
| <i>welshimeri</i>    | carrier-protein] |        |       |   |            |        |    |
|                      | Synthase 3       |        | 34.00 | 2 | 2.03·10-07 | 30.17  | 3  |
|                      | (FabH)           |        |       |   |            |        |    |
|                      |                  |        | 34.00 | 3 | 3.03·10-12 | 70.23  | 7  |
|                      |                  |        | 34.00 | 4 | 4.87·10-13 | 118.24 | 12 |
|                      |                  |        | 34.00 | 5 | 8.33·10-15 | 138.23 | 14 |
| <i>Pseudomonas</i>   | Aldehyd          | Q88CA3 | 53.02 | 1 | 7.74·10-07 | 40.22  | 4  |
| <i>putida</i>        | Dehydrogenase    |        |       |   |            |        |    |
|                      | (ADH)            |        | 53.02 | 2 | 5.55·10-15 | 150.28 | 15 |

## Experimenteller Teil

|                              |                        |        |       |   |                        |       |   |
|------------------------------|------------------------|--------|-------|---|------------------------|-------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Aldehyd                | Q2G1J0 | 53.62 | 1 | 3.07·10 <sup>-12</sup> | 50.28 | 5 |
|                              | Dehydrogenas<br>(AldA) |        |       |   |                        |       |   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Aldehyd                | Q2FWX9 | 51.70 | 1 | 1.19·10 <sup>-08</sup> | 30.21 | 3 |
|                              | Dehydrogenase<br>(ADH) |        | 51.70 | 2 | 7,67·10 <sup>-09</sup> | 50.22 | 5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | L-Lactat               | Q2G218 | 29.42 | 1 | 2.60·10 <sup>-06</sup> | 40.17 | 4 |
|                              | Dehydrogenase<br>(LDH) |        | 29.42 | 2 | 6,69·10 <sup>-07</sup> | 30.17 | 3 |

### 16.5.32 Rekombinante Expression

Die relevanten Proteine, welche durch Massenspektrometrie (siehe Kapitel 16.5.30) identifiziert wurden, wurden rekombinant und heterolog in *E. coli* überexpressiert. Dies diente als interne Kontrolle gegenüber den massenspektrometrischen Ergebnissen. Hierfür wurde die Gateway® Technologie der Firma Invitrogen™ verwendet:

Die Gene der Zielproteine durch PCR vervielfältigt. Hierfür wurde das AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase Kit und 10, 30 und 50 ng an zugehöriger, genomischer DNA eingesetzt. Es wurde gemäß dem PCR-Standardprotokoll (siehe Kapitel 16.5.10) verfahren. Der *attB1* vorwärts Primer und der *attB2* rückwärts Primer wurden im Vorfeld so synthetisiert, dass das resultierende *attB*-PCR Produkt direkt einsetzbar in der Gateway® Technologie der Firma Invitrogen™ war. PCR Produkte wurden mittels 1% Agarose Gelelektrophorese getrennt. Die Bande auf Zielhöhe wurde mittels Ethidiumbromid im UV-Licht nachgewiesen, ausgeschnitten und das PCR Produkt mit Hilfe des E.Z.N.A.™ MicroElute™ Gel Extraction Kit isoliert. DNA Konzentrationen wurden mittels NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 ermittelt. 100 fmol gereinigtes *attB*-PCR Produkt und 50 fmol *attP*-beinhaltender Donor Vektor pDONR™201 in TE Puffer wurden für die *in vitro* BP Reaktion eingesetzt. Hierfür wurde der BP Clonase™ II Enzym Mix der Firma Invitrogen™ verwendet. Es wurde gemäß Standardprotokoll des Herstellers verfahren. Der resultierende *attL*-beinhaltende Vektor wurde in chemisch kompetente One Shot® *E. coli* TOP10 Zellen der Firma Invitrogen™

transformiert. Hierfür wurde nach Standardprotokoll verfahren (siehe Kapitel 16.5.16). Die Zellen wurden auf LB-Medium mit  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin ausplattiert. Vereinzelt Klone wurden isoliert und über Nacht in LB-Medium mit  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und ihre Plasmide durch Verwendung des E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit isoliert. Hierbei wurde nach Standardprotokoll des Herstellers vorgegangen. Für die *in vitro* LR-Reaktion wurden 50 fmol des gereinigten, attL-beinhaltenen Vektors, 50 fmol des attR-beinhaltenen Zielvektors pDest007 sowie den LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix der Firma Invitrogen<sup>TM</sup> in TE Puffer verwendet. Der resultierende attB-beinhaltende Expressionsvektor wurde in chemisch kompetente *E. coli* BL21 Zellen der Firma Novagen transformiert. Hierfür wurde nach Standardprotokoll verfahren (siehe Kapitel 16.5.16). Die Zellen wurden auf LB-Medium mit  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin ausplattiert. Die Zielvektorsequenz vereinzelter Klone wurde durch Sequenzierung durch die Firma GATC (Martinsried, Deutschland) kontrolliert. Hierfür wurden die Klone isoliert und über Nacht in LB-Medium mit  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und ihre Plasmide durch Verwendung des E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit isoliert. Hierbei wurde nach Standardprotokoll des Herstellers vorgegangen.

Rekombinante Klone wurden in LB Medium (11) mit  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Die Überexpression des Zielgens wurde mit Anhydrotetrazyklin im Verhältnis 1:10000 bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.4 bis 0.6 bei  $37^\circ\text{C}$  induziert. Nach Inkubation von 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen pelletiert (4000 g, 5 min, RT).

### 16.5.33 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Zur Reinigung rekombinanter Proteine wurden standardmäßig die Zellen von 1 l Expressionskultur (15l pelletiert, mit PBS gewaschen und in Puffer W (15 ml) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels FRENCH<sup>®</sup> Press mit zugehöriger Druckzelle (Thermo Fisher Scientific) aufgeschlossen (4×, 500 bis 1200 psi,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Lysat wurde zentrifugiert (45 min, 9000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand (entspricht cytosolischer Fraktion) wurde in einen 50 ml Superloop (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) überführt. Die Reinigung erfolgte unter Verwendung einer Strep Tap<sup>TM</sup> HP Säule (5ml, GE Healthcare) und eines Äkta<sup>TM</sup> Purifier Systems mit UV Detektor (UPC 900, P900, Box900, Frac950, GE Healthcare). Nach Auftreten der Probe (Flussgeschwindigkeit 1 ml/min) auf die mit 5 Säulenvolumen

vorkonditionierte Säule, wurde diese mit 10 Säulenvolumina Puffer W (Flussgeschwindigkeit 5 ml/min) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 Säulenvolumina Puffer E (Flussgeschwindigkeit 1 ml/min). Es wurden Fraktionen von je 1 oder 2 ml gesammelt. Die Säule wurde jeweils mit 3 Säulenvolumina deionisiertem Wasser, 0.5 M NaOH/H<sub>2</sub>O und deionisiertem Wasser gewaschen.

### 16.5.34 Massenspektrometrische Analyse der markierten Aldehyd Alkohol Dehydrogenase (AADH)

AADH (50 µg, 528.57 nmol, 29.37 nM, fc) und Verbindung **32** (55 µM, fc) wurden beide in PBS (pH 7.3) in einem Gesamtvolumen von 18 µl gemischt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. 80 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> wurde zugegeben. Überschuss an Verbindung **32** wurde durch Filtration der Reaktionsmischung durch einem Mikrofilter (Ausschlussgröße 30 kDa) abgetrennt. Verbliebenes Enzym wurde mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (2×, je 100 µl) gewaschen. Die verbliebene Proteinlösung wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ergänzt. 2.5 µg Trypsin (0.5 µg) wurden zu 50 µl AADH-Lösung zugegeben und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die tryptisch verdauten Peptide wurden auf eine Dionex C18 Nano Trap Säule (100 µm) geladen, anschließend eluiert und über eine Dionex C18 PepMap 100 (3 µm) Säule getrennt. Die Analyse erfolgte durch Tandem Massenspektrometrie gefolgt durch hochauflösende Massenspektrometrie mit einem gekoppelten Dionex Ultimate 3000 LC-ThermoFinnegan Orbitrap XL MS System. Die Daten der Massenspektrometrie wurden mit dem SEQUEST Algorithmus gegen die entsprechenden Datenbanken mit Hilfe der Software „Bioworks“ abgesucht. Die Suche wurde auf tryptische Peptide mit maximal zwei ausgelassenen Schnittstellen, monoisotopischen Vorläuferionen und einer Peptidtoleranz unter 10 ppm begrenzt. Zusätzlich wurden Filter gesetzt, um die Suchergebnisse weiter einzugrenzen: Die Werte des „Xcorr gegen Ladungszustand“-Filters wurden für Xcorr Werte auf 1.5, 2.0 und 2.5 bzw. für die Werte des Ladungszustandes auf +1, +2, +3 gesetzt. Die Anzahl der verschiedenen Peptide wurde auf  $\geq 2$  und die Wahrscheinlichkeitsfilter für Peptide (p-Werte) auf  $< 0.001$  gesetzt. Diese Filtereinstellungen wurden ähnlich zu denen gesetzt, die bereits für die SEQUEST Analyse in der Literatur beschrieben sind.<sup>[211]</sup> Die detektierten AADH Peptide sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Ergebnisse der MS Analyse tryptisch gespaltener, markierter AADH. Modifizierte C Aminosäurereste (C#) sind rot hervorgehoben.

| detektiertes Peptidion | zugehörige Peptidsequenz | zugehörige AADH Sequenzposition |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| $b_4^{+1}$             | SFDQ                     | 248 bis 251                     |
| $b_7^{+1}$             | SFDQGM                   | 248 bis 254                     |
| $b_9^{+1}$             | SFDQGMIC#A               | 248 bis 256                     |
| $b_{10}^{+1}$          | SFDQGMIC#AS              | 248 bis 257                     |
| $b_{11}^{+1}$          | SFDQGMIC#ASE             | 248 bis 258                     |
| $b_{12}^{+1}$          | SFDQGMIC#ASEQ            | 248 bis 259                     |
| $b_{13}^{+1}$          | SFDQGMIC#ASEQA           | 248 bis 260                     |
| $b_{14}^{+1}$          | SFDQGMIC#ASEQAV          | 248 bis 261                     |
| $y_9^{+1}$             | SEQAVIVDK                | 257 bis 265                     |
| $y_{11}^{+1}$          | C#ASEQAVIVDK             | 255 bis 265                     |
| $y_{12}^{+1}$          | IC#ASEQAVIVDK            | 254 bis 265                     |
| $y_{14}^{+1}$          | GMIC#ASEQAVIVDK          | 252 bis 265                     |

### 16.5.35 IC<sub>50</sub>-Bestimmung der Aldehyd Alkohol Dehydrogenase (AADH)

Eine Reaktionsmischung (100 µl Gesamtvolumen) beinhaltete 100 mM TrisHCl, 0.66 mM β-NAD, 0.10 M KCl, 1.60 mM Acetaldehyd, 10.00 mM β-Mercaptoethanol, 0.63 µg AADH und 1.0, 10.0, 17.5, 25.0, 50.0, bzw. 100 µmol der Verbindung **32** oder 100 µmol der Verbindung **33**, **34** oder **35**. Entsprechende Kontrollansätze beinhalteten keine Verbindung **32**, **33**, **34** oder **35**. Alle Mischungen wurden vor Zugabe von β-NAD und Acetaldehyd für 15 min bei RT vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von β-NAD und Acetaldehyd gestartet und verlief bei RT. In Kontroll- und Reaktionsansätzen wurde die Produktzunahme photometrisch durch Messung der Absorptionzunahme bei λ = 340 nm verfolgt. Die Veränderung der Enzymaktivität wurde gemäß der folgenden Gleichung 5 berechnet:

Gleichung 5

$$\frac{\text{Absorptionszunahme des Reaktionsansatzes}}{\text{Absorptionszunahme des Kontrollansatzes}} \cdot 100 = \text{Veränderung der Enzymaktivität (\%)}$$

Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt. Die Zugabe von Verbindung **32**, **33**, **34** oder **35** wirkte sich wie folgt auf die AADH Enzymaktivität aus (Tabelle 12):

Tabelle 12: Effekt von Verbindung 1, 2, 3, oder 4 auf die AADH Enzymaktivität.

| Verbindung | finale Konzentration<br>( $\mu\text{mol}$ ) | AADH Aktivität<br>(%) | Standardabweichung<br>der<br>AADH Aktivität (%) |
|------------|---|-----------------------|---|
| -          | 0.00  | 100.00                | 0.00  |
| <b>32</b>  | 1.00  | 75.00                 | 0.00  |
| <b>32</b>  | 10.00                                       | 54.16                 | 5.89  |
| <b>32</b>  | 25.00                                       | 25.00                 | 0.00  |
| <b>32</b>  | 50.00                                       | 7.91                  | 2.12  |
| <b>32</b>  | 100.00                                      | 1.37                  | 1.37  |
| <b>33</b>  | 100.00                                      | 15.00                 | 0.79  |
| <b>34</b>  | 100.00                                      | 57.89                 | 7.44  |
| <b>35</b>  | 100.00                                      | 63.15                 | 0.00  |

### 16.5.36 Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der Verbindungen **32**, **33**, **34**, **36**, **37** gegen verschiedene Bakterien

Eine Übernachtskultur von *Pseudomas putida*, *Bacillus lichemiformis* und *Listeria welshimeri* oder *Staphylococcus aureus* NCTC wurde benutzt, um LB medium (100  $\mu\text{l}$ /well) in einem 96 well plate anzupflanzen. In *Pseudomas putida* beinhaltenden Ansätzen wurden die Verbindungen **32** bzw. **33** zugegeben. In *Bacillus lichemiformis* beinhaltenden Ansätzen wurden die Verbindungen **32** bzw. **36** zugegeben. In *Listeria welshimeri* beinhaltenden

Ansätzen wurden die Verbindungen **32** bzw. **34** zugegeben. In *Staphylococcus aureus* NCTC beinhaltenden Ansätzen wurden die Verbindungen **32**, **34** bzw. **37** zugegeben. Alle Verbindungen hatten die finale Konzentration 500  $\mu\text{M}$ . Bakterienfreies Medium diente als Negativkontrolle. Verbindungsfreie Ansätze dienten als Positivkontrolle. All Test- und Kontrollansätze wurden dreimal angesetzt. Alle Ansätze inkubierten in einem 96 well plate für 16 h bei 37 °C. Die optische Dichte aller Testansätze wurde mit der optischen Dichte zugehöriger Kontrollansätze verglichen.

### **16.5.37 Markierung der $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) mit der Verbindung **32****

Ein Reaktionsansatz (50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen, PBS pH 7.3) beinhaltete 50  $\mu\text{M}$  Verbindung **1** und 300 ng gereinigte gamma-GT. Die Mischung inkubierte für 1 Stunde bei RT. Rhodamin azid (13.0  $\mu\text{M}$ , fc), TCEP (1.04 mM, fc), Ligand (100.0  $\mu\text{M}$ , fc) und  $\text{CuSO}_4$  (1.00 mM, fc) wurden schrittweise zugegeben. Die Mischung inkubierte 1 Stunde bei RT. Der Ansatz wurde mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

### **16.5.38 Markierung rekombinanter Enzyme**

Ein Testansatz wurde wie folgt hergestellt: 0.20  $\text{OD}_{600}$  von ADH, AldA, PCDH, AADH oder FabH überexprimierenden Zellen (Bedingungen der Überexpression siehe Kapitel 16.5.32) wurden pelletiert und in 50  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Kontrollansätze beinhalteten dieselbe Menge an nicht-induzierten Zellen. Alle Zellen wurden durch Ultraschall (Bandelin Sonopuls,  $3 \times 10$  s, 60% Leistung, Modus 5) bei 4 °C lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (10 min, 16200 g). 43  $\mu\text{l}$  jedes Überstandes (entspricht cytosolischer Fraktion) wurde in ein neues Gefäß überführt. Eine weitere Hitzekontrolle wurde jeweils analog hergestellt. Jedoch wurde sie 7 min bei 99 °C inkubiert, bevor Verbindung **32** oder **34** zugegeben wurde. Zur Markierung aller rekombinanten Enzyme bis auf FabH wurde Verbindung **32** mit einer finalen Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zugegeben. FabH beinhaltende Lysate wurden mit Verbindung **34** mit einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  versetzt. Alle Ansätze inkubierten 1 Stunde bei RT vor Zugabe von Rhodamin Azid (13.0  $\mu\text{M}$ , fc), TCEP (1.04 mM,

fc), TBTA Ligand (100.0  $\mu\text{M}$ , fc) und  $\text{CuSO}_4$  (1.00 mM, fc). Alle Reaktionsmischungen inkubierten 1 Stunde bei RT bevor jeweils 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (2 $\times$ ) zugegeben wurde. 50  $\mu\text{l}$  jedes Ansatzes wurden mittels 10%iger SDS-PAGE mit anschließender Fluoreszenzaufnahme analysiert.

## 17 Danksagung

Herrn Professor Dr. *Thomas Carell* danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung meiner Promotion. Ohne seine Zustimmung zur Mitbenutzung der Infrastruktur seiner Laboratorien, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. *Stephan A. Sieber* danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Stellung der sehr interessanten Themen seine stete Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit frei und interdisziplinär arbeiten zu können.

Den beiden Arbeitskreisen *Carell* und *Sieber* danke ich für das sehr gute Arbeitsklima, dass dafür sorgte, dass ich immer gerne das Labor betrat. Vor allem danke ich meinen Laborkollegen Dr. *Thomas Böttcher*, *Kerstin Kurz*, *Isabell Staub* und *Max Pitscheider* für deren freundschaftliche Zusammenarbeit und das sehr gute Laborklima.

Den Studenten *Julian Egger*, *Sarah Illi* und *Christina Hettstedt*, die ich in ihrer Bachelorarbeit oder Forschungspraktikum betreute, danke ich für ihre engagierte Mitarbeit.

Dr. *Stephenson* und Frau *Dubler* danke ich für die großartige Unterstützung bei der NMR Analytik.

Dr. *Spahl* und Professor Dr. *Stephan A. Sieber* danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Dr. *Müller* und Dr. *Strasser* für ihre Hilfestellung bei molekularbiologischen Problemen.

*Sabine Frohnafel*, *Christian Heinlein*, Dr. *Anja Katzemich* und Dr. *Stefano Mezzato* danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

Großen Dank schulde ich meiner Frau Sabine für ihre Liebe und Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

---

## 18 Literaturverzeichnis

- [1] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [2] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837.
- [3] M. L. Fournier, J. M. Gilmore, S. A. Martin-Brown, M. P. Washburn, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3654.
- [4] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, 198.
- [5] Z. Chang, *Sci. China C. Life. Sci.* **2009**, *52*, 515.
- [6] E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 798.
- [7] A. S. J. Reinders, *Biomol. Egin.* **2007**, 169.
- [8] S. Arastu-Kapur, E. L. Ponder, U. P. Fonovic, S. Yeoh, F. Yuan, M. Fonovic, M. Grainger, C. I. Phillips, J. C. Powers, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 203.
- [9] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 130.
- [10] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005.
- [11] B. M. Cullen, I. M. Halliday, G. Kay, J. Nelson, B. Walker, *Biochem. J.* **1992**, 461
- [12] B. Walker, B. M. Cullen, G. Kay, I. M. Halliday, A. McGinty, J. Nelson, *Biochem. J.* **1992**, 449.
- [13] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjug. Chem.* **1994**, 400.
- [14] C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, D. H. Z. Li, J. C. Powers, *Bioconjug. Chem.* **1993**, 560.
- [15] S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Biotechniques* **2005**, 175.
- [16] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686.
- [17] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 3279.
- [18] M. Uttamchandani, J. Li, H. Sun, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 667.
- [19] B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, C. Drahl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5788.
- [20] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell Proteomics* **2002**, 828.
- [21] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 14694.
- [22] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 10335.
- [23] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 10000.
- [24] D. Greenbaum, K. F. Medzihradsky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, 7.
- [25] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradsky, M. Bogyo, *Mol. Cell Proteomics* **2002**, *1*, 60.
- [26] G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chem. Biol.* **2001**, 81.
- [27] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 805.
- [28] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, 1067.
- [29] C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 5788.
- [30] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 1523.
- [31] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 7408.
- [32] E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787.
- [33] E. Weerapana, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 405.
- [34] M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Chem. Commun.* **2009**, 3741.
- [35] T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 4600.

- [36] T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 663.
- [37] I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13400.
- [38] I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6271.
- [39] D. Greenbaum, K. F. Medzihradsky, A. Burlingame, M. Bogoy, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 569.
- [40] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, K. Hanada, *Acta Biol. Med. Ger.* **1981**, 1513.
- [41] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, 189.
- [42] D. H. Pliura, B. J. Bonaventura, R. A. Smith, P. J. Coles, A. Krantz, *Biochem. J.* **1992**, 759.
- [43] E. Shaw, H. Angliker, P. Rauber, B. Walker, P. Wikstrom, *Biomed. Biochim. Acta* **1986**, 1397.
- [44] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Bromme, *J. Med. Chem.* **1995**, 3193.
- [45] M. Fonovic, S. H. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogoy, *Mol. Cell Proteomics* **2007**, 1761.
- [46] E. Shaw, *Methods Enzymol.* **1994**, 649.
- [47] S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z. X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z. Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 8251.
- [48] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochem. J.* **1994**, *33*, 5661.
- [49] H. Bayley, *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam, **1983**.
- [50] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 274.
- [51] Q. Yan, G. D. Prestwich, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5021.
- [52] E. W. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 14435.
- [53] M. Uttamchandani, J. Wang, J. Li, M. Hu, H. Sun, K. Y. Chen, K. Liu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7848.
- [54] C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 1171.
- [55] M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Nomanbhoy, M. Wu, H. Weissig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 350.
- [56] H. A. Kaplan, F. Naider, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1988**, *16*, 7814.
- [57] G. T. J. van der Horst, G. M. S. Mancini, R. Brossmer, U. Rose, F. W. Verheijen, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10801.
- [58] K. Rajagopalan, A. J. Chavan, B. E. Haley, D. S. Watt, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14230.
- [59] N. M. Green, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51.
- [60] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogoy, *Trends Cell. Biol.* **2004**, 29.
- [61] R. Huisgen, *1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley: New York, **1984**.
- [62] V. V. Rostovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596.
- [63] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 10030.
- [64] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 3057.
- [65] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [66] H. C. Hang, J. Loureiro, E. Spooner, A. W. van der Velden, Y. M. Kim, A. M. Pollington, R. Maehr, M. N. Starnbach, H. L. Ploegh, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*.
- [67] H. C. Hang, C. Yu, M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6.
- [68] J. A. P. J. M. Baskin, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A., A. L. Miller, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, 16793.
- [69] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14400.
- [70] T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1260.
- [71] S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *ChemComm* **2006**, 2311.

- [72] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018.
- [73] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1363.
- [74] S. A. Sieber, T. S. Mondala, S. R. Head, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15640.
- [75] N. Jessani, S. Niessen, B. Q. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D. Y. Noh, J. R. Yates, S. S. Jeffrey, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 691.
- [76] N. Jessani, S. Niessen, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Cell Cycle* **2005**, *4*, 253.
- [77] K. Y. Li, H. Tu, A. K. Ray, *Langmuir* **2005**, *21*, 3786.
- [78] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
- [79] J. K. Eng, B. Fischer, J. Grossmann, M. J. Maccoss, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 4598.
- [80] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 62.
- [81] B. F. Cravatt, G. M. Simon, J. R. Yates, *Nature* **2007**, *450*, 991.
- [82] R. L. K. R. Chalcraft, C. Mills, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2506.
- [83] W. A. Tao, R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 110.
- [84] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279.
- [85] P. van der Veken, E.H. Dirksen, E. Ruijter, R. C. Elgersma, A. J. Heck, D. T. Rijkers, M. Slijper, R. M. Liskamp, *Chembiochem* **2005**, *6*, 2271.
- [86] A. H. Fauq, R. Kache, M. A. Khan, I. E. Vega, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 248.
- [87] H. L. Ball, P. Mascagni, *J. Peptide Sci.* **1997**, *3*, 252.
- [88] M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 2593.
- [89] D. C. Dieterich, J. J. Lee, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 532.
- [90] S. H. Verhelst, M. Fonovic, M. Bogyo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 1284.
- [91] J. C. Anderson, C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *1*, 1.
- [92] J. C. Sheehan, K. Umezawa, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3771.
- [93] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15780.
- [94] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 429.
- [95] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*, 125.
- [96] J. C. Sheehan, G. D. Daves, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2006.
- [97] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed. ed., Wiley & Sons Inc., New York, **2007**.
- [98] C. H. Park, R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2453.
- [99] J. Guo, J. Asong, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5345.
- [100] J. Literak, A. Dostalova, P. Klan, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 713.
- [101] Kyuwon Kim, Haesik Yang, Sangyong Jon, Eunkyung Kim, J. Kwak, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *126*, 15368.
- [102] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *DDT* **2003**, *8*, 1128.
- [103] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. v. Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- [104] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [105] L.A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.
- [106] C. Boussard, V. E. Doyle, N. Mahmood, T. Klimkait, M. Pritchard, I. H. Gilbert, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *37*, 883.
- [107] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645.
- [108] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [109] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [110] F. Albericio, R. Chincilla, d. J. Dodsworth, *Org. Prep. And Proced. Int.* **2001**, *33*, 203.
- [111] O. Marder, Y. Shvo, F. Albericio, *Chim. Oggi* **2002**, *20*, 37.
- [112] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.

- [113] S. Mezzato, *Dissertation Universität Bayreuth* **2004**.
- [114] C. Heinlein, *Diplomarbeit Universität Bayreuth* **2006**.
- [115] R. Orth, *Diplomarbeit Universität Bayreuth* **2006**.
- [116] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 535.
- [117] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370.
- [118] M. Rinnova, M. Novakova, V. Kasicka, J. Jiracek, *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 355.
- [119] L. P. Miranda, W. D. Lubell, K. M. Halkes, T. Groth, M. Grotli, J. Rademann, C. H. Gottfredsen, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 523.
- [120] S. S. Wang, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3258.
- [121] J. P. Tam, W. F. Cunningham-Rundles, B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *46*, 4001.
- [122] F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 355.
- [123] O. Fiehn, *Plant Mol. Biol.* **2002**, *48*, 155.
- [124] D. B. Kell, H. V. Westerhoff, *Trends Biotechnol.* **1986**, *4*, 137.
- [125] A. R. Fernie, R. N. Tretheway, A. J. Krotzky, L. Willmitzer, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, *5*, 763.
- [126] D. A. Fell, *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 267.
- [127] M. R. Wenk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 594.
- [128] M. D. Disney, J. L. Childs-Disney, *Chembiochem* **2007**, *8*, 649.
- [129] K. R. Chalkraft, R. Lee, C. Mills, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2506.
- [130] J. Gierlich, G. A. Burley, P. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [131] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [132] K. Zhang, J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *119*, 2453.
- [133] P. G. Conrad II, R. S. Givens, B. Hellrung, C. S. Rajesh, M. Ramseier, J. Wirz, **2000**, *122*, 9436.
- [134] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd Edition ed., Thieme, **2005**.
- [135] B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 637.
- [136] S. G. Withers, *Carbohydrate Polym.* **2001**, *44*, 325.
- [137] C. S. Rye, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573.
- [138] D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem Res* **2000**, *33*, 11.
- [139] L. E. Comstock, D. L. Kasper, *Cell* **2006**, *126*, 847.
- [140] M. A. Schmidt, L.W. Riley, I. Benz, *Trends in Microbiology* **2003**, *11*, 554.
- [141] I. Benz, M. A. Schmidt, *Molecular Microbiology* **2002**, *45*, 267.
- [142] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell Proteomics* **2002**, *1*, 781.
- [143] A. V. Romaniouk, A. Silva, J. Feng, I. K. Vijay, *Glycobiology* **2004**, *14*, 301.
- [144] C. S. Tsai, Y. K. Li, L. C. Lo, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3607.
- [145] D. J. Vocadlo, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 5338.
- [146] M. K. H. Hinou, H. Shimizu, S. Nishimura, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11669.
- [147] M. Kurogochi, S. Nishimura, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44704.
- [148] O. Hekmat, Y. W. Kim, S. J. Williams, S. He, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35126.
- [149] S. J. Williams, O. Hekmat, S. G. Withers, *Chembiochem* **2006**, *7*, 116.
- [150] S. G. Withers, R. Aebersold, *Protein Science* **1995**, *4*, 361.
- [151] T. -H. Shie, Ying-Ling Chiang, Jing-Jer Lin, Yaw-Kuen Li, L.-C. Lo, *Carbohydrate Res.* **2006**, *341*, 443.
- [152] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 2615.
- [153] K. A. Stubbs, A. Scaffidi, A. W. Debowski, B. L. Mark, R. V. Stick, D. J. Vocadlo, **2008**, *130*, 327.

- 
- [154] M. Kuroguchi, S.-I. Nishimura, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 44704.
- [155] C. P. Lu, C. T. Ren, Y. N. Lai, S. H. Wu, W. M. Wang, J. Y. Chen, L. C. Lo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 6888.
- [156] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, 100, 9116.
- [157] O. Hekmat, C. Florizone, Y.-W. Kim, L. D. Eltis, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *ChemBiochem* **2007**, 8, 2125.
- [158] M. van Scherpenzeel, R. J. van den Berg, W. E. Donker-Koopman, R. M. Liskamp, J. M. Aerts, H. S. Overkleeft, R. J. Pieters, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 267.
- [159] J. N. BeMiller, R. J. Gilson, R. W. Myers, M. M. Santoro, M. P. Yadav, *Carbohydrate Res.* **1993**, 250, 93.
- [160] V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 515.
- [161] N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, 11, 1645.
- [162] N. Asano, *Glycobiology* **2003**, 13, 93R.
- [163] S. Mohan, B. M. Pinto, *Carbohydrate Res.* **2007**, 342, 1551.
- [164] M. Püttner, *Dissertation Universität Bayreuth* **2005**.
- [165] H. M. I. Osborn, *Carbohydrates: Best synthetic methods.*, Academic Press, **2003**.
- [166] S. Cao, R. Roy, *Carbohydrate Lett.* **1996**, 2, 27.
- [167] F. D. Tropper, F. O. Anderson, S. Braun, R. Roy, *Synthesis* **1992**, 618.
- [168] C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2350.
- [169] B. Paul, W. Korytnyk, *Carbohydrate Res.* **1978**, 67, 457.
- [170] C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevolot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *JOC* **2006**, 71, 4700.
- [171] A. R. Katritzky, S. K. Singh, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9077.
- [172] K. A. Stubbs, M. Balcewich, B. L. Mark, D. J. Vocadlo, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 21382.
- [173] M. D. Balcewich, K. A. Stubbs, Y. He, T.W. James, G. J. Davies, D. J. Vocadlo, B. L. Mark, *Protein Science* **2009**, 18, 1541.
- [174] D. Vocadlo, C. Mayer, S. He, S. G. Withers, *Biochemistry* **2000**, 39, 117.
- [175] B. Henrissat, A. Bairoch, *J. Biochem.* **1996**, 316, 695.
- [176] B. Henrissat, A. Bairoch, *Biochem. J.* **1993**, 293, 781.
- [177] W. Votsch, M. F. Templin, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 39032.
- [178] Q. Cheng, H. Li, K. Merdek, J. T. Park, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 4836.
- [179] W. Vötsch, M. F. Templin, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 39032.
- [180] M. Okuyama, H. Mori, S. Chiba, A. Kimura, *Protein Expr. Purif.* **2004**, 37, 170.
- [181] M. Herrchen, G. Legler, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 527.
- [182] B. W. Matthews, *C. R. Biol.* **2005**, 328, 549.
- [183] R. H. Jacobson, X.-J. Zhang, R. F. Dubose, B. W. Matthews, *Nature* **1994**, 369, 761.
- [184] L. Wells, K. Vosseller, R. N. Cole, J. M. Cronshaw, M. J. Matunis, G. W. Hart, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1, 791.
- [185] A. Asgarali, K. A. Stubbs, A. Oliver, D. J. Vocadlo, B. L. Mark, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53, 2274.
- [186] J. Clardy, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1541.
- [187] C. W. J. Clardy, *Nature* **2004**, 432, 829.
- [188] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215.
- [189] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
- [190] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52.
- [191] C. f. D. AHRQ, *Organization, and Markets, Healthcare Cost and Utilization Project, Nationwide Inpatient Sample 1993-2005*.
- [192] M. Fonovic, M. Bogoy, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, 5, 721.

- 
- [193] L. J. Hanka, D. G. Martin, G. L. Neil, *Cancer Chemother. Rep.* **1973**, 57, 141.
- [194] S. J. Gould, S. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10167.
- [195] H. N. Jayaram, D. A. Cooney, J. A. Ryan, G. Neil, R. L. Dion, V. H. Bono, *Cancer Chemother. Rep.* **1975**, 59, 481.
- [196] R. H. Earhart, G. L. Neil, *Adv. Enzyme Regul.* **1985**, 24, 179.
- [197] J. Y. Tso, S. G. Bower, H. Zalkin, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 6734.
- [198] H. Suzuki, H. Kumagai, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43536.
- [199] K. Williams, S. Cullati, A. Sand, E. I. Biterova, J. J. Barycki, *Biochemistry* **2009**, 48, 2459.
- [200] H. N. Jayaram, T. W. Kensler, B. Ardalán, *Cancer Treat. Rep.* **1981**, 65, 491.
- [201] K. E. Hill, D. D. Von Hoff, R. F. Burk, *Invest. New Drugs* **1985**, 3, 31.
- [202] L. Allen, R. Meck, A. Yunis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1980**, 27, 175.
- [203] R. E. Watts, M. Siegel, C. Khosla, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7493.
- [204] S. V. Chittur, T. J. Klem, C. M. Shafer, V. J. Davisson, *Biochemistry* **2001**, 40, 876.
- [205] E. G. E. Jahngen, E. F. Rossomando, *Synthetic Communications* **1982**, 12, 601.
- [206] P. A. Wade, J. F. Berezna, B. A. Palfey, P. J. Carroll, W. P. Dailey, S. Sivasubramian, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3045.
- [207] P. Caldirola, M. Ciancaglione, M. De Amici, C. D. Micheli, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4647.
- [208] A. Pinto, *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, 20, 508.
- [209] M. De Amici, C. De Micheli, E. Grana, R. Rodi, F. Zonta, M. G. Santagostino-Barbone, *Eur. J. Med. Chem.* **1989**, 24, 171.
- [210] X. Qui, C. A. Janson, A. K. Konstanidis, S. Nwagwu, C. Silverman, W. W. Smith, S. Khandekar, J. Lonsdale, S. S. Abdel-Meguid, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 36465.
- [211] S. P. Mirza, B. D. Halligan, A. S. Greene, M. Olivier, *Physiol. Genomics* **2007**, 30, 89.

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name Ronald Frohnapfel, geb. Orth

Geburtsdatum 17 April 1981

Geburtsort Arad, Rumänien

Nationalität deutsch

Familienstand verheiratet, eine Tochter

### AUSBILDUNG UND ZIVILDIENTST

---

**seit 02/2007** Promotionsstudium im Rahmen des CIPSM im AK Sieber/Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der Technischen Universität München

**09/2006-01/2007** Promotionsstudium im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 1302/1 „Der PI3K Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“ an der Eberhard Karls Universität, Tübingen

**2001-2006** Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth, Bayreuth

Diplom Note 1.3

Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Synthese von Glykopeptidthioestern mittels Split-Intein Proteinspaltung“

**2000-2001** Zivildienst im Alten- und Pflegeheim „St. Joseph“, Ludwigshafen

**1991-2000** Besuch des Heinrich-Böll-Gymnasiums, Ludwigshafen