

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Fachbereich Chemie
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

Neue Konzepte für nicht-ionische Inhibitoren der humanen Galactosyltransferase B sowie der humanen Fucosyltransferase 5

vorgelegt von
Felix Niemeyer
aus Hamburg

August 2016

-
1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer
 2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Stark
- Tag der Disputation: 14.10.2016

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis Januar 2015 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Christian Stark, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die interessante Themenstellung und für die stets freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Stark danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glycoproteine	1
1.2	Glycosyltransferasen	3
1.2.1	Struktur von Glycosyltransferasen	4
1.2.2	Reaktionsmechanismen der Glycosyltransferasen	7
1.2.3	Galactosyltransferasen	9
1.2.4	Fucosyltransferasen	15
1.2.5	Glycosyltransferaseinhibitoren	17
1.3	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	18
1.4	Ligandbasiertes Wirkstoffdesign	18
1.4.1	Pharmakophormodelle	19
1.4.2	Quantitative Struktur-Aktivitäts Beziehung (QSAR)	19
1.5	Rekombinante Expression von Proteinen	20
2	Problemstellung	22
3	Ergebnisse und Diskussion	23
3.1	Strukturbasiertes Design von Inhibitoren der Galactosyltransferase B	23
3.1.1	Untersuchung neuer Pyrophosphatmimetika	23
3.1.1.1	<i>Molecular Modelling</i>	23
3.1.1.2	Synthese	29
3.1.1.3	Bissulfonamid-Galactoside als Pyrophosphat-Mimetika	36
3.1.2	Untersuchung neuer Bisubstratanaloga	42
3.1.3	Untersuchung von Triazolderivaten als Nucleobasenanaloga	46
3.2	Ligandbasiertes Design von Inhibitoren der Fucosyltransferase 5	52
3.2.1	Erstellung eines Homologiemodells der Fucosyltransferase 5	52
3.2.2	Rekombinante Expression humaner Fucosyltransferasen	54
3.2.3	Kinetische Charakterisierung mittels Progresskurvenanalyse	59
3.2.4	Pharmakophor zur Ligandauswahl der Nucleobasenanaloga	63
3.2.5	SPR Bindungsstudien	65
3.2.6	STD-NMR	72
3.2.7	Entwicklung möglicher Donorsubstratanaloga	75

4 Zusammenfassung	82
5 Summary	84
6 Experimenteller Teil	86
6.1 Verwendete Materialien und Geräte	86
6.2 Verwendete Software	88
6.3 Verwendete Chemikalien, Enzyme, Standards, Materialien und Anti- körper	88
6.4 Medien und Puffer	89
6.5 Methoden	91
6.5.1 <i>Molecular Modelling</i>	91
6.5.2 Molekularbiologische Arbeiten	96
6.5.3 Zellbiologische Methoden	101
6.5.4 Proteinbiochemische Methoden	103
6.5.5 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	105
6.5.6 Sättigungstransfer-Differenz-NMR (STD-NMR)	106
6.5.7 NMR-Progresskurvenanalyse	107
6.6 Synthesen	108
6.7 Darstellungsversuche	120
7 Gefahrstoffverzeichnis	124
Appendix	131
1 <i>docking</i> an GTB (2RJ7)	131
2 Expressionsvektor	136
3 Sequenzen	136
3.1 humane Fucosyltransferase III	137
3.2 humane Fucosyltransferase V	139
3.3 humane Fucosyltransferase IX	141
3.4 Alignment der humanen Fucosyltransferasen III,V,VII und IX . . .	143
4 SPR-Bindungskurven an Fut5	146
5 STD-Bindungskurven und Inhibitionsversuche an Fut5	154
Literatur	159
Danksagung	167
Erklärung	169

Abkürzungen

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, drei-dimensional
abs.	absolutes
arom.	aromatisch
AS	Aminosäure
Bn	Benzyl
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dest.	destilliert
EE	Ethylacetat
EI	electron impact, Elektronenstoß-Ionisation
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fuc	Fucose
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GDP	Guanidindiphosphat
ges.	gesättigt
GT	Glycosyltransferasen
GTA	α -1,3- <i>N</i> -Acetylgalactosaminyltransferase
GTB	α -1,3-Galactosyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
m	Multipllett
M	Molekulargewicht

Inhaltsverzeichnis

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation –Time of Flight
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
NMR	nuclear magnetic resonance
Nu	Nukleophil
PE	Petrolether
s	Singulett
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TDP	Thymidindiphosphat
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Gal	Uridindiphospho- α -D-Galactose
UDP-GalNAc	Uridindiphospho- α -D-N-Acetylgalactosamin
UMP	Uridinmonophosphat

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Metionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
X	-	Unbekannt oder nicht Standardaminosäure

1 Einleitung

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms zum Anfang dieses Jahrtausends wurde die Basis für die Analyse der über 23.000 Gene des Menschen gelegt. Allerdings stellte der Vergleich naher Verwandter sowie weniger komplexer Organismen die Frage auf, woher die enorme Komplexität und Diversität des Menschen resultiert. Zur Diversität tragen vor allem posttranslationale Modifikation der kodierten Proteine bei. Zunehmend wird anerkannt, dass wichtige Mechanismen der interzellulären Kommunikation und Entwicklung durch komplexe Mechanismen gesteuert werden, die erst nach der Proteintranslation erfolgen.[1] Zu diesen posttranslationalen Veränderungen zählt auch die Glycosylierung von Proteinen. Dabei werden spezifische Glycane, die aus Bausteinen wie Glucose, Mannose und vielen weiteren aufgebaut sind, auf bestimmte Aminosäurereste übertragen. Aufgrund der großen Relevanz glycosylierter Strukturen bei der Zellerkennung und Signaltransduktion gibt es großen Bedarf an Methoden zur detaillierten Aufklärung der Funktion dieser Substanzklasse.[2]

1.1 Glycoproteine

Etwa 60-70 % aller Proteine liegen glycosyliert vor, so dass es sich hierbei um eine wichtige posttranslationale Modifikation handelt.[3] Dabei wird zwischen der N- und O-Glycosylierung unterschieden. Bei der N-Glycosylierung handelt es sich um eine Modifikation am Seitenketten-Stickstoff von Asparaginresten, die im Konsensusmotiv (Asn-X-Ser/Thr) Asparagin gefolgt von einer unbestimmten Aminosäure außer Prolin und dann Serin oder Threonin liegt.[4]

Wenn die entsprechende Erkennungssequenz vorliegt und das Asparagin zugänglich ist, also nicht in der Proteinfaltung verdeckt wird, dann kann es im endoplasmatischen Retikulum glycosyliert werden. Hierbei wird ein komplexes Kohlenhydrat bestehend aus zwei GlcNac, neun Mannosen und drei Glucosen durch die Oligosaccharyltrans-

ferase übertragen.[5] Diese akzeptiert als Donorsubstrat das eben genannte Saccharid gebunden an Dolichol-Pyrophosphat (ein Lipid).[6]

Anschließend erfolgt der Transport in den Golgi-Apparat, wo zunächst die terminalen Mannosen entfernt werden um dann für das Protein und den Organismus typische Glycanstrukturen aufzubauen. Dieser Prozess wird von den entsprechenden Glycosyltransferasen und Glycosidasen vollbracht. Dabei werden verschiedene Typen von Glycanstrukturen unterschieden. Der *high-mannose* Typ findet sich vor allem in Hefen. Dagegen sind im Menschen vor allem Komplex-Typ Glycane und solche vom Hybrid-Typ zu finden. Der Komplextyp zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Monosaccharide aus, während der Hybrid-Typ zwischen dem Komplex-Typ und dem *high-mannose* Typ anzusiedeln ist (s. Abb. 1.1).[4]

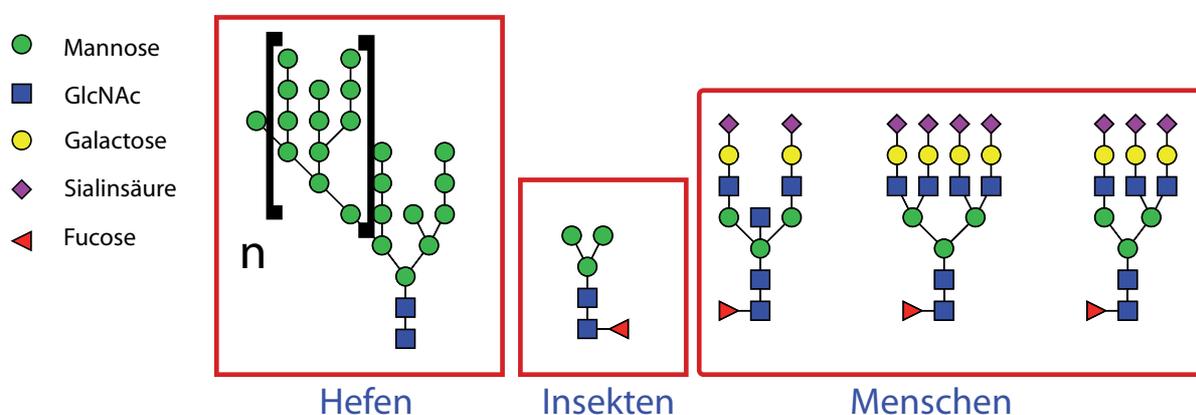


Abb. 1.1: Typische Glycosylierungsmuster von Hefen, Insekten und Menschen. Während Hefen *high-mannose* Strukturen bilden sind in Menschen complex-typ Glycosylierungsmuster zu finden. Insekten wiederum zeigen bis auf Fucosylierung vor allem eine *core*-Glycosylierung. Angepasst nach [7]

Dagegen erfolgt die O-Glycosylierung an den Hydroxy-Gruppen von Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin. Nahmen frühe Arbeiten noch rein strukturelle Funktionen (Unterstützung der Proteinfaltung) an, so weiß man inzwischen, dass die Funktionsvielfalt deutlich weiter reicht.[8] Neben den strukturellen Eigenschaften, wie Unterstützung der Konformation, Schutz gegen Proteolyse (und damit Kontrolle der Lebensdauer) und Modulation der Proteinfunktion (Proteoglycane, Glycocalix), haben Glycoproteine auch erweiterte Funktionen.[9] Die Glycane dienen auch als Liganden für Bindungsereignisse, vermitteln Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion und stellen Zielstrukturen für Mikroorganismen, Toxine und Antikörper dar oder maskieren Zielstrukturen.[2, 10]

Um diese große funktionelle Vielfalt ergründen zu können, sind fortgeschrittene analy-

tische Methoden erforderlich. Da moderne biochemische Werkzeuge wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Untersuchung des Genoms und Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) zur Untersuchung des Proteoms keine Informationen über die Glycosylierung liefern, sind vor allem massenspektrometrische Methoden (MALDI-MS, ESI-MS und LC-ESI-MS) aufschlussreich,[11] ergänzt durch NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Anomeren, der Verknüpfung und der Konformation der Kohlenhydrate.[12]

Zur besseren Analyse werden häufig die Proteine in Peptide gespalten und anschließend das Glycan enzymatisch vom Peptid getrennt. Dadurch erhöht sich die Empfindlichkeit der oben genannten Methoden und viele Signale können erst nach der Spaltung ausgewertet werden.

Aus diesen strukturellen Informationen lassen sich allerdings noch keine direkten Hinweise auf die Funktion der Glycane erlangen. Dazu ist ein Studium der Wirtsorganismen erforderlich.

1.2 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen katalysieren unter anderem die Glycosylierung von Proteinen. Es sind Enzyme, die Kohlenhydrateinheiten von aktivierten Donorsubstraten auf andere Moleküle übertragen. Diese membrangebundenen Proteine übertragen meist Hexosen, wobei diese in den meisten Fällen als aktivierte Nucleotiddiphosphatderivate (NDP) vorliegen. Einige Beispiele für Donorsubstrate sind in Tab. 1.1 dargestellt.[4]

Donor saccharid	Glc	Gal	GlcNAc	UDP- GalNAc	GlcA	Xyl	GDP- Man	Fuc	CMP- Sia
----------------------------	-----	-----	--------	----------------	------	-----	-------------	-----	-------------

Tabelle 1.1: Donorsubstrate der 9 Monosaccharide, die von Glycosyltransferasen auf Proteine übertragen werden.

Das allgemeine Schema der Übertragung ist in Formel 1.1 dargestellt:



Da die Monosaccharide in den komplexen Glycanen hochspezifische Primärsequenzen, glycosidische Verknüpfungen und anomere Strukturen aufweisen, die nur von Glycosyltransferasen in dieser Präzision verknüpft werden, ist ein möglicher Ansatz,

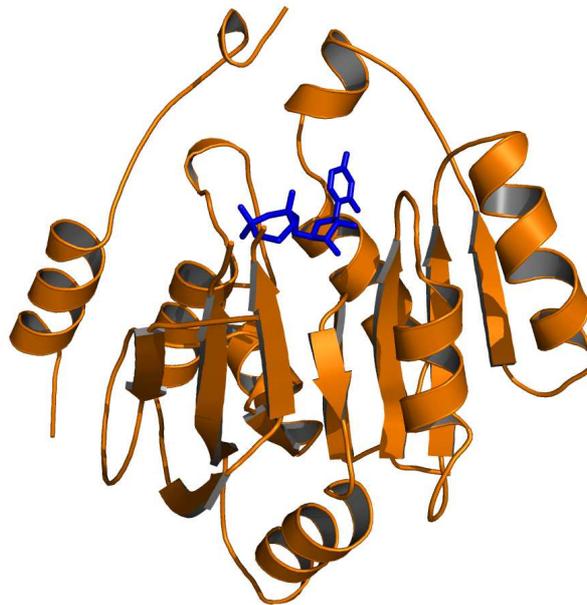


Abb. 1.2: Die GT-A Faltung wird durch das invertierende Enzym SpsA aus *Bacillus subtilis* (PDB 1qgq) gezeigt und besteht aus einem $\beta/\alpha/\beta$ -Sandwich.[14]

um die Funktion einzelner Oligosaccharide in diesen komplexen Strukturen zu untersuchen, die spezifische Inhibition einzelner Glycosyltransferasen. Vorteile dieses Ansatzes sind neben dem reduzierten finanziellen Aufwand gegenüber Knockout-Systemen vor allem, dass es keine Beschränkung auf bestimmte Tierrassen gibt und man zeitliche Unabhängigkeit vom Entwicklungszyklus des untersuchten Organismus gewinnt.

1.2.1 Struktur von Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen können in den meisten Fällen in die zwei Superfamilien GT-A und GT-B eingeteilt werden.[13]

Der GT-A werden vor allem Glycosyltransferasen zugeordnet, die im Golgi-Apparat und ER lokalisiert sind.[14] Die GT-A Faltung (s. Abb. 1.2) besteht aus einem $\beta/\alpha/\beta$ -Sandwich, in Form einer Rossmannfalte. Dies ist ein typisches Strukturelement von Nucleotidbindenden Enzymen. Dabei wird das katalytische Zentrum durch die Assoziation von einem kleineren mit dem zentralen β -Faltblatt gebildet.[15] Die entsprechenden Glycosyltransferasen besitzen alle das sogenannte DXD-Motiv in ihrer

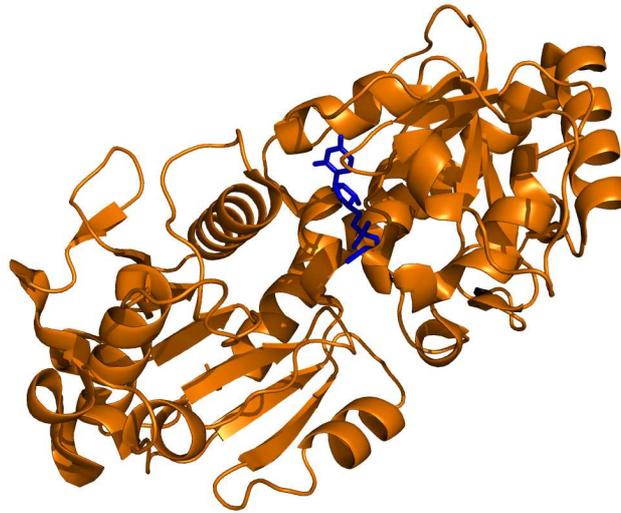


Abb. 1.3: Die GT-B Faltung wird am Beispiel des Enzyms β -Glucosyltransferase aus *Bacteriophage T4* (PDB 1jg7) gezeigt und besteht aus zwei separaten Rossmann-Domänen, die durch eine Spalte verbunden sind.[20]

Aminosäuresequenz, also Aspartat, eine variable Aminosäure X und wieder Aspartat. Die variable Aminosäure im DXD-Motiv ist häufig eine polare oder aliphatische Aminosäure, welche an der Bindung des Ribonukleotids beteiligt ist. Die GT-A Glycosyltransferasen sind von der Anwesenheit eines bivalenten Kations abhängig, im Allgemeinen Mn^{2+} oder Mg^{2+} . Während der Katalyse tritt das Aspartat im DXD-Motiv mit den Phosphatgruppen des Nukleotiddonors in Kontakt, die typischerweise durch Mn^{2+} koordiniert sind.[16] Das C-terminale Ende dient meist zur Erkennung des Akzeptorsubstrates.[17]

Die GT-B Superfamilie ist deutlich heterogener. Ihr gehören vor allem prokaryotische Enzyme an, die sekundäre Metaboliten glycosylieren oder an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind.[18] Außerdem gehören ca. 30 % aller Glycosyltransferasen aus *C. elegans*, sowie die O-GlcNAc-Transferase, die Proteine im Zellkern und Cytoplasma modifiziert, zu dieser Familie.[19]

Die GT-B Faltung (s. Abb. 1.3) wird von zwei separaten Rossmann-Domänen, die durch eine Spalte verbunden sind, gebildet. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich das katalytische Zentrum. Die Topologie der beiden Rossmann-Domänen nimmt mehrere alternierende α -Helices und β -Faltblätter ($\beta/\alpha/\beta$) ein und stellt eine typische nucleotidbindende Domäne dar.[15, 21] Die Bindung eines bivalenten Metall-

ions scheint im Unterschied zur GT-A Superfamilie nicht essentiell für die Katalyse zu sein, wobei es eventuell für die vollständige Aktivität gebraucht wird.[17]

Viele Kristallstrukturen weisen Lücken im Bereich des katalytischen Zentrums auf oder haben flexible Schleifen in der Proteinsequenz, die nicht aufgelöst sind. Gerade diese flexiblen Bereiche scheinen eine wichtige Rolle bei der Katalyse durch den *induced fit* oder bei der Substratbindung durch das Schließen der Substrattasche zu spielen. Anscheinend sind die dynamischen Prozesse in diesen Bereichen aber zu schnell für eine Auflösung mittels Röntgenstrukturanalyse.[22]

1.2.2 Reaktionsmechanismen der Glycosyltransferasen

Die Übertragung des Donorsubstrates erfolgt bei Glycosyltransferasen sowohl regio- als auch stereospezifisch. Mechanistisch wird bei den Glycosyltransferasen zwischen invertierenden und nicht-invertierenden Glycosyltransferasen unterschieden.[13]

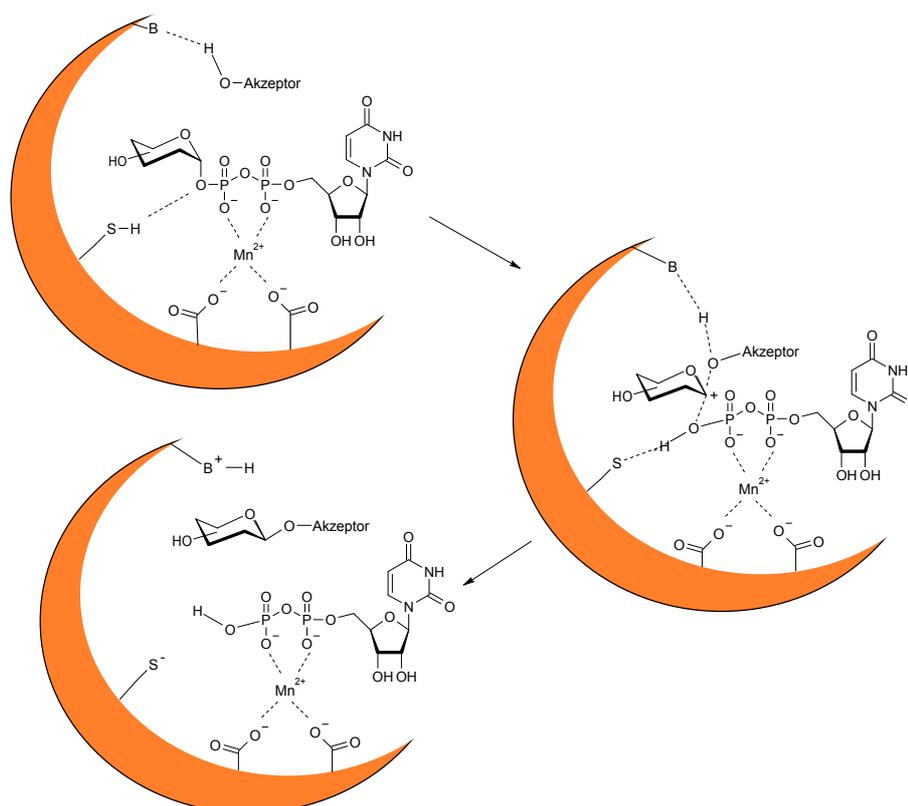


Abb. 1.4: Mechanismus invertierender Glycosyltransferasen: In einem S_N2 -artigen Übergangszustand wird das Donorsubstrat vom Akzeptorsubstrat angegriffen. Das neue Glycosid wird unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum des Donors gebildet.[13]

Der Reaktionsmechanismus für invertierende Glycosyltransferasen kann folgendermaßen beschrieben werden (s. Abb. 1.4): Die glycosidische Bindung des Donorsubstrats wird durch Lewis-saure Katalyse des Proteins geschwächt. Daraufhin kommt es zu einem S_N2 -artigen Übergangszustand mit einem Glycosylcarbeniumion, welches durch den Sauerstoff des Akzeptorsubstrates angegriffen wird, dessen Nucleophilie seinerseits durch eine basische Gruppe des Enzyms gestärkt wird.[23]

Der Mechanismus von nicht-invertierenden Glycosyltransferasen konnte noch nicht

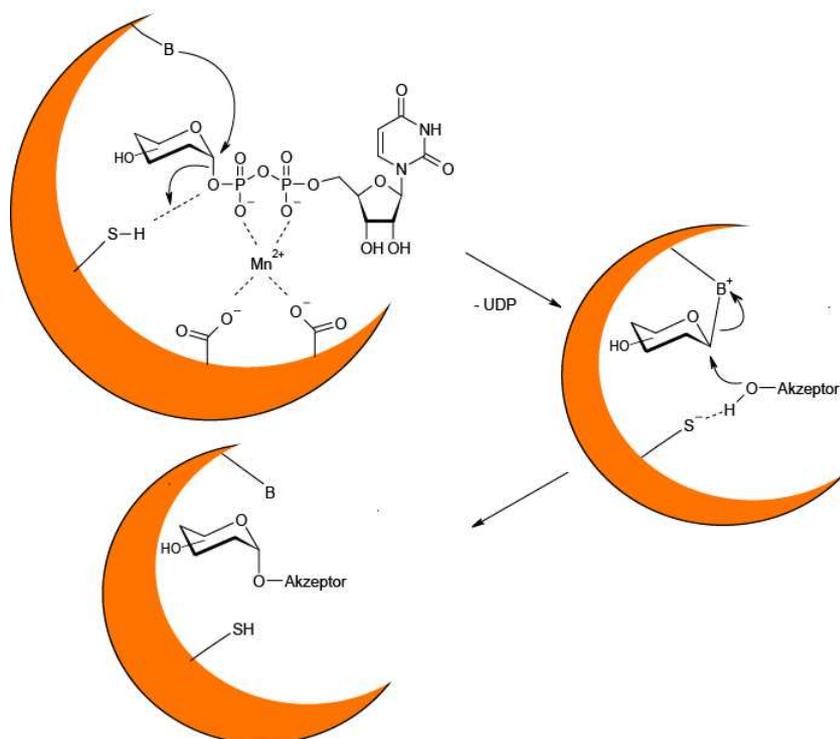


Abb. 1.5: Postulierter Mechanismus der doppelten Inversion für nicht-invertierende Glycosyltransferasen. Nach Angriff einer nucleophilen Gruppe des Enzyms und Austritt von NDP wird die Kohlenhydrateinheit auf den Akzeptor übertragen. Beide Reaktionen erfolgen unter Inversion der Konfiguration.[13]

abschließend aufgeklärt werden. Eine mögliche Hypothese beschreibt der folgende Mechanismus (s. Abb. 1.5):

Eine nucleophile Gruppe des Enzyms greift am anomeren Kohlenstoffatom des Kohlenhydratrestes an, wobei es unter Austritt des NDP-Restes zur Inversion der Konfiguration am anomeren C-Atom kommt. In einem zweiten Schritt wird das katalytische Nucleophil durch das Sauerstoffatom des Akzeptorsubstrates ersetzt. Dieser Schritt erfolgt wieder unter Inversion der Konfiguration, so dass insgesamt die Konfiguration am anomeren Zentrum erhalten bleibt.[24]

Allerdings kann nicht in allen entsprechenden Strukturen eine nucleophile Seitenkette einer Aminosäure in ausreichender Nähe zur *active site* gefunden werden. Auch konnte noch keine Glycosyl-Enzym Bindung nachgewiesen werden. Daher wird als alternativer Mechanismus der einer S_Ni Reaktion postuliert, bei dem vermutlich das austretende Diphosphat den Glycosylakzeptor basenkatalytisch aktiviert und damit

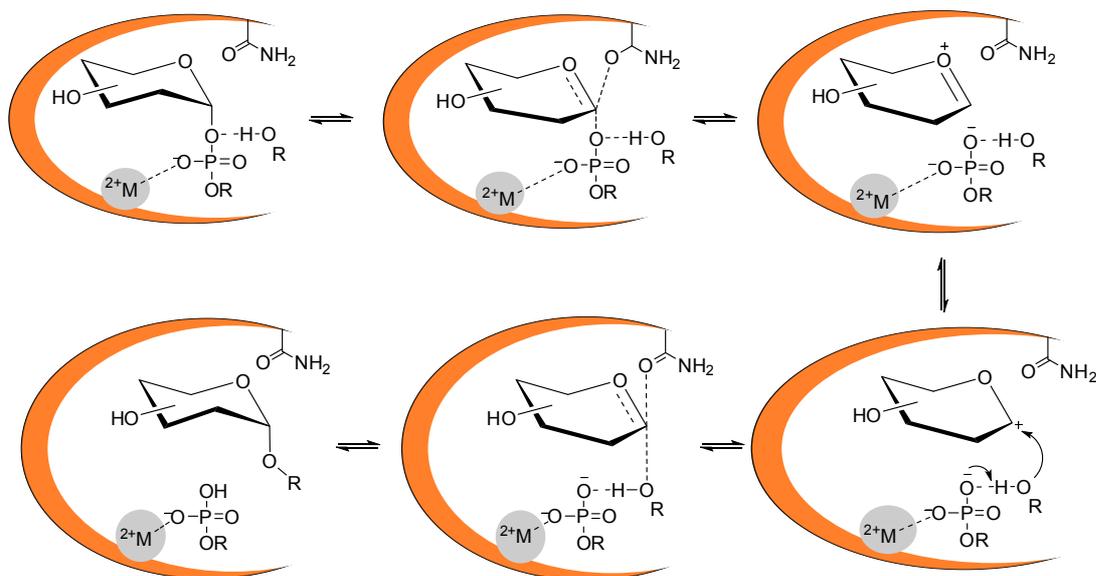


Abb. 1.6: Alternativer Mechanismus einer S_Ni Reaktion für nicht-invertierende Glycosyltransferasen. Beim Austritt der Phosphatgruppe wird die OH-Gruppe des Akzeptors aktiviert und das eng angebundene Ionenpaar greift von derselben Seite an.[13]

den Angriff von derselben Seite ermöglicht (s. Abb. 1.6).[13]

1.2.3 Galactosyltransferasen

Galactose stellt ein häufiges Strukturelement in prokaryotischen und eukaryotischen Glycokonjugaten dar. In Säugetieren findet man $\alpha(1,3)$ bzw. $\alpha(1,4)$ Verknüpfungen der Galactose sowie $\beta(1,3)$ bzw. $\beta(1,4)$ mit den jeweiligen Akzeptoren.

Als gemeinsame Strukturmerkmale von eukaryotischen Galactosyltransferasen findet man, dass sie fast ausschließlich im Golgiapparat lokalisierte Typ II Transmembranproteine sind. Neben einem kurzen cytosolischen Segment, dem ein Transmembrananteil von etwa 20 Aminosäuren folgt, bildet eine große katalytische Domäne im Lumen den Hauptteil des Proteins.[25]

Blutgruppe	Antigen(e)	Antikörper
A	A	B
B	B	A
AB	A und B	keine
0	keine	A und B

Tabelle 1.2: Merkmale der verschiedenen Blutgruppen.

Das AB0 Blutgruppensystem

1901 beschrieb der Österreicher Karl Landsteiner das AB0 Blutgruppensystem[26]. Dieses Blutgruppensystem hat sich zusammen mit dem Rhesusfaktor als das wichtigste Blutgruppensystem der Transfusionsmedizin entwickelt, da sich hiermit die meisten Komplikationen bei Bluttransfusionen vermeiden lassen. Es beruht auf der Beobachtung, dass bei der Mischung von Blut bestimmter Spender Aggregation auftritt. Da diese Aggregation bei der Bluttransfusion schwere Folgen hat, erklärt dies die weitreichende Bedeutung der Tests für dieses Blutgruppensystem.

Gut 50 Jahre später konnte die Ursache für die Aggregation erstmals auf molekularer Ebene nachvollzogen werden. Auf der Oberfläche von Erythrozyten und einigen anderen Zellen konnten die Antigene durch partielle Hydrolyse und Analyse der erhaltenen Fragmente nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um das H-Antigen (α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal) bei Blutgruppe 0 und die Blutgruppen-Antigene A (α -D-GalNAc(1-3)- α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal) und B (α -D-Gal-(1-3)- α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal). [27]

Dabei besitzt die Blutgruppe A das Antigen A und den Antikörper Anti-B, die Blutgruppe B entsprechend Antigen B und Antikörper Anti-A und Blutgruppe AB besitzt die Antigene A und B sowie keine Antikörper. Keine Antigene, aber Antikörper Anti-A und Anti-B, sind bei der Blutgruppe 0 präsent (s. Abb. 1.2).

Diese komplexen Strukturen werden durch eine Abfolge von Glycosyltransferasen gebildet. Im letzten Schritt wird die Zugehörigkeit zur Blutgruppe A oder B durch die Übertragung des Gal- oder GalNAc-Restes bestimmt. 1978 konnten die beiden Enzyme isoliert werden, die für die Bildung der Antigene A und B aus dem H-Antigen verantwortlich sind. Bei der Bildung des A-Antigens handelt es sich um die α -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA), die ein N-Acetylgalactosamin-Monosaccharid vom Donorsubstrat UDP-GalNAc überträgt. Die Blutgruppen B Galactosyltransferase (GTB) überträgt dagegen eine Galactose vom Donorsubstrat UDP-Gal auf das H-

Antigen. In Abwesenheit dieser beiden Enzyme kann keines der beiden Substrate übertragen werden und es handelt sich um die Blutgruppe 0. Wenn beide Enzyme exprimiert werden, handelt es sich um die Blutgruppe AB (s. Abb. 1.7).[28]

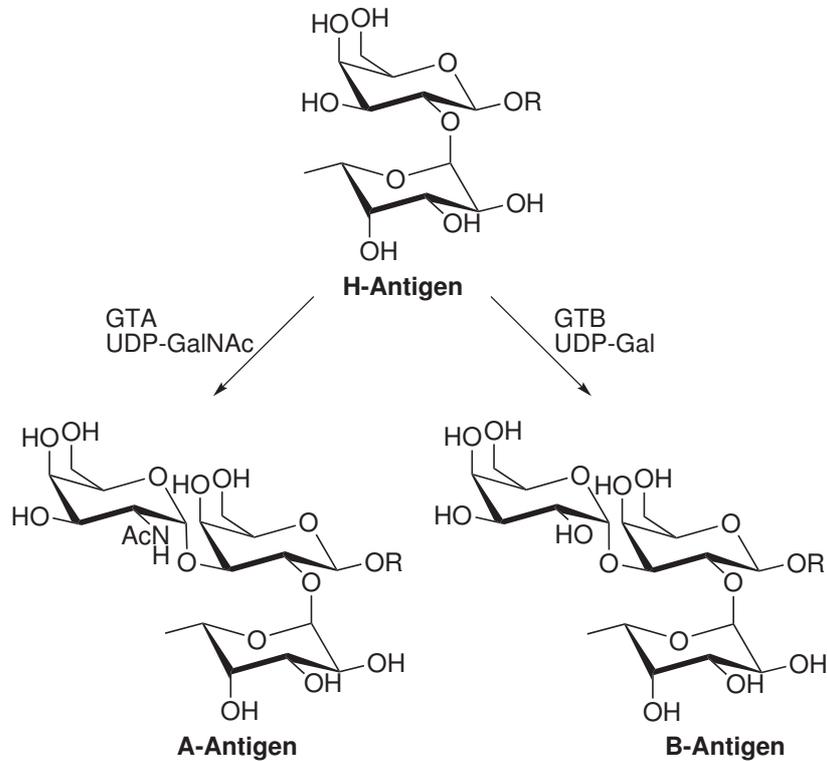


Abb. 1.7: Bildung der Antigene A und B durch die Glycosyltransferasen GTA und GTB aus den Donorsubstraten UDP-GalNAc und UDP-Gal und dem H-Antigen.

Die humane Galactosyltransferase der Blutgruppe B

Träger der Blutgruppe B oder AB exprimieren die Galactosyltransferase (GTB) der Blutgruppe B. GTA und GTB gehören beide der Superfamilie GT-A an und werden zur Familie GT6 gezählt.[23] In dieser Familie ist bis heute nur noch eine Struktur der β -Galactosid α -1,3-galactosyltransferase aus der Kuh sowie eine GalNAc-Transferase aus *Bacteroides ovatus* hinterlegt.[23] Die GTB unterscheidet sich von der GTA nur in vier Aminosäuren.[29] Damit stellen sie eines der homologsten bekannten Glycosyltransferasepaare dar.

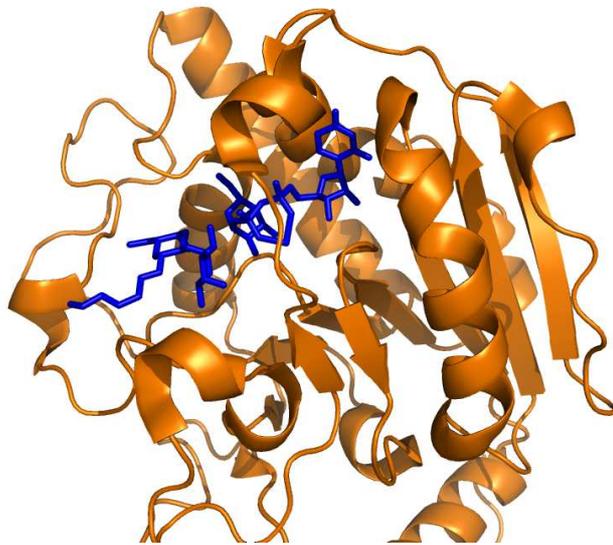


Abb. 1.8: Chimäre Struktur aus GTA und GTB, in der zwei Aminosäuren aus dem aktiven Zentrum der GTA und zwei aus dem aktiven Zentrum der GTB stammen. Gebunden dargestellt sind die natürlichen Substrate UDPGal und das H-Antigen (PDB 2rj7). *crossed eye* Darstellung des Proteins als Cartoon.

Eigenschaften der GTB Die Struktur der GTB wurde erstmalig im Jahr 2002 röntgenkristallographisch aufgeklärt.[30] Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die durch eine Spalte getrennt sind, in der sich das aktive Zentrum sowie alle vier Aminosäuren befinden, durch die sich die GTB und die GTA unterscheiden. Das aktive Zentrum wird von einer flexiblen Schleife flankiert (Aminosäuren 179-194), die erst sehr viel später in einer neueren Röntgenstruktur aufgelöst werden konnte.[31] Beide Domänen sind für die Erkennung der beiden natürlichen Substrate von GTB verantwortlich. Die N-terminale Domäne ist für die Bindung des Donorsubstrates zuständig, während das Akzeptorsubstrat am C-Terminus gebunden wird.[30]

Das DXD-Motiv wird von den Aminosäuren Asp211, Val212 und Asp213 gebildet und befindet sich in der Mitte der Spalte, wo es ein bivalentes Kation koordiniert.

Bioaktive Konformation der Substrate der GTB Bis 2008 lagen keine kristallographischen Daten über die bioaktive Konformation des Donorsubstrates UDP-Gal vor und man griff auf Daten aus transfer-NOE-NMR-Experimenten zurück, um die Konformation von UDP-Gal in der Enzytasche zu klären.[32] Seit 2008 ist eine chimäre Struktur aus GTA und GTB, in der zwei Aminosäuren aus dem aktiven Zentrum

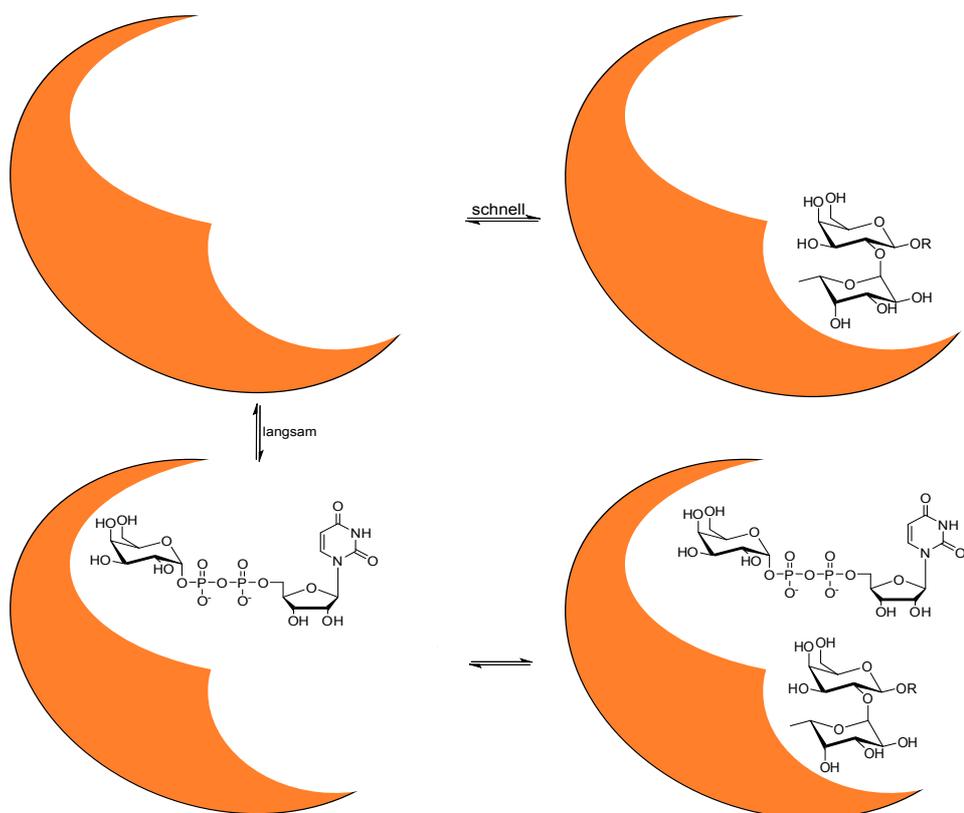


Abb. 1.9: Postulierter Mechanismus der Substratbindung: Da der Austausch des H-Antigens schnell erfolgt, ist dessen Bindung wahrscheinlicher, wenn bereits UDP-Gal gebunden ist, dessen Assoziation langsamer erfolgt und mit größeren konformationellen Änderungen verbunden ist.[32]

der GTA und 2 aus dem aktiven Zentrum der GTB stammen, kristallisiert. In dieser Struktur wurde mittels *soaking* UDP-Gal aufgesogen und schnell genug präpariert, um die Röntgenstruktur aufzunehmen. Die Hydrolaseaktivität des Enzyms ist sehr hoch, daher wurde in früheren Versuchen häufig nur UDP gefunden.[31]

Dabei kann in beiden Experimenten festgestellt werden, dass das H-Antigen auch in Lösung in seiner bioaktiven Form vorliegt, während UDP-Gal in einer Konformation gebunden wird, die in Lösung energetisch ungünstig ist. Man nimmt daher an, dass die Bindung an das Enzym die bioaktive Konformation durch die freiwerdende Bindungsenergie unterstützt. Diese Konformation wird dann durch ein bivalentes Metallion stabilisiert.[32]

Bereits aus den NMR-Daten wurde ein Mechanismus postuliert, der die Bildung des

ternären Enzym-Substrat-Komplexes erläutert und die Übertragung von Galactose von UDP-Gal auf das H-Antigen erklärt (s. Abb. 1.9).

Ungebundenes UDP-Gal wird demnach in der zurückgebogenen bioaktiven Konformation von der GTB gebunden und stabilisiert. Da die Lebensdauer des GTB-Donor-substrat-Komplexes mit 100 ms länger ist, als die des GTB-Akzeptorsubstrat-Komplexes (Lebensdauer ca. 10 ms), bildet sich der ternäre Komplex nur bei der Bindung von UDP-Gal; da erst dann die Übertragung von Galactose auf das H-Antigen stattfinden kann.[31]

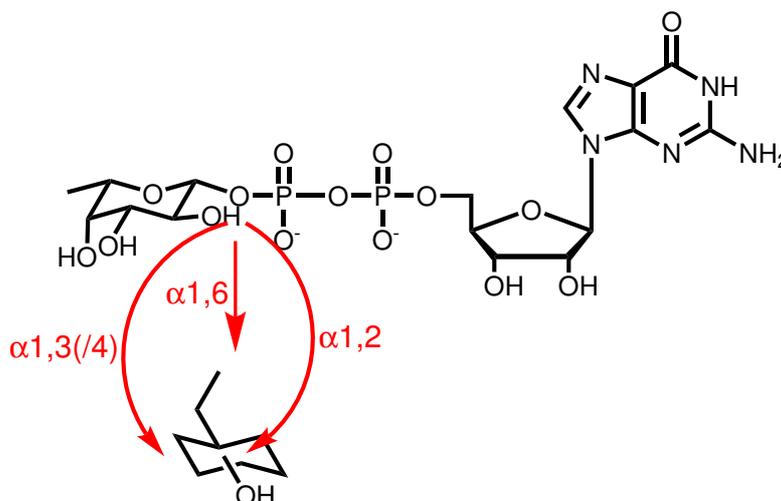


Abb. 1.10: Fucosyltransferasen übertragen Fucose von GDP-Fuc auf Substrate in den oben dargestellten Verknüpfungen.

1.2.4 Fucosyltransferasen

Fucosyltransferasen katalysieren die Übertragung von L-Fucose von GDP-Fuc auf Akzeptorsubstrate (s. Abb. 1.10). Dies sind im Falle der N-Glycane wiederum Zucker. Es sind bis heute 13 verschiedene Fucosyltransferasen des menschlichen Genoms bekannt.[33] Davon sind zwei O-Glycosyltransferasen (POFUT1 und 2). Die N-Glycane werden von 11 Fucosyltransferasen gebildet. Dabei übertragen die Fucosyltransferasen 1 und 2 die Fucosereste in einer α -1,2 Verknüpfung. Von der Fucosyltransferase 1 wird das H-Antigen als Vorläufer der zuvor besprochenen Blutgruppenantigene gebildet, während die Fucosyltransferase 2 die sekretorische Variante darstellt.[34]

Die Fucosyltransferase 8 überträgt in α -1,6-Verknüpfung besonders auf das innenliegende GlcNac, weshalb auch von core-Fucosylierung gesprochen wird.[34] Dieses Enzym ist ebenfalls das Einzige, für das die Kristallstruktur einer humanen Fucosyltransferase vorliegt. Gleichzeitig ist es die einzige Fucosyltransferase, die selbst keine Glycosylierung trägt. Dies scheint für die Expression und Kristallisation von Vorteil zu sein.

Die restlichen Fucosyltransferasen übertragen allesamt α -1,3 verknüpfte Fucose. Die Lewis Epitope a,b und x stellen ebenso wie die entsprechenden Sialyl-Varianten Liganden für die Interaktion mit den E-, P- und L-Selectinen dar.[35] Dabei sitzen E-Selectine auf Endothelzellen, P-Selectine auf Erythrozyten und L-Selectine auf Leu-

kozyten. Diese Oberflächenproteine haben wesentliche Aufgaben bei der Zellerkennung und Interaktion. Dabei tragen sie extrazellulär eine Lectin-Domäne, die in der Lage ist Kohlenhydrate zu erkennen. Eine wesentliche Rolle spielen die Lectine dabei im gesunden Körper bei der Steuerung von Entzündungsprozessen.[36] Gleichzeitig werden dieselben Erkennungsmuster im Falle einer Krebserkrankung auch bei der Metastasierung beobachtet. Da hierbei insbesondere die oben genannten Lewis Epitope involviert scheinen, sind die hieran beteiligten Enzyme von großer medizinischer Bedeutung. [33]

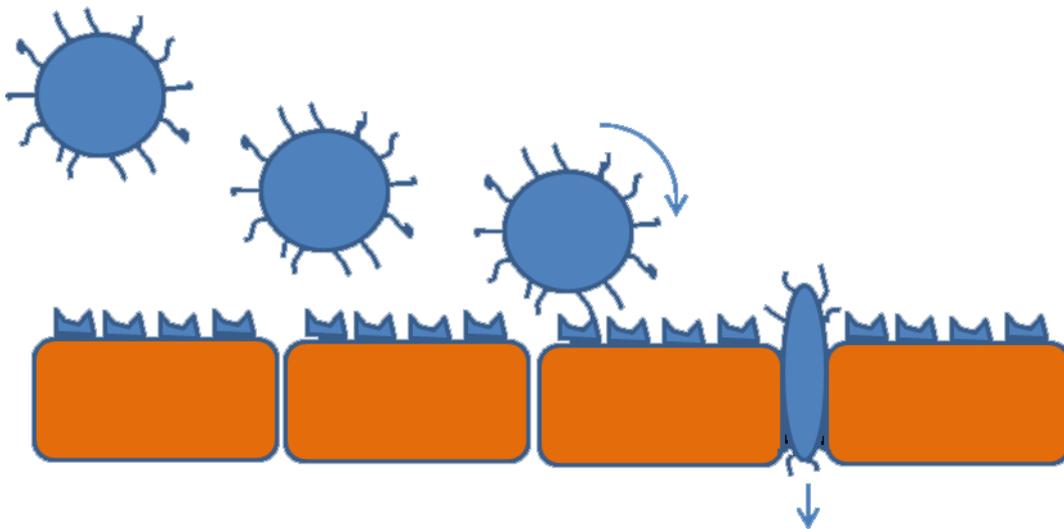


Abb. 1.11: Die Zelladhäsion wird über die Interaktion von Glycanstrukturen (wie dem Lewis Motif) mit Lectindomänen der Selectine vermittelt. Erst durch diese Interaktionen ist eine Verzögerung im Blutstrom und damit ein Rollen entlang der Epithelschicht möglich.

In Abbildung 1.12 ist der phylogenetische Stammbaum der humanen α -1,3-Fucosyltransferasen dargestellt. Dort zeigt sich die genetische Ähnlichkeit der Transferasen 3, 5 und 6. Dies lässt sich entsprechend auch im *alignment* nachvollziehen (im Appendix auf S. 145).

Während über die biologische Funktion der Fucosyltransferasen 10 und 11 zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt ist, zeigen sie genetisch stärkere Ähnlichkeit zur Fucosyltransferase 9, als zu allen anderen Fucosyltransferasen. Die Fucosyltransferase 9 wiederum zeigt in *knock-out* Mäusen eine verringerte Bildung der Lewis-X Struktur im Hirn und damit einhergehend Angst-assoziiertes Verhalten.[37]

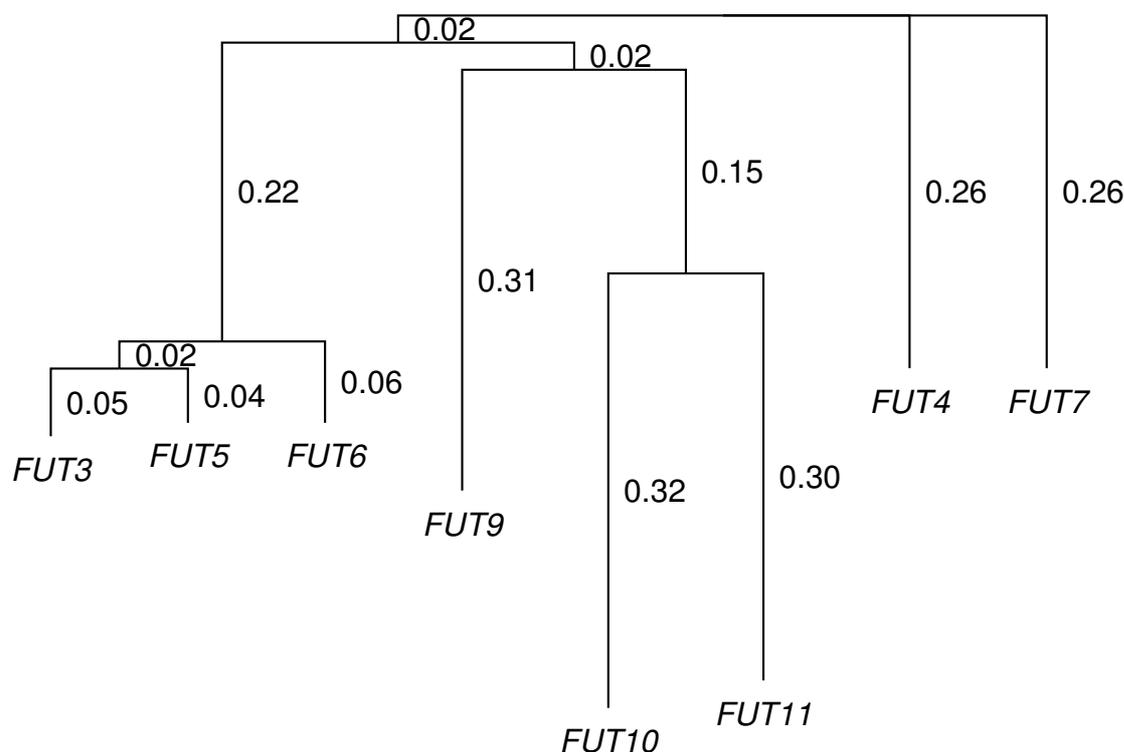


Abb. 1.12: Der phylogenetische Stammbaum der humanen α -1,3-Fucosyltransferasen zeigt die Ähnlichkeit der Fucosyltransferasen 3, 5 und 6.

1.2.5 Glycosyltransferaseinhibitoren

Glycosyltransferaseinhibitoren können nach ihren Strukturmerkmalen in drei Klassen eingeteilt werden.[38]

Es gibt Donorsubstratanaloga, die oft Strukturmerkmale von Nucleotid-diphosphateinheiten oder -monophosphateinheiten beinhalten. Daneben existieren Akzeptorsubstratanaloga, die sich vom Akzeptorsubstrat ableiten und oftmals Disaccharide sind. Desweiteren Bisubstratanaloga, die Strukturelemente des Donor- wie auch Akzeptorsubstrates aufweisen.

Dabei wird die Spezifität meist nur durch Bisubstratanaloga erreicht, da sowohl die Donoren als auch Akzeptoren häufig von mehreren Glycosyltransferasen akzeptiert werden und demnach auch ihre jeweiligen Analoga unspezifisch binden.[38]

Oligosaccharide und Glycokonjugate spielen eine wichtige Rolle in der Zellerkennung und in Signaltransduktionskaskaden, daher ist zur Aufklärung der biologischen Funktion und strukturellen Beziehungen die gezielte Beeinflussung von Glycosylierungs-

prozessen von großem Interesse. Die spezifische Inhibition von Glycosyltransferasen ist dafür ein geeignetes Mittel. Trotz einer Reihe bereits bekannter Inhibitoren für Glycosyltransferasen ist die spezifische Hemmung einer Glycosyltransferase nicht trivial. Die geringe Anzahl von Kristallstrukturen, die zur Verfügung stehen, schränkt das strukturbasierte Design stark ein. Und auch für Hochdurchsatz-*screenings* muss das *target* zumindest isolierbar sein. Dies stellt gerade bei membranständigen Proteinen eine große Hürde für die Entwicklung einer Leitstruktur dar.

1.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Strukturbasiertes Design beruht auf der strukturellen Kenntnis des *Targets* und/oder bereits bestehender Stoffe, die damit in Wechselwirkung treten, es ist erst seit den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts verfügbar.[39] Hier sind insbesondere leistungsfähige pro- und eukaryotische Expressionssysteme zu nennen, durch die ausreichende Mengen von Proteinen für die Strukturanalyse und Bindungsstudien gewonnen werden können. Hinzu kommen Fortschritte in der Röntgenstrukturanalyse, der NMR-Spektroskopie und die ständig steigende Leistungsfähigkeit der Rechner, so dass die benötigte Zeit zur Aufklärung von Strukturen deutlich gesenkt werden konnte und inzwischen sehr große Proteine sowohl kristallisiert sind als auch die Wechselwirkungen am Computer simuliert werden können. 1988 befanden sich noch knapp 200 3D-Strukturen in der Brookhaven Protein-Datenbank. Zum Stand November 2014 sind mehr als 100 000 Strukturen in der Proteindatenbank hinterlegt.[40]

1.4 Ligandbasiertes Wirkstoffdesign

Im Gegensatz zum strukturbasierten Wirkstoffdesign ist es beim ligandbasierten Wirkstoffdesign nicht nötig die Struktur des Rezeptors zu kennen.

Die Entwicklung dieser Methode hat vor allem historische Gründe. So waren bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts vor allem zufällige Entdeckungen für die Entwicklung von Wirkstoffen verantwortlich. Während die Erfolgsquote dieser Vorgehensweise geringer wurde, waren gleichzeitig noch keine Strukturinformationen der Proteine vorhanden.[41] Erst mit den Arbeiten von Perutz und Kendrew in den sechziger Jahren waren erste grobe Strukturmodelle von Proteinen vorhanden.[42, 43] Die erste hochauflösende Proteinstruktur datiert auf das Jahr 1967.[44]

Auch heutzutage hat das ligandbasierte Wirkstoffdesign einen wesentlichen Anteil an der Wirkstoffentwicklung obwohl inzwischen eine Vielzahl an Proteinstrukturen vorhanden sind. So sind es gerade die membranständigen Proteine, die häufig schwierig zu kristallisieren sind. Dementsprechend ist gerade für die Glycosyltransferasen die Datenlage, was Strukturinformation angeht, besonders dünn.[23]

Das ligandbasierte Wirkstoffdesign benötigt hingegen nur die Information über die Bindungseigenschaften einiger weniger Moleküle. Ausgehend von dieser Information gibt es zwei Ansätze um die Affinität von neuen Molekülen vorher zu sagen und zu bewerten.[45]

1.4.1 Pharmakophormodelle

Der Pharmakophorbegriff wurde von Kier ausgehend von Molekülorbitalberechnungen entwickelt.[46, 47] Nach IUPAC Definition handelt es sich um die sterischen und elektronischen Eigenschaften, die nötig sind um eine optimale Interaktion mit dem Zielmolekül zu gewährleisten.[48] Insofern erklärt ein Pharmakophormodell, warum strukturell unterschiedliche Moleküle an den gleichen Rezeptor binden können. Die Modellentwicklung beginnt mit einem Satz diverser Liganden, von denen einige binden und andere nicht. Für diese muss dann eine energetisch günstige Konformation gefunden werden und eine Überlagerung der Moleküle, sodass zum Beispiel Phenylringe als gemeinsames Strukturmerkmal überlagert werden. Hiervon ausgehend kann dann die Bewertung der Eigenschaften von Bindern und Nichtbindern, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückendonoren sowie Akzeptoren, erfolgen. Mit einem Satz an Testmolekülen sollte dann überprüft werden ob die korrekte Vorhersage der biologischen Aktivität tatsächlich möglich ist. Ebenso ist es natürlich möglich das Modell mit der wachsenden Menge an Informationen, die über Bindungspartner gewonnen wird, zu verfeinern.[45, 49]

1.4.2 Quantitative Struktur-Aktivitäts Beziehung (QSAR)

Nach IUPAC Definition handelt es sich bei der quantitativen Struktur-Aktivitäts Beziehung um mathematische Methoden um die chemische Struktur mit einer pharmakologischen Aktivität in Beziehung zu setzen. Dazu werden Regressions-Methoden oder Methoden zur Mustererkennung eingesetzt.[48] Dabei werden physikochemische Eigenschaften als Deskriptoren zur Vorhersage der biologischen Aktivität verwendet. Als Maß der Aktivität wird häufig eine Bindungs- oder Inhibitions-Konstante verwendet. Die zugrunde liegende Annahme ist demnach, dass ähnliche Strukturen auch eine ähnliche Wirkung aufweisen. Eine vielfache Anwendung dieses Prinzips ist die der Bioisostere. So lassen sich durch Austausch von Gruppen, wie z. B. Wasserstoff durch Deuterium oder Fluor, die pharmakologischen Eigenschaften wie Toxizität oder Wirksamkeit gezielt beeinflussen. [50] Um eine Vorhersage derartiger Veränderungen leisten zu können, muss das Regressionsmodell in der Lage sein, die Aktivitätsänderung durch kleine Variationen der Moleküle vorherzusagen. Eine sorgfältige Überprüfung der erstellten Modelle ist gerade deshalb vonnöten, da durch den induktiven Charakter des QSAR Prinzips leicht Fehlaussagen getroffen werden können.[51, 52]

Gerade deshalb versucht man mit dieser Methode häufig besonders starke Trends aufzuspüren, die sich dann mit einfachen Merkmalen der Moleküle, wie der Polarität oder der Anzahl an Wasserstoffbrücken Donoren, erklären lassen.[53]

1.5 Rekombinante Expression von Proteinen

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität für die oben genannten Modelle ist weiterhin die Messung von Affinitätsdaten unumgänglich. Daher wird das jeweilige Zielprotein in ausreichender Menge und Reinheit benötigt. Da die Isolation aus natürlichem Material häufig geringere Mengen oder Feinheiten liefert, wird seit der Verfügbarkeit von modernen biochemischen Methoden auf die rekombinante Expression gesetzt. Dabei wird zunächst die Ziel Sequenz aus Genomischer DNA amplifiziert. Anschließend erfolgt die Ligation in einen passenden Vektor, der geeignet ist die DNA in den Expressionsstamm zu überführen (hierfür kommen unter anderem Viren und Plasmide infrage).[54]

Als Expressionssysteme kommen neben bakteriellen Systemen wie *E. coli* [55] vor allem eukariotische Systeme wie Hefen (*P. Pastoris* [56], *S. cerevisiae* [57]), Insektenzellen (*S. frugiperda* [58, 59]) und Säugerzellen (Chinese Hamster Ovary, CHO und Human Embryonic Kidney, HEK [60, 61]) infrage. Nach einer Selektion der erfolgreich transformierten Zellen, erfolgt die Expression des Zielproteins durch Induktion eines zelleigenen Promoters. Die anschließende Reinigung des Proteins von den sonstigen zellulären Proteinen erfolgt heutzutage häufig durch das Anbringen eines Histidin tags, das dann selektiv mittels immobilisierter Metall-Affinitäts Chromatographie (IMAC) gebunden und anschließend wieder eluiert wird.[62, 63]

	Wachstum	Expressionslevel	Posttranslationale Modifikationen
<i>E. coli</i>	Schnell (30 Minuten)	Hoch	Nein
Hefen	Schnell (90 Minuten)	Niedrig - hoch	Ja
Insektenzellen	Langsam (18-24 h)	Niedrig - hoch	Ja
Säugerzellen	Langsam (24 h)	Niedrig - moderat	Ja

Tabelle 1.3: Die Wahl eines Expressionssystems bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit und Erträge wird von den Eigenschaften des jeweiligen Zielproteins beeinflusst.

Die Wahl des Zellsystems wird dabei vor allem von den Eigenschaften des Proteins bestimmt (s. Tab. 1.3). Während coli-Bakterien schnell und in günstigen Medien wachsen, weisen sie die Merkmale der höheren Organismen, wie posttranslationale Modifikationen, nicht auf. Dadurch sind gerade die Glycosyltransferasen häufig nicht richtig gefaltet und können entsprechend nicht löslich in das Nährmedium abgegeben

werden. In diesem Fall muss auf die eukaryotischen Expressionssysteme zurückgegriffen werden. Während Hefen ebenfalls schnell wachsen und in günstigen Medien kultiviert werden können, ist ihre N-Glycosylierung vom high mannose Typ, was unter Umständen Probleme bereiten kann. Dagegen wachsen Insektenzellen und Säugerkzellen relativ langsam und in teureren Nährmedien. Dafür gibt es häufig keine Probleme mit der Faltung und die Glycosylierung ist der humanen ähnlicher (Insektenzellen) oder gleich. Wie Tabelle 1.3 entnommen werden kann sinkt typischerweise auch die Expressionsrate von Bakterien über Hefen zu Säugerkzellen.[64]

2 Problemstellung

Oligosaccharide spielen eine wichtige Rolle in der Zellerkennung und Signaltransduktion.[8] Eine gezielte Beeinflussung der Biosynthese ist demnach von großer Bedeutung, um sowohl Informationen über die vielfältigen biologischen Phänomene zu erhalten als auch durch spezifische Hemmung von Glycosyltransferasen Einfluss auf medizinisch relevante Funktionen zu nehmen.[65] Glycosyltransferasen spielen unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren.[66]

Die Galactosyltransferase B (GTB) ist für den Aufbau des Blutgruppenantigens B verantwortlich.[30] Träger der Blutgruppe B zeigen eine 1.7 -fach höhere Wahrscheinlichkeit an Darmkrebs zu erkranken.[67] Daher stellt diese Glycosyltransferase ein relevantes Ziel für die Inhibitor-Entwicklung dar. Zudem ist dieses Enzym sowohl strukturell charakterisiert, als auch bezüglich der kinetischen Parameter detailliert beschrieben.[68] Potente Inhibitoren für Glycosyltransferasen müssen allerdings zwei Voraussetzungen erfüllen. Zum einen müssen sie eine hohe Affinität besitzen, was vor allem auf die Wechselwirkungen des Pyrophosphates und der Nucleobase zurückzuführen ist. Zum anderen müssen sie die notwendige Spezifität aufweisen, damit sie nur auf eine Glycosyltransferase wirken. Um hochaffine Inhibitoren für GTs zu entwickeln, die gleichzeitig zellpermeabel sind, muss die negative Ladung des Pyrophosphates durch nichtionische Reste ersetzt werden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern sich das Pyrophosphat durch ungeladene Moleküle ersetzen lässt. Zudem sollen Synthese-bausteine und -routen entwickelt werden, mit deren Hilfe effektive Inhibitoren modular aufgebaut werden können.

Da Donorsubstrat-analoge Inhibitoren prinzipiell auf ganze Klassen von Glycosyltransferasen wirken (z. B. alle Galactosyltransferasen) ist zudem ein einfacher Aufbau bisubstratanaloger Inhibitoren wünschenswert. Hierfür soll untersucht werden, ob ein Thiadiazolderivat [69], als Basis für eine Affinitätssteigerung dienen kann.

Die Fucosyltransferase 5 ist für den Aufbau des Lewis X Antigens verantwortlich.[70] Dieses spielt bei der Metastasierung von Krebs eine entscheidende Rolle.[37] Im Gegensatz zur GTB ist für die Fucosyltransferase 5 keine Struktur bekannt. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich strukturelle Informationen über das Enzym gewinnen lassen und falls nicht, soll über einen ligandbasierten Ansatz ein Pharmakophormodell des Donorsubstrates entwickelt werden, mit dessen Hilfe sich donorsubstratanaloge Inhibitoren darstellen lassen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturbasiertes Design von Inhibitoren der humanen Galactosyltransferase B

3.1.1 Untersuchung neuer Pyrophosphatmimetika

3.1.1.1 *Molecular Modelling*

Bindung des natürlichen Donorsubstrates UDP-Gal Für den Entwurf neuer Pyrophosphatmimetika ist das Verständnis der Bindung des natürlichen Substrates UDP-Galactose eine essenzielle Voraussetzung. Eine gute Basis hierfür ist die 2008 veröffentlichte Struktur 2RJ8 aus der Proteindatenbank.[31] In dieser Struktur ist die GTB in ihrer geschlossenen Konformation aufgelöst. Außerdem ist das Donorsubstrat UDP kokristallisiert, allerdings fehlt in dieser Struktur die Galactose, da diese durch die Enzymaktivität schnell hydrolytisch abgespalten wird. Zusammen mit der oben angegebenen Struktur wurde gleichzeitig der Eintrag 2RJ7 in der Proteindatenbank abgelegt. In dieser Struktur wurden molekularbiologisch an zwei Positionen gegenüber der GTB Mutationen zur Sequenz der GTA eingeführt, dafür ist aber UDP-Galactose kokristallisiert. Durch ein *alignment* der beiden Strukturen lässt sich die UDP-Galactose in ihrer Bindungskonformation in die Struktur 2RJ8 übernehmen. So lassen sich wesentliche Interaktionen des Moleküls mit der GTB bestimmen. Dieser statischen Betrachtung fehlt allerdings der zeitliche Verlauf der Interaktion, weshalb eine molekulardynamische Simulation erstellt wurde. Hierfür wurde eine Wasserbox mit mindestens 10 Å Abstände des Proteins zu den Seiten verwendet. Zusätzlich zum Ladungsausgleich mit Natrium- bzw. Chlorid-Ionen wurde die Salzkonzentration auf 0.15 M eingestellt. Die Simulationszeit betrug 2.4 ns. In Abbildung 3.1 sind diese Interaktionen grafisch zusammengefasst. Hervorzuheben sind die Wechselwirkungen des Pyrophosphats mit dem Mangan, die über 100 % der Simulationszeit stabil sind. Daneben zeigen sich im Bereich der Nucleobase Wechselwirkungen des NH der Nucleobase zum Rückgrat von Isoleucin 123 und eine π -Wechselwirkung mit Tyrosin 126. Diese Daten decken sich ebenfalls mit der energetischen Untersuchung der Fragmente, die wesentliche Energiebeiträge im Bereich der Nucleobase und des Pyrophosphats zeigen.[68]

3 Ergebnisse und Diskussion

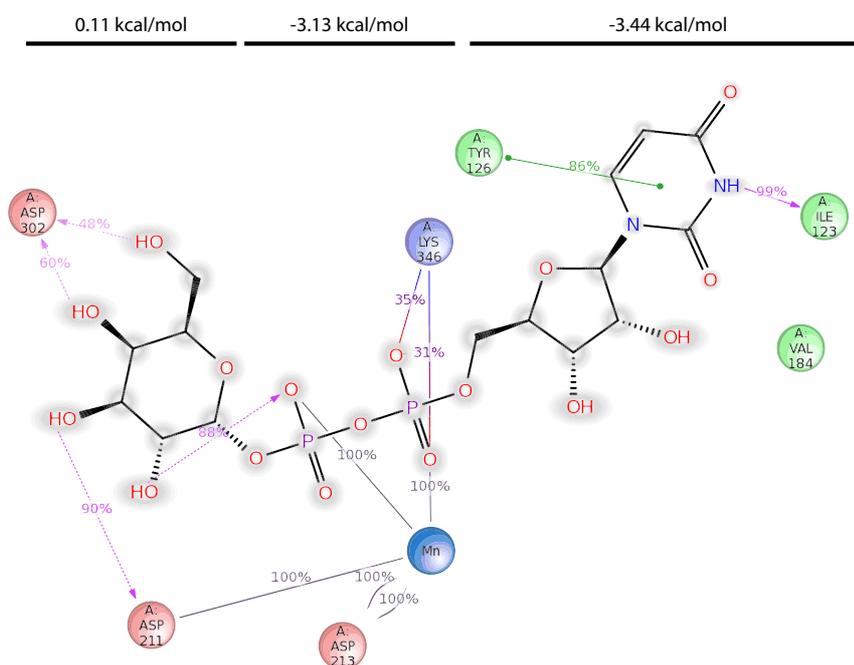


Abb. 3.1: Zusammenfassung der Interaktionen von UDP-Gal mit der GTB. Im zeitlichen Verlauf sind vor allem die Kontakte des Mangans mit den Sauerstoffen des Pyrophosphats und den beiden Aspartaten 211 und 213, mit jeweils 100 % Kontaktzeit, von essentieller Bedeutung. Ebenso ist der Kontakt der Nucleobase mit dem Rückgrat des Isoleucins 123 in Form einer Wasserstoffbrücke entscheidend. Desweiteren trägt Tyrosin 126 in Form einer $\pi - \pi$ -Interaktion über 86 % des Simulationszeitraums zur Bindung bei. Die wesentlichen Energiebeiträge des Donorsubstrates UDP-Gal stammen von der Nucleobase und dem Pyrophosphat.[68]

Eine energetisch nachgeordnete Rolle spielt die Galactose, die aber für die Spezifität verantwortlich ist. So wird UDP-Galactose nur von Galactosyltransferasen hochaffin gebunden. Auch in der molekulardynamischen Simulation zeigt sich, dass die Kontakte der Galactose nicht über den gesamten Simulationszeitraum aufrechterhalten werden, wobei der stärkste Kontakt hier über 90 % der Simulation zwischen der 3-Hydroxygruppe und Aspartat 211 gebildet wird.

Bindungsmodus von 1 Da J. Albers in seiner Diplomarbeit bereits einen nichtionischen Liganden entworfen hatte,[71] der von K. Schaefer in ihrer Dissertation synthetisiert und untersucht wurde,[72] wurde auch dieses Molekül molekulardynamisch untersucht.

Auch hier zeigt der Sechsring der Harnsäure eine zeitlich stark ausgeprägte $\pi - \pi$ -Interaktion über 85 % des Simulationszeitraums mit Tyrosin 126, während gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke des NH an Position 3 über 99 % der simulierten Zeit mit dem

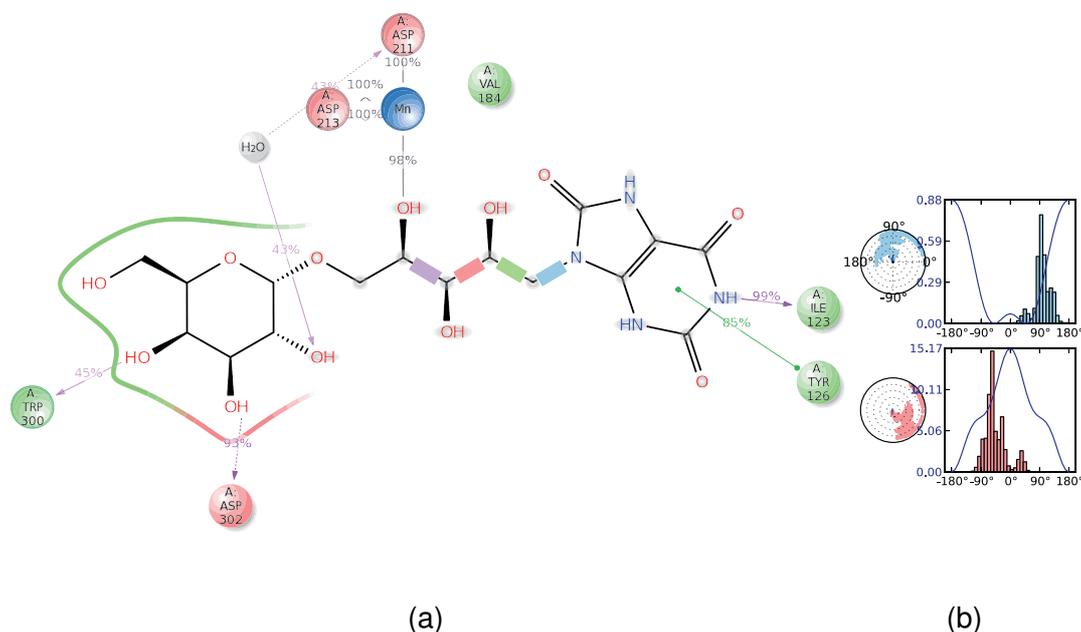


Abb. 3.2: Die $\pi - \pi$ -Interaktion und die Wasserstoffbrücke des NH an Position 3 von Verbindung **1** stimmen mit denen von UDP-Gal überein. Mangan wird hingegen über die Hydroxygruppe an Position 4' des Linkers gebunden. Die Konformation von Verbindung **1** weist eine gewisse Spannung im Linkerbereich auf (s. Abb. 3.2b). Dies scheint durch die definierte Lage der Nucleobase und des Galactoseteils begründet. Hierdurch ist der Linker mit fünf Kohlenstoffen evtl. etwas zu kurz und das Molekül somit gespannt.

Rückgrat von Isoleucin 123 besteht. Die wesentlichen Merkmale der Nucleobase in Wechselwirkung mit dem Protein scheinen also identisch zu sein.

Ebenso wird über 98 % der Zeit eine Wechselwirkung zwischen Mangan und der Hydroxygruppe an 5' des Linkers aufgebaut, was auch *in silico* die Beobachtung der vorangegangenen Experimente bestätigt, dass das Phosphat durch ungeladene Gruppen ersetzt werden kann.

Das Torsionsprofil (s. Abb. 3.2b) fasst die konformationelle Entwicklung von drehbaren Bindungen über den Simulationszeitraum zusammen. Zum Einen gibt das Histogramm Aufschluss über die Verteilung der Torsionswinkel mit dazugehörigem Energieprofil (in kcal/mol) und zum Anderen in einem Polarplot die zeitliche Entwicklung der Torsion. Dabei entspricht das Zentrum dem Zeitpunkt 0 der Simulation und der äußere Rand dem Endpunkt der Simulation (2.4 ns). Jeder Datenpunkt repräsentiert demnach einen Diederwinkel zu dem gegebenen Zeitpunkt. Die Analyse des Ligand-Torsionsprofils zeigt insbesondere im Bereich des Linkers ein gewisses Maß an Spannung. Dies zeigt sich insbesondere an der Bindung zwischen C2' und C3'. Hier wird von der energetisch günstigsten trans-Konformation auf eine gestaffelte Konforma-

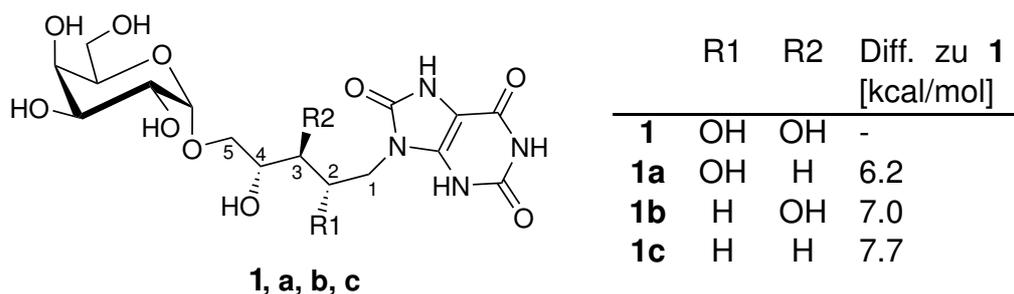


Abb. 3.3: Einfluss der Hydroxy-Gruppen des Linkerfragments zwischen Harnsäure und D-Galactose auf die Bindungsenergie.

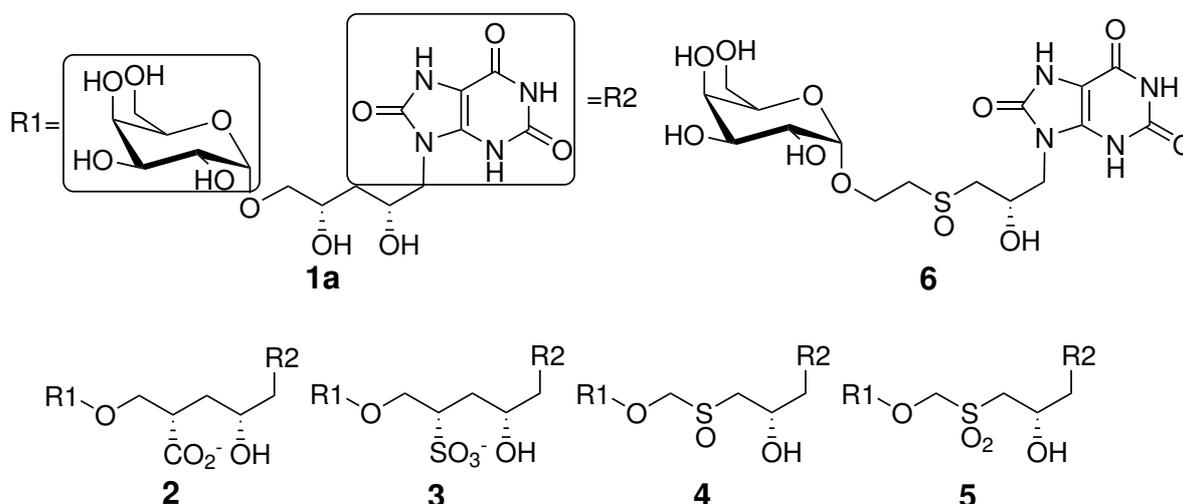
tion ausgewichen, was einen energetischen Nachteil von 5 kcal/Mol zur Folge hat. Während die Größe dieser Zahl sicherlich zu hoch erscheint, zeigt es doch, dass der Linker mit fünf Kohlenstoffatomen einige Spannung aufweist.

Die Untersuchung der Torsionswinkel über den Simulationsraum zeigt, dass im Bereich des Linkerfragmentes nicht die energetische günstigste Konformation eingenommen wird. Vor allem die Bindung zwischen C2' und C3' (in Abb. 3.2a rosa) zeigt im Torsionsprofil ein Maximum bei etwa -60° , das bei weitem nicht dem energetischen Minimum entspricht. Hier lässt sich auch erkennen, dass zum Ende des Simulationszeitraums eine Konformationsänderung stattfindet. Diese führt wiederum zur Schwächung der Bindung, sodass der Ligand sich in diesem Zeitraum vom Protein entfernt.

Design neuer Pyrophosphatmimetika Zunächst sollte der Energiebeitrag der Hydroxyfunktionen im Linker-Fragment des Ribityl-verknüpften Liganden von J. Albers untersucht werden,[71] da in diesem Bereich aus synthetischen und pharmakologischen Gründen die Hydrophilie verringert werden sollte. Dazu wurden die Hydroxygruppen iterativ entfernt und die jeweiligen Energien berechnet.

Die Hydroxygruppe an Position 4 wurde jeweils im Molekül belassen, da diese am stärksten mit dem Manganion in Wechselwirkung steht und als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen der Affinität zum Metall genutzt werden sollte.

Bei den berechneten Energien fiel auf, dass die Entfernung beider Hydroxygruppen an Position 2 und 3 eine Verschlechterung der Bindungsenergie um 7.7 kcal/mol gegenüber **1** bewirkte. Hierbei wurde zwar die größte Verringerung der Hydrophilie in diesem Bereich erreicht, allerdings auch zu viel Affinität eingebüßt. Daher wurde anschließend der Einfluss von beiden Hydroxygruppen einzeln untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Entfernung der Hydroxygruppe an 2 immer noch eine Verschlechterung der Bindungsenergie um 7.0 kcal/mol bedeutete. Dagegen ergibt die Entfernung der Hydroxygruppe an 3 nur eine Einbuße von 6.2 kcal/mol, weshalb diese in folgenden Untersuchungen immer beibehalten wurde.



Schema 3.1: *in silico* untersuchte Verbindungen zur Mimikrierung der Phosphatgruppe aus UDP-Gal: Ein Carboxylat **2**, ein Sulfonat **3**, ein Sulfoxid **4** und ein Sulfon **5**

Die 2-Hydroxyfunktion scheint entscheidend für die Bindungsaffinität in diesem Bereich zu sein. Die Hydroxyfunktion an Position 4 ist entscheidend für die Wechselwirkung mit dem Mangankation, daher wurden mehrere funktionelle Gruppen an der Position 4 des Linkers eingeführt.

Die Herausforderung bestand darin, eine Gruppierung zu finden, die neben einer guten Mangankombindung weniger hydrolyselabil als ein Pyrophosphat ist und gleichzeitig eine höhere Membranpermeabilität aufweist. Unter den evaluierten funktionellen Gruppen waren ein Carboxylat **2**, ein Sulfonat **3**, ein Sulfoxid **4** und ein Sulfon **5**. In der Diplomarbeit des Autors wurden die Bindungsenergien mithilfe des Programms Sybyl durch manuelle Positionierung der Liganden und anschließende Minimierung nach Formel 3.1 errechnet.[73] Da diese Methode die Solvationsenergie ignoriert, wurde während der Promotion die Bindungsenergie mit der MM-GBSA Methode (molecular mechanics - generalized Born surface accessibility) im Modul Prime der Software Maestro berechnet.[74]

Verbindung	ΔG_{Bind} [kcal/mol]
3	-77.0
2	-74.8
6	-65.7
7	-64.5
4	-63.8
5	-59.4

Tabelle 3.1: Die Bindungsenergien (MM-GBSA) von Carboxylat **2** und Sulfonat **3** zeigen eine Präferenz für geladene Linker.

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{Komplex}} - E_{\text{Protein}} - E_{\text{Ligand}} \quad (3.1)$$

Diese Methode ergänzt Berechnung der Bindungsenergie um ein implizites Solvationsmodell.[75] Die Ergebnisse dieser Berechnung (s. Tab. 3.1) unterscheiden sich von denen, die mit Sybyl erhalten wurden.[73] Energetisch sind in diesem Fall die geladenen Liganden Carboxylat **2** und Sulfonat **3** bevorzugt. Ob diese veränderte Bindungsenergie auf das verwendete Kraftfeld zurückgeht oder das Solvationsmodell, kann nicht gesagt werden. Ein Nachteil beider Verbindungen ist allerdings die Ladung, daher wurden ebenfalls Moleküle untersucht, die polar aber ungeladen sind, wie das Sulfoxid **4** und das Sulfon **5**.

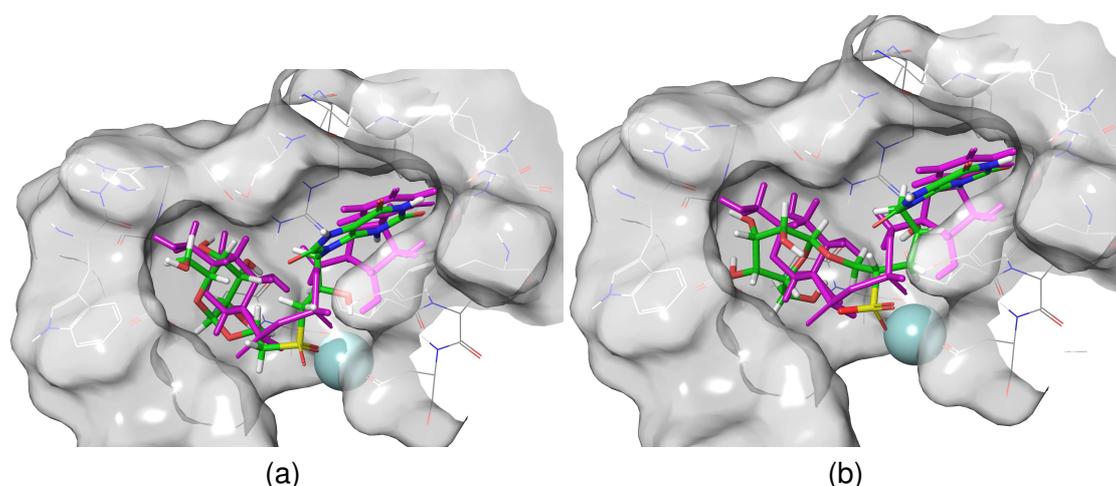


Abb. 3.4: Das Sulfonat **3** mit fünf Kohlenstoffen im Linker (s. Abb. 3.4b in grün) erscheint etwas zu kurz, wodurch die Galactose deutlich gegenüber UDP-Gal (in magenta) verschoben ist. Dagegen ist die Galactose im Sulfon **7** (s. Abb. 3.4a in grün) deutlich besser gegenüber UDP-Gal (in magenta) positioniert.

Sulfoxide haben den Nachteil, dass sie ebenso wie das Carboxylat **3** und Carbonat **2** chiral sind. Chemisch müsste daher ein Weg gefunden werden, diese funktionelle Gruppe stereoselektiv einzuführen.

Es wurde festgestellt, dass durch die von J. Albers übernommene Länge des Linkerfragments von fünf C-C-Einfachbindungen keine gute Positionierung der polaren Gruppe zum Mangan erreicht werden konnte und in der Folge auch Galactose schlechter in der Bindungstasche positioniert ist (vgl. Abb. 3.4b).[71] Um die Anordnung dem natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal anzupassen, wurde der modifizierte Linker um eine Methylengruppe verlängert **6**. Sulfon **7** und Sulfoxid **6** sind durch diese Verlängerung der Linkerkette deutlich besser zum Mangan positioniert. Gerade das Sulfon ist durch die zwei Sauerstoffe ähnlich dem Phosphat orientiert (vgl. Abb. 3.4a).

Durch diese Orientierung ist eine feste Interaktion der funktionellen Gruppen mit dem Protein gewährleistet. Die Nucleobase ist wiederum über eine $\pi - \pi$ -Interaktion mit Ty-

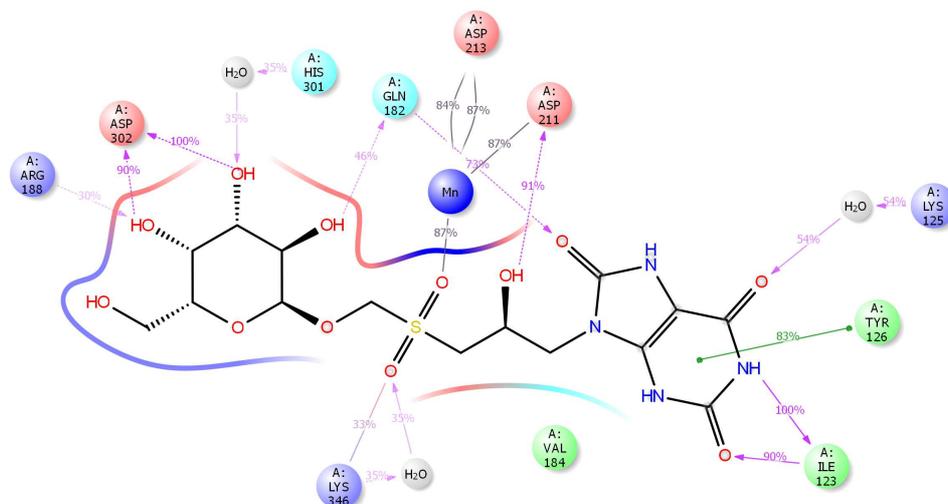


Abb. 3.5: Wiederum wird die Nucleobase von Verbindung **7** durch eine $\pi-\pi$ -Interaktion mit Tyrosin 126 sowie eine Wasserstoffbrücke mit Isoleucin 123 gebunden. Zudem bildet das NH in Position 1 eine Wasserstoffbrücke mit dem Aspartat 211 aus. Im Linker ist es wiederum die Hydroxygruppe an Position 2' sowie das Sulfon, welche über den gesamten Simulationszeitraum eine Interaktion mit Mangan herstellen. Zudem ist der Schwefel des Sulfons an Aspartat 213 gebunden.

rosin 126 sowie eine Wasserstoffbrückenbindung vom NH 3 an das Isoleucin 123 gebunden. Zudem bildet das NH an Position 1 der Harnsäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit Aspartat 211 aus. Im Linker ist neben dem Kontakt der Hydroxygruppe zum Mangan ebenso das Sulfon über den gesamten Simulationszeitraum gebunden. Zusätzlich erfolgt durch Aspartat 213 eine Bindung an den Schwefel des Sulfons (s. Abb. 3.5).

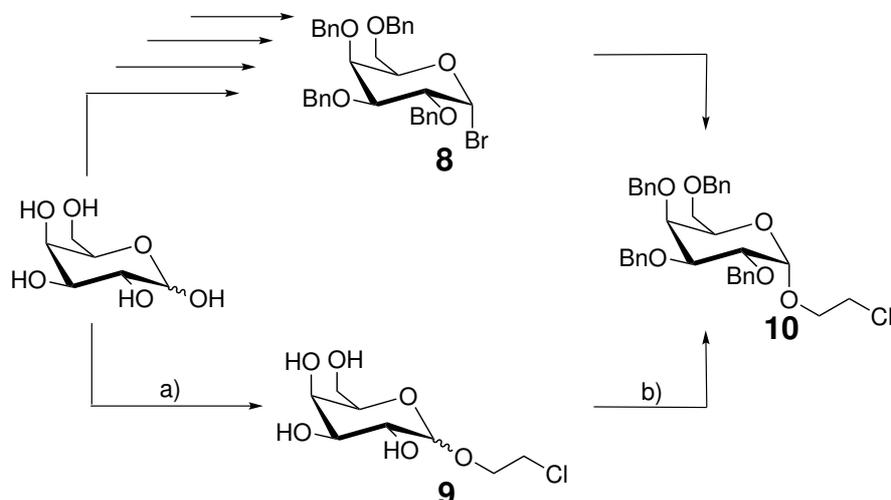
3.1.1.2 Synthese

Darstellung des Galactosylfragmentes

Synthese mit Verwendung von Benzylschutzgruppen Bereits während der Diplomarbeit konnte eine Synthese zur Darstellung des benzylgeschützten Chlorethylgalactosids **8** etabliert werden.[73] Der hierfür benötigte Glycosyldonor als perbenzyliertes Galactosylbromid kann in 4 Stufen aus D-Galactose dargestellt werden, wobei alle Literaturstellen bekannt sind.[76–79]

Dieses Galactosylbromid **8** lässt sich anschließend mit Chlorethanol α -selektiv glycosylieren, was mit einer Ausbeute von 67 % zufriedenstellend ausfiel. Weitere Aus-

beutesteigerungen (94 %) durch den Einsatz von Chlorethanol als Lösungsmittel, für eine bessere Kinetik, führten zu Selektivitätseinbußen.

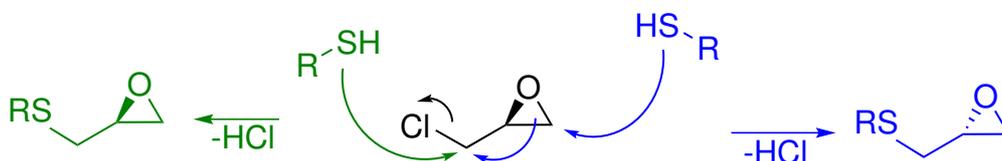


Schema 3.2: Die Darstellung von Verbindung **10** erfolgt entweder über die Darstellung des perbenzylierten Galactosylbromids **8** (oberer Weg), das in einer *in-situ* Anomerisierung mit Chlorethanol umgesetzt werden kann. Als effektiver erwies sich aber die direkte Fischer-Glycosylierung mit Chlorethanol zu **9** und die anschließende Benzylierung (unterer Weg). Reaktionsbedingungen: a) H^+ , Chlorethanol b) NaH, BnBr.

Während dieser Arbeit zeigte sich, dass diese Syntheseroute auf Grund der Anzahl an linearen Stufen einer direkten Fischer Glycosylierung (s. Abb. 3.2 unterer Weg) unterlegen ist. Zwar ist diese Reaktion nicht stereoselektiv, dafür wird die Synthese um 4 lineare Stufen reduziert mit einer Gesamtausbeute von 27%. Die erhaltene Mischung aus α und β Chlorethylgalactosid **9** konnte schlecht gereinigt werden, daher wurde das Rohprodukt (54% Ausbeute) benzyliert. Diese Reaktion musste gegenüber der zuvor verwendeten Benzylierungsvorschrift ([77]) angepasst werden, da die initiale Zugabe von Natriumhydrid die Bildung eines internen Sechsrings zwischen 2-OH und C2' des Linkers favorisiert. Daher wird das Galactosid in Benzylbromid und wenig DMF vorgelegt und eine Suspension von Natriumhydrid zugetropft. Durch den hohen Überschuss an Benzylbromid verläuft die Reaktion sehr schnell und exotherm.

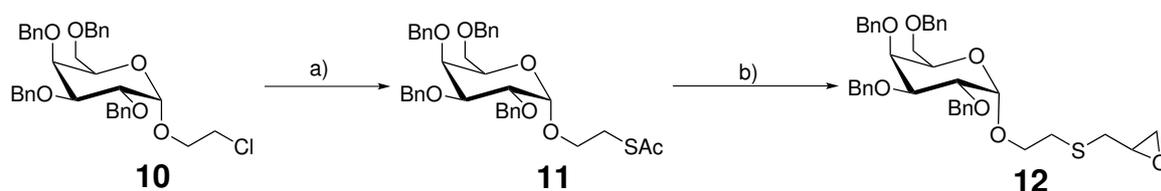
Aufbau des Linkers Während der Diplomarbeit wurde das Chlorid **10** in einer nucleophilen Substitution unter *Finkelstein*-Bedingungen mit Thioessigsäure zum Thioacetat umgesetzt. Die Entschützung des Schwefels erfolgte in der Diplomarbeit

noch mit *tert*-Butanolat. Die Verseifung nach *Zemplen* stellte sich jedoch als schneller und dennoch kompatibel mit der folgenden *in-situ* Umsetzung mit Epichlorhydrin dar.



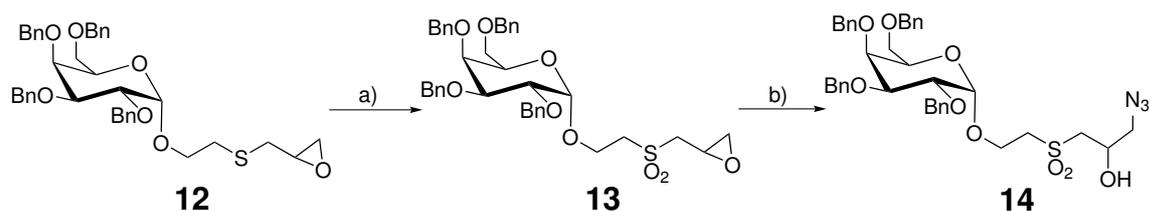
Schema 3.3: Der nucleophile Angriff des Schwefels in der Oxiranöffnung kann am Halogenkohlenstoff oder terminal am Oxiran erfolgen, wodurch sich die Stereochemie der Hydroxygruppe umkehrt.

Da diese Reaktion für die stereoselektive Einführung der Hydroxygruppe verantwortlich ist, stellt sich die Frage nach der Regioselektivität des Schwefel-Angriffs. Dieser Angriff kann am Halogenkohlenstoff oder terminal am Oxiran erfolgen, wodurch sich die Stereochemie der Hydroxygruppe umkehrt (s. Schema 3.3). NMR-spektroskopisch lassen sich die jeweiligen Diastereomere der Linkerhydroxygruppe zwar unterscheiden und es zeigte sich auch, dass die Reaktion vollständig substratkontrolliert abläuft, die absolute Konfiguration lässt sich aber nicht ableiten. Die Möglichkeit der Deuterium-Isotopenmarkierung wurde nicht verfolgt, da die Literatur für analoge Reaktionen von Alkoholen [80] und Thiole [81] mit Epichlorhydrin einen Angriff auf das Oxiran und die Umlagerung desselben unter Austritt von Chlorid beschreibt.



Schema 3.4: Schwefel kann durch nucleophile Substitution mit Thioessigsäure geschützt eingeführt werden. Nach der Verseifung wird dieser mit Epichlorhydrin umgesetzt. Reaktionsbedingungen: a) AcSH, K₂CO₃, NaI b) NaOMe, Epichlorhydrin.

Das Oxyanion, welches nur während der Umlagerung kurzzeitig vorliegt, kann durch Protonen abgefangen werden. Bei höherem Wasseranteil des verwendeten Methanols findet sich daher auch ein Teil des Halohydrins, welches nur bei oben genanntem Angriff entstehen kann und nicht, wenn der Angriff am chlorsubstituierten Kohlenstoff erfolgt. Daher ergibt sich mit der Regiochemie ebenfalls die Stereochemie dieses Reaktionsschrittes.

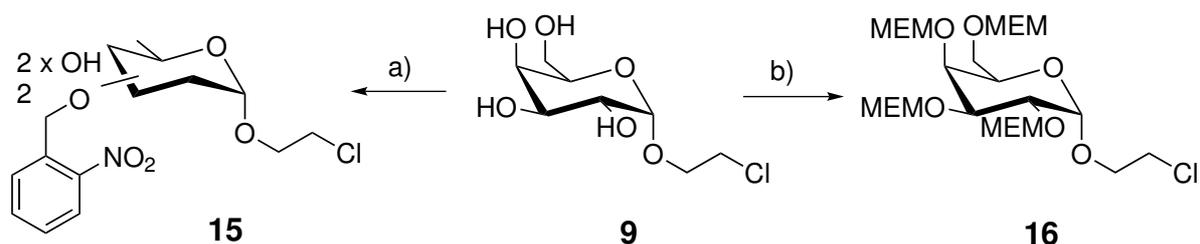


Schema 3.5: Die Oxidation des Schwefels zum Sulfon gelingt am besten mit mCPBA. Eine Ringöffnung mit Aminen liefert das falsche Regioisomer, weshalb auf eine Ringöffnung mit Azid ausgewichen wurde. Reaktionsbedingungen: a) mCPBA b) NaN_3 , Bu_4NCl .

Da starke Oxidationsmittel gebraucht werden, um den Thioether zum Sulfon zu oxidieren, wurden verschiedene Oxidationsmittel getestet. meta-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) zeigte nahezu quantitative Ausbeuten des entsprechenden Sulfons. Der Versuch das Epoxid mit Ammoniak zu öffnen ergab dominant die Ringöffnung am mittleren C-Atom. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Wasserstoffbrückenbindung des angreifenden Ammoniaks mit dem Sauerstoff des Sulfons. Um diese Hypothese zu belegen wurde die Ringöffnung mit Natriumazid durchgeführt, welches keine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff des Sulfons aufbauen kann. Dabei wurde die terminale Ringöffnung mit 84 % Ausbeute erreicht. Die Synthese dieser Verbindung zeigt, dass Sulfone erfolgreich in der entsprechenden Position eingeführt werden können, um das Pyrophosphat zu ersetzen. Weitere Transformationen dieser Verbindung um die Harnsäure aufzubauen sind denkbar. Allerdings wurden in weiteren Versuchen erhebliche Probleme festgestellt, diese Verbindung zu entschützen. Eine selektive Reduktion des Azides ist zum Beispiel mit Triphenylphosphin denkbar, wenn aber eine abschließende Entschützung des Zielmoleküls unter diesen Bedingungen nicht möglich ist, so ist die bis hierhin dargestellte Syntheseroute zur Darstellung des Zielmoleküls hinfällig. Daher wurden alternative Schutzgruppenstrategien untersucht.

Synthese mit Verwendung von alternativen Schutzgruppen In diesem Zusammenhang wurde das Augenmerk auf Ether beibehalten, da die Vielzahl an unterschiedlichen Bedingungen die Nutzung von zum Beispiel Estern als permanente Schutzgruppe ausschließt. Als orthogonal abzuspaltende Benzyl-Alternative wurde die ortho-Nitrobenzylgruppe untersucht. Diese Schutzgruppe bietet den besonderen Vorteil, dass sie durch Photolyse abgespalten werden kann. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine Zweifachschützung erreicht werden. Da auch in der Literatur keine Vollschützungen von Kohlenhydraten bekannt sind, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

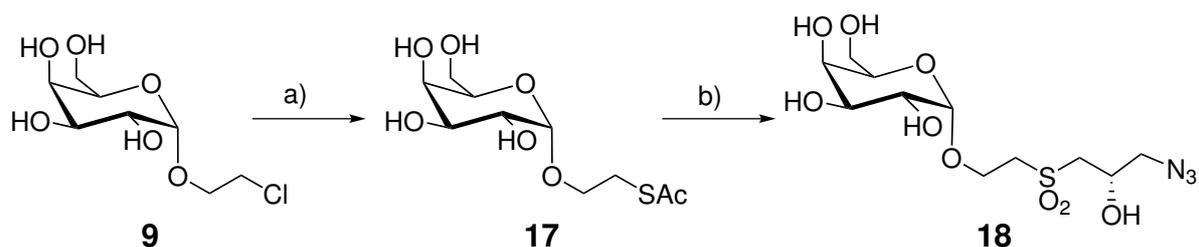
Ebenso wurde die Einführung der MEM-Schutzgruppe (Methoxy-ethoxy-methylether) untersucht. Diese kann ebenfalls basisch in guten Ausbeuten eingeführt werden. Als



Schema 3.6: Die Einführung alternativer Etherschutzgruppen konnte ebenfalls unter basischen Bedingungen erfolgen, führte aber nicht zu befriedigenden Ergebnissen. Reaktionsbedingungen: a) KOH, *o*-Nitrobenzylbromid B) NaH, MEM-Cl

Ether ist sie unter den gewählten Reaktionsbedingung stabil, lässt sich aber später unter aprotischen Bedingungen durch Zugabe einer schwachen Lewis Säure abspalten. Besonders Zink(II)-Verbindungen haben sich unter diesen Bedingungen bewährt. Auch mit der MEM-Schutzgruppe sind vollgeschützte Galactoside nicht bekannt. Allerdings konnte massenspektrometrisch in einem Nebenprodukt die Einführung von vier MEM-Gruppen nachgewiesen werden. Ebenso wurden ^{13}C -NMR spektroskopisch die vier neuen Acetal-Kohlenstoffe beobachtet. Ein zufriedenstellendes Protonen-NMR konnte nicht erhalten werden. Da sich außerdem die Aufarbeitung und Reinigung dieser Verbindung aufgrund der hohen Polarität äußerst schwierig gestaltete, wurde auch diese Schutzgruppenstrategie nicht weiter verfolgt.

Synthese ohne Schutzgruppen Daher wurde nun versucht, eine Synthese unter Verzicht auf Schutzgruppen zu etablieren. Zunächst sollte die Möglichkeit einer Synthese an der Festphase untersucht werden. Diese bietet den Vorteil, dass trotz der hohen Polarität der ungeschützten Galactoside und der damit notwendigen polaren Lösemittel eine einfache Reinigung durch Spülen des Harzes möglich ist. Zudem besteht durch etablierte Syntheseroboter aus der Peptidsynthese die Möglichkeit einer Automation der Synthese und Reinigungsschritte.[82] Die Wahl des Harzes fiel auf ein Merrifield-Chlorbenzyl-Harz, das analog zur Benzylschützung der Galactose mit Natriumhydrid und Natriumiodid mit dem Galactosid gekuppelt wurde. Zur Überprüfung wurde 1/10 des Ansatzes im Anschluss hydrogenolytisch wieder vom Harz abgespalten. Hier konnte eine Ausbeute von 68 % erhalten werden, womit sowohl Kuppelung als auch Abspaltung möglich sind. Nach den folgenden Umsetzungen konnten die entsprechenden Produkte nicht mehr vom Harz abgespalten werden oder nicht nachgewiesen werden. Ob die Umsetzungen oder die Abspaltung nicht funktionieren, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Probleme decken sich dementsprechend mit den Erfahrungen zur Entfernung der Benzylschutzgruppen. Leider sind viele andere Harze wie Tritylderivate unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil, daher wurde im folgenden eine schutzgruppenfreie Syntheseroute erarbeitet.



Schema 3.7: Die Umsetzung von Verbindung **9** erfolgt mit Thioessigsäure zum Thioacetat **17**. Dieses lässt sich im Eintopfverfahren zunächst mit Natriummethanolat in Methanol entschützen und mit *R*-Epichlorhydrin umsetzen. Anschließend wird mithilfe von Kaliumperoxymonosulfat der Schwefel zum Sulfon oxidiert. Da unter diesen Bedingungen sowohl die Bildung des Oxirans als auch des Chlorhydrins beobachtet wird, wurde das Lösungsmittel entfernt und in DMF mit Natriumazid ein einheitliches Produkt **18** dargestellt. Reaktionsbedingungen: a) AcSH, K_2CO_3 , NaI b) 1. NaOMe, (*S*)-Epichlorhydrin 2. K_2SO_5 , 3. 5 eq. NaN_3 , 1.5 eq. NaI.

Die Darstellung von Chlorethylgalactosid **9** gelingt nicht anomenenrein. Durch vorübergehende Acetylierung und fraktionierende Umkristallisation ist es allerdings leicht, nach Deacetylierung, zu anomenenreinem Chlorethylgalactosid **9** zu gelangen. Da sowohl die Schützen als auch die Entschützen nahezu quantitativ verlaufen, ist lediglich der Arbeitsaufwand ein Nachteil dieser Methode. Eventuell lässt sich auch mithilfe von Impfkristallen, die über diese Methode gewonnen werden können, eine direkte Reinigung von Verbindung **9** erreichen. Ebenso wie mit der benzylgeschützten Verbindung **10** kann auch **9** mit Thioessigsäure umgesetzt werden. Dabei wurde eine Ausbeute von 24 % erzielt. Limitierend für die Ausbeute ist in diesem Fall die Reinigung der hochpolaren Verbindung. Hierfür wurde zunächst eine Voreinigung mittels Kieselgel und Aceton/Methanol (9:1) als Laufmittel durchgeführt. Erst die anschließende Reinigung mittels HPLC (RP-Säule Nucleodur-Isis mit Acetonitril/Wasser als Eluent) ergab die erforderliche Reinheit. Aufgrund der problematischen Reinigung wurden die folgenden drei Stufen im Eintopfverfahren durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit Natriummethanolat der Schwefel entschützt. Anschließend wurde mit 1.3 Äquivalenten *R*-Epichlorhydrin in Methanol umgesetzt. Nach 16 Stunden wurde dann mithilfe von Kaliumperoxymonosulfat der Schwefel zum Sulfon oxidiert. Massenspektrometrisch konnte sowohl die Bildung des Oxirans als auch des Chlorhydrins nachgewiesen werden. Eine Reinigung dieses Gemisches war nicht erfolgreich. Daher wurde nach Entfernen des Lösungsmittels in DMF bei 60 °C mit 1.5 Äquivalenten Natriumiodid und 5 Äquivalenten Natriumazid ein einheitliches Produkt dargestellt. Die Reinigung hiervon mittels HPLC lieferte das gewünschte Azid **18** in einer Gesamtausbeute von 2.5 %.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die während der Diplomarbeit eingeführte Schutzgruppenstrategie unter Verwendung von Benzylgruppen nicht zielführend ist. Die Benzylgruppen können nicht abgespalten werden, ohne das Zielmolekül zu verändern. Auch alternative Schutzgruppen konnten nicht eingeführt werden. Daher ist die hier vorgestellte Syntheseroute unter Verzicht auf Schutzgruppen die erfolgversprechendere Variante. Das dargestellte Azid **18** kann unter anderem zum Amin reduziert werden, um die Harnsäure hieran aufzubauen, wie es von K. Schäfer durchgeführt wurde.[72] Das Azid kann aber auch als Baustein für einfache Clickreaktionen genutzt werden, die in Abschnitt 3.1.3 vorgestellt werden. Diese haben den Vorteil, dass die Synthese auf wenige Schritte reduziert wird. In dieser Arbeit wurde für die Fucosyltransferase 5 eine Reaktion zum Aufbau von Nucleobasen untersucht, die ebenfalls auf Aziden aufbaut (s. Abschnitt. 3.2.7). Daher ist dieses Molekül ein sehr flexibler Baustein auf dem Weg zu spezifischen Donorsubstrat-analogen Inhibitoren für Glycosyltransferasen.

3.1.1.3 Bissulfonamid-Galactoside als potentielle Pyrophosphat-Mimetika

Molecular Modelling Wie bereits im vorigen Abschnitt diskutiert, ist es eine große Herausforderung, nichtionische Mimetika für das Pyrophosphat von UDP-Gal zu entwerfen. Dabei ist gerade der Verzicht auf die Ladung für einen bioverfügbaren Inhibitor von essenzieller Bedeutung. In Tabelle 3.2 ist zu erkennen, dass die Verbindung 7 eine schlechtere Bindungsenergie aufweist als UDP-Gal.

Daher sollte in einem *in-silico screening* gezielt nach geeignetem Ersatz für das Pyrophosphat aus UDP-Gal gesucht werden. Um eine größere Anzahl an Molekülen untersuchen zu können, wurde auf das Web-basierte *docking* Programm *dock blaster* zurückgegriffen.[83] In diesem wurde die Struktur 2RJ7 der PDB verwendet,[31] da in dieser Struktur UDP-Gal kokristallisiert ist. Zwar stellt diese Struktur eine Chimmäre zwischen der GTA und der GTB dar, allerdings betreffen die Mutationen die Bindung der Galactose, die für die Affinität im Bereich des Pyrophosphates wenig Bedeutung haben sollten. Dafür erleichtert die gebundene Struktur die Auswahl der Bindungstasche erheblich.

Als Ligand-Datenbank wurde ein Teil der *Zinc*-Datenbank verwendet.[84] Hier wurde der Datensatz *fragments* ausgewählt. Diese sind nach der Bedingung XLogP kleiner 3.5, Molekulargewicht kleiner 250 g/mol und Anzahl rotierbarer Bindungen kleiner/gleich fünf definiert. Zum Zeitpunkt der Arbeiten waren das etwa 600000 Moleküle. Unter den 500 besten Treffern trugen 498 Moleküle eine Ladung. Dominierend konnten Bis-Carboxylate gefunden werden, die zwar eine große Ähnlichkeit zur Ladungsverteilung im Pyrophosphat aufweisen, unter pharmakologischen Gesichtspunkten jedoch unerwünscht sind. Die verbleibenden zwei Moleküle sind die Sulfonamide **19** und **20** (s. Abb. 3.6). Bemerkenswerterweise belegen diese Verbindungen in der Auswahl die Ränge sechs (**19**, $\Delta G_{\text{Bdg.}} = -105.8$ kcal/mol) und acht (**20**, $\Delta G_{\text{Bdg.}} = -105.7$ kcal/mol). Die besten 100 Treffer des *dockings* sind im Anhang zusammen mit den Bindungsenergien dargestellt. Aufgrund der einfachen Verfügbarkeit von Pyridinaminen wurde ebenfalls Verbindung **21** in die Überlegungen mit einbezogen. Eine Affinitätsuntersuchung aller drei Kandidaten wurde mit der Fucosyltransferase 5 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.7).

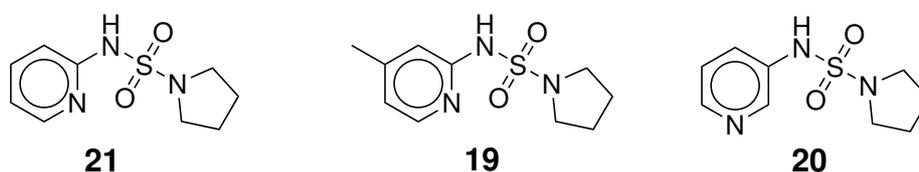


Abb. 3.6: Die Verbindungen **19** und **20** sind aus den 500 besten Treffern eines *screenings* die einzigen ungeladenen Spezies, die Mangan mit guter Affinität binden.

Zum Einen ist dieser auf *docking* basierte Ansatz eine Bestätigung des zuvor ent-

wickelten Konzeptes von Sulfonen als Ersatz für Phosphate. Zum Anderen sind Sulfonamide im Gegensatz zu Sulfonsäureestern hydrolysestabil. Damit eröffnet diese funktionelle Gruppe die Möglichkeit auch das zweite Phosphat, welches direkt an den Zucker gebunden ist, durch ein Sulfonamid zu ersetzen. Dies wäre mit Sulfonaten nicht möglich, da diese eine gute Austrittsgruppe darstellen. Gerade die Einführung dieser zweiten funktionellen Gruppe aber sollte es ermöglichen, energetisch besser mit UDP-Gal zu konkurrieren.

Dies bestätigt sich auch *in-silico*, denn in der Struktur **22** sind genau die beiden Phosphate des UDP-Gal durch zwei Sulfonamide ersetzt. Diese Struktur zeigt eine um 2.4 kcal/Mol verbesserte Bindungsenergie gegenüber **7**. Des Weiteren wurde durch Simulation untersucht, ob die veränderte Synthesepaltung durch den Einsatz von Sulfonamiden auch eine weitere Vereinfachung des Linkers zulässt. Dazu wurde die Hydroxygruppe des Linkers entfernt. Die Struktur **23** scheint für die Bindungstasche zu lang zu sein, da sich eine um 3 kcal verschlechterte Bindungsenergie gegenüber der Referenz zeigt. Dies könnte durch die festere Positionierung der Sulfonamide, ähnlich zum Pyrophosphat in UDP-Gal, erfolgen. Daher wurde die Alkylkette um eine Methyleinheit verkürzt und so zeigt **24** lediglich eine um 0.5 kcal/Mol verschlechterte Bindungsenergie in dieser Untersuchung.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich verschiedene synthetische Ansätze ableiten. Zunächst sollte aufgrund der guten Bindungsenergie der Ersatz des Pyrophosphats im UDP-Gal durch ein Bissulfonamid erfolgen. Hierfür wird im Folgenden eine Synthesestrategie entwickelt. Zum Anderen zeigen die Harnsäurederivate mit Alkylsulfonamid-Linker ebenfalls vielversprechende Bindungsenergien. Hier wurden erste Synthesversuche unternommen, allerdings sollten eventuell noch weitere Vereinfachung im Bereich der Nucleobase mit aufgenommen werden. So sind zum Beispiel Triazol-Derivate wie sie ebenfalls im folgenden Kapitel der Fucosyltransferase 5 diskutiert werden, eine weitere Option, um zu einer modularen Synthesepattform zu gelangen, die den energetischen Ansprüchen an Glycosyltransferase-Inhibitoren gerecht wird und gleichzeitig die Spezifität durch den Einsatz verschiedener Glycane adressiert. Beim Einsatz von Amidosulfonyl-Alkylaziden ist ebenso die Kombination mit den Triazol-Derivaten, die am Ende dieses Kapitels hergeleitet werden, als Nucleobase möglich.

Synthesepaltung Die Synthesepaltung geht von Galactose und Uridin, als kommerziell erhältlichen Substanzen, aus. Die Bildung von unsymmetrischen Bissulfonamiden ist nach derzeitigem Wissensstand [85] durch Schotten-Baumann analoge Synthesen von einem substituierten Sulfonylchlorid mit einem substituierten Sulfamid möglich. Hierfür ist zu entscheiden, welches Molekül das geeignete Nukleophil ist und welches sich eher als Sulfonylchlorid eignet. In dieser Arbeit wurde das Nucleophil als Sulfamoyl-uridin geplant, da an der 5'-Position der Nucleobase die größte Elektronen-

3 Ergebnisse und Diskussion

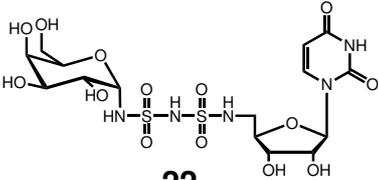
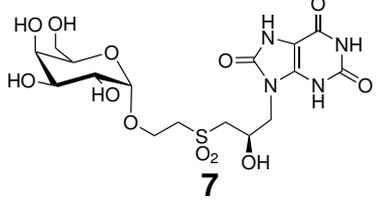
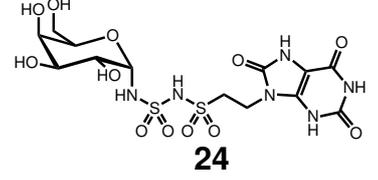
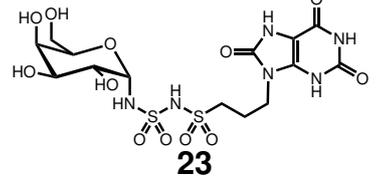
	$\Delta\Delta G_{\text{Bdg.}} [\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$
UDP-Gal	-42.3
 22	-2.4
 7	0
 24	0.5
 23	3.0

Tabelle 3.2: Die Bindungsenergien der untersuchten Sulfonamide zeigen, dass sich der Ersatz des Pyrophosphats im UDP-Gal durch ein Bissulfonamid nicht nur pharmakologisch lohnt, sondern auch energetisch zu vertreten ist.

dichte aller Stickstoffe vorherrscht, da dieser von der benachbarten Methylengruppe einen induktiven Beitrag erhält (s. Abb. 3.7). Somit kann auf der Uridin-Seite das acidere NH des Sulfamides durch eine Base deprotoniert werden. Das Stickstoff-Atom am anomeren Zentrum der Galactose hat durch den Ringsauerstoff der Galactose eine geringere Elektronendichte. Daher bietet es sich an, die Galactose als Sulfamoylchlorid einzusetzen (s. Abb. 3.7).

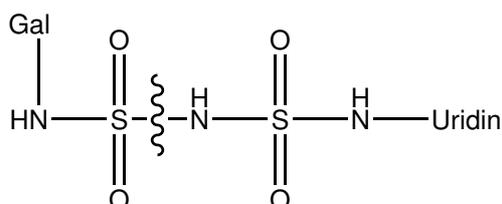
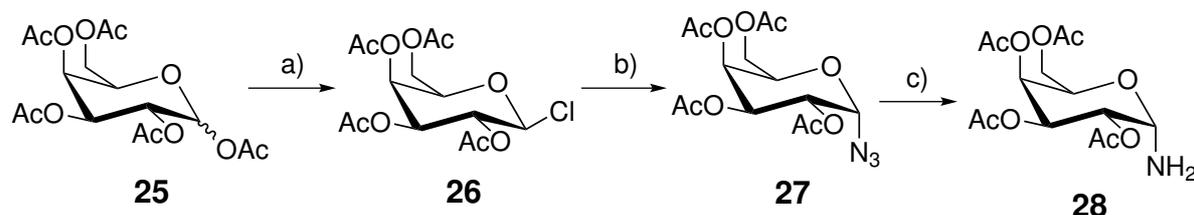


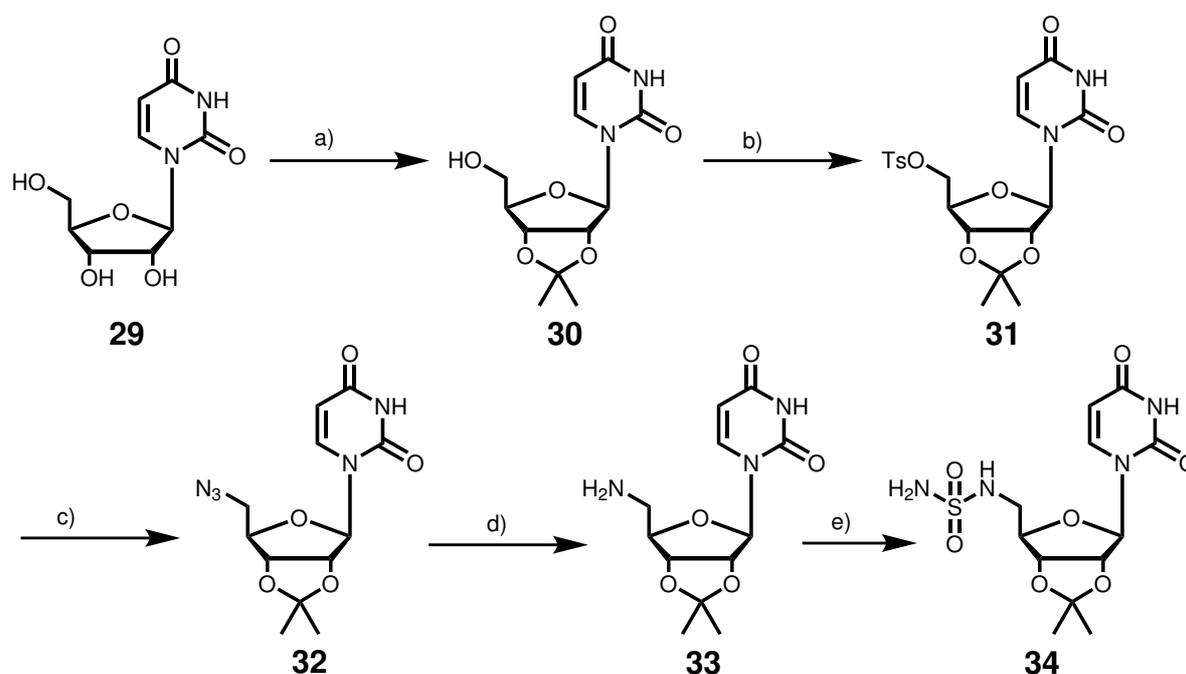
Abb. 3.7: Für die Darstellung von Verbindung **22** wurde nach retrosynthetischer Analyse der Bindungsbruch für die oben dargestellte Variante gewählt. So lässt sich das acidere NH auf der Uridin-Seite deprotonieren und in einer Schotten-Baumann Reaktion mit Galactose als Sulfamoylchlorid umsetzen.

Galactosylfragment Da alle Galactosyltransferasen UDP-Gal in α -Konfiguration an der Galactose binden, ist es essentiell, dass die Galactose α verknüpft ist. Hierfür muss eine passende Schutzgruppenstrategie und Glycosylierungsmethode gefunden werden, da Amine als Nucleophil zu einem hohen β -Anteil führen. Literaturbekannt ist hingegen der Zugang über Azide. Es zeigte sich, dass über die peracetylierte Galactose unter Ausnutzung des Nachbargruppeneffekts der Acetatschutzgruppe an Position 2 selektiv das β -Chlorid nach Ibatullin *et al.* dargestellt werden kann.[86] Dies kann im folgenden nach Takeda *et al.* mit Natriumazid in einer S_N2 Reaktion selektiv zum α -Azid umgesetzt werden,[87] welches sich wiederum nach Tietze *et al.* zum Amin reduzieren lässt.[88]



Schema 3.8: Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylamin. Diese erfolgt durch Einführung eines β Chlorides an peracetylierter Galactose und anschließender nukleophiler Substitution zweiter Ordnung mit Natriumazid. Das Galactosylazid lässt sich dann zum entsprechenden Amin reduzieren. Reaktionsbedingungen: a) PCl_5 , BF_3 b) NaN_3 , c) H_2/PtO_2 .

UrdinfrAGMENT Nach Winans und Bertozzi kann ausgehend von Isopropyliden geschütztem Uridin durch Tosylierung der 5' Hydroxygruppe eine gute Abgangsgruppe geschaffen werden. Diese kann im Folgenden durch den Einsatz von Natriumazid substituiert werden. Die Reduktion der Azidgruppe liefert dann das entsprechende Amin.[89]

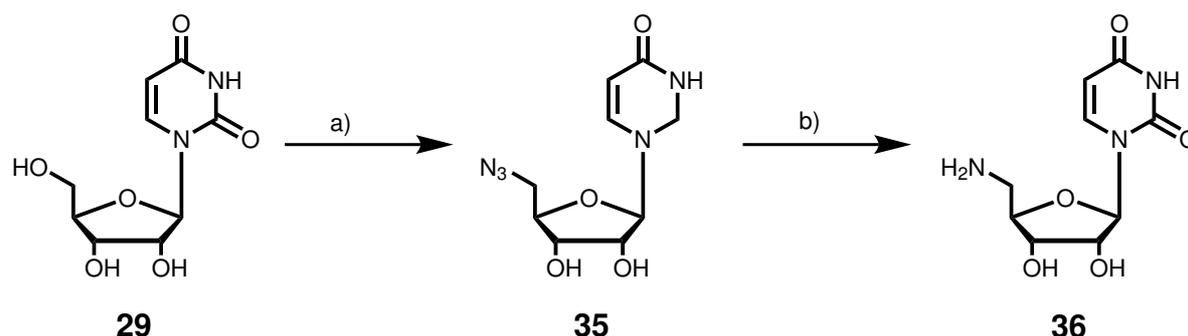


Schema 3.9: Darstellung von 2',3'-O-Isopropyliden-5'-sulfamoyluridin. Reaktionsbedingungen: a) Aceton, H_2SO_4 b) Tosylchlorid, Pyridin c) NaN_3 d) H_2 , Pd/C e) Amidosulfonsäurechlorid, Et_3N .

Das Amin (**33**) kann nun mit Hilfe eines Amidosulfonsäurehalogens in das Zielmolekül (**34**) überführt werden (s. Abb. 3.9).

Bei der alternativen Syntheseroute nach Gong wird Uridin in einer Eintopf-Reaktion in das ungeschützte Azid (**35**) überführt, welches wiederum zu einem Amin reduziert wird (**36**). [90] Die weiteren Reaktionen verlaufen analog nach Schema. 3.9.

Alkylverknüpfte Harnsäure Der Aufbau einer N9-verknüpften Harnsäure an einem Alkyl linker wurde von K. Schaefer eingehend untersucht.[72] Demnach lässt sich diese durch den Einsatz von 6-Chlor-5-nitrouracil an aliphatischen Aminen aufbauen. Die zur Darstellung von Verbindung **24** und **23** benötigten Edukte 2-Aminoethansulfonamid und 3-Aminopropansulfonamid sind kommerziell erhältlich oder können alternativ nach Smits *et al.* bzw. Lateef *et al.* dargestellt werden.[91, 92]



Schema 3.10: Darstellung von 5'-Sulfamoyluridin **37** unter Verzicht auf Schutzgruppen. Reaktionsbedingungen: a) $P(Ph)_3$, CBr_4 , NaN_3 b) H_2 , Pd/C .

Synthese Die Darstellung des Galactosylazides **27** gelang nach Literaturvorschriften problemlos. Ebenso konnte die Reduktion desselben erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund der Migrationstendenz der Acyl-Schutzgruppen sollte dieser Schritt erst unmittelbar vor der Umsetzung zum Sulfonamid erfolgen.

Auch die Darstellung des Uridin Fragmentes nach Winans gelang ohne Schwierigkeiten. Eine Vereinfachung der Synthese stellt der Verzicht auf Schutzgruppen dar. So konnte das Sulfamoyluridin **37** nach dieser Methode dargestellt werden.

Die Darstellung von unsymmetrischen Sulfonamiden und Bissulfonamiden ist bisher nicht in größerem Umfang dokumentiert. Die Zusammenfassung der Literaturergebnisse von Rohr *et al.*, [93] Weiß *et al.* [94] und Graf [95] für diese spezifische Fragestellung wurde in der Diplomarbeit von Franziska Exnowitz versucht.[96] Allerdings besteht für die Zusammenführung der oben dargestellten Fragmente noch der Bedarf an passenden Methoden. Gerade unter diesem Gesichtspunkt sind die kommerziell erhältlichen Ethyl- und Propyl-Linker von Interesse (in den Verbindungen **24** und **38** in Tabelle 3.2), da diese einen vereinfachten Zugang zu der Synthese erlauben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Synthese von Bissulfonamiden als Donorsubstrat-Analoga eine Herausforderung bleibt und im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden konnte. Gerade im Hinblick auf den hohen Energiebeitrag des Pyrophosphates zur Bindung hat dieser Ansatz aber eine besondere Relevanz. Daher ist auch das Interesse anderer Forschungsgruppen am Ersatz dieser hochaffinen Gruppierung durch nicht geladene Moleküle zu erklären. In einer ähnlichen Arbeit haben daher Babic *et al.* ein ähnliches Konzept für die GlcNAc und MurNAc Enzyme (MurA, MurC und MurG) vorgestellt, in dem sie ebenfalls auf ein Uridin verknüpftes Sulfonamid setzen. Das zweite Phosphat ersetzen sie allerdings durch ein C-glycosidisch verknüpftes Amid.[97]

3.1.2 Untersuchung neuer Bisubstratanaloga

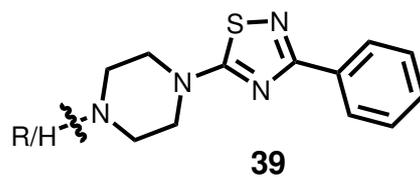
Molecular Modelling

In einem NMR basierten *screening* konnte von C. Rademacher eine Thiadiazol (3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol) basierte Struktur **39** als micromolarer Inhibitor der GTB identifiziert werden ($IC_{50}=0.79$ mM).[69] Später konnte in kristallographischen Experimenten die Lage dieser Struktur in der GTB verifiziert werden.[98] Dabei wurde festgestellt, dass das sekundäre Amin im Piperazinring das Mangan der GTB verdrängt.

Es wurde untersucht, ob die Aminofunktion als Nucleophil eine Erweiterung und damit Affinitätssteigerung des Ligandmoleküls erlaubt. Dazu wurden gezielt Strukturen aus der *Zinc*-Datenbank ausgewählt,[84] die einen Halogensubstituenten tragen. Dies sollte eine leichte Synthetisierbarkeit im Sinne einer nucleophilen Substitution ermöglichen. Der Ligand **39** wurde aus der Struktur 3U0X [98] erhalten und über ein *alignment* in die zuvor verwendete und vorgebereitete Struktur 2RJ8 übernommen. Aus der Software Schrödinger wurde das Modul *combiglide* verwendet. Dieses Programmmodul ist gedacht, um aus Molekülen mit mehreren Funktionalitäten und den entsprechenden Reaktanden kombinatorische Bibliotheken zu erstellen und diese anschließend mittels *docking* energetisch zu bewerten. Da in dieser Arbeit keine kombinatorische Bibliothek benutzt wurde, wurde das Programm lediglich genutzt, um die Generierung der Liganden aus Struktur **39** als Amin und den Halogenen durchzuführen und anschließend in einem *docking* die Affinität dieser Strukturen zu untersuchen.

Zunächst wurden die erhaltenen Treffer qualitativ auf die Übereinstimmung in der Positionierung des Fragmentes **39** überprüft. Die daraus erhaltenen Strukturen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Der *docking score* gibt eine energetische Näherung für die verschiedenen Liganden wieder (kleinere Werte, stärkere Bindung), aber u.a. Rezeptorbeweglichkeit und Solvation bleiben unberücksichtigt.[99] Daher wurden in dieser Untersuchung mittels MM-GBSA (vgl. Abschn. 3.1) relative Bindungsenergien zu **39** berechnet, nach denen die Tabelle sortiert ist. Auffällig ist die Häufung von Strukturen mit acetamidischen Elementen, die etwa ein Drittel der Strukturen ausmachen. Innerhalb dieses Leitmotivs ist die einfachste Struktur die des Iodacetamides (als Syntheseedukt), welches sich vor allem aufgrund der einfachen Verfügbarkeit als Ausgangspunkt für Syntheseveruche und Affinitätsuntersuchungen anbietet. Allerdings ist diese Struktur nicht in der Lage auch Teile der Nucleobase zu ersetzen, da sie hierfür zu klein ist. Die Besetzung der Basenposition ist erst mit den längeren Derivaten möglich, die auch *in-silico* bessere Bindungsenergien versprechen, in der Lage.

3 Ergebnisse und Diskussion



Struktur	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ [kcal/mol]	docking score
39	0	-
40	-46.5	-7.0
40	-34.0	-7.2
41	-31.3	-7.0
41	-30.4	-6.9
41	-30.2	-8.1
42	-30.1	-7.0
42	-26.2	-7.1
42	-19.8	-5.5
42	-19.3	-6.9
42	-19.0	-6.8

... Fortsetzung der Tab. **3.3** auf der nächsten Seite

3 Ergebnisse und Diskussion

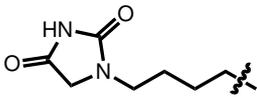
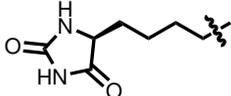
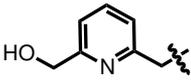
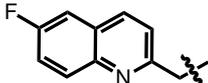
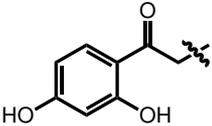
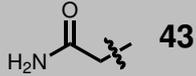
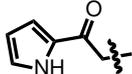
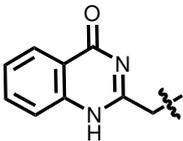
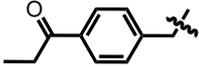
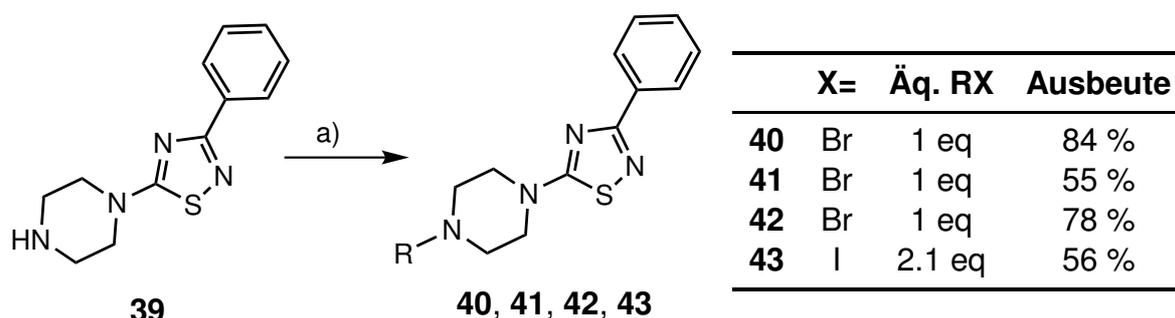
Struktur	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ [kcal/mol]	docking score
	-18.6	-8.2
	-18.4	-6.9
	-18.3	-7.3
	-16.6	-6.9
	-16.3	-7.1
 43	-11.6	-5.8
	-9.5	-5.9
	-6.4	-6.8
	-1.8	-6.9

Tabelle 3.3: Ergebnisse des *dockings* von Derivaten von **39**, die am Stickstoff einen weiteren Substituenten tragen. Grau hinterlegt sind die Strukturen mit Acetamid im Substituenten, da diese gehäuft auftreten und für die Synthesen ausgewählt wurden.

Die besten Bindungsenergien zeigen zwei Vertreter, die auf der Stickstoffseite des Amides einen aromatischen bzw. aliphatischen Sechsring an einer Ethylkette tragen. Warum das Cyclohexen gegenüber dem Benzolderivat noch einmal 12 kcal/Mol an Bindungsenergie gewinnt, ist unklar. Daneben zeigt sich ein Trend, wonach insbesondere die Moleküle, die weniger affin binden zu kurz sind, um die Bindungstasche der Nucleobase zu besetzen.

Synthese und Untersuchung der Bindungsaffinität

Die Synthese und Affinitätsmessungen wurden von P. Leccese durchgeführt und werden daher von ihr eingehend dokumentiert.[100] An dieser Stelle sei daher nur darauf verwiesen, dass die Synthese auf einer einstufigen nucleophilen Substitution eines Acetamid-Halogenids durch den sekundären Stickstoff von Verbindung **39** aufbaut. Diese Idee war auch Ausgangspunkt der *Docking*-Experimente. In den Synthesen wurden für die Moleküle **40** bis **43** Ausbeuten von 55-84 % erreicht (s. Schema 3.11).[100]



Schema 3.11: Die Synthese der Verbindungen **40** bis **43** konnte ausgehend von **39** durch den Einsatz von Cäsiumcarbonat (a) und den in der Tabelle angegebenen Alkylhalogeniden erfolgen. Dabei wurden Ausbeuten von 55-84 % erzielt.[100]

	K_D (SPR) [nM]	K_i (STD) [μ M]
40	0.5	17
41	5.8	9
42	-	19

Tabelle 3.4: Die Affinitätsuntersuchungen der Verbindungen **40** bis **43** mittels SPR und STD-NMR zeigt Unterschiede zwischen dem SPR-Experiment, in dem nanomolare Dissoziationskonstanten beobachtet werden und dem STD-Experiment, in dem die Inhibitionskonstanten unter Verwendung von 0.33 mM UDP im mikromolaren Bereich liegen.[100]

3.1.3 Untersuchung von Triazolderivaten als Nucleobasenanaloga

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwiefern sich die Nucleobase der GTB auch durch Triazolderivate ersetzen lässt. Bekanntermaßen lassen sich diese Verbindungen durch die Huisgenreaktion einfach darstellen.[101] Dies würde eine deutliche Vereinfachung der Syntheseroute bedeuten, da der Aufbau der Harnsäure immer noch 5 Stufen ausgehend vom Azid bedeutet. Zudem erlaubt die Triazolsynthese den schnellen Aufbau kleiner Substanzbibliotheken durch den Einsatz verschiedener Alkine. Im Rahmen der Arbeiten mit der Fucosyltransferase konnten mit dieser Vorgehensweise bereits sehr positive Erfahrung gewonnen werden, da sich damit die Spezifität und Affinität der Bindungstasche im Bereich für Nucleobase sehr gut analysieren lässt.

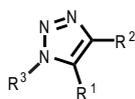
Ein reizvoller Nebenaspekt dieses Ansatzes ist die Übertragbarkeit auf verschiedene Glycosyltransferasen. Dabei wird generell im Bereich der Nucleobase Affinität generiert, während die Spezifität vor allem im Bereich des Donorzuckers zu finden ist. Durch einen modularen Aufbau im Sinne der Triazole könnten verschiedene Glycosyltransferasen mit einfachen Mitteln inhibiert werden.

Molecular Modelling

Die *docking*-arbeiten, die in diesem Abschnitt besprochen werden, standen unter der Prämisse, Alternativen zu der Harnsäure als Nucleobasen-Analogon zu finden. Da die Ergebnisse von J. Albers [71] mit einer geschlossenen Konfiguration der GTB erstellt wurden und diese nur geringen Raum für weitere Substituenten am aromatischen Ring zulässt, wurde für diese Arbeit eine offene Struktur der GTB verwendet. Arbeiten der Arbeitsgruppe Wagner zeigten ebenfalls, dass 5-Formylthien-2-yl-UDP in der Lage ist, die offene Konformation der GTB zu stabilisieren bzw. zu blockieren und damit die Bindung der natürlichen Substrate zu unterbinden.[102]

In der Proteindatenbank existiert unter dem Code 2RIT eine Struktur der GTB in ihrer offenen Konformation. Allerdings sind auch hier einige Loops und Seitenketten nicht aufgelöst. Diese wurden in einem Homologiemodelling mithilfe der vorhandenen GTB Strukturen ergänzt.

3 Ergebnisse und Diskussion



R1	R2	R3	docking score	$\Delta\Delta G$
	CHO	= CH ₂ CN	-8.25	ref
	"	"	-8.14	0.11
	"	"	-8.07	0.18
Butyl	"	= C ₁₁ H ₉	-8.04	0.21
	"	CH ₂ CN	-8.03	0.22
	"	C ₇ H ₆ Cl	-8.02	0.23
	"	CH ₂ CN	-7.98	0.27
	"	"	-7.98	0.27
	"	"	-7.92	0.33
	"	C ₁₁ H ₉	-7.90	0.35
Me	"	C ₇ H ₄ Cl ₃	-7.90	"
Me	CONH ₂	CH ₂ CN	-7.90	"
Me	Acetyl	"	-7.88	0.36
Benzyl	CHO	"	-7.86	0.39
Me	CONH ₂		-7.84	0.41

... Fortsetzung der Tab. 3.6 auf der nächsten Seite

3 Ergebnisse und Diskussion

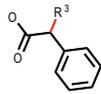
R1	R2	R3	docking score	$\Delta\Delta G$
Me	CONH ₂		-7.80	0.45
Phenoxymethyl	CH ₂ OH	CH ₂ CN	-7.79	0.46

Tabelle 3.6: Zu jeder Kombination aus drei Substituenten des Triazolringes ist der *docking score* angegeben. Dieser gibt eine energetische Näherung für die verschiedenen Liganden wieder (kleinere Werte, stärkere Bindung), während u.a. Rezeptorbeweglichkeit und Solvatation unberücksichtigt bleiben.[99] Für eine schnelle Vergleichbarkeit sind die relativen Energien $\Delta\Delta G$ angegeben. Diese zeigen eine Präferenz für Nitrile (R3) als Komplexbildner für das zweiwertige Kation. Daneben ist ein Carbonyl an R2 wichtig. Dies zeigt die Analogie zu Uracil, wo ebenfalls wichtige H-Brücken mit dem Sauerstoff aufgebaut werden. Als Substituent R3 finden sich vor allem subst. Phenylether unter den besten Treffern.

Für das *docking* wurden aus der *Zinc*-Datenbank Strukturen ausgewählt, die 1,4 und 1,5 Triazole enthalten.[84] Diese Auswahl ist durch die leichte Darstellbarkeit der Strukturen durch die Huisgen Reaktion zu erklären.[101] Dabei lassen sich durch die Wahl des Katalysators regioselektiv die jeweiligen Isomere darstellen. Während Kupfer (I) die 1,4 Triazole bildet,[103] kann durch den Einsatz von Rutheniumkatalysatoren die Bildung der 1,5 Triazole bevorzugt werden.[104] Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass hohe Regioselektivitäten nur bei monosubstituierten Alkinen erreicht werden.

Aus dem *docking* wurden die 500 besten Treffer anhand ihres *docking score* sortiert und anschließend eine Gruppe von Molekülen manuell aufgrund der Übereinstimmung zur Positionierung des Uracils ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 dargestellt. Besonders auffällig ist, dass als Substituent R3 in den meisten Fällen ein Methylenitril vorzufinden ist. Diese Gruppierung komplexiert das Mangan der GTB in ähnlicher Weise wie das Sulfon in den zuvor entworfenen Liganden. Daher wird dies als eine weitere funktionelle Gruppe aufgefasst, die in der Lage ist das Pyrophosphat zu ersetzen. Allerdings ist dies in den aktuellen Ligand-Entwürfen sterisch und synthetisch nicht zu integrieren.

Der Substituent R2 ist in den meisten Fällen ein Aldehyd, der pharmakologisch unerwünschte Eigenschaften aufweist. Zu erklären ist dieses Carbonyl durch die Wasserstoffbrücke zum Isoleucin 123, welche ansonsten vom Carbonylsauerstoff an Position C4 des Uracils aufgebaut wird. Bei genauerer Analyse der *docking* Tabelle zeigt sich aber auch, dass nicht notwendigerweise ein Aldehyd vorliegen muss, sondern auch ein Amid mit geringfügig kleinerer Energie bindet. Dies spiegelt die Analogie zum

Uracil wieder, wo ebenfalls amidische Fragmente zu finden sind. Als Substituent R1 findet sich eine breite Palette von Phenolethern die diverse Substituenten tragen. Diese Strukturen wurden zum Phenylpropargylether zusammengefasst, der als Syntheseäquivalent in die weiteren Betrachtungen dieses Ansatzes für die Click-Synthese einbezogen wurde. Hierfür wurde die Machbarkeit der Synthese untersucht und ist im nächsten Abschnitt besprochen.

Bei der Überprüfung der Strukturen im *modelling* zeigte sich, dass die Verknüpfung an das bestehende Gerüst aus Galactose mit Sulfonlinker nicht ohne weiteres möglich ist (s. Abb. 3.8). Als Grund hierfür ist der sterische Anspruch des Nitrils zu nennen, der somit auch die Nucleobase anders positioniert. Hierdurch ist keine Verknüpfung der erhaltenen Moleküle möglich. Daher wurde der Phenylpropargylether Rest für die Verknüpfung mit dem bisherigen Linker aus-

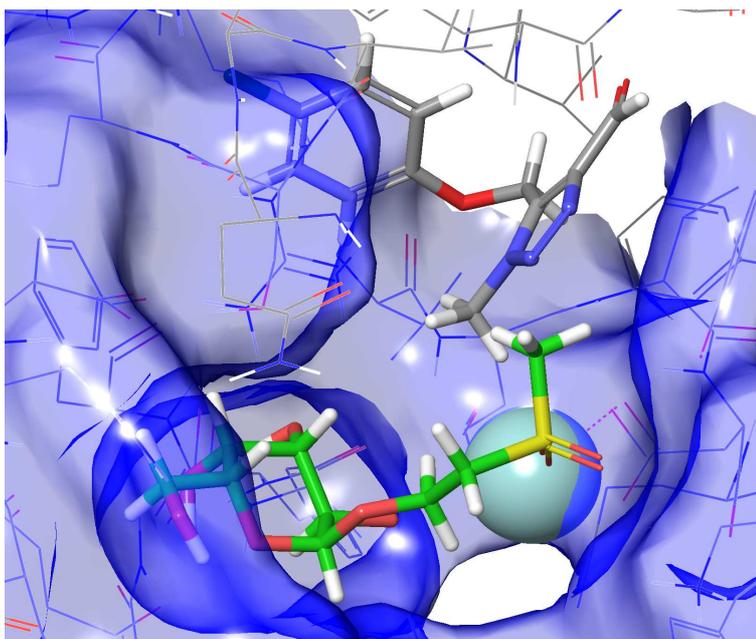


Abb. 3.8: Die Verknüpfung der Triazole aus dem *docking* an den Linker (grün) ist aus sterischen Gründen nicht möglich. Während Das Sulfon (grünes Molekül) zur Bindung des Mangans weiter vorn platziert ist, bindet das Triazol (grauses Molekül) weiter hinten im Protein.

gelassen und stattdessen die Substitution an R1 oder R2 untersucht. Hierfür wurden diejenigen Substituenten gewählt, welche dem Substitutionsmuster im Sechsring der Harnsäure ähnlich sind. Dementsprechend kommt für die Position R1 ein Acetamid als Substituent infrage (**44**) oder für Position R2 ein Formamid (**45**). Die molekulardynamische Untersuchung beider Liganden zeigte eine schwächere Interaktion von Verbindung **45**, weshalb die Ergebnisse hier nicht gezeigt werden. Ligand **44** zeigt hingegen eine stabile Komplexierung des Mangans durch das Sulfon ebenso wie eine $\pi-\pi$ -Interaktion des Triazolrings mit Tyrosin 126. Zusätzlich baut der Amidsubstituent des Triazols zwei Wasserstoffbrücken zum Rückgrat von Phenylalanin 121 und Isoleucin 123 auf.

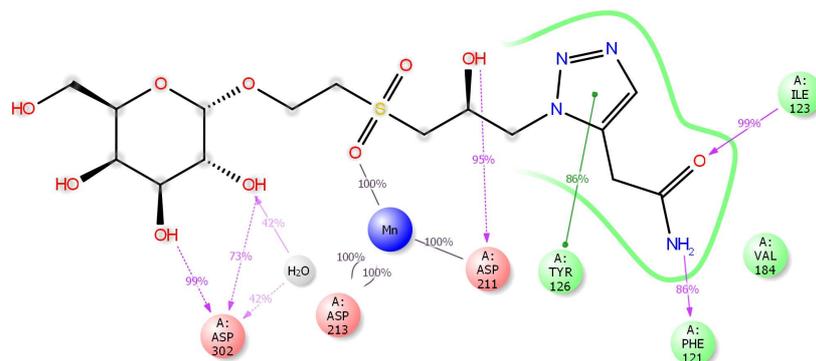
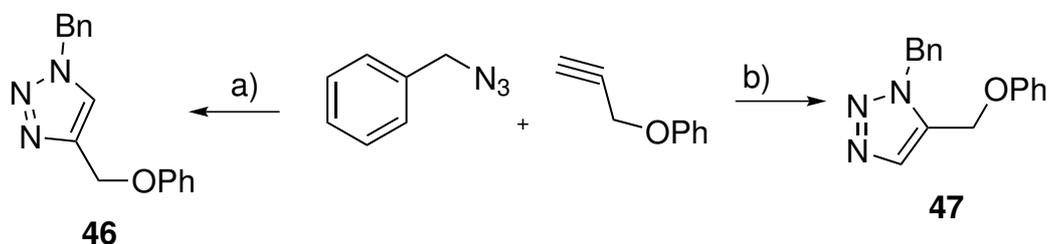


Abb. 3.9: Ligand **44** zeigt sowohl eine feste Interaktion des Mangans mit dem Sulfon, als auch eine beständige π -Wechselwirkung des Triazols mit Tyrosin 126. Zusätzlich wird von der Amidfunktion der Triazolsubstituenten ein Wasserstoffbrückennetzwerk auf das Rückgrat von Phenylalanin 121 und Isoleucin 123 aufgebaut.

Synthese

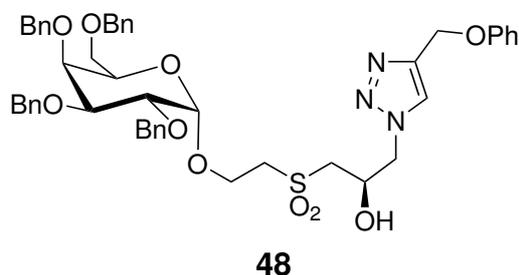
Um die Synthetisierbarkeit der *in silico* untersuchten Verbindungen zu demonstrieren, wurde zunächst die Triazolbildung mit Benzylazid und Phenylpropargylether untersucht. Dies ist nach Creary *et al.* unter Kupferkatalyse möglich und liefert unter diesen Umständen das 1,4 substituierte Triazol **46**.^[105] Durch den Einsatz von $\text{Cp} \cdot \text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ kann das 1,5-Regioisomer **47** dargestellt werden.^[104]



Schema 3.12: Die Darstellung von Verbindung **46** gelingt ausgehend von Benzylazid und Phenylpropargylether durch den Einsatz von a) CuI . Durch den Einsatz von b) $\text{Cp}^* \text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ wird **47** erhalten.

Um die Übertragbarkeit der literaturbekannten Triazol-Synthesen auf die hier untersuchten Verbindungen zu demonstrieren, wurde **14** unter denselben Bedingungen mit Phenylpropargylether umgesetzt. Die Bildung des Produktes dieser Testreaktion konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Für eine komplette Strukturaufklärung war zu wenig Substanz vorhanden. Dieser Ansatz wurde nicht weiterverfolgt, da die Entschützung der Benzylgruppen nicht unproblematisch ist, wie im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte. Zudem ist in diesem Molekül noch eine

weitere benzyliche Position vorhanden.

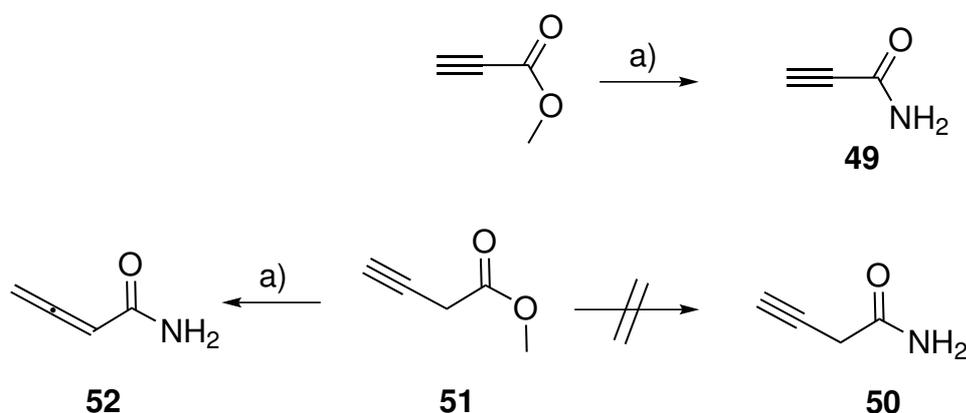


Schema 3.13: Die Darstellung von Verbindung **48** wurde unter denselben Bedingungen wie in Abb. 3.12 mit Phenylpropargylether und **14** durch den Einsatz von a) CuI durchgeführt.

Daher wurde, um der Schutzgruppen-Problematik zu begegnen, eine Schutzgruppenfreie Syntheseroute aufgebaut. Das hier dargestellte Azid **18** stellt einen einfachen Zugang zu den oben beschriebenen Donorsubstratanaloga dar.

Für die Darstellung von Verbindung **45** und **44** werden Propiolamid und Butinamid benötigt. Während die Darstellung von Propiolamid **49** aus Methylpropiolat nach Phippen *et al.* durch Umsetzung mit Ammoniak gelang,[106] ist die Synthese von Butinamid **50** nicht literaturbekannt. Die Umsetzung des Methylbutinoates **51** mit Ammoniak analog zur Darstellung von Verbindung **49** schlug fehl und es wurde das Allen **52** gebildet (s. Abb. 3.14). Daher muss in zukünftigen Versuchen für die Darstellung von Verbindung **44** die Click-Reaktion mit **51** durchgeführt werden. Erst anschließend kann die Verseifung des Esters zum Amid erfolgen, ohne dass eine Umlagerung der Dreifachbindung zu befürchten ist.

Die in diesem Abschnitt entwickelten Triazol-basierten Nucleobaseanaloge erlauben eine erhebliche Vereinfachung der Syntheseroute von donorsubstratanalogen Inhibitoren für Glycosyltransferasen, da die Nucleobase durch dieses Konzept mittels Click Reaktion aufgebaut werden kann. Dieses Konzept ist sowohl mit der schutzgruppenfreien Syntheseroute (s. S. 34) kompatibel als auch bei der Verwendung von Bissulfonamiden (s. S. 36). Daher ist dies ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu modularen Inhibitoren für Glycosyltransferasen. Alternativ ist auch der Aufbau von Nucleobaseanaloga denkbar, wie sie im Abschnitt 3.2.7 für die Fucosyltransferase 5 besprochen wird.



Schema 3.14: Die Darstellung von Verbindung **49** ist durch den Einsatz von a) NH_3 möglich.[106] Die analoge Umsetzung des Butinoates **51** schlug fehl und es wurde das Allen **52** gebildet.

3.2 Ligandbasiertes Design von Inhibitoren der Fucosyltransferase 5

Im Gegensatz zur GTB sind von den humanen α -1,3-Fucosyltransferasen keine Strukturen bekannt. Um zu klären, ob dennoch ein strukturbasiertes Ligand-Design möglich ist, wurde zunächst untersucht, ob ein Homologiemodell erstellt werden kann.

3.2.1 Erstellung eines Homologiemodells der Fucosyltransferase 5

Basierend auf dem oben gezeigten Sequenzalignment wurde ein Homologiemodell erstellt. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass Strukturmerkmale in der Natur konserviert werden. Daher konnten ähnliche Strukturen aus der Proteindatenbank als Vorlage genutzt werden. In diesem Fall wurde die Fucosyltransferase aus dem Bakterium *Helicobacter pylori* verwendet. Für die Erstellung eines Homologiemodells kommt erschwerend hinzu, dass die Domänen-Architektur der humanen Fucosyltransferasen genau umgekehrt zu der von *Helicobacter pylori* ist (z.B. N-terminale Transmembrandomäne beim Menschen, C-terminal bei *H. pylori*). In Abbildung 3.11 ist zu erkennen, dass identische Aminosäuren weit über das Protein verteilt sind. Zur Erstellung des Homologiemodells wurde das gesamte *alignment* der Fut5 (wie im Anhang dargestellt) verwendet, um die Aminosäuren an die Positionen aus der bakteriellen Struktur von *H. pylori* zu orientieren.

Die Sequenzidentität beträgt allerdings lediglich 20 %. In der aktiven Tasche ist die

3 Ergebnisse und Diskussion

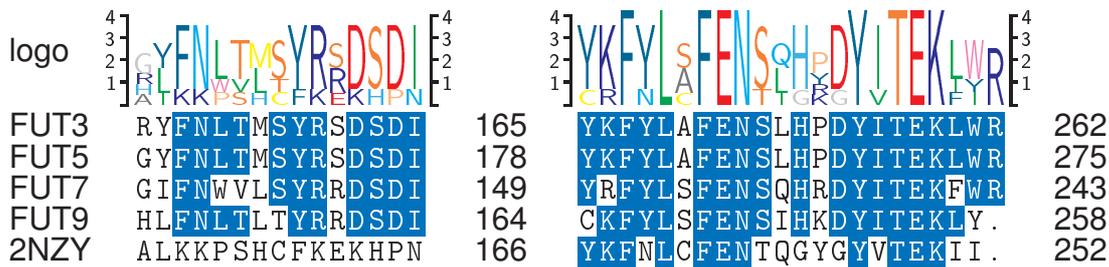


Abb. 3.10: Alignment der humanen Fucosyltransferasen 3, 5, 7 und 9 mit der bakteriellen Fucosyltransferase aus *H. pylori* (2NZY), deren Struktur bekannt ist. Rechts vom alignment ist die jeweilige Position innerhalb der einzelnen Sequenz angegeben. Oberhalb ist das Sequenzlogo als Zusammenfassung der Homologie dargestellt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung im Bereich des Bindungsmotives des Donorsubstrates. Das FEN .. TEK Motiv ist sehr stark in allen Fucosyltransferasen konserviert, während das DSD Motiv nur in den humanen Sequenzen zu finden ist.[107]

Übereinstimmung höher. Dies stimmt mit der Konservierung von funktional relevanten Strukturmerkmalen überein. Die so erhaltene Struktur wurde sowohl mittels MD-Simulation als auch mittels Minimierung energetisch entspannt. Wenn man die Energie des so erstellten Modells mit der Ursprungsstruktur vergleicht, wird ersichtlich, dass die geringe Homologie zu einem deutlichen Anstieg der Gesamtenergie dieses Systems im Vergleich zur Energie der Vorlage führt. In Abbildung 3.12 sind die wesentlichen Interaktionen von GDP-Fucose mit dem so erstellten Homologiemodell zu sehen.

Das Interaktionsdiagramm zeigt wichtige Interaktion des TEK Motivs. Es wurde mithilfe der Software Maestro über das ligand interaction diagram erzeugt. Dabei bildet das Lysin 247 eine Salzbrücke zum Pyrophosphat aus, Glutaminsäure 246 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zur Fucose und zur Ribose aus. Im Bereich der Fucose und des Pyrophosphats liefert das Homologiemodell daher Aussagen mit dessen Hilfe sich Hypothesen zum Bindungsverhalten stützen lassen. Hierbei ist das Pyrophosphat wesentlich an der Bindungsenergie beteiligt. Die humanen Fucosyltransferasen weisen allerdings ein konserviertes DSD-Motiv auf, welches bekannt für die Bindung eines zweiwertigen Kations ist. So sind auch diverse humane Fucosyltransferasen in ihrer Aktivität stark metallionenabhängig. Dieses Motiv fehlt wiederum in der Struktur aus *Helicobacter pylori*. Zudem hat die Nucleobase des Liganden einen wesentlichen Anteil an der Bindungsenergie von Donorsubstraten. Der Teil der Bindungstasche, in welcher die Nucleobase liegt, zeigt allerdings keine Übereinstimmung zur Struktur von *Helicobacter pylori*. Hier spielt auch die umgekehrte Domänenarchitektur eine Rolle. Dementsprechend sind im Ligandenplot keine Interaktion zwischen Protein und

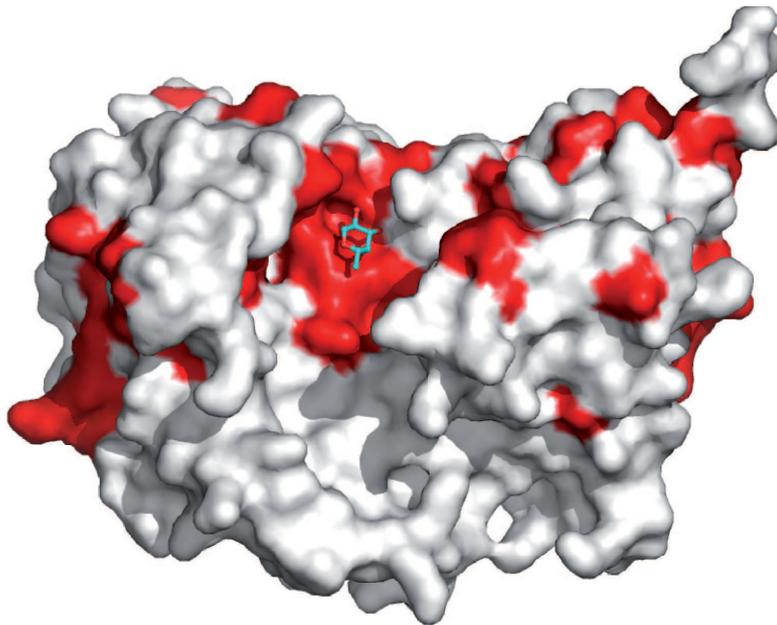


Abb. 3.11: Darstellung der Proteinstruktur der Fucosyltransferase von *Helicobacter pylori* (2NZX). Farblich hervorgehoben sind die Aminosäuren, welche identisch mit der humanen Fucosyltransferase 5 sind.

Guanin vorhanden. Daher müssen für diesen Teil des Moleküls ligandbasierte Wege gefunden werden, um zu hoch affinen Inhibitorstrukturen zu gelangen.

Um die Hypothesen von ligandbasierten Untersuchungen überprüfen zu können, muss das Protein für Messungen verfügbar sein. Die humane Fucosyltransferase sollte deshalb exprimiert werden, hierfür wurden verschiedene Zellsysteme untersucht.

3.2.2 Rekombinante Expression humaner α 1,3-Fucosyltransferasen

In Tabelle 3.7 sind wichtige Eigenschaften der Fucosyltransferasen 3, 5, 7 und 9 zusammengefasst. Sie sind zwischen 342 und 374 Aminosäuren lang. Daraus ergeben sich unglycosyliert Massen von 39-42 kDa, allerdings weisen die Fucosyltransferasen ein bis fünf mögliche N-Glycosylierungsstellen auf. Es ist bekannt, dass die Glycosylierung häufig einen großen Einfluss auf die Faltung und Aktivität von Glycosyltransferasen hat.[108, 109] Daher wurden diese vier Transferasen für die Expressionsversuche ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Expression zu erhöhen. In der Tabelle sind Literaturstellen für erfolgreiche Expressionen angegeben. Diese sind größtenteils aus humanen, Hamster- und Insekten-Zellen sowie aus Hefen erfolgt. Funktional hat neben der α -1,3 Aktivität, die alle Fucosyltransferasen der

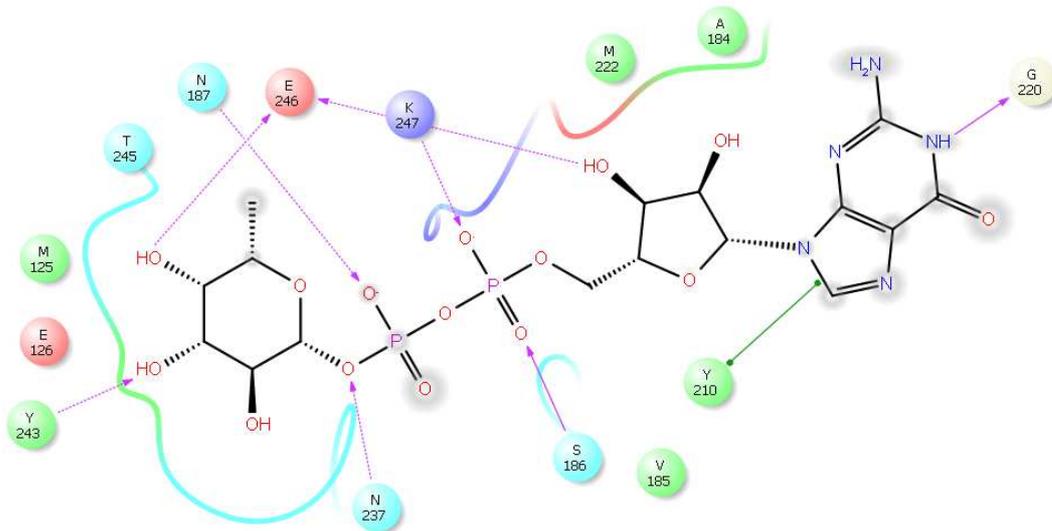


Abb. 3.12: Das Interaktionsdiagramm von GDP-Fucose mit dem Homologiemodell der Fut5: Die wichtigste Interaktion besteht in der Salzbrücke des TEK Motivs zum Pyrophosphat. Da die humanen Fucosyltransferasen im Bereich Nucleobase keine Homologie zu *Helicobacter pylori* aufweisen, sind hier auch keine Interaktion zu erkennen.

genannten Tabelle aufweisen, lediglich die Fucosyltransferase 3 eine α -1,4 Aktivität. Als Donorsubstrate akzeptieren alle Fucosyltransferasen lediglich GDP-Fucose. Das minimale Akzeptor-Substrat, welches Umsatz zeigt, ist für die Fucosyltransferasen 3, 5 und 9 N-Acetyl-D-lactosamin (LacNac) während die Fucosyltransferase 7 Sialyl-N-acetyl-lactosamin (sialyl LacNac) als Akzeptorsubstrat benötigt. Damit bilden alle genannten Fucosyltransferasen das Lewis X Motiv, während die Fucosyltransferase 7 das sialyl-Lewis X Motiv bildet. Die Fucosyltransferase 3 produziert mit ihrer Nebenaktivität ebenfalls das Lewis A Motiv. Für die Überprüfung der Aktivität ist es auch wichtig zu wissen, ob die Transferase von Metallionen als Cofaktor abhängig ist.

Expression mittels Hefezellen

Mittels Polymerasekettenreaktion wurden die Gene der humanen Fucosyltransferasen 3, 5, 7 und 9 aus cDNA amplifiziert. Da es sich bei den Fucosyltransferasen um Transmembranproteine handelt, wurde die Transmembrandomäne entsprechend Literaturdaten (für die Fut3, Gallet *et al.* [110]) gewählt oder entsprechend der Vorhersage der TM-Domäne (Sonhammer *et al.* [114]) gesetzt. Aufbauend auf diesen

3 Ergebnisse und Diskussion

	FUT3	FUT5	FUT7	FUT9
AS	361	374	342	359
Masse	42 kDa	43 kDa	39 kDa	42 kDa
N-Glyc.	2 Stellen	5 Stellen	1 Stelle	3 Stellen
Expression	<i>P. pastoris</i> [110] <i>S. frugiperda</i> (Sf9) [112]	Sf9 [70]	<i>H. sapiens</i> [35] Sf9 [113]	Sf9 [111]
Funktion	α -1,3/1,4 Lea, Lex	α -1,3 Lewis X	α -1,3 sLex	α -1,3 Lewis X
Akzeptor	LacNac	LacNac	sialyl LacNac	LacNac
Kation	Mn, Mg		Mn, Mg	-

Tabelle 3.7: Übersicht der humanen α -1,3-Fucosyltransferasen, die für Expressionsversuche ausgewählt wurden.

Informationen wurden die Primer für die Amplifikation entworfen, welche im Anhang gezeigt sind. Der Fut3 *forward Primer* enthält die EcoRI Schnittstelle und zusätzlich eine SacII Schnittstelle, um die Fut9 klonieren zu können. Die *Reverse Primer* enthalten entweder die NotI Schnittstelle (Fut3, 5 + 9) oder XbaI (Fut7).

Nach erfolgreicher Amplifikation erfolgte der Verdau durch die entsprechenden Restriktionsenzyme. Die Ligation mit dem Vektor und anschließende Transformation von *E. coli* Zellen erlaubten die Selektion durch Ampicillin (für den pucT Vektor) oder Zeocin (für den pPic Vektor). Die erfolgreiche Selektion eines Klons der Fucosyltransferase 7 konnte dabei nicht erfolgen.

Der Vektor pPicZ alpha C ist im Anhang dargestellt. Das Gen der Fucosyltransferasen wird unter Kontrolle des starken Alkoholoxigenase Promoters (AOX) der Hefe gestellt. Aus vorhergehenden Arbeiten zur Expression von Insektenallergenen waren in diesem Vektor zusätzlich ein N-terminaler 10x His-Tag, ein V5-Antikörperepitop und eine TEV-Schnittstelle eingebracht (s. Abb. 3.13a).[115] Durch diese Konstruktion ist eine einfache Reinigung und Detektion möglich. Außerdem können die eingebrachten Tags über die TEV-Schnittstelle entfernt werden. Gegenüber den C-terminalen Tags des Vektors (myc und His) hat dieses Konstrukt den Vorteil, dass die katalytische Domäne, die nahe dem C-Terminus sitzt nicht durch eingebrachte Tags beeinflusst wird.

Im Anhang sind alle Sequenzen der klonierten Vektoren angefügt. Dort ist ersichtlich, dass der Leserahmen eingehalten wird, die N-terminalen Tags vorhanden sind und das Gen der Fucosyltransferasen ohne Transmembrandomäne eingefügt wurde. Durch Linearisierung über die SacI Schnittstelle und Elektroporation wurden X-33 Hefezellen transformiert. Die Transformationsansätze wurden mit Zeocin als Antibio-

3 Ergebnisse und Diskussion

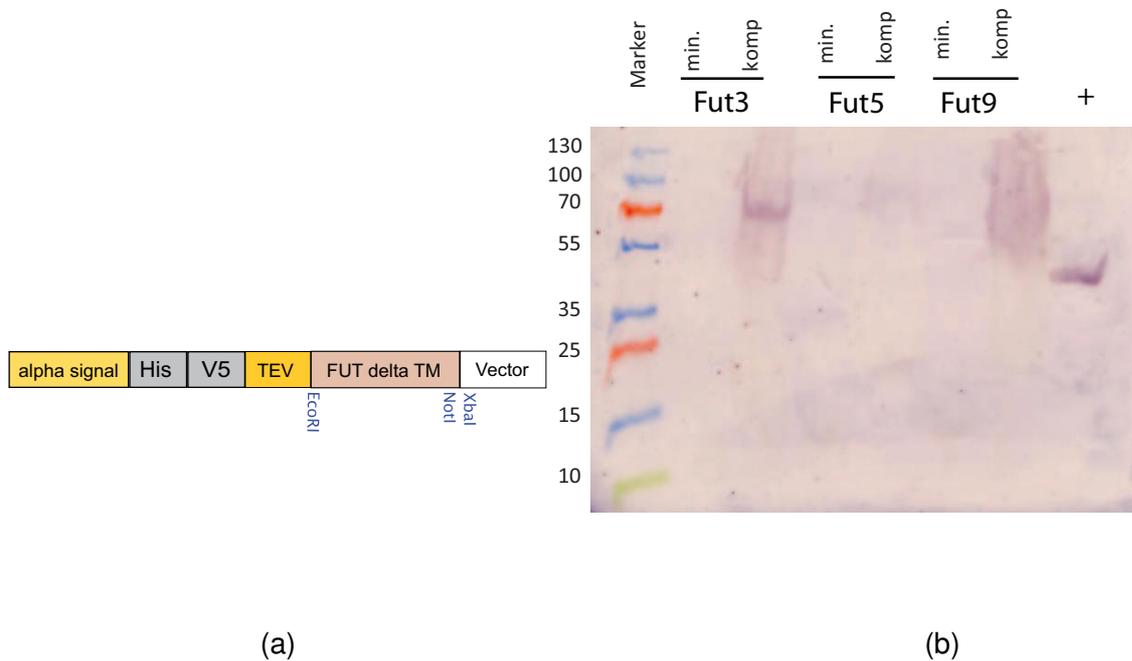


Abb. 3.13: Die Konstruktion des Expressionsvektors (a) erlaubt die Expression eines Fusionsproteins aus Sekretionssignal, His-Tag, V5 Antikörperepitop, TEV Proteaseschnittstelle und Fucosyltransferase. Blot der Zellen aus Testexpressionen der Fucosyltransferasen 3, 5 und 9 (b). In Minimalmedium kann keine Expression nachgewiesen werden. In Komplexmedium werden die Fucosyltransferasen 3 und 9 im Zellaufschluss nachgewiesen ebenso wie die Positivkontrolle (Fut5).

tikum selektiert, da diese Resistenz nur bei erfolgreicher Transformation mit dem Vektor vorhanden ist. Die vorhandenen Klone wurden mittels genomischer PCR auf die Integration der Vektor-DNA überprüft.

Die so selektierten Klone der Fucosyltransferase 3 zeigten in einer Testexpression Banden bei 44 kDa und 88 kDa, die auf Sekretion der Fut3 in monomerer und homodimerer Form hindeuteten, allerdings konnten diese Banden in einem Western-Blot mittels V3-Antikörper nicht als Fucosyltransferase identifiziert werden. Ebenso zeigten die Expressionen der Fucosyltransferasen 5 und 9 keine Banden im Western-Blot, die sich mit V5-Antikörper und sek. Antikörper anfärben ließen.

Um Proteolyse des Proteins im gepufferten Medium auszuschließen wurde eine Expression in ungepuffertem Minimalmedium durchgeführt. Allerdings konnte auch dabei kein nachweisbares Expressionslevel erreicht werden.

Anschließend wurden die Zellen der Expressionsansätze in komplexem und Minimalmedium mittels SDS-Page aufgeschlossen, um die Transferasen im Western Plot

zu detektieren (s. Abb. 3.13b). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bei der Expression im Komplexmedium die Fucosyltransferasen 3 und 9 intrazellulär verbleiben. Damit ist zumindest die Expression der klonierten Gene in Hefezellen möglich, allerdings verbleiben diese intrazellulär, was auf eine unzureichende Faltung oder posttranslationale Modifikation hindeutet. Damit sind diese Proteine höchstwahrscheinlich nicht funktional.

Daher wurde zu diesem Zeitpunkt auf die Expression mittels Insektenzellen ausgewichen.

Expression mittels Insektenzellen

Für die Expression mit Hilfe von Insektenzellen wurde auf das etablierte baculovirale Expressionssystem in *Spodoptera frugiperda* zurückgegriffen, da bereits ein Expressionsvektor der Fucosyltransferase V in der Arbeitsgruppe Spillner vorhanden war.[70] Dieser Virusvektorstock war zu Beginn der Arbeiten auf Grund von Alterung inaktiv und musste zunächst wieder auf einen guten Infektionstiter gebracht werden. Dazu wurden mehrere Amplifikationsrunden des verbliebenen Virusstocks in Insektenzellen vorgenommen. Allerdings konnte auch bei zweimaliger Wiederholung keine erfolgreiche Expression in Testansätzen erreicht werden.

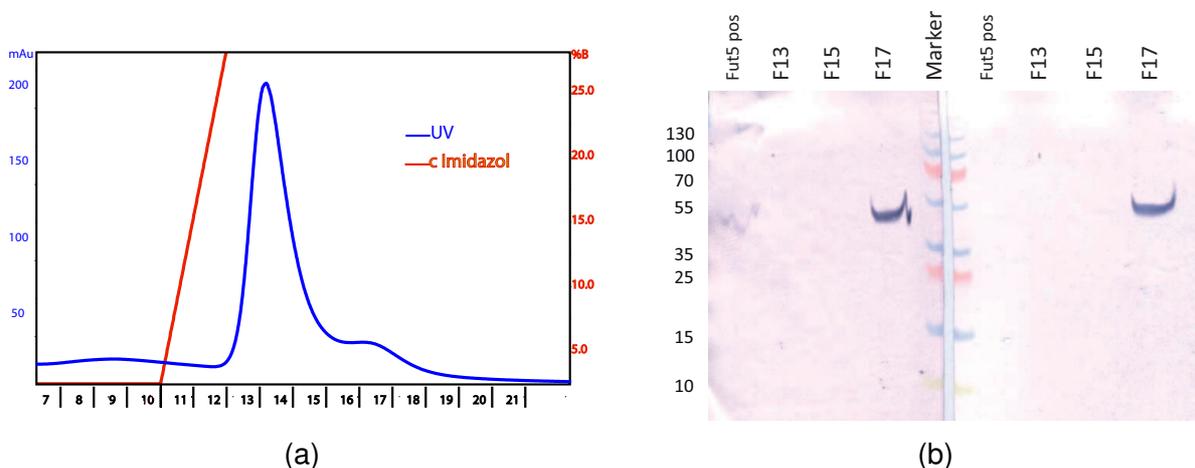


Abb. 3.14: Reinigung der Fut5 durch Metall-Affinitätschromatographie. **a** Das Chromatogramm der Reinigung zeigt den Imidazol Gradienten (rechts) und die Absorption (links). Ein intensiver Peak eluiert um Fraktion 14. **b** Im Blot zeigt sich, dass lediglich die Fraktion 17 Fut5 enthält. Der intensive Peak bei Fraktion 14 enthält Verunreinigungen. Die Fut5 konnte in Fraktion 17 nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte mit anti Fut3 AK links (ausreichend Homologie) und anti V5 AK rechts. Sekundär wurden beide mit anti rabbit AK + AP-Konjugat entwickelt.

Daher wurde erneut ein frischer viraler Vektor konstruiert und dieser anschließend in mehreren Amplifikationsrunden auf ein gutes Expressionslevel gebracht. Dabei zeigte sich allerdings, dass bereits nach der ersten Amplifikationsrunde das höchste Level der Expression erreicht wurde und in den folgenden Runden nur eine Abnahme zu beobachten war. Daher wurde mit diesem Virus eine 400 ml Expression durchgeführt. Nach der Abtrennung der zellulären Bestandteile wurde der Expressionsüberstand durch Kreuzfiltration konzentriert und anschließend durch Nickel-Affinitäts-Chromatographie über den His-Tag gereinigt. Dabei zeigte sich im Chromatogramm ein starker Elutionspeak bei Fraktion 14, welcher jedoch keine Fut5 enthielt. Die Fucosyltransferase konnte mittels Western-Blot in Fraktion 17 nachgewiesen werden (s. Abb. 3.14). Die Fut5 konnte somit für die folgenden Untersuchungen in ausreichender Menge aus Insektenzellen exprimiert werden.

3.2.3 Kinetische Charakterisierung mittels Progresskurvenanalyse

Golgi pH-Wert

Diverse Glycosyltransferasen zeigen ein pH Optimum bei $\text{pH} < 7$. Genauere Daten für das pH Optimum von Glycosyltransferasen in Datenbanken wie BRENDA sind ungenau.[116] Hier überlagern sich Untersuchungen zu pH-Optima einzelner Transferasen mit den Daten einzelner Bindungsstudien, die bei einem definierten pH durchgeführt wurden. Ausschlaggebend für das pH Optimum ist evolutionsbedingt der pH-Wert des Golgi Apparates, in dem die Glycosylierung erfolgt.[117] Dieser pH-Wert konnte in einer Arbeit von Llopis *et al.* ermittelt werden.[118] In dieser Untersuchung wurden Fusionsproteine aus verschiedenen GFP Varianten (die bei unterschiedlichen pH Werten ihr Fluoreszenzmaximum haben) und einer Glycosyltransferase erstellt. Diese Fusionsproteine werden subzellulärer im Golgi-Apparat verankert und es konnte ein pH-Wert von 6.58 ermittelt werden. Es erscheint also sinnvoll, Untersuchungen von Glycosyltransferasen bei diesem pH-Wert durchzuführen.

Metallionen-Abhängigkeit

Diverse Glycosyltransferasen sind für ihre volle Aktivität auf die Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen angewiesen. Häufig steht dies im Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines DXD Motivs. Lange wurde diskutiert, welches Kation für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Während Magnesium in deutlich höheren Konzentrationen in der Zelle vorkommt als Mangan, zeigt die Aktivität vieler Glycosyltransferasen mit Mangan höhere Umsätze. Während dies früher als zufällig angenommen wurde, deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass dies einen funktionalen Hin-

tergrund hat. Carmona *et al.* konnten mittels Synchrotron Fluoreszenz-Bildgebung nachweisen, dass Mangan bei Exposition der Zelle bevorzugt in den Golgi-Apparat transportiert wird. Dies scheint vor allem eine Schutzfunktion gegen neurodegenerativer Erkrankung zu sein, die durch erhöhte Mangankonzentrationen in der Zelle ausgelöst werden.[119]

Durch die Verwendung von zwei Partikelstrahlexperimenten (PIXE = particle induced x-ray emission microanalysis; BS = backscattering), kann nicht nur der relative Anteil an Mangan innerhalb der Zelle bestimmt werden, sondern ebenfalls die absolute Konzentration.[120] Der so ermittelte Wert für Mangan liegt bei $<0.72 \times 10^{-15}$ g pro Gramm Trockengewicht der Zellen. Daraus lässt sich eine maximale Konzentration von 4.8 Millimolar Mangan im Golgi-Apparat errechnen. In einer früheren Untersuchung konnten Chandra *et al.* feststellen, dass Magnesium gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegt.[121]. Für Magnesium werden Konzentrationen zwischen fünf und 25 Millimolar angegeben.[122] Es kann daher angenommen werden, dass ein substantieller Anteil von Mangan an der Aktivität von metallabhängigen Glycosyltransferasen besteht.

Aktivitätsuntersuchung

Die Überprüfung der Aktivität der Fucosyltransferase 5 erfolgte mittels NMR Spektroskopie. Dazu wurde das Enzym durch Dialyse in deuterierten BisTris-Puffer überführt. Anschließend wurden zunächst N-Acetyl-D-lactosamin (LacNac) und alkalische Phosphatase zugegeben. N-Acetyl-D-lactosamin stellt dabei das minimale Motiv des Akzeptorsubstrates dar. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert das entstehende GDP, sodass keine Produktinhibition auftritt. Mit dieser Probe wurde zunächst ein NMR Spektrum (^1H) aufgenommen, um die Konzentrationen auf dieses Spektrum beziehen zu können. Anschließend wurde GDP-Fucose zugegeben und die Zeit erfasst. Im Abstand von 30 Minuten wurden über 60 Stunden ^1H -NMR Spektren aufgenommen.

Für die Analyse der akquirierten Protonspektren sind separierte Signale nötig, sodass eine eindeutige Zuordnung und Integration möglich ist. Besonders die aromatischen Signale der Nucleobase waren hierfür geeignet. Die H-8 Signale von GDP-Fucose und Guanosin liegen bei 8.01 bzw. 7.89 ppm. Ähnlich verhält es sich mit den anomeren Protonen der Ribose, die zwei separierte signale bei 5.83 und 5.80 zeigen. Der Verbrauch an N-Acetyl-D-lactosamin und die Bildung der Lewis X Struktur können gut an den N-Acetyl Signalen bei 1.94 ppm bzw. 1.93 ppm beobachtet werden und die Methylgruppe der Fucose zeigte bei 1.12 ppm (für GDP-Fucose) bzw. 1.13/1.10 ppm (α/β -Fucose) ebenfalls integrierbare Signale. Aus den Integralen konnte die Konzentration der jeweiligen Spezies berechnet werden und gegen die Zeit aufgetragen werden.

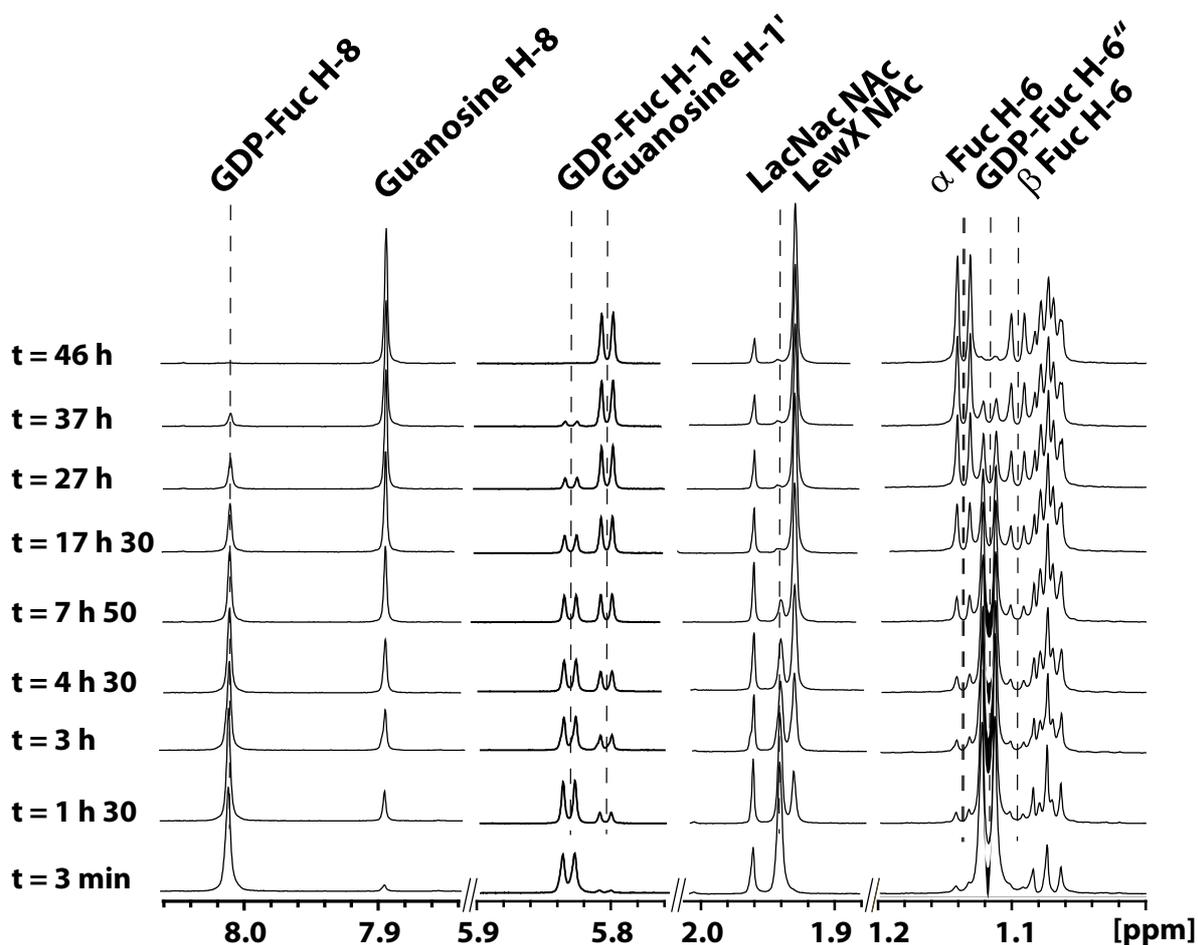


Abb. 3.15: Die Umsetzung von GDP-Fucose und LacNAc durch die Fut5 wurde mittels NMR verfolgt. Die NMR Spektren aus 46 h Reaktionszeit sind dargestellt. Zur Bestimmung der Konzentration der Edukte und Reaktionsprodukte wurden die NMR Signale von GDP-Fuc und Guanin im aromatischen und anomeren Bereich (der Ribose) herangezogen. Diese Signale eignen sich besonders gut. Daneben konnte der Verbrauch von LacNAc und die Bildung von Lewis X gut im Bereich der N-Acetylsignale beobachtet werden. Auch die Hydrolyse von GDP-Fucose zu den beiden anomeren Fucosen konnte anhand der Methylsignal beobachtet werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

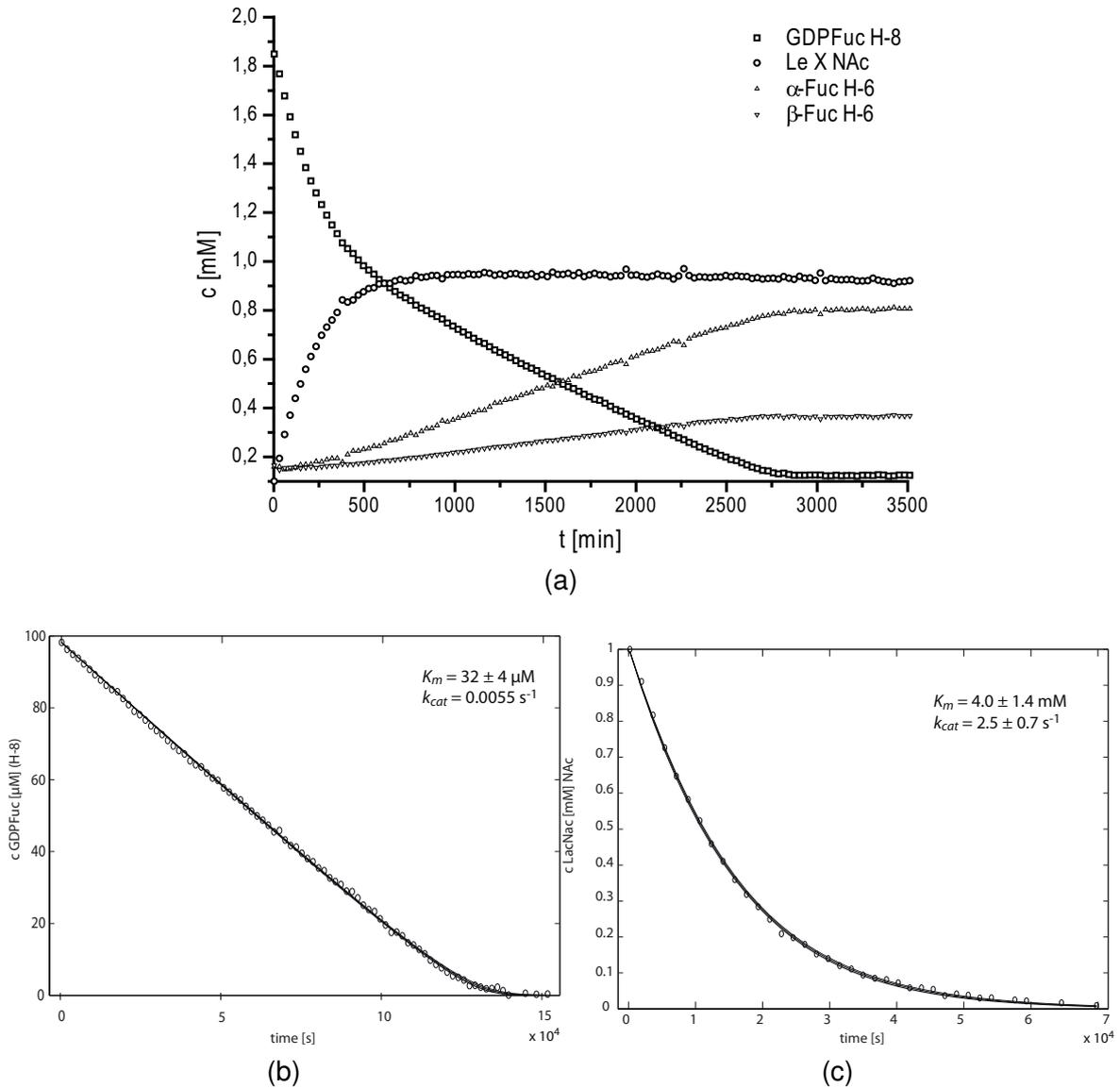


Abb. 3.16: a Aus der Integration der Signale in den NMR Spektren konnten die Konzentrationen der Edukte und Produkte berechnet werden. Während in den ersten 600 Minuten 1 mM Fucose von GDPFuc auf LacNac übertragen wird, findet anschließend mangels Akzeptorsubstrat nur noch die Autohydrolyse der GDP-Fucose statt. Auf Grund dieses Reaktionsablaufs lassen sich in einem einzigen Experiment beide K_m Werte bestimmen. Konzentration von GDP Fucose (b) und LacNac (c) im zeitlichen Verlauf der Enzymreaktion.

Es ist klar zu erkennen, dass durch den Überschuss an GDP-Fucose gegenüber N-Acetyl-D-lactosamin zunächst bevorzugt die Übertragung von Fucose auf das N-Acetyl-lactosamin stattfindet. Diese Übertragung findet schnell statt. Nachdem das Akzeptorsubstrat verbraucht ist, findet die langsamere Autohydrolyse der GDP-Fucose in Guanosindiphosphat, welches von der zugegebenen alkalische Phosphatase umgesetzt wird, sowie α und β -Fucose statt. Diese Reaktion ist zwar nachrangig und weniger schnell, allerdings erlaubt dieser Versuchsaufbau die gleichzeitige Bestimmung der K_M und k_{kat} Werte für beide Substrate der Fucosyltransferase. Interessant wäre es außerdem gewesen, ob die Autohydrolyse bei Anwesenheit des Akzeptorsubstrates gehemmt ist, allerdings sind die Geschwindigkeitsunterschiede bzw. die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung für derartige Aussagen zu gering. Es wurde angenommen, dass die Enzym Reaktion nach dem Michaelis-Menten-Mechanismus abläuft. Hierfür gilt die klassische Michaelis-Menten Differenzialgleichung, siehe Gleichung 3.2.

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (3.2)$$

Die Auswertung der erhaltenen Progresskurve erfolgte durch die Verwendung der Lambert-W-Funktion. Goudar et al. zeigten, dass die Lambert-W-Funktion eine Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung darstellt (s. Gleichung 3.3).[123] Diese zeigt die Abhängigkeit der Substratkonzentration vom K_M Wert, der Startkonzentration und der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion. Eine analytische Lösung dieser Gleichung gibt es nicht, allerdings lässt sich mithilfe numerischer Programme, wie zum Beispiel MATLAB, eine Anpassung der experimentellen Daten an die vorgegebene Funktion vornehmen und daraus können K_M und V_{max} bzw. durch Umformung k_{kat} erhalten werden.[124]

$$[S] = K_M W \left(\frac{[S]_0}{K_M} \left\{ \frac{[S]_0 - v_{max} t}{K_M} \right\} \right) \quad (3.3)$$

Die so ermittelten kinetischen Parameter der Fucosyltransferase 5 betragen für GDP-Fuc $K_m = 32 \mu\text{M}$ und $k_{cat} = 0.0055 \text{ s}^{-1}$. Die Werte für N-Acetyl-D-lactosamin betragen $K_m = 4 \text{ mM}$ und $k_{cat} = 2.5 \text{ s}^{-1}$. Dies Werte sind in guter Übereinstimmung mit den publizierten Daten, sodass von einem Enzym normaler Aktivität ausgegangen werden kann.[125]

3.2.4 Formulierung eines Pharmakophors zur Ligandauswahl der Nucleobasenanaloga

Um für die energetisch wichtige Nucleobase ligandbasiert Analoga zu finden, wurde ein Pharmakophormodell erstellt. Welches in Abbildung 3.17 dargestellt ist. Es wurde

das aromatische Tautomer des Guanins, welches nur zu wenigen % vorliegt, verwendet, da von vielen Glycosyltransferasen bekannt ist, dass $\pi-\pi$ Interaktionen einen wichtigen energetischen Beitrag zur Bindung dieses Molekülteils beitragen. Auch die Ergebnisse der späteren Untersuchungen und die Verfeinerung des Pharmakophor-modells bestätigen diese Annahme.

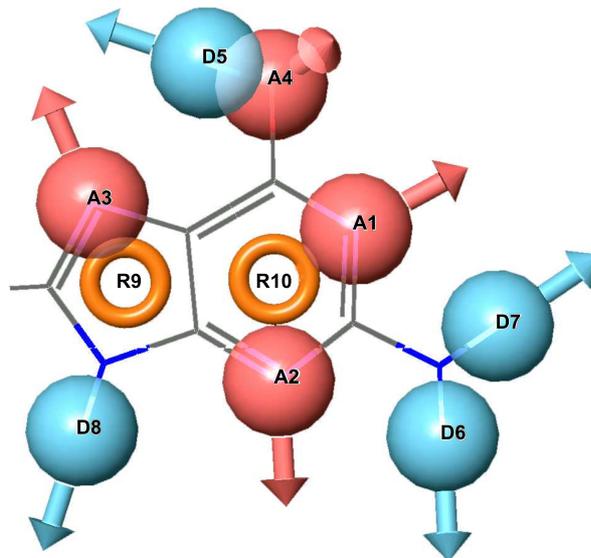


Abb. 3.17: Darstellung der Pharmakophoreigenschaften von Guanin als Nucleobase.

Mithilfe dieser Pharmakophordefinition wurde nun die *Zinc*-Datenbank auf geeignete Analoga durchsucht.[84] Hierfür wird die Geometrie der Pharmakophorhypothese herangezogen. Demnach sind die Abstände zwischen den einzelnen Eigenschaften (wie zum Beispiel R9 und A1) die Vorlage, nach der Treffer in Datenbanken gesucht werden können.[126] Programmseitig werden daraufhin die Konformere der Datenbankmoleküle generiert und hierin nach Übereinstimmungen mit der Pharmakophordefinition gesucht. Das Auftreten aller zehn Pharmakophormerkmale in einem Molekül würde die Diversität stark einschränken. Daher wurden auch Moleküle als Übereinstimmung gewertet, die lediglich fünf der zehn Eigenschaften erfüllen. Eine Festlegung auf bestimmte Eigenschaften des Pharmakophors, wie zum Beispiel den aromatischen Ring R10, wurde nicht vorgenommen, da hierfür zu wenig Informationen zur Relevanz einzelner Merkmale vorliegen.

Zur Hypothesenbildung wurden zunächst aus der *Zinc*-Datenbank aromatische Moleküle mit einem Molgewicht kleiner 300 ausgewählt.[84] Mit dieser relativ hohen Gewichtsbeschränkung sollten auch schwerere Halogenide und größere polyzyklische Aromaten mit einbezogen werden. Zusätzlich wurde die Datenbank dahingehend ein-

geschränkt, dass lediglich Strukturen mit einem berechneten logP Octanol/Wasser kleiner 1.5 zugelassen wurden. Diese Einschränkung erfolgte, um bei späteren Messungen im wässrigen Medium nicht zu viele unlösliche Kandidaten zu erhalten. Bei der Sichtung der Ergebnisse fiel die Häufung von Molekülen aus dem Bestand des National Cancer Institutes aus den USA auf. Daher wurde gezielt noch einmal dieser Katalog mit den oben genannten Kriterien durchsucht. Da einige Substanzen dann doch nicht mehr erhältlich waren, wurden letztlich 40 Substanzen für die Affinitätsuntersuchungen erhalten.

3.2.5 SPR Bindungsstudien

Nachdem die Aktivität des verwendeten Enzyms durch die NMR Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, sollten SPR Bindungsstudien der 40 potentiellen Liganden, welche mittels Pharmakophorsuche erhalten wurden, durchgeführt werden. Hierfür mussten zunächst Bedingungen für die Immobilisierung auf einem SPR Chip gefunden werden.

Mittels Amidkupplung konnte die Fucosyltransferase 5 auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Hierzu wurde zunächst die elektrostatische Anziehung bei dem gegebenen pH von 4.5 getestet. Der Wert von 7500 RU in 2 Minuten zeigte, dass der gewählte pH eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Carboxyextranmatrix ermöglicht. Nach Regeneration der Chipoberfläche und Aktivierung mit EDC/NHS konnten 8300 RU der Fucosyltransferase 5 gebunden werden. Anschließend wurden beide Flusszellen mit Ethanolamin deaktiviert.

Untersuchung der natürlichen Substrate

Die Vermessung der natürlichen Substrate der Fucosyltransferase 5 erfolgte zum einen, um das Messsystem auf seine Validität zu überprüfen. Dabei konnten die Literaturwerte bestätigt werden.[127]

Zum anderen sollte untersucht werden, welchen energetischen Anteil die einzelnen Fragmente der GDP-Fucose am Bindungsereignis haben. Dazu wurden neben der GDP-Fucose selbst auch GDP, Guanosin und Guanin (**53**) untersucht. Dabei zeigte sich, dass GDP-Fucose und GDP mit ähnlichen Affinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich binden (K_D (GDP) = 3.8 μ M, K_D (GDP-Fuc) = 2.0 μ M). Ebenfalls untersucht wurde Guanosin, welches lediglich mit 0.4 mM bindet. Guanin konnte nur mit Hilfe von 5 % DMSO-haltigem Puffer gelöst werden, zeigte dann aber eine Dissoziationskonstante von 0.12 mM. Nimmt man ein additives Verhalten der Fragmente an der gesamten Bindungsenergie an, so ergeben sich die in Abbildung 3.18 gezeigten energetischen Anteile. Hervorzuheben ist der starke Bindungsanteil der Nucleobase mit -5.5 kcal/mol sowie die des Pyrophosphates mit 3 kcal/mol. Dies ist in guter Überein-

3 Ergebnisse und Diskussion

stimmung mit den Daten die von anderen Glycosyltransferasen vorliegen. Dort variiert der Einfluss der Ribose und des zu übertragenden Zuckers an der Bindungsenergie, aber die Nucleobase und das Pyrophosphat stellen immer den größten Anteil an der Bindungsenergie.[13]

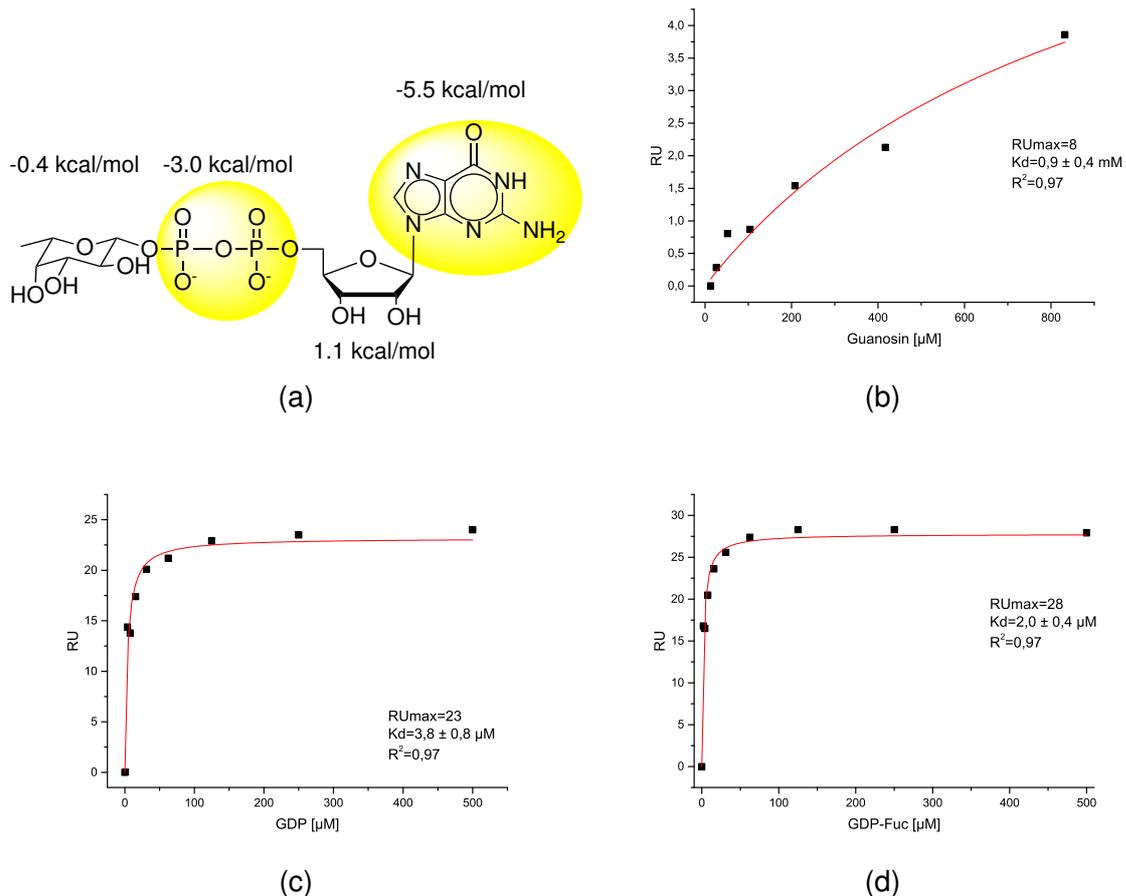


Abb. 3.18: Die Anteile der verschiedenen Strukturelemente an der Bindungsenergie von GDP-PFuc mit der Fucosyltransferase V sind in **a** zusammengefasst. Die Diagramme **b-d** zeigen die SPR Bindungskurven der Substrate GDP-Fuc, GDP und Guanosin. Guanin wurde unter veränderten Bedingungen (5 % DMSO) gemessen und ist daher hier nicht abgebildet.

screening einer Ligandbibliothek

Die Ergebnisse der natürlichen Substrate zeigen deutlich, dass für einen fragment-basierten Ansatz zunächst Liganden gefunden werden müssen, die die Nucleobase

ersetzen können. Diese müssen nicht nur energetisch mit dem natürlichen Substrat Guanin konkurrieren können, sondern auch eine günstige Ausgangsbasis für die Anknüpfung weiterer Fragmente bieten. Unter diesem Gesichtspunkt wurden in Abbildung 3.17 bereits wichtige Eigenschaften für ein entsprechendes Pharmakophor formuliert. Die in Abschnitt 3.2.4 gefundenen 40 potentiellen Liganden sollten mithilfe des SPR Experimentes untersucht werden. Das geringe Molekulargewicht und die schlechte Löslichkeit der heteroaromatischen Verbindungen stellen eine große Herausforderung in Bezug auf das experimentelle Design und den apparativen Aufbau dar. Da aufgrund der immobilisierten Proteinmenge kleine RU Antworten zu erwarten waren, die dicht an der Detektionsgrenze des Gerätes liegen, wurden keine kinetischen Daten, sondern mittels Titrationsreihen thermodynamische Daten erfasst. Hierzu wurden die Liganden einzeln als gesättigte Lösungen DMSO-haltigen BisTris Puffers verwendet. Dieser Puffer enthielt 5 % DMSO, um eine bessere Löslichkeit der Liganden zu erreichen, ohne das Protein zu stark zu belasten.

Die Lebensdauer des Proteins war unter diesen Bedingungen dennoch stark reduziert. Daher wurde alle zehn Messungen eine Kontrollmessung mit GDP durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität der FUT nach 20 Stunden soweit gesunken war, dass keine weiteren Messungen mehr möglich waren. Daher wurde nach dieser Zeit jeweils neues Protein immobilisiert.

Die Konzentrationen der Ligandlösungen wurden anschließend mittels NMR bestimmt. Dazu wurde BisTris als interner Standard verwendet. Der Puffer wurde mit Natriumchlorid auf eine Ionenstärke von 0.15 M eingestellt und enthielt ebenfalls 5 % DMSO. Die Integrale der Ligandsignale wurden ins Verhältnis zu denen von BisTris gesetzt (Relaxationsdelay $d_1 = 12$ s). Die so ermittelten Konzentrationen stellen die Sättigungskonzentration unter den gewählten Bedingungen dar. Die ermittelten K_D Werte aus den SPR Experimenten mussten nicht korrigiert werden, wenn die gewählte Konzentration unterhalb der Sättigung lag. Ansonsten wurden die Dissoziationskonstanten entsprechend der verringerten Konzentration korrigiert.

Zunächst wurden die Ergebnisse qualitativ bewertet. In Abbildung 3.19 sind die untersuchten Liganden nach Affinität sortiert. Es zeigt sich, dass besonders unter den höher affinen Molekülen hauptsächlich Purinderivate zu finden sind.

In Tab. 3.8 sind die Dissoziationskonstanten der gezeigten Verbindungen zusammen mit den maximalen SPR Antworten und dem Rang aus dem Pharmakophormodell dargestellt. Die Verbindungen **88** bis **91** zeigen keinerlei Bindung mit der Fucosyltransferase 5. Aufgrund ihres Molekulargewichtes hätte keine der untersuchten Verbindungen eine SPR-Antwort RU_{max} größer 30-50 zeigen dürfen. Für STD-Experimente wurden Moleküle bis zu 3 RU_{max} berücksichtigt. Die Ergebnisse der SPR Messungen zeigen, dass keine annelierten Sechsringe anstelle des Purin-Fünfrings toleriert werden. Ebenso ist die einzige tricyclische Verbindung **85** energetisch stark benachteiligt.

3 Ergebnisse und Diskussion

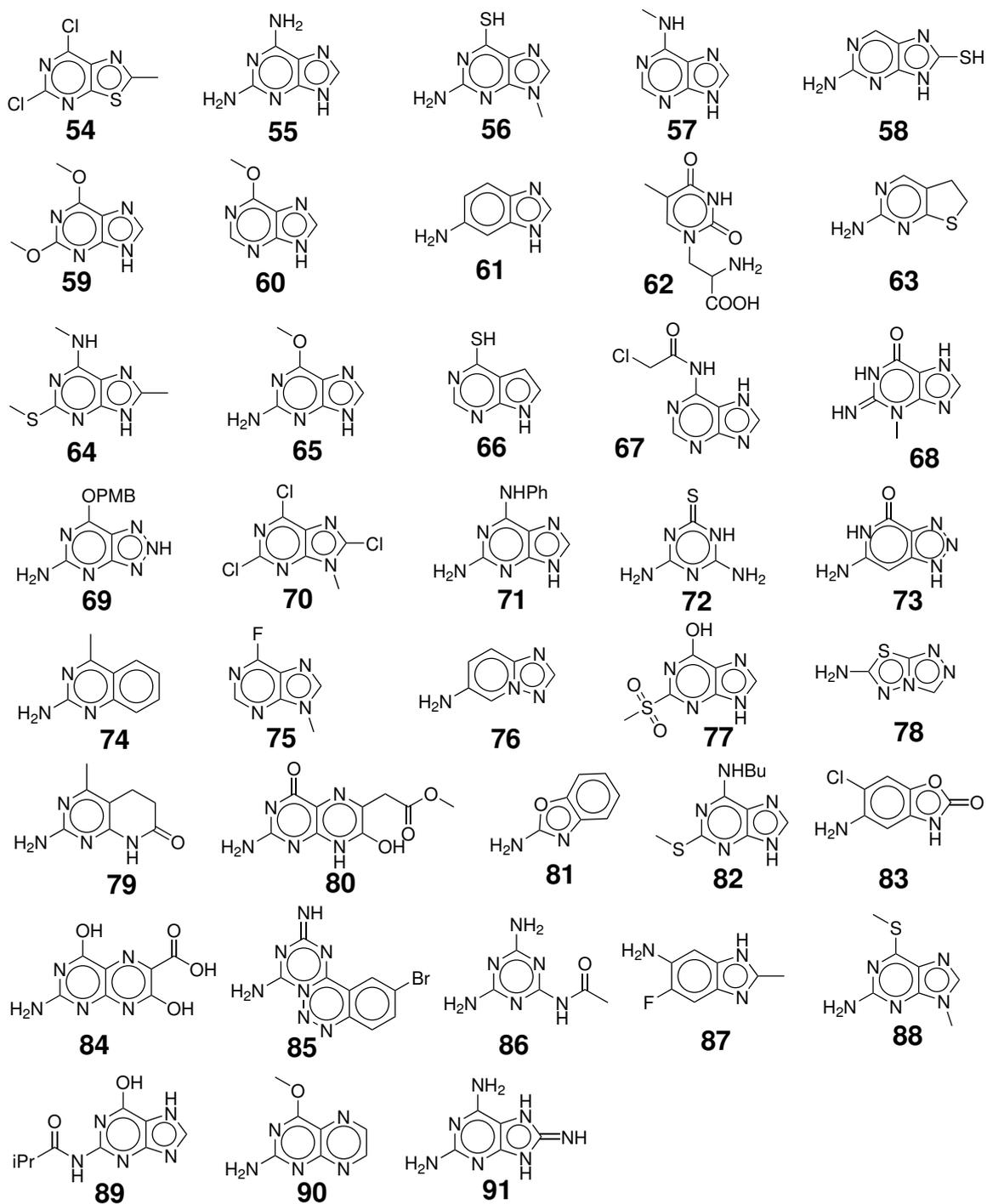


Abb. 3.19: Übersicht aller mittels SPR untersuchten Liganden der FUT 5, sortiert nach absteigender Affinität.

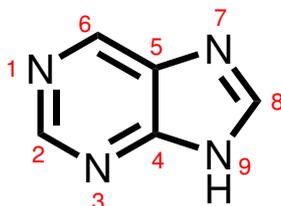
3 Ergebnisse und Diskussion

	Kd [mM]	RUmax	Pharmakophor Rang
54	0.13	49	49
55	0.34	57	2
56	0.37	41	6
57	0.41	29	13
58	0.42	66	3
59	0.46	66	8
60	0.47	23	9
61	0.59	80	22
62	0.67	78	
63	0.88	115	57
64	1.0	1219	17
65	1.1	79	1
66	1.2	1353	34
67	1.2	526	44
68	1.3	1415	16
69	1.3	1518	27
70	1.4	563	47
71	1.5	1745	18
72	1.5	596	48
73	1.6	176	
74	1.6	700	24
75	1.9	736	37
76	2.0	192	32
77	2.1	269	33
78	2.2	814	39
79	2.4	322	56
80	2.6	894	36
81	2.6	393	53
82	2.7	15026	55
83	2.9	1215	41
84	3.3	1185	42
85	3.4	1279	45
86	3.7	382	51
87	4.6	1600	35
88	3×10^{10}	2×10^{12}	11
89	1×10^{14}	1×10^{15}	54
90	2×10^{13}	1×10^{15}	4
91	1×10^{14}	9×10^{15}	25

Tabelle 3.8: Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien mit der Fucosyltransferase 5.

Verfeinerung des Pharmakophors

Eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit bevorzugter Bindungsenergien hat die Pharmakophorhypothese, welche zur Ligandenauswahl genutzt wurde, noch nicht. Dennoch finden sich in der zweiten Hälfte der Tabelle, welche die niederaffinen bzw. unspezifisch binden Moleküle zeigt, vor allem Moleküle die auch anhand der Pharmakophorsuche Ränge in der zweiten Hälfte haben. Essentiell für die Aktivität der Liganden sind vor allem die Ringstickstoffe des 6-Ringes im Purin (A1 und A2, s. Abb 3.17) sowie der aromatische fünfring im Purin (R9). Bei Betrachtung der Purinanaloge ist dies demnach das Minimalmotiv, anhand dessen aktive Inhibitoren ausgewählt werden. Gleichzeitig stellt dies eine starke Vereinfachung der Pharmakophorhypothese dar, die somit auch die Suche nach weiteren Inhibitoren stark vereinfacht.



Kd [mM]	ΔG [kcal/mol]	Pos 2	Pos3	Pos 6	Pos 8	Pos 9
0.34	-4.7	NH ₂		NH ₂		
0.37	-4.7	NH ₂		SH		Me
0.40	-4.6			NHMe		
0.42	-4.6	NH ₂			SH	
0.46	-4.6	OMe		OMe		
0.46	-4.6			OMe		
1.0	-4.1	NH ₂		OMe		
1.0	-4.1	SMe		NHMe	Me	
1.2	-4.0			NHCOCH ₂ Cl		
1.3	-3.9	Cl		Cl	Cl	Me
1.3	-3.9	NH ₂	Me	OH		
1.5	-3.9	NH ₂		NHPh		
1.6	-3.8	NH ₂		OH		
2.0	-3.7			F		Me
2.0	-3.7	SO ₂ Me		OH		
13	-2.6	SMe		NHBU		

Tabelle 3.9: Tabellarische Darstellung der Dissoziationskonstante und der dazugehörigen Bindungsenergien in Abhängigkeit der Substitution des Puringerüsts.

In Tabelle 3.9 sind alle Purinderivate mit den dazugehörigen Bindungskonstanten und

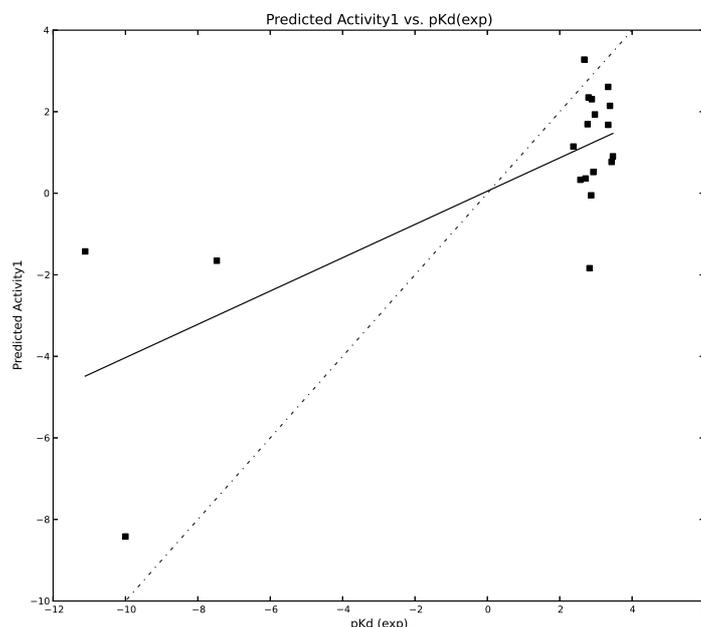


Abb. 3.20: Auftragung der mittels Maestro vorhergesagten Aktivität (*predicted activity*) gegen die mittels SPR bestimmte Aktivität (als negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K_D). Die Ausgleichsgerade zeigt, dass es noch keine Übereinstimmung mit der Diagonalen gibt. Allerdings lassen sich immerhin inaktive Substanzen von aktiven unterscheiden.

-energien sowie den Substituenten aufgeführt. Für die Positionen 3, 8 und 9 liegen zu wenig Substanzen vor, um eine quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehung (quantitative structure-activity-relationship, QSAR) abzuleiten. Die Moleküle mit Aminogruppe in Position 2, die sich lediglich in Position 6 unterscheiden (grau hinterlegt), stellen die größte Gruppe in der Untersuchung dar, bei der die Strukturänderung mit einer Bindungsenergie korreliert werden kann. Qualitativ lässt sich festhalten, dass große Substituenten (wie Phenylreste) die Bindung schwächen. Dieser Trend lässt sich auch für die anderen Substituenten an dieser Position fortsetzen. Allerdings lässt sich keine Festlegung mehr treffen, ob ein Wasserstoffbrückendonator oder -akzeptor bevorzugt gebunden wird.

Entsprechende Versuche, einen Zusammenhang mit einer berechneten oder gemessenen Größe herzustellen, waren nur für eine Aktivitätsvorhersage durch die Software Maestro erfolgreich (s. Abb. 3.20). Hierfür werden die gemessenen Aktivitäten durch multiple lineare Regression mit den verschiedenen programminternen Eigenschaften in Beziehung gesetzt. Durch die geeignete Gewichtung von Faktoren kann so eine gewisse Vorhersagekraft erreicht werden, die aber schon bei der Anwendung einer

weiteren Methode (STD-NMR) an ihre Grenzen stieß. Daher scheint für die Erstellung eines aussagekräftigen QSAR-Modells eine größere Datenbasis und ein einheitlicher Satz von Molekülen (z.B. nur Purine) nötig zu sein.

3.2.6 STD-NMR

Die Experimente, die in diesem Abschnitt diskutiert werden, bauen auf den SPR Experimente aus Abschnitt 3.2.5 auf, mit denen bereits Dissoziationskonstanten bestimmt werden konnten. Es konnte mit dieser Methode keine Informationen zur Kompetition um die Bindungstasche getroffen werden. Daher wurde in den STD Experimenten hierauf besonderer Wert gelegt. Da im STD Experiment das Protein nicht immobilisiert vorliegt, sondern in Lösung, steigt mit der Anzahl an vermessenen Liganden auch der Proteinbedarf. In dieser Arbeit war die Proteinmenge allerdings stark limitiert. Daher wurde folgende Vorgehensweise etabliert: Zunächst wurden die aussichtsreichsten Kandidaten aus dem SPR *screening* selektiert. Dann wurde von diesen ein Protonenspektrum akquiriert. Anschließend wurden Mischungen von 5-6 Liganden erstellt, in denen sich jeweils mindestens eine Protonenresonanz separiert befindet. Mit diesen Mischungen wurde dann zunächst eine klassische STD Titration durchgeführt, aus der sich Dissoziationskonstanten bestimmen ließen. Anschließend wurde eine kompetitive STD Titration mit GDP als Kompetitor durchgeführt. Durch dieses Vorgehen wurden zwar für die verschiedenen Liganden verschiedene K_i Werte von GDP bestimmt, allerdings konnten mit einem NMR Experiment bis zu sechs K_D und K_i Werte bestimmt werden. Zu beachten ist hierbei, dass große Inhibitionskonstanten von GDP eine starke Bindung des Inhibitors bedeuten.

In Tabelle 3.10 sind die Ergebnisse der STD Experimente zusammengefasst, die Bindungskurven von **57** sind Abb. **3.22** dargestellt, während die restlichen Bindungskurven im Anhang dargestellt sind. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SPR Experimente, gerade wenn beachtet wird, dass aufgrund der Voraussetzungen für die STD Experimente schwierige Bedingungen bezüglich Enzymmenge, Dissoziationskonstante und Löslichkeit der Inhibitoren vorlagen. Zwar zeigt sich nicht die gleiche Reihenfolge der Bindungsaffinitäten wie in den SPR-Studien, die Größenordnung der gefundenen Dissoziationskonstanten stimmt aber bis auf wenige Ausnahmen überein. Unter den Ausnahmen befinden sich die Liganden **78** und **58**, welche beide deutlich bessere Dissoziationskonstanten (0.013 mM bzw. 0.28 mM) als im SPR Experimenten (0.42 mM bzw. 2.1 mM) zeigen.

Interessanter als die Dissoziationskonstanten selbst waren in diesem Experiment aber die Untersuchungen zur Kompetition um die Donorbindungsstelle. Im Anhang finden sich die Grafiken der Inhibitionsstudien mit GDP. Für die meisten Liganden konnten IC_{50} Werte bestimmt werden, aus welchen mittels der Cheng-Prusoff-Gleichung

3 Ergebnisse und Diskussion

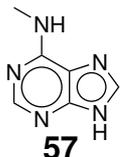
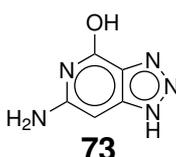
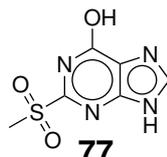
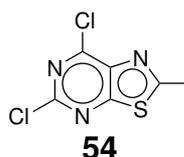
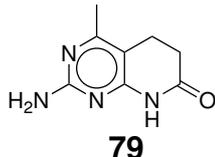
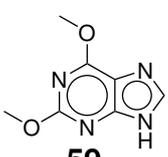
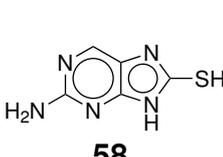
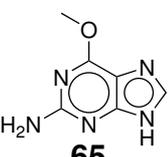
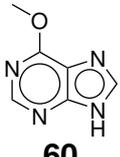
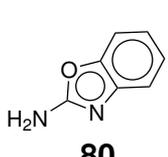
	K_D [mM]	IC_{50} (GDP) [mM]	K_i (GDP) [mM]	SPR Rang	Pharmakophor
	0.41	3.4 (15 μ M 57)	3.4	4	13
		2.8 (15 μ M 73)	2.3	20	
	0.28	2.33 (0.2 mM 77)	1.7	24	33
		2.4 (0.33 mM 54)	0.73	1	49
	0.12	0.42 (94 μ M 79)	0.23	26	56
	0.25	0.3 (0.24 mM 59)	0.152	6	8
	0.013	0.4 (94 μ M 58)	0.14	5	3
	1.07	0.1 (0.44 mM 65)	0.07	12	1
		0.1 (88 μ M 55)	0.078	2	2
				7	9
Guanin	0.53			27	36

Tabelle 3.10: Ergebnisse der STD Bindungs- und Inhibitionsstudien mit der Fucosyltransferase 5.

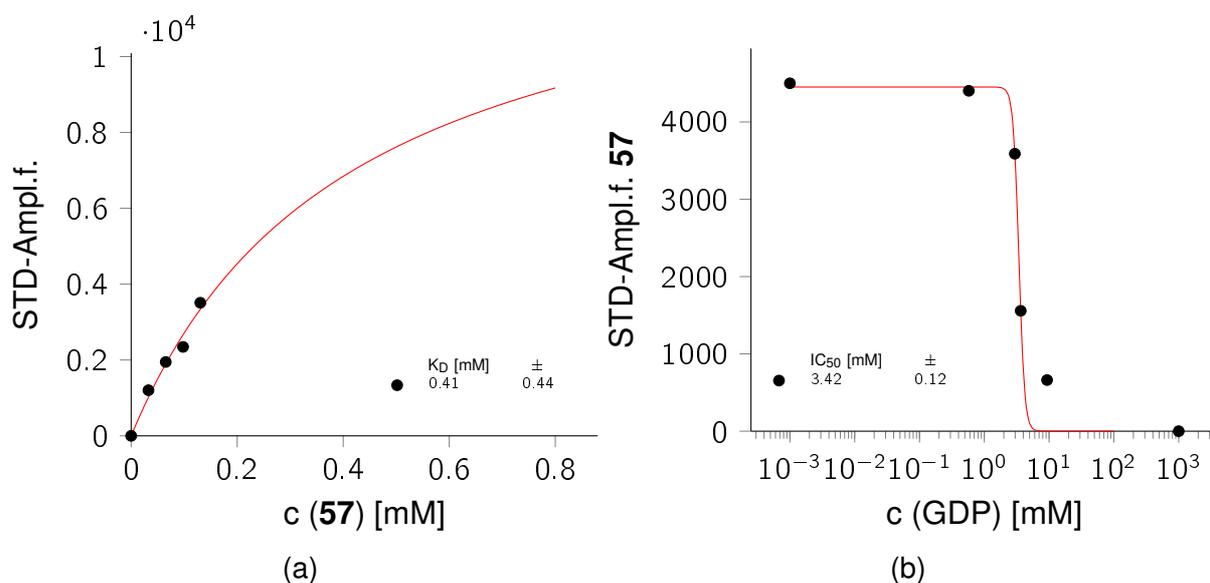


Abb. 3.21: Der Fit der Bindungskurve **a**) ergibt für **57** eine Dissoziationskonstante von 0.41 mM. Die Anpassung der Inhibitionskurve **b**) ergibt einen IC_{50} von 3.4 mM.

die entsprechenden Inhibitionskonstanten (K_i) berechnet werden konnten.[128]

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (3.4)$$

Da sich für die Nucleobasenanaloga keine Umsetzung ergibt, lässt sich K_m durch die Dissoziationskonstante K_d ersetzen. In den Fällen, in denen keine Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels STD NMR möglich war, wurde die entsprechende Dissoziationskonstante aus dem SPR Experiment verwendet. In Tabelle 3.10 sind die Nucleobasen nach absteigendem K_i sortiert. Demnach zeigt sich, dass Verbindung **57** den höchsten K_i aufweist, obwohl die Dissoziationskonstante sowohl im SPR als auch im STD Experiment nicht zu den besten Werten zählt. Ligand **73** und **77** sind in dieser Hinsicht ebenso interessant, da sie millimolare Inhibitionskonstanten für die Verdrängung durch GDP aufweisen. Gerade Ligand **73** stellt im Hinblick auf die Synthese von weiteren Analoga auf Grund der guten Darstellbarkeit von Derivaten eine wertvolle Leitstruktur dar, auf der weitere Studien aufgebaut wurden (s. Abschnitt 3.2.7).

Verbindung **54** zeigt einen guten IC_{50} Wert und einen besseren K_i als die restlichen Verbindungen im mikromolaren Bereich. Die inhibitorischen Konstanten der restlichen Verbindungen sind sehr ähnlich.

Zusammenfassend kann zu den STD Experimenten gesagt werden, dass die Dissoziationskonstanten des SPR Experimentes im Allgemeinen bestätigt werden konnten.

3.2.7 Entwicklung möglicher Donorsubstratanaloga

Zur effektiven Inhibition von Glycosyltransferasen bedarf es neben einer hochaffinen Nucleobase oder einem Analogon ebenfalls eines Substituenten für das Pyrophosphat. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, donorsubstratanaloge Inhibitoren zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde das zuvor entwickelte Guaninpharmakophor auf guanosinanalogue Strukturen erweitert. Hierfür wurde ein flexibler Ansatz gewählt, der es sowohl ermöglicht verschiedene Substituenten in Position 2 und 6 des Purins einzuführen als auch riboseanalogue Substituenten in Position 9. Von den mittels SPR untersuchten Liganden erfüllten nur die Verbindungen **69**, **73** und **79** die einfache Darstellbarkeit von Derivaten in den genannten Positionen (s. Abb. 3.22a). Ligand **79** zeigt eine geringe Affinität und Selektivität und wurde daher nicht weiter betrachtet. Lediglich für Verbindung **69** finden sich diverse Derivate in der Literatur, die sich durch einfache Syntheseschritte aufbauen lassen.

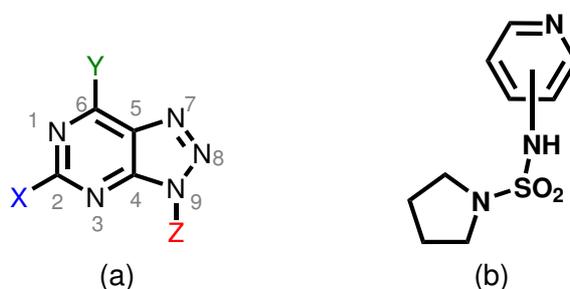


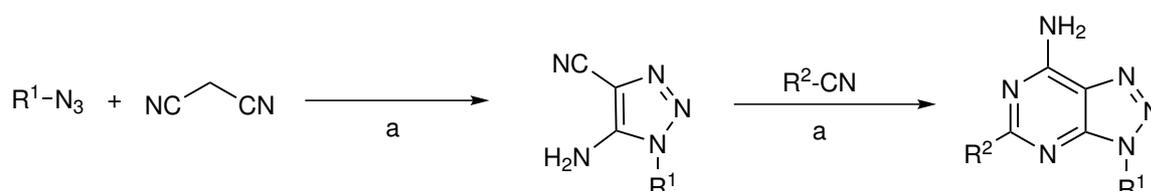
Abb. 3.22: Nucleobasenanaloga auf Azapurinabasis, wie in 3.22a dargestellt, eignen sich gut, um den Ersatz des Guanosins durch Analoga zu untersuchen. Dagegen sind Pyridin-sulfonamid-Derivate (3.22b) ein geeigneter Ersatz für ein Phosphat, die gleichzeitig die Position der Ribose und ebenfalls der Fucose belegen können.

Neben der Nucleobase spielt, wie oben gesagt, das Pyrophosphat eine entscheidende Rolle für die Bindungsenergie von Glycosyltransferase-Inhibitoren. Daher sollte auch für diesen Teil eines Donorsubstrat Analogons nach möglichen Mimetika gesucht werden. *Docking*-Untersuchungen der GTB ergaben, dass Sulfonamid-Derivate als geeigneter Ersatz für ein Pyrophosphat dienen können (s. Abb 3.22b). Die Übertragbarkeit auf die Fucosyltransferase 5 sollte hier untersucht werden. Da sich diese Substanzen zudem einfach aus den entsprechenden Aminen darstellen lassen, war sowohl ein einfacher synthetischer Zugang gegeben, als auch eine leichte Erweiterbarkeit in Hinblick auf spätere donorsubstratanaloge Inhibitoren.

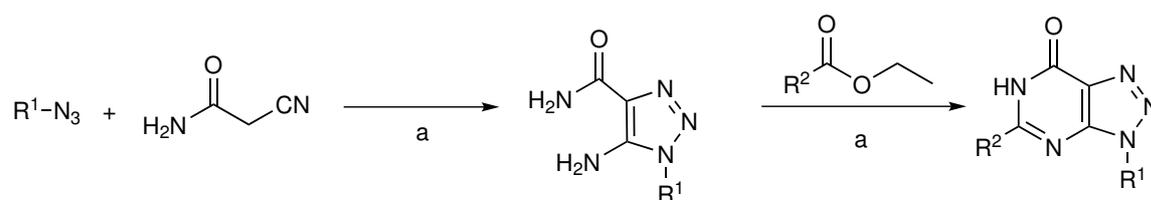
Synthese

Azapurine Ziel war es, eine möglichst große Vielfalt verschiedener Purinanaloga darstellen zu können. Daher wurde die Synthesestrategie von Biagi *et al.* aufgegrif-

fen, die es erlaubt, [8]-Aza-purinderivate darzustellen.[129] Diese zeigten im SPR-*screening* (s. Abb. 3.19) gute Bindungseigenschaften und die Synthese nach Biagi *et al.* erlaubt die flexible Einführung von Substituenten in den drei Positionen 2, 6 und 9. Es sollten verschiedene 6-Amino-[8]-Azapurine sowie [8]-Azapurin-6-one nach dem Syntheschema 3.15 bzw. 3.16 dargestellt werden.



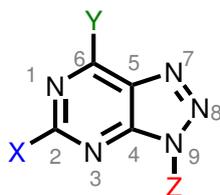
Schema 3.15: Die 6-Amino-[8]-azapurine lassen sich durch Umsetzung von Biscyaniden mit Aziden darstellen. Der zunächst entstehende Fünfring kann anschließend mit einem weiteren Cyanid zum Aminoazapurin geschlossen werden. Reaktionsbedingungen: **a** EtONa, EtOH, 78 °C [129]



Schema 3.16: Die [8]-Azapurin-6-onen lassen sich durch Umsetzung von β -Amidocyaniden mit Aziden darstellen. Der zunächst entstehende Fünfring kann anschließend mit einem Ester zum Azapurinon geschlossen werden. Reaktionsbedingungen: **a** EtONa, EtOH, 78 °C [129]

Durch diese beiden Synthesewege ist es möglich in Position 6 entweder eine Amino- oder eine Ketofunktion einzubringen. Der Substituent in Pos 9 wird bei beiden Synthesewegen durch das entsprechende Azid eingebracht und der Substituent in Position 2 wird je nach Synthesestrategie als entsprechendes Nitril oder als Ethoxyester eingeführt. Die Synthese des 2,6 Diamino-9-benzyl-[8]-azapurin **92** wurde nach der Vorschrift von Albert *et al.* durchgeführt.[130]

Die Synthese von 6-Amino-9-benzyl-2-methyl-[8]-azapurin **93** wurde analog zur Vorschrift von Biagi *et al.* durchgeführt. Die Rohausbeute ist quantitativ, die mittels HPLC bestimmte Reinheit liegt bei 20 %. Die nach Biagi *et al.* aufgeführte Reinigung des Produktes durch saure Fällung und anschließende Umkristallisation verlief erfolglos [129], da noch weitere Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde daher mittels präparativer HPLC gereinigt. Die so erhaltenen reinen Fraktionen reichten für die STD-Messungen aus. Die Synthese von 6-Amino-9-cyclohexyl-2-methyl-[8]-azapurin **94** verlief mit 50 % Ausbeute erfolgreicher.



	X	Y	Z	Ausbeute	Literatur
92	NH ₂	NH ₂	Bn	23	Albert <i>et al.</i> [130]
93	Me	NH ₂	Bn	20	Biagi <i>et al.</i> [129]
94	Me	NH ₂	Cy	50	-
95	H	OH	Bn	-	Biagi <i>et al.</i> [129]
96	H	OH	Cy	-	-

Tabelle 3.11: Synthese verschiedener substituierter 8-Azapurine. Während die 6-Aminoderivate in befriedigenden Ausbeuten dargestellt werden konnten, zeigte sich bei den Guaninderivaten nur die Bildung des Zwischenproduktes.

Auch hier war eine Reinigung mittels präparativer HPLC erforderlich. Die Synthesen von 9-Cyclohexyl-[8]-azapurin-6-on **96** und 9-Benzyl-[8]-azapurin-6-on **95** verliefen erfolglos, es konnte nur das jeweilige Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Hier scheint die Bildung des Fünfringes erfolgreich zu verlaufen, während die Iminbildung und anschließende Amidierung scheitern. Laut Biagi *et al.* ist auch die Nutzung des Methylformiats eine Möglichkeit.[129] Die höhere Reaktivität könnte die Spaltung des Esters durch das Amid NH erleichtern.

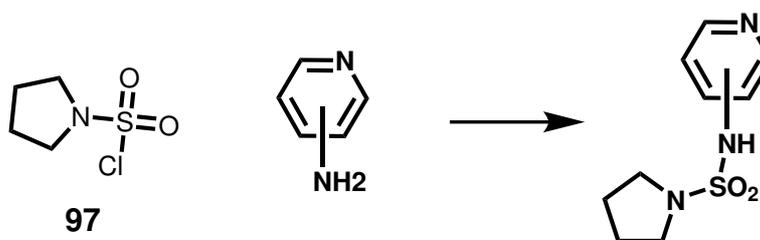


Abb. 3.23: Die Darstellung der Verbindungen **19-21** durch Umsetzung von 1-Pyrrolidinsulfonylchlorid mit den entsprechenden Aminopyridinen gelingt in geringen Ausbeuten von 3-5 %.

Sulfonamide Die Darstellung von 1-Pyrrolidinsulfonylchlorid **97** gelingt nach Krueger *et al.* [131] Durch Umsetzung dieses Sulfonylchlorides **97** mit den entsprechenden Aminopyridinen in Dichlormethan lassen sich in geringen Gesamtausbeuten (2-4 %) die Verbindungen **19-21** darstellen (s. Abb. 3.23). Diese nicht-

	K_D [mM]	Rmax (RU)
21	1.9	195
19	76	1510
20	n. B.	n. B.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der SPR-Bindungsstudien mit der Fucosyltransferase 5.

optimierten Ausbeuten stehen in guter Übereinstimmung mit den Ausbeuten ähnlicher Verbindungen.[131, 132]

SPR

Im Rahmen des SPR *screenings* der Nucleobase (s. S. 68) wurden daher auch die Moleküle **19-21** untersucht. Dabei zeigte sich, dass Verbindung **21** mit einer Dissoziationskonstante von 1.9 mM eine deutlich höhere Affinität aufweist als die Derivate **19** (76 mM) und **20**, welches nicht spezifisch bindet. Da für die Fucosyltransferase 5 keine strukturellen Information verfügbar sind, warf diese erhebliche Abstufung der Dissoziationskonstanten zunächst Fragen auf. Dabei ist vor allem der Unterschied der 2-Aminopyridine gegenüber den 3-Aminopyridinen auffällig.

In molekulardynamischen Untersuchungen mit der GTB konnte bestätigt werden, dass ein bi- bzw. tridentates Bindungsmotiv am Mangan vorliegt. Die Stickstoffe der Verbindung zeigen über den gesamten Simulationszeitraum einen starken Kontakt zum Mangan auf (s. Abb. 3.24a). Diese Koordinationssphäre ist mit dem 3-Aminopyridin nicht möglich (s. Abb. 3.24b). Die Bindungsenergien aus *docking* Untersuchungen an der GTB deuteten nicht auf einen derart großen Unterschied der Bindungsenergien hin, aber es ist durchaus denkbar, dass die Bindungstasche der Fucosyltransferase in dieser Hinsicht anders aussieht. Da Verbindung **21** die niedrigste Dissoziationskonstante aufweist und der Bindungsmodus günstiger erscheint, wurde der Ligand für weitere Untersuchungen in STD-NMR Studien ausgewählt.

STD-NMR

In der abschließenden Untersuchung mittels STD-NMR sollte ermittelt werden, welche Dissoziationskonstanten die Moleküle **92-94** aufweisen und ob diese Moleküle durch GDP wieder verdrängt werden können. Dies ist ein erfolgreicher Nachweis,

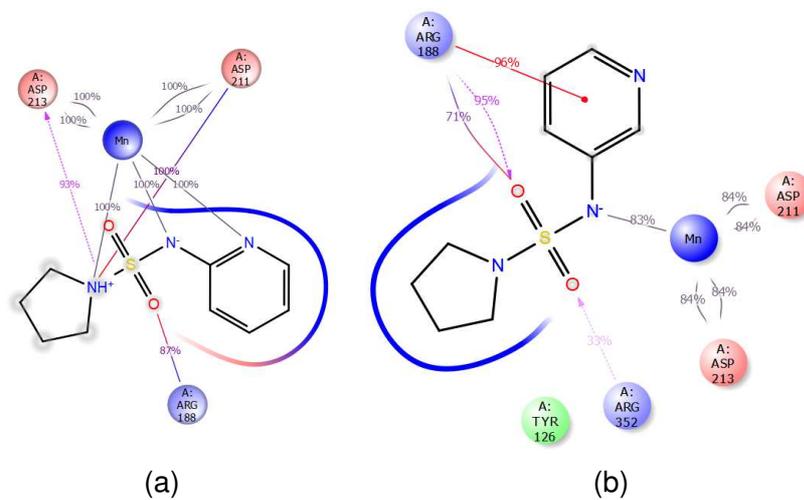


Abb. 3.24: Interaktionsdiagramm der MD-Simulationen von den Liganden **20** und **21** mit der GTB. Während Verbindung **21** (3.24a) mit einer Dissoziationskonstante von 1.9 mM eine deutlich höhere Affinität aufweist, bindet Verbindung **20** (3.24b) lediglich unspezifisch. Einen Erklärungsansatz bietet das *docking* und die MD Simulation der Substanzen in der bekannten Struktur der GTB: Hier verändert sich der Bindungsmodus durch das unterschiedliche Motiv der Stickstoffatome. Nur von Verbindung **21** erfolgt eine tridentate Komplexierung des Mangans. Gleichzeitig ist die Orientierung des Aromaten unterschiedlich.

dass eine Bindung in der Bindungstasche des GDP erfolgt. Des Weiteren sollte **21**, welches unter den Pyrrolidin-Sulfonamiden die besten Bindungseigenschaften im SPR Experiment zeigte, auf Konkurrenz um die Bindungstasche untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass **21** eine Dissoziationskonstante von 1.5 mM aufweist. Dieses Ergebnis zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den SPR Studien, in denen eine Dissoziationskonstante von 1.9 mM bestimmt wurde. Der IC₅₀ Wert von 0.8 mM sowie die Inhibitionskonstante K_i von 0.62 millimolar sind für das untersuchte System unter den vier besten Inhibitionskonstanten und somit besser, als die meisten Nucleobasenanaloga. Zusätzlich sind diese Moleküle besonders wertvoll auf dem Weg zu einem donorsubstratanalogen Inhibitor, da die Studien an der GTB (docking und Molekulardynamik) darauf schließen lassen, dass das Sulfon am Mangan bindet. Damit liegt der Pyridinring vermutlich an der Stelle der Ribose und ist somit ein guter Kandidat, um eine Verknüpfung, z.B. mit den substituierten Azapurinen, zu ermöglichen.

	K _D [mM]	IC ₅₀ (GDP) [mM]	K _i (GDP) [mM]
93	0.4	2 (0.35 mM 93)	1.1
21	1.5	0.8 (0.45 mM 21)	0.62
94	0.24	0.65 (0.27 mM 94)	0.4
92		0.4 (75 μM 92)	

Tabelle 3.13: Ergebnisse der STD Bindungs- und Inhibitionsstudien mit der Fucosyltransferase 5.

Die Untersuchung der substituierten Azapurine zeigte submillimolare Dissoziationskonstanten von 0.2-0.4 mM für die Verbindungen **92-94**. Im Vergleich mit dem Triazoloaminopyridinon **73** stellt dies bereits eine Verbesserung um den Faktor zehn dar. Damit leistet der Substituent in Position neun (Benzyl bzw. Cyclohexyl) noch keinen großen Beitrag zur Bindungsenergie. Es zeigt sich aber, dass diese Position genutzt werden kann, um einen Inhibitor aufzubauen. Gerade die einfache Synthese erlaubt daher die gezielte Suche nach besseren Substituenten. Die Bestimmung der IC₅₀ Werte zeigt gemeinsam mit den daraus ermittelten Inhibitionskonstanten, dass Verbindung **93** unter den drei untersuchten Kandidaten das höchste inhibitorische Potenzial aufweist. Alle drei Verbindungen konkurrieren mit GDP um die Bindungstasche und lassen sich durch GDP aus dem Enzym verdrängen. Die Benzylgruppe scheint als Substituent geeigneter zu sein. Dies ist insofern positiv zu werten, als auch die Benzylgruppe an der Stelle der Ribose positioniert sein soll. Dieser Umstand könnte eine Verknüpfung der Azapurine mit den Pyridin-Sulfonamiden erlauben (s. Abb. 3.25).

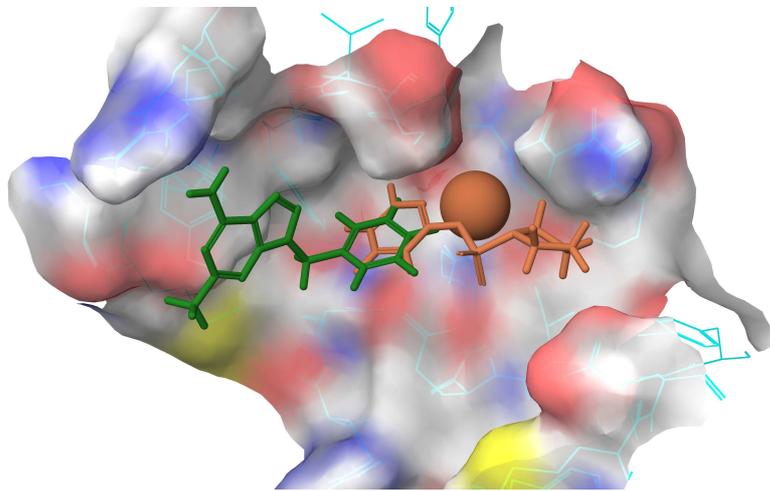


Abb. 3.25: Modellierung der Substrate **93** (grün) und **21** (ocker) im Homologiemodell der Fut 5.

4 Zusammenfassung

Aufgrund der großen Relevanz glycosylierter Strukturen bei der Zellerkennung und Signaltransduktion gibt es großen Bedarf an Methoden zur Aufklärung der Funktion dieser Substanzklasse. Glycosyltransferasen (GTs) sind die Schlüsselenzyme beim Aufbau von Glycanen. Sie katalysieren die Übertragung einer Kohlenhydrateinheit von einem aktivierten Donor, häufig ein XDP Zucker, bei dem X eine heteroaromatische Nucleobase ist, die über Ribose und ein Diphosphat mit dem entsprechenden Zucker verknüpft ist. Die Bindungsenergie wird hauptsächlich im Bereich der Nucleobase und des Diphosphates generiert. Ribose und der zu übertragende Zucker sind energetisch nachrangig. Allerdings ist der Donorzucker für die Spezifität verantwortlich. In dieser Arbeit wurden daher Konzepte für den Ersatz beider Gruppierungen entwickelt.

Die humane Galactosyltransferase B (GTB) ist für eine Glycosyltransferase hervorragend charakterisiert und katalysiert den Transfer einer Galactoseeinheit von UDP-Gal auf das H-Antigen, wodurch das Blutgruppen B-Antigen gebildet wird. Die Blutgruppe eines Individuums hat erheblichen Einfluss auf die Prognose und den Verlauf bestimmter Krebsarten. Zudem ist dieses Enzym aufgrund der vielen verfügbaren Daten ein ideales Modellsystem für die Entwicklung von Inhibitoren. Um die Verfügbarkeit im Körper zu gewährleisten muss das Diphosphat in UDP-Gal durch nichtionische Gruppen ersetzt werden, um zu wirksamen Inhibitoren zu gelangen. In dieser Arbeit wurden bekannte nichtionische Inhibitoren *in-silico* modelliert und ihr Bindungsverhalten analysiert, um ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Bindungsmechanismen zu erhalten. Auf diesem Verständnis aufbauend wurden ein neues Konzept entwickelt, um den Ersatz des Pyrophosphates durch ein hochpolares aber nichtionisches Sulfon zu ermöglichen. Die Synthese eines Galactosides, das über ein Sulfon an ein Azid gebunden ist war erfolgreich. Dieses Molekül konnte sowohl in einer Schutzgruppenstrategie als auch unter Verzicht auf Schutzgruppen dargestellt werden. Da die Synthese des Sulfones im Aglycon größere Schwierigkeiten bereitet, wurden weitere Vereinfachungen der Moleküle untersucht. Donorsubstratanaloga, die Triazole anstelle der Nucleobase enthalten sind *in-silico* in der Lage Uridin als Nucleobase zu ersetzen. Die benötigten Alkin-Edukte konnten erfolgreich dargestellt werden und die Umsetzung zu Triazolen durch einfache Click-Chemie wurde anhand von Modellsystemen mit und ohne Galactose gezeigt.

Der Ersatz beider Phosphate im UDP-Gal ist unter energetischen Gesichtspunkten

sehr erstrebenswert. Bissulfonamide als Ersatz beider Phosphate wurden daher *in-silico* untersucht. Die entsprechenden Bausteine (ein geschütztes Galactosylamin und Sulfamoyluridin) wurden erfolgreich dargestellt.

Auf der Suche nach hochaffinen und hochspezifischen Inhibitoren versprechen Bisubstratsanaloge den größten Erfolg. In dieser Arbeit wurde ein literaturbekanntes Molekül (ein Thiadiazolderivat) in *docking* Studien auf Seiten der Nucleobase verlängert. Die zugehörigen Bindungsaffinitäten wurden vorhergesagt. Während die Synthese und Affinitätsstudien von P. Leccese durchgeführt wurden, zeigte sich die Reihenfolge der Affinitäten als richtig und diese Moleküle zeigen herausragende Dissoziationskonstanten für nichtionische Glycosyltransferase-Inhibitoren von 9-17 μM .

Die humanen Fucosyltransferase fünf (Fut5) ist nicht so gut charakterisiert wie die GTB. Es ist bekannt, dass Lewis X Strukturen, die von der Fut5 aufgebaut werden, bei der Metastasierung von Krebs eine Rolle spielen. Daher sind Inhibitoren für dieses Enzym hochinteressant. Nichtsdestotrotz ist, wie für viele Glycosyltransferasen, keine strukturelle Information für dieses Enzym verfügbar. Daher wurde ein Homologiemodell basierend auf der Struktur aus *H. pylori* entwickelt, das erste Einblicke in den Mechanismus der Substratbindung erlaubt. Die niedrige Homologie ermöglicht allerdings kein strukturbasiertes *design*. Daher war es nötig das Enzym in ausreichenden Mengen für Affinitätsmessungen zu produzieren. Die Produktion in Hefezellen stellte sich als schwierig heraus, wohingegen die Produktion in Insektenzellen erfolgreich war. Die nachfolgende kinetische Charakterisierung mittels NMR Progresskurvenanalyse (GDP-Fuc $K_m = 32 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 0.0055 \text{ s}^{-1}$; N-Acetyl-D-lactosamin $K_m = 4 \text{ mM}$ und $k_{\text{cat}} = 2.5 \text{ s}^{-1}$) zeigte eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten.

Als Ausgangspunkt für ein ligandbasiertes Inhibitor-design wurde ein Pharmakophormodell der Nucleobase formuliert. Mit diesem Modell wurde ein Satz von 38 stark unterschiedlichen heteroaromatischen Verbindungen ausgewählt und mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) untersucht. Die erhaltenen Daten wurden genutzt um das Pharmakophor zu verfeinern und die zehn bestbindenden Strukturen wurden mittels STD-NMR (saturation transfer difference) auf ihre Konkurrenz mit dem natürlichen Donorsubstrat GDP-Fucose untersucht. Die zugehörigen Inhibitionskonstanten zeigen vielversprechende Kandidaten, die besten binden mit Dissoziationskonstanten von 0.12 mM. Unter diesen Molekülen zeigen zwei Azapurine nicht nur gute Affinitäten (K_D von 1.3 mM bzw. 1.6 mM) sondern auch das Potenzial die Fragmente zu vergrößern. Hierfür wurde die Chemie der Azapurine untersucht und mehrere Derivate wurden mittels STD-NMR untersucht (K_D von 0.24 mM bzw. 0.4 mM). Ebenso wurden drei Sulfonamide, die aus einem *docking* der GTB entstammen, mittels SPR untersucht (K_D von 1.9 mM). Das beste Sulfonamid zeigt auch im STD Experiment Konkurrenz um die Bindungstasche. Sowohl die Affinitäten in diesen Experimenten als auch der vorgeschlagene Bindungsmodus zeigt Potenzial für die Verknüpfung dieser Fragmente.

5 Summary

Glycosyltransferases (GTs) play an important role in the biosynthesis of glycan structures, like N- and O-glycans. Glycosylation influences modulatory functions as well as structural features. Also, inter-cell recognition is often mediated by glycosylation.

Glycosyltransferases (GTs) are the key enzymes in the biosynthesis of glycans, catalyzing the specific transfer of carbohydrate moieties from an activated donor to an acceptor substrate. Typical donors for glycosyltransferases are XDP sugars, where X is a nucleoside attached to a diphosphate (DP). Binding-energy and therefore affinity is mainly associated with the nucleobase as well as the diphosphate. Donor sugar and ribose residue are of lesser importance for affinity. The donor sugar is however important for specificity. To analyze the effect of glycosylation patterns in biological systems specific inhibitors of glycosyltransferases are of vital importance.

The human galactosyltransferase B (GTB) is (for a glycosyltransferase) extremely well characterized. GTB is responsible for the transfer of a galactose residue from UDP-Gal to the H-antigen thereby forming the blood group B-antigen. Because of the huge amount of structural data available, this enzyme is an ideal model for inhibitor design and inhibition studies. For bioavailability of a drug the diphosphate in UDP-Gal has to be replaced by a nonionic group, as ionic compounds normally do not permeate the cell wall. Still, high affinity ligands must mimic both the nucleobase and the pyrophosphate. Therefore, molecules that not only carry the galactose but also polar pyrophosphate-mimics in the aglycon are being sought.

During this work, previous non-ionic inhibitors were simulated *in-silico* and their binding behavior was analyzed for a deeper understanding of the mechanisms governing the affinity of these substances. Based on these insights, a concept to replace the phosphate by a highly polar yet non-ionic sulfone was developed. The synthesis of a galactoside linked via a sulfone to an azide was possible with and without protecting groups. The synthesis however was challenging, to further simplify the synthesis of donor substrate analogues triazoles were analyzed regarding their potential as nucleobase substitutes. It could be shown that triazoles can indeed replace the nucleobase found in GTB. The alkyne building blocks were successfully synthesized and the possibility to build the triazoles by simple click chemistry was tested with and without molecules containing galactose. Replacement of the second phosphate found in donor sugars is energetically favourable. Therefore the use of bisulfoneamides as a motif to replace both phosphates found in sugar nucleotides was evaluated *in-silico*

and the corresponding building blocks (a protected galactosyl-amine and sulfamoyl-uridine) were successfully prepared. On the quest towards high affinity and high specificity inhibitors, bisubstrate analogues have proven to be most successful. In this work an existing molecule found in the literature was used in a docking study for the elongation towards the nucleobase side. The binding affinities were predicted. The synthesis and affinity evaluation of the molecules was performed by P. Leccese and the order of affinities proved to be correct. These molecules show remarkable binding constants (9-17 μM) for non-ionic glycosyltransferase inhibitors.

The human fucosyltransferase 5 (Fut5) is not as well characterized as the GTB. It is well known that the Lewis X antigen produced by Fut5 is responsible for the metastasis of cancer cells. Therefore, it is important that inhibitors for this enzyme are developed. However, no structural information of this enzyme is currently known. The creation of a homology model based on the *H. pylori* structure allowed first insight into the mechanisms that govern binding of the donor substrate. The low homology did not allow structure-based drug-design. Therefore, the production of this enzyme for the measurement of affinities during a ligand-based design was mandatory. While the expression in yeast cells proved to be difficult, it was successful in insect cells. The subsequent kinetic characterization via NMR progress curve analysis was in accordance with the literature data (GDP-Fuc $K_m = 32 \mu\text{M}$ and $k_{\text{cat}} = 0.0055 \text{ s}^{-1}$; N-Acetyl-D-lactoseamine $K_m = 4 \text{ mM}$ and $k_{\text{cat}} = 2.5 \text{ s}^{-1}$).

As a starting point for the ligand-based design a pharmacophore of the nucleobase was proposed. With this model a set of 38 diverse heteroaromatic compounds was selected and screened by surface plasmon resonance (SPR). The data obtained was used to refine the pharmacophore and the 10 top-scoring compounds were evaluated by STD-NMR (Saturation Transfer Difference) for competition with the natural donor substrate GDP-fucose. The corresponding inhibition constants show promising candidates with the best dissociation constants being 0.12 mM. Among these molecules, two azapurines not only showed good affinity (K_D of 1.3 mM and 1.6 mM) but also the potential for fragment growth. Therefore, the chemistry for the synthesis of azapurines was tested and several synthesized molecules were analyzed by STD-NMR (K_D of 0.24 mM and 0.4 mM) together with the best sulfoneamide that emerged from another SPR screening of three substances (K_D of 1.9 mM). Those were found by docking-experiments performed with the GTB. The affinities found in all these experiments confirm that it is possible to grow the fragments towards a donor substrate analogue. The proposed binding mode has also potential for further linking and growing attempts.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Materialien und Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Blotting	V20 Semi-Dry Blotter Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	SCIE-PLAS Bio-Rad
Brutschrank	CO2 Brutschrank INCO 153med	Memmert
ESI-TOF	6224 TOF LC/MS	Agilent
Gefriertrocknungs- anlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ
Gelelektrophorese	Horizontal-Gelelektrophorese Criterion Vertical Electrophoreis EPS 3500XL LKB GPS 200/400 Power	peqLab Bio-Rad Amersham Pharmacia
HPLC-MS	1200 Series mit 6120 Quadrupol	Agilent
Inkubator	innova™ 44 incubator shaker	New Brunswick Scientific
IR-Spektrometer	Alpha-P Platinum ATR	Bruker
Laminarströmungs- bank	Holten Laminair	Thermo Fischer
Mikroskop	Primovert Mikroskop	Carl Zeiss
Mikrowelle	Discover	CEM
NMR Spektrometer	DRX 500 Avance 700 AMX 400 Avance III HD 600	Bruker
Photometer	BioPhotometer ND-1000	Eppendorf AG Thermo Scientific
pH-Meter	pH 526	WTW
Polarimeter	P8000	Krüß Optronic
Proteinreinigung	ÄKTA Start His Trap excel	GE Healthcare GE Healthcare

6 Experimenteller Teil

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SG Water
Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph
RP-Säule	Nucleodur C18 Isis Nucleodur C18 Pyramid	Macherey & Nagel
Schmelzpunktapparatur	Apotec	Otto Stein
Schüttler	MS1 Minishaker KS 200 basic Shaker	IKA Labortechnik
SPR Sensorchip	CM5	GE Healthcare
SPR	T100 3000	Biacore Biacore
Thermocycler	Primus 25 advanced S1000TM Thermal Cycler	peqLab Bio-Rad Laboratories
Thermomixer	Thermomixer C	Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
Wasserbad	Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH
Zentrifuge	5417 C 5417 R 5804R	Eppendorf

6.2 Verwendete Software

Software	Hersteller
Biacore T100 Control (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
ChemDraw Pro 11.0	CambridgeSoft
ChemStation	CEM
gnuplot	Projekt gnuplot
Illustrator CS2	Adobe
LC/MSD Chemstation (Rev. B.04.03 [54])	Agilent Technologies
Maestro (Vers. 9.3.5-10.5)	Schrödinger
Matlab R2015b	Mathworks
Origin (8.5G - 2016G)	Origin Lab
Topspin 3.1	Bruker Biospin

6.3 Verwendete Chemikalien, Enzyme, Standards, Materialien und Antikörper

Hersteller	Chemikalien
Acros	4-Amino-2,6-dihydroxypyrimidin, Tetrabrommethan
Agilent	ESI tuning mix
Antibodies-online	Anti-V5-Antikörper, polyklonal, Ziege
AppliChem	Ameisensäure (MS grade)
Biesterfeld	Toluol (techn.)
Burdick + Jackson	Essigsäure, Natriumiodid
Chempur	S-Epichlorhydrin
Deutero	Chloroform-d, Deuteriumoxid, DMSO-d6, Aceton-d6
Eurisotop	CHCl3-d3, MeOH-d4
Fluka	Trockene Lösungsmittel in <i>crown cap</i> Flaschen, Palladium auf Aktivkohle, DCC Thioessigsäure, Tetrabutylammoniumbromid, Pyridin, Epichlorhydrin
GE Healthcare	HyClone SFX-Insect Media, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, GeneJET Gel Extraction Kit
Greiner Bio-One	Gewebekulturflaschen und -schalen

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

6 Experimenteller Teil

Hersteller	Chemikalien
Grüssing	Essigsäureanhydrid, Magnesiumoxid, Natriumhydrogencarbonat, NaOH, Salzsäure 37%, Triethylamin
Honeywell	Natriumsulfat
Iris Biotech	DIPEA, DMF <i>peptide grade</i>
Kraemer& Martin	Aceton (techn.), Chloroform (techn.), Dichlormethan (techn.), Diethylether (techn.), Ethylacetat (techn.), Methanol (techn.), Petrolether (techn.)
Lancaster	Tetramethylharnstoff
Merck	Acetylchlorid, Benzylbromid, Molsieb 3 Å, Molsieb 4 Å, Natriumazid, Natriumhydroxid, Salpetersäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Triphenylphosphin, Wasserstoffperoxid
metabion	Oligonukleotide
R& D Systems	rekombinante Fucosyltransferase 5
Riedel de Haën	Natrium, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat, Kieselgel 60
Sarstedt	Gewebekulturflaschen und –schalen, sterile Pipetten
Sigma-Aldrich	2,5-Dihydroxybenzoesäure, Acetonitril (HPLC grade), Kunipia F, Diphosgen, 4-Nitrobenzoylchlorid, 2-Chlorethanol, HBr/Eisessig, D-Galactose, Tetrabutylammoniumiodid, Oxalylbromid, Kalium- <i>tert</i> -butanolat, <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Thermo Fischer	DMEM, DreamTaq, FastAP, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, T4-DNA-Ligase, Gentamicin, Page Ruler Plus prestained Protein Ladder, Penicillin G, RPMI, Streptomycin, Trypsin-EDTA, Zeocin
VWR	Acetonitril (HPLC grade)
Westphalen	H ₂ , NH ₃

6.4 Medien und Puffer

Agarosegel-Auftragspuffer (6x)	0.09% (w/v)	Bromphenolblau
	0.09% (w/v)	Xylen Cyanol FF
	60% (w/v)	Glycerol
	60 mM	EDTA
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/mL	Ampicillin in 70% EtOH
APS-Stocklösung	10% (w/v)	Ammoniumpersulfat
500X B (Biotin) steril filtriert	0.02 % (w/v)	Biotin

6 Experimenteller Teil

50 mM BisTris	50 mM	BisTris (d ₁₉), pH 6.7
	100 mM	NaCl
entw.	5 mM	MnCl ₂
oder	20 mM	MgCl ₂
Coomassie-Färbelösung	0.1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250
	1% (v/v)	Eisessig
	40% (v/v)	Methanol in ddH ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v)	Eisessig
	80% (v/v)	Wasser
Detektionslösung (AP)	0.1 M	Tris-HCl, pH 9.5
	10 mM	MgCl ₂
0.1 M	NaCl	
10X D (Dextrose) autoklaviert	20 % (w/v)	Dextrose
DNA-Breaking Buffer	2 % (v/v)	Triton X-100
steril filtriert	1 % (w/v)	SDS
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	1mM	EDTA
10X GY (Glycerol) autoklaviert	10 % (v/v)	Glycerol
Kanamycin-Stocklösung	20 mg/mL	Kanamycin in ddH ₂ O
Kryomedium für Insektenzellen	45% (v/v)	SFX Insektenzellmedium
	45% (v/v)	konditioniertes SFX Insektenzellmedium
	10% (v/v)	DMSO
10X M (Methanol) steril filtriert	5% (v/v)	Methanol
NBT-Stocklösung	1% (w/v) NBT	in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5
PAGE-Probenpuffer (4x)	250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	40% (v/v)	Glycerol
	8% (w/v)	SDS
	0.004% (w/v)	Bromphenolblau
PAGE-Sammelgel-Puffer (4x)	0.5 M	Tris-HCl, pH 6.8
	0.4% (w/v)	SDS
PAGE-Tankpuffer (5x)	0.125 M	Tris-HCl, pH 8.3
	0.96 M	Glycin

6 Experimenteller Teil

	0.5% (w/v)	SDS
PAGE-Trenngel-Puffer (4x)	1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8
	0.4% (w/v)	SDS
SDS-PAGE Anodenpuffer	40 mM	Tris pH 8.9
SDS-PAGE Kathodenpuffer	100 mM	Tris
	100 mM	Tricin pH 8.6
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
steril filtriert	1mM	EDTA
Transferpuffer	25 mM	Tris
	19.2 mM	Glycin
auf 800 mL mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8.3 einstellen		
	20% (v/v)	Isopropanol
X-Phos-Stocklösung	0.5% (w/v)	5-Bromchlorindolylphosphat Dinatriumsalz in ddH ₂ O
10X YNB (Yeast Nitrogen Base)	10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
steril filtriert	3.4 % (w/v)	YNB
YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Medium	1 % (w/v)	Hefe Extrakt
für Platten	2 % (w/v)	Agar
in 90% Endvolumen Wasser	2 % (w/v)	Trypton
autoklaviert		
anschließend Zugabe	10% (v/v)	10 x D-Lösung
YPDS + Zeocin (YPD + Sorbitol) Platten	1 % (w/v)	Hefe Extrakt
	2 % (w/v)	Agar
	1 M	Sorbitol
in 90% Endvolumen Wasser	2 % (w/v)	Trypton
autoklaviert		
nach Abkühlen auf 60 °C	10% (v/v)	10 x D-Lösung
	0.1 % (v/v)	Zeocin (100 mg/mL)

6.5 Methoden

6.5.1 Molecular Modelling

Die molecular Modelling Arbeiten in dieser Dissertation wurden mit dem Programm Maestro Version 9.3.5-10.6 von Schrödinger durchgeführt. Proteinstrukturen wurden

aus der Proteindatenbank geladen, dabei wurde im allgemeinen die Struktur 2RJ8 für Arbeiten der GTB verwendet und die Struktur 2NZY als homologe Struktur der Fucosyltransferase fünf. Andere Strukturen sind, falls diese verwendet wurden, gesondert angegeben.

Proteinstrukturen wurden mithilfe des Protein Preparation Wizard in Maestro vorbereitet. Hierfür wurden folgende Optionen angewandt: *Assign bond orders, add hydrogens, create zero-order bonds to metals, create disulfide bonds, convert selenomethionines to methionines, delete waters beyond 5 Å from het groups*. Bei Bedarf konnten ebenso Seitenketten oder nicht-aufgelöste *loops* programmseitig eingefügt werden. Kristallisationsreagenzien wie Glycerol wurden aus der Struktur entfernt, ebenso wie die Wassermoleküle, falls sie störend für die folgenden Arbeiten waren. Wenn die Wassermoleküle im Protein belassen wurden, konnte deren Orientierung bei pH 6.6 analog dem des Golgi Apparates optimiert werden. Eine abschließende Minimierung mit *restraints* der Schweratome wurde durchgeführt, um Spannungen in der Struktur energetisch abzubauen.

Die Platzierung von Liganden, die nicht mittels *docking* im Protein erfolgte, wurde durch manuelles oder programmgestütztes *alignment* anhand der natürlichen Liganden vorgenommen.

Moleküldynamik-Simulationen (MD)

Moleküldynamische Simulationen wurden mithilfe des Programmes Desmond innerhalb von Maestro durchgeführt. Hierfür muss zunächst ein geeignetes Molekülsystem generiert werden, dem das Protein (eventuell mit dem Liganden) solvatisiert vorliegt. Als Solvationsmodell wurde für Proteine das vorgefertigte SPC-Modell verwendet. Die Form der Lösungsmittelbox wurde anhand der Form des Proteins gewählt, sodass dieses nicht aus der Box herausragte und das Gesamtsystem nicht zu viele Teilchen enthielt. Ladungen wurden programmseitig durch Natrium- oder Chlorid-Ionen ausgeglichen. Zusätzlich wurde die Gesamtionstärke mit Natriumchlorid auf 0.15 M angehoben.

Das so erstellte Modellsystem wurde dann für MD Simulationen verwendet. Hierzu wurde die Simulationszeit anfangs auf 1.2 ns festgelegt und diese Simulationszeit verlängert, falls das System energetisch nicht äquilibriert war. Das Aufzeichnungsintervall der Trajektorie wurde normalerweise bei den Standardwerten von 4.8 ps für die Trajektorie und 1.2 ps für die Energie belassen. Falls diese zeitliche Auflösung nicht ausreichte wurden Simulationen mit verkürzten Aufzeichnungs-Intervallen durchgeführt. Als Ensemble wurde das NPT Ensemble gewählt, welches sowohl die Temperatur bei 300 Kelvin konstant hält als auch den Druck bei 1013 mbar. Ebenfalls wurde das Relaxationsprotokoll des Programmes genutzt, welches das Simulationssystem in mehreren Schritten von niedrigen Temperaturen und anfänglichen *restraints* für das

Protein auf die Zieltemperatur ohne *restraints* bringt.

Für die Analyse der molekulardynamischen Simulationen wurde zunächst das Energiediagramm der Simulation erstellt und auf die Konvergenz von Energie und Temperatur auf einen Gleichgewichtswert hin untersucht. Wenn dies der Fall war wurde eine qualitative Bewertung der Trajektorie vorgenommen, um eine Dissoziation des Liganden oder starke konformationelle Änderungen auszuschließen.

Die Analyse der Proteinen-Ligand-Wechselwirkungen erfolgte mithilfe des Struktur-Interaktionsdiagrammes. Dabei kann anhand der RMSD-Werte auch quantitativ nachvollzogen werden, ob die Bewegung von Ligand und Proteinen gemeinsam erfolgt oder Dissoziation stattfindet. Besonders die Ligand-Protein-Kontakte ergänzen das statische Bild, welches aus Ligand-Interaktions-Diagrammen besteht. Hier wird dargestellt, über welchen Prozentteil der Simulationszeit eine Interaktion besteht. Ligand Torsionsanalysen zeigen schließlich, ob der Ligand energetisch ungünstige Konformation einnehmen muss, um eine starke Wechselwirkung mit dem Protein einzugehen. Hierbei werden zum einen die Winkel der frei drehbaren Bindungen in einem Histogramm dargestellt und mit der dazugehörigen Energie hinterlegt. Zum anderen wird in einem Polarplot der zeitliche Verlauf der Torsionswinkel dargestellt.

Berechnung von Bindungsenergien mit *Prime* MM-GBSA

Für die Berechnung von Bindungsenergien wurde auf das Programm *Prime* MM-GBSA in Maestro zurückgegriffen. Hierfür wurden einzelne Liganden in dem jeweiligen Protein positioniert und dann als neuer Eintrag extrahiert. Anschließend wurden in dem Programm die Berechnung für getrennte Strukturen von Protein und Liganden ausgewählt. Die erhaltenen Energien haben neben der Bindungsenergie nach Gleichung 3.1 auf S. 27, die durch Molekülmechanik (MM) berechnet wird, ebenfalls einen Anteil für die Solvation der Einzelkomponenten sowie des Komplexes durch die *generalized Born surface accessibility* (GBSA) Komponente, welche eine Näherung an die Poisson-Boltzmann-Gleichung darstellt. Da auch diese Bindungsenergien keine verlässlichen absoluten Werte darstellen wurden sie in Relation zu einem Referenzmolekül gesetzt.

Docking

Für *docking*-Arbeiten wurden Liganden aus der *zinc* Datenbank verwendet.[84] Diese wurden zunächst als *SD-file* geladen und dann mit dem Programm LigPrep für das *docking* vorbereitet. Falls nötig wurden Filterkriterien verwendet, um die Anzahl oder Auswahl an Liganden für die jeweilige Fragestellung anzupassen. Als Kraftfeld wurde OPLS_2005 verwendet. Ladungen wurden für den pH des Golgi von 6.7 ± 0.3 erzeugt. Hierfür wurde Epik als Unterprogramm gewählt, und Metallbindungsstellen

erzeugt. Die Moleküle wurden entsalzen und mögliche Tautomere erzeugt, während Chiralitäten, wie in der Originaldatei vorgegeben, übernommen wurden.

Für die Erstellung eines Gitters für das *docking* wurde eine zuvor vorbereitete Proteinstruktur mit natürlichem Liganden geladen. Anschließend wurde mithilfe des Programmes *glide* ein Gitter erzeugt. Hierzu wurde zunächst der natürliche Ligand als Referenzpunkt ausgewählt. Eine Skalierung der Van-der-Waalsradien erfolgte nicht. Die Größe der Box wurde anschließend überprüft, sodass die Lage und Größe genug Platz für das *docking* der Liganden hatte. Als flexible Seitengruppe wurde, je nach Anspruch der *docking* Studie, vor allem die Hydroxygruppe von Tyrosin 126 ausgewählt. Um die Qualität des so erstellten Gitters zu überprüfen, wurde zunächst der natürliche Ligand gedockt. Falls dieser eine gute Übereinstimmung mit der Kristallstruktur aufwies, wurde das Gitter für die jeweilige Fragestellung verwendet. Falls der Ligand in seiner Positionierung stark abwich, wurden für die Erstellung des Gitters *constraints*, wie z.B. verbotene Volumina, definiert. Ebenso wurde für bestimmte Fragestellungen eine Interaktion mit dem Mangan als notwendig erachtet und ein entsprechender *constraint* definiert.

Für das *docking* wurde sowohl das zuvor erstellte Gitter, als auch die Datei der vorbereiteten Liganden ausgewählt. Für die Liganden wurde hierbei eine Skalierung der Van-der-Waals Radien mit dem Faktor 0.8 vorgenommen, um eine etwas weniger rigide Auswahl zu treffen. Die Präzision für das *sampling* wurde anhand der jeweiligen Fragestellung von grob (HTVS) bis fein (XP) gewählt. Die Liganden wurden immer als flexibel eingestellt. Sowohl Stickstoff-Inversionen wurden erlaubt, als auch das *sampling* von Ringskonformationen. Lediglich Amide wurden mit energetischen Strafen für nicht-planare Konformere belegt. Eine energetische Minimierung der fünf energetisch besten Posen wurde ausgewählt. Die so erhaltenen Ligand-Posen sind anhand ihres *docking* Score sortiert, der zwar keine energetische Einheit hat, aber eine Bewertung der Bindungseigenschaften darstellt, die einer Energie nahe kommt. Neben dieser quantitativen Bewertung wurde generell eine qualitative Bewertung anhand der Übereinstimmung der Bindungsposition mit dem natürlichen Liganden vorgenommen. Ebenso wurde eine Bewertung der besten 100 Treffer nach wiederkehrenden Strukturmustern vorgenommen.

Als Sonderfall des *dockings* wurde das kombinatorische *screening* mit dem Programm *combiglide* durchgeführt. Hierfür wurde die Struktur 3U0X der GTB verwendet. Die Erzeugung der virtuellen Edukte erfolgte analog zu dem Vorgehen im Programm *ligprep* in dem Programmmodul von *combiglide*, hier wird gezielt eine funktionelle Gruppe gefiltert (z.B. Alkylhalogenide) und anschließend vorbereitet. Zunächst wurde in dem Programm der Ligand **39** ausgewählt. In diesem wurde die NH-Bindung als reaktives Zentrum definiert. Anschließend wurde die Datei mit den zu knüpfenden Ligandmolekülen ausgewählt (Alkyljodide, Säurechloride und Alkylbromide). Die Einstellungen für das *docking* erfolgten analog zu den Beschreibungen im Absatz zuvor.

Eine Festlegung auf einen *constraint* für das Kernmolekül wurde nicht vorgenommen. Die Analyse der *docking*-Ergebnisse erfolgte zunächst anhand der Positionierung des **39**-Fragmentes, dessen Piperazin-Stickstoff weiterhin innerhalb der Aspartate des DXD-Motivs liegen sollte. Die so ermittelten 19 guten Treffer wurden anschließend mit dem Programm MM-GBSA nach absteigender Bindungsenergie sortiert.

Die Arbeiten, welche mithilfe des Programmes *dockblaster* durchgeführt wurden, fanden mithilfe der Programmoberfläche auf der Webseite statt.[83] Hierfür wurde das *docking* anhand einer PDB Struktur ausgewählt und dort der entsprechende PDB Code (2RJ7) eingetragen und GDU (Abkürzung des Liganden UDP-Gal) ausgewählt. Nach vorbereitenden Schritten des Programms konnte die entsprechende Bindungstasche ausgewählt werden. Dies erfolgte mithilfe des Programmes *Chimera*,[133] welches eine visuelle Überprüfung der Positionierung erlaubt. Für das *docking* selbst wurde die Option des größeren *samplings* und *polarisierten scorings* ausgewählt. Als Datenbank wurde die Auswahl der Fragmente verwendet.[84]

Homologiemodelling

Die Erstellung eines Homologiemodell erfolgte mit dem Programm *Prime* innerhalb von *Maestro*. Dabei wurde der *structure prediction wizard* verwendet. Zunächst wurde die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins (Fut5) im FASTA Format geladen. Hiermit erfolgte eine BLAST Datenbank Suche nach homologen Strukturen in der PDB. Anschließend erfolgte die Auswahl eines passenden Templates (2NZY). Das *alignment* der Proteinsequenz (hier Fut5) mit der Templat-Sequenz (2NZY) erfolgte mithilfe der Clustal-W Programmauswahl. Anschließend wurde das Modell Energie-basiert erstellt. Um einen Eindruck über die Qualität das erstellten Modells zu gewinnen, wurde zum Einen eine qualitative Bewertung der Interaktion des natürlichen Substrates mit den entsprechenden Resten anhand von Literaturdaten zu entsprechenden Interaktionen auf Proteinseite verglichen. Zudem wurde eine energetische Bewertung im Vergleich zu dem Templat vorgenommen.

Pharmakophormodell und *screening*

Die Erstellung eines Pharmakophormodells erfolgte mithilfe des Programmes *Phase* innerhalb von *Maestro*. Da für die Suche von Nucleobasenanaloga keine oder nicht ausreichend Affinitätsdaten für die Erstellung eines Pharmakophors vorhanden waren, wurde manuell ein Pharmakophor formuliert. Hierfür wurde auf den kristallisierten Liganden Guanosindiphosphat der Struktur 2NZY zurückgegriffen. Aus diesem wurde das Guanin kopiert und die in Abbildung 3.17 auf S. 64 dargestellten Pharmakophoreigenschaften definiert.

Da das Programm *Phase* für eine Datenbanksuche ausgelegt ist, wurde zunächst

die Datenbank mit Molekülen für die Struktursuche hinterlegt. Die Aufarbeitung der Strukturen erfolgte dabei in zwei Stufen. Zunächst wurden die Fragmente, die aus der *zinc*-datenbank ausgewählt wurden, anhand der Kriterien Molekulargewicht < 300 und logP < 1.5 gefiltert. Die Vorbereitung der so ausgewählten Strukturen erfolgte im Programm *Phase* analog zu den Vorbereitungsschritten in *LigPrep*, jedoch wird bereits eine Generierung verschiedener Konformere vorgenommen. Des Weiteren wurde der Katalog des *National Cancer Institutes* ausgewählt (der ebenfalls in der *zinc*-Datenbank verfügbar ist) und wie vorher für eine Datenbanksuche vorbereitet.

Die anschließende Suche nach Treffern erfolgte durch Auswahl der zuvor erstellten Hypothese. Die bereits existenten Konformere wurden in dieser Suche verwendet und es wurden mindestens fünf der zehn möglichen Pharmakophoreigenschaften als Voraussetzung für Treffer gefordert.

Innerhalb dieser Auswahl an Molekülen sollten diejenigen ausgewählt werden, welche die größte chemische Diversität aufweisen. Hierfür wurden die Moleküle in das Programm *canvas* übernommen und dort programmgestützt *3D pharmacophore fingerprints* für Drei- und Vier-Punkt Pharmakophore erzeugt. Die bereits vorhandenen Konformere wurden dabei übernommen. Anhand dieser *fingerprints* wurde dann eine Auswahl der Moleküle nach größtmöglicher Diversität über die Soergel Distanzmatrix vorgenommen.[134]

6.5.2 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook und Ausubel durchgeführt.[135, 136] Es wurde generell Reinstwasser für alle Lösungen verwendet. Um die Haltbarkeit der Medienpuffer zu erhöhen wurden diese entweder sterilfiltriert oder mittels Wasserdampf in einem Autoklaven für 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Die praktische Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten erfolgte in einem Labor der Sicherheitsstufe eins nach GenTG.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen wurde die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide, die als Primer der Reaktion dienen, ist es möglich, nicht nur sequenzspezifische Abschnitte zu vervielfältigen sondern auch gezielt Schnittstellen in die DNA einzubringen. Es wurden die Mengen bzw. Konzentrationen aus Tab. 6.4 verwendet.

Für die Reaktion werden jeweils drei Schritte wiederholt (s. Tab. 6.5). Dies ist zunächst das Denaturieren der DNA bei 94 °C gefolgt von einer annealing Phase, die von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer abhängt und der abschließenden Elongationsphase die bei 72 °C erfolgt. Hierbei wird durch eine hitzestabile DNA

Substanz	Menge/Konzentration
DNA	1 μL (100 ng/ μL)
forw. Primer	0.5 μL (1000 ng/ μL)
rev. Primer	0.5 μL (1000 ng/ μL)
Pfx Puffer	2.5 μL
Pfx Polymerase	0.5 μL
Wasser	20 μL

Tabelle 6.4: Standardansatz einer PCR.

Polymerase in Gegenwart der jeweiligen Desoxyribonukleosidtriphosphaten der Komplementärstrang synthetisiert.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	
prim. Denaturierung	94	120	x1
Denaturierung	94	30	x30
<i>annealing</i>	$T_m - 5$	30	
Elongation	68	75	
fin. Elongation	68	120	x1

Tabelle 6.5: Standard Programm einer PCR-Reaktion.

Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die Auftrennung erfolgt dabei in einem elektrischen Feld anhand der Größe. Die in dieser Arbeit eingesetzten einprozentigen Agarosegele wurden folgendermaßen hergestellt: 0.5 g Agarose wurden in 50 mL 0.5x TE-Puffer suspendiert und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 5 μL Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung in eine Gießkammer überführt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Laufkammer mit TE-Puffer gegeben. Die Proben wurden mit 6x Beladungspuffer aufgetragen und über 10-60 Minuten bei einer Spannung von 140-160 V getrennt. Anschließend erfolgt die Detektion mittels UV-Licht während die Größenordnung durch einen DNA Standard möglich war.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA wieder aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde das Genejet Gel Extraction Kit verwendet. Dabei wird die DNA unter hoher Salzkonzentration an einem Silica-

Matrix gebunden und mit Wasser wieder eluiert. Hierfür wurden die DNA Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Bindepuffer für 10 Minuten unter Schütteln bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung auf die Zentrifugensäule gegeben und zentrifugiert. Nach einem Reinigungsschritt mit 700 μL Waschpuffer wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet. Die anschließende Elution erfolgte mit destilliertem Wasser für 1 Minute bei 12000 g.

Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen

Für den Restriktionsverdau wurde DNA anhand der Herstellervorgaben mit einer entsprechenden Menge Restriktionsenzyme und Puffer versetzt. Die Reaktionszeit betrug 5-300 Minuten und die Temperatur wurde ebenfalls nach Herstellervorgaben für das jeweilige Enzym eingestellt.

Dephosphorylieren von DNA-Fragmenten

Für die Dephosphorylierung der terminalen Phosphatgruppe eines DNA Stranges wurde 1 μL Phosphatase für 10 Minuten bei 37 °C zu dem jeweiligen Restriktionsverdau gegeben.

Extraktion von DNA-Lösungen

Die Abtrennung von Proteinen aus DNA Lösung wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion erreicht. Hierfür wurde die Probe mit 0.5 Volumina Phenol und 0.5 Volumina Chloroform versetzt und geschüttelt. Die wässrige Phase mit DNA wurde abgenommen. Es folgte eine Ethanolfüllung der DNA.

Ethanol-fällung von DNA

Für die Fällung und Konzentrationserhöhung wurden zu einem Volumen DNA Lösung drei Volumina eiskaltes Ethanol und ein Zehntelvolumen 3 M Natriumacetat-lösung pH 5.2 zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Lösung 20 Minuten bei 4 °C und 20.400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 100 μL 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wie oben wurde der Überstand verworfen und die DNA getrocknet, um sie anschließend in Wasser aufzunehmen.

DNA-Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und DNA-Fragment in einem Verhältnis von etwa eins zu fünf eingesetzt. Zu einem Gesamtvolumen von 20 μL DNA wurden weiterhin 2 μL

Ligations-Puffer und 1 μL T4 DNA-Ligase gegeben. Die Ligation erfolgte entweder für drei Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ausgehend von einer Vorkultur wurden 2 mL SOB-Medium mit 2 mL dieser Kultur inokuliert. Diese Kultur wurde bis zu einer OD von 0.6 wachsen gelassen und anschließend bei 4 °C und 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 mL eiskaltem Inoue Transformationspuffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL Transformationspuffer resuspendiert und nach 10 Minuten Inkubation auf Eis mit 750 μL DMSO versetzt. Aliquots von 100 μL wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

Herstellung kompetenter *P. pastoris*-Zellen

Es wurde eine über Nacht Kultur *Pichia pastoris* angesetzt. Hiervon wurden 700 μL zu 500 mL frischem YPD-Medium in einem 2 L Erlenmeyer Kolben gegeben. Die Zellen wurden über etwa 20 Stunden bis zu einer optischen Dichte von 1.5 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (4000 rpm, 5 Minuten, 4 °C) und in 500 mL eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 250 mL eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 mL eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen. Nach der abschließenden Zentrifugation wurden die Zellen in 1.5 mL eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen.

Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde die Hitzeschockmethode angewandt. Hierfür wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 μL eines Ligationsansatzes vermischt. Diese Lösung wurde anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert um sie anschließend 90 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad zu überführen. Direkt im Anschluss wurde die Suspension wieder auf Eis gekühlt und mit 1 mL 2YT-Medium versetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert und anschließend 200 μL dieser Lösung auf LB-Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Über Nacht erfolgte ein Wachstum bei 37 °C. Diese Platten sind bei Versiegelung und invertierter Lagerung bei 4 °C etwa einen Monat haltbar. Für eine längere Lagerung wurden Kulturen der Kolonien mit 1/5 Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

Transformation von *P. pastoris* durch Elektroporation

100 μL der eisgekühlten kompetenten Zellen wurden mit 50 μg linearisierter Plasmid DNA versetzt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Auf Eis erfolgte für 5 Minuten eine Inkubation und anschließend die Elektroporation. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Ladespannung 1000 V, Kapazität 25 μF , Widerstand 481 Ω und Zeit 12 ms. Direkt nach dem Strompuls wurde 1 mL eiskalte 1 M Sorbitol-Lösung zu den Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde für 1 Stunde bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. 100 μL der Zellsuspension wurden auf YPDS-Platten mit Zeocin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 2-3 Tage bei 30 °C. Diese Platten sind bei Versiegelung und invertierter Lagerung bei 4 °C etwa einen Monat haltbar. Für eine längere Lagerung wurden Kulturen der Kolonien mit 1/5 Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte dem GeneJET Miniprepkit II. Ausgehend von einer Über-Nacht-Kultur wurden 2 mL derselben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 250 μL eiskalter Resuspensions-Lösung mit RNase aufgenommen. Anschließend wurden 250 μL Lysepuffer hinzugegeben und stark geschüttelt. Nach Zugabe von 350 μL Neutralisierungslösung wurde wiederum geschüttelt und der farblose Niederschlag für 5 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zentrifugensäule gegeben und bei 12.000 g eine Minute eluiert. Dieser Durchfluss wurde verworfen und anschließend noch zweimal mit je 500 μL Waschpuffer eluiert. Nach Trocknung der Säule durch Zentrifugation wurde die DNA mittels Wasser von der Säule eluiert.

Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefen

Ausgehend von einer Über-Nacht-Kultur eines einzelnen *Pichia pastoris* Stammes wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und in 200 μL Breaking-Buffer suspendiert. Mithilfe von 0.3 g sterilen Glasperlen und 200 μL Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 wurde der Aufschluss durch 3 Minuten Vortexen erreicht. Es wurden 200 μL TE-Puffer hinzugefügt und 2 min bei 14000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und die DNA mittels 1 mL eiskaltem Ethanol gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 12000 g abgetrennt. Es folgte ein Waschschrift mit 70 % eiskaltem Ethanol und nach Zentrifugation wie vorher wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 μL Wasser aufgenommen.

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte photometrisch unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Extinktionen bei 280 nm und 260 nm.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde durch die Firma GATC-Biotech nach der Sanger Methode durchgeführt.[137]

6.5.3 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Insektenzellen wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank absolviert. Arbeiten mit Hefezellen wurde mithilfe eines Bunsenbrenners durchgeführt.

Kultivieren und Passagieren von Sf9-Zellen

Die Kultivierung erfolgte mithilfe eines Inkubators bei 27 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in dem Kulturmedium HyClone SFX-Insect Media mit 10 µg/mL Gentamycin. Für die adhärenzte Kultivierung wurden Gewebekulturflaschen aus Polystyrol mit Filter verwendet.

Das Passagieren der Zellen erfolgte durch die Entfernung des alten Kulturmediums und Zugabe einer entsprechenden Menge frischen Kulturmediums und anschließendes Abklopfen der Zellen. Durch Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und nach Auszählung wurde eine geeignete Verdünnung in einer neuen Kulturflasche ange-setzt.

Kultivieren und Hefe-Zellen

Das Wachstum von Hefen in Flüssigkultur wurde bei 30 °C und Schütteln mit 230 rpm durchgeführt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde ausgehend von einer Zellsuspension durch Ein-satz von 10 µL Zellen mit der gleichen Menge Trypanblau und 20 µL Wasser durch-geführt. Nur lebendige Zellen zeigen dabei keine Blaufärbung. Die Auszählung dieser Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Dabei wur-de die Anzahl von Zellen in 16 Kleinquadraten mit dem Faktor 4×10^4 multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

Expression mittels Sf9-Zellen

Transfektion von Sf9-Zellen In einer 25 cm² Gewebekulturflasche wurden 1.5x10⁶ Sf9-Zellen ausgesät und für 30-60 Minuten adhären gelassen. Es wurden 10 µL Cellfectin II, 1 µg Vektor DNA und 0.25 µg linearisierte Baculo-DNA zu 100 µL Insektenzellmedium gegeben und vermischt. Diese Lösung wurde für 30-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf 900 µL mit Zellmedium aufgefüllt. Anschließend wurde das überstehende Medium der ausgesäten Zellen abgenommen und stattdessen das Transfektionsgemisch zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 27 °C unter gelegentlichem Schwenken. Anschließend wurde das Volumen mit Gentamycin-enthaltendem Insektenzellmedium auf 5 mL aufgefüllt und für 72 Stunden bei 27 °C inkubiert. Dieser Zellüberstand stellt den P1-Virusdreck dar und wurde abgenommen, die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten abgetrennt und der Überstand unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Virusamplifikation und Herstellen von Baculovirus-infizierten Sf9-Zell-Kryostocks In einer 175 cm² Gewebekulturflasche wurden 2.5x10⁷ Sf9-Zellen ausgesät und für 30-60 Minuten adhären gelassen. Anschließend wurde der Überstand an Medium abgenommen und 25 mL Insektenzellmedium zugegeben. Hierzu wurden 100-500 µL des P1-Virusstocks gegeben und die Zellen 72 Stunden bei 27 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und stellt den Virusstock-P2 dar.

Testexpression Je 1x10⁶ Sf9-Zellen in 2 mL Medium wurden in einer Six-Well Gewebekulturschale ausgesät und für 30-60 Minuten Zeit zur Adhäsion gelassen. Vom Virusstock-P2 wurden 6 verschiedene Mengen zu den Zellen gegeben und dieser Ansatz für 72 Stunden bei 27 °C inkubiert. Der Zellüberstand wurde anschließend auf den Erfolg der Expression überprüft (s. Abb. 6.1).

Expression von Proteinen im großen Maßstab Die Expression von größeren Proteinmengen wurde in Suspensions-Schüttel-Kultur durchgeführt. Dafür wurden Insektenzellen auf eine Dichte von 1.5x10⁶/mL verdünnt und in Volumina bis zu 500 mL in Gewebekulturflaschen überführt. Anschließend wurde entsprechend der Testexpression eine passende Menge Virusstock zugegeben und die Zellkultur für 72 Stunden bei 27 °C und 100 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C abgetrennt und das Protein aus dem Überstand isoliert.

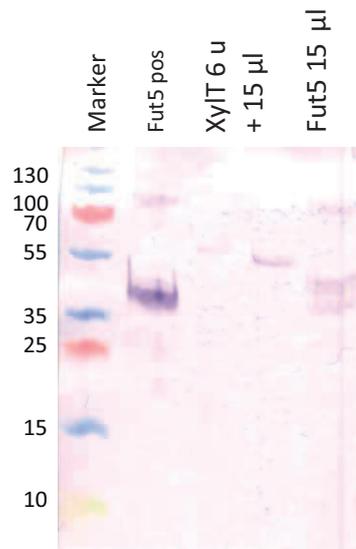


Abb. 6.1: Auf der rechten Bahn dieses Blots kann man die Testexpression Amplifikationsrunde I der Fucosyltransferase erkennen. Auch mehrmalige Versuche einen stärkeren Virsutiter zu amplifizieren blieben unerfolgreich. Daher wurde mit diesem Virusstock exprimiert. Die Detektion erfolgte mit anti Fut3 AK und anti rabbit AK + AP-Konjugat.

Expression mittels Hefe-Zellen

Zu 25 mL Komplexmedium BMGY (bzw. Minimalmedium) wurde eine Einzelkolonie oder eine Kryokultur zum Animpfen gegeben und diese Suspension bis zu einer OD von 3-6 bei 30 °C und 230 rpm wachsen gelassen (etwa 24 Stunden). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 g und Raumtemperatur über 5 Minuten pelletiert und dann im Induktionsmedium BMMY zu einer OD von 1 resuspendiert. Die Proteinexpression erfolgte über fünf Tage bei 30 °C und 230 rpm unter Zugabe von ein Prozent Methanol alle 24 Stunden. Alle 12 Stunden wurde eine Probe für die Untersuchung der Expression abgenommen. Diese wurde anschließend auf den Erfolg der Expression untersucht.

6.5.4 Proteinbiochemische Methoden

Immobilized Metallion Affinity Chromatography (IMAC)

Für die Reinigung von Proteinen aus Kulturüberständen wurde mithilfe eines FPLC Systems Äkta-Start die IMAC durchgeführt. Hierzu wurden der Zellüberstand mit Natronlauge auf pH 8 justiert und die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C für 45 Minuten entfernt. Es folgte eine Filtration mithilfe einer Tangen-

tialflussfiltration bei einer Porengröße von $0.45 \mu\text{m}$. Die erhaltene Lösung wurde nach Äquilibration einer Nickel-Sepharose-Säule mit 10 mL PBS bei pH 8 ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geleitet. Anschließend wurden als Waschlösung zunächst 10-50 ml PBS und anschließend zweieinhalb Prozent einer 300 mM Imidazol-Lösung über die Säule geleitet, um unselektiv gebundene Proteine zu eluieren. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit einem Gradienten derselben 300 mM Imidazol-Lösung in PBS. Dabei wurden Fraktionen von 1.5 ml aufgefangen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamid-Gele wurden in einem senkrechten Gießstand hergestellt. Dabei wurde aufgrund der ausreichenden Trennleistung auf ein Sammelgel verzichtet. Für das Trenngel wurden Konzentrationen von 10-20% Polyacrylamid angesetzt. Beispielhaft ist in Tab. 6.5.4 die Zusammensetzung für 17,5 % angegeben.

	Trenngel
Wasser	4.05 mL
Trenngelpuffer	6.25 mL
Acrylamid-Lösung	14.6 mL
Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)	75 μL
TEMED	20 μL
gesamt	25 mL

Nach dem Mischen der Flüssigkeiten in obiger Reihenfolge wurden die Gele direkt gegossen, da die Polymerisation mit Zugabe des Persulfates startet. Zwischen die Glasscheiben wurden anschließend Teflon-Kämme für die Geltaschen geschoben. Die Polymerisation war nach etwa 1 h beendet und die Gele wurden anschließend bis zur Verwendung in befeuchtetem Papier bei 4°C gelagert.

Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge Probenpuffer für etwa 5 Minuten aufgekocht. Anschließend wurden die Lösungen auf das Gel aufgetragen und für die Molekulargewichtbestimmung ebenso ein Marker aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 140-160 V durchgeführt. Das Ende war erreicht, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbung von Gelen nach der Elektrophorese erfolgte für 30-60 Minuten in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch Inkubation mit Essigsäure.

Elektrophoretischer Proteintransfer (Western-Blot)

Es wurde das Verfahren des semi-dry Blottens verwendet. Dabei wird das Gel auf einer Nitrozellulosemembran platziert und unter dem Einsatz von geringen Mengen Transferpuffer einer konstanten Stromstärke ausgesetzt. Für die Bindung des Transferpuffers wurde Filterpapier eingesetzt. Dieser Stapel wurde zwischen zwei Elektroden platziert und mit 80 mA pro Blatt für 90-120 Minuten entwickelt.

Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (immunprinting)

Zunächst wurden unbelegte Stellen der Nitrozellulosemembran für 30 Minuten in 4 % MPBS (Milchpulver in PBS-Puffer) blockiert. Danach wurde eine geeignete Verdünnung des Primärantikörpers in 2 % MPBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde eine geeignete Verdünnung des Sekundärantikörpers als AP-Konjugat (alkalische Phosphatase) wiederum in 2 % MPBS für 2 Stunden unter schwenken auf den Blot gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde der Nachweis in 10 mL AP-Detektionspuffer, 125 μ L NBT-Stocklösung und 125 μ L X-Phos-Stocklösung durchgeführt. Nach erfolgter Farbreaktion im Dunkeln wurde der Blot getrocknet und konnte abgelichtet werden.

6.5.5 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die Fucosyltransferase fünf wurde für die SPR Experiment in manganhaltigen BisTris Puffer überführt. Hierfür wurden Dialyse-Membranen mit einer Ausschlussgröße von 10.000 g pro Mol verwendet anschließend erfolgte eine fotometrische Bestimmung der Enzymkonzentration.

Die Immobilisierung des Enzyms auf dem Sensorchip CM5 wurde nach verschiedenen Protokollen durchgeführt.

1. Die Periodatspaltung wurde mit der Fucosyltransferase 5 in PBS Puffer bei pH 7.2 und einer Konzentration von 90 μ g/ml durchgeführt. 300 μ L dieser Lösung wurden mit 300 μ L 20 mM Natriumperiodatlösung in Acetatpuffer bei pH 5.5 (100 millimolar) verdünnt und diese Lösung wurde in Dunkelheit und bei Raumtemperatur für 35 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Lösung mit einer NAP5 Größenausschluss-Chromatographiesäule auf 10 mM Acetatpuffer pH 4 gebracht und somit das Periodat entfernt. Die nun vorliegende Konzentration betrug lediglich 10 μ g/ml. Ein CM5 Sensorchip wurde wiederum mit EDC/NHS bei 5 μ L/min aktiviert und anschließend wurden 5 mM Hydrazin in Wasser immobilisiert. Nach einem *capping* mit Ethanolamin wurde das Protein für 420 s bei 5 μ L/min immobilisiert und die gebildeten Immine anschließend mit 100 mM

Natriumcyanoborhydrid in Acetatpuffer reduziert. Da bei diesem Vorgehen lediglich 100 RU des Proteins immobilisiert werden konnten, wurde die Lösung auf eine Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ reduziert. Auch hiermit war eine Immobilisierung nicht erfolgreich.

2. Um die Fucosyltransferase 5 mittels Antikörper nichtkovalent auf dem Sensorchip zu immobilisieren wurde ein V5 Antikörper mit einer 20 kDa Dialysemembran in Acetatpuffer bei pH 5 dialysiert, um das enthaltene Natriumazid zu entfernen. Nach Aktivierung des Sensorchips mit EDC/NHS wurden bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L/min}$ 10500 RU immobilisiert. Dennoch schlug ein *capture* der Fucosyltransferase 5 fehl, da diese vermutlich proteolytisch zersetzt war. Eine Kontrolle mit dem humanen Fetuin, welches ebenfalls ein V5 Antikörperepitop enthält, zeigte einen erfolgreichen *capture* von 3000 RU. Dies entspricht sehr gut dem Molgewichtsverhältnis von etwa 1 zu 3.
3. Für die erfolgreiche Kupplung mittels Amid-Bindungsknüpfung wurde die Chipoberfläche unter Verwendung von EDC/NHS bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L/min}$ aktiviert. Anschließend wurde die Fucosyltransferase bei einer Flussrate von ebenfalls 5 $\mu\text{L/min}$ für 120 Sekunden über die Flusszelle geleitet. Dabei wurde eine Immobilisierung von 8.000-11.000 RU erreicht. Anschließend wurden sowohl Referenzzelle als auch Meßzelle mit Ethanolamin deaktiviert.

Für das Screening der Liganden wurden diese in BisTris Puffer mit 5 % DMSO gelöst und der Überstand abgenommen. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte anschließend mittels $^1\text{H-NMR}$ unter Verwendung von 5 mM BisTris als internem Standard. Die Liganden wurden in Konzentrationen von 0 mM bis zur Sättigung (maximal 500 μM) vermessen. Dabei wurde eine Flussrate von 10 $\mu\text{L/min}$ bei 25 °C eingestellt. Die Kontaktzeit betrug 120 Sekunden und anschließend erfolgte die Regeneration über 300 Sekunden durch das Spülen mit Puffer. Alle 10 Messungen erfolgte eine Kontrolle der Aktivität mit GDP. Da die Aktivität im DMSO-haltigen Puffer nach über die Messzeit stetig abnahm, wurde nach etwa 20 Stunden eine neue Messzelle für die Immobilisierung der Fucosyltransferase 5 genutzt.

6.5.6 Sättigungstransfer-Differenz-NMR (STD-NMR)

Die STD-NMR-Experimente erfolgten in 50 millimolar BisTris- d_{19} Puffer. Als Metallion für diese Messungen wurde 20 millimolar Magnesium verwendet und der pH betrug 6.7 (unter Berücksichtigung der Korrektur von 0.4 Einheiten für deuterierte Lösungen). Aufgrund der geringen Enzymmenge wurde in einem 3 mm Röhrchen eine Gesamtkonzentration von 1 μM Fucosyltransferase 5 durch Verdünnung auf ein Endvolumen von 180 μL eingestellt. Für diese Messungen wurde käufliche Fucosyltransferase von R& D Systems verwendet. Diese lag in Tris Puffer (25 mM) vor, der

folglich mit verdünnt wurde. Diese Verunreinigung wurde wegen der geringen Proteinmenge in Kauf genommen und anschließend als interner Standard verwendet. Die Akquisition der NMR Spektren erfolgte mit dem Pulsprogramm `stdiffesgp3` bei 298 K. Es wurden jeweils 512 Inkremente *on-* und *off-resonance* aufgenommen. Als Einstrahlpunkte wurden 40 ppm *off-resonance* und 1.4 ppm *on-resonance* verwendet. Die Sättigungszeit betrug 2 s, ebenso wie der *Relaxationsdelay*. Für die Unterdrückung der Wasserresonanz wurde ein 2 ms Sekunden Puls bei 34 dB verwendet. Die Unterdrückung unerwünschter Proteinsignale erfolgte mit einem 50 ms Sekunden *Spinlock*-Puls bei 30 dB.

Das pseudo 2D-Spektrum wurde in das jeweilige *on-* und *off-resonance* Spektrum separiert und ein Differenzspektrum durch Subtraktion erstellt. Anschließend wurde das *off-resonance* Spektrum prozessiert und die Phasenkorrektur in die folgenden Spektren übernommen.

Mittels serieller Integration wurden die Flächen der ausgewählten Signale bestimmt und daraus die absoluten STD-Prozente ermittelt. STD-Amplifikationsfaktoren, für die Ermittlung der Dissoziations- und Inhibitions-konstanten, wurden durch Multiplikation mit dem Ligand Überschuss erhalten.

6.5.7 NMR-Progresskurvenanalyse

Nach Dialyse des Enzyms (Ausschlussgröße 10 000 g/mol) in deuteriertem BisTris-Puffer mit Magnesium als bivalentem Kation erfolgte die Messung der Enzymaktivität mithilfe eines 500 MHz NMR. Hierfür wurde ein 3 mm NMR-Röhrchen mit einem Volumen von 180 μ l Lösung verwendet. Hierin waren 1.5 μ M Fucosyltransferase 5, 1 mM N-Acetyllactosamin und 20 U alkalische Phosphatase gelöst. Nach der Akquisition eines Referenz-Spektrums für die Startkonzentration des Akzeptorsubstrates und Optimierung der sonstigen Parameter, wie Wasserunterdrückung, wurde GDP-Fucose als Donorsubstrat bis zu einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Gleichzeitig stellte dies den Startzeitpunkt der Reaktion dar. Für die folgende Aufnahme von 128 Experimenten alle 29 Minuten wurde das Pulsprogramm `zgesgp2D_4` verwendet. Wurden die 1D-Spektren aus dem Pseudo 2-D Spektrum extrahiert und seriell prozessiert. Es wurde ein LB von 0.5 verwendet. Durch serielle Integration wurden die Stoffmengen bezogen auf das Referenz-Spektrum ermittelt. Mithilfe dieser Konzentrationen und der zugehörigen Zeitpunkte konnte durch Anpassung der Kurve durch das Programm Matlab die Bestimmung der Enzymparameter K_M und V_{max} erfolgen.

6.6 Synthesen

NMR-Spektren in Chloroform wurden mit Tetramethylsilan als Standard aufgenommen. Wässrige Proben wurden mit Aceton versetzt und anhand des Lösungsmittelsignals referenziert.[138]

Darstellung von 2-Chlorethyl- α -D-galactopyranosid 9

Das Patent nach Szabilowski wurde vom technischen auf den Labormaßstab übertragen. [139]

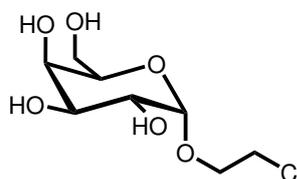
23.9 g (132 mmol) D-Galactose wurden in 40 ml Chlorethanol bei 120 °C gelöst. Die Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt und dann wurden 10 g Calciumsulfat sowie katalytische Mengen Amberlite IR120 zugegeben. Die Lösung wurde bei dieser Temperatur für 24 Stunden gerührt und anschließend die Feststoffe durch Filtration entfernt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt. Der resultierende Sirup war rein genug für eine direkte Benzylierung im nächsten Schritt, konnte aber auch durch Umkristallisation aus Ethanol überschichtet mit Petrolether rein dargestellt werden.

Charakterisierung

R_f-Wert (DCM/MeOH 4:1): 0.45.

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ ber. für

C₈H₁₅ClO₆Na 265.045, gef. 265.045.



C₈H₁₅O₆Cl
242.66 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 5.01 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1), 4.04 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 6.2 Hz, H5), 3.99-3.96 (m, 2H, H4, H1'a), 3.88 (1H, dd, ³J_{H2,H3} = 3.5 Hz, ³J_{H3,H4} = 10.5 Hz, H3), 3.85-3.81 (2H, m, H1'a, H2), 3.80-3.78 (2H, m, H2'), 3.73 (2H, d, ³J_{H5,H6} = 6.2 Hz, H6) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ = 98.5 (C1), 71.1 (C5), 69.4 (C3), 69.2 (C4), 68.3 (C1'), 68.2 (C2), 61.2 (C6), 43.4 (C2') ppm.

Darstellung von 2-Chlorethyl 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosid 10

Variante 1 Die Reaktion wurde unter Stickstoffschutzatmosphäre durchgeführt. Es wurden 2.35 g (3.9 mmol) **8** in 12 mL absolutem Dichlormethan gelöst und 1.24 g (3.81 mmol) Tetrabutylammoniumbromid sowie 1.3 mL DIPEA zugegeben. Danach

wurden 266 μL (4 mmol) Chlorethanol hinzugefügt und die Lösung für 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 20 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit jeweils 20 mL dest. Wasser, 1M Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat, und erneut mit dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit PE/EE 2:1 als Eluent. Ausbeute: 1.58 g (2.62 mmol, 67 %) eines gelben Öls.

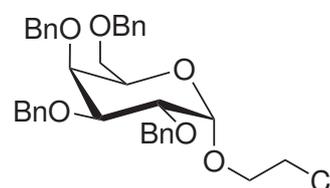
Variante 2 Die Reaktion wurde unter Stickstoffschutzatmosphäre durchgeführt. Es wurden 2.48 g (10.2 mmol) **9** in 5.00 mL DMF gelöst und bei 4 °C zu einer Suspension von 1.91 g (79.6 mmol, 7.79 eq.) Natriumhydrid in 12.0 mL (82.8 mmol, 8.10 eq.) Benzylbromid getropft. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 60 h gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand drei mal mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde zwei mal mit Wasser und zwei mal mit ges. Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Eine Säulenfiltrations über Silica mit PE um Benzylbromid zu eluieren folgte die Elution mit PE/EE (2:1). Nach Entfernung des Lösungsmittel wurden 3.67 g (6.09 mmol, 59 %) eines gelben Öls erhalten.

Charakterisierung

R_f -Wert (PE/EE 2:1): 0.71.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +68.0^\circ$ ($c=0.45$, CHCl_3).

(ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{ClO}_6\text{Na}$ 625.2327, gef. 625.2329, $[\text{M}+\text{K}]^+$ ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{ClO}_6\text{K}$ 641.2067, gef. 641.2071.



$\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{ClO}_6$
603.14 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.40\text{-}7.20$ (20 H, m, H_{arom}), 4.93 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.83 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.82 (1H, d, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.4$ Hz, H1), 4.80 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.72 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.66 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.56 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.45 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.38 (1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.04-4.00 (1H, m, 5H), 4.04 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 9.5$ Hz, H2), 3.96-3.92 (1H, m, H4), 3.90-3.88 (1H, m, H3), 3.84-3.70 (2H, m, OCH_2), 3.67-3.65 (2 H, m, CH_2Cl), 3.50 (1H, t, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 6.3$ Hz, H6) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 138.9, 138.8, 138.7, 138.1$ (C_q arom.), 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (C arom.), 92.1 (C1), 69.7 (C5), 78.8 (C3), 74.9 (C4), 74.8, 73.6, 73.1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 76.8 (C2), 69.2 (C6), 68.5 (OCH_2), 60.5

(C6), 42.8 (CH₂Cl) ppm.

Darstellung von 2-O-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-ethyl ethanthioat 11

Die Reaktion wurde unter Stickstoffschutzatmosphäre durchgeführt. Es wurden 5.68 g (9.42 mmol) **10** in 45 mL DMF gelöst und 1.4 g (9.4 mmol) Natriumiodid sowie 1.55 g (9.42 mmol) Kaliumcarbonat zugegeben. Nach Zugabe von 0.8 mL (9 mmol) Thioessigsäure wurde für 16 Stunden bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen und mit 1M Salzsäure und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Produkt wurde im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 5.52 g (8.58 mmol, 91 %) eines rotbraunen Öls.

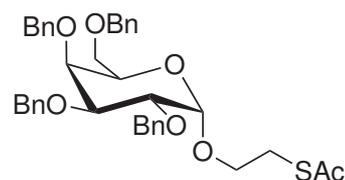
Charakterisierung

R_f-Wert (PE/EE 2:1): 0.71.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +54.2^\circ$ (c=1.0, DCM)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ ber. für

C₃₈H₄₂O₇SNa 665.2543, gef. 665.2547.



C₃₈H₄₂O₇S
642.80 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.40-7.20 (20H, m, Arom.), 4.93 (1H, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.83 (1H, ²J_{H,H} = 12.1 Hz, CH₂-Ph), 4.80 (1H, ²J_{H,H} = 12.1 Hz, CH₂-Ph), 4.80 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, H1), 7.72 (1H, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.66 (1H, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.56 (1H, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.45 (1H, ²J_{H,H} = 12.1 Hz, CH₂-Ph), 4.38 (1H, ²J_{H,H} = 11.3 Hz, CH₂-Ph), 4.02 (1H, dd, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, ³J_{H2,H3} = 10.0 Hz, H2), 3.99-3.94 (2H, m, H4, H5), 3.92 (1H, dd, ³J_{H3,H4} = 2.8 Hz, ³J_{H2,H3} = 10.0 Hz, H3), 3.74-3.57 (2H, m, OCH₂), 3.49 (2H, d, ³J_{H5,H6a} = 6.2 Hz, H6a), 3.49 (2H, d, ³J_{H5,H6b} = 6.8 Hz, H6b), 3.20-3.04 (2H, m, SCH₂), 2.28 (3H, s, SAc) ppm.

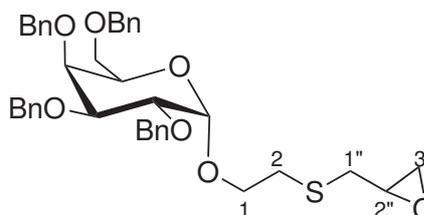
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 195.3 (SC=O), 139.0, 138.8, 138.7, 138.1 (C_qarom.), 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (C arom.), 98.0 (C1), 79.1 (C3), 76.7 (C2), 75.2 (C4), 74.9, 73.6, 73.5, 73.4 (CH₂-Ph), 69.7 (C5), 69.1 (C6), 66.9 (OCH₂), 30.7 (SAc), 29.0 (SCH₂) ppm.

Darstellung von ((2S)-Oxiran-2-yl-methylthio)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosid **12**

Die Durchführung der Reaktion erfolgte unter Schutzgasatmosphäre. Es wurden 1.54 g (2.39 mmol) **11** in 30 mL Methanol vorgelegt und eine geringe Menge Natrium wurde hinzugefügt. Unter Rühren wurden 200 μ L (2.55 mmol) *R*-Epichlorhydrin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet. Das Gemisch wurde in Diethylether aufgenommen und die wässrige Phase zwei Mal mit dem selbigen extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 939 mg (1.43 mmol, 60 %), eines orangefarbenen Öls erhalten.

Charakterisierung

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +46.3^\circ$ (c=1.0, DCM)
 HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ ber. für $C_{39}H_{44}O_7SNa$ 679.2700, gef. 679.2704;
 $[M+K]^+$ ber. für $C_{39}H_{44}O_7SK$ 695.2440, gef. 695.2447.



$C_{39}H_{44}O_7S$
656.83 g/mol

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 7.40$ - 7.20 (20H, m, Arom.), 4.93 (1H, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH_2 -Ph), 4.85 (1H, d, $^3J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H1), 4.83 (1H, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, CH_2 -Ph), 4.80 (1H, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, CH_2 -Ph), 7.72 (1H, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH_2 -Ph), 4.66 (1H, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH_2 -Ph), 4.56 (1H, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH_2 -Ph), 4.45 (1H, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, CH_2 -Ph), 4.38 (1H, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH_2 -Ph), 4.05 (1H, dd, $^3J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, $^3J_{H2,H3} = 9.8$ Hz, H2), 4.00-3.89 (3H, m, H3, H4, H5), 3.89-3.56 (6H, m, H1'a, H2', H1'b, H1''a, H3''a), 3.51 (2H, t, $^3J_{H5,H6} = 6.3$ Hz, H6), 3.49-2.73 (3H, m, H1''b, H2'', H3''b) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 128.5$, 128.4, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6 (C arom.), 98.1 (C1), 79.1 (C3), 76.6 (C2), 75.2 (C4), 74.9, 73.6, 73.5, 73.4 (CH_2 -Ph), 70.0 (C5), 69.1 (C6), 68.5 (C1'), 62.4, 62.3 (C2', C1''), 50.3 (C2''), 42.8 (C3'') ppm.

Darstellung von 2-(Oxiran-2-yl-methylsulfonyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosid **13**

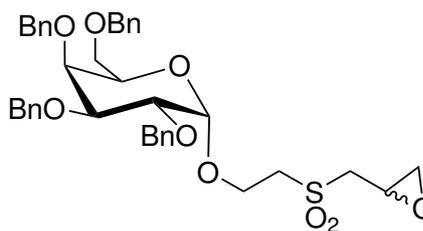
Allgemeine Vorgehensweise für die Oxidation des Sulfides zum Sulfon: ein Äquivalent **12** wurde in Dichlormethan gelöst und 1.5 Äquivalente *m*CPBA hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend

wurde die Säure durch wässrige Aufarbeitung mit PBS bei pH 7.4 entfernt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dabei wurden 78 % Ausbeute eines farblosen Sirupes erhalten.

Charakterisierung

Ausgehend von (*S*)-Epichlorohydrin entsteht (*R*)-(Oxiran-2-yl-methylsulfonyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosid.

R_f 0.38 (PE/EE 2:1)
 HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ ber. für
 $C_{39}H_{44}O_9S$ 711.2598, gef. 706.2597



$C_{39}H_{44}O_9S$
 688.83 g/mol

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.42-7.26 (20H, m, H Ph), 4.93 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, CH_2 -Ph), 4.93 (1H, d, $^3J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, H1), 4.75 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, CH_2 -Ph), 4.73 (1H, d, $^2J_{H,H} = 10.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.62 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.2$ Hz, CH_2 -Ph), 4.58 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.57 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.47 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.40 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.7$ Hz, CH_2 -Ph), 4.04 (1H, dd, $^3J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, $^3J_{H_2,H_3} = 10.0$ Hz, H2), 3.99 (1H, ddd, $^3J_{H_1',H_2'} = 3.8$ Hz, $^2J_{H,H} = 10.9$ Hz, H1'a), 3.96 (1H, dd, $^3J_{H_3,H_4} = 2.7$ Hz, $^3J_{H_4,H_5} = 1.0$ Hz, H4), 3.89-3.77 (1H, m, H1'b), 3.87 (1H, dt, $^3J_{H_4,H_5} = 0.9$ Hz, $^3J_{H_5,H_6} = 6.3$ Hz, H5), 3.82 (1H dd, $^3J_{H_2,H_3} = 10.0$ Hz, $^3J_{H_3,H_4} = 2.7$ Hz, H3), 3.62 (1H, ddd, $^3J_{H_1',H_2'} = 3.5$ Hz, $^2J_{H,H} = 10.6$ Hz, H2'a), 3.58-3.51 (1H, m, H1''a), 3.51 (2H, t, $^3J_{H_5,H_6} = 6.3$ Hz, H6), 3.22 (1H, ddd, $^3J_{H_1'',H_2''} = 2.6$ Hz, $^3J_{H_2'',H_3''} = 5.4$ Hz, $^3J_{H_2'',H_3''} = 9.5$ Hz, H2''), 3.04-2.97 (1H, m, H2'b), 2.94 (1H, dt, $^3J_{H_1',H_2'} = 2.6$ Hz, $^2J_{H,H} = 14.9$ Hz, H1''b), 2.62 (1H, dd, $^3J_{H_2'',H_3''} = 4.1$ Hz, $^3J_{H_2'',H_3''} = 5.3$ Hz, H3'a), 2.25 (1H, dd, $^3J_{H_2'',H_3''} = 2.5$ Hz, $^3J_{H_2'',H_3''} = 5.3$ Hz, H3'b) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6 (C Ph), 98.2 (C1), 79.0 (C3), 76.6 (C2), 74.9 (CH_2 -Ph), 74.7 (C4), 73.8, 73.7, 72.8 (CH_2 -Ph), 70.0 (C5), 69.2 (C6), 62.4 (C1'), 57.8 (C1''), 53.8 (C2') 46.2 (C2''), 45.8 (C3'') ppm.

Ausgehend von (*R*)-Epichlorohydrin entsteht (*S*)-(Oxiran-2-yl-methylsulfonyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosid.

R_f 0.38 (PE/EE 2:1)
 HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ ber. für $C_{39}H_{44}O_9S$ 711.2598, gef. 706.2598

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.38-7.25 (20H, m, H Ph), 4.94 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, CH_2 -Ph), 4.86 (1H, d, $^3J_{H_1,H_2} = 3.8$ Hz, H1), 4.80 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.4$ Hz, CH_2 -Ph),

4.76 (1H, d, $^2J_{H,H} = 12.0$ Hz, CH₂-Ph), 4.72 (1H, d, $^2J_{H,H} = 12.0$ Hz, CH₂-Ph), 4.63 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, CH₂-Ph), 4.58 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.6$ Hz, CH₂-Ph), 4.47 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.8$ Hz, CH₂-Ph), 4.40 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.9$ Hz, CH₂-Ph), 4.04 (1H, dd, $^3J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, $^3J_{H2,H3} = 10.2$ Hz, H2), 4.05-4.00 (1H, m, H1'a), 3.95 (1H, dd, $^3J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 0.8$ Hz, H4), 3.87 (1H, dt, $^3J_{H4,H5} = 0.8$ Hz, $^3J_{H5,H6} = 6.3$ Hz, H5), 3.78 (1H, , H1'b), 3.77 (1H dd, $^3J_{H2,H3} = 10.2$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, H3), 3.50 (2H, t, $^3J_{H5,H6} = 6.3$ Hz, H6), 3.30 (2H, dd, $^3J_{H1',H2'} = 2.0$ Hz, $^3J_{H1',H2'} = 4.9$ Hz, H2'), 3.58-3.51 (1H, m, H1"a), 3.20-3.17 (2H, m, H1"b, H2"), 2.69 (1H, dd, $^3J_{H2'',H3''} = 1.5$ Hz, $^3J_{H2'',H3''} = 4.2$ Hz, H3"a), 2.44 (1H, dd, $^3J_{H2'',H3''} = 1.5$ Hz, $^3J_{H2'',H3''} = 4.2$ Hz, H3"b) ppm.
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) $\delta = 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6$ (C Ph), 98.3 (C1), 78.5 (C3), 76.3 (C2), 74.8 (CH₂-Ph), 74.6 (C4), 73.7, 73.6, 72.7 (CH₂-Ph), 70.0 (C5), 69.1 (C6), 61.8 (C1'), 57.4 (C1"), 53.6 (C2') 46.1 (C3"), 45.8 (C2") ppm.

Darstellung von 2-(3-Azido-2-hydroxypropylsulfonyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl α -D-galactopyranosid 14

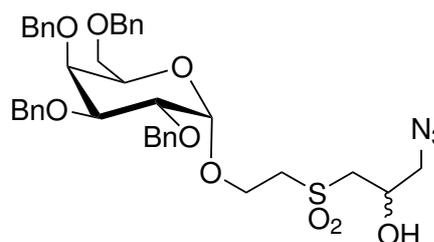
2 mg (3 μ M) **13** wurden in 2 mL DMF gelöst und 25 mg (0.38 mmol) Natriumazid sowie 26 mg (94 μ M) Kaliumcarbonat wurden zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für eine Woche gerührt. Nach Filtration und Gefriertrocknung wurde der Rückstand Dichlormethan aufgenommen. Chromatographie mittels HPLC (Si-60 250-25mm, 55% EE/Hexan, 20ml/min) lieferte 1.85 mg eines farblosen Sirupes (2.5 μ M, 84 % Ausbeute in 94 % Reinheit(nach NMR Integration)).

Charakterisierung

R_t (Si-60 250-25mm, 55% EE/Hexan, 20ml/min) 11.2'

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ ber. für

C₃₉H₄₅N₃O₉SNa 754.2769, gef. 754.2796.



C₃₉H₄₅N₃O₉S
731.29 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.41-7.24$ (20H, m, H Ph), 4.92 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, CH₂-Ph), 4.83 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, CH₂-Ph), 4.80 (1H, d, $^3J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H1), 4.76 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.5$ Hz, CH₂-Ph), 4.72 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.8$ Hz, CH₂-Ph), 4.66 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH₂-Ph), 4.56 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH₂-Ph), 4.48 (1H, d, $^2J_{H,H} = 12.1$ Hz, CH₂-Ph), 4.40 (1H, d, $^2J_{H,H} = 11.3$ Hz, CH₂-Ph), 4.10-4.04 (3H,

m, H2", H1'a, H2), 3.98 (1H, dd, $^3J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 1.2$ Hz, H4), 3.85 (1H, dt, $^3J_{H5,H6} = 6.3$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 1.2$ Hz, H5), 3.80 (1H, dd, $^3J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, $^3J_{H2,H3} = 10.0$ Hz, H3), 3.77 (1H, ddd, $^3J_{H1',H2'} = 3.1$ Hz, $^3J_{H1',H2'} = 4.9$ Hz, $^2J_{H,H} = 10.4$ Hz, H1'b), 3.50 (1H, d, $^3J_{H5,H6a} = 5.9$ Hz, H6a), 3.50 (1H, d, $^3J_{H5,H6b} = 6.8$ Hz, H6b), 3.43 (1H, ddd, $^3J_{H1',H2'} = 2.6$ Hz, $^3J_{H1',H2'} = 6.7$ Hz, $^2J_{H,H} = 14.4$ Hz, H2'a), 3.28 (1H, ddd, $^3J_{H1',H2'} = 2.7$ Hz, $^3J_{H1',H2'} = 7.4$ Hz, $^2J_{H,H} = 14.4$ Hz, H2'b), 3.23 (1H, dd, $^3J_{H1'',H2''} = 2.7$ Hz, $^2J_{H,H} = 14.7$ Hz, H1''a), 3.16 (1H, dd, $^3J_{H1'',H2''} = 8.7$ Hz, $^2J_{H,H} = 14.7$ Hz, H1''b), 3.05 (2H, d, $^3J_{H2'',H3''} = 5.1$ Hz, H3'') ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 128.4, 128.2, 128.0, 127.6$ (C Ph), 98.7 (C1), 79.3 (C3), 76.1 (C2), 75.0, 74.7 (CH_2 -Ph), 74.4 (C4), 73.7, 73.1 (CH_2 -Ph), 70.2 (C5), 69.3 (C6), 66.3 (C2''), 62.1 (C1'), 58.9 (C1''), 55.6 (C3''), 54.2 (C2') ppm.

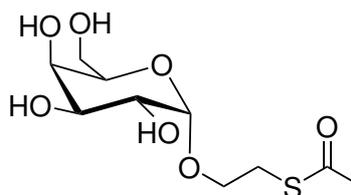
Darstellung von 2-O- α -D-Galactopyranosyl)-ethyl ethanthioat 17

363 mg (1.50 mM) **9** wurden in DMF gelöst und es wurden 13 mg (katalytisch) Natriumiodid hinzugegeben. Nach Zugabe von 153 mg (1 Äq.) Natriumcarbonat wurde bei 75 °C 125 μL (1.2 Äq.) Thioessigsäure zugegeben. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels HPLC gereinigt (Nucleodur Pyramid 250/25, 20 ml/min). Es wurde folgender Gradient verwendet: 0 % Acetonitril 0.5 min, 40 % Acetonitril 7 min, 0 % Acetonitril 10 min. Dabei wurden 102 mg (0.362 mmol) eines tiefroten Sirupes erhalten. Die Ausbeute beträgt 24 %.

Charakterisierung

R_f 0.46 (Aceton/MeOH 9:1)

MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 305.2



$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{S}$

282.3 g/mol

^1H -NMR (500 MHz, D_2O) $\delta = 4.98$ (1H, d, $^3J_{H1,H2} = 3.5$ Hz, H1), 4.02-3.99 (2H, m, H3, H2), 3.87-3.81 (m, 3H, H5, H4, H1'a), 3.75 (1H, d, $^3J_{H5,H6} = 5.9$ Hz, H6), 3.77-3.73 (1H, m, H1'b), 3.22-3.18 (2H, m, H2'), 4.41 (3H, s, Ac) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) $\delta = 164.5$ (C=O), 99.3 (C1), 71.1 (C5), 69.5 (C3), 69.3 (C4), 68.2 (C2), 66.3 (C1'), 61.2 (C6), 30.0 (Ac), 28.7 (C2') ppm.

Darstellung von 2-(3-Azido-2-hydroxypropylsulfonyl)-ethyl- α -D-galactopyranosid **18**

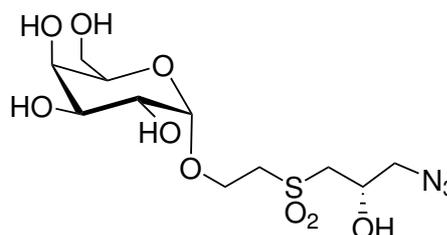
5.1 mg **17** (0.018 mmol) wurden in 5 mL Methanol gelöst und der pH mit frischer Methanollösung auf 10 eingestellt. Nach 10 Minuten wurden 1.8 μ L (2.2 mg, 0.023 mmol, 1.3 Äq.) *R*-Epichlorhydrin zugegeben und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 7.2 mg (0.046 mmol, 2.6 Äq.) Kaliumperoxymonosulfat zugegeben und für einen Tag gerührt. Die festen Bestandteile wurden durch Filtration entfernt und der Rückstand nach Entfernung des Lösungsmittels in DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4.0 mg (1.5 Äq.) Natriumiodid und 6.0 mg (5 Äq.) Natriumazid gegeben. Die Lösung wurde für 16 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels HPLC gereinigt (Nucleodur Pyramid 250/25, 20 ml/min). Es wurde folgender Gradient verwendet: 0 % Acetonitril 0.5 min, 40 % Acetonitril 7 min, 0 % Acetonitril 10 min. Dabei wurden 160 μ g (0.431 μ mol) eines farblosen Sirupes erhalten. Die Ausbeute beträgt 2.4 %.

Charakterisierung

R_t 5.17' (Nucleodur Pyramid 250/25, 20 ml/min; 0 % Acetonitril 0.5 min, 40 %

Acetonitril 7 min)

MS (ESI): $[M+Na]^+$ 394.3



$C_{11}H_{21}N_3O_9S$

371.4 g/mol

1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ = 5.01-4.99 (1H, m, H1), 4.47-4.45 (1H, m, H2'') 4.24-4.22 (2H, m, H1', H2'), 4.00-3.98 (m, 1H, H4), 3.98-3.96 (1H, m, H5), 3.93-3.90 (2H, m, H1', H2'), 3.87-3.83 (2H, m, H2, H3), 3.77-3.75 (2H, m, H6), 3.60-3.58 (2H, m, H3''), 3.52-3.47 (2H, m, H1'') ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) δ = 98.8 (C1), 71.4 (C5), 69.6 (C3), 69.2 (C4), 68.1 (C2), 65.2 (C2''), 61.0 (C1', C2'), 61.2 (C6), 57.3 (C3''), 55.5 (C1'') ppm.

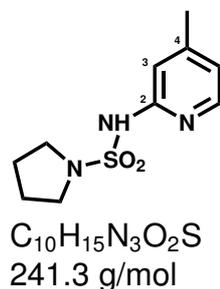
Darstellung von N-(4-Methylpyridin-2-yl)pyrrolidin-1-sulfonamid **19**

Pyrrolidinsulfamoylchlorid wurde analog zu Krueger *et al.* dargestellt.[131] Auf Grund der Reaktivität des Sulfonylchlorides wurde auf eine Charakterisierung verzichtet. Stattdessen wurde als äquimolare Menge 86.4 mg 2-Amino-4-methylpyridin

(0.800 mmol) zugegeben. Als Base wurden 10 mL Pyridin zugegeben und für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mittels HPLC gereinigt (Nucleodur-Isis). Dabei wurde folgender Gradient verwendet: 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min, 20 % Acetonitril 10 min. Die Elutionsfraktion bei 4.5 min enthielt die gesuchte Masse und wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Dabei wurden 6.7 mg (28 μ M) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 3.5 %.

Charakterisierung

R_t 4.5' (Nucleodur-Isis 250/25, 20 ml/min; 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min)
MS (ESI): $[M+H]^+$ 242.2.



1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.01 (d, 1H, 3J = 5.7 Hz, H6), 7.17 (s, 1H, H3), 6.66 (d, 1H, 3J = 5.8 Hz, H5), 3.35-3.31 (m, 4H, CH_{2N}), 2.35 (s, 3H, Me), 1.88-1.86 (m, 4H, CH_2) ppm.

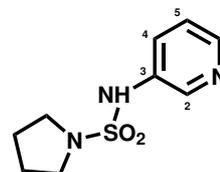
^{13}C -NMR (175 MHz, $CDCl_3$) δ = 154.0 (C1), 152.6 (C4), 141.9 (C6), 117.2 (C5), 114.9 (C3), 48.5 (CH_{2N}), 25.6 (CH_2), 22.0 (Me) ppm.

Darstellung von N-(Pyridin-3-yl)pyrrolidin-1-sulfonamid 20

Pyrrolidinsulfamoylchlorid wurde analog zu Krueger *et al.* dargestellt.[131] Auf Grund der Reaktivität des Sulfonylchlorides wurde auf eine Charakterisierung verzichtet. Stattdessen wurde als äquimolare Menge 133 mg 3-Aminopyridin (1.41 mmol) zugegeben. Als Base wurden 10 mL Pyridin zugegeben und es wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mittels HPLC gereinigt (Nucleodur-Isis). Dabei wurde folgender Gradient verwendet: 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min, 20 % Acetonitril 10 min. Die Elutionsfraktion bei 3.7 min enthielt die gesuchte Masse und wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Dabei wurden 5.8 mg (26 μ M) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 1.8 %.

Charakterisierung

R_t 3.7' (Nucleodur-Isis 250/25, 20 ml/min; 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min)
MS (ESI): $[M+H]^+$ 228.1.



$C_9H_{13}N_3O_2S$
227.3 g/mol

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.45 (d, 1H, 4J = 2.5 Hz, H2), 8.39 (dd, 1H, 4J = 1.1 Hz, 3J = 4.6 Hz, H6), 7.69 (ddd, 1H, 4J = 1.2 Hz, 4J = 2.7 Hz, 3J = 8.4 Hz, H4), 7.28 (dd, 1H, 3J = 4.8 Hz, 3J = 8.4 Hz, H5), 3.36-3.32 (m, 4H, CH_{2N}), 1.88-1.86 (m, 4H, CH_2) ppm.

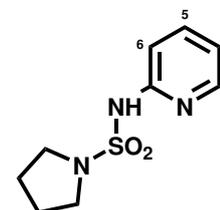
^{13}C -NMR (175 MHz, $CDCl_3$) δ = 145.2 (C6), 141.0 (C2), 135.1 (C3), 127.1 (C4), 124.2 (C5), 48.5 (CH_{2N}), 25.8 (CH_2) ppm.

Darstellung von N-(Pyridin-2-yl)pyrrolidin-1-sulfonamid 21

Pyrrolidinsulfamoylchlorid wurde analog zu Krueger *et al.* dargestellt.[131] Auf Grund der Reaktivität des Sulfonylchlorides wurde auf eine Charakterisierung verzichtet. Stattdessen wurde als äquimolare Menge 132 mg 2-Aminopyridin (1.40 mmol) zugegeben und für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mittels HPLC gereinigt (Nucleodur-Isis). Dabei wurde folgender Gradient verwendet: 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min, 20 % Acetonitril 10 min. Die Elutionsfraktion bei 3.7 min enthielt die gesuchte Masse und wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Dabei wurden 5.7 mg (25 μ M) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 1.8 %.

Charakterisierung

R_t 3.7' (Nucleodur-Isis 250/25, 20 ml/min; 20-50 % Acetonitril 1.5 min, 65 % Acetonitril 4 min, 100 % Acetonitril 6 min)
MS (ESI): $[M+H]^+$ 228.1.



$C_9H_{13}N_3O_2S$
227.3 g/mol

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.21 (br s, 1H, H3), 7.66 (m, 1H, H5), 7.33 (d, 1H, 3J = 8.8 Hz, H6), 6.92 (t, 1H, 3J = 6.4 Hz, H4), 3.37-3.35 (m, 4H, CH_{2N}), 1.88-1.86 (m,

4H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (175 MHz, CDCl₃) δ = 153.0 (C1), 145.6 (C3), 139.5 (C5), 117.3 (C4), 113.7 (C6), 48.5 (CH_{2N}), 29.7 (CH₂) ppm.

Darstellung von 2', 3'-O-Isopropylidenuridin 30

Variante A 30 wurde nach Winans und Bertozzi dargestellt. [89]

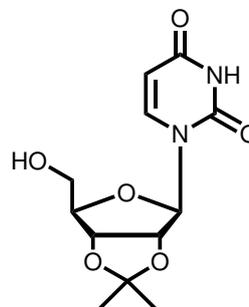
Variante B 30 wurde nach Chabaud *et al.* dargestellt. [140]

Charakterisierung

R_f-Wert (Chloroform/MeOH 10:1): 0.25.

Schmelzpunkt: 161 °C

MS (ESI): [M+H]⁺ 285.1.



C₁₂H₁₆N₂O₆
284.3 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆) δ = 7.83 (d, 1H, ³J_{H5,H6} = 8.1 Hz, H5), 5.91 (d, 1H, ³J_{H1',H2'} = 3.0 Hz, H1'), 5.61 (d, 1H, ³J_{H5,H6} = 8.1 Hz, H6), 4.94 (dd, 1H, ³J_{H1',H2'} = 2.9 Hz, ³J_{H2',H3'} = 6.3 Hz, H2'), 4.89 (dd, 1H, ³J_{H3',H2'} = 3.3 Hz, ³J_{H3',H4'} = 6.4 Hz, H3'), 4.19 (m, 1H, H4'), 3.78 (m, 2H, H5'), 1.52 (s, 3H, Me_iPr), 1.32 (s, Me_iPr) ppm.

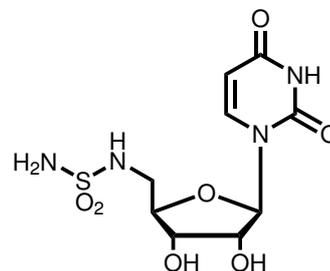
¹³C-NMR (75 MHz, Aceton-d₆) δ = 142.7 (C5), 114.3, 102.7 (C6), 93.0 (C1'), 87.6 (C4'), 85.2 (C2'), 81.6 (C3'), 62.7 (C5'), 27.6 (Me_iPr) ppm.

Darstellung von 5'-N-sulfamoyluridin 37

0.31 g (1.3 mmol) **36** wurden in 24 mL abs. Dimethylsulfoxid gelöst und es wurden 540 μL Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 0.20 g (1.7 mmol) **98** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 5 mL Methanol versetzt und anschließend im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Es wurden 0.06 g eines gelblichen Feststoffes (0.2 mmol, 15 %) erhalten.

Charakterisierung

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +1.6^\circ$ (c=1.0, DMF)
 Schmelzpunkt: 89 °C



$C_9H_{14}N_4O_7S$
 322.3 g/mol

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.75$ (d, 1H, $^3J_{H5,H6} = 8.3$ Hz, H5), 5.75 (d, 1H, $^3J_{H1',H2'} = 5.4$ Hz, H1'), 5.65 (d, 1H, $^3J_{H5,H6} = 8.1$ Hz, H6), 4.06-4.04 (m, 1H, H2'), 3.98-3.95 (m, 1H, H3'), 3.76 – 3.70 (m, 1H, H4'), 3.10 (dd, 1H, $^2J_{H,H} = 13.1$ Hz, $^3J_{H4,H5a} = 3.1$ Hz, H5') ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 102.7$ (C6), 90.0 (C1'), 81.0 (C4'), 72.6 (C2'), 71.3 (C3'), 46.1 (C5') ppm.

Darstellung von 6-Amino-9-cyclohexyl-2-methyl-[8]-azapurin 94

10.0 mL abs. Ethanol wurden mit 0.2 g Natrium versetzt. Nach vollständiger Reaktion des Natriums wurden 210 mg (3.18 mmol) Propandinitril zugegeben und die Reaktion 10 Minuten refluxiert. Es wurden 378 mg (3.02 mmol) Cyclohexylazid sowie 2.4 mL (45 mmol) Acetonitril zugegeben und weitere 15 Stunden refluxiert. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelb-orange Niederschlag wurde mit dest. Wasser gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Es wurde folgender Gradient benutzt: 0-6 min, 0%-50% MeCN; 6-8.5 min, 50%-100% MeCN; 8.5-9.5 min, 100% MeCN, 9.5-13.5 min, 100%-20%MeCN. Die Flussrate betrug 20 mL/Minute.

Charakterisierung

MS (ESI): $[M+H]^+$ 233.1.



$C_{11}H_{16}N_6$
 232.1 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ = 4.68-4.61 (m, 1H, CH_{Cy}), 2.43 (s, 3H, Me), 2.06-1.97 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{Cy}}$), 1.90-1.83 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Cy}}$), 1.75-1.68 (m, 1H, $\text{CH}_{2\text{Cy}}$), 1.54-1.43 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{Cy}}$), 1.34-1.26 (m, 1H, CH_{Cy}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ = 56.4 (CH_{Cy}), 31.9 ($\text{CH}_{2\text{Cy}}$), 25.7 (Me), 24.8 (CH_{Cy}) ppm.

6.7 Darstellungsversuche

2-Chlorethyl-(2,3,4,6-Tetra-O- β -methoxy-ethoxymethyl- α -D-galactopyranosid

16

Variante A 1.69 g (6.69 mmol) **9** wurden in 3.0 mL DMF (abs.) gelöst. Es wurden 870 mg (36 mmol) Natriumhydrid, gelöst in 3.6 mL (32 mmol) MEM-Cl zugetropft. Die Lösung wurde 66 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Rf (EE/Aceton 9:1): 0.31, 0.53

MS (ESI): $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 612.3, $[\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{ClO}_{12}+\text{NH}_4]^+$ 524.3.

Zur vollständigen Schützung wurde weiteres NaH zugegeben und 3 Stunden gerührt. Dies führte lediglich zur Substitution des Chlorides durch die 2-Hydroxygruppe.

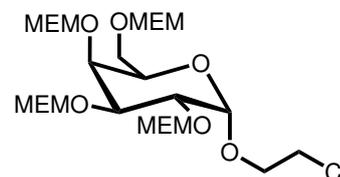
MS (ESI): $[\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$ 493.3.

Variante B Es wurden 252.4 mg (10.52 mmol) Natriumhydrid in 1.3 mL (11 mmol) MEM-Cl gelöst. 516.1 mg (2.127 mmol) **9**, suspendiert in 2.0 mL DME (abs.) wurden langsam zugetropft. Die Suspension wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer massenspektrometrischen Überprüfung, in der kein Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde zur Verbesserung Löslichkeit DMF zugegeben. Nach 3 Stunden wurde massenspektrometrisch das dreifach geschützte Chlorethylgalactosid nachgewiesen, weswegen erneut MEM-Cl zugegeben wurde.

Das erhaltene Gemisch wurde säulenchromatographisch gereinigt (EE/Aceton 9:1).

Charakterisierung

MS (ESI): $[M+NH_4]^+$ 612.0,
 $[C_{20}H_{39}ClO_{12}+Na]^+$ 529.2.



$C_{24}H_{47}ClO_{14}$
 595.1 g/mol

^{13}C -NMR (100 MHz, Aceton- d_6) δ = 99.8 (C1), 96.9 (CMEM), 96.1 (CMEM), 93.7 (O-CH₂-OCMEM), 76.2 (C5), 75.6 (C2), 74.9 (C4), 74.3 (C3), 69.2 (C6), 67.7 (C1'), 58.8 (CH₃ CMEM), 44.0 (C2') ppm.

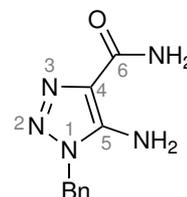
Die Signale des 1H -NMR-Spektrums konnten nicht zufriedenstellend zugeordnet werden.

9-Benzyl-[8]-azapurin-6-on 95

95 wurde nach Dornow [141] dargestellt. Allerdings zeigte die massenspektrometrische Analyse, dass der zweite Ringschluss mit Ethylformiat nicht erfolgte.

Charakterisierung

MS (ESI): 218, 433, 458, 721.



$C_{10}H_{11}N_5O$
 217.1 g/mol

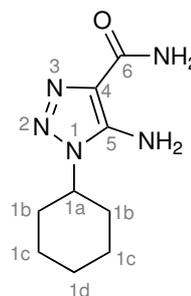
9-Cyclohexyl-[8]-azapurin-6-on 96

10.0 mL abs. Ethanol wurden mit 0.15 g Natrium versetzt. Nach vollständiger Reaktion des Natriums wurden 267 mg (3.18 mmol) Cyanoacetamid sowie 373 mg (me2.98) Cyclohexylazid zugegeben und die Reaktion eine Stunde refluxiert. Es wurden 1.2 mL (15 mmol) Ethylformiat zugegeben und weitere 16.5 h refluxiert. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der farblose Niederschlag wurde in dest. Wasser gelöst und mit 10 %-iger Essigsäure wurde ein pH-Wert von 4 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und mit wenig Wasser gewaschen. Der Niederschlag wurde lyophilisiert.

Sowohl massenspektrometrisch, als auch NMR-spektroskopisch konnte nur der erste Ringschluss bestätigt werden.

Charakterisierung

MS (ESI): 210, 419, 441.



$C_9H_{15}N_5O$
209.1 g/mol

1H -NMR (700 MHz, DMSO) δ = 4.19-4.12 (m, 1H, H-1a), 1.95-1.88 (m, 2H, H_{Cy}), 1.85-1.80 (m, 2H, H_{Cy}), 1.80-1.72 (m, 2H, H_{Cy}), 1.69-1.64 (m, 1H, H_{Cy}), 1.42-1.34 (m, 2H, H_{Cy}), 1.27-1.19 (m, 1H, H_{Cy}) ppm.

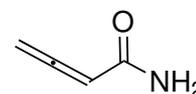
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 164.5 (C6), 143.8 (C5), 121.6 (C4), 54.6 (C1a), 31.6 (C1b), 24.9 (C1c), 24.7 (C1d) ppm.

3-Butinamid 50

1.0 mL (1.1 mg) Methylbut-3-inoat (11 mmol) wurden in 25 mL wässr. Ammoniak (33 %) bei 0 °C gelöst und für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde mit Ethylacetat 3 mal extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein farbloser Feststoff (478 mg, 5.76 mmol) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 51 %.

Charakterisierung

1H -NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 5.65 (1 H, dt, $^4J_{H_2,H_4}$ = 6.7 Hz, $^4J_{H_2,NH}$ = 1.1 Hz, H2), 5.25 (2 H, d, $^4J_{H_2,H_4}$ = 6.7 Hz, H4) ppm. ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 212.6 (=C=), 166.9 (C=O), 90.3 (C2), 80.3 (C4) ppm.



C_3H_5NO
83.1 g/mol

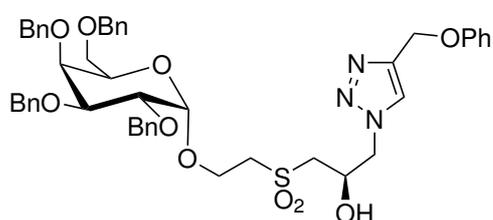
Anstatt der Verseifung des Amides allein fand zusätzlich die Umlagerung der Dreifachbindung zum Allen statt.

1-(2-hydroxypropylsulfonyl)-ethyl 2,3,4,6-tetra-O-benzyl α -D-galactopyranosyl)-4-phenoxyethyl-1H-1,2,3-triazol
48

14 (etwa 1 mg) wurde in Butanol/Wasser 1:1 gelöst und 1 μ L Phenylpropargylether wurde hinzugegeben. Nach der Zugabe von Kupferchlorid (katalytisch) wurde die Reaktion für 1 Stunde gerührt und mittels ESI-MS auf den Reaktionserfolg überprüft. Eine Isolierung und Reinigung des Produktes schlug fehl.

Charakterisierung

MS (ESI): $[M+H]^+$ 864.2.



$C_{48}H_{53}N_3O_{10}S$
864 g/mol

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		066-225-319-336	210-233-305/351-338
Acetonitril		225-332-302-312-319	210-240-302+352-305+351+338-403+233
Acetylchlorid		014-225-314	210-233-240-241-242-243-260-264-280-301/330/331/303
Acrylamid		301-312-332-315-317-319-340-350-361f-372	201-280-302+352-304+340-305+351+338-308+310
Aluminiumchlorid		314	260-280-301+330+331-305+351+338-309-310
Ameisensäure		226-302-314-331	210-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338-403+233
2-Aminopyridin		301+311-315-319-335	261-280-301+310-305+351+338-312
3-Aminopyridin		301-311-315-319-331-335-373	261-280-301+310-305+351+338-311
2-Amino-4-methylpyridin		301+311+331-373	261-280-301+310-311

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Ammoniak		071-221-280- 331-314-400	210-260-280- 273-304+340- 303+361+353- 305+351+338- 315-377-381-405- 403
Ammoniumper- sulfat		272-302-315- 317-319-334- 335	280-302+352- 304+341- 305+351+338- 342+311
Benzylazid		203-204	210-230-240-250- 280-370+380-372- 373-401-501
Benzylbromid		301-315-319- 335	261-305/351/338
BisTris		315-319-335	261-305+351+338
Bromwasser- stoff in Eisessig		314-335	261-280- 305+351+338
2-Butinsäu- remethyle- ster		226-315-319- 335	261-305+351+338
Camphersul- fonsäure		314	280- 305+351+338-310
Chloroform		351-302-373- 315	302-352-314
m-Chlorper- benzoesäure		242-302-314	301+330+331- 280- 305+351+338- 301+31
2-Chloretha- nol		226- 300+310+330	210-280-302+352- 304+340-309+310
Cyanacetamid		302-315-319- 335	261-305+351+338

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Dichlormethan		351	281
Diethyl ether		019-066,224-302-336	210-233-240-241-242-243-264-280-301/312-303/361/353-330-370/378-403/235
N,N-Dimethylformamid		312-319-332-360D	201-202-261-264-280-281-302/352-304/340-305/351/338-308/313-312-322-337/313-363-405
Diisopropyl-ethylamin		225-301-314-412	210-233-240-273-280-301+330+331-305+351+338-309+310-403+235
Diphosgen		330-314	280-303+361+353-304+340-305+351+338-310
EDTA		319	305+351+338
EDC		314	280-305+351+338-310
Epichlorhydrin		226-301+311+331-314-317-350	201-261-280-301+310-305+351+338-310
Essigsäure		226-314	280-301/330/331-309/310-305/351/338
Essigsäure-anhydrid		226-302-331-314-335	210-260-280-303+361+353-305+351+338-312

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Ethanol		225	210
Ethylacetat	 	066-225-319-336	210-233-240-305+351+338-403+235
Ethylformiat	 	225-332-302-319-335	
Gentamicin		317-334	261-280-342+311
Imidazol	  	302-314-360D	201-280-305+351+338-310
Isopropanol	 	225-319-336	210-233-240-305+351+338-403+235
Kaliumcarbonat		315-319-335	302+352-305+351+338
Kalium- <i>tert</i> -butanolat	  	228-252-302-314	210-223-280-301+330+331-305+351+338-309+310-370+378-402+404
Kanamycin		360	201-308+313
Malodinitril	 	331-311-301-410	261-273-280-301+310-311-501
Manganchlorid	 	301-411	273-309+310
MEM-chlorid	  	226-302-315-319-335-350-361	201-261-280-305+351+338-308+313
Methanol	  	225	210-233-240-241-242-243-280-303/361/353-370/378-403/235

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Natrium		014-260-314	280- 301+330+331- 305+351+338- 309-310-370+378- 422
Natriumazid		032-300-310- 373-410	273-280- 301+310+330- 302+352-310-391- 501
Natriumcarbonat		319	260-305+351+338
Natriumcyanoborhydrid		032-260-300- 310-330-314- 410	273-280- 301+330+331- 302+352- 304+340- 305+351+338- 402+404
Natriumhydrid		226	223-231/232- 335/334-370/378- 402/404
Natriumhydroxid		314-290	280-301/330/331- 309/310- 305/351/338
Natriumiodid		400	273
Natriumperiodat		271-314-372- 400	210-221-273-280- 301+330+331- 305+351+338- 371+380+375- 308+310
4-Nitrobenzoylchlorid		314	280-301/330/331- 305/351/338- 309/310
2-Nitrobenzylbromid		314	280- 305+351+338-310

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Oxalylbromid		014-032-314-332	280-305+351+338-310
Petrolether		225-304-315-336-361-373-411	210-233-240-241-242-243-264-273-280-301/330-302/352-303/361/353-321/331-370/378-391-403/235-405
Phosphorpen- tachlorid		014-029-330-302-373-314	260-280-284-305+351+338-310
Pyridin		225-302-312-332	210
Pyrrolidin		225-302-314-332	210-280-305+351+338-310
Salpetersäure		272-314-290	260-280-301/330/331-309/310-305/351/338
Salzsäure		314-335	261-280-305 + 351 + 338-310
Schwefelsäure		314-290	280-301/330/331-309/310-305/351/338
Silber-I-oxid		272-315-319-335	220-261-305+351+338
Streptomycin		302-361	201-280-302+352
Sulfurylchlorid		014-314-335	261-280-305+351+338-310
TEMED		225-332-302-314	210-280-305+351+338-310

... Fortsetzung auf der nächsten Seite

7 Gefahrstoffverzeichnis

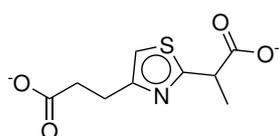
Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Tetrabutylammoniumiodid		302-315-319-335	261-264-280-301/312-302/352-304/340-305/351/338-312-321-332/313-337/313-362-403/233-405
Tetrabrommethan		302-315-318-335	261-280-305+351+338
Thioessigsäure		225-301-314	210-280-301+310-305+351+338-310
TMS		224	210
Toluol		225-304-315-336-361d-373	210-261-281-301 + 310-331
Tosylchlorid		315-318	280-305+351+338
Triethylamin		225-302-312-314-332	210-280-305 + 351 + 338-310
Triphenylphosphin		302-317-319-411	273-280-305+351+338
Triton X-100		315-319-335	261-305+351+338
Wasserstoff		220	210
Wasserstoffperoxid		271-332-302-314	
Zeocin		302	

Appendix

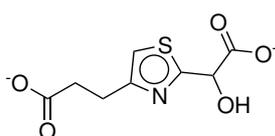
1 docking an GTB (2RJ7)

Es sollte in einem *in-silico screening* nach geeignetem Ersatz für das Pyrophosphat aus UDP-Gal gesucht werden. Es wurde auf das Web-basierte *docking* Programm *dock blaster* zurückgegriffen.[83] In diesem wurde die Struktur 2RJ7 der PDB verwendet.[31]

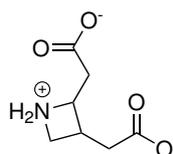
Als Ligand-Datenbank wurde ein Teil der *Zinc*-Datenbank verwendet.[84] Hier wurde der Datensatz *fragments* ausgewählt. Die besten 100 Treffer des *dockings* sind hier zusammen mit den Bindungsenergien dargestellt.



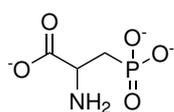
-110.72 kcal/mol



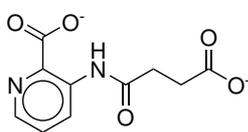
-108.18 kcal/mol



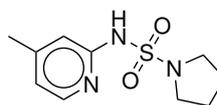
-107.30 kcal/mol



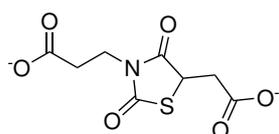
-106.26 kcal/mol



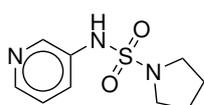
-106.00 kcal/mol



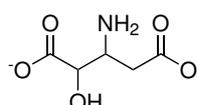
-105.83 kcal/mol



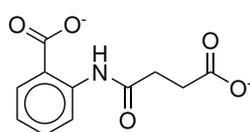
-105.75 kcal/mol



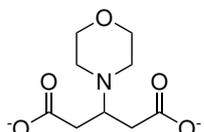
-105.67 kcal/mol



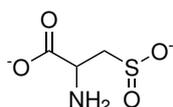
-105.18 kcal/mol



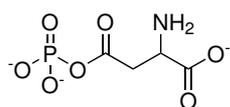
-104.26 kcal/mol



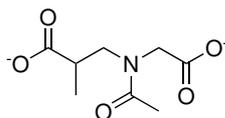
-104.18 kcal/mol



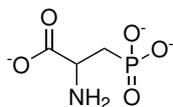
-103.91 kcal/mol



-103.62 kcal/mol

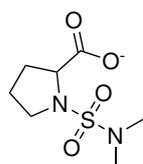


-103.49 kcal/mol

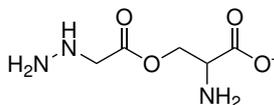


-103.36 kcal/mol

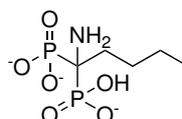
Appendix



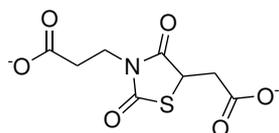
-103.29 kcal/mol



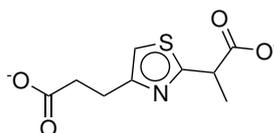
-102.71 kcal/mol



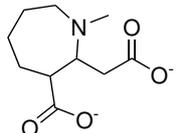
-102.70 kcal/mol



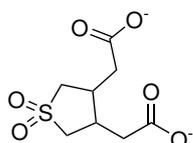
-102.56 kcal/mol



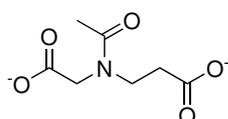
-102.54 kcal/mol



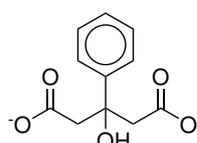
-102.27 kcal/mol



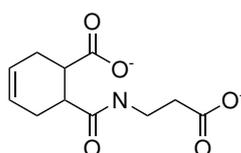
-102.25 kcal/mol



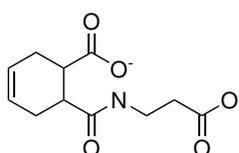
-102.05 kcal/mol



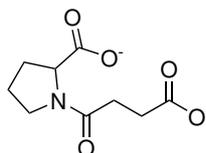
-101.90 kcal/mol



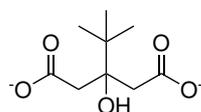
-101.16 kcal/mol



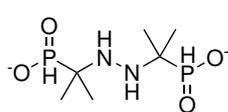
-101.15 kcal/mol



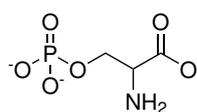
-100.71 kcal/mol



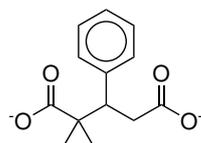
-100.65 kcal/mol



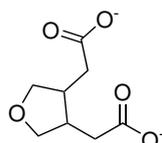
-100.32 kcal/mol



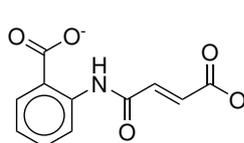
-100.12 kcal/mol



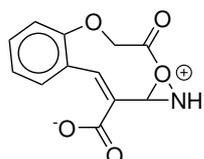
-100.00 kcal/mol



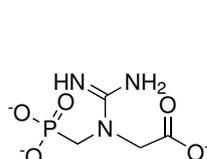
-99.94 kcal/mol



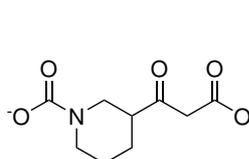
-99.77 kcal/mol



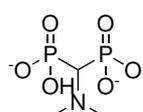
-99.76 kcal/mol



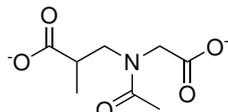
-99.68 kcal/mol



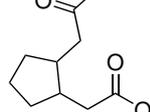
-99.66 kcal/mol



-99.60 kcal/mol

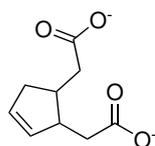


-99.58 kcal/mol

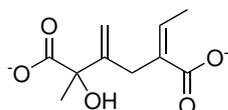


-99.27 kcal/mol

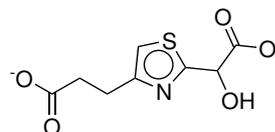
Appendix



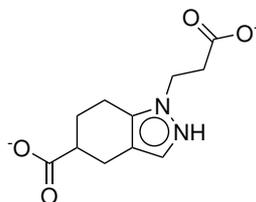
-99.20 kcal/mol



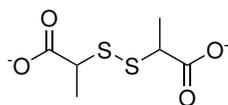
-99.11 kcal/mol



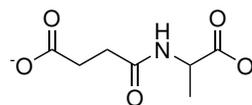
-99.02 kcal/mol



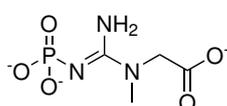
-98.95 kcal/mol



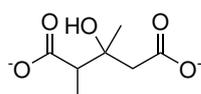
-98.84 kcal/mol



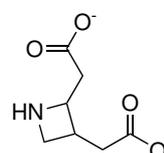
-98.81 kcal/mol



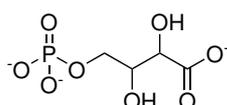
-98.43 kcal/mol



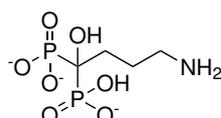
-98.33 kcal/mol



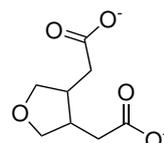
-98.31 kcal/mol



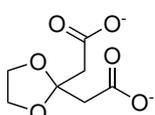
-98.27 kcal/mol



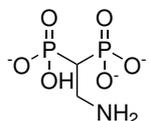
-98.22 kcal/mol



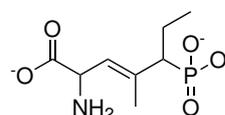
-98.22 kcal/mol



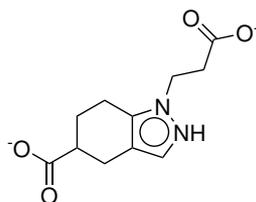
-98.21 kcal/mol



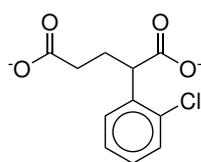
-98.13 kcal/mol



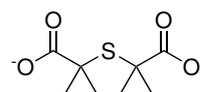
-98.10 kcal/mol



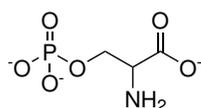
-98.05 kcal/mol



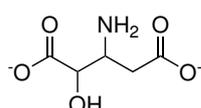
-97.98 kcal/mol



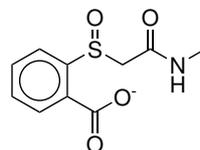
-97.98 kcal/mol



-97.92 kcal/mol

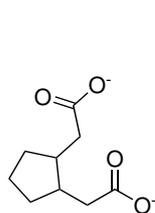


-97.73 kcal/mol

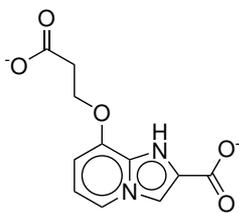


-97.68 kcal/mol

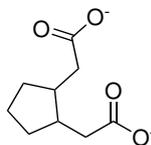
Appendix



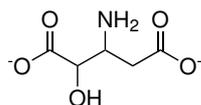
-97.58 kcal/mol



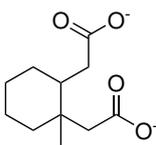
-97.54 kcal/mol



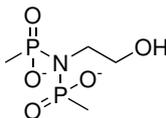
-97.37 kcal/mol



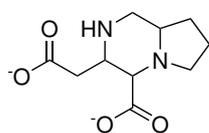
-97.30 kcal/mol



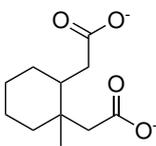
-97.28 kcal/mol



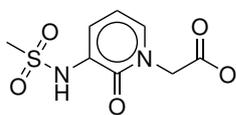
-97.26 kcal/mol



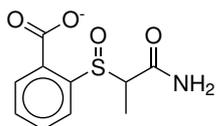
-97.18 kcal/mol



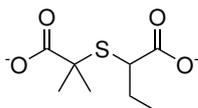
-97.13 kcal/mol



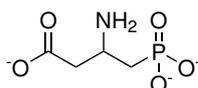
-97.13 kcal/mol



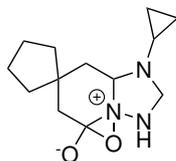
-97.06 kcal/mol



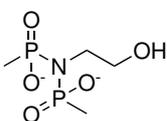
-96.99 kcal/mol



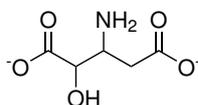
-96.98 kcal/mol



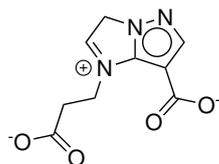
-96.84 kcal/mol



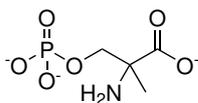
-96.76 kcal/mol



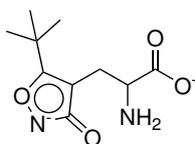
-96.73 kcal/mol



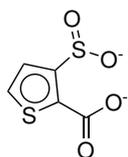
-96.68 kcal/mol



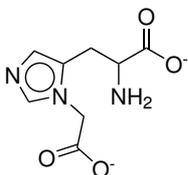
-96.65 kcal/mol



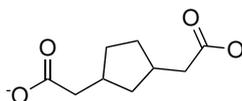
-96.63 kcal/mol



-96.59 kcal/mol

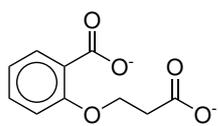


-96.52 kcal/mol

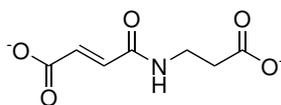


-96.49 kcal/mol

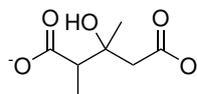
Appendix



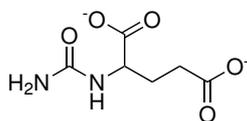
-96.38 kcal/mol



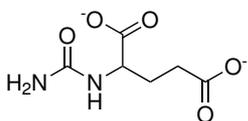
-96.31 kcal/mol



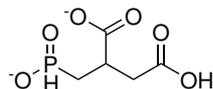
-96.27 kcal/mol



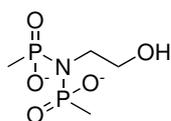
-96.26 kcal/mol



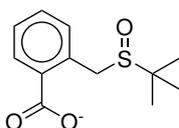
-96.08 kcal/mol



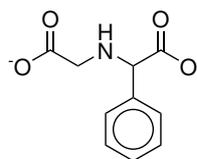
-96.03 kcal/mol



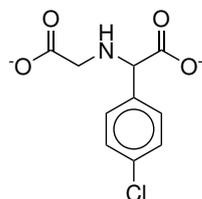
-95.95 kcal/mol



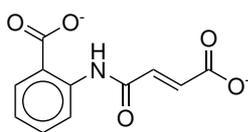
-95.93 kcal/mol



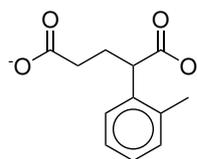
-95.91 kcal/mol



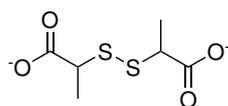
-95.90 kcal/mol



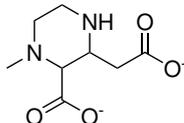
-95.88 kcal/mol



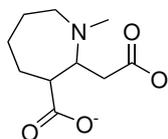
-95.76 kcal/mol



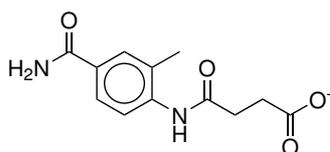
-95.76 kcal/mol



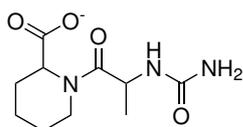
-95.72 kcal/mol



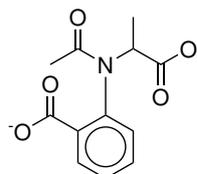
-95.62 kcal/mol



-95.60 kcal/mol

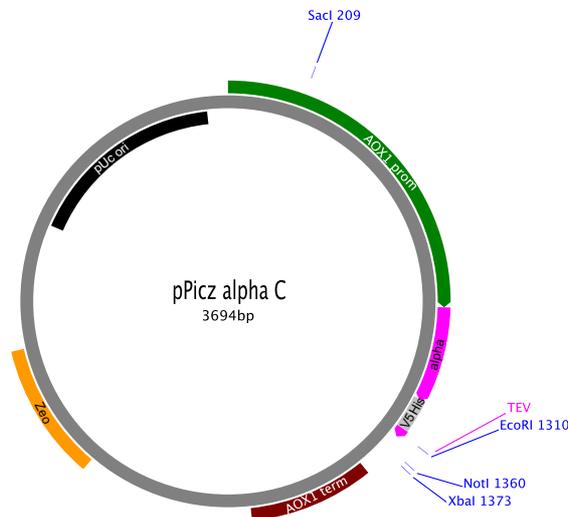


-95.54 kcal/mol



-95.45 kcal/mol

2 Expressionsvektor



3 Sequenzen

	Forward
Fut 3 EcoRI/SacII NotI	GATC GAATTC CCGCGG CCTAGGGCTCCCAGTGGG
Fut 5 EcoRI NotI	GATC GAATTC CAGGACAGCATGGCGACCCC
Fut 7 EcoRI XbaI	GATC GAATTC TCAGCCCCTCGGGGTACCCC
Fut 9 SacII NotI	GATC CCGCGG AACCTACCAACAGCTGGATC
	Reverse
Fut 3 EcoRI/SacII NotI	GATC GCGGCCGC TCAGGTGAACCAAGCCGCTATG
Fut 5 EcoRI NotI	GATC GCGGCCGC AGTCCACTTCGTTTCGGCGATA
Fut 7 EcoRI XbaI	GATC TCTAGA TCAGGCCTGAAACCAACCCTC
Fut 9 SacII NotI	GATC GCGGCCGC AATTAAGGTTTTGGTAAAGAG

Tabelle 2: Primer zur Amplifikation der Fucosyltransferasen aus cDNA. Der Fut3 forward Primer enthält die EcoRI Schnittstelle und zusätzlich eine SacII Schnittstelle, um die Fut9 klonieren zu können. Die forward Primer der Fut5 und Fut7 enthalten ausschließlich die EcoRI Schnittstelle während der Fut9 forward Primer die SacII Schnittstelle enthält. Die Reverse Primer enthalten entweder die NotI Schnittstelle (Fut3,5,9) oder XbaI (Fut7).

3.1 humane Fucosyltransferase III

TAATTATTCGAAACGATGAGATTTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATT 50
 . L F E T M R F P S I F T A V L F

CGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG 100
 A A S S A L A A P V N T T T E D

AAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAA 150
 E T A Q I P A E A V I G Y S D L E

GGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGG 200
 G D F D V A V L P F S N S T N N G

GTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAG 250
 L L F I N T T I A S I A A K E E

GGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCATCGATCCATCATCACCAT 300
 G V S L E K R E A E A S I H H H H

CACCATCACCATCACCATGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCT 350
 H H H H H H G K P I P N P L L G L

CGATTCTACGCGTACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGAATTCCTCGCGGC 400
 D S T R T E N L Y F Q G E F P R

CTAGGGCTCCAGTGGGTCCTCCCGACAGGACACCACTCCCACCCGCCCC 450
 P R A P S G S S R Q D T T P T R P

ACCCTCCTGATCCTGCTATGGACATGGCCTTTCCACATCCCTGTGGCTCT 500
 T L L I L L W T W P F H I P V A L

GTCCCGCTGTTTACAGAGATGGTGCCCGGCACAGCCGACTGCCACATCACTG 550
 S R C S E M V P G T A D C H I T

CCGACCGCAAGGTGTACCCACAGGCAGACACGGTTCATCGTGCACCACTGG 600
 A D R K V Y P Q A D T V I V H H W

Appendix

GATATCATGTCCAACCCTAAGTCACGCCTCCCACCTTCCCCGAGGCCGCA 650
D I M S N P K S R L P P S P R P Q

GGGGCAGCGCTGGATCTGTTCAACTTGGAGCCACCCCTAACTGCCAGC 700
G Q R W I W F N L E P P P N C Q

ACCTGGAAGCCCTGGACAGATACTTCAATCTCACCATGTCCTACCGCAGC 750
H L E A L D R Y F N L T M S Y R S

GACTCCGACATCTTCACGCCCTACGGCTGGCTGGAGCCGTGGTCCGGCCA 800
D S D I F T P Y G W L E P W S G Q

GCCTGCCCACCCACCGCTCAACCTCTCGGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCT 850
P A H P P L N L S A K T E L V A

GGGCGGTGTCCAACCTGGAAGCCGGACTCAGCCAGGGTGGCTACTACCAG 900
W A V S N W K P D S A R V R Y Y Q

AGCCTGCAGGCTCATCTCAAGGTGGACGTGTACGGACGCTCCCACAAGCC 950
S L Q A H L K V D V Y G R S H K P

CCTGCCCAAGGGGACCATGATGGAGACGCTGTCCCGGTACAAGTTCTACC 1000
L P K G T M M E T L S R Y K F Y

TGGCCTTCGAGAACTCCTTGCACCCCGACTACATCACCGAGAAGCTGTGG 1050
L A F E N S L H P D Y I T E K L W

AGGAACGCCCTGGAGGCCTGGGCCGTGCCCGTGGTGCTGGGCCCCAGCAG 1100
R N A L E A W A V P V V L G P S R

AAGCAACTACGAGAGGTTCTGCCACCCGACGCCTTCATCCACGTGGACG 1150
S N Y E R F L P P D A F I H V D

ACTTCCAGAGCCCCAAGGACCTGGCCCCGTACCTGCAGGAGCTGGACAAG 1200
D F Q S P K D L A R Y L Q E L D K

GACCACGCCCGCTACCTGAGCTACTTTGCTGGCGGGAGACGCTGCGGCC 1250
D H A R Y L S Y F R W R E T L R P

Appendix

TCGCTCCTTCAGCTGGGCACTGGATTTCTGCAAGGCCTGCTGGAAACTGC 1300
R S F S W A L D F C K A C W K L

AGCAGGAATCCAGGTACCAGACGGTGCGCAGCATAGCGGCTTGGTTCACC 1350
Q Q E S R Y Q T V R S I A A W F T

TGA 1353
.

3.2 humane Fucosyltransferase V

TAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATT 50
. L F E T M R F P S I F T A V L F

CGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG 100
A A S S A L A A P V N T T T E D

AAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAA 150
E T A Q I P A E A V I G Y S D L E

GGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGG 200
G D F D V A V L P F S N S T N N G

GTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAG 250
L L F I N T T I A S I A A K E E

GGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCATCGATCCATCATCACCAT 300
G V S L E K R E A E A S I H H H H

CACCATCACCATCACCATGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCT 350
H H H H H H G K P I P N P L L G L

CGATTCTACGCGTACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGAATTCAGGACA 400
D S T R T E N L Y F Q G E F Q D

GCATGGCGACCCCTGCCACCCACCCCTACTGATCCTGCTGTGGACGTGG 450
S M A T P A H P T L L I L L W T W

Appendix

CCTTTTAAACACACCCCGTGGCTCTGCCCCGCTGCTCAGAGATGGTGCCCGG 500
P F N T P V A L P R C S E M V P G

CGCGGCCGACTGCAACATCACTGCCGACTCCAGTGTGTACCCACAGGCAG 550
A A D C N I T A D S S V Y P Q A

ACGCGGTCATCGTGCACCACTGGGATATCATGTACAACCCCAAGTGCCAAC 600
D A V I V H H W D I M Y N P S A N

CTCCCGCCCCCACCAGGCCGCAGGGGCAGCGCTGGATCTGGTTCAGCAT 650
L P P P T R P Q G Q R W I W F S M

GGAGTCCCCCAGCAACTGCCGGCACCTGGAAGCCCTGGACGGATACTTCA 700
E S P S N C R H L E A L D G Y F

ATCTCACCATGTCCTACCGCAGCGACTCCGACATCTTCACGCCCTACGGC 750
N L T M S Y R S D S D I F T P Y G

TGGCTGGAGCCGTGGTCCGGCCAGCCTGCCCACCCACCGCTCAACCTCTC 800
W L E P W S G Q P A H P P L N L S

GGCCAAGACCGAGCTGGTGGCCTGGGCGGTGTCCAACCTGGAAGCCGGACT 850
A K T E L V A W A V S N W K P D

CGGCCAGGGTGCCTACTACCAGAGCCTGCAGGCTCATCTCAAGGTGGAC 900
S A R V R Y Y Q S L Q A H L K V D

GTGTACGGACGCTCCCACAAGCCCCTGCCCAAGGGGACCATGATGGAGAC 950
V Y G R S H K P L P K G T M M E T

GCTGTCCCGGTACAAGTTCTATCTGGCCTTCGAGAACTCCTTGCACCCCG 1000
L S R Y K F Y L A F E N S L H P

ACTACATCACCGAGAAGCTGTGGAGGAACGCCCTGGAGGCTGGGCCGTG 1050
D Y I T E K L W R N A L E A W A V

CCCGTGGTGCTGGGCCCCAGCAGAAGCAACTACGAGAGGTTCTGCCACC 1100
P V V L G P S R S N Y E R F L P P

Appendix

CGACGCCTTCATCCACGTGGACGACTTCCAGAGCCCCAAGGACCTGGCCC 1150
D A F I H V D D F Q S P K D L A

GGTACCTGCAGGAGCTGGACAAGGACCACGCCCGCTACCTGAGCTACTTT 1200
R Y L Q E L D K D H A R Y L S Y F

CACTGGCGGGAGACGCTGCGGCCTCGCTCCTTCAGCTGGGCACTGGCTTT 1250
H W R E T L R P R S F S W A L A F

CTGCAAGGCCTGCTGGAAGCTGCAGCAGGAATCTAGGTACCAGACGGTGC 1300
C K A C W K L Q Q E S R Y Q T V

GCGGCATAGCGGCTTGGTTACCTGA 1326
R G I A A W F T .

3.3 humane Fucosyltransferase IX

TAATTATTCGAAACGATGAGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATT 50
. L F E T M R F P S I F T A V L F

CGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATG 100
A A S S A L A A P V N T T T E D

AAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAA 150
E T A Q I P A E A V I G Y S D L E

GGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGG 200
G D F D V A V L P F S N S T N N G

GTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAG 250
L L F I N T T I A S I A A K E E

GGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCATCGATCCATCATCACCAT 300
G V S L E K R E A E A S I H H H H

CACCATCACCATCACCATGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCT 350
H H H H H H G K P I P N P L L G L

Appendix

CGATTCTACGCGTACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGAATTCCCGCGGA 400
D S T R T E N L Y F Q G E F P R

AACCTACCAACAGCTGGATCTTCAGTCCAATGGAATCAGCCAGCTCTGTG 450
K P T N S W I F S P M E S A S S V

CTGAAAATGAAAACTTCTTTTCCACCAAAACTGATTATTTTAATGAAAC 500
L K M K N F F S T K T D Y F N E T

TACTATTCTGGTGTGGGTGTGGCCATTTGGGCAGACCTTTGACCTTACAT 550
T I L V W V W P F G Q T F D L T

CCTGCCAAGCAATGTTCAACATCCAAGGATGCCATCTCACAACGGACCGT 600
S C Q A M F N I Q G C H L T T D R

TCACTGTACAACAAATCCCATGCAGTTCTGATCCATCACCGAGACATCAG 650
S L Y N K S H A V L I H H R D I S

TTGGGATCTGACAAATTTACCTCAGCAAGCTAGGCCACCCTTCCAGAAAT 700
W D L T N L P Q Q A R P P F Q K

GGATTTGGATGAATTTGGAATCACCAACTCACACTCCCCAAAAGAGTGGC 750
W I W M N L E S P T H T P Q K S G

ATTGAGCACTTGTTTAACTGACTCTGACTTACCGCCGTGATTCAGATAT 800
I E H L F N L T L T Y R R D S D I

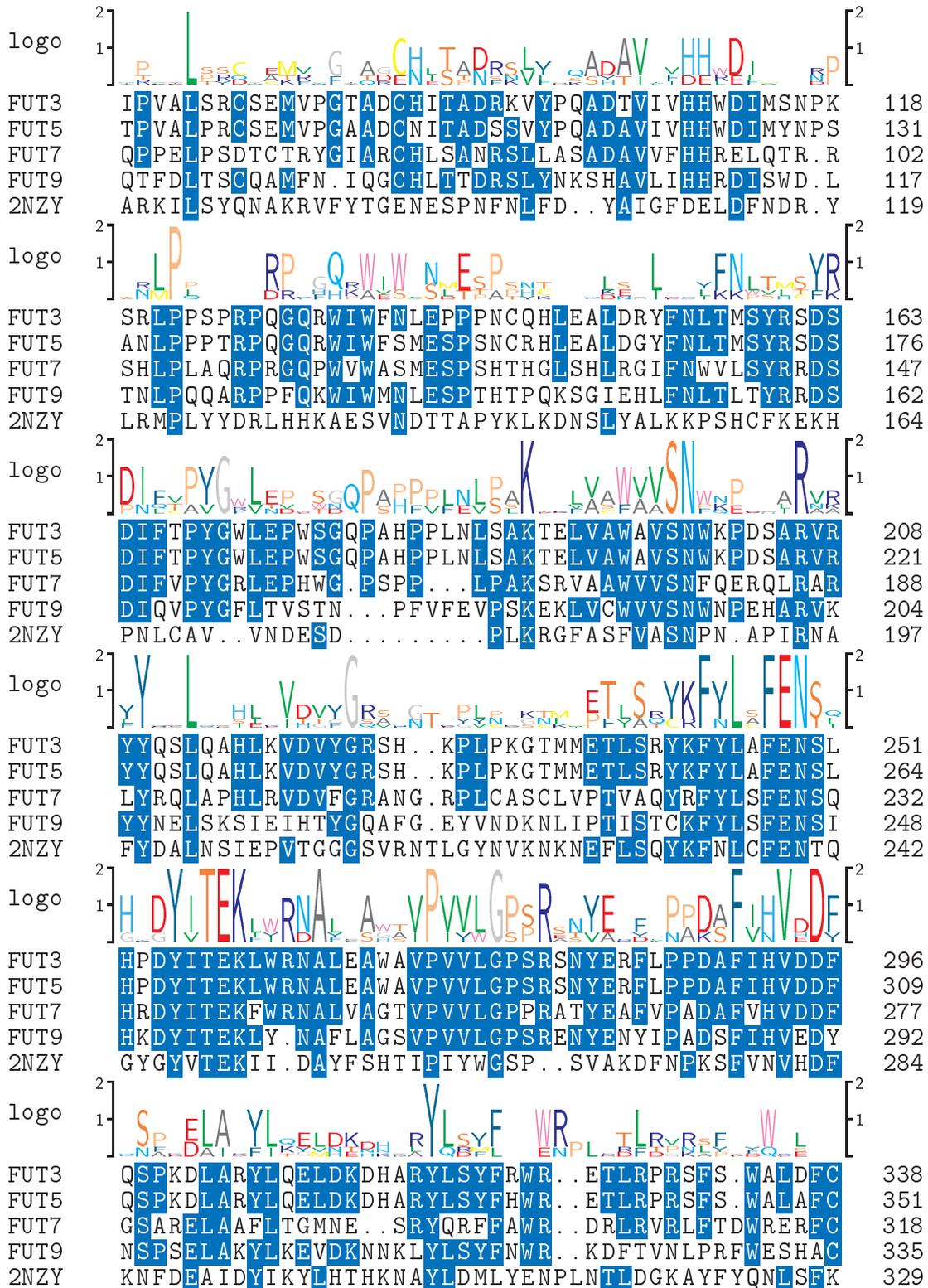
CCAAGTGCCTTATGGCTTCTTGACGGTAAGCACAAATCCCTTCGTGTTTG 850
Q V P Y G F L T V S T N P F V F

AAGTGCCAAGCAAAGAGAAATTTGGTGTGCTGGGTTGTGAGTAACTGGAAC 900
E V P S K E K L V C W V V S N W N

CCTGAGCATGCCAGAGTCAAGTATTACAATGAGCTAAGCAAAAGCATTGA 950
P E H A R V K Y Y N E L S K S I E

AATCCATACCTACGGGCAAGCATTGAGAGAATATGTCAATGATAAAAATT 1000
I H T Y G Q A F G E Y V N D K N

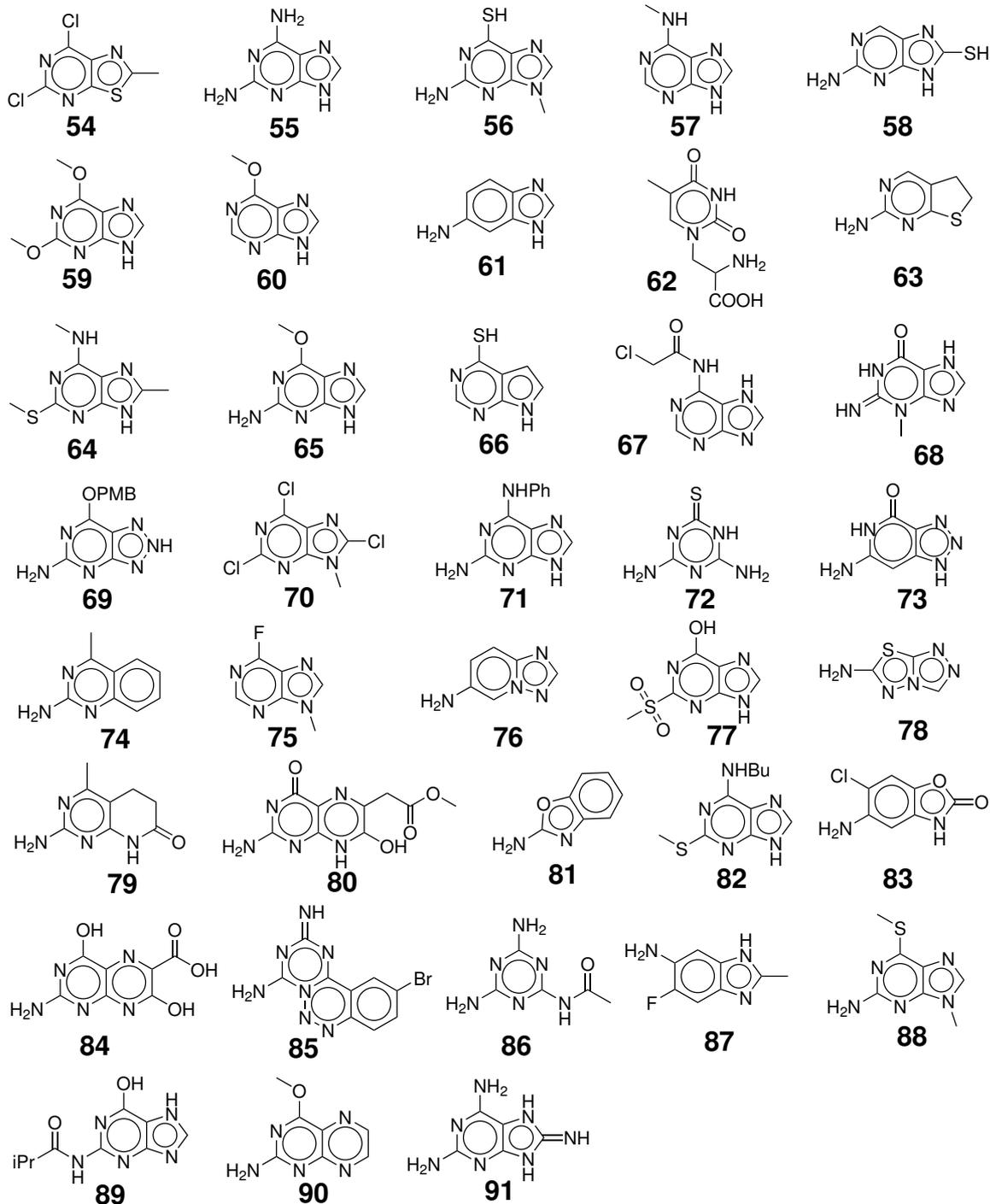
Appendix



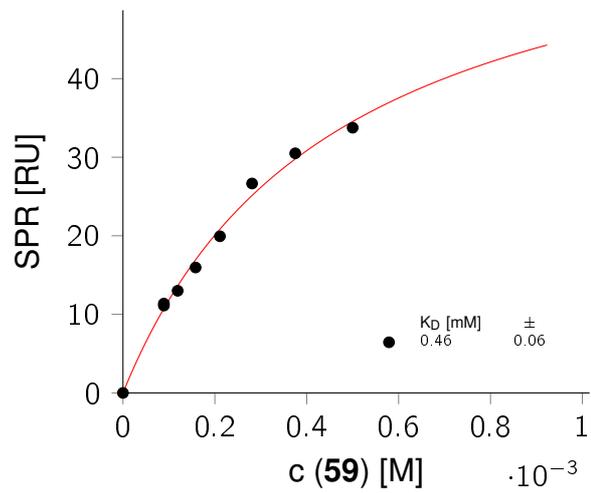
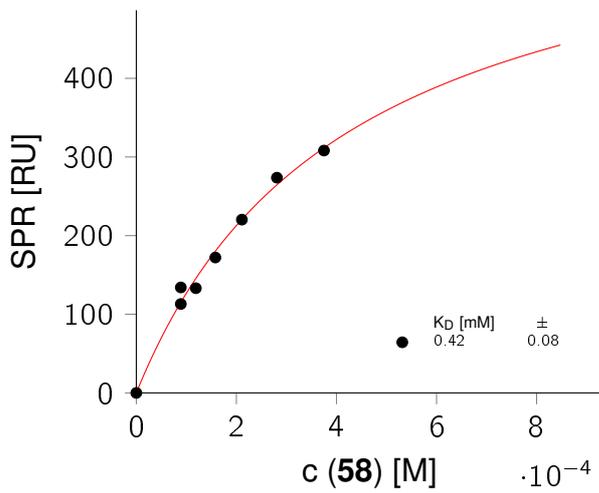
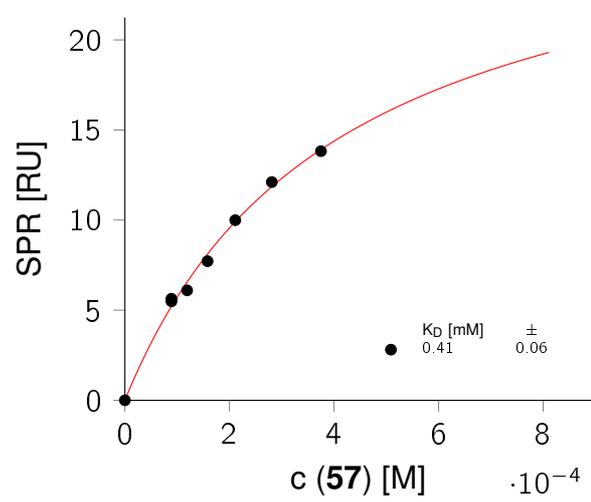
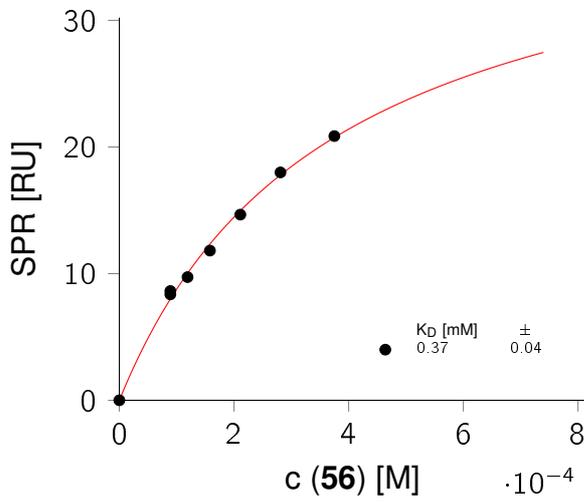
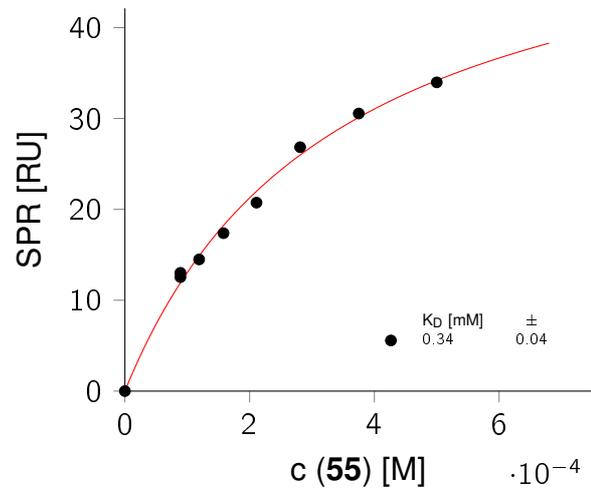
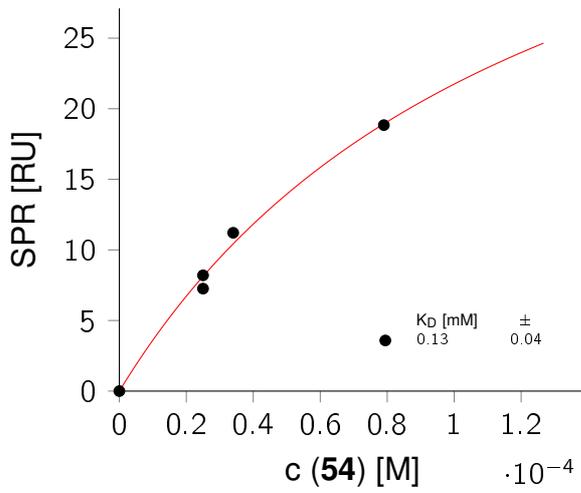
Appendix



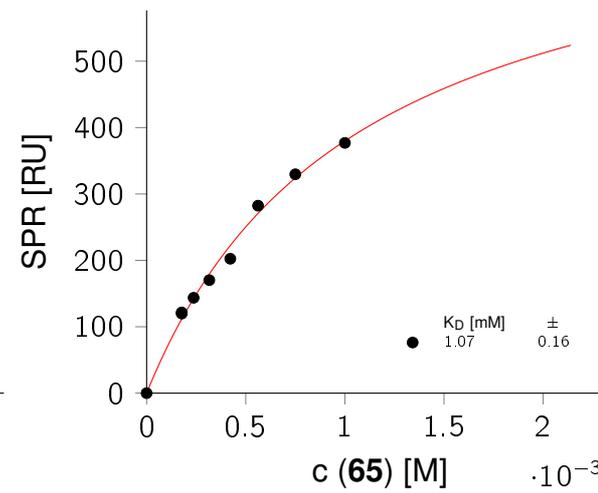
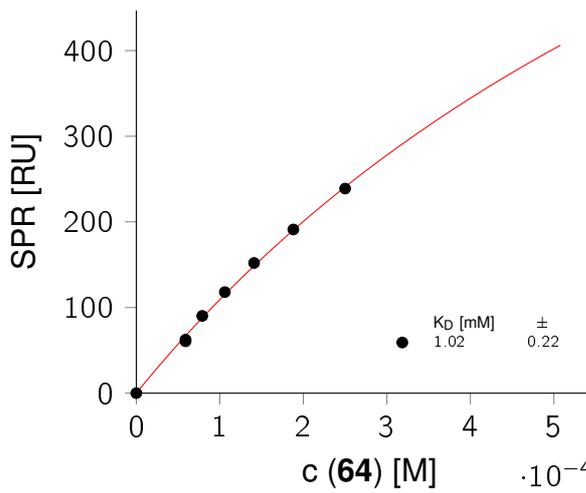
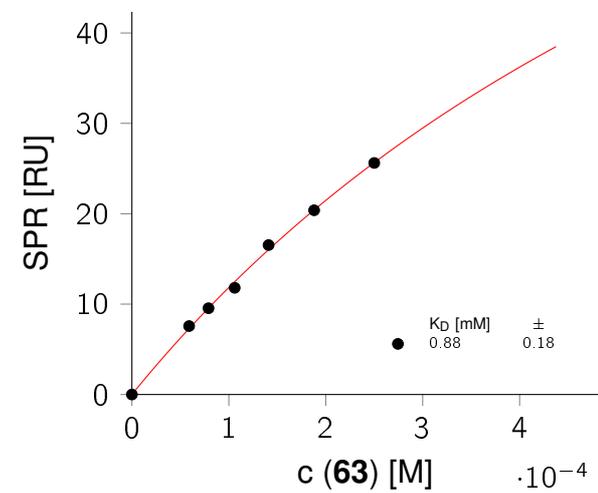
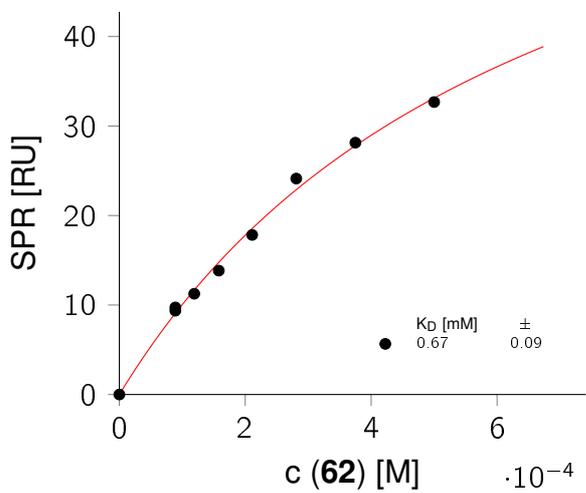
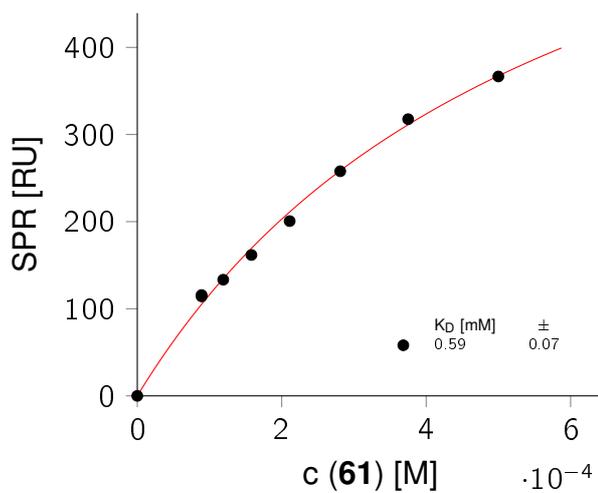
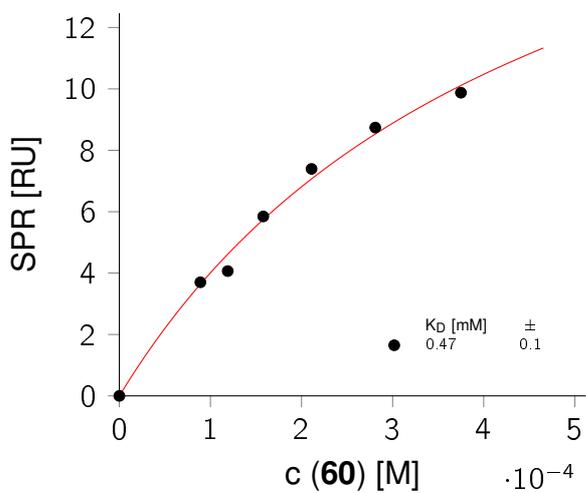
4 SPR-Bindungskurven an Fut5



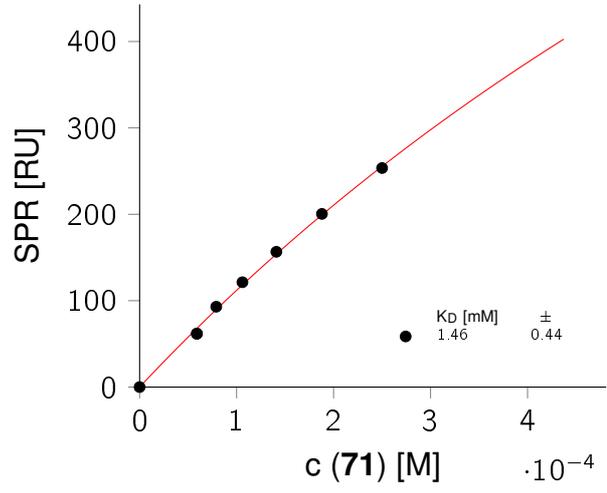
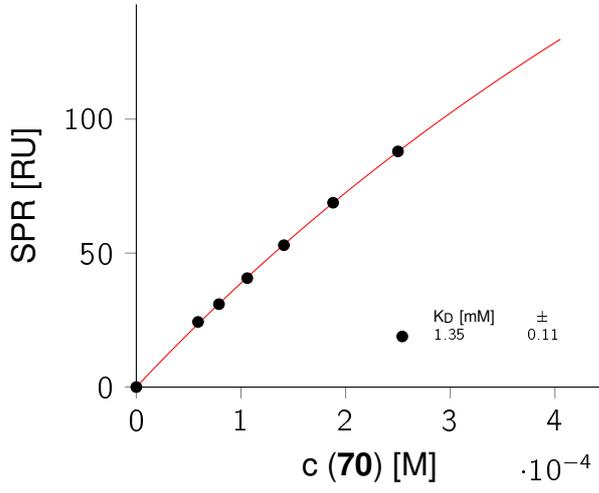
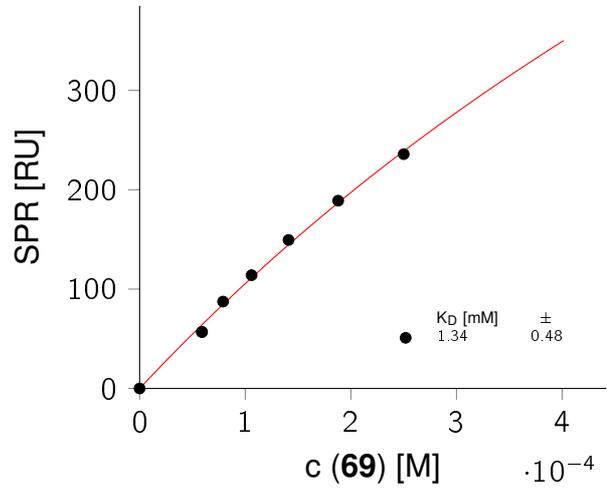
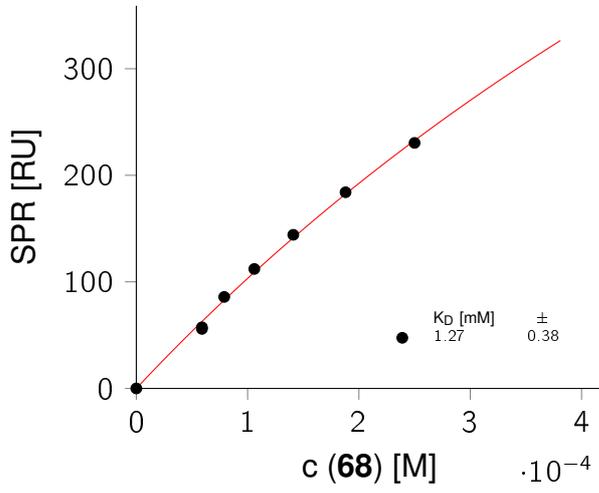
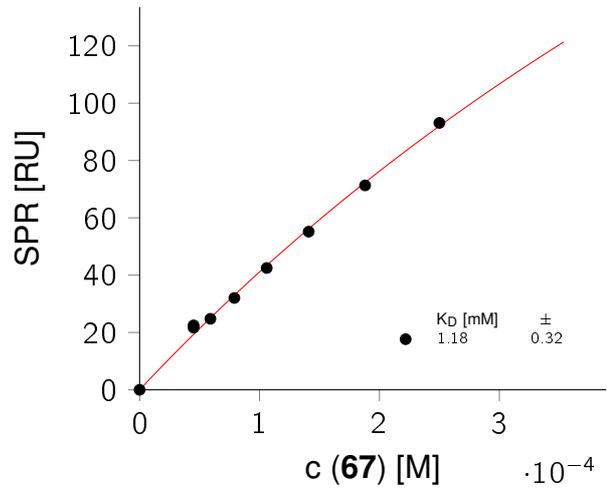
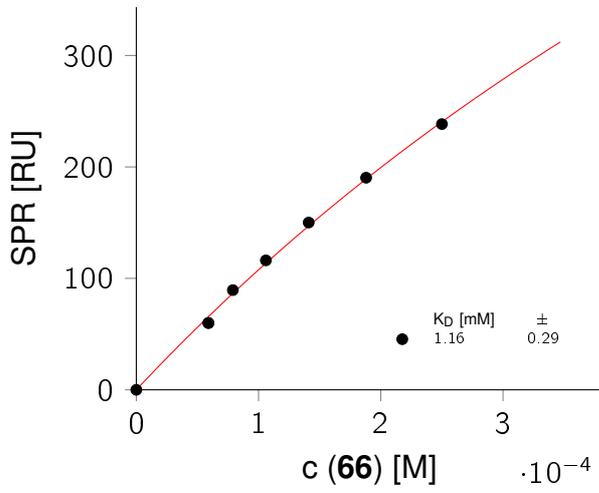
Appendix



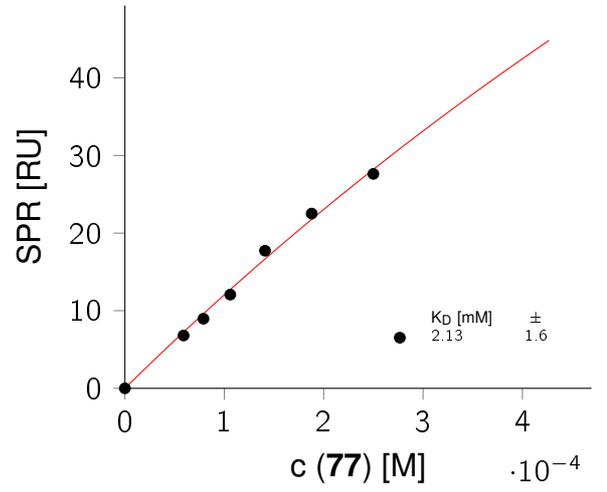
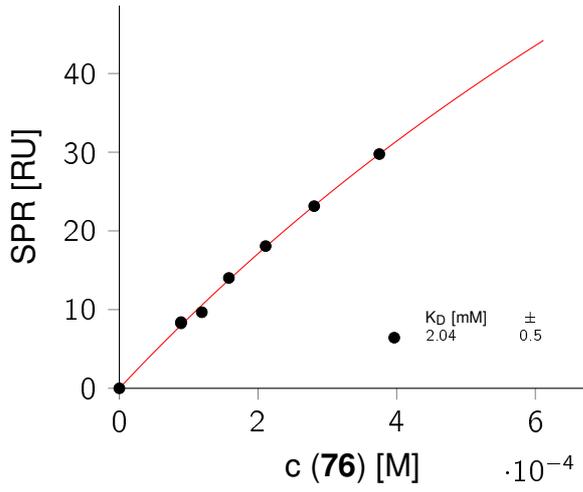
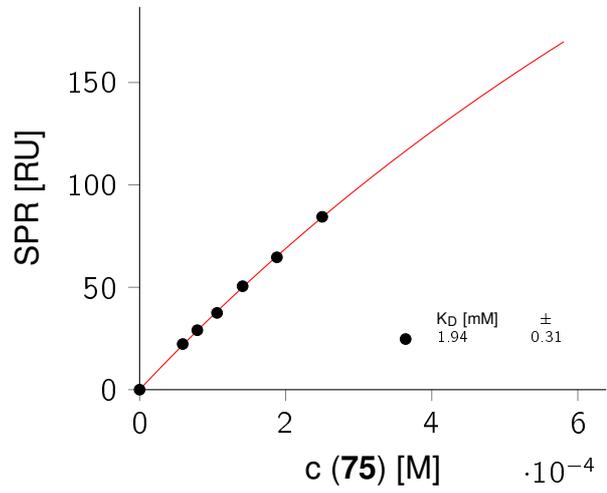
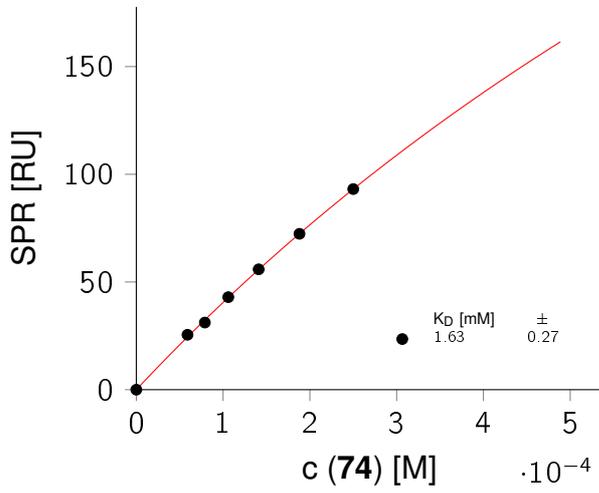
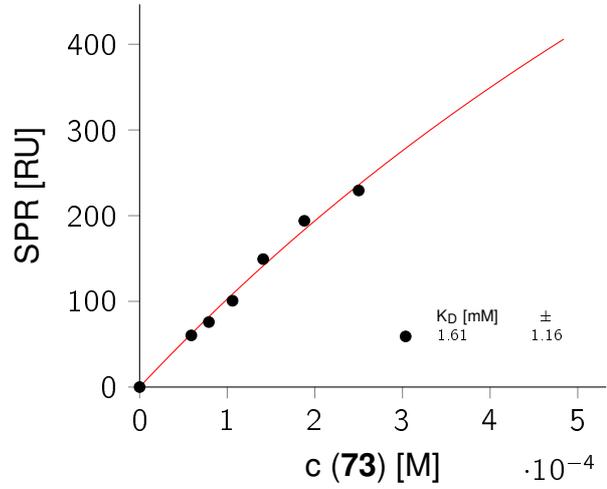
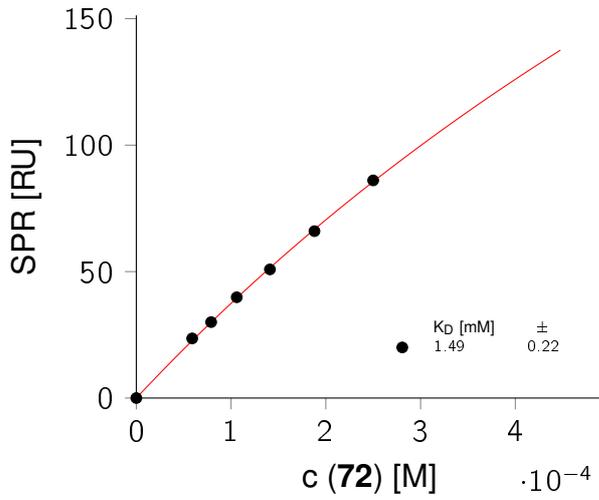
Appendix



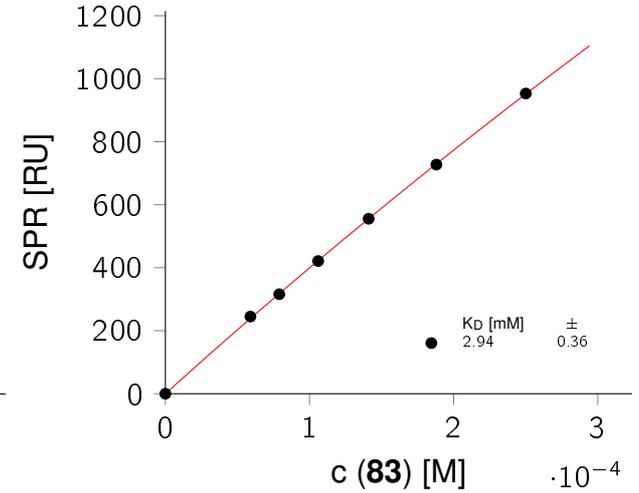
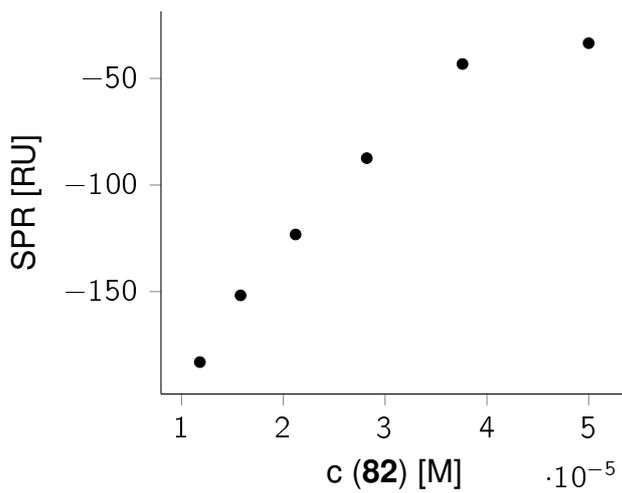
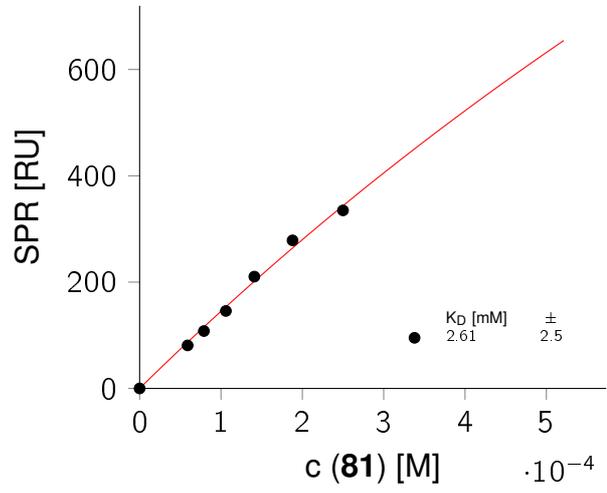
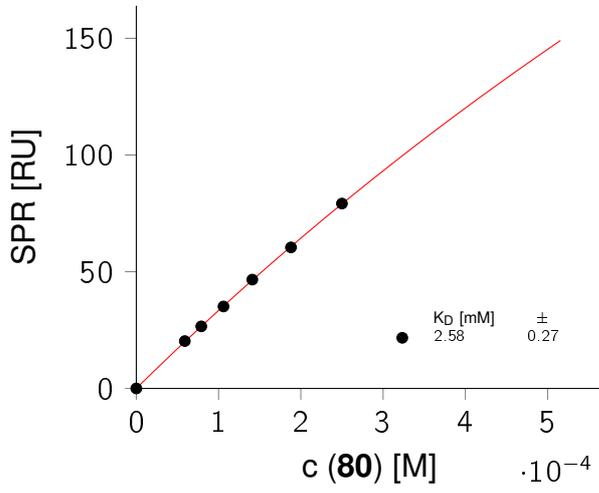
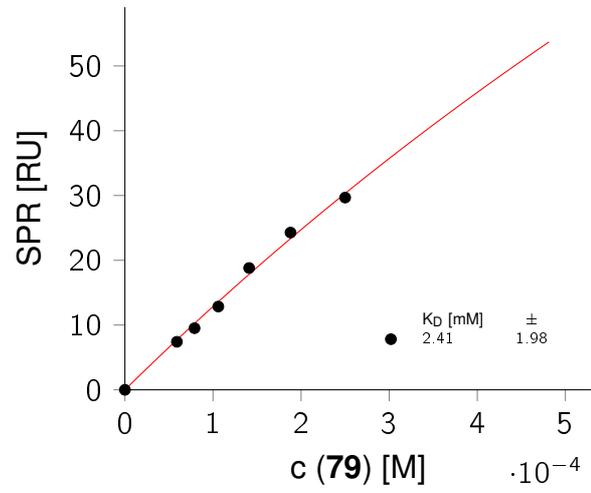
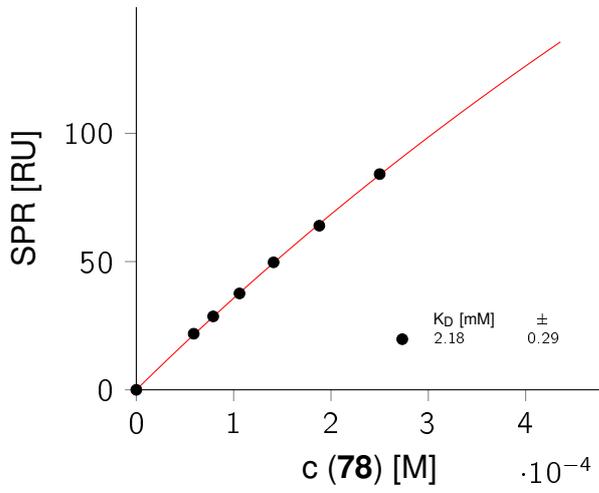
Appendix



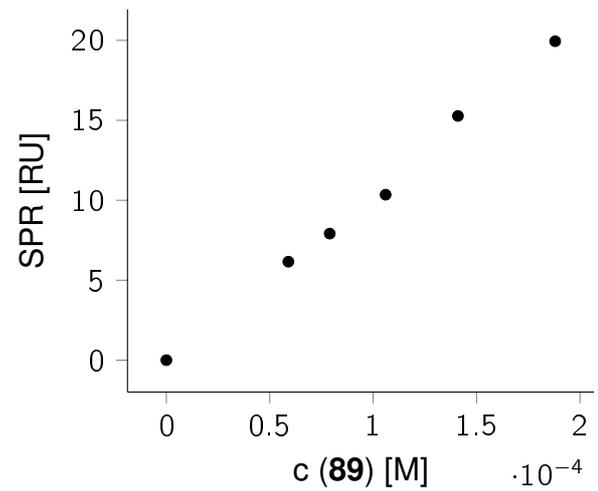
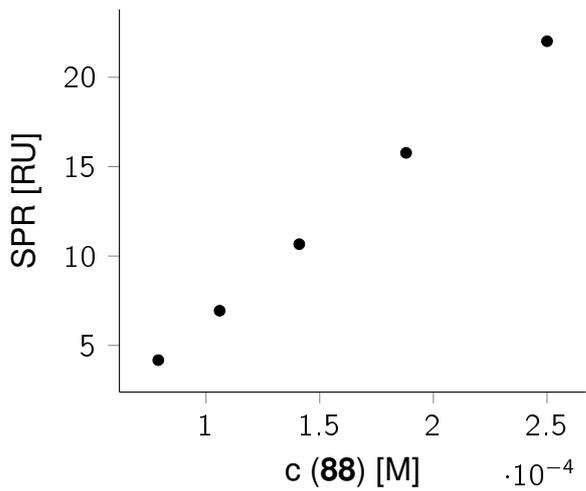
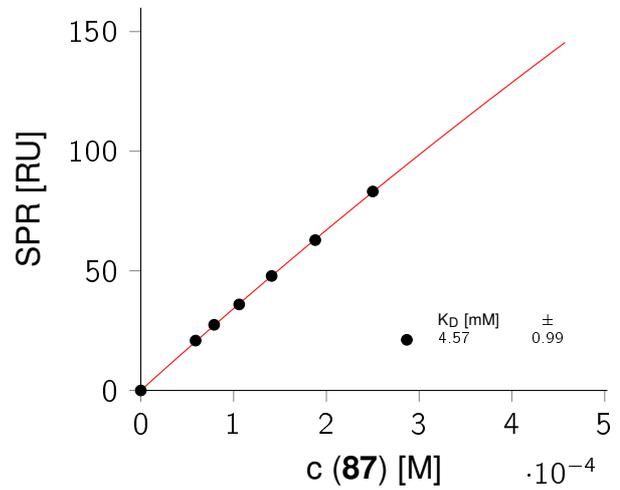
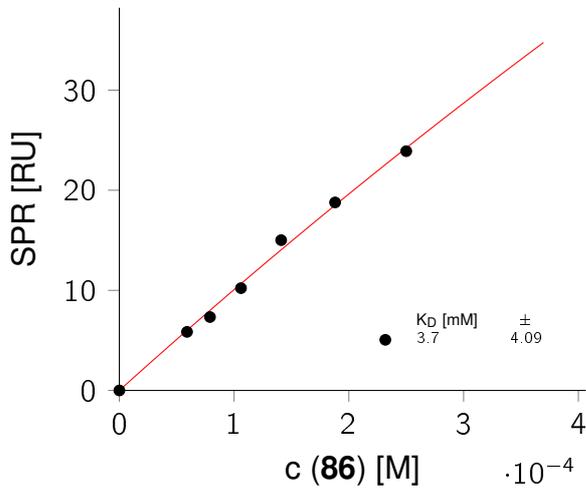
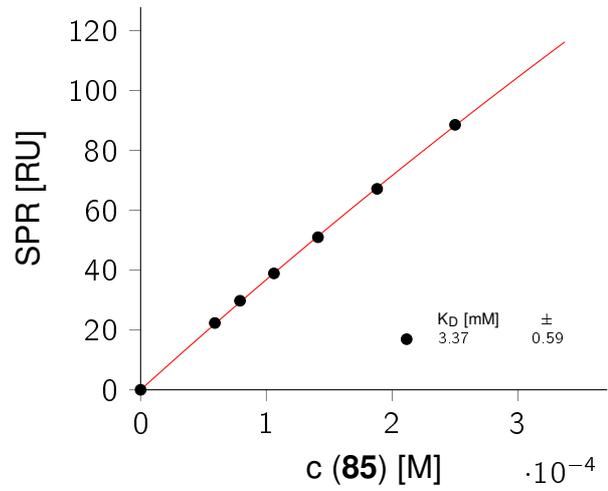
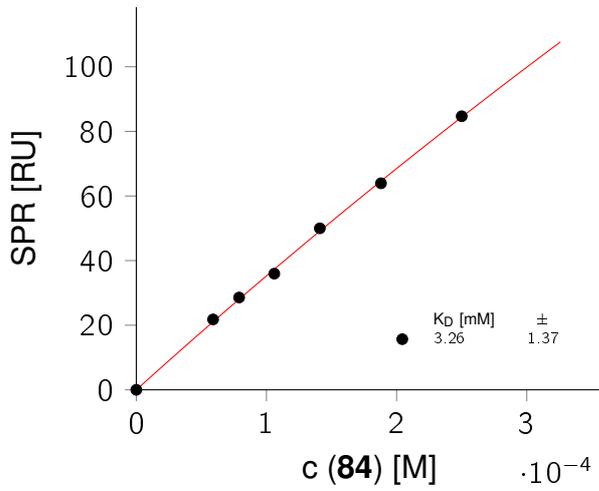
Appendix



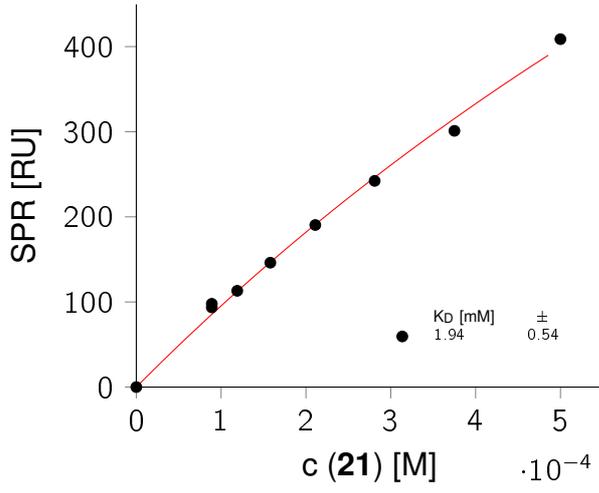
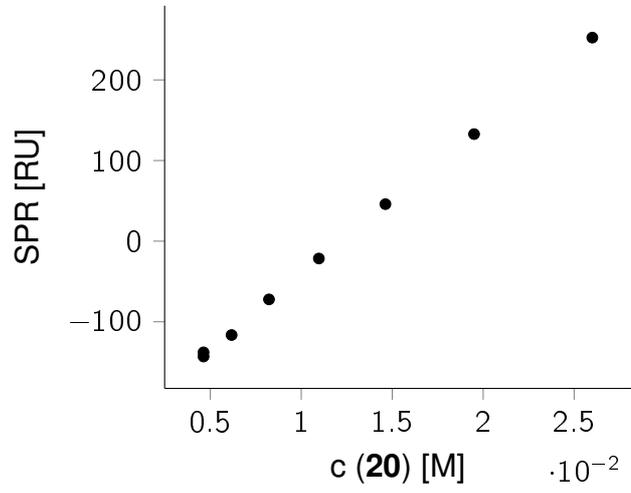
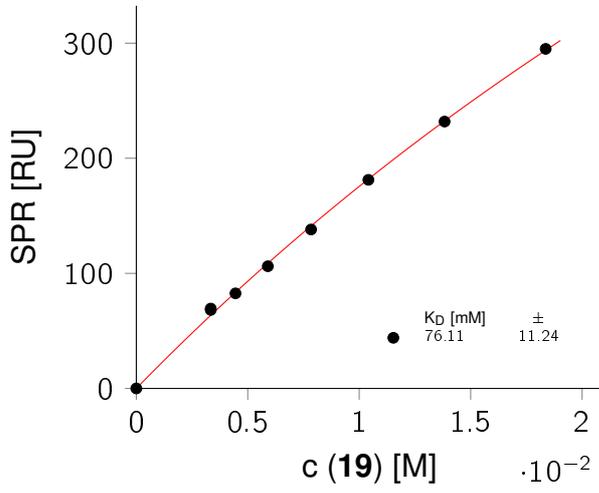
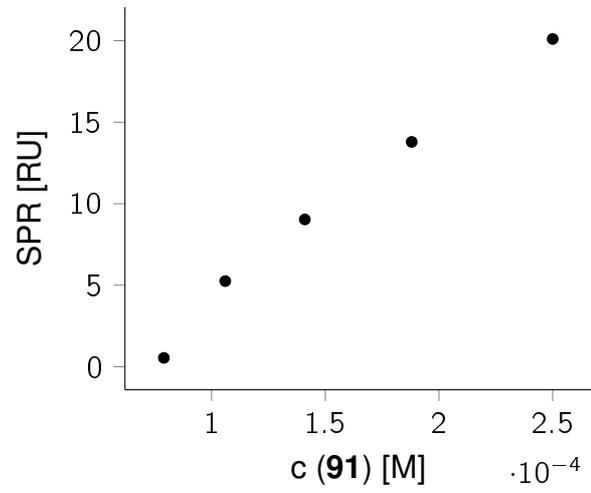
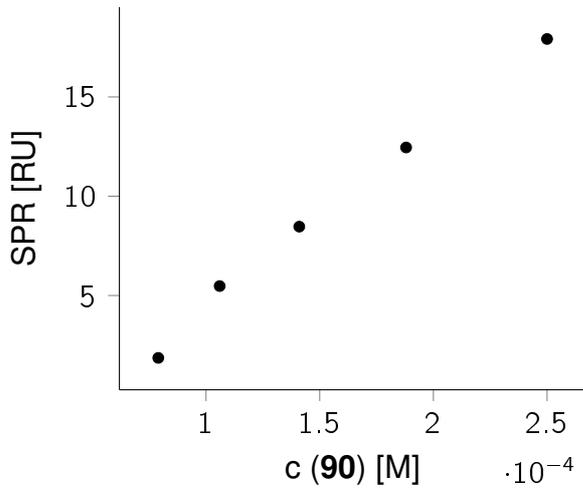
Appendix



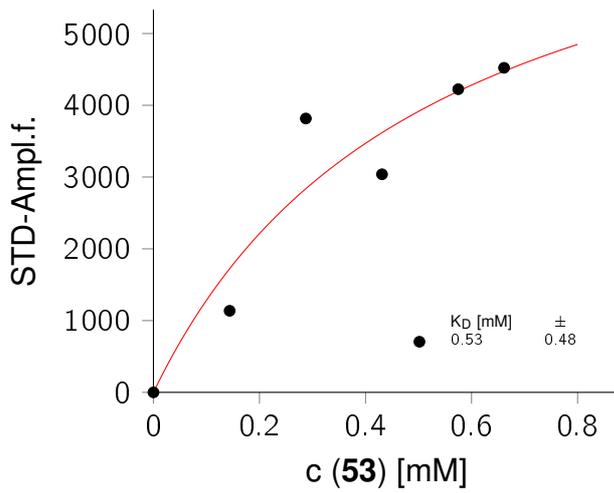
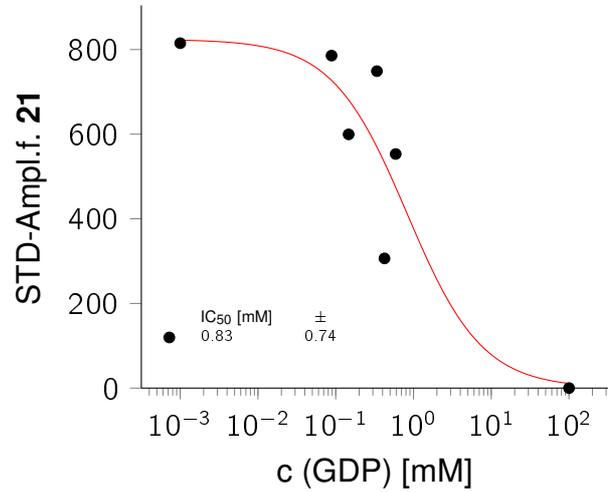
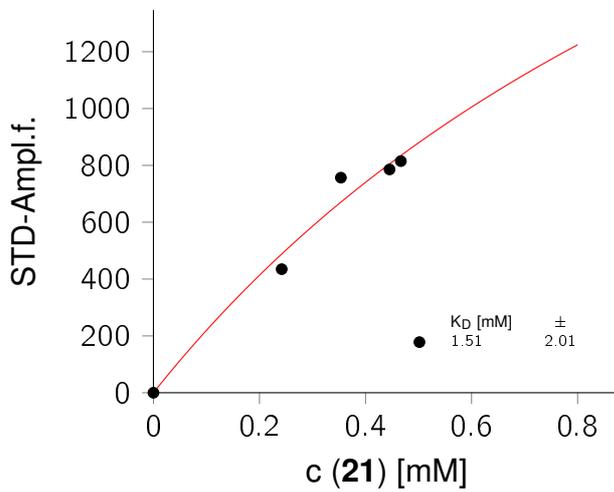
Appendix



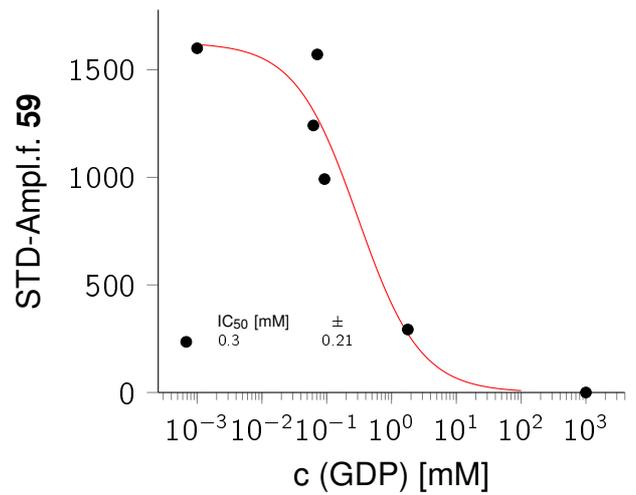
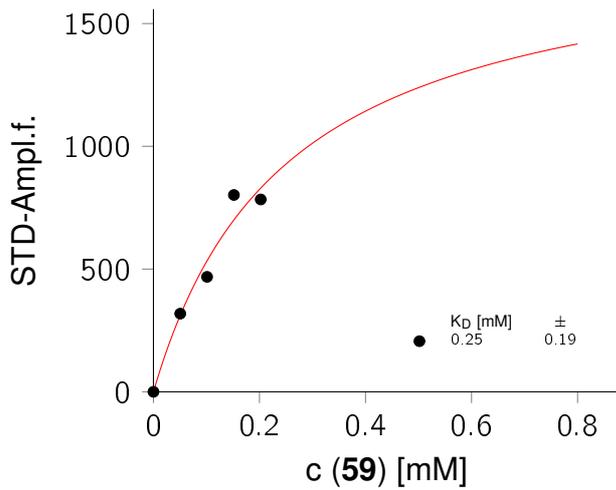
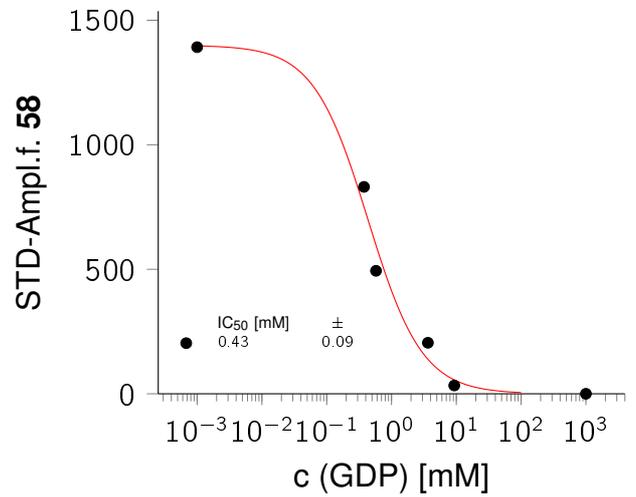
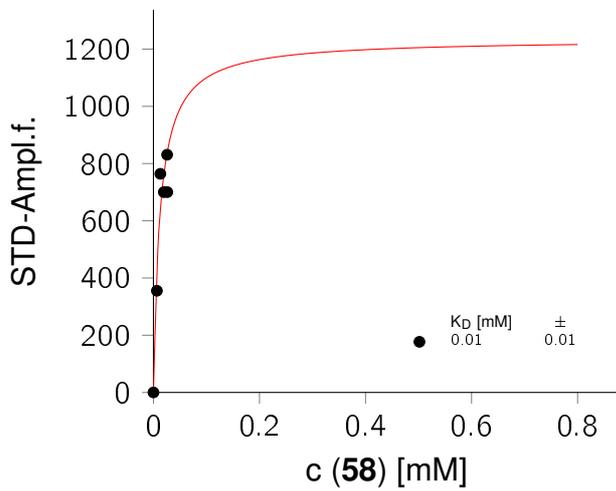
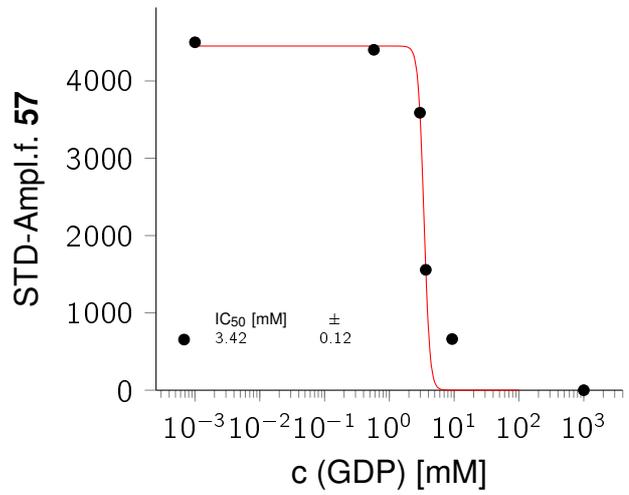
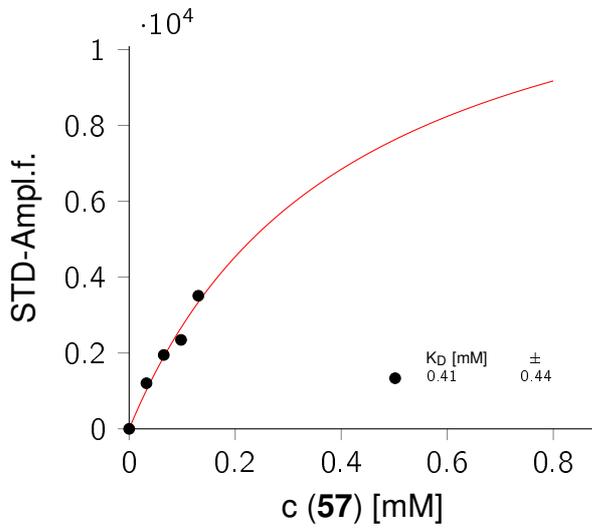
Appendix



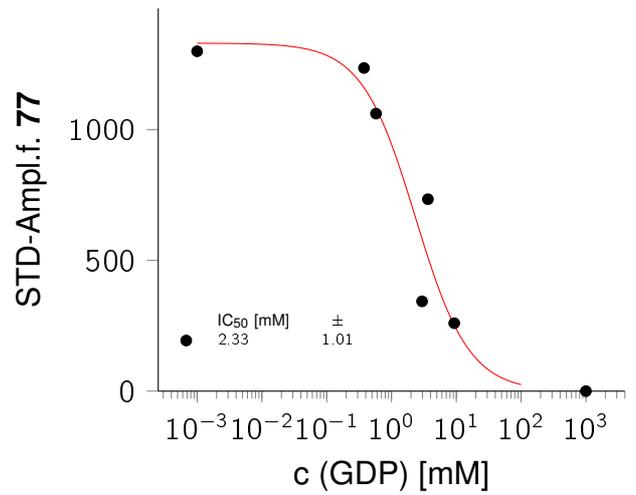
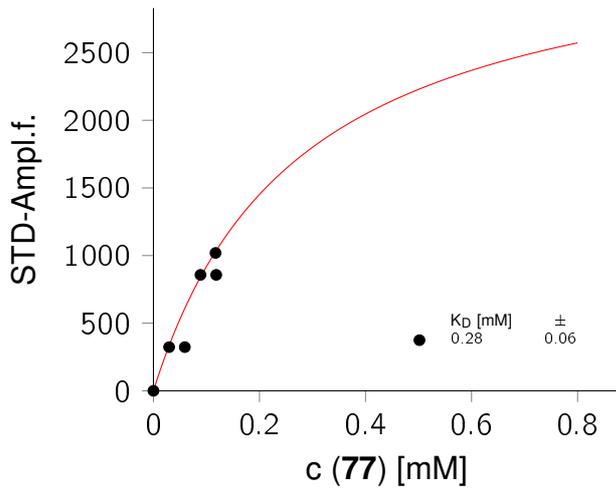
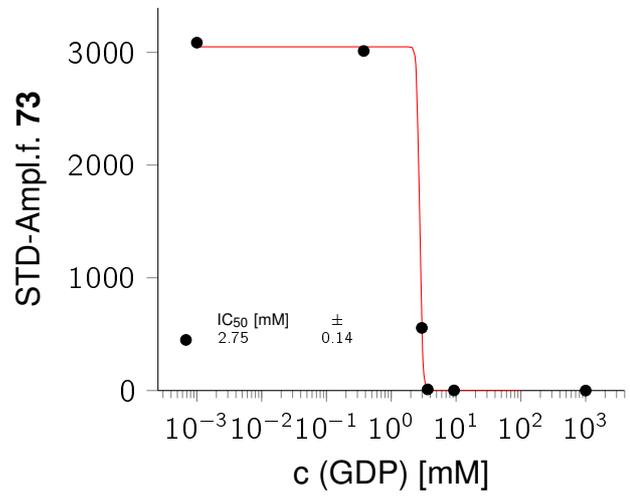
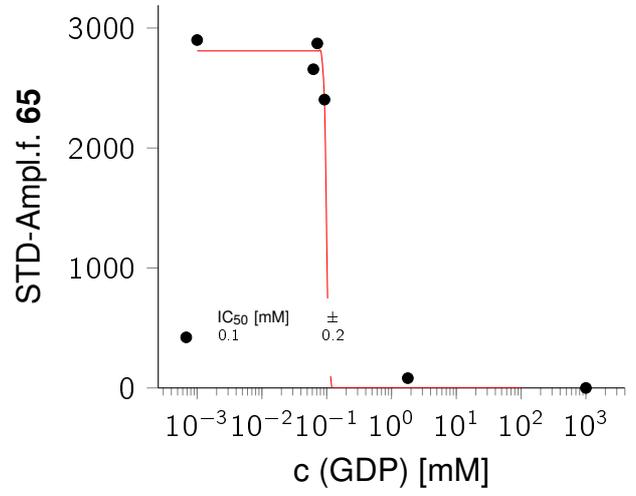
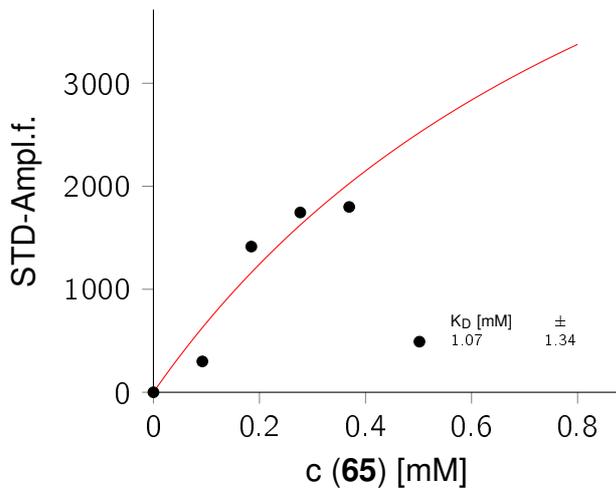
5 STD-Bindungskurven und Inhibitionsversuche an Fut5

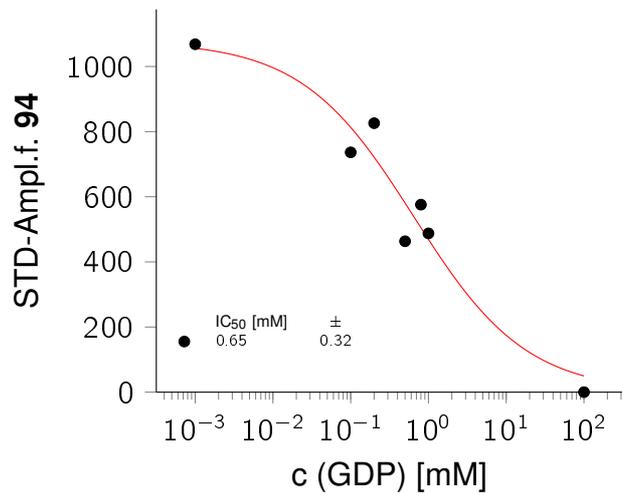
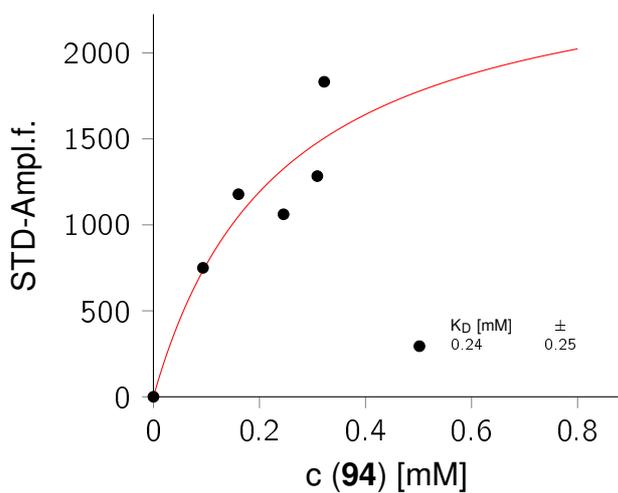
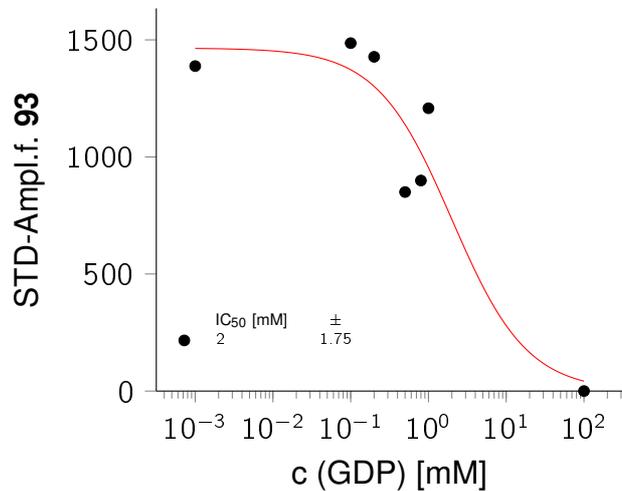
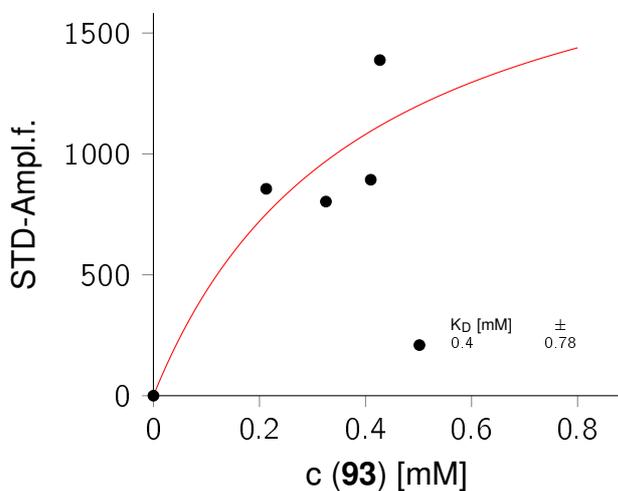
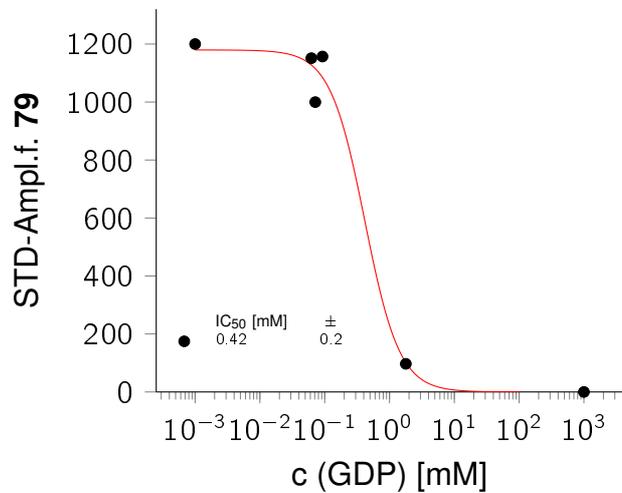
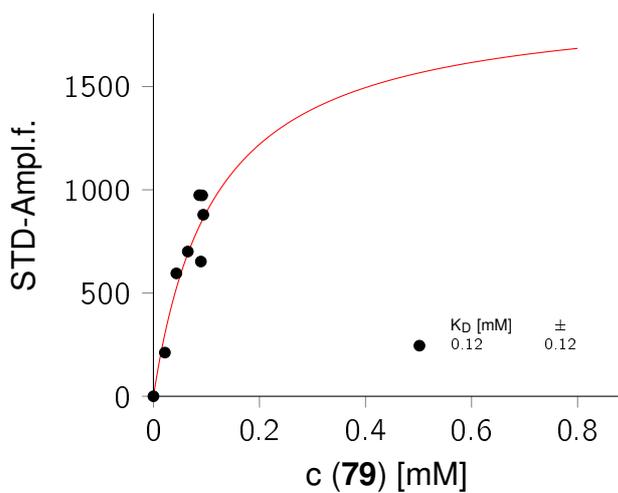


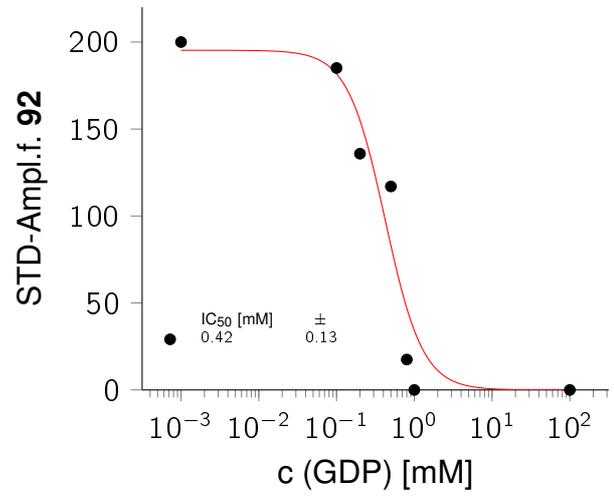
Appendix



Appendix







Literatur

- [1] W. Just, A. P. Lothrop, M. P. Torres, S. M. Fuchs, *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1247–1257.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [3] R. Apweiler, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 4–8.
- [4] S.-M. Kulmala, S. Syrjanen, I. Shabalova, N. Petrovichev, V. Kozachenko, J. Podistov, O. Ivanchenko, S. Zakharenko, R. Nerovjna, L. Kljukina, M. Branovskaja, V. Grunberga, A. Juschenko, P. Tosi, R. Santopietro, K. Syrjanen, *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2470–2475.
- [5] M. E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to glycobiology*, 3. ed. H1, Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], **2011**.
- [6] C. J. Waechter, W. J. Lennarz, *Annu Rev Biochem* **1976**, *45*, 95–112.
- [7] D. 621, The different types of glycans produced in different organisms. **2016**.
- [8] B. Imperiali, S. E. O'Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 643–649.
- [9] A. M. Sinclair, S. Elliott, *J Pharm Sci* **2005**, *94*, 1626–1635.
- [10] H. Ge, W. Yuan, J. Liu, Q. He, S. Ding, J. Pu, B. He, *PLoS One* **2015**, *10*, e0117463.
- [11] A. Dell, H. R. Morris, *Science (80-.)*. **2001**, *291*, 2351–2356.
- [12] J. F. G. Vliegthart in *NMR Spectrosc. Comput. Model. Carbohydrates*, (Hrsg.: J. F. G. Vliegthart, R. J. Woods), ACS Symposium Series, **2006**, Kap. 2, S. 1–19.
- [13] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
- [14] S. J. Charnock, G. J. Davies, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6380–6385.
- [15] C. Breton, A. Imberty, *Curr Opin Struct Biol* **1999**, *9*, 563–571.
- [16] N. Tarbouriech, S. J. Charnock, G. J. Davies, *J Mol Biol* **2001**, *314*, 655–661.
- [17] C. Breton, L. Šnajdrová, C. Jeanneau, J. Koča, A. Imberty, *Glycobiology* **2006**, *16*, 29R–37R.
- [18] C. King, G. Rios, M. Green, T. Tephly, *Curr. Drug Metab.* **2000**, *1*, 143–161.

- [19] N. E. Zachara, G. W. Hart, *Chem Rev* **2002**, *102*, 431–438.
- [20] S. Moréra, L. Larivière, J. Kurzeck, U. Aschke-Sonnenborn, P. S. Freemont, J. Janin, W. Rürger, *J Mol Bio* **2001**, *311*, 569–77.
- [21] Y. Hu, S. Walker, *Chem Biol* **2002**, *9*, 1287–1296.
- [22] B. Ramakrishnan, P. V. Balaji, P. K. Qasba, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 491–502.
- [23] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *J Mol Biol* **2003**, *328*, 307–317.
- [24] M. L. Sinnott, *Chem Rev* **1990**, *90*, 1171–1202.
- [25] T. Hennet, *Cell Mol Life Sci* **2002**, *59*, 1081–1095.
- [26] K. Landsteiner, *Zentralblatt Bakteriologie* **1900**, *27*, 357–362.
- [27] T. J. Painter, M. Watkins Winifred, W. T. J. Morgan, *Nature* **1965**, *206*, 594–597.
- [28] M. Nagai, V. Dave, H. Muensch, A. Yoshida, B. E. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 377–379.
- [29] I. Yamamoto, M. Sekine, T. Hata, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 306.
- [30] S. I. Patenaude, N. O. L. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic, S. V. Evans, *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9*, 685–690.
- [31] J. A. Alfaro, R. B. Zheng, M. Persson, J. A. Letts, R. Polakowski, Y. Bai, S. N. Borisova, N. O. L. Seto, T. L. Lowary, M. M. Palcic, S. V. Evans, *J Biol Chem* **2008**, *283*, 10097–10108.
- [32] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 13529–13538.
- [33] D. J. Becker, J. B. Lowe, *Glycobiology* **2003**, *13*, 41R–53R.
- [34] B. Ma, J. L. Simala-Grant, D. E. Taylor, *Glycobiology* **2006**, *16*, 158R–184R.
- [35] K. Sasaki, K. Kurata, K. Funayama, M. Nagata, E. Watanabe, S. Ohta, N. Hanai, T. Nishi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14730–7.
- [36] G. Karp, S. Vogl, S. Kuhlmann-Krieg, *Molekulare Zellbiologie*, **2005**, S. 1007.
- [37] E. Miyoshi, K. Moriwaki, T. Nakagawa, *J. Biochem.* **2008**, *143*, 725–729.
- [38] C.-H. Wong, *Carbohydrate-based Drug Discovery, Bd. 2*, WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, **2003**.
- [39] U. Holzgrabe, *Chemother J* **2004**, *13*, 142–147.
- [40] PDB, **2014**.
- [41] A. R. Fersht, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 650–654.

- [42] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrisch, H. Wyckhoff, D. C. Philips, *Nature* **1958**, *181*, 662–666.
- [43] M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. N. N. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, *Nature* **1960**, *185*, 416–422.
- [44] B. W. Mathews, P. B. Sigler, R. Henderson, D. M. Blow, *Nature* **1967**, *214*, 652–656.
- [45] G. Klebe, *Wirkstoffdesign, Bd. 2*, **2009**.
- [46] L. B. KIER, *Mol. Pharmacol.* **1967**, *3*, 487–494.
- [47] J. H. van Drie, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2012**, *11*, 271–279.
- [48] C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg, L. A. Mitscher, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129–1143.
- [49] R. Marshall, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1987**, *27*, 193–213.
- [50] G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147–3176.
- [51] a. Tropsha, P. Gramatica, V. K. Gombar, *Qsar Comb. Sci.* **2003**, *22*, 69–77.
- [52] P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 694–701.
- [53] C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya, V. Prachayasittikul, *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 633–654.
- [54] S. Gräslund, P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. Dhe-Paganon, H.-w. Park, A. Savchenko, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S.-H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C.-Y. Kim, L.-W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schütz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Büssow, K. C. Gunsalus, Graslund, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 135–146.
- [55] F. Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, **1999**.
- [56] J. L. Cereghino, J. M. Cregg, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 45–66.
- [57] N. Malys, J. A. Wishart, S. G. Oliver, J. E. G. McCarthy, *Methods Enzymol.* **2011**, *500*, 197–212.

- [58] F. Altmann, E. Staudacher, I. B. H. Wilson, L. März, *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 109–123.
- [59] T. A. Kost, J. P. Condreay, D. L. Jarvis, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 567–575.
- [60] M. P. Rosser, W. Xia, S. Hartsell, M. McCaman, Y. Zhu, S. Wang, S. Harvey, P. Bringmann, R. R. Cobb, *Protein Expr. Purif.* **2005**, *40*, 237–243.
- [61] A. Lackner, K. Genta, H. Koppensteiner, I. Herbacek, K. Holzmann, S. Spiegl-Kreinecker, W. Berger, M. Grusch, *Anal. Biochem.* **2008**, *380*, 146–148.
- [62] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, **2009**.
- [63] H. Rehm, T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, **2010**.
- [64] J. Yin, G. Li, X. Ren, G. Herrler, *J. Biotechnol.* **2007**, *127*, 335–347.
- [65] P. Compain, O. R. Martin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 541–60.
- [66] M. N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J. L. Abrahams, N. H. Packer, *Proteomics* **2014**, *14*, 525–546.
- [67] B. M. Wolpin, A. T. Chan, P. Hartge, S. J. Chanock, P. Kraft, D. J. Hunter, E. L. Giovannucci, C. S. Fuchs, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 424–431.
- [68] N. Sindhuwinata, L. L. Grimm, S. Weißbach, S. Zinn, E. Munoz, M. M. Palcic, T. Peters, *Biopolymers* **2013**, *99*, 784–95.
- [69] C. Rademacher, J. Landström, N. Sindhuwinata, M. M. Palcic, G. Widmalm, T. Peters, *Glycoconj J* **2010**, *27*, 349–358.
- [70] J. Münster, P. Ziegelmüller, E. Spillner, R. Bredehorst, *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 448–57.
- [71] J. Albers, Diss., Department Chemie der Universität Hamburg, **2007**.
- [72] K. Schaefer, Diss., Universität Hamburg, **2012**.
- [73] F. Niemeyer, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2011**.
- [74] P. D. Lyne, M. L. Lamb, J. C. Saeh, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4805–8.
- [75] J. Li, R. Abel, K. Zhu, Y. Cao, S. Zhao, R. A. Friesner, *Proteins* **2011**, *79*, 2794–812.
- [76] M. Nüchter, B. Ondruschka, W. Lautenschläger, *Synth Comm* **2001**, *31*, 1277–1283.
- [77] C. Girard, M.-L. Miramon, T. de Solminihac, J. Herscovici, *J. Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1769–1774.
- [78] S. Koto, N. Morishima, Y. Miyata, and Shonosuke Zen, *Bull Chem Soc Jpn* **1976**, *49*, 2639–2640.
- [79] U. Spohr, N. Le, C.-C. Ling, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 238–255.

- [80] F. Asinger, B. Fell, J. Pfeifer, A. Saus, *J. für Prakt. Chemie* **1972**, *314*, 71–79.
- [81] A. R. Khosropour, M. M. Khodaei, K. Ghozati, *Zeitschrift für Naturforsch. B* **2005**, 572–576.
- [82] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [83] J. J. Irwin, B. K. Shoichet, M. M. Mysinger, N. Huang, F. Colizzi, P. Wassam, Y. Cao, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5712–20.
- [84] T. Sterling, J. J. Irwin, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2324–2337.
- [85] U. Jäger, W. Sundermeyer, H. Pritzkow, *Chem. Ber.* **1987**, *120*, 1183–1190.
- [86] F. M. Ibatullin, S. I. Selivanov, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9577–9580.
- [87] T. Takeda, Y. Sugiura, Y. Ogihara, S. Shibata, *Can. J. ...* **1980**, *58*, 2600–2603.
- [88] L. F. Tietze, A. Bergmann, *Angew. Chemie* **1985**, *97*, 135–136.
- [89] K. A. Winans, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 113–129.
- [90] W. Gong, J.-p. Desaulniers, *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* **2012**, *31*, 389–400.
- [91] R. A. Smits, M. Adami, E. P. Istyastono, O. P. Zuiderveld, C. M. E. Van Dam, F. J. J. De Kanter, A. Jongejan, G. Coruzzi, R. Leurs, I. J. P. De Esch, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2390–2400.
- [92] S. Lateef, S. R. K. Mohan, R. Rameshraj, S. Reddy, J. Reddy, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 1254–1257.
- [93] W. ROHR, G. HAMPRECHT, N-Substd. sulphamoyl halides prepn. - by reacting alcohols with halosulphonyl isocyanates, **1975**.
- [94] G. Weiß, G. W. G. Schulze, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *729*, 40–51.
- [95] R. Graf, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 1071–1079.
- [96] F. Exnowitz, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2014**.
- [97] A. Babič, S. Gobec, C. Gravier-Pelletier, Y. Le Merrer, S. Pečar, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9093–9100.
- [98] R. Jørgensen, L. L. Grimm, N. Sindhuwinata, T. Peters, M. M. Palcic, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 4171–5.
- [99] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- [100] P. Leccese, Diss., Universität Hamburg, **2016**.
- [101] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *13*, 604–637.

- [102] T. Pesnot, R. Jørgensen, M. M. Palcic, G. K. Wagner, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 321–3.
- [103] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, **2005**, 210–216.
- [104] B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
- [105] X. Creary, A. Anderson, C. Brophy, F. Crowell, Z. Funk, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8756–61.
- [106] C. B. W. Phippen, A. M. Goldys, C. S. P. McErlean, *European J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6957–6964.
- [107] C. Breton, R. Oriol, a. Imberty, *Glycobiology* **1998**, *8*, 87–94.
- [108] K. Seelhorst, C. Stacke, P. Ziegelmüller, U. Hahn, *Glycobiology* **2013**, *23*, 559–67.
- [109] V. A. Morais, J. Serpa, A. S. Palma, T. Costa, L. Maranga, J. Costa, *Biochem. J.* **2001**, *353*, 719–25.
- [110] P. F. Gallet, H. Vaujour, J.-M. M. Petit, A. Maftah, A. Oulmouden, R. Oriol, C. Le Narvor, M. Guilloton, R. Julien, *Glycobiology* **1998**, *8*, 919–25.
- [111] C. Stacke, P. Ziegelmüller, U. Hahn, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 35–8.
- [112] V. Morais, J. Costa, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 69–75.
- [113] A. Shinkai, K. Shinoda, K. Sasaki, Y. Morishita, T. Nishi, Y. Matsuda, I. Takahashi, H. Anazawa, *Protein Expr. Purif.* **1997**, *10*, 379–385.
- [114] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne, A. Krogh, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1998**, *6*, 175–82.
- [115] H. Seismann, S. Blank, I. Braren, K. Greunke, L. Cifuentes, T. Grunwald, R. Bredehorst, M. Ollert, E. Spillner, *Mol. Immunol.* **2010**, *47*, 799–808.
- [116] BRENDA.
- [117] Y. Maedal, T. Kinoshita, *Methods Enzymol.* **2010**, *480*, 495–510.
- [118] J. Llopis, J. M. McCaffery, a. Miyawaki, M. G. Farquhar, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6803–8.
- [119] A. Carmona, G. Deves, S. Roudeau, P. Cloetens, S. Bohic, R. Ortega, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 194–203.
- [120] A. Carmona, G. Deves, R. Ortega, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1585–1594.

- [121] S. Chandra, E. P. Kable, G. H. Morrison, W. W. Webb, *J. Cell Sci.* **1991**, *100* (Pt 4), 747–752.
- [122] W. Jahnen-Dechent, M. Ketteler, *Clin. Kidney J.* **2012**, *5*, i3–i14.
- [123] C. T. Goudar, S. K. Harris, M. J. McInerney, J. M. Suflita, *J. Microbiol. Methods* **2004**, *59*, 317–326.
- [124] F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 443–9.
- [125] B. W. Murray, S. Takayama, J. Schultz, C. H. Wong, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11183–95.
- [126] R. D. Cramer, D. E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967.
- [127] L. Vo, S. Lee, M. C. Marcinko, E. H. Holmes, B. A. Macher, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25250–25255.
- [128] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [129] G. Biagi, A. M. Bianucci, A. Coi, B. Costa, L. Fabbrini, I. Giorgi, O. Livi, I. Micco, F. Pacchini, E. Santini, M. Leonardi, F. A. Nofal, O. L. Salerni, V. Scartoni, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4679–4693.
- [130] A. Albert, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 345.
- [131] A. Chris Krueger, D. L. Madigan, W. W. Jiang, W. M. Kati, D. Liu, Y. Liu, C. J. Maring, S. Masse, K. F. McDaniel, T. Middleton, H. Mo, A. Molla, D. Montgomery, J. K. Pratt, T. W. Rockway, R. Zhang, D. J. Kempf, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3367–3370.
- [132] C. Guo, L. Dong, S. Kephart, X. Hou, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2909–2913.
- [133] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [134] D. Bajusz, A. Rácz, K. Héberger, *J. Cheminform.* **2015**, *7*, 20.
- [135] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1989**.
- [136] F. Ausubel, R. Brent, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, **2005**.
- [137] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [138] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J Org Chem* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [139] K. Szablikowski, Verfahren zur Darstellung eines Gemisches aus α - und β -Chlorethylglucopyranose, Schutzrecht, **1993**.

- [140] P. Chabaud, M. Camplo, D. Payet, G. Serin, L. Moreau, P. Barthélémy, M. W. Grinstaff, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 466–472.
- [141] A. Dornow, J. Helberg, *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2001–2010.

Danksagung

Ich möchte mich bei Claudia, Silas und Maarten bedanken, weil sie immer da waren, auch wenn ich spät nach Hause gekommen bin.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich während meines doch recht langen Studiums nicht nur finanziell, sondern auch bei allen Problemen unterstützt haben.

Vielen Dank an alle Mitglieder des AK Meyer für die freundliche Aufnahme, gute Stimmung und entspannte Arbeitsatmosphäre. Im einzelnen danke ich:

- Katrin Schaefer für das Beantworten aller Fragen zur GTB, zu Inhibitoren und zu synthetischen Problemen
- Patrizia für die Bereitschaft immer ein Problem zu diskutieren oder auch nur zu Plaudern
- Moritz für die gute Laune, ewige Wissbegierde und Hilfe bei vielen Problemen
- Karsten für die super Zeit, Hilfe an der HPLC und Entsorgung von MeCN-Flaschen
- Martin danke ich für sein Interesse an Synthese und die Hilfe bei Maestro-Problemen sowie das Lachen (z.B. über Kalkofe)
- Alex, für ein offenes Ohr, nicht nur bei Computerproblemen
- Alena für die gemeinsamen Wanderungen in die BC
- Raffi für die offene, interessierte Art
- Ilona und Insa für die gute Laune
- allen NMR-Admins für die vielen Stunden an offenen Konsolen und an Heliumkannen
- Wei, Moritz, Nadja, Anna-Lena, Tim und Hinnerk dafür, dass der AK-Meyer so viel Spaß macht
- meinen Praktikanten Jan-Christian Boy, Nadine Hofeditz, Katharina Berg, Mazlum Yesilmen, Baldur Schroeter, Anja Riegel, Michael Niermann, Gregor Heck,

Danksagung

Eugen Klein, Ben Mietner, Sergej Diez, Julian Koch, Lars Thormann, Simone Heinecke, Tomas Piernitzki, Amelie Stahlbuhk, Sandra Semmler, Joel Jaschek, für ihr Engagement und die eingebrachte Arbeit

- Emre Akgün für die erfrischende Bachelor-Arbeit
- Thomas Peters und seinem Arbeitskreis für die Messungen an der Biacore, gemeinsame Diskussionen und Konferenzen.
- Edzard Spillner dafür, dass ich in seiner Arbeitsgruppe alle biochemischen Arbeiten durchführen konnte
- Franky, Melanie und Thorsten für die vielen Tips und Erklärungen sowie für die nette Art, mit der ihr mir die biochemischen Arbeiten näher gebracht habt
- Thomas Hackl und der NMR-Abteilung für die Unterstützung bei diversen NMR Messungen und den Hinweis, mich doch mal auf NMR-Stellen zu bewerben
- Maria Riedner und der MS-Abteilung ebenso für diverse vermessene Proben
- dem IT-Service für die vielen Hilfen, nicht nur was Computerfragen angeht
- Raffi, Tim, Claudia und Jan-Mirco für das Korrekturlesen dieser Arbeit

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Essen, 24. Oktober 2016

Ort, Datum

Unterschrift