Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren für die humane Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase

Dissertation

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

vorgelegt von **Katrin Schaefer**aus Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Tag der Disputation: 06. 01. 2012

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit zwischen Juni 2008 und November 2011 am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Bernd Meyer, durchgeführt. Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die sehr interessante Themenstellung und die stets freundliche, wertvolle und fördernde Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. h. c. mult. W. Francke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>		
1	EINLEITUNG	1
1.1	GLYCOSYLTRANSFERASEN	2
1.2	DAS ABO(H) BLUTGRUPPENSYSTEM	5
1.3	DIE HUMANE BLUTGRUPPE-B-SPEZIFISCHE GALACTOSYLTRANSFERASE	7
1.4	GLYCOSYLTRANSFERASE INHIBITOREN	9
<u>2</u>	AUFGABENSTELLUNG	14
<u>3</u>	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	16
3.1	DESIGN, SYNTHESE UND ANALYSE VON UDP ANALOGEN INHIBITOREN	18
3.2	DESIGN, SYNTHESE UND ANALYSE EINES UDP-GAL ANALOGEN INHIBITORS	45
3.3	PROGRESSKURVENANALYSE DER INHIBITION GEGENÜBER VERSCHIEDENEN	
	GLYCOSYLTRANSFERASEN	61
3.4	ENTWICKLUNG EINES BISUBSTRATANALOGEN INHIBITORS	72
<u>4</u>	ZUSAMMENFASSUNG	88
<u>5</u>	SUMMARY	90
<u>6</u>	EXPERIMENTELLER TEIL	92
6.1	VERWENDETE GERÄTE UND SOFTWARE	92
6.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	93
6.3	VERWENDETE PUFFER	95
6.4	SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) EXPERIMENTE	96
6.5	SATURATION TRANSFER DIFFERENCE (STD) NMR EXPERIMENTE	96
6.6	RADIOCHEMISCHE ENZYMASSAYS	97
6.7	NMR BASIERTE ENZYMASSAYS	98
6.8	Synthesen	101
6.9	Syntheseversuche	136

INHALTSVERZEICHNIS

<u>7</u>	TOXIKOLOGISCHE DATEN	142
<u>8</u>	LITERATUR	146
DAN	NKSAGUNG	151
LEBENSLAUF		153
ERK	KLÄRUNG	155

Abkürzungsverzeichnis

Ac Acetyl

arom. aromatisch
AS Aminosäure
ber. berechnet

BisTris Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan

Bn Benzyl

BSA Rinderserumalbumin

Bz Benzoyl

CV Column Volume

δ chemische Verschiebung

d Dublett

1D, 2D, 3D ein-, zwei-, dreidimensional

DCM Dichlormethan

dest. destilliert

DIPEA *N,N*-Diisopropylethylamin

DMF *N,N*-Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DTT Dithiothreitol

EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EtOAc Ethylacetat

El Elektronenstoß Ionisation

ESI Elektrospray Ionisation

Et Ethyl

Et₂O Diethylether

EtOH Ethanol

Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

Fuc Fucose

Gal Galactose

GalNAc N-Acetylgalactosamin

Glc Glucose

GDP Guanidindiphosphat

gef. gefunden ges. gesättigt

GalT Galactosyltransferase
GT Glycosyltransferase

GTA Blutgruppe-A-spezifische N-Acetylgalactosaminyltransferase

GTB Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HTS High Throughput Screening

*IC*₅₀ mittlere inhibitorische Konzentration

J Kopplungskonstante

 K_D thermodynamische Dissoziationskonstante

 K_I Inhibitionskonstante

K_M Michaelis-Menten-Konstante

LacNAc N-Acetyllactosamin

m Multiplett

MALDI TOF Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight

Me Methyl

MeCN Acetonitril
MeOH Methanol

MOPS 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure

MS Massenspektrometrie

Ms Mesyl, Methansulfonyl

m/z Masse/Ladung

NDP Nucleosiddiphosphat

NEt₃ Triethylamin

NHS N-Hydroxysuccinimid

NMP Nucleosidmonophosphat

NMR Nuclear Magnetic Resonance

NOE Nuclear Overhauser Enhancement

PE Petrolether 50-70

PG Protecting Group, Schutzgruppe

Phe Phenyl

POGLUT humane *O*-Glucosyltransferase 1

ppm Parts Per Million

 R_f Ratio of Fronts

RP Reversed Phase

rpm Umdrehungen pro Minute

rt Raumtemperatur RU Response Unit

s Singulett

SPR Surface Plasmon Resonance
STD Saturation Transfer Difference

StBu tert-Butylthio

t Triplett

TBTU *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-

tetramethyluronium tetrafluoroborat

*t*Bu *tert*-Butyl

Tf Trifluormethansulfonyl

TFA Trifluoressigsäure

TFAA Trifluoressigsäureanhydrid

TIPS Triisopropylsilan

TMS-Triflat Trimethylsilyltrifluormethansulfonat

UDP Uridindiphosphat

UDP-Gal Uridindiphosphat Galactose

UDP-GalNAc Uridindiphosphat N-Acetylgalactosamin

UDP-Glc Uridindiphiphosphat Glucose

UMP Uridinmonophosphat

Aminosäuren

Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Ala	A
Arg	R
Asn	N
Asp	D
Cys	C
Gln	Q
Glu	E
Gly	G
His	Н
Ile	I
Leu	L
Lys	K
Met	M
Phe	F
Pro	P
Ser	S
Thr	T
Trp	W
Tyr	Y
Val	V
	Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr

1 Einleitung

Kohlenhydrate bilden eine der großen Naturstoffklassen und stellen den größten Anteil der Biomasse auf der Erde dar. Neben ihrer Rolle als Energielieferant und Stützsubstanz (wie Cellulose oder Chitin), sind Kohlenhydrate aktiv an der Zellkommunikation beteiligt (Abbildung 1). Dabei sind Strukturmerkmale und Erkennungsprozesse nicht immer klar voneinander separiert, sondern die Aufgabenbereiche von Glycanen können innerhalb eines Organismus durchaus fließend sein. Zuckerstrukturen befinden sich nahezu auf allen Zellen (Glycocalyx) und vielen natürlich vorkommenden Makromolekülen, z.B. Proteinen. Sie werden überwiegend an der Oberfläche präsentiert und sind somit in der Lage, wichtige Signal- und Erkennungsprozesse in der Zelle zu beeinflussen und zu regulieren. [1] Da sich die Funktion der Glycanstrukturen nicht nur auf einen bestimmten Bereich eingrenzen lässt, ist die Erforschung biologisch relevanter Kohlenhydrate ein wichtiges Mittel, um zelluläre Prozesse verstehen zu lernen.

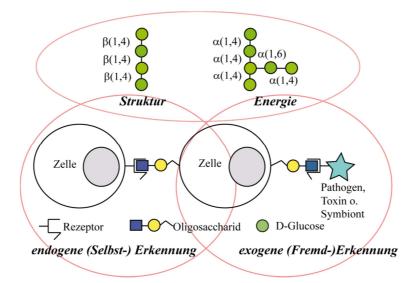


Abbildung 1: Allgemeine und vereinfachte Einteilung der biologischen Funktionen von Glycanen. Neben strukturgebenden Merkmalen und als Energiequelle spielen Glycane eine wichtige Rolle bei der endogenen und exogenen Erkennung durch eigene oder fremde Lectine (Rezeptoren). Die Übergänge zwischen allen relevanten Bereichen sind fließend.^[1]

In eukaryotischen Zellen werden Oligosaccharide durch einige wenige Glycosylhydrolasen (GHs) und durch eine große Anzahl an Glycosyltransferasen (GTs) synthetisiert. Die Beschäftigung mit diesen Enzymen hilft somit die biologischen Zusammenhänge von Glycanstrukturen und ihre Aufgaben zu verstehen.

1.1 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen (GTs) spielen eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von komplexen Oligosacchariden, Glycoproteinen, Glycolipiden und Glycoconjugaten. Man geht heute davon aus, dass GTs etwa ein bis zwei Prozent der Genprodukte eines Organismus ausmachen, was die Wichtigkeit dieser Enzymklasse unterstreicht.^[2] Die Mehrheit der Glycosyltransferasen sind Typ II Transmembranproteine, die im Golgi lokalisiert sind.^[3] GTs katalysieren die spezifische Übertragung einer Kohlenhydrateinheit von einem aktivierten Donorzucker (fast ausschließlich Zuckernucleotide) auf ein Akzeptorsubstrat (Abbildung 2).

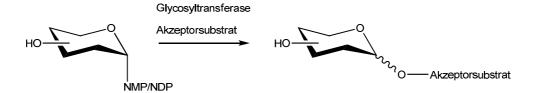


Abbildung 2: Schematische Darstellung der durch Glycosyltransferasen katalysierten Reaktion. Ein aktivierter Zucker wird spezifisch auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Dabei wird Nucleosidmonophosphat (NMP) oder Nucleosiddiphosphat (NDP) als Nebenprodukt freigesetzt.

Der Akzeptor ist im Regelfall eine Hydroxyfunktion eines Oligosaccharids, die Übertragung erfolgt aber auch auf Lipide, Proteine, Nucleinsäuren und Antibiotika (Abbildung 3). Glycosyltransferasen sind hochspezifisch in ihrer Akzeptorsubstraterkennung, während eine Klasse von GTs das gleiche Donorsubstrat nutzt (z.B. UDP-Galactose von Galactosyltransferasen).^[2]

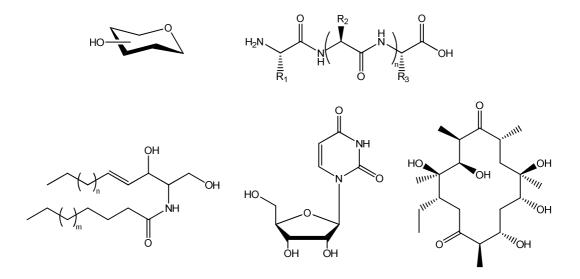


Abbildung 3: Allgemeine Strukturen von gängigen Akzeptorsubstraten, die von GTs genutzt werden. Grundsätzlich werden vorrangig Hydroxyfunktionen der Akzeptorsubstrate hochspezifisch glycosyliert. Diese können Teil eines Kohlenhydrates, Proteins, Lipids, Nucleosids oder auch Antibiotika sein.

EINLEITUNG

Abhängig vom jeweiligen Enzym kann die Übertragung der Kohlenhydrateinheit auf das Akzeptormolekül unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration erfolgen, wodurch die Synthese von α - und β -Glycosiden aus einem identischen Donorsubstrat ermöglicht wird. Während der Mechanismus von invertierenden Glycosyltransferasen bekannt ist, ist der Katalysemechanismus von nicht invertierenden GTs in vielen Fragen noch offen. [2,4-7]

1.1.1 Klassifizierung von Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen wurden anhand ihrer Gensequenzen klassifiziert, die in der CAZy Datenbank (www.cazy.org) als Familien gelistet sind. Bis heute sind 94 Familien bekannt (Juli 2011). [8] Während eine große Diversität an Genfamilien bekannt ist, beschränkt sich die Faltung der Enzyme, deren dreidimensionale Struktur bis heute geklärt ist, auf nur zwei verschiedene Faltungsarten (Abbildung 4). Der Faltungstyp GT-A beschreibt Enzyme, die zwei Rossman-artige Domänen aufweisen normalerweise und innerhalb ihrer Aminosäuresequenz ein DXD Motiv besitzen, welches ein bivalentes Kation binden kann. Dieses hilft aktiv in der Katalyse der Reaktion, indem es die Pyrophosphatgruppe des Donorsubstrats bindet. Jedoch ist dieses Bindemotiv nicht konserviert und es gibt Beispiele von Glycosyltransferasen, deren Struktur GT-A folgt, aber kein DXD Motiv aufweist. [9] Eukaryotische GTs, die dieser Faltung zugeordnet werden, weisen typischerweise einen kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Teil auf, gefolgt von der Transmembran- und Stammregion, die dann in der globulären katalytischen Domäne endet. [10] Der Faltungstyp GT-B besitzt zwei Rossman-ähnliche Domänen, die nicht so fest assoziiert sind, wie in der GT-A Faltung. In der Spalte zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms. Die Katalyse dieser Enzyme scheint nicht zwangsläufig durch ein bivalentes Kation unterstützt zu werden. [2,4]



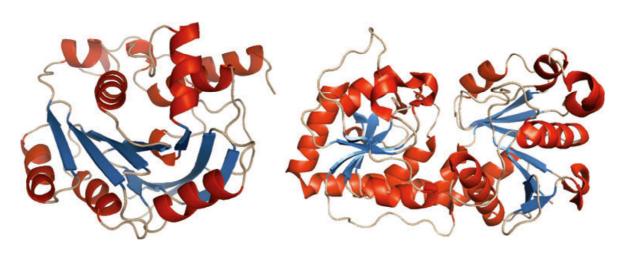


Abbildung 4: Faltungstypen von Glycosyltransferasen. A) Faltungstyp GT-A. Hier ist repräsentativ die Röntgenkristallstruktur der invertierenden GT SpsA aus *Bacillus Subtilus* gezeigt (pdb: 1qgq). Zwei eng assoziierte $\beta/\alpha/\beta$ Domänen führen zu einem zentralen β-Faltblatt. B) Faltungstyp GT-B. Gezeigt ist die Kristallstruktur des Bakteriophagen T4 β-Glucosyltransferase (pdb: 1jg7). Die beiden Rossman-ähnlichen Domänen sind locker assoziiert. In der Spalte zwischen beiden Domänen befindet sich das katalytische Zentrum. [2]

Zurzeit wird eine dritte Faltung GT-C diskutiert, die anhand von iterativen Sequenzvergleichen auf eine 3D Struktur hinweist, die ein großes hydrophobes Integralprotein mit 8 bis 13 Transmembranhelices und einem aktiven Zentrum in einer *long-loop* Region ergeben würde.^[11] Die erste 3D Struktur eines Enzyms, das dieser neuen postulierten Faltung entsprechen sollte, schwächt jedoch die Klassifizierung, da gezeigt wurde, dass das durchgeführte *alignment* auf einem Sequenzbereich für einen Transmembranteil zu basieren scheint und nicht auf dem vorhergesagten *loop*-Bereich mit dem aktiven Zentrum.^[12]

Eine weitere Einteilung kann anhand der Stereochemie des entstehenden Produkts bei der Katalyse gemacht werden. Wie schon erwähnt, kann das aktivierte Kohlenhydratderivat entweder mit Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum übertragen werden. Man spricht somit von invertierenden oder nicht-invertierenden Glycosyltransferasen. Dabei muss festgehalten werden, dass bis heute kein Zusammenhang zwischen Faltungstyp einer GT und dem stereochemischen Ergebnis ihrer katalysierten Reaktion gefunden wurde. [8]

1.2 Das ABO(H) Blutgruppensystem

Beim Menschen ist eine Vielzahl an Blutgruppen bekannt, deren Systematik sich an der Zusammensetzung von Glycolipiden und Proteinen orientiert. [13-16] Dabei gehört das ABO(H) Blutgruppensystem zu einem der Wichtigsten. In diesem System werden die Blutgruppen in vier Hauptklassen unterteilt: A, B, AB und O (null). Diese Einteilung ist schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt und beruht auf der Beobachtung Landsteiners, dass die Kombination aller Seren der verschiedenen Blutgruppen zu Aggregationen führt. [17] Erst Mitte des Jahrhunderts stellte man fest, dass die verschiedenen Blutgruppen unterschiedliche Antigene auf den Erythrozyten und anderen Zelltypen präsentieren und diese Antigene aus Glycostrukturen bestehen. [18] Die Aggregation findet auf Grund des Vorhandenseins entsprechender Antikörper im Serum statt, die gezielt die Antigene der jeweils anderen Blutgruppe erkennen.

Die ABO(H) Antigene werden beim Menschen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschieden stark exprimiert. So weisen Neugeborene etwa 25-50% weniger A/B Antigene auf der Oberfläche ihrer Erythrozyten auf als die roten Blutkörperchen eines Erwachsenen. [16] Neben ihrem Einfluss auf Zellwachstum und -differenzierung scheint die Expression der Antigene auch in pathologischen Prozessen, vorrangig in der Carcinogenese, eine wichtige Rolle zu spielen. [19] Dabei ist die am häufigsten beobachtete Veränderung der Verlust der Expression der ABO(H) Antigene und wurde erstmals bei Magenkrebs beschrieben. Später wurde diese Beobachtung mit der Abnahme an Enzymaktivität in Zusammenhang gebracht. [20,21] Im Gegensatz dazu wurde bei Dickdarmkrebs eine erhöhte Expression von A/B Antigenen festgestellt, die normalerweise im Darm während des Entwicklungsverlaufs immer stärker abnimmt. [22,23]

Die Blutgruppenantigene werden auf N-Acetyllactosamin des Typs 1 und 2, auf O-GalNAc-Glycanen und Glycolipiden präsentiert. Sie werden vorrangig auf membranständigen Proteinen und Lipiden gefunden. Die Biosynthese der entsprechenden Antigene wird von verschiedenen Glycosyltransferasen übernommen, wobei die Übertragung einer α -L-Fucose auf die terminale D-Galactosyleinheit des N-Acetyllactosamin durch eine $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase das H-Antigen generiert, welches der Blutgruppe O entspricht. Je nach Sekretionsort und Typ des N-Acetyllactosamins übernimmt diese Aufgabe eine bestimmte $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase (Abbildung 5).

Blutgruppenspezifische
$$\alpha(1,2)$$
- Fucosyltransferase

GDP-Fucose

- GDP

H-Antigen

Abbildung 5: Biosynthese des H-Antigens durch eine blutgruppenspezifische $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase. Die Übertragung einer α -L-Fucoseeinheit auf die 2-Position der terminalen D-Galactose des *N*-Acetyllactosamins generiert das H-Antigen-Disaccharid.

Das Antigen der Blutgruppe A wird durch die blutgruppenspezifische $\alpha(1,3)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) synthetisiert, die das H-Antigen als Akzeptorsubstrat nutzt. Dabei wird eine neue $\alpha(1,3)$ -glycosidische Bindung zwischen der terminalen D-Galactose und dem übertragenden N-Acetylgalactosamin gebildet. Auch das Blutgruppenantigen B wird aus dem H-Antigen generiert, jedoch erfolgt die Modifizierung durch einen $\alpha(1,3)$ -D-Galactoserest, die von der blutgruppenspezifischen $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase (GTB) durchgeführt wird (Abbildung 6).

GTA und GTB unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren in ihrer Sequenz und gehören damit zu den bis heute bekannten Glycosyltransferase-Paare, die die höchste Homologie aufweisen. [26]

Abbildung 6: Biosynthese der Blutgruppenantigene A und B. Beide Antigene werden aus dem H-Antigen durch die spezifischen Glycosyltransferasen GTA und GTB synthetisiert. Die Antigene A und B unterscheiden sich nur in der Position 2 der terminalen Galactose. Hier besitzt das A-Antigen eine *N*-Acetylaminogruppe, während das B-Antigen an Position 2 eine Hydroxyfunktion aufweist.

1.3 Die humane Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase

Die humane Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase (GTB) ist ein nicht invertierendes Enzym, dass die Synthese des Blutgruppenantigens B katalysiert, wobei bei der Reaktion ein bivalentes Kation involviert ist. [27] In diesem Prozess wird eine α -D-Galactose-Einheit von Uridindiphosphat-Galactose (UDP-Gal) auf das terminale Disaccharid α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-OR des H-Antigens übertragen. Dadurch entsteht eine neue α (1,3)-glycosidische Bindung zwischen der D-Galactose des H-Antigens und des übertragenen Kohlenhydrats. [28] Im Gegensatz zu vielen anderen Glycosyltransferasen ist die dreidimensionale Struktur des Proteins bekannt (Abbildung 7). [27,29] GTB liegt in wässriger Lösung und bei neutralem pH als Homodimer vor. [30] Die Struktur des rekombinant exprimierten Enzyms entspricht der Faltung GT-A, in der das N-terminale Ende die

EINLEITUNG

Bindungsdomäne für das Donorsubstrat bildet und die Bindungstasche für das Akzeptorsubstrat durch den C-terminalen Teil des Peptids gebildet wird. Das DXD-Motiv, das für die Bindung des bivalenten Kations von Bedeutung ist, befindet sich in der Spalte zwischen den Rossman-ähnlichen Domänen und ist Teil des katalytischen Zentrums, welches durch eine flexible Peptidschleife geöffnet und geschlossen werden kann. [27] Man geht davon aus, dass die geschlossene Form der Bindungstasche nur angenommen wird, wenn Donorund Akzeptorsubstrat gleichzeitig gebunden sind.

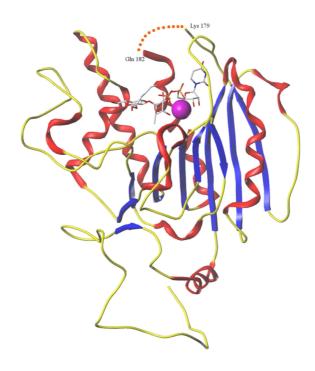


Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur der humanen Blutgruppe-B-spezifischen Galactosyltransferase (GTB, pdb: 2rj8). Gezeigt ist das Monomer in der geschlossenen Konformation, in der das H-Antigen Disaccharid und UDP cokristallisiert sind. Helices sind in rot, Faltblätter in blau und peptidische *loops* in gelb dargestellt. Die Bindungstasche für das Donor- und Akzeptorsubstrat liegt in einer Spalte, die durch die Rossman-ähnlichen Domänen flankiert wird. Dabei wird das Donorsubstrat koordinativ über die Pyrophosphateinheit an ein bivalentes Mn²⁺-Ion (magenta) gebunden. Die flexible Peptidschleife, welche das aktive Zentrum schließt, ist in der Struktur nicht vollständig aufgelöst (orange gepunktete Linie).

Obwohl die mechanistischen Details der Katalyse bis heute nicht vollständig geklärt sind, konnte durch NMR gestützte Studien gezeigt werden, dass das Donorsubstrat UDP-Gal in einer zurückgefalteten Konformation gebunden wird, in der der zu übertragende Zucker über der Nucleotideinheit liegt. Zudem wurde festgestellt, dass das Donorsubstrat abhängig von der An- oder Abwesenheit eines H-Antigen-Disaccharid-Analogons unterschiedlich stark gebunden wird. Auch das Akzeptorsubstrat wird abhängig von der Anwesenheit von UDP unterschiedlich stark gebunden, was die Kooperativität beider Substrate beweist. Die Art des Bindungszustands beider Substrate mittels Röntgenstrukturanalyse konnte erstmals 2008

EINLEITUNG

gezeigt werden, wobei das Donorsubstrat erfolgreich in einer Mutante von GTB cokristallisiert werden konnte.^[29] Zudem wurde durch massenspektrometrische Analysen die Bedeutung eines vorhandenen bivalenten Kations unterstrichen, da das Enzym sonst keine ausreichende Affinität zum Donorsubstrat aufwies.^[30] Die Kombination von Röntgenkristallographie und Konformationsanalyse durch NMR haben erste Einblicke in die Bindung des Donorsubstrats ergeben. Während die Affinität von UDP-Gal vorrangig über den Nucleotidteil des Substrats gesteuert wird^[34], erfolgt die Erkennung des Akzeptorsubstrats anhand der D-Galactose-Einheit des H-Antigens. Die L-Fucose scheint keine Rolle bei der Erkennung, jedoch aber bei der Katalyse zu spielen.^[28]

Auch die Kinetik der katalysierten Reaktion wurde untersucht. So konnte die Michaelis-Menten-Konstante K_M in der Anwesenheit von Mn^{2+} zu $K_M = 88~\mu\mathrm{M}$ für das H-Antigen und $K_M = 27~\mu\mathrm{M}$ für UDP-Gal bestimmt werden. [29,35]

1.4 Glycosyltransferase Inhibitoren

Im Allgemeinen können Inhibitoren für Glycosyltransferasen anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in drei Klassen unterteilt werden. Hierbei werden Inhibitoren, die die Bindungstasche des Donorsubstrats besetzen sollen, donorsubstratanaloge Inhibitoren genannt. Sie enthalten ein NDP- bzw. NMP-Motiv oder ein Mimetikum Diphosphateinheit sowie ein Glycosyldonor- oder Übergangszustandsanalogon Unterdrückung der Übertragung des Kohlenhydrats. Entsprechend nennt man Moleküle, die das Akzeptorsubstrat mimikrieren, akzeptorsubstranaloge Inhibitoren. Sie sollen die Übertragung des entsprechenden Zuckers auf das Akzeptorsubstrat behindern, indem sie das aktive Zentrum kompetitiv zum natürlichen Substrat blockieren. Bisubstratanaloge Inhibitoren vereinen Eigenschaften von Donor- und Akzeptorsubstrat und versprechen die größte Wirksamkeit. [36] Inhibitoren für Glycosyltransferasen eignen sich sehr gut, um den Mechanismus des Enzyms und die biologische Funktion des synthetisierten Oligosaccharids zu untersuchen. Bis heute wurde ein sehr großer Aufwand betrieben, um wirksame Inhibitoren für GTs zu erhalten. [37-39] Dabei entspricht der größte Teil an Verbindungen donorsubstranalogen Inhibitoren. Durch die Nutzung struktureller und mechanistischer Informationen ist es kürzlich gelungen, einen Inhibitor für Galactosyltransferasen zu entwickeln, der eine inhibitorische Konstante von $K_I = 0.45 \mu M$ bis 38.8 μM gegenüber verschiedener Galactosyltransferasen besitzt. Dabei befand sich unter den untersuchten GTs auch GTB, welche durch den Inhibitor mit $K_I = 2.4 \mu M$ in Gegenwart des Donorsubstrats UDP-Gal gehemmt wurde (Abbildung 8).^[40]

Abbildung 8: Donorsubstratanaloger Inhibitor für Galactosyltransferasen, der die Bindungstasche des Basenfragments nutzt. Durch Derivatisierung an der 5-Position innerhalb der Pyrimidinbase von UDP-Gal wurde eine Inhibition der $\alpha(1,4)$ -Galactosyltransferase (*Neisseria meningitidis*) mit $K_I = 0.45 \, \mu M$ in Gegenwart von UDP-Gal erhalten. [40]

Im Gegensatz dazu sind nur wenige Inhibitoren bekannt, die in einem befriedigendem Ausmaß spezifisch die Donor- und Akzeptorbindungstasche besetzen. Dies liegt vorrangig an mangelnder Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der meisten GTs. Weiterhin erschwert die Komplexität der katalysierten Reaktion und der vielfach variierenden Faktoren, die Einfluss auf die Katalyse nehmen, die Suche nach einem Inhibitormolekül. Letzteres bedeutet, dass Donor- und Akzeptorsubstrat bekannt sein müssen, da deren Struktur maßgeblich für Affinität und Spezifität verantwortlich ist. Zudem ist es hilfreich, die An- oder Abwesenheit eines bivalenten Kations zu kennen, um das Design daraufhin abstimmen zu können. Nicht zuletzt die Konfiguration des anomeren Zentrums des Produkts, die je nach GT unterschiedlich sein kann, erschwert die Suche nach einem hochspezifischen Inhibitor. Der erste bekannte bisubstratanaloge Inhibitor ist ein Überganzustandsanalogon, welches für die α(1,2)-Fucosyltransferase entwickelt worden ist (Abbildung 9). Die Bestimmung der inhibitorischen Konstante ergab einen Wert von $K_I = 16 \,\mu\text{M}$ in Anwesenheit des Donorsubstrats GDP-Fucose und $K_I = 2.3 \,\mu\text{M}$ bezogen auf Phenyl β-D-Galactopyranosid. [41]

Abbildung 9: Bisubstratanaloger Inhibitor für die $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase. Der Übergangszustand wird simuliert, indem das Nucleotid des Donorsubstrats GDP-Fuc kovalent über eine kurze Alkylkette an die 2-Position des Akzeptorglycosids gebunden ist. [41]

Von der kleinen Anzahl an bekannten bisubstratanalogen Inhibitoren sind die Wenigsten für nicht invertierende GTs entwickelt worden. Dies liegt an der erschwerten Realisierung der richtigen Konfiguration, da in diesem Fall das natürlich entstehende Produkt dieselbe Konfiguration am anomeren Zentrum des übertragenden Zuckers wie des Donorsubstrats aufweist. Durch Schmidt *et al.* wurde ein Bisubstratanalogon für die $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase des Schweins synthetisiert, in dem dieses Problem durch eine C-glycosidische Bindung zwischen UDP und der D-Galactose des Akzeptorsubstrats gelöst wurde (Abbildung 10). Die Aktivität des Enzyms konnte mit einem IC $_{50} \approx 5 \,\mu\text{M}$ gehemmt werden. [42]

Abbildung 10: Bisubstratanaloger Inhibitor für die $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase des Schweins. Der Nucleotidteil des Donorsubstrats ist über eine C-glycosidische Bindung mit der terminalen D-Galactose des Akzeptorsubstrats verknüpft.^[42]

Da bestimmte Oligosaccharidstrukturen innerhalb der Zellkommunikation und -differenzierung eine entscheidende Rolle spielen und bei vielen Krankheiten, wie z.B.

EINLEITUNG

Darmkrebs eine wichtige Funktion übernehmen, ist das Interesse an gezielter Hemmung bestimmter GTs sehr hoch.

1.4.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Die Suche nach einem neuen Wirkstoff erweist sich häufig als schwierig und komplex, da der Anspruch an ein solches Molekül für den Einsatz als Medikament sehr hoch ist. So wird neben der Spezifität und Wirksamkeit auch dessen Bioverfügbarkeit, die Länge der Wirksamkeit des Medikaments am Zielort und eine möglichst geringe Toxizität benötigt. Um den Aufwand weitestgehend zu minimieren und Projekte möglichst effizient zu gestalten, sind in den letzten Jahrzehnten verschiedene Konzepte verwendet und auch wieder aufgegeben worden. Seit Anfang der 1990er Jahre wurde aufgrund der fortschreitenden Entwicklung von automatisierter Synthese- und Analysemöglichkeiten durch das *high throughput screening* (HTS) eine Vielzahl an Verbindungen dargestellt. Trotz kleinerer Erfolge wurde jedoch sehr schnell klar, dass auch eine Erhöhung des Durchsatzes die Suche nach einem geeigneten Wirkstoff nicht erleichtern wird. Ein anderer Ansatz verfolgt die Einteilung von Molekülen nach ihren "drug-like" Eigenschaften, in dem Wirkstoffe, die die klinische Phase erfolgreich durchlaufen haben, nach ähnlichen Merkmalen kategorisiert worden sind. Von diesen Kategorisierungen ist die *Lipinski rule of five* für oral verabreichte Medikamente die bekannteste.

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign setzt, im Gegensatz zum kombinatorischen Ansatz, die Kenntnis (durch eine vorhandene Kristallstruktur) oder detaillierte Vorstellung (durch ein Homologiemodell) der dreidimensionalen Struktur des zu inhibierenden Rezeptors voraus. Dabei wird diese Struktur genutzt, um durch computergestützte Analysen Ligandstrukturen für diese Rezeptoren zu entwickeln. [46-49] Diese Technik ist vor allem auf die Verbesserung und Leistungsfähigkeit von Computern und Expressionssystemen zurückzuführen und lässt sich generell in einem Ablaufzyklus wie folgt beschreiben (Abbildung 11): Mit der bekannten 3D Struktur des Rezeptors wird durch computergestützte *molecular modeling* Experimente ein Ligand entworfen, der sich, von seiner Struktur und seinem energetischen Verhalten im virtuellen Bindungsfall, gut in die Bindungstasche einfügt. Dieser virtuelle Ligand wird anschließend synthetisiert und dann in Gegenwart des Rezeptors getestet. Liganden, die im

EINLEITUNG

"Ernstfall" ein Bindungsereignis mit ihrem eigentlichen Zielmolekül eingegangen sind, werden nun demselben Zyklus zur Optimierung unterworfen. [49]

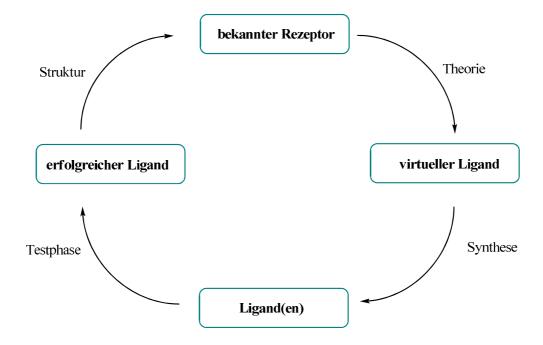


Abbildung 11: Genereller Ablauf für die strukturbasierte Entwicklung eines Liganden mit computergestützten Methoden. Für einen bekannten Rezeptor wird in der Theorie ein Ligand entworfen. Weist der virtuelle Ligand bestimmte, im Vorfeld festgelegte Merkmale auf, wird er synthetisiert und gegenüber dem Rezeptor getestet. Findet nun ein Bindungsereignis zwischen beiden Molekülen statt, kann die Struktur des Liganden für weitere Optimierung genutzt werden und erneut in den Zyklus eingehen. [49]

2 Aufgabenstellung

Glycanstrukturen sind an der Zellerkennung und der Zellkommunikation beteiligt. Diese für die zellulären Prozesse fundamental wichtigen Naturstoffe werden von Glycosyltransferasen (GTs) synthetisiert, die innerhalb ihrer katalysierten Reaktion hochspezifisch einen NDP-oder NMP-aktivierten Zucker auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Diese im Golgi lokalisierten Enzyme bilden glycosidische Bindungen unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum.

Für das Verständnis und die Aufklärung der Details des Katalysemechanismus sind Inhibitoren ein attraktives Werkzeug, um diese Klasse an Enzymen zu untersuchen. Zudem veranlasste die Erkenntnis, dass Glycanstrukturen bei Krankheiten, wie z.B. Krebs, eine Rolle spielen, eine verstärkte Suche nach spezifischen Glycosyltransferase-Inhibitoren. Bis heute ist die Suche nach einem passenden Inhibitor, der nur eine spezifische GT hemmt, sehr schwierig, da nur einige wenige dreidimensionale Strukturen von wenigen GTs gelöst sind. Zudem ist die Reaktion durch die Beteiligung von zwei Substraten und einem (bzw. keinem) bivalenten Kation als Cofaktor recht komplex. Ist ein Kation an der enzymatischen Reaktion beteiligt, wird dieses durch die Pyrophosphateinheit des Donorsubstrats koordiniert. Da neben der koordinativen Fähigkeit auch die Affinität des Donorsubstrats zu dem Zielenzym über die Diphosphateinheit beeinflusst wird, besitzt dieses Fragment in der Entwicklung eines Inhibitors eine Schlüsselrolle. Jedoch ist gerade diese polare Gruppe für einen membrangängigen Inhibitor gänzlich ungeeignet und macht die Suche nach einem Inhibitor, der am Zielort innerhalb der Zelle wirken soll, mühselig.

Da GTs, die denselben Zucker auf ein Akzeptorsubstrat übertragen, auch das identische Donorsubstrat nutzen, ist die Suche nach einem spezifischen Enzyminhibitor zusätzlich erschwert. Dies bedeutet für eine Verbindung, die nur das Donorsubstrat mimikriert, dass mit diesem Molekül immer eine Klasse an GTs angesprochen wird. Auch wenn die Affinität eines Inhibitors vorrangig über den donorsubstratanalogen Teil des Inhibitors gesteuert werden wird, kann die Spezifität gegenüber einer einzigen GT nur über die Miteinbeziehung des Akzeptors des Enzyms in einem Inhibitormokelül kontrolliert werden, da hier der größte Anteil an Spezifität gegenüber der Transferreaktion lokalisiert ist.

Somit ergibt sich die höchste Effizienz der Inhibition einer GT durch die Kombination der Eigenschaften beider Substrate, indem die hohe Affinität des Donorsubstrats und die

AUFGABENSTELLUNG

Spezifität des Akzeptorsubstrats in einem bisubstratanalogen Inhibitor vereinigt wird. Bis heute gibt es nur einige Beispiele von bisubstratanalogen Inhibitoren, die eine befriedigende Selektivität gegenüber einer einzigen GT zeigen.

Da die 3D Struktur der humanen Blutgruppe-B-spezifischen Galactosyltransferase (GTB) bekannt ist und erste mechanistische Studien veröffentlicht sind, ist dieses Enzym ein attraktives Modellsystem, um spezifische, auf der Basis von diesen Strukturinformationen beruhende Inhibitoren zu entwickeln und zu testen. GTB katalysiert den Transfer eines D-Galactopyranosylrestes von UDP-Galactose (UDP-Gal) auf die *O3*-Position des terminalen D-Galactopyranosids des H-Antigens, wodurch die Bildung des Blutgruppe B Antigens resultiert. Bei dieser Reaktion ist ein bivalentes Kation involviert.

Innerhalb dieser Arbeit sollte ausgehend von Harnsäurederivaten, die sich als potenzielle Uracilmimetika verwenden lassen können, Inhibitoren entwickelt, synthetisiert und gegenüber GTB untersucht werden, die sich schrittweise von einem UDP Mimetikum zu einem bisubstratanalogen Inhibitor für GTB erweitern lassen. Da der Ersatz des UDP-Fragments innerhalb des Donorsubstrats UDP-Gal ein kritischer Punkt in der Entwicklung eines erfolgsversprechenden Inhibitors ist, sollte hier ein besonderer Schwerpunkt gelegt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

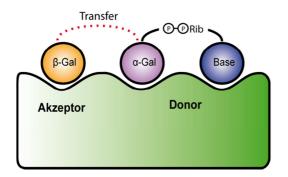
Glycosyltransferasen (GTs) katalysieren den spezifischen Transfer eines Monosaccharids auf ein Akzeptorsubstrat. Für diese Reaktion beinhaltet das aktive Zentrum einer GT eine Bindungstasche für einen Kohlenhydratrest eines Akzeptorsubstrats und eine Bindungstasche für das Donorsubstrat, wobei beide räumlich sehr nahe zueinander angeordnet sind. Wenn beide Substrate gleichzeitig gebunden sind, wird das katalytische Zentrum durch eine Peptidschleife geschlossen und die Übertragung der Kohlenhydrateinheit kann erfolgen. Für die Erkennung der eigenen Substrate verwendet jede GT verschiedene Fragmente der Substrate. So geht die Affinität zum Donorsubstrat vorrangig aus der Erkennung des Nucleotidteils hervor, während jede GT hochspezifisch ihr entsprechendes Akzeptorsubstrat erkennt. Dabei nutzen alle GTs, die eine bestimmte Monosaccharid-Einheit übertragen, auch das gleiche Donorsubstrat. [2,4] Möchte man nun gezielt einen Inhibitor entwickeln, der hochspezifisch nur eine bestimmte GT hemmt, so muss dieser gleichzeitig die Donor- und Akzeptorbindungsdomäne besetzen. Im Gegensatz dazu lässt sich eine ganze Glycosyltransferasen-Klasse inhibieren, indem nur die Bindungstasche des Donorsubstrats blockiert wird, da alle das gleiche Substrat verwenden. Im Falle von Galactosyltransferasen bedeutet dies, dass die Synthese eines Analogons von UDP-Gal für die gezielte Inhibierung dieser Familie an GTs ausreichend wäre.

In einem strukturbasierten Ansatz zur Entwicklung von Inhibitoren für Glycosyltransferasen sollten schrittweise folgende Punkte berücksichtigt werden:

- 1. Der Inhibitor sollte eine ausreichend hohe Affinität gegenüber dem Enzym besitzen.
- 2. Der Inhibitor sollte eine hohe Spezifität gegenüber einer einzigen Glycosyltransferase Familie aufweisen, z.B. Galactosyltransferasen.
- 3. Der Inhibitor sollte mit hoher Spezifität nur ein einziges Enzym hemmen, z.B. GTB, was eine hohe Donor-und Akzeptorspezifität des Moleküls voraussetzt.

Da GTs zu den Transmembranproteinen zählen und innerhalb der Zelle normalerweise im Golgi lokalisiert sind, sollte der Inhibitor in der Lage sein, Zellwände und Membranen der Zellkompartimente zu überwinden, um so sein Zielenzym erreichen zu können. Diese Voraussetzung hat Allgemeingültigkeit für alle Inhibitoren, die in biologischen Systemen eingesetzt werden sollen.

Je nachdem, welche dieser Grundvoraussetzungen erfüllt sind, resultieren daraus Inhibitoren, die sich in ihrer Spezifität gegenüber GTs unterscheiden. Durch Erfüllung der ersten Voraussetzung, d.h. eine hinreichende Affinität zum Enzym, würde sich ein Mimetikum ergeben, das spezifisch die Bindungstasche des Nucleotids des Donorsubstrats besetzen würde, da der größte Beitrag an Affinität aus diesem Teil des Moleküls resultiert. Bezieht man den zweiten Punkt mit ein, würde sich der Inhibitor an eine Klasse an GTs wenden und es ergäbe sich daraus ein donorsubstratanaloger Inhibitor. Ein Inhibitor, der alle drei Punkte erfüllen kann, sollte hochspezifisch nur mit einem Enzym eine inhibitorische Bindung eingehen, z.B. GTB (Abbildung 12).



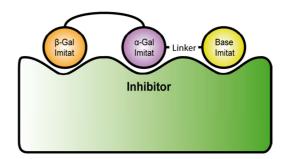


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Konzepts zur Inhibierung von Glycosyltransferasen am Beispiel der GTB. *Links*: GTB (grün) besitzt je eine Bindungstasche für die Kohlenhydratstruktur des Akzeptorsubstrats (orange), für die zu übertragende D-Galactoseeinheit des Donorsubstrats (violett) und eine Erkennungsdomäne für die Nucleotidbase (blau). Die Übertragung (rot gepunktete Linie) der Zuckereinheit erfolgt bei gleichzeitiger Bindung beider Substrate. *Rechts*: Das aktive Zentrum von GTB (grün) wird durch einen Inhibitor besetzt. Die Bindungsstelle der Kohlenhydratstrukturen des Akzeptor- und des Donorsubstrats sind durch Molekülfragmente blockiert, die kovalent miteinander verknüpft sind und die natürlichen Kohlenhydrate mimikrieren (orange und violett). Dieses Fragment ist über eine nichtionische Einheit (Linker) an eine modifizierte Base (gelb) gebunden, die eine erhöhte Affinität im Vergleich zur natürlichen Nucleobase von GTB mitbringt.

Da im Nucleotid durch die Pyrophosphateinheit ein energiereicher Anteil des UDP-Gals vorliegt, der in diesem Fall zusätzlich mit einem bivalenten Kation wechselwirkt und einen signifikanten Anteil an der Affinität zur GTB besitzt, muss gewährleistet sein, dass ein Inhibitor ohne die Pyrophosphatgruppe in der Lage ist, diesen Teil ohne einen starken Verlust an Bindungsaffinität hinreichend zu ersetzen. Dieser Teil des Donorsubstrats beinhaltet mit dem Nucleosid durch die D-Ribose ein weiteres hochpolares Fragment, welches schließlich die für die Affinität benötigte Base trägt. Dies bedeutet, dass für die Bioverfügbarkeit eines geeigneten Inhibitors dieses polare Fragment oder aber zumindest die Diphosphatgruppe durch ein nichtionisches Fragment ersetzt werden muss. Soll dieses Fragment in weiteren Studien genutzt werden, um darauf aufbauend ein donorsubstratanalogen bzw. bisubstratanalogen Inhibitor zu entwickeln, so sollte der Strukturersatz eine Möglichkeit

beinhalten, die D-Galactose des Donorsubstrats und des Akzeptorsubstrats passend zu positionieren.

Im Folgenden wird die schrittweise Entwicklung von einem Strukturfragment zu einem bisubstratanalogen Inhibitor für die GTB beschrieben. Dabei werden im ersten Teil dieser Arbeit das Design, die Synthese und die anschließende Analyse von UDP-Mimetika vorgestellt, die dann in das Konzept eines donorsubstratanalogen Inhibitors eingehen, welcher im zweiten Teil beschrieben wird. Dieser sollte in der Lage sein, eine Klasse, d.h. Galactosyltransferasen zu hemmen. Um zu überprüfen, ob die synthetisierten UDP-Mimetika sowie das UDP-Gal Mimetikum auch experimentell diese postulierten Eigenschaften mitbringen, wird in einem dritten Teil die Hemmung gegenüber der humanen Blutgruppe-Aspezifischen N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA), inklusive der Entwicklung eines NMR basierten Inhibitionsassys, vorgestellt. Schließlich wird dann gezeigt, wie der donorsubstratanaloge Inhibitor durch rationales Design in das Konzept eines bisubstratanalogen Inhibitors eingebunden werden kann.

3.1 Design, Synthese und Analyse von UDP analogen Inhibitoren

3.1.1 *In silico* Analyse von Harnsäurederivaten als UDP Mimetika

Untersuchungen zur Bindungsaffinität des natürlichen Donorsubstrats UDP-Gal zu GTB mittels NMR haben ergeben, dass vor allem die Nucleotidbase Uracil vorrangig für die Affinität verantwortlich ist, die durch die Anwesenheit der Ribosyl- und Diphosphateinheit erhöht wird. Im Gegensatz dazu wird die Spezifität durch die Erkennung der Kohlenhydratstrukturen, im Fall von GTB den α -D-Galactopyranosylrest des Donorsubstrats und das β -D-Galactopyranosylfragment des H-Antigens, hervorgerufen. [28,34]

Da Uracil die Schlüsselrolle bezüglich der Affinität des Donorsubstrats einnimmt, wurde in *docking* Studien und unterstützenden STD NMR Experimenten durch J. Albers nach alternativen Strukturfragmenten für die Nucleotidbase gesucht, die eine erhöhte Affinität zur GTB aufweisen, indem sie den Platz in der Bindungstasche besser ausnutzen sollten als die natürliche Base. Es stellte sich heraus, dass Harnsäure mit einer inhibitorischen Konstante von $K_I = 1.7$ mM in Gegenwart von Uracil ein guter Kandidat für den Ersatz des Uracils war.

Virtuelle Fragment-Evolution resultierte schließlich in 9-N-Pentitylharnsäurederivaten, die in der Lage sein sollten, nicht nur die Pyrophosphat-Einheit, sondern auch den Ribosylteil des Nucleotids zu überbrücken. Dieses Ergebnis wurde mit dem docking von 9-D-Ribityl-1,3,7trihydro-2,6,8-purintrion (1) untermauert. Mit diesem Molekülfragment sollte es möglich sein, für **D**-Galactose zu positionieren, dass die Bindungstasche dieses eine SO Kohlenhydratfragment durch den Zucker oder ein entsprechendes Mimetikum besetzt werden kann. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in einem docking Experiment die Bindungsenergie von 9-(5-O-α-D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8trion (3) gegenüber GTB geprüft und es konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur die Galactose gut in der Bindungstasche positioniert, sondern auch die berechnete Bindungsenergie eine verstärkte Bindung von 3 zu GTB (verglichen mit 1) aufzeigte. [50]

Da seit 2008 eine neue Röntgenkristallstruktur der GTB zugänglich ist, wurde eine erneute Bewertung und eine Ergänzung der *in silico* Daten, die J. Albers berechnet hatte, vorgenommen. In dessen Arbeit wurde mit einem Homologiemodell, das sich aus der Kristallstruktur von GTB aus dem Jahr $2002^{[27]}$ und transfer-NOE NMR Daten zusammensetzte, genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde GTB in der geschlossenen Form (BBBB, pdb: 2rj8)^[29] verwendet und die Analyse mit dem *molecular modeling* Programm SYBYL (Tripos) durchgeführt. Nicht aufgelöste Bereiche, die vor allem die hochflexible *loop* (Aminosäuren 177-195) betreffen, wurden in einem Homologiemodeling ergänzt.^[51] Das bivalente Manganion in der Bindungstasche wurde, wie von F. Niemeyer beschrieben, als starres Aggregat zwischen den Aminosäuren Asp211, Asp 213 und dem Metallion definiert, um Deformierungen des Proteins während des Minimierungsvorgangs zu vermeiden.^[51] Die Partialladungen des Proteins wurden mit Amber und die des Liganden nach Gasteiger-Marsili berechnet. Als Kraftfeld diente das Tripos-Kraftfeld, indem die Minimierung in 1000 Iterationsschritten bzw. bis zu einer Energieänderung von $\Delta E = 0.05$ kcal/mol durchgeführt wurde.

Die minimierten Strukturen wurden nun mit der Lage und der Bindungsenergie von UDP-Gal in der Donorbindungstasche von GTB im berechneten Modell verglichen. Dazu wurde das Donorsubstrat aus einer Kristallstruktur einer Chimäre von GTB (AABB, pdb: 2rj7)^[29] extrahiert, in der das Substrat erstmalig cokristallisiert werden konnte. In dieser chimären Proteinstruktur sind zwei von vier Aminosäuren, in denen sich GTB von der humanen Blutgruppe A spezifischen *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) unterscheidet, durch die aus GTA substituiert.^[29] Da beide Enzyme höchst homolog sind, kann davon ausgegangen

werden, dass die Bindung von UDP-Gal in GTB analog zu der Bindung in dem mutierten Protein sein wird. In Abbildung 13 ist UDP-Gal in der Bindungstasche des Donorsubstrats von GTB gezeigt.

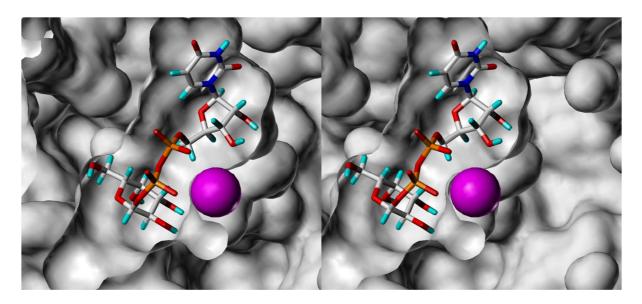


Abbildung 13: *Crossed-eye* Darstellung von UDP-Gal (extrahiert aus pdb: 2rj7)^[29] in der Bindungstasche für das Donorsubstrat von GTB. Die Affinität der Bindung von UDP-Gal (*atom-type*) ist vorrangig von der Nucleobase (oben rechts) abhängig und wird durch die Anwesenheit des Ribosyl- und Pyrophosphatteils des Moleküls verstärkt. Die Diphosphateinheit wird durch das bivalente Mn^{2+} -Ion (magenta) koordiniert und ist an die α -D-Galactose gebunden, die in einer eigenen Bindungstasche für die Katalyse positioniert wird.

Die Bindungsenergien $E_{Bindung}$ für die Liganden an GTB wurden nach Gleichung Gl-1 berechnet.

$$E_{Bindung} = E_{PL} - E_P - E_L \tag{Gl-1}$$

mit E_{PL}: Energie des minimierten Protein-Ligand-Komplexes

E_P: Energie des Proteins

E_L: Energie des Liganden

Die so erhaltenen Bindungsenergien geben nur relative Werte an, die aber eine Abschätzung zulassen, ob ein Ligand im Vergleich zu einem Bezugsmolekül eine deutlich bessere oder schlechtere Bindungsenthalpie mitbringt. Dieses *ranking* muss aber nicht zwangsläufig der Realität entsprechen, sondern kann nur Hinweise auf erfolgsversprechende Liganden geben, die dann in einem *in vitro* Modell verifiziert werden müssen.

Aus den *docking* Studien von 2006/07 ging bereits hervor, dass 9-D-Ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (1) sich gut eignen könnte, den UDP-Rest des Donorsubstrats zu ersetzen.^[50] Dieses Ergebnis wurde in den hier durchgeführten *in silico* Experimenten bestätigt

(Abbildung 14). Das Harnsäurederivat **1** bindet mit dem Harnsäurefragment in großer Übereinstimmung mit der Lage der natürlichen Nucleobase in der Bindungsdomäne für Uracil und ist in der Lage, den hochenergetischen Pyrophosphat- und den Ribosylteil von UDP-Gal zu ersetzen.

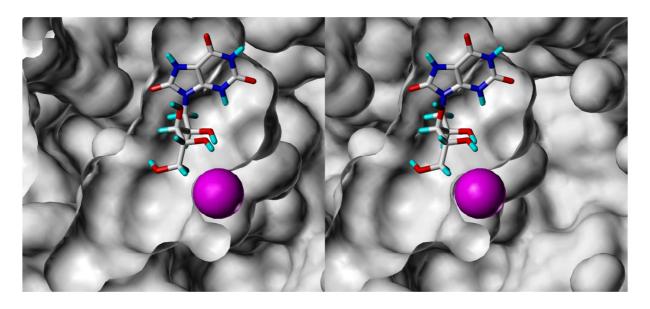


Abbildung 14: *Crossed-eye* Darstellung von 9-D-Ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (1) in der Bindungstasche für das Donorsubstrat von GTB. Das Harnsäurefragment von 1 (*atom-type*) wird in der Bindungstasche für die Nucleobase Uracil gebunden und zeigt eine gute Übereinstimmung zu der Lage des natürlichen Substrats. Die Hydroxyfunktionen des Linkerfragments könnten behilflich sein, das bivalente Mn²⁺-Ion (magenta) zu koordinieren. Die primäre Hydroxygruppe des D-Ribityllinkers ist in Richtung der Bindungstasche für die zu übertragende α-D-Galactose ausgerichtet.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass die in diesem Molekül vorhandenen polaren Hydroxyfunktionen durch Acetylierung in membranpermeable funktionelle Gruppen überführt werden können, die dann innerhalb der Zelle durch zellinterne Prozesse wieder entfernt werden und so der Inhibitor in der Zelle freigesetzt wird.

Um eine bessere Einschätzung des Einflusses des Linkerfragments hinsichtlich seiner koordinativen Eigenschaften zu gewährleisten, wurde neben 1 auch die Energie von 9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (2) in der geschlossenen Form von GTB minimiert. Beide Moleküle unterscheiden sich nur in der Stellung einer Hydroxyfunktion an C-2 der D-Pentityleinheit, was aber großen Einfluss auf die bevorzugte Konformation der Moleküle in Lösung hat. Polyalkohole bevorzugen häufig eine gestreckte Zickzack-Konformation, die aber im Falle von energetisch ungünstigen 1,3-diaxialen Wechselwirkungen umgangen wird, indem das Molekül eine sichelförmige Konformation annimmt. [52,53] Dieses Phänomen ist z.B. in D-Ribitol beobachtbar. [53] Um diese gebogene Konformation einzunehmen, ist in den acyclischen Derivaten der D-Ribose die Bindung

zwischen C-3 und C-4 so gedreht, dass die 1,3-diaxiale Wechselwirkung von den Hydroxygruppen OH-2 und OH-4 möglichst minimiert wird. Im Gegensatz dazu nehmen D-Arabinitolderivate bevorzugt die gestreckte Zickzack-Konformation der Kette ein. [52-54] Betrachtet man nun die Konformation des D-Ribitylfragments von 1 im gebundenen Zustand in der Bindungstasche der GTB, so wird deutlich, dass es sich in der für Ribitole eigentlich ungünstigen Zickzack-Konformation befindet (Abbildung 14). Diese Änderung der Konformation vom freien zum gebundenen Zustand benötigt Energie, die aufgewendet werden muss, damit der Ligand an das Protein binden kann.

Bei 2 ist die gestreckte Konformation, in der scheinbar das Pentitylfragment des Liganden durch GTB gebunden wird, die Vorzugskonformation. Dies bedeutet, dass in diesem Fall kein energetischer Verlust durch das Bindungsereignis zu erwarten sein sollte. Dies wurde durch das *in silico* Experiment bestätigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch 2 durchaus in der Lage ist, UDP im Donorsubstrat zu ersetzen (Abbildung 15). Wie bei 1 wird die Bindungstasche für das UDP der UDP-Gal gut durch das Harnsäurefragment von 2 genutzt. Der Polyolteil des Moleküls befindet sich in der Bindungsregion der Pyrophosphateinheit und endet an der Bindungstasche für die α-D-Galactose.

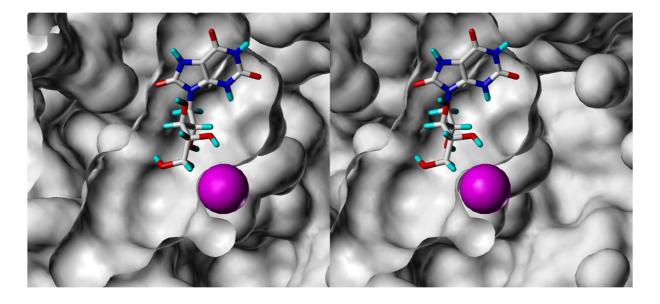


Abbildung 15: *Crossed-eye* Darstellung von 9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (2) in der Bindungstasche für das Donorsubstrat der GTB. Die Bindung von 2 (*atom-type*) wird durch die Bindung des Harnsäurefragments in der Bindungstasche für die Nucleobase bestimmt. Der D-Arabinityllinker ist so ausgerichtet, dass die primäre Hydroxyfunktion in Richtung der bindenden Domäne für die zu übertragende Kohlenhydrateinheit zeigt. Das Mn²⁺-Ion scheint nur durch eine Hydroxyfunktion des Polyolfragments koordiniert zu werden.

Die berechneten Bindungsenergien von 1 und 2 erwiesen sich in dem verwendeten Modell als virtuell identisch (Tabelle 1). Verglichen mit der berechneten Bindungsenergie des

natürlichen Donorsubstrats sind beide Liganden nicht in der Lage, mit UDP-Gal um die Bindung zu konkurrieren. Durch den Ersatz der nicht gewünschten ionischen und polaren Reste im Donorsubstrat besitzen aber beide gutes Potenzial, um als UDP-Ersatz zu wirken.

Tabelle 1: Berechnete Bindungsenergien in kcal/mol von UDP-Gal im Vergleich mit den UDP-Mimetika **1** und **2**. Im Computermodell konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem D-Ribityl- und D-Arabinitylfragment beider Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bindungsenergie festgestellt werden.

Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]
UDP-Gal	-65.65
9-D-Ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (1)	-33.70
9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (2)	-33.69

Während der *in silico* Experimente fiel auf, dass beide Moleküle unterschiedlich gut in der Lage sind, das bivalente Kation, welches für die Katalyse benötigt wird, zu komplexieren. Diese Aufgabe wird bei dem natürlichen Substrat durch die Pyrophosphatgruppe des UDP-Gals übernommen und kann nur bei 1 durch die 1,3-diaxiale Orientierung der Hydroxygruppen an *C-2-* und *C-4* übernommen werden. Diese zweizähnige Komplexierung ist in 2 nicht möglich. Eine Entscheidung zugunsten eines der beiden Verbindungen kann durch computergestützte Experimente nicht entschieden werden. Ob nun die bessere Komplexbildung des Mn²⁺-Ions in 1 zu Kosten der nicht-optimalen Konformation oder die gewünschte Konformation in 2 zu Kosten der nicht optimalen Komplexierung des Kations die Bindung zur GTB stärker beeinflusst, sollte nun durch die Synthese von 1 und 2 und anschließende Untersuchung der Substanzen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften zur GTB geklärt werden.

3.1.2 Synthese von Harnsäurederivaten als UDP Mimetika

Für die Darstellung von alkylierten Harnsäurederivaten ist je nach Alkylierungsmuster eine unterschiedliche Synthesestrategie nötig, die von der direkten Alkylierung der Harnsäure ausgehen kann oder den Aufbau des Puringerüsts erzwingt. Die Synthese von 1 und 2 (Abbildung 16) bedarf es den Aufbau des anellierten Ringsystems, da die direkte Alkylierung der *N*-9 Position an der Harnsäure nicht regioselektiv verläuft.

Abbildung 16: 9-D-Ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (1) und 9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (2) wurden nach den Ergebnissen des *molecular modeling* für die Synthese der UDP Mimetika ausgewählt. Beide Moleküle besitzen einen Polyolrest, der sich an der *N*-9 Position des Harnsäuregerüstes befindet.

Für die Synthese von 1 und 2 wurde von 6-Chloruracil (5)^[55] ausgegangen, um die selektive Alkylierung an N-9 der Harnsäure zu gewährleisten. Die Synthese von Purinderivaten stützt sich bis heute auf die Traube-Purinsynthese, die von 5,6-Diaminopyrimidinderivaten ausgeht. [56,57] Um das Puringrundgerüst zu erhalten, können 5-Nitroso- oder 5-Nitroderivate als Ausgangsverbindungen dienen. Dabei ist die Verwendung von Nitrosoderivate und anschließende in situ-Reduktion zur Aminofunktion weit verbreitet. Diese Synthesestrategie schien auf den ersten Blick einen schnelleren Zugang zu den gewünschten Harnsäurederivaten zu ermöglichen, als die für 1 publizierte Synthese, [58] da die Einführung der Nitrosogruppe an C-5 des Pyrimidingerüsts ohne vorangehende Isolierung des 6-Aminouracilderivats durchführbar ist. [59-61] So wurden 5 und D-Ribitylamin (6) für 24 Stunden in H₂O unter Rückfluss erhitzt und anschließend bei 0 °C mit Natriumnitrit bei pH 4.5 umgesetzt (Abbildung 17, oben). Jedoch konnte das Produkt 7 nicht nachgewiesen werden. Eine anschließende Überprüfung der Substitutionsreaktion im ersten Reaktionsschritt, d.h. die Bildung des 6-Aminouracilderivats, konnte nicht zweifelsfrei zeigen, Zwischenprodukt gebildet wurde. Auch die Einbeziehung der Mikrowellentechnik und Variationen der eingesetzten Temperatur und Reaktionsdauer führten nicht zum gewünschten Produkt. So wurden 5 und 6 unter veränderten Reaktionsbedingungen umgesetzt (Abbildung 17. unten).^[61]

Abbildung 17: Versuch der Synthese von 5-Nitroso-6-D-ribitylaminouracil (7) ausgehend von 6-Chloruracil (5). Oben: 5 und D-Ribitylamin (6) wurden nach Römisch und Bacher^[64] umgesetzt, wobei 7 nicht nachgewiesen werden konnte. Unten: 7 wurde unter literaturbekannten Reaktionsbedingungen erhalten.^[61]

Dazu wurden beide Edukte für eine Stunde bei 95 °C und anschließend für 2 Stunden bei 110 °C im Hochvakuum erhitzt. Der Rückstand wurde dann in Wasser aufgenommen und bei 0 °C und pH 4.5 mit Natriumnitrit versetzt. In diesem Fall wurde 7 massenspektrometrisch nachgewiesen, die Charakterisierung durch 13 C-NMR Spektroskopie erwies sich aber als kompliziert, da die quartären Kohlenstoffatome in D_2O teilweise nicht zu identifizieren waren. Zudem zeigte das Signal für C-5 eine chemische Verschiebung von $\delta=99.8$ ppm, welche eindeutig nicht einem quartären Kohlenstoffatom in dem vorliegenden Pyrimidindionderivat zuzuordnen ist. Demzufolge wurde die Synthese der Harnsäurederivate über entsprechende Nitrosoverbindungen nicht weiter verfolgt.

Da der Aufbau des Harnsäuregerüsts auch über 6-Amino-5-nitrouracilderivate möglich ist, wurde nun **5** unter Standardbedingungen nitriert, um 6-Chlor-5-nitrouracil (**8**) zu erhalten. Die Umsetzung mit D-Ribitylamin zu 5-Nitro-6-D-ribitylaminouracil (**9**) erfolgte in Anlehnung an Cresswell *et al.* mit einer Ausbeute von 68%.

Abbildung 18: Darstellung von 5-Nitro-6-D-ribitylaminouracil (9). [55,66] Als Ausgangsmaterial diente 6-Chloruracil (5), welches nach der Einführung der Nitrogruppe mit D-Ribitylamin umgesetzt wurde.

Durch die erfolgreiche Synthese von 9 wurde nun 1 nach Cushman *et al.* dargestellt.^[58] Dafür wurde 9 durch Hydrogenolyse mit Hilfe von Pd/C als Katalysator in das Diaminoderivat 10 überführt und diese hochreaktive Zwischenstufe *in situ* in das entsprechende Carbamat 11 umgesetzt. Um dieses Produkt zu erhalten, wurde 10 mit Ethylchlorformiat für 12 Stunden bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Die Cyclisierungsreaktion wurde anschließend in 0.03 M Natriumethanolat-Lösung für 24 Stunden unter Rückfluss durchgeführt. Ausgehend von 5 wurde 1 wurde erfolgreich mit einer Ausbeute von 17% über 5 Stufen erhalten (Abbildung 19).

Abbildung 19: Synthese von 9-D-Ribityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (1). Ausgehend von 9 wurde das reaktive Diaminoderivat 10 dargestellt, das ohne weitere Isolierung zu 11 umgesetzt wurde. Das Carbamat konnte anschließend mit einer Ausbeute von 88% erfolgreich zu 1 cyclisiert werden.

Die Strategie zur Darstellung von 1 wurde nun auf die Synthese von 2 übertragen und analog durchgeführt. Hierzu wurde 8 mit D-Arabinitylamin (12)^[67,68] für 24 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Das erhaltene 6-Amino-5-nitrouracilderivat 13 wurde mit einer Ausbeute von 67% erhalten. Darauf folgend wurde nun die Diaminouracilverbindung 14 und ohne weitere Isolierung 15 dargestellt. Die Cyclisierungsreaktion zum gewünschten Produkt wurde auch in diesem Fall in frisch hergestellter 0.03 M Natriumethanolat-Lösung durchgeführt und 2 mit einer Ausbeute von 80% erhalten (Abbildung 20).

Abbildung 20: Darstellung von 9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydro-2,6,8-purintrion (2). Die Umsetzung von 8 mit D-Arabinitylamin (12) ergab 13 in einer Ausbeute von 67%. Dieses Zwischenprodukt wurde nun erst zum Diaminouracilderivat 14 und *in situ* zu 15 umgesetzt. Das gewünschte Produkt 2 wurde anschließend durch Cyclisierung von 15 in 80% Ausbeute erhalten.

3.1.3 Analyse des inhibitorischen Potenzials der UDP Mimetika gegenüber GTB

3.1.3.1 Bindungsstudien mittels Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Die synthetisierten UDP Mimetika sollten in einer ersten Analyse zeigen, ob diese in der Lage sind, mit dem Zielenzym GTB eine Bindung einzugehen. Für die Überprüfung der Bindungseigenschaften bietet sich in einer ersten die Verwendung von *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Spektroskopie als geeignete Analysemethode an, um erste Informationen über das Bindungsverhalten des Liganden zu erhalten. SPR ist eine optische, biosensorische

Technik, die ohne *labeling* der zu analysierenden Bindungspartner auskommt. Dazu wird im Regelfall einer der Bindungspartner auf die Oberfläche eines Mikrofluid-Chips kovalent gebunden und der Ligand über die Oberfläche geleitet. Wenn nun ein Bindungsereignis des Liganden zum gebundenen Rezeptor stattfindet, ergibt sich eine Änderung der gebundenen Masse und daraus resultierend eine Änderung des Reflexionswinkels des eingestrahlten polarisierten Lichts. [69,70] Durch Aufnahme von der zeitabhängigen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, die als Winkelveränderung der Oberflächen Plasmonen Resonanz detektiert wird, können Sensorgramme erhalten werden, in denen zwischen Phasen der Assoziation und Dissoziation des Liganden an den immobilisierten Bindungspartner unterschieden werden kann. Die Auswertung dieser Sensorgramme ermöglicht somit die Bestimmung eines Bindungsereignisses des untersuchten Systems.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität der UDP Mimetika gegenüber der GTB wurde das Enzym auf einem Sensorchip immobilisiert (um 4000 fmol) und die UDP-Mimetika 1 und 2 in Konzentrationen von 0 bis 1 mM über die Chipoberfläche geleitet. Zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms wurde zudem UDP als natürliches Donorsubstratanalogon in Konzentrationen von 8 μ M bis 0.5 mM verwendet. Da nicht abschließend geklärt ist, ob GTB Mn^{2+} oder Mg^{2+} als bivalentes Kation benutzt und beide Ionen prinzipiell für die Katalyse in Frage kommen, $^{[34]}$ wurden die SPR Experimente mit Mn^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen 50 mM BisTris-Puffer durchgeführt. Zudem sollte auf diese Weise eine bessere Vergleichbarkeit mit den Literaturdaten (meist in der Anwesenheit von Mn^{2+} akquiriert) und der eigenen STD NMR Experimente (durch die paramagnetische Natur von Mangan kann nur Mg^{2+} genutzt werden) gewährleistet werden. Alle Experimente wurden bei 25 °C und 30 μ L/min durchgeführt.

Betrachtet man nun die erhaltenen Sensorgramme für UDP, so zeigen sie ein typisches Verhalten für eine Enzym-Substrat-Wechselwirkung, in denen sich innerhalb von Sekunden ein Gleichgewicht des Bindungszustands beider Partner nach der Injektion einstellt. Für die Messungen entsprach die immobilisierte Enzymmenge 3663 RU, woraus sich ein theoretischer RU_{max} Wert für UDP von RU_{max} = 42.77 RU ergab. Nach Beendigung der Kontaktzeit stellt sich genauso schnell wieder der Ausgangszustand ein, in dem GTB und UDP dissoziiert vorliegen (Abbildung 21). Für das untersuchte System wurde eine Assoziationskonstante k_a von $k_a = 6.9 \cdot 10^7$ M⁻¹s⁻¹ und eine Dissoziationskonstante k_d von $k_d = 2.3$ s⁻¹ bestimmt.

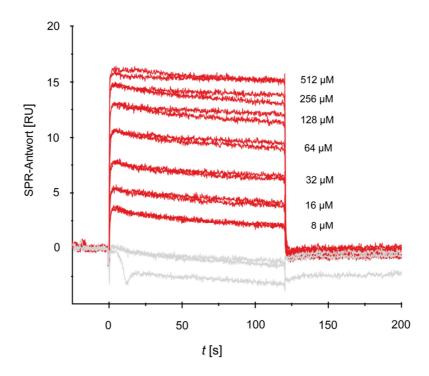


Abbildung 21: Sensorgramme der SPR Experimente von GTB in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an UDP und 5 mM Mn^{2+} als Kation (*rot*: Sensorgramme in Anwesenheit von UDP; *grau*: Sensorgramme in Abwesenheit von UDP). Gezeigt ist die SPR-Antwort in Abhängigkeit von der Zeit. Es wird sofort mit dem Beginn der Injektion des Liganden (t = 0 s) eine Assoziation registriert, die während der Injektionszeit konstant bleibt. Dies wird durch eine schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen beiden Bindungspartnern bewirkt. GTB und UDP dissoziieren nach Beendigung der Injektion innerhalb von Sekunden, was in einem starken Abfall der SPR-Antwort in den Grundzustand (t = 120 s) sichtbar wird.

Im Gegensatz dazu zeigen die Sensorgramme von $\mathbf{1}$ eine deutlich verlangsamte Assoziation des Liganden an GTB. Somit benötigt das betrachtete Enzym-Ligand-System eine deutlich längere Zeitspanne, um einen Gleichgewichtszustand des Bindungsmodus zu erreichen (Abbildung 22). Für $\mathbf{1}$ wurde eine theoretische Maximal-Antwort von $\mathrm{RU}_{\mathrm{max}} = 32~\mathrm{RU}$ bestimmt. Um zu gewährleisten, dass sich das untersuchte System in einem Bindungsgleichgewichtszustand befindet, wurde die Kontakzeit auf 300 s erhöht. Die Dissoziation betreffend, wurde Ähnliches beobachtet. Der vollständig dissoziierte Zustand zwischen GTB und Ligand wurde erst nach längerer Regenerationszeit wieder hergestellt. Die verlangsamte Assoziation und Dissoziation des Liganden konnte durch die Bestimmung der kinetischen Konstanten k_a und k_d bestätigt werden. So ergab sich für $\mathbf{1}$ für die Assoziationsgeschwindigkeit $k_a = 4.7~\mathrm{M}^{-1}\mathrm{s}^{-1}$ und für die Dissoziation vom Protein $k_d = 6.4 \cdot 10^{-4}~\mathrm{s}^{-1}$.

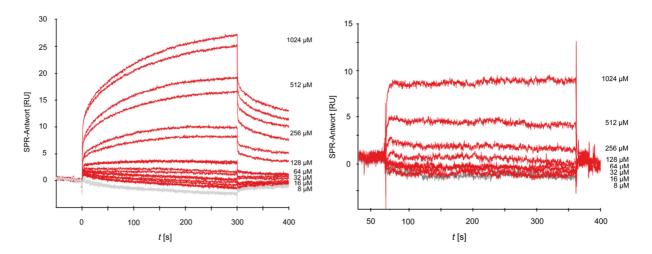


Abbildung 22: Sensorgramme der SPR Experimente von GTB in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an 1 bzw. 2 und 5 mM Mn^{2+} (rot: Sensorgramme in Anwesenheit des Inhibitors; grau: Sensorgramme in Abwesenheit von 1 bzw. 2). Links: Die Sensorgramme in Gegenwart von 1 zeigen deutlich, dass eine konzentrationsabhängige Bindung zwischen GTB und 1 stattfindet. Das Assoziationsgleichgewicht zwischen GTB und 1 stellt sich, verglichen mit UDP, nur sehr langsam ein. Nach der Injektion (von t = 0 s bis t = 300 s) erfolgt die Dissoziation des Liganden (ab t = 300 s) langsamer als der natürliche Ligand des Enzyms. Der Ausgangszustand wird erst nach einer Regenerationsphase wieder erreicht. Rechts: In Gegenwart von 2 zeigt sich, dass auch hier eine konzentrationsabhängige Bindung zur GTB stattfindet. Die Bindung zum Enzym ist jedoch schwächer ausgeprägt als bei 1.

Aus den Sensorgrammen zu erkennende Eigenschaft, langsame Assoziation und Dissoziation von 1 und GTB, zeigen, dass dieser Ligand gutes Potenzial als Inhibitor hat, da seine Verweildauer am Enzym um ein Vielfaches länger als die Bindung von UDP an GTB ist.

Aus den erhaltenen Daten wurde für **1** eine Dissoziationskonstante von $K_D = 899 \, \mu \text{M}$ in Anwesenheit von Mangan als Kation erhalten. Somit ist die daraus resultierende Affinität des Liganden in etwa 18-mal schwächer, als die Bindung des natürlichen Substrats UDP-Gal $(K_D \approx 50 \, \mu \text{M})$; N. Sindhuwinata, mündliche Mitteilung) und um einen Faktor von 27 schwächer als UDP, dessen K_D in dieser Studie zu $K_D = 33 \, \mu \text{M}$ unter Verwendung von Mn²⁺ bestimmt wurde (Abbildung 23).

Um die Bindungseigenschaften von 2 und GTB zu überprüfen, wurde der Ligand unter gleichen Bedingungen analysiert (Abbildung 22, rechts). Hierbei stellte sich heraus, dass 2 eine schwächere Bindung zur GTB eingeht, als 1. Die Dissoziationskonstante K_D wurde in diesem Fall zu $K_D = 2.3$ mM bestimmt (Abbildung 23). Dieser Wert entspricht in etwa der inhibitorischen Konstante von Harnsäure in Gegenwart von Uracil, die zu $K_I = 1.7$ mM mittels STD NMR bestimmt wurde. [50] Im Gegensatz zu 1 konnten keine kinetischen Parameter bestimmt werden.

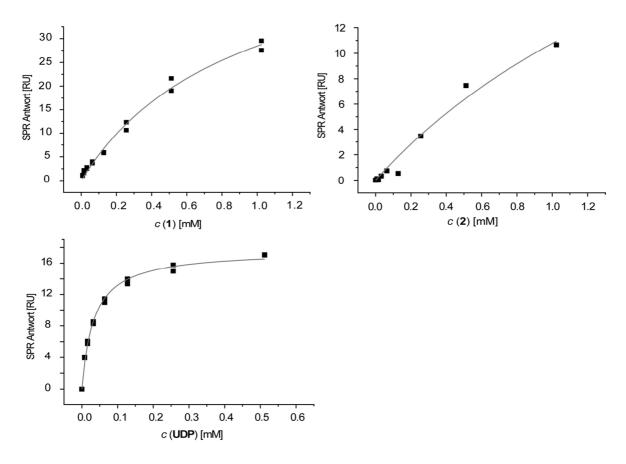


Abbildung 23: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D von UDP, **1** und **2** nach einem *one-site binding* Modell in Anwesenheit von GTB und Mn²⁺ mittels SPR. *Oben links*: Der K_D -Wert von **1** wurde zu $K_D = 899 \,\mu\text{M}$ bestimmt. *Oben rechts*: Der K_D -Wert von **2** wurde zu $K_D = 2.3 \,\text{mM}$ bestimmt. *Unten links*: Der K_D -Wert von UDP wurde zu $K_D = 33 \,\mu\text{M}$ bestimmt.

Die SPR Experimente wurden ergänzend mit Mg²⁺ als bivalentes Kation durchgeführt. Wie erwartet und beschrieben, zeigte UDP in diesem Fall eine schwächere Bindung zur GTB als in der Anwesenheit von Mangan (Abbildung 24). Dies ist auf die Komplexierung des Manganions durch die Pyrophosphat-Einheit zu erklären, die im Falle von Magnesium nicht so stark ausgeprägt ist. Die daraus resultierende Dissoziationskonstante ist mit 330 μM um einen Faktor 10 schwächer in der Anwesenheit von Mg²⁺ als Cofaktor (Abbildung 25).

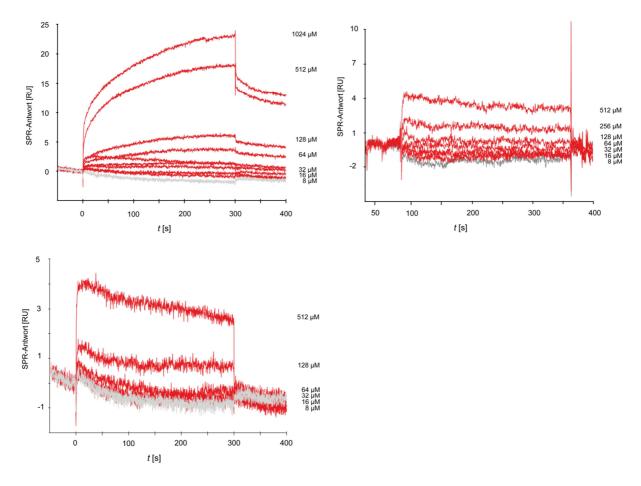


Abbildung 24: Sensorgramme von 1, 2 und UDP in Gegenwart von 5 mM Mg²⁺. *Links oben*: Sensorgramm von 1 in Gegenwart von der GTB. *Rechts oben*: Sensorgramm von 2 in Gegenwart des Enzyms GTB. *Links unten*: Sensorgramm von UDP. Die Bindung von UDP an das Enzym ist durch das anwesende Mg²⁺ im Vergleich zur Bindung in Anwesenheit von Mn²⁺ geschwächt.

Im Gegensatz dazu konnten für **1** und **2** K_D -Werte bestimmt werden, die eine deutlich erhöhte Bindung in der Anwesenheit von Magnesium aufweisen. So wurde für **1** eine Dissoziationskonstante von $K_D = 366 \,\mu\text{M}$ erhalten, während sich der Wert für den Liganden **2** auf $K_D = 828 \,\mu\text{M}$ verbesserte (Abbildung 25). Scheinbar besitzen die Hydroxygruppen in **1** und **2** eine höhere Affinität zu Magnesium, als zu Mn²⁺. Die kinetischen Parameter k_a und k_d konnten in Anwesenheit von Mg²⁺ nicht bestimmt werden.

In dieser ersten Analyse der synthetischen UDP Mimetika 1 und 2 konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen in der Lage sind, an GTB zu binden und sich als Basis für eine weitere Entwicklung eines donorsubstratanalogen Inhibitor zu dienen. Um zusätzlich zu den ermittelten K_D -Werten weitere Informationen über die Bindung zu erhalten, sollten nun STD NMR Experimente durchgeführt werden, die neben der Bestimmung des K_D -Werts zusätzlich die Bestimmung eines Bindungsepitops ermöglichen.

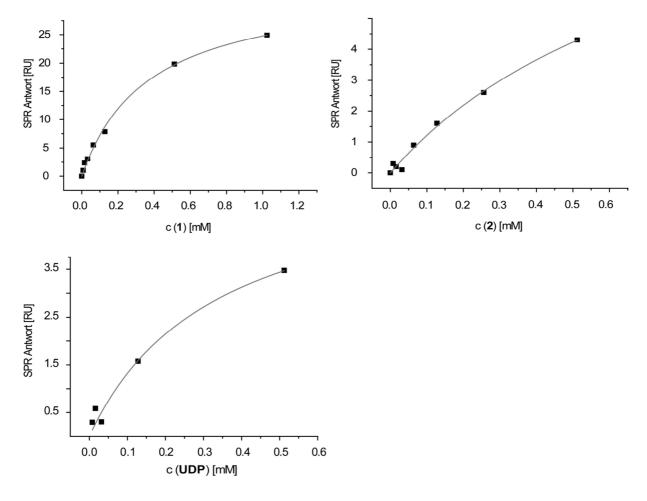


Abbildung 25: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D von 1, 2 und UDP nach einem *one-site binding* Modell in Anwesenheit von GTB und Mg²⁺ mit Hilfe von SPR. *Links oben*: Der K_D -Wert von 1 wurde zu $K_D = 366 \,\mu\text{M}$ bestimmt. *Rechts oben*: Der K_D -Wert von 2 wurde zu $K_D = 828 \,\mu\text{M}$ bestimmt. *Links unten*: Der K_D -Wert von UDP wurde zu $K_D = 330 \,\mu\text{M}$ bestimmt.

3.1.3.2 Bindungsstudien mittels Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

Die Nutzung eines zweiten Verfahrens zur Bestimmung der Dissoziationskonstante sollte die SPR Experimente verifizieren. Dies sollte durch die Verwendung von Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spektroskopie durchgeführt werden. Die Methode der STD NMR Spektroskopie ermöglicht es, die Bindung eines kleinen Liganden an ein Protein zu beobachten, ohne beide Bindungspartner chemisch zu verändern. Dabei wird das Bindungsereignis von Seiten des Liganden betrachtet. Das Verfahren beruht auf der Möglichkeit, das Protein gezielt durch einen Puls zu sättigen und diese Sättigung auf einen gebundenen Liganden durch Spindiffusion zu übertragen. Diffundiert der gesättigte Ligand wieder in Lösung, kann dieser Zustand detektiert werden. Das STD Spektrum ergibt sich nun

aus der Differenz von zwei Spektren, in denen das Protein je einmal gesättigt (*on-resonance*) und ungesättigt (*off-resonance*) vorliegt. Da die Sättigungsübertragung vom Protein auf den Liganden in Abhängigkeit von der räumlichen Nähe der einzelnen beobachteten Molekülfragmente stattfindet, kann über diese Methode zusätzlich ein *epitope mapping* durchgeführt werden, in dem die für die Bindung wichtigsten Strukturelemente bestimmt werden können.^[71,72]

Da dieses Verfahren auch in Anwesenheit mehrerer konkurrierender Liganden möglich ist, kann durch kompetitive Titration mit einem natürlichen Substrat(-analogon) der *IC*₅₀-Wert eines Inhibitors bestimmt werden. Gleichzeitig wird durch die Konkurrenzsituation deutlich, ob der potenzielle Inhibitor an der gewünschten Stelle (hier in der Bindungstasche des Donorsubstrats) bindet. Wird ein STD Effekt des natürlichen Substrats beobachtet, der sich abhängig von der Inhibitorkonzentration abschwächt, kann davon ausgegangen werden, dass dieselbe Bindungstasche besetzt wird. Der gegenteilige Fall würde darauf hindeuten, dass der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms bindet.

Zur Bestimmung des K_D -Werts wurden die STD NMR Experimente mit 19 μ M GTB in 50 mM BisTris- d_{19} Puffer durchgeführt. Da sich Mangan durch seinen paramagnetischen Charakter nicht für NMR spektroskopische Untersuchungen eignet, wurden alle NMR Experimente in Gegenwart von 10 mM Mg²⁺-Ionen durchgeführt. Das UDP Analogon **1** wurde in Konzentrationen von 0.45 bis 1.5 mM verwendet, was einem Ligandenüberschuss gegenüber dem Protein von 24 bis 87 entspricht. Aus den erhaltenen Daten konnte durch Auftragung der Ligandkonzentration gegen den STD-Amplifikationsfaktor eine Dissoziationskonstante von $K_D = 205 \,\mu$ M für H-2' bestimmt werden (Abbildung 26).

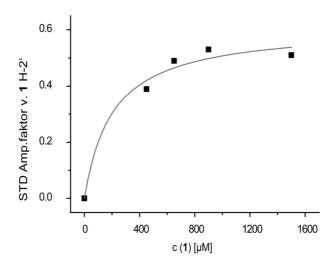


Abbildung 26: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D von **1** mit Hilfe von STD NMR Spektroskopie. Die Experimente wurden mit 19 μ M GTB in BisTris- d_{19} und bei 298 K durchgeführt. Der Ligandenüberschuss an **1** gegenüber der Konzentration an GTB betrug 24 bis 87. Der K_D -Wert wurde nach einem *one-site binding* Modell zu $K_D = 205 \,\mu$ M bestimmt.

Die Berechnung des STD Amplifikationsfaktors erfolgte nach Gl-2.

$$STD_{Amp} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \frac{[L]_{ges}}{[P]_{ges}}$$
 (Gl-2)

mit I_0 : Signalintensität im *off-resonance* Spektrum

I_{sat}: Signalintensität im *on-resonance* Spektrum

[L]_{ges}: Gesamtkonzentration des Liganden

[L]_{ges}: Gesamtkonzentration des Proteins

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante von **2** wurde das gleiche Puffersystem und dieselbe Konzentration an GTB wie bei **1** genutzt (19 μ M GTB in 50 mM BisTris- d_{19} und 10 mM MgCl₂). Die Konzentration von **2** wurde zwischen 0.25 und 1.5 mM variiert, was einem Ligandenüberschuss von 13 bis 87 entspricht. In diesem Fall wurde die Dissoziationskonstante auf $K_D = 388 \,\mu$ M bestimmt (Abbildung 27).

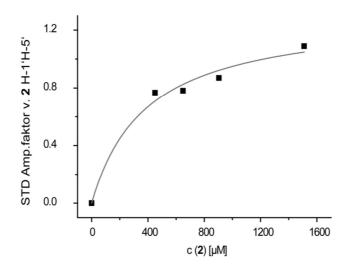


Abbildung 27: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D von **2** mit Hilfe von STD NMR Spektroskopie. Die Experimente wurden mit 19 μ M GTB in BisTris- d_{19} und bei 298 K durchgeführt. Der Ligandenüberschuss an **2** gegenüber der Konzentration an GTB betrug 13 bis 87. Der K_D -Wert wurde nach einem *one-site binding* Modell zu $K_D = 388 \,\mu$ M bestimmt.

Damit ist der K_D -Wert von 2 um einen Faktor von zwei höher als der für 1 erhaltene Wert. Trotz der Differenz sind die erhaltenen Werte im Einklang mit den SPR Experimenten, in denen 1 eine bessere Bindung zur GTB eingeht als 2. Zudem scheint die Diskriminierung durch das Enzym zwischen beiden Molekülen nicht allzu groß zu sein, was durch die *in silico* berechneten Bindungsenergien vorhergesagt wurde.

So ist auch das Bindungsepitop beider Moleküle sehr ähnlich. Das *epitope mapping* wurde mit 19 µM GTB und 1.5 mM **1** bzw. **2** in BisTris- d_{19} durchgeführt. Da in deuterierten Lösungsmitteln NH- und OH-Protonen gegen Deuterium austauschen, ist die Bestimmung des Epitops des Harnsäurefragments der Inhibitoren nicht möglich. Dementsprechend konnte nur für das Linkerfragment eine Aussage getroffen werden. Im Falle von **1** konnte gezeigt werden, dass die Protonen H-1', H-2' und H-4' die größte Nähe zu dem Enzym aufweisen Ähnliches gilt für **2** (Abbildung 28). Hier sind es die Protonen H-1' und H-2', die den höchsten STD Effekt im Vergleich zu allen anderen betrachteten Protonen des Moleküls zeigen. Bei den betrachteten Verbindungen zeigte sich in beiden Fällen, dass H-2' am nächsten zur GTB lokalisiert ist, gefolgt von H-1'. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die unterschiedliche Stereochemie an C-2' keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsepitop des Liganden zu haben scheint.

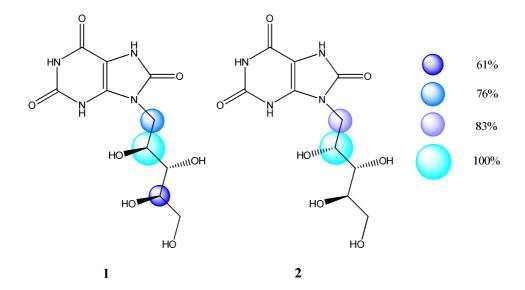


Abbildung 28: Bestimmung des Bindungsepitops von **1** und **2** in Gegenwart von 19 μM GTB. Das Harnsäurefragment konnte auf Grund seiner nicht detektierbaren NH-Protonen nicht untersucht werden. Das Bindungsepitop beider Liganden stellte sich als sehr ähnlich heraus. In beiden Fällen ist das Proton *H-2* ' am nächsten zur GTB lokalisiert, gefolgt von *H-1*'. Die unterschiedliche Stereochemie an *C-2* ' scheint somit keinen sichtbaren Einfluss auf das Bindungsepitop der Verbindungen zu haben.

3.1.3.3 Analyse der Konformation der UDP Mimetika 1 und 2 in Lösung

Neben dem Einfluss der Stereochemie an C-2' beider Linkerfragmente wurde nun die Konformation der Liganden in Lösung betrachtet. Wie unter 3.1.1 erwähnt, besitzen die freien Alditole von denen sich die Zuckerfragmente von 1 und 2 ableiten (D-Ribitol und D-Arabinitol), eine stark unterschiedliche Konformation in Lösung. [52,53,73] Aus diesem Grund wurde die Konformation der Alditolreste in 1 und 2 in Lösung mittels NMR untersucht, indem die erhaltenen Kopplungskonstanten in Bis $Tris-d_{19}$ mit den veröffentlichten Daten von Horton et al. [53,73] verglichen wurden. Dabei wurden die Kopplungskonstanten nur nach erster Ordnung analysiert. Einen wichtigen Hinweis auf die vorliegende Konformation des Linkerfragments liefert die Kopplung zwischen H-3' und H-4'. Die theoretischen Kopplungskonstanten würden für diese Kopplung in der Zickzack-Konformation eine Konstante von $^{3}J = 9.8$ Hz (Zickzack entspricht trans) erwarten lassen und für die sichelförmige Konformation eine Kopplungskonstante von $^{3}J = 3.6$ Hz (gebogene Konformation entspricht gauche). In der Verbindung 1 wurde sie zu ${}^{3}J_{H3'/H4'} = 6.7$ Hz bestimmt (Abbildung 29, oben). Diese Kopplungskonstante scheint somit eine Mischung der Zickzack- und der sichelförmigen Konformation widerzuspiegeln, in denen beide Konformationen in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Dies bedeutet, dass 1 eine geringere

Tendenz als die bekannten D-Ribitolderivate aufweist, eine gebogene Konformation einzunehmen und zu ca. 50% in der nicht bevorzugten Zickzack-Konformation vorliegt. Betrachtet man im Vergleich D-Arabinitolderivate, so zeigen sie in Lösung bevorzugt die gestreckte Zickzack-Konformation,^[73] was sich in einer Kopplungskonstante von ${}^3J_{H3'/H4'} = 8.5$ Hz zwischen H-3' und H-4' äußert. Mit ${}^3J_{H3'/H4'} = 8.1$ Hz wurde in 2 fast genau diese Kopplungskonstante beobachtet (Abbildung 29, unten). In diesem Fall ist also davon auszugehen, dass das Pentitylfragment in 2 fast ausschließlich die Zickzack-Konformation einnimmt, in der H-3' und H-4' antiparallel zueinander angeordnet sind.

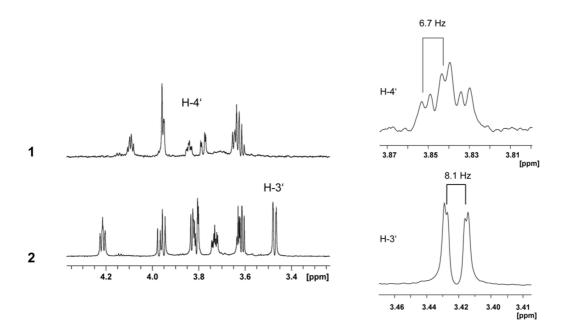


Abbildung 29: ¹H-NMR Spektren von **1** und **2** (700 MHz, BisTris- d_{19} , 298 K). *Links*: Die ¹H-NMR Spektren beider UDP Mimetika im Bereich von $\delta = 3.25$ bis 4.35 ppm. *Rechts oben*: *H-4* von **1** in einer vergrößerten Ansicht. Die Kopplungskonstante wurde zu ${}^3J_{H3'/H4'} = 6.7$ Hz bestimmt. *Rechts unten*: *H-3* von **2** in einer vergrößerten Ansicht. Die Kopplungskonstante wurde zu ${}^3J_{H3'/H4'} = 8.1$ Hz bestimmt.

Die Ergebnisse des *molecular modeling* ließen erwarten, dass das Enzym die Liganden 1 und 2 in der gestreckten Zickzack-Konformation bindet. Diese Konformation ist in 2 zu 100% und in 1 nur zu 50% zu beobachten. In Konsequenz verliert 1 einen Anteil der Bindungsenergie von etwa $\Delta G \approx 0.4$ kcal/mol nur allein durch die geringere Präsenz der bevorzugten Konformation für die Bindung an GTB. Experimentell besitzt 1 einen um den Faktor von 2 niedrigeren K_D Wert als 2 gegenüber GTB. Somit wurde davon ausgegangen, dass die Koordination des Mg^{2+} -Kations durch die zweite Hydroxyfunktion in 1 effektiver zu sein scheint. Dies entspräche einem Beitrag zur Bindungsenergie von annähernd 0.8 kcal/mol und würde den Entropie-Effekt überkompensieren.

3.1.3.4 Inhibitionsstudien mittels Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass die UDP Mimetika 1 und 2 in der Lage sind, an GTB zu binden. Um nun zu klären, ob die Verbindungen auch die Bindungstasche des Donorsubstrats besetzen, wurden kompetitive Experimente durchgeführt. Dazu wurde das natürliche Produkt UDP in verschiedenen Konzentrationen in Anwesenheit von GTB und dem jeweiligen UDP Mimetikum mittels STD NMR Spektroskopie untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass UDP und 1 bzw. 2 um dieselbe Bindungstasche konkurrieren.

Für die Bestimmung des IC_{50} Werts und der daraus resultierenden inhibitorischen Konstante K_I von **1** wurden weitere STD NMR Experimente mit 10 μ M GTB und 1 mM UDP durchgeführt. Die Konzentration von **1** wurde von 0.4 bis 2.5 mM variiert. Aus den erhaltenen Daten wurde ein IC_{50} Wert von $IC_{50} = 1.2$ mM ermittelt (Abbildung 30).

Aus dem experimentell bestimmten Wert ergibt sich nach der Cheng-Prusoff-Gleichung^[74] die konzentrationsunabhängige inhibitorische Konstante K_I nach Gleichung 3:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Ligand]}{K_D}} \tag{Gl-3}$$

mit IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration des Inhibitors

[Ligand]: Konzentration des zu kompetitierenden Liganden

 K_D : Dissoziationskonstante des Liganden

Unter vergleichbaren Bedingungen wurde durch STD NMR Experimente der K_D Wert von UDP zu $K_D = 0.43$ mM bestimmt (N. Sindhuwinata, T. Peters, persönliche Mitteilung), wodurch sich für **1** eine inhibitorische Konstante von $K_I = 361$ µM ergibt.

Auch 2 wurde hinsichtlich seines inhibitorischen Potenzials untersucht, wobei die STD NMR Experimente bei 10 μ M GTB, konstanter Konzentration an UDP (1 mM) und unterschiedlichen Konzentrationen an 2 durchgeführt wurden. Durch logarithmische Auftragung der Konzentration von 2 gegen den STD Amplifikationsfaktor von H-5 von 2 wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration von $IC_{50} = 1.9$ mM erhalten. Nach Gl-3 ergibt sich demnach für 2 eine inhibitorische Konstante von $K_I = 571$ μ M.

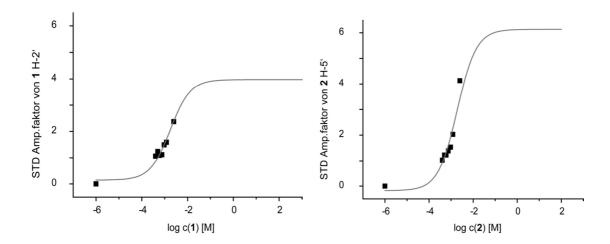


Abbildung 30: Bestimmung des IC_{50} Werts von 1 und 2 in Gegenwart von 10 µM GTB und 1 mM UDP mit Hilfe von STD NMR Spektroskopie. *Links*: Unter Verwendung eines *one-site competition* Modells wurde für 1 ein Wert von $IC_{50} = 1.2$ mM bestimmt. *Rechts*: Unter Verwendung eines *one-site competition* Modells wurde für 2 ein Wert von $IC_{50} = 1.9$ mM bestimmt.

3.1.3.5 Inhibitionsstudien mit Hilfe eines radiochemischen Enzymassays

Durch die Verwendung von einem radiochemischen Enzymassay sollte die inhibitorische Aktivität der UDP Mimetika ergänzend analysiert werden. Für die Durchführung dieses Assays wurde GTB, radioaktiv markiertes Donorsubstrat und α-L-Fuc-(1-2)-β-D-Gal-octyl als Akzeptorsubstrat eingesetzt. Durch die ¹⁴C-Markierung an C-1 des Galactosylrests in UDP-Gal kann so die Bildung des Trisaccharidproduktes mit Hilfe eines Scintillationszählers verfolgt und demnach die Inhibitionsfähigkeit der zu untersuchenden Verbindung bestimmt werden. Für die Durchführung des Assays wurde sich an Sindhuwinata et al. orientiert. [32] In diesem Assay erfolgt die Trennung von nicht umgesetzter UDP-(14C)Gal und dem radioaktiven Produkt durch die Verwendung von RP-Chromatographie, in dem das Produkt durch die Anwesenheit des Octyl-Aglycons und UDP-Gal unter unterschiedlichen Bedingungen eluiert werden. Nach der beschriebenen Durchführung des Aktivitätsassays für die GTB wurde für den Inhibitionsassay ein MOPS-Puffer, der 1 mg/mL BSA und 20 mM eines bivalenten Kations beinhaltete, als Ausgangssituation gewählt. Für die Ermittlung der idealen Bedingungen des Inhibitionsassays wurden nun verschiedene Parameter variiert. Um Ungenauigkeiten in den Messungen zu vermeiden, wurde die Enzymkonzentration so gewählt, dass nicht mehr als 10% des dpm_{max}-Werts (dpm: Zerfall pro Minute) erreicht wurde. Zudem sollte bei Zugabe des Inhibitors eine hinreichend starke Inhibition zu beobachten sein, um eine Variation seiner Konzentration und damit die Bestimmung des IC₅₀-Werts zu ermöglichen. So wurde neben der Änderung der Konzentration an GTB und

UDP-Gal auch der Einfluss der Verwendung von $\mathrm{Mn^{2+}}$ und $\mathrm{Mg^{2+}}$ untersucht, da bekannt ist, dass das natürliche Donorsubstrat eine wesentlich schwächere Bindungsaffinität in Anwesenheit von $\mathrm{Mg^{2+}}$ zu GTB aufweist, als im Beisein von $\mathrm{Mn^{2+}}$. Durch Verwendung von $\mathrm{Mg^{2+}}$ wurde erhofft, eine wesentlich deutlichere Verdrängung des UDP-Gals durch den Inhibitor beobachten zu können. Die Konzentration des H-Antigen-Disaccharids wurde stets bei seiner K_M - Konzentration ($K_M = 54~\mu\mathrm{M}$) belassen.

Tabelle 2: Allgemeine Bestimmung der Assaybedingungen für die Inhibition von GTB. Durch Variation der Enzymkonzentration c (GTB), der Donorsubstratkonzentration c (UDP-Gal) und der Inkubationszeit (t) wurde eine Einschätzung der bestmöglichen Bedingungen für den Inhibitionsassay ermöglicht. Dabei mussten alle beteiligten Reaktionspartner innerhalb der Reaktionszeit so abgestimmt sein, dass der lineare Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik nicht verlassen wurde. Die vielversprechendsten Bedingungen sind grau hinterlegt.

M^{2+}	c (GTB)	c (UDP-Gal) [μM]	c (H-Antigen Disacch.) [μM]	<i>t</i> [min]
Mg^{2+}	1 μΜ	34	54	30
Mg^{2+}	10 μΜ	34	54	30
Mg^{2+}	10 μΜ	34	54	20
Mn^{2+}	1 nM	3.4	54	10
Mn^{2+}	10 nM	3.4	54	10
Mn^{2+}	10 nM	34	54	10
Mn^{2+}	2 nM	3.4	54	20
Mn^{2+}	20 nM	34	54	20
Mn ²⁺	4 nM	3.4	54	20
Mn ²⁺	40 nM	34	54	20

Aus den in Tabelle 2 gezeigten Variationen der Assaybedingungen zeigte sich, dass sich eine Inhibition der GTB am besten bei Verwendung von 4 nM GTB in Anwesenheit von Mn^{2+} , 3.4 μ M UDP-Gal bzw. 40 nM GTB und 34 μ M UDP-Gal oder 10 μ M GTB und 34 μ M UDP-Gal bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten gut verfolgen lässt. Bei allen drei Bedingungen befand sich die Enzymaktivität bei etwa 10% des dpm_{max}-Werts, was einem Experiment im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik entspricht. Dieser wurde bei den Experimenten abhängig von der Donorsubstratkonzentration zu dpm_{max} = 51578 für 34 μ M UDP-Gal und dpm_{max} = 44809 für 3.4 μ M UDP-Gal bestimmt. Durch die Zugabe von 5 mM 1 bzw. 2 wurde die Auswahl der Assaybedingungen weiter eingeschränkt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bestimmung der Assaybedingungen durch punktuelle Zugabe der UDP Mimetika und einer Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Restaktivität von GTB bei Verwendung unterschiedlicher Assaybedingungen. Bei Zugabe von 5 mM der Inhibitoren **1** oder **2** wurde je nach gewählten Rahmenbedingungen ein unterschiedlich starker Rückgang an Enzymaktivität beobachtet. Um auch bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen eine Verringerung an GTB Aktivität detektieren zu können, wurde sich für die Inhibitionsexperimente für Mn²⁺, 4 nM GTB und 3.4 μM UDP-Gal entschieden.

\mathbf{M}^{2+}	c (GTB)	c (UDP-Gal)	Inhibitor [5 mM]	dpm	Restaktivität v. GTB
Mg^{2+}	10 μΜ	34 μΜ	-	4418	
Mg^{2+}	10 μΜ	34 μΜ	1	1955	44%
Mg^{2+}	10 μΜ	34 μΜ	2	2135	48%
Mn^{2+}	40 nM	34 μΜ	-	3239	
Mn^{2+}	40 nM	34 μΜ	1	2527	78%
Mn^{2+}	40 nM	34 μΜ	2	2649	82%
Mn ²⁺	4 nM	3.4 µM	-	4558	
Mn^{2+}	4 nM	3.4 µM	1	1150	25%
Mn ²⁺	4 nM	3.4 µM	2	1552	34%

Durch die Beobachtung der Restaktivität des Enzyms konnte so abgeschätzt werden, ob die gewählten Bedingungen eine detektierbare Inhibition auch bei niedrigen Konzentrationen an 1 und 2 ermöglichen. Hieraus resultierte, dass sich der Inhibitionsassay bestmöglich bei Verwendung von 4 nM GTB, 3.4 µM Donorsubstrat, 54 µM Akzeptorsubstrat und einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37 °C durchführen lässt, da die Restaktivität von GTB bei der Verwendung der alternativen Assaybedingungen und 5 mM des jeweiligen Inhibitors zu stark war, um bei niedrigeren Inhibitorkonzentrationen noch eine signifikante Änderung der Enzymaktivität zu detektieren.

Durch die Verwendung einer frisch exprimierten Enzymcharge wurden für die eigentliche Bestimmung des IC_{50} -Werts erneut die Assaybedingungen bestimmt, wobei sich an den vorangegangenen Experimenten orientiert wurde. So wurde Mn^{2+} als bivalentes Kation verwendet und das Donorsubstrat UDP-Gal konstant mit 3.4 μ M eingesetzt. Nur die ideale Konzentration an GTB wurde neu bestimmt und von 0.5 nM bis 5 nM variiert und die Inkubationszeit erneut festgelegt. Aus den erhaltenen Werten wurde sich für die Verwendung von 0.5 nM GTB, 3.4 μ M UDP-Gal, 54 μ M H-Antigen-Disaccharid und 20 mM MnCl₂ in

BSA-haltigen MOPS-Puffer entschieden. Die Inkubationszeit wurde auf 15 Minuten bei 37 °C festgelegt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Erneute Bestimmung der Assaykonditionen auf Grundlage der vorab erzielten Ergebnisse. Durch die Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Durchführung der Experimente im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik verifiziert. Der dpm $_{max}$ -Wert bei den durchgeführten Experimenten wurde zu dpm $_{max}$ = 43399 bestimmt. Dies bedeutet für eine ideal nutzbare Enzymaktivität, dass diese im Bereich von dpm = 4000 liegen sollte. Die schließlich genutzten Assaybedingungen sind grau hinterlegt.

c (GTB) [nM]	<i>t</i> [min]	dpm
5	22	31095
1	22	11439
0.5	22	6429
5	17	28712
0.5	17	4876
0.5	15	4031

Für die Bestimmung des IC_{50} -Werts von **1** wurde diese Verbindung nun in Konzentrationen von 0 bis 10 mM hinzugefügt und anhand der verminderten Aktivität von GTB innerhalb des Assays detektiert. Für **1** ergab sich aus der Anpassung der erhaltenen Daten nach einem *one-site-competition* Modell ein IC_{50} -Wert von $IC_{50} = 1.6$ mM.

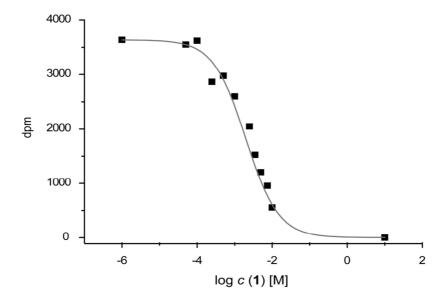


Abbildung 31: Bestimmung des IC_{50} -Werts von **1** in Gegenwart von 0.5 nM GTB, 3.4 μM UDP-Gal und 54 μM α-L-Fuc-(1-2)-β-D-Gal-octyl als Akzeptorsubstrat mit Hilfe eines radiochemischen Enzymassays. **1** wurde in Konzentrationen von 0 bis 10 mM verwendet. Die Konzentration von 10 M (log c(**1**) = 1 [M]) ist virtuell. Unter Verwendung eines *one-site competition* Modells wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration von $IC_{50} = 1.6$ mM erhalten.

Das UDP Mimetikum **2** wurde unter identischen Bedingungen untersucht. Aufgrund der schlechteren Löslichkeit von **2** in Wasser (verglichen mit **1**), konnte **2** nur bis zu einer Konzentration von 7.5 mM vermessen werden. Für **2** ergab sich für die mittlere inhibitorische Konzentration ein Wert von $IC_{50} = 2.4$ mM.

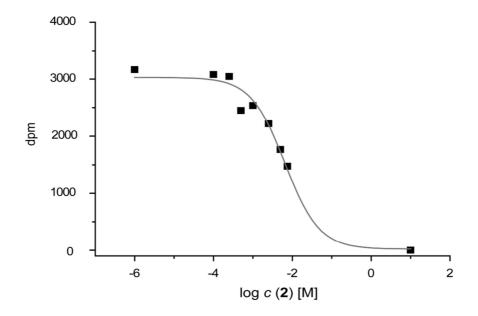


Abbildung 32: Bestimmung des IC_{50} -Werts von **2** in Gegenwart von 0.5 nM GTB, 3.4 μM UDP-Gal und 54 μM α-L-Fuc-(1-2)-β-D-Gal-octyl als Akzeptorsubstrat mit Hilfe eines radiochemischen Enzymassays. **2** wurde in Konzentrationen von 0 bis 7.5 mM verwendet. Die Konzentration von 10 M (log c(**2**) = 1 [M]) ist virtuell. Unter Verwendung eines *one-site competition* Modells wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration von $IC_{50} = 2.4$ mM erhalten.

Mit Hilfe der Cheng-Prusoff Gleichung (Gl-3) ergeben sich somit für die UDP Mimetika 1 und 2 inhibitorische Konstanten von $K_I(1) = 1.5$ mM und $K_I(2) = 2.2$ mM in Konkurrenz mit dem Donorsubstrat UDP-Gal. Vergleicht man nun die erhaltenen Ergebnisse der beiden Mimetika untereinander, so kann festgestellt werden, dass GTB durch 1 etwas stärker inhibiert wird als durch 2.

Betrachtet man abschließend die experimentellen Ergebnisse, die mit den synthetisierten UDP Mimetika durchgeführt wurden, so gibt es deutliche Hinweise, dass die Pentityllinker in 1 und 2 die Pyrophosphatgruppe des natürlichen Donorsubstrats ersetzen könnten. Obwohl durch den Ersatz ein Verlust an Bindungsaffinität in Anwesenheit von Mn^{2+} in Kauf genommen werden muss, konnte gezeigt werden, dass Harnsäure in Kombination mit einem Pentitylrest in der Lage ist, die Bindungstasche von UDP in Anwesenheit von Mg^{2+} als Cofaktor mit vergleichbarer Affinität zu besetzen und die Inhibitionsfähigkeit von nicht derivatisierter Harnsäure zu verbessern. Während für Harnsäure noch eine Inhibitionskonstante von $K_I = 1.7$

mM (gegenüber Uracil)^[50] bestimmt wurde, so wurden für **1** und **2** inhibitorische Konstanten von $K_I = 361 \, \mu\text{M}$ (**1**, gegenüber UDP) und $K_I = 571 \, \mu\text{M}$ (**2**, gegenüber UDP) mittels STD NMR Spektroskopie erhalten. Somit sind **1** sowie **2** geeignete Fragmente für die Weiterentwicklung zu einem entsprechenden donorsubstratanalogen Inhibitor, dem der ionische und energiereiche Pyrophosphatrest fehlt. Mit diesen Eigenschaften sollten beide Verbindungen in ihrer acetylierten Form in der Lage sein, Membranen und Zellkompartimente zu überwinden, um die membranständige GTB im Golgi zu erreichen. Die Entwicklung eines entsprechenden donorsubstratanalogen Inhibitors soll nun im zweiten Teil der Diskussion vorgestellt werden.

3.2 Design, Synthese und Analyse eines UDP-Gal analogen Inhibitors

3.2.1 *In silico* Analyse eines UDP-Galactose Mimetikums

Mit der Entwicklung eines donorsubstratanalogen Inhibitors wird immer eine Klasse an GTs angesprochen. Dies liegt an der ubiquitären Verwendung dieses Substrates innerhalb einer Klasse. So nutzen z.B. alle Galactosyltransferasen UDP-Gal als Donorsubstrat.^[2,4] In diesem natürlichen Substrat besitzt der α-D-Galactopyranosylrest einen äußerst wichtigen Anteil an der Spezifität des Donorsubstrats gegenüber GTB.^[34] Dementsprechend ist die Anwesenheit dieser Kohlenhydratstruktur innerhalb des Inhibitormoleküls gewünscht, um so die Spezifität z.B. gegenüber Galactosyltransferasen zu gewährleisten. Dieser nächste Schritt ist im Design eines spezifischen Inhibitors entscheidend, da hier die Diskriminierung aller anderen Klassen von Glycosyltransferasen vollzogen werden soll.

Die Durchführung der hier beschriebenen computergestützten Experimente sollte nun klären, ob die Einbeziehung einer α-D-Galactopyranosyleinheit, die als Glycosid an die primäre Hydroxyfunktion von 1 bzw. 2 gebunden ist, neben einer idealen Positionierung des Galactoserestes auch einen Energiegewinn gegenüber den UDP Mimetika ergeben würde. Schon in Studien, in denen ein Homologiemodell der GTB verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass sich zumindest 9-(5-*O*-α-D-Galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (3) gut in der Donorbindungstasche positioniert. Die alternativ sicherlich einfacher zu synthetisierende Variante eines β-D-Galactopyranosylrestes wurde nicht in

Betracht gezogen, da schon durch Blume *et al.* gezeigt wurde, dass β -D-Galactose sehr stark mit dem H-Antigen Disaccharid um die Akzeptorbindungstasche konkurriert. Zudem wird β -D-Galactose sehr leicht von UDP-Gal aus der Donorbindungstasche verdrängt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde davon ausgegangen, dass die Verwendung eines α -Glycosids der D-Galactose eine bessere Wahl für die Entwicklung eines Inhibitors ist, der bevorzugt die Donorbindungstasche besetzen soll.

Die *in silico* Experimente wurden in der geschlossenen Form von GTB^[29] durchgeführt, deren nicht aufgelöste Bereiche durch ein Homologiemodeling ergänzt wurden.^[51] Alle weiteren Parameter wurden so verwendet, wie schon unter 3.1.1 beschrieben.

In beiden Fällen wurde beobachtet, dass sich die Orientierung der Inhibitormoleküle in der Bindungstasche des natürlichen Donorsubstrats der Orientierung des eigentlichen Substrat UDP-Gal ähnelt (vgl. Abbildung 13). Betrachtet man die Lage von 3 innerhalb der Donorbindungstasche, so zeigt sich deutlich, dass die Bindungstasche der Nucleobase Uracil durch das Harnsäurefragment besetzt wird, während der α-D-Galactopyranosylrest in der Bindungstasche für den Zuckerrest von UDP-Gal gebunden wird (Abbildung 33). Beide Molekülfragmente werden durch den Pentityllinker, der das bivalente Mangankation koordinieren könnte, gut positioniert.

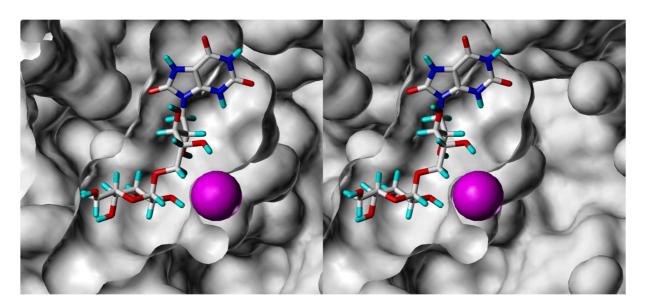


Abbildung 33: *Crossed-eye* Darstellung von 9-(5-O- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**3**) in der Bindungstasche für das Donorsubstrat von GTB. Das Harnsäurefragment von **3** (*atom-type*) wird in der Bindungstasche für die Nucleobase Uracil gebunden und zeigt eine gute Übereinstimmung zu der Lage des natürlichen Substrats. Die Hydroxyfunktionen im Linkerfragment könnten behilflich sein, das bivalente Mn²⁺-Ion (magenta) zu koordinieren. Die primäre Hydroxygruppe des D-Arabinityllinkers ist in Richtung der Bindungstasche für die zu übertragende α -D-Galactose ausgerichtet, in der das α -D-Galactopyranosylfragment gebunden wird.

Eine entsprechende Anordnung wird für **4** beobachtet (Abbildung 34). Auch hier wird die α-D-Galactopyranosyleinheit in der Bindungstasche für das Zuckerfragment von UDP-Gal positioniert.

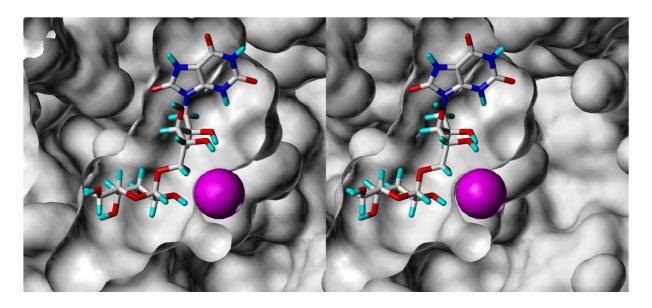


Abbildung 34: *Crossed-eye* Darstellung von 9-(5-O- α -D-galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (4) in der Bindungstasche für das Donorsubstrat von GTB. Das Harnsäurefragment von 4 (atom-type) wird in der Bindungstasche für die Nucleobase Uracil gebunden und zeigt eine gute Übereinstimmung zu der Lage des natürlichen Substrats. Die Hydroxyfunktionen im Linkerfragment könnten behilflich sein, das bivalente Mn²⁺-Ion (magenta) zu koordinieren. Die primäre Hydroxygruppe des D-Ribityllinkers ist in Richtung der Bindungstasche für die zu übertragende α -D-Galactose ausgerichtet, in der das α -D-Galactopyranosylfragment gebunden wird.

Bei genauer Gegenüberstellung des natürlichen Donorsubstrat und der Mimetika fällt auf, dass die Orientierung des α -D-Galactpyranosids in 3 und 4 auf den ersten Blick nicht exakt der Bindung des Kohlenhydratteils im Falle von UDP-Gal zu entsprechen scheint (Abbildung 35). Dabei sollte aber berücksichtigt werden, dass bis jetzt die reale Orientierung des α -D-Galactopyranosylrestes innerhalb der Bindungstasche noch nicht vollständig geklärt ist. Zudem wurde die Positionierung des natürlichen Substrats entsprechend der Orientierung in der Röntgenkristallstruktur in der GTB-Chimäre AABB durchgeführt, während der Galactosylrest in 3 und 4 aufgrund von vorangegangenen *homology modeling* Studien von T. Peters (persönliche Mitteilung) positioniert wurde. In Abbildung 33 sind die verschiedenen Anordnungen der Zuckereinheit noch einmal vergleichend gezeigt.

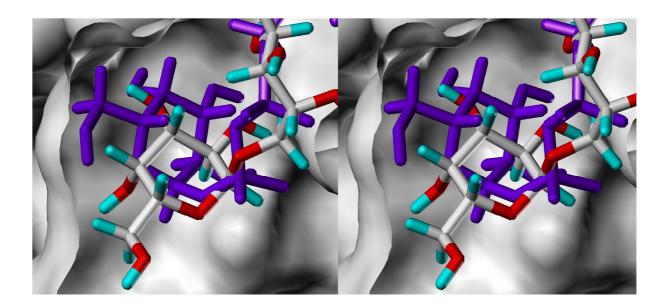


Abbildung 35: Crossed-eye Darstellung der Bindungstasche für das Galactosylfragment des Donorsubstrats von GTB bei gleichzeitiger Anwesenheit von UDP-Gal (violett) und 3 (atom type). Es zeigt sich, dass der Galactoserest von 3 leicht in die Bindungstasche hineingedreht vorliegt. Da die Position der zu übertragenden Galactose in UDP-Gal der Röntgenkristallstruktur 2rj7 entstammt, und demnach die exakte Position aller Atome aufgrund der möglichen Auflösung nicht zweifelsfrei bestimmt ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Orientierung der Galactose in 3 einer möglichen Orientierung entspricht.

Neben der Bestimmung der Orientierung innerhalb der Bindungstasche wurden die Bindungsenergien von 3 und 4 nach *Gl-1* berechnet und anschließend mit den erhaltenen Ergebnissen von 1 und 2 verglichen. Die berechneten Bindungsenergien für 3 und 4 zeigten, dass diese bedeutend günstiger als ihre entsprechenden UDP Mimetika 1 und 2 waren (Tabelle 5). Die erhaltenen virtuellen Werte waren um 12 kcal/mol niedriger, und auch wenn dies noch nicht der berechneten Energie von UDP-Gal entspricht, so ist doch der Effekt durch die zusätzliche Galactosyleinheit in 3 und 4 beachtlich.

Tabelle 5: Relative berechnete Bindungsenergien der UDP-Mimetika 1 und 2 im Vergleich zu den UDP-Gal Mimetika 3 und 4. Die erhaltene virtuelle Bindungsenergie für die UDP-Gal analogen Verbindungen ist energetisch deutlich günstiger als die berechnete Bindungsenergie der UDP analogen Inhibitoren.

Minimierter Ligand	Einordnung der relativen berechneten Bindungsenergien mit GTB [kcal/mol]	
1	0.00	
2	0.01	
3	-11.97	
4	-11.99	
UDP-Gal	-31.95	

Vergleicht man nun die Bindungsenergien der UDP-Gal Mimetika 3 und 4 untereinander, so wird deutlich, dass beide eine fast identische virtuelle Bindungsenergie aufweisen. Dieses Ergebnis ist nicht ganz überraschend, da die *in silico* Studien für die UDP Mimetika auch sehr ähnliche Ergebnisse für die Bindungsenergie lieferten (s. 3.1.1).

Die erhaltenen Ergebnisse des *molecular modeling* legten nahe, dass sich **3** und **4** für die Synthese anbieten würden, da beide Moleküle *in silico* eine effektive Nutzung der Bindungstasche aufweisen, sowie eine verbesserte Bindungsenergie im Vergleich zu den entworfenen UDP Mimetika mitbringen.

3.2.2 Synthese eines UDP-Gal Mimetikums

Aufgrund der *in silico* Daten schien es sinnvoll, die Moleküle **3** und **4** (Abbildung 36) zu synthetisieren. Dabei wurde schnell klar, dass der Zugang zu **4** aufgrund der Stereochemie an C-2 des Linkerfragments weitaus aufwändiger ist, als zu **3**.

Abbildung 36: 9- $(5-O-\alpha-D-Galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion ($ **3** $) und 9-<math>(5-O-\alpha-D-Galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion ($ **4**) eignen sich nach den Ergebnissen des*molecular modeling*prinzipiell für die Synthese als UDP-Gal Mimetika.

Da die Verbindungen 3 und 4, wie die schon beschriebenen UDP Mimetika, 9-N-alkylierte Harnsäurederivate darstellen, muss in diesen Derivaten, entsprechend wie bei 1 und 2, das Harnsäuregerüst aufgebaut werden, um die selektive Alkylierung der 9-Position zu gewährleisten. Für eine analoge Syntheseroute müssten so die entsprechenden Amine synthetisiert werden, um die anschließende Umsetzung zu ihren 6-Aminopyrimidinderivaten zu ermöglichen, die dann analog zu 1 und 2 cyclisiert werden könnten. Dabei sind für die Synthese des Amins zwei Eigenschaften ausschlaggebend. Zum einen muss gewährleistet

sein, dass der D-Galactopyranosylrest als α -Anomer vorliegt, zum anderen muss, je nach Derivat, an C-2 die richtige Stereochemie vorhanden sein (Abbildung 37). Dies erfordert für $\mathbf{3}$ und $\mathbf{4}$ je eine individuelle Synthesestrategie.

Abbildung 37: Betrachtung der UDP-Gal Mimetika unter retrosynthetischen Gesichtspunkten. Analog zu den UDP Mimetika sollten die UDP-Gal Mimetika aus 6-Chloruracil und einem entsprechenden Amin darstellbar sein. Dabei sollte im zu synthetisierenden Amin die Konfiguration am anomeren Zentrum der α-D-Galactopyranosyleinheit gewährleistet sein, sowie die stereochemische Information an C-2 berücksichtigt werden. Nach Einführung eines weiteren Stickstoffatoms innerhalb des Pyrimidinderivats kann dieses dann zum gewünschten Produkt cyclisiert werden.

Während das Amin für **4** durch Glycosylierung zweier orthogonal geschützter Monosaccharide synthetisiert werden muss, um im Zielmolekül die richtige Orientierung der Hydroxyfunktion an C-2 zu gewährleisten, kann im Falle von **3** die richtige Stereochemie an C-2 und gleichzeitig die α -Konfiguration des D-Galactosylrests durch einen Wohlabbau von D-Melibiose^[76,77] erhalten werden (Abbildung 38).

Abbildung 38: Retrosynthetische Betrachtung des für die Synthese von 3 benötigten Amins aus D-Melibiose. Für eine analoge Reaktion zu 1 und 2 kann das für 3 benötigte Amin aus D-Melibiose unter Verwendung eines Wohlabbaus erhalten werden. Durch den Abbau würde sich der benötigte Pentityllinker aus der D-Glucoseeinheit von D-Melibiose mit der gewünschten Stereoinformation an C-2 des Produktes (roter Kreis) ergeben.

Durch diesen schnelleren synthetischen Zugang von 3 wurde ein Fokus auf die Synthese dieses Moleküls gelegt. Zudem kann so festgestellt werden, ob die Umsetzung analog zu den UDP Mimetika mit einem Amin, welches durch den Pyranosering sterisch erheblich an Anspruch gewonnen hat, überhaupt möglich ist.

So wurde D-Melibiose (16) mit Hydroxylamin in Ethanol für 2 Stunden bei 70 °C gerührt und D-Melibioseoxim (17) mit einer Ausbeute von 99% erhalten. Dieses wurde dann mit Hilfe von Natriumacetat und Essigsäureanhydrid in Octaacetylmelibionitril (18) überführt, aus dem durch Abspaltung des Cyanids das um ein Kohlenstoffatom gekürzte Pentosederivat 19 dargestellt wurde. Dazu wurde 18 mit Natriummethanolat in Chloroform für 20 Minuten unter gleichzeitigem Verlust des Cyanids deacetyliert. Um nun das gewünschte Amin 21 zu erhalten, wurde ausgehend von 19 das entsprechende Oxim 20 mit einer Ausbeute von 97% dargestellt, welches im Anschluss unter Verwendung von PtO₂ hydrogenolytisch zum gewünschten Produkt 21 umgesetzt wurde. Die Gesamtausbeute über 5 Stufen betrug 35% (Abbildung 39).

Abbildung 39: Synthese von 5-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-arabinitylamin (21). Ausgehend von D-Melibiose (16) wurde durch die Durchführung eines Wohlabbaus über drei Stufen 5-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-arabinose (19) erhalten. Anschließende Überführung in das entsprechende Oxim 20 wurde das Amin 21 durch Reduktion mit Pt erhalten.

Das Amin 21 sollte nun in eine analoge Synthesestrategie zu den Harnsäurederivaten 1 bzw. 2 integriert werden. Für diese Schlüsselreaktion wurde 21 mit 6-Chloruracil (5) und dessen

5-Nitroderivat **8** umgesetzt. Dabei stellte sich nur die Synthese des Nitroaminoderivats **22** als erfolgreich heraus (Abbildung 40).

Abbildung 40: Substitutionsreaktion von **21** mit 6-Chloruracil (**5**) und 6-Chlor-5-nitrouracil (**8**). Bei der Umsetzung von **21** mit **5** konnte kein Produkt isoliert werden (oben). Die Synthese des Nitroaminouracilderivats **22** erfolgte erfolgreich unter Verwendung von **8** (unten).

Durch Erhalt der Verbindung 22 wurde die Synthese des gewünschten Produktes analog zu den Verbindungen 1 und 2 weiter verfolgt. Dazu wurde 22 durch Verwendung von Pd/C und H₂ zum entsprechenden reaktiven Diamin 23 reduziert und *in situ* mit Ethylchlorformiat erfolgreich in das Carbamat 24 überführt. Das gewünschte Harnsäurederivat 3 wurde anschließend aus 24 unter Rückfluss in 0.03 M Natriumethanolat-Lösung mit einer Ausbeute von 60% erhalten (Abbildung 41).

Mit der Synthese von 3 konnte somit gezeigt werden, dass die Verwendung von anspruchsvollen Aminen in der Synthese von 9-*N*-alkylierten Harnsäurederivaten möglich ist, wobei die Ausbeute innerhalb des Schlüsselschritts zu 22 von 18% auf 43% optimiert werden konnte. Weiterhin stand mit 3 nun ein Molekül zur Verfügung, dass nicht nur den kritischen Nucleotidteil von UDP-Gal mimikriert, sondern die Bindung des natürlichen Donorsubstrats von GTB durch die Galactoseeinheit noch stärker behindern könnte. Das inhibitorische Potenzial sollte nun durch SPR Experimente, STD NMR Messungen und der Verwendung von Enzymassays charakterisiert werden.

Abbildung 41: Synthese des UDP-Gal Mimetikums **3**. Das Nitroaminouracilderivat **22** wurde hydrogenolytisch in das Diaminouracil **23** überführt und sofort in das entsprechende Carbamat **24** umgesetzt. Anschließende Cyclisierung in 0.03 M NaOEt-Lösung ergab das gewünschte Produkt **3**.

3.2.3 Analyse des inhibitorischen Potenzials des UDP-Gal Mimetikums gegenüber GTB

3.2.3.1 Bindungsstudien mittels Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Um den Einfluss der α -D-Galactopyranosyleinheit in 3 bezüglich der Bindungseigenschaften näher zu untersuchen, wurde in einer ersten Analyse SPR Studien durchgeführt. Dafür wurde GTB auf einem Sensorchip immobilisiert und 3 in Konzentrationen von 0 bis 1 mM über die Chipoberfläche geleitet. Für die durchgeführten Experimente wurde ein Mn^{2+} -haltiger BisTris-Puffer verwendet, da das Enzym für die Katalyse ein bivalentes Kation benötigt, und eine Flussrate von $30~\mu L/min$ bei $25~^{\circ}C$ genutzt.

Anhand der in Abb. 40 gezeigten Sensorgramme wird deutlich, dass sich die Assoziation und Dissoziation von 3 zur GTB über eine längere Zeitphase erstreckt. Es wurden jedoch keine

sinnvollen Werte für die kinetischen Parameter k_a und k_d erhalten. Trotzdem zeigt das Verhalten des Liganden, dass sich **3** potenziell als Inhibitor nutzen lässt.

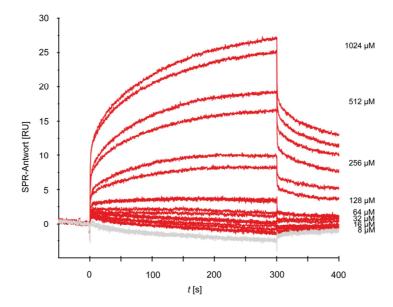


Abbildung 42: Sensorgramme der SPR Experimente von GTB in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von 3 (rot: Sensorgramme in Anwesenheit von 3; grau: Sensorgramme in Abwesenheit von 3). Die Sensorgramme zeigen deutlich, dass eine konzentrationsabhängige Bindung zwischen GTB und 3 stattfindet. Das Assoziationsgleichgewicht zwischen GTB und 3 stellt sich nach der Injektion (t = 0 s) des Liganden ein und zeigt einen günstigen Bindungsverlauf (t = 0 bis 300 s) für einen Inhibitor. Die Dissoziation erfolgt nach der Beendigung der Injektion von 3 (ab t = 300 s).

Die Analyse der Sensorgramme und damit die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D nach einem *one-site binding* Modell ergab einen Wert von $K_D = 254 \,\mu\text{M}$. Vergleicht man diese Konstante mit der Dissoziationskonstante des UDP Mimetikums 2, welche unter identischen Bedingungen erhalten wurde, so konnte durch die Anwesenheit der α -D-Galactopyranosyleinheit in 3 die Dissoziationskonstante um einen Faktor von 9 verbessert werden.

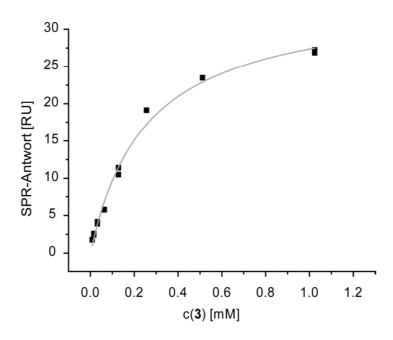


Abbildung 43: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D von **3** nach einem *one-site binding* Modell in Anwesenheit von GTB und Mn²⁺ mit Hilfe von SPR Spektroskopie. Der K_D -Wert von **3** wurde zu $K_D = 254 \mu M$ bestimmt.

3.2.3.2 Bindungsstudien mittels Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

Die Bindungseigenschaften von **3** an der GTB wurden ebenfalls mit Hilfe von STD NMR Experimenten überprüft. Dazu wurde **3** in Konzentrationen von 95 bis 564 μ M (entsprechend einem Ligandüberschuss von 15 bis 99) in Anwesenheit von 6 μ M GTB vermessen. Durch die Auftragung der Inhibitorkonzentration gegen den STD-Amplifikationsfaktor von H-2" konnte eine Dissoziationskonstante von $K_D=182~\mu$ M bestimmt werden (Abbildung 44).

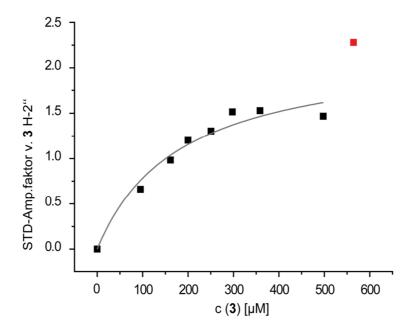


Abbildung 44: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D von 3 mit Hilfe von STD NMR Spektroskopie. Die Experimente wurden mit 6 μ M GTB in BisTris- d_{19} und 298 K durchgeführt. Der Ligandenüberschuss an 3 betrug 15 bis 99. Der K_D -Wert wurde nach einem *one-site binding* Modell zu $K_D = 182 \mu$ M bestimmt.

Dieser Wert hat die gleiche Größenordnung wie die für 1 und 2 ermittelten K_D Werte (205 μ M bzw. 388 μ M), die unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen erhalten wurden. Während die SPR Experimente noch eine Verbesserung der Dissoziationskonstante im Vergleich zu 2 von fast 9 ergab, konnte hier eine nur um einen Faktor von 2 stärkere Bindung festgestellt werden.

Die detailliertere Charakterisierung des Bindungsereignisses durch Erstellung eines Bindungsepitops von 3 zeigte, dass das Linkerfragment in 3 weiterhin stark an der Bindung beteiligt ist (Abbildung 45). Dabei zeigte sich, dass *H-2* und *H-4* des Arabinityllinkers innerhalb dieses Fragments die größte Nähe zum Protein aufweisen. Schon bei 1 und 2 wurde festgestellt, dass *H-2* signifikant zur Bindung beiträgt und somit auch in 3 dieses Bindungsepitop erhalten bleibt. Während *H-4* nur bei 1 eine Rolle bei der Bindung spielte und bei 2 kein signifikanter STD Effekt beobachtbar war, so bestimmt *H-4* in 3 das Bindungsepitop mit 68% mit. Innerhalb des α-D-Galactopyranosylrestes konnte nur zwischen *H-2* und GTB ein hinreichend großer Kontakt beobachtet werden, wobei dieses Proton aber insgesamt die höchsten Amplifikationsfaktoren aller detektierbaren Protonen zeigte.

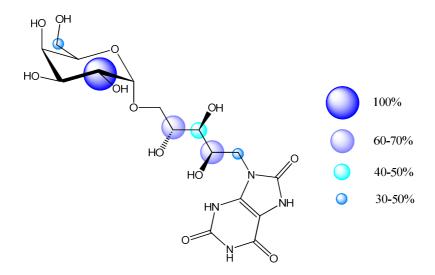


Abbildung 45: Bestimmung des Bindungsepitops von **3** in Gegenwart von 6 μM GTB. Das Harnsäurefragment konnte auf Grund seiner nicht detektierbaren NH-Protonen nicht untersucht werden. *H-2* '' bildet mit dem höchsten STD Amplifikationsfaktor den Bezugspunkt von 100% (*dunkelblauer Kreis*). Alle anderen Werte der anderen Protonen sind relativ zu *H-2* '' angegeben. Protonen mit einem STD Effekt unter 30% sind nicht farblich hervorgehoben.

Diese Beobachtung ist erwähnenswert, da diese Position entscheidend für die Diskriminierung zwischen UDP-Gal und UDP-GalNAc durch GTB respektive GTA ist und sich somit schließen lässt, dass sich die Galactopyranosyleinheit entsprechend dem natürlichen Donorsubstrat zu positionieren scheint und ähnlich erkannt wird. Da auch das Linkerfragment die Kontakte zum Protein ähnlich den UDP-Mimetika beibehält, scheinen die Abstände zwischen dem Zuckerfragment und des Harnsäurerestes gut gewählt.

Alle anderen Protonen sind mit weniger als 50% STD Effekt nicht in die Bildung des Bindungsepitops mit einbezogen worden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Harnsäurefragment durch seine austauschbaren Protonen nicht detektiert werden konnte und somit keine Aussage über dieses Fragment gemacht werden kann.

Die NMR spektroskopische Untersuchung der Bindung von 3 an die GTB sollte nun durch kompetitive Experimente mit UDP als natürliches Substrat erweitert werden.

3.2.3.3 Inhibitionsstudien mittels Saturation Transfer Difference NMR Spektroskopie

Wie schon für 1 und 2 beschrieben, kann das inhibitorische Potenzial einer Verbindung durch kompetitive Experimente mit einem natürlichen Substrat des zu inhibierenden Proteins ermittelt werden.

Für die Bestimmung der inhibitorischen Konstante K_I von 3 wurde zunächst eine kompetitive STD Titration durchgeführt, in der UDP als natürliches Substrat aus der Bindungstasche von GTB verdrängt werden sollte. Die Experimente wurden bei 298 K durchgeführt und UDP in einer Konzentration von 1 mM vorgelegt. 3 wurde in Konzentrationen von 95 μ M bis 2.5 mM hinzugegeben und die Änderung der STD Amplifikationsfaktoren auf Seiten von UDP und des Inhibitors beobachtet. Während die STD-Amplifikationsfaktoren der Protonen von UDP bei steigender Konzentration von 3 abnahm, konnte für das Proton H-2 von 3 bei Auftragung des STD Amplifikationsfaktors gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration von 3 ein IC_{50} Wert von IC_{50} = 389 μ M bestimmt werden.

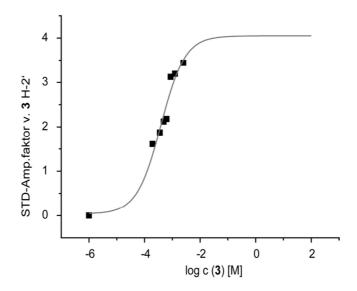


Abbildung 46: Bestimmung des IC_{50} Werts von **3** in Gegenwart von 10 μ M GTB und 1 mM UDP mit Hilfe von STD NMR Spektroskopie. Unter Verwendung eines *one-site competition* Modells wurde für **3** ein Wert von $IC_{50} = 389 \mu$ M bestimmt.

Die inhibitorische Konstante wurde nach Gl-3 zu $K_I = 117$ μ M bestimmt. Dies entspricht im Vergleich mit dem K_I Wert von **2** einer Verbesserung der Inhibition um einen Faktor von fast 5, der unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen erhalten wurde.

Um die kompetitiven STD NMR Experimente zu validieren, wurde auch mit 3 ein radiochemischer Enzymassay durchgeführt, in dem der IC_{50} Wert in Gegenwart von UDP-Gal und dem H-Antigen Disaccharid bestimmt werden sollte.

3.2.3.4 Inhibitionsstudien mit Hilfe eines radiochemischen Enzymassays

Der radiochemische Enzymassay sollte die durch die STD NMR Experimente bestimmte Inhibitionskonstante K_I überprüfen und zeigen, dass GTB auch in Anwesenheit beider natürlichen Substrate, dem H-Antigen Disaccharid und UDP-Gal, durch 3 in seiner Aktivität gehemmt wird. Für die Durchführung der Experimente wurde, wie für 1 und 2 beschrieben, ¹⁴C-markiertes **UDP-Gal** als Donorsubstrat und α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl Akzeptorsubstrat genutzt. Der Assay wurde in MOPS-Puffer durchgeführt, der 1 mg/mL BSA und 20 mM MnCl₂ enthielt. Die Konzentration an GTB und UDP-Gal wurde vor Beginn der Experimente bestimmt, um zu gewährleisten, dass die Bestimmung der Aktivität von GTB im linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kinetik stattfindet, um den Fehler innerhalb der Messungen möglichst gering zu halten. Dazu wurde GTB und UDP-Gal in verschiedenen Konzentrationen und mit verschiedenen Inkubationszeiten vermessen, wobei sich in einer ersten Bestimmung die Verwendung von 4 nM GTB, 3.4 µM UDP-Gal und eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37 °C als sinnvoll erwies (s. Tabelle 2 und Tabelle 3).

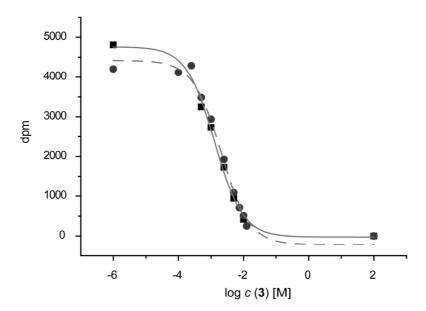


Abbildung 47: Bestimmung des IC_{50} Werts von 3 mittels eines radiochemischen Inhibitionsassays. Die Messung wurde zweimal unter *steady state* Bedingungen durchgeführt. Unter Verwendung von 4 nM GTB, 3.4 μ M UDP-Gal und 54 μ M H-Antigen Disaccharid über eine Reaktionsdauer von 20 Minuten wurde der IC_{50} Wert zu $IC_{50}=1.3$ mM bestimmt (Quadrate, durchgezogene Linie). Die Durchführung des Assays mit 0.5 nM frisch exprimierter GTB, 3.4 μ M UDP-Gal und 54 μ M H-Antigen Disaccharid über eine Zeitdauer von 15 Minuten ergab eine mittlere inhibitorische Konzentration von $IC_{50}=1.9$ mM (Punkte, gestrichelte Linie).

Unter diesen Bedingungen wurde eine Einfachbestimmung mit 3 in Konzentrationen von 0 bis 12.5 mM durchgeführt. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivität von GTB beobachtet, wobei die Bestimmung des IC_{50} Werts sich hier zu 1.3 mM ergab. Die

Bestimmung des IC_{50} Werts wurde erneut mit frisch exprimierter GTB durchgeführt, wobei hier 0.5 nM GTB, 3.4 μ M radioaktiv markierte UDP-Gal, 54 μ M H-Antigen Disaccharid und der Inhibitor über einen Zeitraum von 15 Minuten inkubiert wurden (Abbildung 47).

Die Messdaten dieser zweiten Bestimmung ergaben einen IC_{50} Wert von 1.9 mM. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gl-3) ergibt sich somit aus beiden Bestimmungen im Mittel eine Inhibitionskonstante von $K_I = 1.5$ mM.

Die Analyse von 3 zeigt somit deutlich, dass sich mit Hilfe dieses Moleküls GTB inhibieren lässt. So besetzt 3 die Bindungstasche des Nucleotids, was durch die kompetitiven STD NMR Experimente gezeigt werden konnte. Auch die Bestimmung des IC_{50} Werts in Anwesenheit von Mg^{2+} und UDP wurde unter den experimentellen Bedingungen erfolgreich durchgeführt. Vergleicht man nun 3 mit dem UDP Analogon 2, welches dem donorsubstratanalogen Inhibitor zu Grunde liegt, so konnte auch mit Hilfe des Enzymassays gezeigt werden, dass die D-Galactopyranosyleinheit in dem erweiterten Inhibitormolekül eine Verbesserung der Inhibitionskonstante um einen Faktor von 1.5 ermöglichte. In Tabelle 6 sind die Dissoziationskonstanten K_D und die Inhibitionskonstanten K_I der Inhibitormoleküle 1, 2 und 3 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 6: K_D und K_I Werte der Inhibitoren **1**, **2** und **3**. Es wird deutlich, dass alle entwickelten Inhibitoren in Kombination mit Mg^{2+} eine höhere Affinität zur GTB aufweisen, als mit Mn^{2+} als Cofaktor. Durch die Anwesenheit der α -D-Galactopyranosyleinheit in **3** konnte der K_D - sowie der K_I -Wert im Vergleich zu **2** gesteigert werden.

	$K_D [\mu M]$			$K_I[\mu M]$	
Inhibitor	Mg^{2+}		Mn ²⁺	Mg^{2+}	Mn ²⁺
	SPR	STD NMR	SPR	STD NMR	Enzym Assay
1	366	205	899	361	1500
2	828	388	2300	571	2200
3	-	182	254	117	1500

Um zu testen, ob die hier vorgestellten 9-N-alkylierten Harnsäurederivate 1, 2 und 3 generell als UDP(-Gal) Inhibitoren wirken, wurden unterschiedliche GTs getestet, die wie GTB UDP-aktivierte Kohlenhydrate übertragen.

3.3 Progresskurvenanalyse der Inhibition gegenüber verschiedenen Glycosyltransferasen

Mit Hilfe von weiteren GTs, die UDP-aktivierte Kohlenhydrate als Donorsubstrat verwenden, sollte nun das allgemeine inhibitorische Potenzial der Inhibitoren 1, 2 und 3 überprüft werden. Ergänzende Experimente zu den bis dato durchgeführten Untersuchungen sollten aufzeigen, ob sich zum einen 1 und 2 auch bei weiteren GTs eignen würden, ein adäquater UDP Ersatz zu sein und zum anderen, ob 3 in der Lage ist, spezifisch eine Klasse an Glycosyltransferasen, d.h. Galactosyltransferasen, zu inhibieren. Dazu sollten nun verschiedene GTs in einem Inhibitionsassay genutzt werden. Für dieses Vorhaben wurde ein NMR basierter Assay genutzt.

3.3.1 Bestimmung der Enzymkinetik von GTs durch einen NMR basierten Enzymassay

Die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I von Inhibitormolekülen wird im Allgemeinen über die Variation der Inhibitorkonzentration unter Bedingungen durchgeführt, in denen sich die Konzentration des Enzymsubstratkomplexes über die experimentelle Messzeit nicht verändert (*steady state*). Alternativ zu dieser Methode, die auch in dieser Arbeit innerhalb des radiochemischen Inhibitionsassays angewandt wurde, können die kinetischen Parameter einer Enzymreaktion auch über die Analyse von Progresskurven erhalten werden. Durch die Verwendung der Lambert-W-Funktion für die Lösung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl-4) ist die Bestimmung der kinetischen Daten aus einer einzigen Progresskurve möglich.^[78]

$$\frac{\mathrm{d}[S]}{\mathrm{d}t} = -\frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

mit [S]: Substratkonzentration

 V_{max} : Maximalgeschwindigkeit

 K_M : Michaelis-Menten-Konstante

$$[S] = K_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K_M} exp\left(\frac{[S]_0 - V_{max}t}{K_M}\right) \right\}$$
 Gl-5

mit W: Lambert-W-Funktion

 $[S]_0$: initiale Substratkonzentration

Die von Goudar *et al.* beschriebene Lambert W Lösung (*Gl-5*) kann dabei nicht nur auf die eigentliche Michaelis Menten Gleichung angewendet werden, sondern auch eine Lösung für analoge Gleichungen bieten. Dies bedeutet, dass mit Hilfe dieser Lösung auch die kompetitive Inhibition einer Enzymreaktion analysiert werden kann. Für diesen Fall würde sich die Umsatzgleichung der kompetitiven Inhibition (*Gl-6*) analog zur *Gl-4/Gl-5* zu der eindeutigen Lambert W Lösung der Inhibition (*Gl-7*) ergeben:

$$\frac{\mathrm{d}[S]}{\mathrm{d}t} = -\frac{V_{max}[S]}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$$

$$Gl-6$$

mit [1]: Inhibitorkonzentration

 K_I : Inhibitionskonstante

$$[S] = K_M'W \left\{ \frac{[S]_0}{K_{M'}} exp\left(\frac{[S]_0 - V_{max}t}{K_{M'}}\right) \right\}$$
mit $K_M' = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

Ein Vorteil dieser Methode der Progresskurvenanalyse besteht darin, dass die Enzymreaktion über den vollständigen zeitlichen Verlauf der Reaktion betrachtet wird und sich somit nicht nur auf den *steady state* beschränkt. Dies erlaubt die Bestimmung der kinetischen Parameter bei einer einzigen Substratkonzentration. Der Einsatz von NMR Spektroskopie ermöglicht zudem den Einsatz unveränderter Verbindungen, so dass radioaktive oder fluorophore Markierungen nicht nötig sind.^[79,80]

Durch Verwendung des Computerprogramms MATLAB und nicht-linearer Regressionsanalyse der eindeutigen Lambert-W-Lösung der Michaelis-Menten-Gleichung können so die gewünschten Parameter K_M , V_{max} und unter Inhibitionsbedingungen auch K_I erhalten werden.

Für die Untersuchung des inhibitorischen Potenzials der Verbindungen 1, 2 und 3 gegenüber weiteren Glycosyltransferasen, die UDP-aktivierte Zucker als Donorsubstrate verwenden, wurden verschiedene GTs ausgewählt. Als Vertreter für weitere GT Klassen, d.h. keine Galactosyltransferasen, sollte die Inhibition von der humanen Blutgruppe A spezifischen N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) und POGLUT, einer O-Glucosyltransferase, untersucht werden. Die Kenntnis über das Inhibitionsvermögen der Inhibitoren innerhalb der Klasse der Galactosyltransferasen sollte zudem durch die Verwendung der $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase der Hausmaus (mus mus culus), $\alpha(1,3)$ GalT) und der humanen $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase ($\beta(1,4)$ -GalT) erweitert werden. Da bei keiner dieser GTs die kinetischen Parameter unter den benötigten Messbedingungen bekannt sind, wurde vor Beginn des eigentlichen Inhibitionsassays die Michaelis-Menten-Konstante K_M unter den gewählten experimentellen Bedingungen bestimmt. Auch GTB wurde unter gleichen Bedingungen untersucht, um so einen besseren Vergleich zu den bisherigen Daten zu erhalten und die ergänzenden Ergebnisse für die verschiedenen GTs besser einschätzen zu können.

3.3.1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} von GTA

Die humane Blutgruppe A spezifische N-Acetylgalactosaminyltransferase A (GTA) katalysiert Synthese des Blutgruppenantigens A. indem sie einen Acetylgalactosaminrest auf die terminale Galactoseeinheit des H-Antigen Disaccharids überträgt. [24,26,29] Für diese Reaktion nutzt sie, wie auch GTB, ein bivalentes Kation. Für die Michaelis-Menten-Konstante K_M wurde dementsprechend Bestimmung der Enzymreaktion von GTA in Mg²⁺-haltigen 50 mM BisTris-d₁₉ Puffer (50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT-d₁₆, 1 μg/μL BSA, 10 U alkalische Phosphatase, pH 6.7) bei 37 °C durchgeführt. Die Zugabe von alkalischer Phosphatase diente der Umsetzung des bei der Reaktion entstehenden UDP in UMP, um so die Produktinhibition des Enzyms zu vermeiden. Als Akzeptorsubstrat diente α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl. Da die Änderung der Konzentration des Donorsubstrats in Anwesenheit des Inhibitors beobachtet werden sollte, wurde das H-Antigen Disaccharid in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat eingesetzt, um eine quasi konstante Konzentration über den Reaktionsverlauf zu gewährleisten. Das Donorsubstrat UDP-GalNAc sollte in einer Konzentration entsprechend seines K_M Werts eingesetzt werden, der unter den verwendeten Reaktionsbedingungen auf 150 μ M geschätzt wurde. Als Grundlage für diese Einschätzung diente zum einen der K_M

Wert für das Donorsubstrat, der unter Verwendung von Mn^{2+} als Cofaktor zu $K_M = 15 \,\mu\text{M}^{[81]}$ bestimmt wurde und zum anderen die Tatsache, dass die Bindung zwischen Enzym und Donorsubstrat in Anwesenheit von Mg^{2+} deutlich geschwächt wird. Die Konzentration von GTA betrug 15 nM. Die Zugabe von UDP-GalNAc diente als Startpunkt der Reaktion, welche anschließend für 18.5 Stunden bei 37 °C verfolgt wurde, wobei alle 7 Minuten ein 1 H NMR Spektrum mit 120 *scans* und *excitation sculpting* zur Wasserunterdrückung aufgenommen wurde. Für die Reaktionsverfolgung wurden die Protonen von UDP-GalNAc genutzt, die isoliert von den *bulk*-Signalen der Kohlenhydratstrukturen des H-Antigens und UDP-GalNAc vorlagen (Abbildung 48).

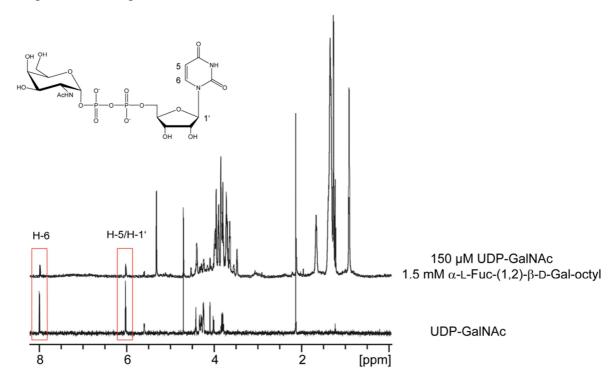


Abbildung 48: ¹H-NMR Spektrum von UDP-GalNAc und dem H-Antigen Disaccharid (700 MHz, 310 K). *Oben*: UDP-GalNAc und das Akzeptorsubstratanalogon α-L-Fuc-(1,2)-β-D-Gal-octyl (in 50 mM BisTris- d_{19}) zeigen starke Signalüberlagerungen im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 3$ ppm bis $\delta = 4.5$ ppm. Die Protonen des Aglycons des H-Antigen Disaccharids befinden sich im hochfeldverschobenen Teil des Spektrums. Im tieffeldverschobenen Bereich des Spektrum befinden sich H-6 und H-5/H-1' von UDP-GalNAc. *Unten*: ¹H-NMR Spektrum von 150 μM UDP-GalNAc in D₂O (700 MHz, 310 K). Neben H-6 und dem Signal für H-5/H-1' ist die N-Acetylgruppe von UDP-GalNAc mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2.13$ ppm deutlich separiert und könnte für die Reaktionsverfolgung genutzt werden, sollte die Änderung der chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen für eine Auswertung nicht ausreichen.

Für die Auswertung der Enzymreaktion wurden die aromatischen Protonen von UDP-GalNAc genutzt, da hier eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung zwischen dem Edukt (UDP-GalNAc) und dem in diesem Assay resultierenden Produkt (Uridinmonophosphat) detektiert werden konnte (Abbildung 49).

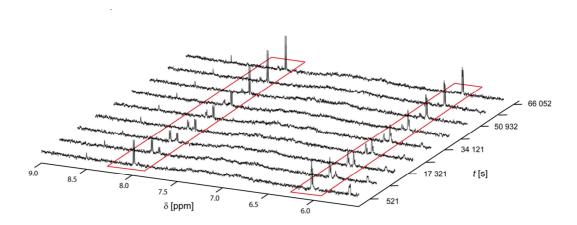


Abbildung 49: Änderung der chemischen Verschiebung von H-6 und H-5/H-1' innerhalb des Uridinfragments im zeitlichen Verlauf der Enzymreaktion von GTA. Zu Beginn der Reaktion (t = 521 s) entspricht die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen UDP-GalNAc. Im zeitlichen Verlauf nimmt die Intensität der Signale ab und es wird je ein neues Signal beobachtet, welches sich in beiden Fällen leicht hochfeldverschoben ergibt (roter Kasten). Nach 18.5 Stunden (t = 66 052 s) sind die Signale, die charakteristisch für das Donorsubstrat sind, nicht mehr zu detektieren und die Enzymreaktion ist beendet.

Dieser Bereich ließ sich gut verwenden, da er nicht von Überlagerungen durch weitere Signale betroffen war. Hinsichtlich des Inhibitionsassays, der im Anschluss an die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante durchgeführt werden sollte, sind die gewählten Signale ideal gelegen, da auch alle drei Inhibitormoleküle in diesem Bereich keine Signale aufweisen.

Die Auftragung der Konzentrationsänderung von UDP-GalNAc gegen die Zeit und anschließende Progresskurvenanalyse ergab für das verwendete System eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 115 \, \mu\text{M}$ und einer Maximalgeschwindigkeit von $V_{\text{max}} = 8.3 \cdot 10^{-9} \, \text{M/s}$ anhand von H5-/H-1' (Abbildung 50).

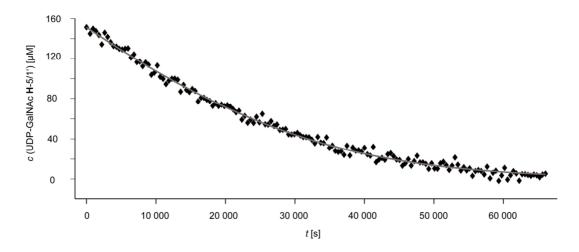


Abbildung 50: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc anhand H-5/H-1' im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung wurde K_M zu K_M = 115 μ M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu V_{max} = $8.3 \cdot 10^{-9}$ M/s bestimmt.

Die Auftragung der Konzentration anhand von H-6 liefert eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 53 \,\mu\text{M}$. Wegen der wesentlich stärkeren Streuung der einzelnen Messpunkte wurde dieser Wert aber nicht berücksichtigt.

3.3.1.2 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} von GTB

Die Enzymreaktion von GTB wurde in Analogie zu der von GTA katalysierten Reaktion in 50 mM BisTris- d_{19} Assay Puffer (50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT- d_{16} , 1 µg/µL BSA, 10 U alkalische Phosphatase, pH 6.7) bei 37 °C durchgeführt. Als Akzeptorsubstrat diente auch hier α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl. Um den K_M Wert des Donorsubstrats bestimmen zu können, wurde auch hier das H-Antigen Disaccharid in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat eingesetzt. Das Donorsubstrat UDP-Gal wurde mit 250 µM eingesetzt und GTB in einer Konzentration von 120 nM verwendet. Die erhöhte Konzentration an Enzym bei diesem Experiment resultierte aus der niedrigeren Wechselzahl k_{cat} von GTB im Vergleich zu GTA und sollte die Dauer des Experiments verkürzen. Mit der Zugabe von UDP-Gal wurde die Reaktion gestartet, welche anschließend für 18.5 Stunden bei 37 °C verfolgt wurde, wobei alle 7 Minuten ein 1 H NMR Spektrum mit 120 scans aufgenommen wurde.

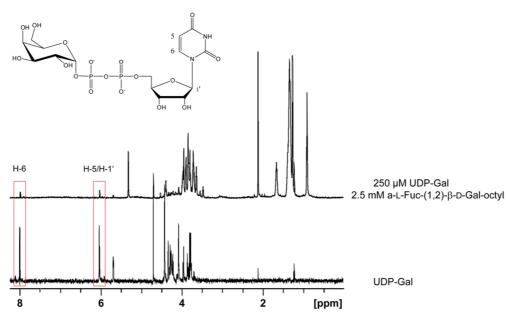


Abbildung 51: 1 H-NMR Spektrum von UDP-Gal und dem H-Antigen Disaccharid (700 MHz, 310 K). *Oben*: UDP-Gal und das Akzeptorsubstratanalogon α-L-Fuc-(1,2)-β-D-Gal-octyl (in 50 mM BisTris- d_{19}) zeigen starke Signalüberlagerungen im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta = 3$ ppm bis $\delta = 4.5$ ppm. Die Protonen des Aglycons des H-Antigen Disaccharids befinden sich im hochfeldverschobenen Teil des Spektrums. Im tieffeldverschobenen Bereich des Spektrum befinden sich H-6 und H-5/H-1' von UDP-Gal. *Unten*: 1 H-NMR Spektrum von 300 μM UDP-Gal in D₂O.

Wie schon für die GTA und UDP-GalNAc beobachtet wurde, eignen sich auch in diesem System die Protonen der Nucleotidbase von UDP-Gal sehr gut für die Verfolgung der Reaktion durch ihre tieffeldverschobene Lage (Abbildung 51).

Anhand von H-5/H-1' ergab sich somit für die untersuchte Enzymreaktion ein K_M Wert von $K_M = 260 \,\mu\text{M}$ für UDP-Gal (Abbildung 52).

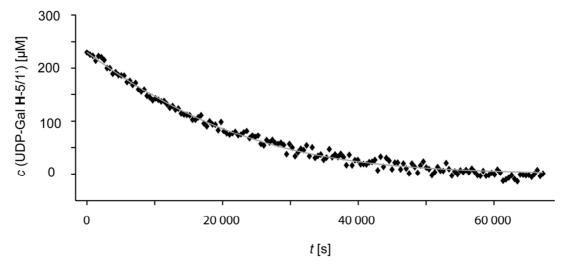


Abbildung 52: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal anhand H-5/H-1' im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung wurde K_M zu $K_M = 260 \, \mu M$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu $V_{max} = 2.0 \cdot 10^{-8} \, \text{M/s}$ bestimmt.

Vergleicht man den erhaltenen Wert mit der enzymatischen Reaktion von GTA, so ergibt sich, dass die Michaelis-Menten-Konstante von GTB/UDP-Gal um einen Faktor von 2.26 größer ist als die von GTA/UDP-GalNAc. Dieses Verhältnis entspricht genau dem Verhältnis beider Konstanten in Anwesenheit von Mn²⁺. [81]

3.3.1.3 Versuche zur Bestimmung der kinetischen Parameter weiterer GTs

Als weiterer Vertreter der Galactosyltransferase Familie wurde $\alpha(1,3)$ GalT genutzt. Dieses Enzym ist für die Bildung des Gal(α 1-3)Gal Epitop verantwortlich, welches von etwa 1% der humanen Antikörper erkannt wird. Dieses Epitop unterscheidet sich von dem Blutgruppe-B-Antigen durch die Abwesenheit des L-Fucoserestes und wird von fast allen Säugetieren gebildet. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} für die durch $\alpha(1,3)$ GalT katalysierte Reaktion wurden 80 nM des Enzyms, 800 μ M UDP-Gal und 8 mM LacNAc bei 37 °C in BisTris- d_{19} Assay Puffer verwendet. Die Reaktion wurde bei 37 °C durchgeführt und über 4.5 Stunden alle 7.5 Minuten ein 1 H-NMR Spektrum aufgenommen. Es konnte jedoch keine Änderung der Intensität der Signale des Donorsubstrats festgestellt

werden. Demnach wurde davon ausgegangen, dass die vorliegende $\alpha(1,3)$ GalT nicht aktiv war.

Die humane *O*-Glucosyltransferase 1 (POGLUT) modifiziert durch die Übertragung einer β-D-Glucoseeinheit auf die Hydroxyfunktion von Serin Proteine, die Wiederholungen der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Sequenz in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. ^[83,84] Zu diesen Proteinen zählen z.B. Faktor VII und Notch. ^[85] Auch wenn nicht viel über die Bedingungen für die *O*-Glucosylierung durch POGLUT bekannt ist, wurde auf der Basis vieler bekannter *O*-Glucosylierungsstellen eine wahrscheinliche Consensus-Sequenz für die Glycosylierung mit H₂N-Cys¹-Xxxx-Ser-Xxx-Pro-Cys²-COOH postuliert. ^[86] Dabei sind beide Cysteine in der Sequenz in die Bildung von Disulfidbrücken involviert. Für die Durchführung des Enzymassays wurde dementsprechend ein Peptid mit der Sequenz H₂N-Cys-Gly-Ser-Thr-Pro-Cys-C(O)NH₂ benötigt, welches mittels manueller Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie synthetisiert wurde. Dabei wurden die Thiolfunktionen beider Cysteinreste durch eine orthogonale Schutzgruppe (StBu) geschützt, um die Oxidation der Thiole zu vermeiden. Zudem ermöglicht diese Schutzgruppe eine eventuelle Cyclisierung des Peptids, sollte POGLUT nicht in der Lage sein, die Peptidsequenz in seiner offenen Form zu erkennen. Die Synthese des Peptids konnte jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Die Untersuchung der enzymatischen Reaktion von $\beta(1,4)$ GalT war auf Grund von Lieferschwierigkeiten seitens SigmaAldrich leider aus Zeitgründen nicht möglich.

Somit wurde der Inhibitionsassay mit GTA durchgeführt, wobei die Enzymreaktion von GTB in Anwesenheit von 3 als Vergleichssystem diente.

3.3.2 Inhibitionsstudien mit Hilfe eines NMR basierten Enzymassays

3.3.2.1 Untersuchung der Inhibition von GTB

Für die Einschätzung der inhibitorischen Konstanten innerhalb des NMR basierten Inhibitionsassays wurde die Inhibition von GTB durch 3 untersucht. Dieses sollte als Referenz für das Inhibitionsvermögens von 3 gegenüber anderen GTs dienen. Für den Inhibitionsassay wurde die Konzentration von GTB auf $0.48~\mu M$ erhöht, um die Experimentdauer zu verkürzen. UDP-Gal wurde in einer Konzentration von $250~\mu M$ verwendet, wobei das H-

Antigen Disaccharid in einem zehnfachen Überschuss (2.5 mM) vorlag. Diese Bedingungen wurden gewählt, da so eine Ermittlung der inhibitorischen Konstante unter K_M Bedingungen des Donorsubstrats möglich ist ($K_M = 260 \,\mu\text{M}$, s. 3.3.1.2). Der Inhibitor **3** wurde in einer Konzentration von 1.5 mM hinzugefügt, da diese Konzentration dem innerhalb des radiochemischen Inhibitionsassays ermittelten K_I Werts entsprach. Für die Aufnahme der Progresskurve wurde für 12 Stunden alle 7 Minuten ein Spektrum mit 120 *scans* mit einer Wasserunterdrückung durch *excitation sculpting* aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 37 °C. Als Startpunkt der Reaktion diente die Zugabe des Donorsubstrats. Nach Auswertung der Daten unter Verwendung von *Gl-7* ergab sich für **3** eine inhibitorische Konstante von 565 μ M (Abbildung 53).

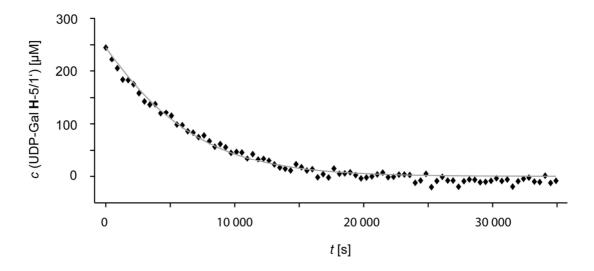


Abbildung 53: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal anhand H-5/H-1' im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB in Anwesenheit von 1.5 mM **3**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition wurde K_I zu K_I = 565 μ M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu V_{max} = $1.8 \cdot 10^{-7}$ M/s bestimmt.

3.3.2.2 Untersuchung der Inhibition von GTA

Für die Untersuchung des inhibitorischen Potenzials von 1, 2 und 3 gegenüber GTA wurde der Enzymassay für die Bestimmung von K_M modifiziert. Da durch die Zugabe der Inhibitoren mit einer längeren Gesamtdauer der Enzymreaktion gerechnet werden musste, wurde die Konzentration an GTA innerhalb des Assays auf 60 nM vervierfacht. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen hinzugefügt, die ihrer im radiochemischen Assay ermittelten inhibitorischen Konstante gegenüber GTB entsprach. Da die eingesetzte Konzentration an UDP-GalNAc mit 150 μ M sehr nahe an dem ermittelten K_M Wert unter den

verwendeten Bedingungen lag, wurde diese Konzentration und dementsprechend der zehnfache Überschuss an H-Antigen Disaccharid mit 1.5 mM aus dem vorangegangenen Enzymassay mit GTA übernommen. Der Inhibitionsassay wurde bei 37 °C durchgeführt und mit der Zugabe des Donorsubstrats begonnen. Die Messungen der Enzymreaktionen in Anwesenheit der UDP-Mimetika 1 und 2 wurden jeweils für 15 Stunden durchgeführt, wobei alle 7 Minuten ein 1 H Spektrum mit 120 *scans* und *excitation sculpting* aufgenommen wurde. Die Analyse der Reaktion wurde analog zum Enzymassay anhand von *H-5/H-1* ' von UDP-GalNAc durchgeführt. Die Auswertung der experimentellen Daten nach *Gl-7* ergab eine Inhibitionskonstante für 1 von $K_I = 712 \mu M$ (Abbildung 54).

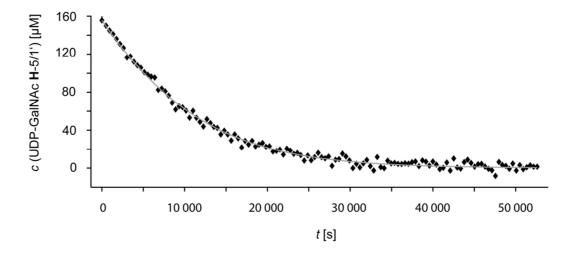


Abbildung 54: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc anhand H-5/H-1' im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von $\mathbf{1}$. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Hemmung wurde K_I zu K_I = 712 μ M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu V_{max} = 4.2·10⁻⁸ M/s bestimmt.

Die Inhibition von GTA durch $\mathbf{2}$ wurde unter analogen Bedingungen durchgeführt, wobei $\mathbf{2}$ in einer Konzentration von 2.2 mM vorlag. Unter diesen Bedingungen wurde eine inhibitorische Konstante von $K_I = 1.1$ mM für $\mathbf{2}$ ermittelt (Abbildung 55). Dieses Ergebnis zeigt, dass beide UDP Mimetika in der Lage sind, nicht nur GTB zu inhibieren, sondern auch GTA. Zudem fällt auf, dass GTA durch $\mathbf{1}$ um einen Faktor von 1.5 stärker inhibiert wird, als durch $\mathbf{2}$. Dieses Verhältnis wurde schon bei der Inhibition von GTB durch $\mathbf{1}$ und $\mathbf{2}$ beobachtet (s. Tabelle 6).

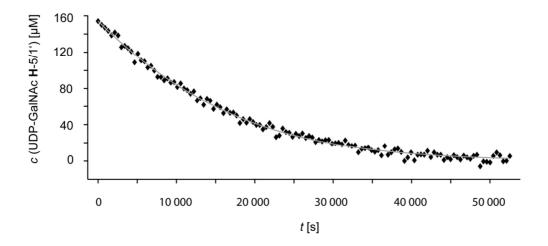


Abbildung 55: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc anhand H-5/H-1' im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von **2.** Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Hemmung wurde K_I zu $K_I = 1.1$ mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu $V_{max} = 2.3 \cdot 10^{-8}$ M/s bestimmt.

Auch die Inhibition von GTA durch 3 wurde untersucht, um die Spezifität des donorsubstratanalogen Inhibitors zu überprüfen. Das Experiment wurde analog zu 1 und 2 durchgeführt und der Inhibitor 3 in einer Konzentration von 1.6 mM verwendet. In diesem Fall konnte für 3 keine Inhibitionskonstante ermittelt werden, da sich für die Lambert-W-Funktion keine sinnvolle Lösung für die inhibitorische Konstante ergab. Betrachtet man die Progresskurve im Vergleich zu den erhaltenen Daten der Inhibition durch 2, so wird deutlich, dass UDP-GalNAc sehr viel schneller in Anwesenheit von 3 umgesetzt wird (Abbildung 56).

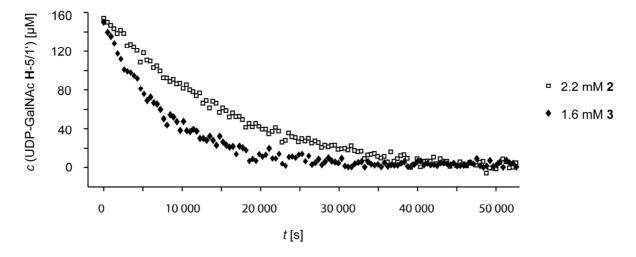


Abbildung 56: Progresskurven der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von 2 bzw. 3. Für die Progresskurve der Inhibition durch 3 konnte keine eindeutige Lösung für die Inhibitionskonstante erhalten werden. Vergleicht man jedoch den Umsatz von UDP-GalNAc gegen die Zeit mit der Reaktion in Anwesenheit von 2, so wird deutlich, dass GTA das Donorsubstrat in Anwesenheit von 3 wesentlich schneller umsetzt.

Die durchgeführten Experimente mit GTA lassen den Schluss zu, dass sich 1 und 2 durchaus auch für andere GTs, die UDP-aktivierte Zucker als Donorsubstrat nutzen, als UDP Mimetika

nutzen lassen können. Durch die sehr hohe Homologie der beiden Enzyme GTA und GTB könnte aber die Inhibition auch durch den Aufbau der sehr ähnlichen Bindungstasche für das Donorsubstrat hervorgerufen sein, die eventuell bei anderen GTs etwas weniger Raum für das Harnsäurefragment bieten könnte. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich der Inhibition von GTA und GTB durch das Inhibitormolekül 3 deutlich, dass die Anwesenheit der α-D-Galactopyranosyleinheit nur im Fall der GTB einen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Reaktion von nimmt. Während 1 und 2 in der Lage waren, die GTA zu inhibieren, scheint in 3 die Spezifität des Inhibitors deutlich erhöht, so dass 3 nicht mehr mit dem eigentlichen Donorsubstrat UDP-GalNAc konkurriert. Ob 3 auch durch weitere GTs, die nicht D-Galactose übertragen, diskriminiert wird, müsste durch weitere Experimente mit anderen Glycosyltransferasen deutlich werden.

Trotz dieser noch nicht vollständig abgeschlossenen Überprüfung hinsichtlich des Inhibitionspotenzials von 3 gegenüber weiteren Glycosyltransferasen soll nun in einem abschließenden Teil ein erster Ansatz für eine Weiterentwicklung von 3 zu einem bisubstratanalogen Inhibitor von GTB vorgestellt werden.

3.4 Entwicklung eines bisubstratanalogen Inhibitors

Für die Entwicklung eines bisubstratanalogen Inhibitors, der in diesem Fall nur die GTB spezifisch inhibieren soll, muss neben dem Donorsubstrat, welches die hohe Affinität mitbringt, auch die Struktur des Akzeptorsubstrats in den potenten Inhibitor mit einfließen, da hier der größte Anteil an Spezifität gegenüber einer GT lokalisiert ist. Innerhalb des Akzeptorsubstrats sind spezifische Molekülfragmente für die Substraterkennung von unterschiedlicher Wichtigkeit, so dass Fragmente, die für die Spezifität eine große Rolle spielen, nicht vernachlässigt werden sollten.

3.4.1 Beurteilung der Lage von UDP-Gal und des H-Antigen Disaccharids in der Bindungstasche von GTB

Für die GTB ist beschrieben, dass innerhalb des Akzeptorsubstrats das Bindungsepitop durch das H-Antigen Disaccharid gebildet wird. Innerhalb dieses Disaccharids bewirkt vorrangig die β-D-Galactopyranosyleinheit den größten Anteil der Spezifität, während die Anwesenheit des L-Fucosylrestes die Katalysegeschwindigkeit beeinflusst. Die Betrachtung der Lage von UDP-Gal und der D-Galactoseeinheit des H-Antigen Disaccharids in der Bindungstasche von GTB sollte nun Aufschluss darüber geben, wie eine Verknüpfung beider Galactoseeinheiten aussehen müsste, um möglichst gut die Bindungstaschen der Kohlenhydratfragmente auszufüllen.

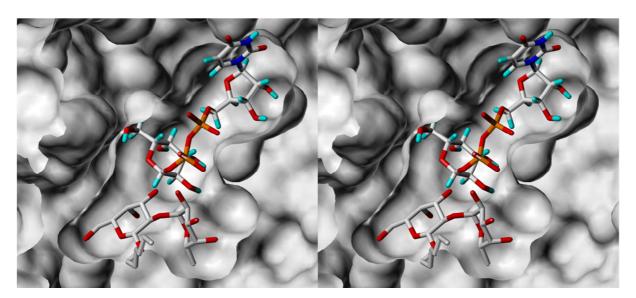


Abbildung 57: Crossed-eye Darstellung von UDP-Gal und dem H-Antigen Disaccharid in der Bindungstasche für das Donor- und Akzeptorsubstrat von GTB. Das Donorsubstrat UDP-Gal (atom-type, rechts oben) bindet in der für das Donorsubstrat spezifischen Bindungstasche, wobei die α-D-Galactopyranosideinheit von UDP-Gal so positioniert ist, dass das anomere Zentrum in die Nähe der O3-Position des terminalen D-Galactopyranosids des H-Antigens (atom-type, links unten) zeigt. Das H-Antigen Disaccharid besetzt die Bindungstasche des Akzeptorsubstrats, wobei das jeweilige Monosaccharid in einer eigenen Tasche gebunden wird.

Um sich ein Bild von der räumlichen Nähe beider Galactoseeinheiten zu machen, wurde die relative Lages des UDP-Gals und des H-Antigen Disaccharids in der Bindungstasche von GTB analysiert. Dazu wurde mit der Röntgenkristallstruktur von GTB in der geschlossenen Form (pdb: 2rj8) gearbeitet. In dieser Kristallstruktur besetzen α-L-Fuc-(1-2)-β-D-Gal-octyl als Akzeptorsubstratanalogon und UDP das aktive Zentrum. Für die Betrachtung der räumlichen Nähe der Substrate wurden die natürlichen Substrate mittels des Programms SYBYL in ihrer Bindungstasche angeordnet. Das H-Antigen Disaccharid wurde wie in der

Kristallstruktur dargestellt verwendet, während UDP-Gal aus der Struktur der Chimäre aus GTA und GTB (AABB, pdb: 2rj7) extrahiert und UDP entfernt wurde. Man erkennt, dass das anomere Zentrum in UDP-Gal in der Nähe der 3-Hydroxyfunktion positioniert ist, um in der eigentlichen Enzymreaktion die neue glycosidische Bindung zu bilden (Abbildung 57).

Für die Entwicklung eines bisubstratanalogen Inhibitors ist die Nutzung der anomeren Position an der zu übertragenden Kohlenhydrateinheit ausgeschlossen, da der Inhibitor 3 (oder ein Analogon) an dieser Stelle das Nucleotidmimetikum als Aglycon trägt. Auf Seiten des H-Antigens schien es sinnvoll, die 3-Hydroxyfunktion für die Bindung an einen donorsubstratanalogen Inhibitor zu nutzen, da sie als Akzeptor keine signifikanten Kontakte mit dem Enzym eingeht. Im Gegensatz dazu kann die 4-Hydroxygruppe, die durch ihre Lage innerhalb der Bindungstasche auch eine alternative Brücke zum Donorzucker darstellen könnte, nicht ohne Schwächung der Bindung zur GTB genutzt werden, da sie wichtige Wechselwirkungen mit der GTB eingeht (Abbildung 58). Um den Beitrag dieser alternativen Hydroxyfunktion zur Bindung nicht zu schwächen, wurde die 3-OH Gruppe als beste Wahl angesehen.

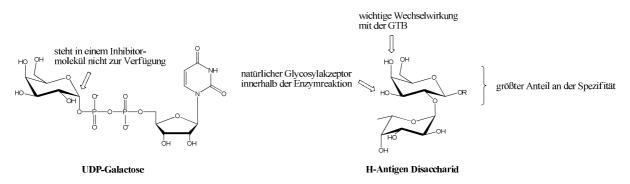


Abbildung 58: Betrachtung von UDP-Galactose und des H-Antigen Disaccharids bezüglich der Möglichkeiten einer Verknüpfung zur Besetzung des aktiven Zentrums.

Für die Erweiterung des UDP-Gal Mimetikums zu einem Inhibitor, der möglichst gut das katalytische Zentrum von GTB abdeckt, wurde nun 3 anstelle von UDP-Gal in dessen Bindungstasche positioniert. Für eine neue kovalente Bindung zwischen den Galactosyleinheiten beider Verbindungen wurde nach möglichst kurzen Distanzen gesucht, die die im Voraus festgelegten Rahmenbedingungen erfüllen. Betrachtet man nun 3 in der Donorbindungstasche, so fällt auf, dass neben dem anomeren Zentrum in 3 auch die 6-Hydroxygruppe in relativer Nähe der 3-OH Gruppe des H-Antigens positioniert ist (Abbildung 59). Dies würde eine Bindung beider Kohlenhydrateinheiten mittels einer etherischen Verknüpfung über diese Hydroxygruppe ermöglichen.

Für eine Beurteilung der Hypothese schien die Synthese eines entsprechenden Disaccharids sinnvoll, da so festgestellt werden kann, ob eine Erweiterung des Inhibitors mit einem zweiten Galactosylrest in einer erhöhten Spezifität und auch eventuell in einem größeren Inhibitionspotenzial resultieren würde.

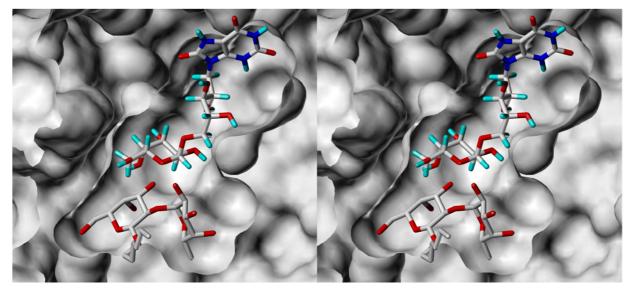


Abbildung 59: *Crossed-eye* Darstellung von UDP-Gal und **3** in der Bindungstasche für das Donor- und Akzeptorsubstrat von GTB. Der Inhibitor **3** (*atom-type*, rechts oben) bindet in der für das Donorsubstrat spezifischen Bindungstasche. Das H-Antigen Disaccharid (*atom-type*, unten) ist entsprechend der Röntgenkristallstruktur von GTB (pdb: 2rj8) positioniert. Neben dem anomeren Zentrum der α-D-Galactopyranosylfragmentes von **3** befindet sich auch die 6-Hydroxygruppe in relativer Nähe zu *O3*-Postion des Galactopyranosids des H-Antigens. Da das anomere Zentrum der Galactose-Einheit von **3** nicht zur Verfügung steht, wurde sich für eine 3,6-*O*-Bindung zwischen den D-Galactose-Einheiten des H-Antigens und **3** entschieden.

3.4.2 Synthesestrategie zur Darstellung eines bisubstratanalogen Inhibitors für GTB

3.4.2.1 Syntheseplanung für einen bisubstratanalogen Inhibitor

Für die Synthese eines bisubstratanalogen Inhibitors, der sowohl die Charakteristika der in dieser Arbeit entwickelten und analysierten UDP- und UDP-Gal Mimetika beinhaltet, als auch die Bindungstasche des H-Antigens besetzen kann, schien es sinnvoll, das gewünschte Disaccharid auch ohne den UDP-Ersatz auf seine Bindungsaffinität gegenüber GTB zu untersuchen. Diese Möglichkeit würde bei keiner oder bei einer unspezifischen Bindung die Möglichkeit bieten, die Verknüpfung beider Substrat-Kohlenhydrate neu zu überdenken und

nach Alternativen zu suchen, die dann hinsichtlich ihrer verbesserten Bindungseigenschaften untersucht werden können.

Abbildung 60: Donor- (**UDP-Gal**), Akzeptorsubstrat (**H-Antigen**) und Produkt (**B-Antigen**) der Enzymreaktion von GTB im Vergleich zu bisubstratanalogen Inhibitoren (**25**). Der Nucleotidteil von UDP-Gal ist durch ein Harnsäurederivat mit Pentityl- bzw. einem Ethoxyethyllinker ersetzt, an dessen primärer Hydroxygruppe ein α -D-Galactopyranosylrest glycosidisch gebunden ist. Dieser Saccharidrest ist über seine *O*6-Position an die *O*3-Position einer β -D-Galactopyranosid-Einheit verbrückt.

In Abbildung 60 sind beide Substrate und das Produkt der GTB im Vergleich zu möglichen bisubstratanalogen Inhibitoren (25.1 - 25.3) gezeigt, die basierend auf den bisherigen Ergebnissen für die UDP-Gal Mimetika denkbar sind.

Für die Synthese aller drei Inhibitoren 25 kann das Molekül in zwei Hauptbestandteile geteilt werden, aus denen der Inhibitor aufgebaut werden kann. Durch diesen Schnitt ergibt sich ein Kohlenhydratteil, der die Zuckerbindungstaschen des Donor- und Akzeptors im aktiven Zentrum von GTB besetzen soll, und die UDP Mimetika 1, 2 oder 26. Da die Syntheseplanung für alle drei Moleküle ähnlich verläuft, ist die weitere Vorgehensweise exemplarisch an 25.3 verdeutlicht (Abbildung 61).

Abbildung 61: Retrosynthetische Betrachtung von **25.3**. Für die Synthese werden 2 Hauptbestandteile benötigt, die sich zu dem UDP Mimetikum **26** und einem Disaccharid ergeben, welches die beiden Galactosideinheiten beinhaltet, die die zuckererkennenden Donor- und Akzeptordomänen besetzen sollen. Für die Glycosylierungsreaktion dieses Moleküls mit **26** muss das Disaccharid entsprechend geschützt und als Glycosyldonor vorliegen.

Da 26 im Linkerfragment im Gegensatz zu 1 und 2 keine Hydroxyfunktionen besitzt, die an der Glycosylierungsreaktion teilnehmen könnten, müsste 26 für die Glycosylierungsreaktion nicht weiter geschützt vorliegen. Diese Eigenschaft sollte die Darstellung des Inhibitormoleküls stark vereinfachen. Für die Darstellung von 25.1 und 25.2 könnte durch Acetylierung der sekundären Hydroxygruppen in 1 und 2 aber analoge Bedingungen für die Glycosylierungsreaktion mit dem Disaccharid geschaffen werden.

Abbildung 62: Betrachtung der Synthese eines Disaccharids für die Darstellung eines bisubstratanalogen Inhibitors. Für die Synthese werden zwei D-Galactopyranosidderivate benötigt, die entsprechend der gewünschten O(3,6)-Bindung geschützt vorliegen müssen. Während die O(3)-Position des Methyl β -D-Galactopyranosids frei vorliegt, muss die (3)-Hydroxyfunktion der zweiten D-Galactopyranosideinheit in eine gute Abgangsgruppe überführt werden, um bei einem nucleophilen Angriff die gewünschte Etherbindung zu ermöglichen.

Die Synthese des Disaccharids sollte aus zwei geschützten D-Galactopyranosid-Derivaten möglich sein. Für diese Synthese sollte die D-Galactopyranosid-Einheit, welche die Akzeptorbindungstasche besetzen soll, im Produkt als β -Anomer vorliegen, da dies der natürlichen Konfiguration im H-Antigen entspricht. Zudem sollte die 3-Hydroxygruppe in

diesem Kohlenhydratderivat ungeschützt sein, um an dieser Position selektiv die neue Bindung zur 6*O*-Position der zweiten D-Galactoseeinheit zu gewährleisten. Weiterhin sollten dafür die 2,4,6–*O*-Positionen für die Synthese geschützt vorliegen (Abbildung 62).

Fiir die Synthese des zweiten D-Galactopyranosidderivats, welches der D-Galactopyranosideinheit des Donorsubstrats entspricht, muss die 60-Position in eine gute Abgangsgruppe überführt werden, um die gewünschte Bindung zwischen beiden Monosacchariden zu erhalten. Weiterhin ist am anomeren Zentrum die Möglichkeit der Einführung einer aktivierende Gruppe für die Glycosylierungsreaktion mit einem UDP Mimetikum nötig, um den bisubstratanalogen Inhibitor synthetisch darstellen zu können (Abbildung 62). Dies bedeutet für die Synthese dieses Derivats, dass bei der Wahl der Schutzgruppe an O2 auf eine nachbargruppeninaktive Schutzgruppe zurückgegriffen werden muss, um am anomeren Zentrum die α-Konfiguration zu erhalten.

Diese Überlegungen resultierten in den in Abbildung 63 gezeigten D-Galactopyranosidderivaten 27 und 28, die für den Aufbau des gewünschten Disaccharids 29 eingesetzt werden sollten.

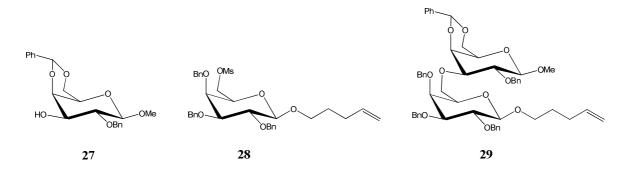


Abbildung 63: Geschützte D-Galactopyranosidderivate, die durch eine nucleophile Reaktion das gewünschte Disaccharid **29** eines bisubstratanalogen Inhibitors ergeben sollten. **27** ist in diesem Fall der Glycosylakzeptor, welcher an *O3*-Position ungeschützt vorliegt. Das D-Galactosylderivat **28** besitzt an *O6* eine Mesylgruppe als gute Abgangsgruppe, um die Substitutionsreaktion zu ermöglichen. Die Positionen 2, 3 und 4 sind durch Benzylether geschützt, da an Position 2 für weitere Reaktionen eine nachbargruppeninaktive Gruppe für weitere Syntheseschritte benötigt wird. Das anomere Zentrum ist durch eine Pentenylgruppe geschützt, da diese inert gegenüber vielen Reaktionsbedingungen ist und sich zu einem aktiven Glycosyldonor umsetzen lässt.

Die Schutzgruppenstrategie für **27** sieht eine Benzylidenschutzgruppe an den Positionen 4 und 6 vor, während die Hydroxyfunktion an *O*2 durch einen Benzylether geschützt ist. Diese wurde gewählt, weil **28** perbenzyliert vorliegen sollte und somit alle vorhandenen Benzylether im Produkt in einem Schritt entfernt werden können. **28** sollte durch Benzylether an den Positionen 2, 3 und 4 geschützt werden, da für folgende Glycosylierungsreaktionen eine nachbargruppeninaktive Schutzgruppe an Position 2 verwendet werden muss. Die

Verwendung eines Mesylrests an C-6 sollte als gute Abgangsgruppe genutzt werden. Für die Schützung des anomeren Zentrums wurde sich für Pentenyl entschieden, da diese Schutzgruppe unter den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil sein sollte und sich im Anschluss an die geplante Substitutionsreaktion leicht in einen Glycosyldonor überführen lässt. Dieser kann dann mit Methanol in das entsprechende Methylglycosid umgesetzt werden, wodurch die Untersuchung des Disaccharids hinsichtlich seiner Bindungsaffinität gegenüber GTB möglich sein sollte. Im Falle von günstigen Bindungseigenschaften könnte aus demselben Donor durch eine Glycosylierungsreaktion mit einem UDP Mimetikum ein bisubstratanaloger Inhibitor dargestellt werden, ohne die Synthese des Disaccharidderivats umstellen zu müssen. Die Synthese der einzelnen Inhibitorfragmente soll nun im Folgenden beschrieben werden.

3.4.2.2 Synthese eines UDP Mimetikums mit reduzierter Polarität im Linkerfragment

Die Harnsäurederivate 1 und 2 besitzen beide polare Fragmente, die den Pyrophosphatrest des UDPs mimikrieren. Zusätzlich wurde eine Variante synthetisiert, die eine verringerte Polarität des Linkerfragments aufweist. Zudem sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, Glycosylierungsreaktionen an dem Linker durchführen zu können, ohne eine sehr aufwändige Schutzgruppenstrategie anwenden zu müssen. Aus diesen Überlegungen wurde als dritte Möglichkeit nun 2-(2-Aminoethoxy)ethanol als Linkerfragment in Erwägung gezogen, welches nur noch eine primäre Hydroxyfunktion aufweist und keine sekundären Hydroxyfunktionen wie in 1 und 2, wodurch eine verminderte Polarität innerhalb dieses Fragments resultiert. Um die Polarität nicht komplett aufzugeben, sollte diese Eigenschaft durch die Etherfunktion des Moleküls widergespiegelt werden. So wurden mit der gewählten Synthesestrategie auch 2-(2-Aminoethoxy)ethanol und 8 für 24 Stunden bei Raumtemperatur entsprechenden 6-Amino-5-nitrouracilderivat **30** umgesetzt. Anschließende Hydrogenolyse unter Verwendung von Pd/C und H₂ ergab dann das Carbamat 31. Die Cyclisierung zu 26 wurde erfolgreich in 0.03 M Natriumethanolat-Lösung durchgeführt (Abbildung 64).

Abbildung 64: Synthese von 26. Die Synthese des Harnsäurederivats 26 erfolgte analog zur Synthese von 1, 2 und 3. 6-Chlor-5-nitrouracil (8) wurde mit einem entsprechenden Amin zu dem Aminouracilderivat 30 umgesetzt, welches nach Hydrogenolyse in das Carbamat 31 überführt wurde. 26 wurde erfolgreich durch Cyclisierung von 31 mit einer Gesamtausbeute von 13% erhalten.

3.4.2.3 Synthese der Monosaccharidderivate zur Darstellung des Kohlenhydratteils eines bisubstratanalogen Inhibitors

Das wichtigste Fragment für die Spezifität des bisubstratanalogen Inhibitors ist in seinem Kohlenhydratteil zu finden, der möglichst gut die Bindungsstellen der beiden D-Galactopyranosideinheiten der Substrate von GTB besetzen sollte. Die vorangegangenen Überlegungen resultierten nun in Synthesen, die die gewünschten Monosaccharidderivate 27 und 28 liefern sollten.

Als Ausgangspunkt für die Synthese von **27** diente Methyl β-D-galactopyranosid (**32**), welches unter Standardbedingungen aus D-Galactose dargestellt wurde. Dieses wurde nach literaturbekannter Prozedur unter Verwendung von Benzylidendimethylacetal bzw. Benzaldehyd in das 4,6-*O*-Benzylidenderivat **33** überführt.^[87,88] Um die freie Hydroxyfunktion in **27** zu erhalten, wurde nun die 3*O*-Position durch die Verwendung von Benzoylchlorid und HOBt selektiv geschützt.^[89] Durch diesen Schritt sollte die folgende Benzylierung der freien Hydroxygruppe in **34** in möglichst hoher Ausbeute durchgeführt

werden können, da normalerweise eine regioselektive Reaktion an *O*2 bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Reaktionszentrums an *O*3 schwer durchzuführen ist. **34** konnte unter Verwendung von HOBt/BzCl erfolgreich mit 89% Ausbeute dargestellt werden.

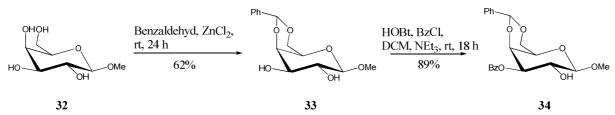


Abbildung 65: Darstellung des β -D-Galactosederivats **34** ausgehend von **32**. Durch die Einführung einer Benzylidenschutzgruppe an O4 und O6 konnte nun regioselektiv die O3 Position mit Hilfe von HOBt durch eine Benzoylgruppe geschützt werden.

Die anschließende Schützung der Hydroxyfunktion an O2 wurde nun mit Benzylbromid unter Verwendung von NaH in DMF durchgeführt. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das gewünschte Produkt 35 nur mit einer Ausbeute von 12% erhalten werden. Bei dieser Reaktion wurden neben dem Produkt das 2,3-O-Benzylderivat und Methyl 3-O-benzyl-4,6-Obenzyliden-β-D-galactopyranosid isoliert, was auf den Verlust und eine Acylwanderung der Benzoylgruppe von O3 auf O2 unter den verwendeten Bedingungen schließen lässt. Dementsprechend wurden die Reaktionsbedingungen geändert und die Reaktion unter Phasentransferkatalyse durchgeführt. Dazu wurde 34 in Dichlormethan und 10%-iger wässriger NaOH mit Tetrabutylammoniumbromid und Benzylbromid für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. [90] Jedoch konnte auch in diesem Fall 35 nur mit einer Ausbeute von 11% erhalten werden. Um die Ausbeute von 35 zu steigern, wurde anstelle der basischen Reaktionsbedingungen der bis dato durchgeführten Reaktionen eine säurekatalysierte Benzylierung von 34 durchgeführt. Unter diesen Umständen Benzyltrichloracetimidat bei Anwesenheit von basenlabilen funktionellen Gruppen eine erfolgen.^[91,92] Hydroxyfunktion Bei Alkylierung der Verwendung dieser Reaktionsbedingungen wurde 35 massenspektrometrisch jedoch nicht nachgewiesen.

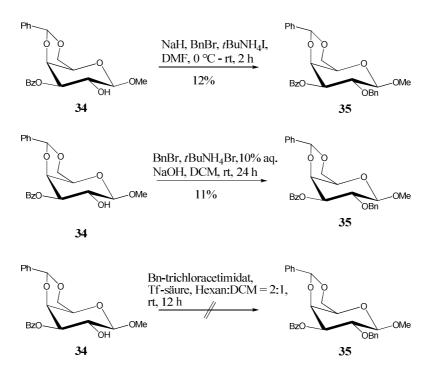


Abbildung 66: Darstellung des vollständig geschützten β -D-Galactopyranosylderivats **35** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Um dieses Galactosederivat für die Synthese des Disaccharids nutzen zu können, wurde **35** an Position *O*3 unter Verwendung von 1% Natriumhydroxid in Methanol entschützt und **27** in einer Ausbeute von 96% erhalten (Abbildung 67).

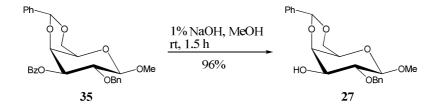


Abbildung 67: Darstellung von **27** durch Entfernung der Benzoylschutzgruppe an O3 von **35**. Die Entschützung der Hydroxyfunktion unter Verwendung von 1% NaOH in Methanol führte mit 96% Ausbeute zum gewünschten β -D-Galactopyranosylderivat **27**.

Somit konnte 27 über vier Stufen erfolgreich erhalten werden.

Für die Synthese von **28** wurde von Penta *O*-acetyl-D-galactopyranosid (**36**) ausgegangen, das durch Peracetylierung von D-Galactose erhalten wurde. Dieses wurde durch die Verwendung von HBr/Eisessig in das entsprechende α-D-Galactopyranosylbromid (**37**) überführt, um das 4-Pentenylaglycon in die Verbindung einzuführen. Dazu wurde **37** unter Koenigs-Knorr Bedingungen mit 4-Penten-1-ol umgesetzt^[93] und **38** mit einer Ausbeute von 54% erhalten. Da die benötigte Verbindung **28** für weitere Reaktionen an den Positionen 2, 3 und 4 perbenzyliert vorliegen und eine freie Hydroxyfunktion an Position-6 besitzen sollte, wurden

die Acetylschutzgruppen in **38** unter basischen Bedingungen entfernt und **39** mit 77% Ausbeute dargestellt (Abbildung 68).

Abbildung 68: Darstellung des Pentenylgalactosids **39** ausgehend von peracetylierter D-Galactose (**36**). Die Verbindung **38** wurde über die Darstellung des Galactosyldonors **37** und anschließender Umsetzung unter Koenigs-Knorr Bedingungen mit einer Ausbeute von 51% erhalten.

Mit einer alternativen Syntheseroute zu **39** konnte der synthetische Aufwand stark reduziert werden. Durch die Verwendung von BF₃·Et₂O konnte die Glycosylierungsreaktion Lewissäure-katalysiert mit 4-Penten-1-ol und **36** durchgeführt werden. Dies bedeutete, dass der Glycosyldonor **37** nicht mehr synthetisiert werden musste. Die anschließende Entschützung von **38** ergab **39** mit 67% Ausbeute über zwei Stufen (Abbildung 69).

Abbildung 69: Lewissäure-katalysierte Glycosylierung von **36** zur Darstellung des Pentenylgalactosids **39**. Durch Verwendung von Bortrifluorid-Etherat konnte **36** direkt zum acetylierten Pentenylglycosid **38** umgesetzt werden, welches dann durch basische Entfernung der Acetylschutzgruppen **39** ergab.

Anschließend wurde der Zucker durch Einführung einer Tritylgruppe an der primären Hydroxygruppe an Position 6 für die anschließende Benzylierung vorbereitet. So wurde 40 unter Verwendung von Tritylchlorid in Pyridin mit 58% Ausbeute erhalten. Die Perbenzylierung wurde dann durch Verwendung von Natriumhydrid und Benzylbromid in DMF durchgeführt und resultierte in der Verbindung 41. Nach Isolierung wurde das

vollgeschützte Monosaccharid **41** in DCM gelöst und mit 1.83 M Trifluoressigsäure und 1.83 M Trifluoressigsäureanhydrid in DCM^[95] versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nun so lange gerührt, bis eine vollständige Entfernung der Tritylschutzgruppe an *O*6 mittels Dünnschichtchromatographie zu beobachten war. Unter diesen gewählten Bedingungen konnte **42** mit 68% Ausbeute erhalten werden. Durch Verwendung einer alternativen Darstellungsmethode, in der **41** ohne weitere Reinigung eingesetzt und die Tritylschutzgruppe unter schwefelsauren Bedingungen entfernt wurde, ^[94] konnte **42** mit einer Ausbeute von 95% über 2 Schritte erhalten werden (Abbildung 70).

Abbildung 70: Darstellung des perbenzylierten Pentenylgalactopyranosids **42**. Durch die Verwendung einer Tritylschutzgruppe an Position 6 von **39** konnten anschließend die restlichen freien Hydroxyfunktionen mittels BnBr und NaH alkyliert werden. Durch die Verwendung dieser Schutzgruppe können in folgenden Glycosylierungsreaktionen α -selektiv ohne störende Nachbargruppenaktivität einer funktionellen Gruppe an O2 durchgeführt werden. Anschließend wurde die Tritylschutzgruppe mit TFA/TFAA bzw. schwefelsaurem Methanol entfernt und **42** mit 68% bzw. 95% Ausbeute erhalten.

Im finalen Schritt in der Syntheseroute von **28** sollte nun die primäre Hydroxyfunktion in **42** in eine Mesylgruppe überführt werden, um so bei der Substitutionsreaktion mit **27** als gute Abgangsgruppe zu fungieren. Dazu wurde **42** mit Mesylchlorid in Pyridin für 2.5 Stunden

gerührt. Nach Isolierung des Produkts konnte **28** mit einer Ausbeute von 92% erhalten werden (Abbildung 71).

Abbildung 71: Darstellung von **28** durch Reaktion von **42** und Mesylchlorid. Das gewünschte Produkt konnte mit 92% Ausbeute durch Reaktion von **42** mit Mesylchlorid in Pyridin isoliert werden.

Somit konnte das zweite wichtige D-Galactopyranosylderivat **28**, welches für den Aufbau des Kohlenhydratteils eines potenten bisubstratanalogen Inhibitors benötigt wird, erfolgreich mit einer Gesamtausbeute von 34% über 6 Stufen erhalten werden.

Mit der Darstellung der beiden Monosaccharidderivate **27** und **28** konnte nun die Synthese zu dem gewünschten Disaccharid erfolgen.

3.4.2.4 Versuch der Synthese des Kohlenhydratteils für einen bisubstratanalogen Inhibitor

Für die Darstellung des Disaccharids **29** wurden die Monosaccharide **27** und **28** genutzt. Da die 3-Hydroxyfunktion von **27** für die Produktbildung mit möglichst hoher Nucleophilie agieren sollte, wurde sich für NaH als basisches Reagenz entschieden und die Reaktion für eine erste Untersuchung in DMF und bei unterschiedlichen Temperaturen (rt, 0 °C, -10 °C, -50 °C) durchgeführt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dabei per Dünnschichtchromatographie. Nach säulenchromatographischer Trennung des Produktgemisches wurden die Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. **29** wurde jedoch in allen Fällen nicht isoliert. Es konnten lediglich die Edukte und das Eliminierungsprodukt aus **28** detektiert werden.

Abbildung 72: Versuch der Darstellung des Disaccharids **29**. Die Monosaccharidderivate **27** und **28** wurden in DMF bei unterschiedlicher Temperatur zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht isoliert werden.

Um die Eliminierung zu vermeiden, sollte die Abgangsgruppe verändert und anstelle des Mesylrestes ein Triflat genutzt werden. Dafür wurde **42** mit Triflatanhydrid umgesetzt, wobei **43** nicht isoliert werden konnte (Abbildung 73).

Abbildung 73: Darstellung von **43**. Mit Hilfe von Trifluormethansulfonsäureanhydrid sollte die 6-Hydroxyfunktion von **42** in eine gute Abgangsgruppe überführt werden.

Des Weiteren wurde ein Versuch zur Darstellung von **29** über das Derivat **44** unternommen. Dazu wurde **28** mit Hilfe von Lithiumbromid in **44** mit 12% Ausbeute überführt.

Abbildung 74: Darstellung des 6-Bromo-6-deoxy-derivats 44 unter Verwendung von LiBr.

Unter Verwendung von **27** und NaH als Base sollte nun das Bromid in **44** als gute Abgangsgruppe fungieren, ohne zur Eliminierungsreaktion zu neigen. Unter den Reaktionsbedingungen wurde **29** nicht isoliert. Es wurde kein Eliminierungsprodukt sondern vorrangig **44** nachgewiesen (Abbildung 75).

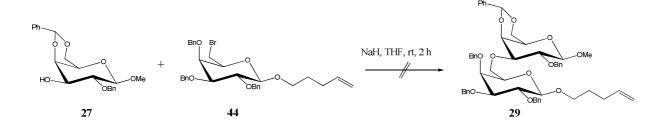


Abbildung 75: Versuch der Darstellung von **29** mit Hilfe des Bromoderivats **44**. Es wurde NaH als Base verwendet, wobei auf die Zugabe von 18-Krone-6 verzichtet wurde. Das Produkt **29** wurde nicht nachgewiesen.

Dies lässt darauf schließen, dass das 6-Bromo-6-deoxyderivat **44** für die gewählten Reaktionsbedingungen zu träge zu sein scheint und sich dementsprechend eine Umsetzung von **28** unter alternativen Reaktionsbedingungen vorteilhafter wäre. So wurde versucht, **27** unter Verwendung von K_2CO_3 zu deprotonieren und anschließend mit **28** bei Raumtemperatur für 2 Stunden zur Rektion zu bringen. Auch in diesem Fall konnte kein Produkt **29** massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bei Verwendung der Mesylverbindung **28** und K_2CO_3 als Base wäre somit eine längere Reaktionszeit sinnvoll und vielversprechend.

4 Zusammenfassung

Die Suche nach spezifischen Inhibitoren für Glycosyltransferasen ist bis heute anspruchsvoll. Dies liegt einerseits an der komplexen Reaktion, die von den Enzymen katalysiert wird und wird andererseits durch die Lage der Enzymklasse erschwert, die als Transmembranproteine vorrangig im Golgi lokalisiert sind. Zusätzlich verwenden verschiedene GTs identische Donorsubstrate, so dass dadurch für die spezifische Inhibition eines einzigen Zielenzyms viele Faktoren berücksichtigt werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Überprüfung eines innovativen Konzepts zur spezifischen Inhibition einer einzelnen Glycosyltransferase erfolgreich an dem Modellsystem der humanen Blutgruppe-B-spezifischen Galactosyltransferase durchgeführt werden.

Zwei 9-*N*-Pentityl Harnsäurederivate (**1** und **2**), die sich in computergestützten Experimenten als vielversprechende Kandidaten für den Ersatz des UDPs im Donorsubstrat UDP-Gal herausstellten, wurden erfolgreich synthetisiert und anschließend analysiert. Die Bindungseigenschaften der UDP Mimetika konnte durch SPR-Studien und STD-NMR Experimente charakterisiert und zudem ein Bindungsepitop für das Linkerfragment der Mimetika erstellt werden. Ihre inhibitorische Wirkung gegenüber GTB konnte in kompetitiven STD NMR Experimenten und mit Hilfe eines radiochemischen Inhibitionsassays nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass **1** GTB um einen Faktor von 1.5 stärker inhibiert als **2**, so dass sich die inhibitorischen Konstanten beider Verbindungen in einer ähnlichen Größenordnung bewegen. Die UDP Mimetika sind in der Lage, den energiereichen und ionischen Pyrophosphatteil des Donorsubstrats zu ersetzen, wobei bei Anwesenheit von Mg²⁺ als bivalentes Kation eine zu UDP vergleichbare Bindungsaffinität erhalten wird.

Die Ergebnisse resultierten in einer Erweiterung der UDP-Mimetika zu den UDP-Gal Mimetika 3 und 4 in silico, wobei 3 auf Grund eines effizienteren synthetischen Zugangs für die Darstellung ausgewählt wurde. Die Bindungseigenschaften von 3 gegenüber GTB wurden mit Hilfe von SPR und STD NMR Experimenten untersucht. Auch hier konnte ein Bindungsepitop mittels STD NMR Spektroskopie erstellt werden. Die Inhibition von GTB durch 3 wurde anhand von einer kompetitiven STD Titration und eines radiochemischen Enzymassays bestimmt, wobei sich zeigte, dass 3 GTB um einen Faktor von knapp 5 (STD NMR) stärker inhibiert als 2, von dem sich 3 ableitet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die drei neuen Inhibitoren 1, 2 und 3 wurden auf ihr Inhibitionspotenzial gegenüber der Glycosyltransferase GTA analysiert. Für dieses Vorhaben wurde ein neuer NMR basierter Inhibitionsassay entwickelt, der sich auf die Progresskurvenanalyse der Enzymreaktion stützt. Dabei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass 1 und 2 auch GTA inhibieren. Dieses Enzym nutzt, wie GTB, ein UDP-aktiviertes Donorsubstrat. Während die UDP-Mimetika sich scheinbar auch für andere GTs nutzen lassen, die UDP-aktivierte Zucker übertragen, konnte bei Anwesenheit von 3 keine messbare Inhibition von GTA festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Spezifität in 3 im Vergleich zu 1 und 2 so weit erhöht ist, dass mit dieser Verbindung GTs, die keine D-Galactose übertragen, erfolgreich diskriminiert werden. Somit ist die Darstellung eines Inhibitors, der spezifisch eine Klasse an GTs, die Galactosyltransferasen, inhibiert, gelungen.

Um nun spezifisch nicht nur Galactosyltransferasen, sondern gezielt nur GTB zu hemmen, wurden erste *in silico* Untersuchungen und Synthesen durchgeführt, um die Spezifität durch die Einbindung des Akzeptorsubstrats weiter zu erhöhen. Durch die Verwendung einer Etherbindung zwischen der *O6*-Position der D-Galactoseeinheit des donorsubstratanalogen Inhibitors und der *O3*-Position des D-Galactoserestes des Akzeptorsubstrats sollte die Bindungstasche für beide Substrate von GTB besetzt werden. Für dieses Vorhaben wurde eine Synthesestrategie erstellt und die Monosaccharidderivate für die Darstellung des Kohlenhydratteils des bisubstratanalogen Inhibitors erfolgreich dargestellt.

5 Summary

Finding suitable inhibitors for one specific glycosyltransferase (GT) is still challenging since the three-dimensional structures of only a few GTs have been solved. Additionally, the search for enzyme specific inhibitors is complicated because a GT class transfers the same carbohydrate residue to an acceptor substrate and they always use the identical donor substrate. Depending on the enzyme, often a bivalent cation is used for catalysis.

Here, a new concept for the development of specific inhibitors for glycosyltransferases is presented using the human blood group B galactosyltransferase (GTB) as a model system.

Two uric acid derivatives (1 and 2), both exhibiting a pentityl moiety at N-9, were designed as mimics of the UDP part of the donor substrate UDP-Gal using molecular modeling. These compounds were synthesized and subsequently analyzed with a strong focus on the inhibitory potential against GTB. The binding affinity of the UDP mimics was determined by surface plasmon resonance (SPR) and saturation transfer difference (STD) NMR experiments resulting in K_D values in the hundred micromolar and low millimolar range.

The inhibitory activity of **1** and **2** was characterized by competitive STD NMR experiments using UDP as natural substrate analog and by a radiochemical enzyme inhibition assay competing against UDP-Gal. In these experiments it was observed that both **1** and **2** are able to inhibit GTB, while **1** was slightly more potent than **2**. It could be shown that 9-*N*-pentityl uric acid derivatives could serve as UDP mimics and are able to replace the ionic pyrophosphate fragment of the donor substrate. In the presence of Mg²⁺ a binding affinity equivalent to UDP was observed.

Extension of the UDP mimics to a UDP-Gal mimic using in silico experiments resulted in the synthesis and analysis of a D-galactopyranosyl uric acid conjugate derived from $\mathbf{2}$. This compound exhibits an α -D-galactopyranosyl residue attached to the pentityl fragment. Using SPR, STD NMR experiments and a radiochemical enzyme assay the dissociation constant K_D and the inhibitory constant K_I of $\mathbf{3}$ could be determined and improved by a factor of almost 5 (STD NMR) compared to $\mathbf{2}$.

To determine the inhibitory potential of these inhibitors against different GTs that use UDP activated sugars as donor substrates, a novel inhibition assay was developed. This enzyme inhibition assay uses progress curve analysis derived from tracking the enzymatic reaction by

SUMMARY

NMR. It could be shown that both UDP mimics $\mathbf{1}$ and $\mathbf{2}$ were able to inhibit GTA. However, no decrease of the enzymatic activity of GTA was observed in the presence of $\mathbf{3}$. This indicates that the specificity of $\mathbf{3}$ compared to $\mathbf{1}$ and $\mathbf{2}$ is increased by the α -D-galactopyranoside fragment present in the UDP-Gal mimic $\mathbf{3}$ since GTA uses UDP-GalNAc as donor substrate. Thus, an inhibitor for a class of enzymes, in this case addressing galactosyltransferases, was successfully developed.

The search for an inhibitor that only inhibits GTB was extended to also involve the acceptor substrate to further increase the specificity of the inhibitor. In computational studies it could be shown that the attachment of a β -D-galactopyranosyl moiety to the O6 position of the galactoside residue of 3 could enhance the specificity of the inhibitory molecule. Consequently, a synthetic strategy was developed and the monosaccharides derivatives that are needed for the synthesis of the carbohydrate fragment of a bisubstrate analogous inhibitor were successfully synthesized.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Software

Gerät	Gerätetyp	Hersteller	
ESI-MS Spektrometer	MAT95XL	ThermoQuest Finnigan	
	6224 TOF LC/MS	Agilent	
Gefriertrockenanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Christ	
HPLC	L-7100	MerckHitachi	
	1200 Serie/6120 Quadrupol	Agilent	
	LC/MS		
Mikrowellenreaktor	Discover	CEM	
NMR 400 MHz	AMX 400	Bruker	
NMR 500 MHz	DRX 500	Bruker	
NMR 700 MHz	Avance 700	Bruker	
NMR Probenröhrchen	3 mm <i>match</i>	Hilgenberg	
	Typ507-HP7	Norell	
pH-Meter	pH 526	WTW	
Photometer	NanoDrop UV	Peqlab	
Polarimeter	P8000	A. Kruss Optronic	
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 M Ω	SGwater	
Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph	
Schmelzpunktbestimmung	Apotec	Otto Stein	
SPR	T100	Biacore	
	3000	Biacore	
SPR Sensorchip	CM5	Biacore	
Szintillationszähler	1409	Wallac	
Ultrafiltrationszelle	Amicon Ultra 10 000 MWCO	Millipore	
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin	
Zentrifugen	5804R, 5417R, 5415D	Eppendorf	

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe
Biacore 3000 Control	Biacore
Biaeval 3.0	
Biacore T 100 Control	GE Healthcare
Biacore T 100 Evaluation	
MATLAB R2011b	MathWorks
Origin Pro 7.5, Origin Pro 8.5G	Origin Lab
Topspin 2.1, Topspin 3.1	Bruker
Sybyl X 1.1	Tripos

6.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

Hersteller	Chemikalie
Acros Organics	2-(2-Aminoethoxy)ethanol, Trifluormethansäureanhydrid, Tritylchlorid
Alfa Aesar	2,4,6-Trichlorpyrimidin
Am. Radiolabeled Chemicals	Uridin-5'-diphosphat-galactose [¹⁴ C(U)]
Applichem	D-Melibiose Monohydrat, Silbercarbonat
Biacore	Ethanolamin
BioRad	Anionentauscher AG 1x2, Acetat, Biogel P2
Cambridge Isotope Lab. Inc.	BisTris- d_{19}
Deutero	CDCl ₃ , D ₂ O
Dowex	Dowex 1x8, 50Wx8, 50Wx2
Eurisotop	$DTT-d_{10}$,
Fluka	Acetonitril, Amberlite IR-120, Benzaldehyddimethylacetal,
	Chloroform, DCM, DMF, DMSO, Methanol, NaH in 60%
	Öldispersion, Pd/C(10%), Pyridin, THF
	I

Hersteller	Chemikalie	
Grüssing	Ameisensäure 98%, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat,	
	NaCl, NaOH, Salzsäure 37%, Triethylamin	
Honeywell	Calciumchlorid, Essigsäure, Heptan, Na ₂ SO ₄	
Iris Biotech	DIPEA, Piperidin, RINK-Amid Harz, Fmoc-L-Cys(StBu),	
	Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-L-Thr(tBu), TBTU	
Lancaster	BF ₃ ·Et ₂ O	
Merck	Ammoniak 25%, Benzoylchlorid, Benzylbromid,	
	Benzyltrichloracetimidat, Calciumsulfat, Diethylphthalat,	
	Drierite, Ethylchlorformiat, HBr/Eisessig (33%),	
	Hydroxylammoniumchlorid, Kieselgel 60, Mesylchlorid,	
	MnCl ₂ ,Molekularsieb 4Å, P ₂ O ₅ , PtO ₂ , Schwefelsäure 98%	
Nova Biochem	HOBt	
Riedel de Haen	Natrium, Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃	
Roche Diagnostics	Alkalische Phosphatase	
Roth	MOPS	
SigmaAldrich	BisTris, BSA, Camphersulfonsäure, D-Galactose, LacNAc,	
	MgCl ₂ , Rauchende Salpetersäure, D-Ribose, Tetrabutyl-	
	ammoniumiodid, Tetrabutylammoniumbromid, UDP-Gal,	
	UDP-GalNAc	
Senn Chem	D-Arabinose	
TCI	4-Penten-1-ol	
Westphalen	H_2	
Zinsser Analytik	Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 800	

6.3 Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
50 mM BisTris (Mn ²⁺ -haltig)	50 mM BisTris
	100 mM NaCl
	5 mM MnCl ₂
	pH 6.7
50 mM BisTris (Mg ²⁺ -haltig)	50 mM BisTris
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂
	pH 6.7
50 mM BisTris-d ₁₉	50 mM BisTris-d ₁₉
	10 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	1 mM DTT- <i>d</i> ₁₆
	pH 6.7
50 mM BisTris- d_{19} Assay	50 mM BisTris-d ₁₉
	10 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	1 mM DTT- <i>d</i> ₁₆
	10 U/180 μL alkalische Phosphatase
	1 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA)
	pH 6.7
A/B Assay Puffer	50 mM MOPS
	20 mM MnCl ₂
	1 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA)
<u> </u>	pH 7.0

6.4 Surface Plasmon Resonance (SPR) Experimente

SPR-Experimente wurden mit Hilfe des Biacore T100 (UDP, **1** und **3**) oder Biacore 3000 (**2**) durchgeführt. Für die Experimente wurde GTB in Mn^{2+} - bzw. Mg^{2+} -haltigen BisTris Puffer überführt. Dazu wurden 500 μ L der Enzymlösung (Lagerung in 50 mM MOPS, 1mM DTT, 5 mM MnCl₂, 100 mM NaCl bei 4 – 6 °C) 4 mal mit 2 mL des verwendeten 50 mM BisTris Puffers bei 4 °C und 4000 G in einem Amicon Ultra Zentrifugationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10 000 g/mol zentrifugiert. Die Konzentration der enzymhaltigen Lösung wurde photometrisch bestimmt.

Die Immobilisierung des Enzyms wurde auf CM5 Sensorchips der Firma Biacore durchgeführt. Nach Aktivierung der Chipoberfläche (Verwendung von EDC/NHS) wurde GTB so lange mit einer Flussrate von 5 μ L/min über die Chipoberfläche der Messzelle (Flusszelle 2) geleitet, bis eine Belegung von etwa 4000 RU erreicht war. Anschließend wurde die Oberfläche der Fluss- und Referenzzelle mit Ethanolamin deaktiviert.

Die Liganden wurden im jeweiligen Messpuffer gelöst und in Konzentrationen zwischen 0 und 1 mM bei einer Flussrate von 30 μ L/min und 25 °C über die Chipoberfläche geleitet. UDP wurde in Konzentrationen von 0 bis 512 μ M verwendet. Die Kontaktzeit betrug in allen durchgeführten Experimenten mit Inhibitoren 300 Sekunden, bei Verwendung von UDP 120 Sekunden.

6.5 Saturation Transfer Difference (STD) NMR Experimente

STD NMR-Experimente wurden mit einem 700 MHz Spektrometer, teilweise ausgestattet mit einem Cryoprobenkopf, in 3 mm Probenröhrchen bei 298 K durchgeführt.

Für die Messungen wurde GTB in 50 mM BisTris- d_{19} Puffer überführt. Da das Enzym im Allgemeinen in Mn²⁺-haltigen MOPS-Puffer gelagert wurde, sollte dieses bivalente Kation durch gründliche Dialyse mit Mg²⁺-Ionen ersetzt werden. Dazu wurde das Enzym unter Verwendung von Amicon Ultra Zentrifugationsröhrchen (Ausschlussgröße 10 000 g/mol) 5-mal mit 50 mM BisTris- d_{19} Puffer bei 3000 G und 4 °C zentrifugiert. Der Volumenüberschuss des Messpuffers bei diesem Vorgang betrug mindestens 3:1, wobei das Gesamtvolumen während der Dialyse auf die Hälfte reduziert wurde. Die

Proteinkonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt und GTB auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Die Aufnahme der STD-Spektren erfolgte mit dem Pulsprogramm stddiffesgp2d.th mit 2k scans (mit Cryoeinheit) bzw. 4k scans (ohne Cryoprobenkopf). Die Proteinsättigung erfolgte bei einem Einstrahlpunkt von -1 ppm, wobei der Sättigungspuls eine Stärke von 73 Hz besaß und die Sättigungszeit 2 s betrug. Der 180 °-Puls wurde mit einer Länge von 2 ms verwendet. Alle Messpunkte wurden mit einem Spinlock-Puls $T_{1\rho}$ ($\gamma B_1 = 6.25$ kHz für 10 ms) erhalten, um den Proteinhintergrund besser zu unterdrücken.

Die Bestimmung der K_D Werte wurde mit einem Ligandüberschuss zwischen 10 und 100 gegenüber GTB vermessen. Für die Bestimmung der IC_{50} Werte wurde ein Ligandüberschuss von 41 bis 293 (1 und 2) bzw. 20 bis 280 (3) gegenüber GTB in Anwesenheit von 1mM UDP verwendet. Für jede untersuchte Substanz wurde ein Artefaktspektrum in Abwesenheit von GTB unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Bei allen verwendeten Inhibitoren konnten keine Artefaktsignale detektiert werden.

6.6 Radiochemische Enzymassays

Die Aktivität von GTB in Anwesenheit der Inhibitoren wurde mit einem radiochemischen Enzymassay^[81] überprüft. In diesem Assay wird eine radioaktiv markierte D-Galactose durch GTB vom Donorsubstrat auf ein H-Antigen-Disaccharid übertragen, welches durch ein hydrophobes Aglycon mit Hilfe von *RP* Chromatographie von nicht umgesetzten UDP-(¹⁴C)-Gal trennbar ist.

Rekombinante GTB wurde durch N. Sindhuwinata in *E.coli* exprimiert. [32]

Für die Durchführung des Enzymassays wurde vor Beginn der eigentlichen Messung immer die maximale (dpm_{max}) und die minimale (dpm_{min}) Geschwindigkeit der Enzymreaktion gemessen, um sicherzustellen, dass der Assay im *steady state* der Reaktion durchgeführt wird und der Fehler während des Assays möglichst gering gehalten wird. Für dessen Durchführung wurden dann Enzymkonzentrationen gewählt, die einer Aktivität von 10% des erhaltenen dpm_{max} Werts entsprachen.

Nach der Optimierung wurde für den Enzymassay 0.5 nM GTB, 3.4 μ M radioaktiv markiertes UDP-(14 C)-Gal und 54 μ M α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl als Akzeptorsubstrat mit einer definierten Konzentration an Inhibitor in A/B Assay Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ L für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 170 μ L eiskaltem Wasser unterbrochen und anschließend das Reaktionsgemisch auf eine RP-18 Säule (Sep-Pak® Vac RC C18) aufgetragen. Diese wurde zuvor mit 4 mL bidest. H_2 O gespült. Es wurde 2-mal mit je 2 mL bidest. H_2 O gewaschen. Nun wurde das Produkt 3-mal mit 2 mL MeOH eluiert und das Filtrat in einem Szintillationsgefäß aufgefangen. Zu der Produktfraktion wurde 6 mL Szintillationsflüssigkeit gegeben und gut durchmischt. Die Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler detektiert.

Aufgrund des verschiedenen Löslichkeitsverhaltens der Liganden in wässriger Lösung wurde $\mathbf{1}$ in Konzentrationen von 0 bis 10 mM zur Inhibition hinzugefügt, $\mathbf{2}$ von 0 bis 7.5 mM und $\mathbf{3}$ konnte in Konzentrationen von 0 bis 12.5 mM zur Bestimmung der IC_{50} Werte herangezogen werden.

6.7 NMR basierte Enzymassays

Bestimmung von K_M und V_{max}

Die Experimente für die Verfolgung der Enzymreaktion für die Bestimmung von K_M und V_{max} wurden mit Hilfe eines 700 MHz Spektrometers in 3 mm NMR Probenröhrchen und einem Gesamtvolumen von 180 μ L bei 310 K durchgeführt. Für die Messungen wurde das entsprechende Enzym in BisTris- d_{19} Assay Puffer überführt. Für den Pufferwechsel wurden Amicon Ultra Zentrifugationsröhrchen (Ausschlussgröße 10 000 g/mol) verwendet und das Enzym bei 4 °C und 3000 G in 50 mM BisTris- d_{19} Puffer überführt. Dieser Vorgang wurde 4 bis 5 Mal widerholt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Für die Reaktionsverfolgung wurde zu der Probe 1 mg/mL BSA und 10 U alkalische Phosphatase in BisTris- d_{19} hinzugefügt.

Für den Assay wurde ein ¹H-NMR Spektrum mit *excitation sculpting* (zgesgp) von dem jeweiligen Donorsubstrat aufgenommen, in dem dieses in einer dem Assay entsprechenden Konzentration vorlag. Anhand dieses Spektrums wurde die Anzahl an *scans* im eigentlichen Assay-Experiment festgelegt. Nun wurden das Enzym und das Akzeptorsubstrat ohne Zusatz

des Donorsubstrats in einem wasserunterdrückten ¹H-Spektrum unter identischen Bedingungen aufgenommen. Diese Zeit wurde zudem genutzt, um die Probe auf 310 K zu äquilibrieren, um Bläschen, die sich an der Glasoberfläche bildeten, durch leichtes Klopfen zu entfernen. Dieser Vorgang war nach 20 – 30 Minuten abgeschlossen. Nun wurde das Donorsubstrat in der gewünschten Konzentration hinzugegeben und das Experiment gestartet. Die benötigte Zeit ab Zugabe des Donors bis zum Beginn der eigentlichen Reaktionsverfolgung wurde als Totzeit mit in die Berechnung aufgenommen. Für die Reaktionsverfolgung wurde ein Pseudo-2D Experiment verwendet, in dem eine Schleife an zgesgp Experimenten implementiert war (zgesgp2D_4.ab). Die Länge des Experiments entsprach im Mittel 18 Stunden.

Für die Bestimmung wurden folgende Systeme untersucht:

Tabelle 7: Verwendete GTs, Donorsubstrate, Akzeptorsubstrate und Puffer für die Bestimmung des K_M und V_{max} Werts mittels NMR Spektroskopie. Für die Länge der Experimente und Konzentration an Enzym wurde sich an k_{cat} orientiert.

Enzym	Donorsubstrat	Akzeptorsubstrat	Puffer	$k_{cat} [s^{-1}]$
GTB	UDP-Gal	α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl	BisTris-d ₁₉ Assay	$6.5^{[96]}$
GTA	UDP-GalNAc	α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl	BisTris- d_{19} Assay	$4.9^{[96]}$
$\alpha(1,3)$ GalT	UDP-Gal	LacNAc	BisTris- d_{19} Assay	1.9 ^a

a) k_{cat} für $\alpha(1,3)$ GalT (bos taurus)^[97]

GTB und GTA und α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Peters (Universität Lübeck) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. $\alpha(1,3)$ GalT wurde durch Frank Bantleon (AK Bredehorst, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie) exprimiert.

Für die Experimente wurden folgende Konzentrationen verwendet, mit deren Hilfe K_M und V_{max} mittels Progresskurvenanalyse erhalten wurden:

Tabelle 8: Verwendete Konzentration an GT, Donor- und Akzeptorsubstrat sowie die jeweiligen resultierenden kinetischen Parameter der einzelnen Enzymreaktionen.

Enzym	c(Enzym)	c(Donorsubstrat)	c(Akzeptorsubstrat)	K_M [mM]	V_{max}
	$[\mu M]$	[µM]	[mM]		[M/s]
GTB	0.12	250	2.5	0.260	2.0.10-8
GTA	0.015	150	1.5	0.115	8.3.10-9
$\alpha(1,3)$ GalT	0.08	800	1.8	-	-

Die Reaktion wurde anhand der Änderung der aromatischen Protonen innerhalb des Uracilfragments bewertet und so die Konzentrationsänderung des Substrates bestimmt. Die Konzentration bei t=0 und der Startwert für V_{max} wurde durch lineare Regression über die ersten Datenpunkte ermittelt.

Bestimmung der inhibitorischen Konstante K_I

Die Bestimmung des K_I Werts der jeweiligen inhibitorischen Verbindung wurde unter analogen Bedingungen zu der Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} durchgeführt (s. Tabelle 7). Die Enzymkonzentration wurde je nach beobachteter Geschwindigkeit der eigentlichen Enzymreaktion jedoch angepasst. Die eingesetzte Inhibitorkonzentration entsprach dem K_I Wert, der durch den radiochemischen Inhibitionsassay ermittelt wurde. Da sich die Anzahl der *scans* während der Bestimmung von K_M bewährt hatte, wurde die Dauer der einzelnen Experimente beibehalten (120 *scans*, 420 s).

Tabelle 9: Verwendete Konzentrationen an GT, Donor-, Akzeptorsubstrat und Inhibitor sowie die resultierenden inhibitorischen Konstanten.

Enzym	c(Enzym)	c(Donorsubstrat)	c(Akzeptorsubstrat)	c(Inhibitor)	$K_I[\mathrm{mM}]$
	$[\mu M]$	[µM]	[mM]	[mM]	
GTB	0.48	250	2.5	1.5 (3)	0.565
GTA	0.06	150	1.5	1.5 (1)	0.712
GTA	0.06	150	1.5	2.2 (2)	1.1
GTA	0.06	150	1.5	1.6 (3)	-

6.8 Synthesen

Die Reaktionen wurden, sofern nicht anders vermerkt, unter einer Stickstoffatmosphäre als Schutzgas durchgeführt. Bei Verwendung von trockenen Lösungsmitteln wurden Produkte der Firma Fluka und SigmaAldrich verwendet. Für die Trocknung von Chloroform wurde mit CaCl₂ vorgetrocknet und anschließend für 2 Stunden über P₂O₅ refluxiert und abschließend destilliert. Ethanol wurde mit Hilfe von Natrium und Diethylphthalat getrocknet und über Molsieb 4Å gelagert. Hexan wurde über Natrium getrocknet und anschließend destilliert. Die dünnschichtchromatographische Detektion wurde durch UV Licht oder durch Verbrennung nach Verwendung eines Schwefelsäure-Tauchbads (5% H₂SO₄) durchgeführt. Die Charakterisierung wurde mit den unter 6.1 aufgeführten Geräten durchgeführt. Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Für literaturbekannte Verbindungen ist nur die Charakterisierung angegeben.

6.8.1 6-Chlorpyrimidin-2,4(*1H*,*3H*)-dion (**5**)

5 wurde nach Cresswell *et al.* dargestellt. ^[55]

 $C_4H_3ClN_2O_2$

5

M = 146.53 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ/ppm = 12.04 (s, 1H, N**H**-1), 11.27 (s, 1H, N**H**-3), 5.74 (s, 1H, **H**-5).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ/ppm = 162.7 (C-4), 150.3 (C-2), 144.7 (C-6), 99.6 (C-5).

EI-MS: $m/z = 146 \text{ (M}^+\text{)}, 103 \text{ (M-NHCO}^+\text{)}, 68 \text{ (M}^+\text{-NHCO-Cl)}.$

Smp: 300 °C (Zersetzung)

6.8.2 D-Ribitylamin (**6**)

6 wurde nach literaturbekannter Prozedur aus D-Ribose über D-Riboseoxim dargestellt. ^[55,61]

$$H_2N$$
 1 2 3 4 5 OH OH

6

$$C_5H_{13}NO_4 \label{eq:model}$$

$$M=151.16 \text{ g/mol}$$

Charakterisierung:

Hochviskoser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 3.79-3.65 (m, 3H, **H**-5, **H**-3, **H**-4), 3.63-3.54 (m, 2H, **H**-2, **H**-5), 2.84 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 3.3 Hz, **H**-1), 2.64 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 8.3 Hz, **H**-1).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ /ppm = 73.2 (C-2), 72.5 (C-4), 72.1 (C-3), 49.8 (C-5), 42.3 (C-1).

HR-ESI-MS: $m/z = 152.0916 [M+H]^+ (gef.), 152.0845 [M+H]^+ (ber.)$

$$[\alpha]_D^{24} =$$
 -5.9 ° (c = 1.0, H₂O)

6.8.3 6-Chlor-5-nitropyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (**8**)

8 wurde nach Al-Hassan *et al.* dargestellt. ^[65]

 $C_4H_2ClN_3O_4$ M = 191.53 g/mol

Charakterisierung:

Hellgelber Feststoff

¹³C-NMR (125 MHz, $H_2O:D_2O = 9:1$): $\delta/ppm = 162.1$ (C-4), 159.1 (C-2), 149.7 (C-6).

EI-MS: $m/z = 191 \text{ (M}^+\text{)}, 173 \text{ (M}^+\text{-H}_2\text{O}), 173 \text{ (M}^+\text{-H}_2\text{O}-\text{O}).$

ESI-MS: $m/z = 189.9661 [M-H]^{-} (gef.), 189.9650 [M-H]^{-} (ber.).$

Smp.: = 168 °C

6.8.4 5-Nitro-6-D-ribitylaminopyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (9)

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Literatur. ^[55,66] Zu einer Lösung aus 1.17 g (7.74 mmol) **6** in 37 mL H₂O wurden 720 mg (3.76 mmol) **8** in 37 mL EtOH langsam hinzugefügt. Die resultierende Lösung wurde mit 3M ammoniakalischer Lösung auf pH 8-9 eingestellt und für 24 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter verminderten Druck eingeengt und der Rückstand mit 25%iger ammoniakalischer Lösung auf pH 10.7 eingestellt. Eventuell entstandener Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat auf eine Anionentauscher-Säule Dowex 1x8 (9 x 2,5 cm, HCOO) aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 mL H₂O, 100 mL 0.01 M Ameisensäure und 500 mL 0.1 M Ameisensäure eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

$$C_9H_{14}N_4O_8$$

M = 306.23 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser, amorpher Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ /ppm = 4.13-4.07 (m, 1H, **H**-2'), 4.84-4.59 (m, 6H, **H**-1', **H**-5', **H**-4', **H**-3', **H**-1', **H**-5').

¹³C-NMR (100 MHz, H₂O:D₂O = 9:1): δ/ppm = 159.3 (C-4), 154.4 (C-2), 149.2 (C-6), 72.7 (C-3'), 72.4 (C-4'), 69.5 (C-2'), 62.7 (C-5'), 45.2 (C-1').

ESI-MS: $m/z = 307.0886 [M+H]^+ (gef.), 307.0884 [M+H]^+ (ber.)$ $329.0669 [M+Na]^+ (gef.), 329.0704 [M+Na]^+ (ber.)$

$$[\alpha]_D^{25} = +0.02 (c = 0.9, H_2O)$$

Smp: 149 °C

6.8.5 5-Ethylcarbamoyl-6-D-ribitylaminopyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (11)

11 wurde nach Cushman *et al.* dargestellt. ^[58]

 $C_{12}H_{20}N_4O_8 \label{eq:mass_model}$ M=348.31 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser, amorpher Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.10 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 3.87 (ddd, 1H, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, ${}^{3}J$ = 6.8 Hz, ${}^{3}J$ = 10.1 Hz, **H**-2'), 3.77-3.68 (m, 2H, **H**-4', **H**-5'), 3.65-3.56 (m, 2H, **H**-3', **H**-5'), 3.50 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 14.7 Hz, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, **H**-1'), 3.42 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 15.3 Hz, ${}^{3}J$ = 7.2 Hz, **H**-1'), 1.20 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.1 Hz, OCH₂C**H**₃).

¹³C-NMR (100 MHz, H₂O:D₂O = 9:1): δ/ppm = 163.2 (C-4), 158.8 (C-5), 154.6 (C-2), 151.3 (C-6), 72.3 (C-3'), 72.2 (C-4'), 70.5 (C-2'), 62.7 (OCH₂CH₃), 62.4 (C-5'), 44.1 (C-1'), 13.7 (OCH₂CH₃).

ESI-MS: $m/z = 349.1344 [M+H]^+ (gef.), 349.1354 [M+H]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = +3.9 \circ (c = 1.27, DMSO)$$

Smp: 80 °C

6.8.6 9-D-Ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**1**)

1 wurde nach Cushman et al. dargestellt. [58]

 $C_{10}H_{14}N_4O_7$ M = 302.24 g/mol

Charakterisierung:

Hellgelber, amorpher Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.05-3.97 (m, 2H, **H**-2', **H**-1'), 3.87 (dd, 1H, 2J = 15.5 Hz, 3J = 9.6 Hz, **H**-1'), 3.81-3.75 (m, 1H, **H**-4'), 3.73 (dd, 1H, 2J = 11.6 Hz, 3J = 2.5 Hz, **H**-5'), 3.65 (dd, 1H, 3J = 6.3 Hz, **H**-3'), 3.59 (dd, 1H, 2J = 11.6 Hz, 3J = 6.7 Hz, **H**-5').

¹³C-NMR (100 MHz, D_2O): $\delta/ppm = 72.7$ (C-4'), 72.1 (C-3'), 69.5 (C-2'), 62.5 (C-5'), 44.0 (C-1').

ESI-MS: $m/z = 303.0934 [M+H]^+ (gef.), 303.0935 [M+H]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = +3.3 \circ (c = 1.02, DMSO)$$

Smp: 147 °C

6.8.7 D-Arabinitylamin (12)

12 wurde nach literaturbekannter Prozedur aus D-Arabinose über D-Arabinoseoxim dargestellt. [67]

$$H_2N$$
 1 $\frac{2}{3}$ $\frac{4}{5}$ OH

12

$$C_5H_{13}NO_4$$
 $M = 151.16 \text{ g/mol}$

Charakterisierung:

Hochviskoser Sirup

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 3.76-3.69 (m, 2H, **H**-5, **H**-2), 3.67-3.61 (m, 1H, **H**-3), 3.55 (dd, 1H, 2J = 11.7 Hz, 3J = 6.4 Hz, **H**-5), 3.40 (dt, 1H, 3J = 8.6 Hz, 3J = 1.6 Hz, **H**-4), 2.70 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 8.3 Hz, **H**-1), 2.65 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 4.7 Hz, **H**-1).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ /ppm = 71.4 (C-4), 71.0 (C-2), 70.9 (C-3), 62.9 (C-5), 43.4 (C-1).

ESI-MS: $m/z = 152.0913 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 152.0917 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)}, 174.0740 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 174.0737 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{25} = +4.7 \circ (c = 1.04, H_2O)$$

6.8.8 6-D-Arabinitylamino-5-nitropyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (13)

511 mg (2.67 mmol) **8** in 26 mL EtOH wurden langsam zu einer Lösung aus 786 mg (5.20 mmol) **12** und 26 mL H₂O hinzugefügt. Der pH wurde mit 1 M NaOH auf pH 8 eingestellt und das Reaktionsgemisch für 24 h bei rt gerührt. Anschließend wurde das Volumen unter verminderten Druck auf etwa die Hälfte eingeengt und der pH mit konz. Ammoniakalischer Lösung auf pH 10.7 eingestellt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat auf eine Anionenaustauscher-Säule Dowex 1x8 (3x2.5 cm, HCOO) aufgetragen. Es wurde mit 80 mL H₂O, 80 mL 0.01 M Ameisensäure und 200 mL 0.1 M Ameisensäure eluiert und produkthaltige Fraktionen eingeengt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 546 mg (1.81 mmol, 67% bezogen auf **8**) eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten.

 $C_9H_{14}N_4O_8$ M = 306.23 g/mol

Charakterisierung:

Hellgelber Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.20 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 5.7 Hz, **H**-2'), 3.80 (dd, 2H, ${}^{2}J$ = 11.7 Hz, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, **H**-5'), 3.74-3.68 (m, 3H, **H**-4', **H**-1'), 3.55 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 8.8 Hz, ${}^{3}J$ = 1.1 Hz, **H**-3').

¹³C-NMR (125 MHz, H₂O:D₂O = 9:1): δ = 71.3 (C-3'), 70.8 (C-4'), 67.6 (C-2'), 62.9 (C-5'), 46.4 (C-1').

HR-ESI-MS: $m/z = 305.0747 \text{ [M-H]}^- \text{ (gef.)}, 305.0739 \text{ [M-H]}^- \text{ (ber.)},$ $307.0879 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 307.0871 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{23} = +14.0 (c = 1.1, DMSO)$$

Smp.: 223 °C

6.8.9 6-D-Arabinitylamino-5-ethylcarbamoylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (15)

13.5 mg Pd/C (10%) und 2.3 mL H₂O wurden für 5 min bei rt unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Nun wurden 45 mg (0.15 mmol) **13** hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 12 h bei rt unter der H₂-Atmosphäre gerührt. Das Gemisch wurde nun auf 0 °C gekühlt und 230 μL NEt₃, 1.13 mL Acetonitril und 135 μL (1.41 mmol) Ethylchlorformiat hinzugegeben. Anschließend wurde für 12 h bei rt gerührt und der Katalysator abfiltriert und mit H₂O gewaschen. Das Filtrat wurde unter verminderten Druck eingeengt und auf eine Kationenaustauscher-Säule Dowex 50Wx2 (3 g, H⁺) aufgetragen. Es wurde mit 25 mL H₂O eluiert und die Fraktion auf eine Anionenaustauscher-Säule AG 1x2 (3 g, HCOO⁻) aufgetragen und mit 30 mL H₂O sowie 75 mL 10 %iger Ameisensäure gewaschen. Produkthaltige Fraktionen wurden eingeengt, in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 37 mg (0.11 mmol, 72 % bezogen auf **13**) eines hellgelben amorphen Feststoffes erhalten.

 $C_{12}H_{20}N_4O_8 \label{eq:model}$ M=348.31 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.09 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 7.2 Hz, C**H**₂), 3.96 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 6.4 Hz, **H**-2'), 3.76 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 11.9 Hz, ${}^{3}J$ = 2.9 Hz, **H**-5'), 3.69-3.64 (m, 1H, **H**-4'), 3.58 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 11.9 Hz, ${}^{3}J$ = 6.1 Hz, **H**-5'), 3.47 – 3.37 (m, 3H, 2 x **H**-1', **H**-3'), 1.19 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.2 Hz, C**H**₃).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ /ppm = 163.2 (C-4), 154.8, 154.5 (C-2, C-5), 151.3 (C-6), 70.8 (C-3'), 70.7 (C-4'), 68.7 (C-2'), 62.9 (C-5'), 62.7 (CH₂), 44.8 (C-1'), 13.7 (CH₃).

HR-ESI-MS: $m/z = 349.1354 [M+H]^+ (gef.), 349.1354 [M+H]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = 57.4 \circ (c = 1.0, H_2O)$$

Smp.: 126 °C

6.8.10 9-D-Arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (2)

26 mg (0.07 mmol) 15 wurden in 6.5 mL 0.03 M NaOEt in EtOH suspendiert und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter verminderten Druck eingeengt und auf eine Anionenaustauscher-Säule AG 1x2 (3 g, HCOO⁻) aufgetragen. Die Säule wurde mit 25 mL H₂O gewaschen und mit 85 mL 10% iger Ameisensäure eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt und unter verminderten Druck eingeengt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 18 mg (0.06 mmol, 80 % bezogen auf **15**) eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten.

 $C_{10}H_{14}N_{4}O_{7} \label{eq:model}$ M = 302.24 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.16 (ddd, 1H 3J = 8.8 Hz, 3J = 1.4 Hz, 3J = 4.4 Hz, **H**-2'), 3.95 (dd, 1H, 2J = 14.8 Hz, 3J = 8.8 Hz, **H**-1'), 3.87 (dd, 1H, 2J = 14.8 Hz, 3J = 4.4 Hz, **H**-1'), 3.79 (dd, 1H, 2J = 11.8 Hz, 3J = 2.8 Hz, **H**-5'), 3.73-3.68 (m, 1H, **H**-4'), 3.64-3.58 (m, 1H, **H**-5'), 3.51 (dd, 1H, 3J = 8.8 Hz, 3J = 1.5 Hz, **H**-3').

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm = 153.3 (C-6), 151.7 (C-8), 150.3 (C-2), 138.2 (C-4), 95.8 (C-5), 71.0 (C-3'), 70.8 (C-4'), 67.5 (C-2'), 63.5 (C-5'), 44.3 (C-1').

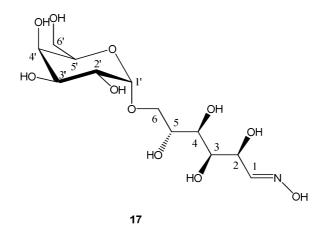
HR-ESI-MS: $m/z = 303.0934 [M+H]^+ (gef.), 303.0935 [M+H]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = +17.5 \circ (c = 1.1, DMSO)$$

Smp.: 145 °C

6.8.11 D-Melibioseoxim (**17**)

17 wurde nach Deferrari *et al.* dargestellt. ^[76]



 $C_{12}H_{23}NO_{11}$ M = 357.31 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser, viskoser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 7.44 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 6.6 Hz, **H**-1, E-Isomer), 6.79 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 6.6 Hz, **H**-1, Z-Isomer), 4.89 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.5 Hz, **H**-1'), 4.31 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 6.6 Hz, **H**-2), 3.91-3.72 (m, 7H, **H**-3, **H**-4', **H**-5', **H**-5, **H**-4, **H**-3', **H**-2'), 3.55 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 6.2 Hz, **H**-6), 3.61-3.57 (m, 2H, **H**-6').

Das Isomeren Verhältnis wurde zu E:Z = 5:1 bestimmt.

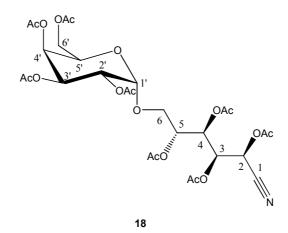
¹³C-NMR (100 MHz, D_2O): $\delta/ppm = 151.5$ (C-1), 98.3 (C-1'), 70.9 (C-5'), 70.4 (C-5), 70.3 (C-4'), 70.1 (C-3), 69.9 (C-6'), 69.6 (C-2), 69.3 (C-4), 68.6 (C-3'), 68.3 (C-2'), 61.2 (C-6).

HR-ESI-MS: $m/z = 380.1156 [M+Na]^+ (gef.), 380.1163 [M+Na]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{25} = +95.9 \circ (c = 0.5, H_2O)$$

6.8.12 Octa-*O*-acetylmelibionitril (**18**)

18 wurde nach Deferrari *et al.* dargestellt. ^[76]



 $C_{28}H_{37}NO_{18}$ M = 675.30 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 5.62 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 5.9 Hz, **H**-2), 5.58 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 7.7 Hz, ${}^{3}J$ = 3.6 Hz, **H**-4'), 5.47 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, **H**-4), 5.43-5.40 (m, 1H, **H**-3), 5.35 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 3.3 Hz, ${}^{3}J$ = 10.8 Hz, **H**-2'), 5.17-5.04 (m, 3H, **H**-1', **H**-3', **H**-5'), 4.16 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-5), 4.09 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-6), 3.69 (ddd, 2H, ${}^{2}J$ = 11.5 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, ${}^{3}J$ = 4.9 Hz, **H**-6'), 2.22/2.19/2.16/2.14/2.11/2.06/2.05/1.99 (s, 8 x 3H, C(O)C**H**₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 170.6/170.1/169.8/169.5/169.4/169.1/168.4 (**C(O)CH**₃), 114.0 (**C**-1), 96.2 (**C**-1'), 68.3 (**C**-5'), 68.0 (**C**-3'), 67.8 (**C**-4), 67.7 (**C**-4'), 67.5 (**C**-3), 67.2 (**C**-2'), 66.8 (**C**-5), 65.3 (**C**-6'), 61.6 (**C**-6), 58-9 (**C**-2), 20.7/20.6/20.4/20.1 (**C(O)CH**₃).

HR-ESI-MS: $m/z = 698.1902 [M+Na]^+ (gef.), 698.1903 [M+Na]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = +100.6^{\circ} (c = 0.8, CHCl_3)$$

Smp: 55 °C

 $R_f = 0.5$ (PE: EtOAc = 1:2)

6.7.13 5-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-arabinose (**19**)

2.03 g (3.01 mmol) **18** wurden in 5 mL trockenem CHCl₃ gelöst und bei -10 °C mit 15 mL NaOMe in MeOH (400 mg Na in 15 mL trockenem MeOH) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 10 mL Eiswasser und 2 mL Essigsäure versetzt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, dreimal mit je 10 mL CHCl₃ gewaschen und anschließend unter verminderten Druck eingeengt. Der Rückstand wurde dreimal mit 10 mL EtOH coevaporiert, in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in wenig H₂O gelöst und mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie gereinigt (Biogel P2).

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 686 mg (2.20 mmol, 73% bezogen auf **18**) eines farblosen Sirups erhalten.

 $C_{11}H_{20}NO_{10} \\$ M = 312.27 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

Das Anomerenverhältnis wurde zu $\alpha:\beta=0.7:1$ bestimmt. Die Angabe der NMR Daten beziehen sich nur auf das β -Anomer.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ /ppm = 5.35 (d, 1H, ³J = 3.8 Hz, **H**-1α), 5.31 (d, 1H, ³J = 2.2 Hz, **H**-1β), 5.02 (d, 1H, ³J = 6.5 Hz, **H**-1'), 4.33-4.28 (m, 1H, **H**-4), 4.11-4.05 (m, 1H, **H**-2), 4.05-3.81 (m, 6H, **H**-3, **H** 4', **H**-5', **H**-3', **H**-2') 3.80-3.69 (m, 3H, **H**-6', **H**-5).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ /ppm = 101.6 (C-1β), 98.3 (C-1'), 95.3 (C-1α), 71.2 (C-5'), 71.1 (C-3'), 69.6 (C-3), 69.5 (C-2'), 69.4 (C-2), 68.5 (C-4), 67.2 (C-6'), 61.3 (C-5).

HR-ESI-MS: $m/z = 335.0953 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 335.0954 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{23} = +178.1 \circ (c = 1.0, H_2O)$$

6.7.14 5-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-arabinoseoxim (**20**)

Eine Suspension aus 446 mg (6.42 mmol) Hydroxylammoniumchlorid und 4 mL trockenem Ethanol wurde bei -12 °C mit einer Natriumethanolat-Lösung (92 mg (4 mmol) Na in 2.8 mL EtOH) versetzt und anschließend für 20 min bei 0 °C gerührt. Ausgefallenes NaCl wurde abfiltriert und mit wenig Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde bei 60 °C zu 481 mg (1.54 mmol) **19** in 7.2 mL EtOH:H₂O (1.3:1) langsam hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 1 h bei 65 – 70 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 487 mg (1.49 mmol, 97 % bezogen auf **19**) eines farblosen, viskosen Sirups erhalten.

20

$$C_{11}H_{21}NO_{10}$$

M = 327.29 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser, viskoser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 7.49 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 5.8 Hz, **H**-1, E-isomer), 6.87 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 5.8 Hz, **H**-1, Z-isomer), 4.88 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.7 Hz, **H**-1'), 4.45 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 5.9 Hz, **H**-2), 3.90-3.70 (m, 6H, **H**-4', **H**-5', **H**-4, **H**-3, **H**-2'), 3.68-3.56 (m, 4H, **H**-5, **H**-6').

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ /ppm = 152.9 (C-1), 98.7 (C-1'), 72.1 (C-5'), 71.3 (C-4), 69.9 (C-3), 69.6 (C-4'), 69.4 (C-2), 69.0 (C-2'), 68.9 (C-6'), 61.5 (C-5).

HR-ESI-MS: $m/z = 350.1055 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 350.1063 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{23} = +211.8 \circ (c = 1.0, H_2O)$$

6.8.15 5-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-arabinitylamin (**21**)

484 mg (1.48 mmol) **20** wurden in 20 mL H₂O gelöst und 25 mg PtO₂ hinzugefügt. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 3 eingestellt und das Reaktionsgemisch für 2 d unter H₂-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde entfernt, mit H₂O gewaschen und das Filtrat auf pH 8 eingestellt und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute:</u> Es wurden 460 mg (1.47 mmol, 99% bezogen auf **20**) eines farblosen Sirups erhalten.

21

$$C_{11}H_{23}NO_9$$

M = 313.31 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.73 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.1 Hz, **H**-1'), 4.12 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-2), 3.95-3.75 (m, 5H, **H**-4', **H**-5', **H**-4, **H**-3', **H**-2'), 3.69 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 5.9 Hz, **H**-6'), 3.65-3.59 (m, 2H, **H**-5), 3.58-3.53 (m, 1H, **H**-3), 3.11 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 6.6 Hz, **H**-1).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ /ppm = 98.5 (C-1'), 71.04 (C-3), 71.02 (C-5'), 69.6 (C-3'), 69.3 (C-4), 68.7 (C-5), 68.5 (C-2'), 66.5 (C-2), 61.2 (C-6'), 42.6 (C-1).

HR-ESI-MS: $m/z = 314.1450 [M+H]^+ (gef.), 314.1451 [M+H]^+ (ber.).$

$$[\alpha]_D^{23} = +121.0 \circ (c = 1.0, H_2O)$$

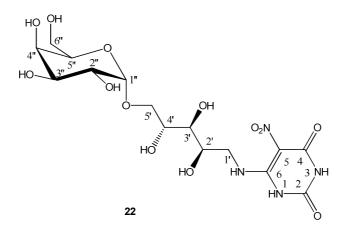
6.8.16 5-Nitro-6-(5-O-α-D-galactopyranosyl)-5-D-arabinitylaminouracil (22)

200 mg (0.63 mmol) **21** in 3.5 mL H₂O wurden langsam mit 63 mg (0.33 mmol) **8** in 3.5 mL Ethanol versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 8 eingestellt und das Reaktionsgemisch für 24 h bei rt gerührt. Die Mischung wurde eingeengt und mit Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M bezogen auf Formiat, pH 10.7) auf pH 10.7 eingestellt. Die Lösung wurde auf eine Anionentauschersäule Dowex 1x8 (3.5 x 2.5 cm, Formiat) aufgetragen und mit 80 mL H₂O, 100 mL 0.01 M Ameisensäure, 200 mL Ameisensäure und

100 mL 10% iger Ameisensäure eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt.

Alternative Reinigung: Die produkthaltige Lösung wurde auf eine Anionentauschersäule Dowex 1x8 (3.5 x 2.5 cm, Formiat) aufgetragen, die vorher mit Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M Ameisensäure, pH 10.7) gewaschen wurde. Nun wurde mit 100 mL Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M Ameisensäure, pH 10.7) und anschließend mit 100 mL Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M Ameisensäure, pH 7.4) gespült. Das Produkt wurde mit 200 mL Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M Ameisensäure, pH 4) eluiert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit heißem Ethanol gewaschen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute:</u> Es wurden 66 mg (0.14 mmol, 43% bezogen auf **8**) eines leicht gelben, amorphen Feststoffes erhalten.



 $C_{15}H_{24}N_4O_{13}$ M = 468.37 g/mol

Charakterisierung:

Gelblicher Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.90 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.7 Hz, **H**-1''), 4.07 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 7.1-Hz, **H**-2'), 3.94 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 10.2 Hz, ${}^{3}J$ = 3.8 Hz, **H**-5'), 3.88-3.72 (m, 4H, **H**-4', **H** 4'', **H**-1', **H**-2''), 3.69-3.64 (m, 4H, 2 x **H**-6'', **H**-5'', **H**-3''), 3.60 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 9.3 Hz, ${}^{3}J$ = 0.9 Hz, **H**-3'), 3.55 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 10.2 Hz, ${}^{3}J$ = 2.2 Hz, **H**-5'), 3.54-3.49 (m, 1H, **H**-1').

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 98.1 (C-1''), 71.0 (C-4''), 69.7 (C-3''), 69.33 (C-5''), 69.31 (C-3'), 68.8 (C-4'), 68.6 (C-2''), 68.3 (C-5'), 68.2 (C-2'), 61.3 (C-6''), 43.3 (C-1').

HR-ESI-MS:
$$m/z = 469.1414 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 469.1413 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)},$$

 $491.1232 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 491.1232 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{23} = +12.8 \circ (c = 1.0, H_2O)$$

Smp.: 145 °C (Zersetzung)

6.8.17 5-Ethylcarbamoyl-6-(5-O-α-D-galactopyranosyl)-5-D-arabinitylaminouracil (**24**)

11.6 mg Pd/C (10%) wurden in 5.6 mL H₂O suspendiert und für 5 min unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde unter einem N₂-Strom 58 mg (0.12 mmol) **22** in 1 mL H₂O hinzugefügt und bei rt für 12 h unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und 191 μL NEt₃, 957 μL MeCN und 114.8 μL (1.2 mmol) Ethylchlorformiat zugefügt. Anschließend wurde bei rt für 12 h gerührt, der Katalysator abfiltriert, mit H₂O gewaschen und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wurde in 2 mL H₂O gelöst und auf einen Kationenaustauscher Dowex 50Wx2 (3 g, H⁺) aufgetragen und mit 25 mL H₂O eluiert. Die Fraktionen wurden nun auf einen Anionenaustauscher AG 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen und mit 30 mL H₂O und 75 mL 10%iger Ameisensäure eluiert. Die wässrige Fraktion wurde gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 42 mg (8.23 mmol, 67% bezogen auf **22**) eines farblosen Feststoffes erhalten.

 $C_{18}H_{36}N_4O_{13}$ M = 510.45 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (700 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.90 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.3 Hz, **H**-1''), 4.11 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 7.1 Hz, C**H**₂), 3.99-3.95 (m, 1H, **H**-2'), 3.92-3.87 (m, 3H, **H**-5', **H**-4'', **H**-5''), 3.87-3.83 (m, 2H, **H**-4', **H**-3''), 3.79-371 (m, 1H, H-2''), 3.67 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 6.2 Hz, **H**-6''), 3.58 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 9.7 Hz, **H**-5'), 3.54 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 9.1 Hz, **H**-3'), 3.50-3.38 (m, 2H, **H**-1'), 1.22 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.1 Hz, C**H**₃).

¹³C-NMR (350 MHz) δ/ppm = 163.3 (C-4), 158.8 (C-5), 98.2 (C-1''), 71.0 (C-5''), 69.7 (C-3'), 69.6 (C-3''), 69.3 (C-4''), 69.0 (C-4'), 68.7 (C-2'), 68.5 (C-2''), 68.4 (C-5'), 62.6 (CH₂), 61.2 (C-6''), 44.1 (C-1'), 13.8 (CH₃).

HR-ESI-MS:
$$m/z = 511.11879 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 511.1882 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)},$$

 $533.1698 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 533.1702 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$
 $[\alpha]_D^{23} = +39.5 \, ^\circ \text{ (c} = 0.8, \text{H}_2\text{O})$

6.8.18 9-(5-O-α-D-Galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**3**)

30 mg (0.06 mmol) **24** wurden in 6 mL 0.03 M NaOEt in Ethanol suspendiert und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend entfernt und der Rückstand in 2 mL H₂O gelöst und auf eine Anionenaustauschersäule AG 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen. Die Säule wurde mit 25 mL H₂O gewaschen und mit 75 mL 10% iger Ameisensäure eluiert. Die sauren Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Nicht umgesetztes Edukt wurde durch Größenausschlusschromatographie (Biogel, P2) abgetrennt.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 16.5 mg (0.35 mmol, 60% bezogen auf **24**) eines gelblichen Feststoffes erhalten.

 $C_{16}H_{24}N_4O_{12}$ M = 464.38 g/mol

Charakterisierung:

Gelblicher Feststoff

¹H-NMR (700 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.87 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.76 Hz, **H**-1''), 4.13 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 7.45 Hz, **H**-2'), 3.95 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 10.2 Hz, ${}^{3}J$ = 3.2 Hz, **H**-5'), 3.90 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 14.4 Hz, ${}^{3}J$ = 6.7 Hz, **H**-1'), 3.70 (d, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, **H**-3'), 3.84 (td, 1H, ${}^{3}J$ = 9.2 Hz, ${}^{3}J$ = 2.8 Hz, **H**-4'), 3.80 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 14.4 Hz, ${}^{3}J$ = 8.3 Hz, **H**-1'), 3.74-3.71 (m 2H, **H**-2'', **H**-5''), 3.68-3.65 (m, 2H, 2 x **H**-6'), 3.53-3.47 (m, 3H, **H**-3'', **H**-5', **H**-4'').

¹³C-NMR (350 MHz, D₂O): δ/ppm = 155.2 (**C**-6), 154.2 (**C**-8), 151.4 (**C**-2), 150.0 (**C**-4), 98.0 (**C**-1''), 71.1 (**C**-5''), 69.7 (**C**-3''), 69.3 (**C**-3'), 68.7 (**C**-2''), 68.6 (**C**-4''), 68.4 (**C**-4'), 68.1 (**C**-5'), 66.7 (**C**-2'). 61.3 (**C**-6''), 41.5 (**C**-1').

HR-ESI-MS: $m/z = 465.1471 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 465.1463 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)},$ $487.1303 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 487.1283 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{24} = +57.8 \circ (c = 0.5, DMSO)$$

6.8.19 6-(2-Ethoxyethyl)amino-5-nitropyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (**30**)

350 mg (1.83 mmol) **8** in 17.5 mL EtOH wurden zu einer Lösung aus 366 μL (3.66 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)ethanol und 17.5 mL H₂O langsam hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 24 h bei rt gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf die Hälfte des Volumens reduziert, der Feststoff abfiltriert und das Filtrat auf pH 10.7 mit wässriger ammoniakalischer Lösung eingestellt. Die Lösung wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule (Dowex 1x8, 3x2.5 cm, HCOO⁻) aufgetragen und mit 100 mL H₂O, 100 mL 0.01 M Ameisensäure und 200 mL 0.1 M Ameisensäure eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden vereinigt und eingeengt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 171 mg (65.3 mmol, 36% bezogen auf **8**) eines leicht gelblichen Feststoffes erhalten.

 $C_8H_{12}N_4O_6 \label{eq:mass_mass_mass}$ M=260.20 g/mol

Charakterisierung:

Gelblicher Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ /ppm = 3.74 (t, 2H, ³J = 4.7 Hz, **H**-4'), 3.70-3.63 (m, 4H, **H**-3', **H**-2'), 3.62-3.58 (m, 2H, **H**-1').

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ /ppm = 159.5 (C-4), 154.9 (C-4), 150.0(C-6), 71.9 (C-3'), 68.4 (C-2'), 60.3 (C-4'), 42.6 (C-1').

HR-ESI-MS: $m/z = 261.0828 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 261.0830 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)},$ $283.0638 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 283.0649 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)},$ $259.0680 \text{ [M-H]}^- \text{ (gef.)}, 259.0684 \text{ [M-H]}^- \text{ (ber.)}.$ Smp: 199 °C

6.8.20 6-(2-Ethoxyethyl)amino-5-ethylcarbamoylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (31)

48 mg Pd/C (10%) wurden unter H_2 -Atmosphäre in 8 mL H_2 O bei rt gerührt. Anschließend wurden 136 mg (0.52 mmol) **30** hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 12 h bei rt unter H_2 gerührt. Nun wurden 0.8 mL NEt_3 , 4 mL MeCN und 481 μL (5.05 mmol) Ethylchlorformiat bei 0 °C hinzugefügt und das Gemisch für 12 h bei rt gerührt. Der Katalysator wurde entfernt, mit wenig H_2O gewaschen und das Filtrat unter verminderten Druck eingeengt. Der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und auf eine Kationenaustauscher-Säule Dowex 50Wx2 (7 g, H^+) aufgetragen. Es wurde mit 50 mL H_2O eluiert und die Fraktion auf eine Anionenaustauscher-Säule AG 1x2 (7g, $HCOO^-$) aufgetragen und mit 50 mL H_2O sowie 120 mL 10 %iger Ameisensäure gewaschen. Produkthaltige Fraktionen wurden eingeengt, in H_2O aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit DCM:MeOH = 6:1 aufgenommen und der Feststoff abgetrennt. Dieser wurde anschließend in H_2O gelöst und gefriergetrocknet.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 107 mg (0.35 mmol, 68% bezogen auf **30**) eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten.

$$C_{11}H_{18}N_4O_6$$

M = 302.28 g/mol

31

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 4.09 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 3.65 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 4.3 Hz, H-4'), 3.62 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 5.1 Hz H-2'), 3.58 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 4.4 Hz, H-3'), 3.45 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 5.1 Hz, H-1'), 1.20 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ/ppm = 171.0 (C-2), 163.3 (C-4), 158.7 (C-5), 151.7 (C-6), 71.9 (C-3'), 69.6 (C-2'), 62.7 (CH₂CH₃), 60.4 (C-4'), 41.7 (C-1'), 13.7 (CH₂CH₃).

HR-ESI-MS: $m/z = 303.1297 [M+H]^+ (gef.), 303.1299 [M+H]^+ (ber.),$ $325.1118 [M+Na]^+ (gef.), 325.1119 [M+Na]^+ (gef.).$

Smp: 124 °C

6.8.21 9-(2-Ethoxyethyl)-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**26**)

21.5 mg (0.07 mmol) **28** wurden in 6.5 mL frisch präparierter 0.03 M NaOEt-Lösung in EtOH für 24 unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 2 mL H₂O aufgenommen und auf eine Anionenaustauschersäule (AG 1x2, 3 g, HCOO) aufgetragen. Die Säule wurde mit 25 mL H₂O gespült und mit 85 mL 10% iger Ameisensäure eluiert. Produkthaltige Fraktionen wurden eingeengt, in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: Es wurden 9 mg (0.04 mmol, 55%) eines leicht gelben Sirups erhalten.

 $C_9 H_{12} N_4 O_5 \\$ $M = 256.22 \ g/mol$

Charakterisierung:

Leicht gelblicher Sirup

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ/ppm = 3.88 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 5.4 Hz, **H**-1'), 3.74 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 5.3 Hz, **H**-3'), 3.71 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 5.0 Hz, **H**-2'), 3.67-3.63 (m, 1H, **H**-3'), 3.59-3.52 (m, 3H, **H**-3', **H**-4').

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ /ppm = 71.8 (C-3'), 67.6 (C-2'), 60.4 (C-4'), 39.5 (C-1').

HR-ESI-MS: $m/z = 257.0884 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 257.0880 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)}.$

6.8.22 Methyl 2-*O*-benzyl-3-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzyliden-β-D-galacto-pyranosid (**35**)

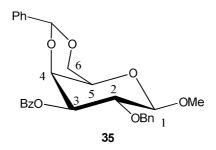
Variante A:

189 mg (7.88 mmol) mit Heptan gewaschenes und anschließend getrocknetes NaH wurden vorgelegt und in 5 mL trockenem DMF suspendiert. Anschließend wurden 1.88 g (4.87 mmol) $34^{[87-89,98]}$ in 5 mL trockenem DMF bei 0 °C langsam hinzugefügt und 20 min bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde wieder auf 0 °C gekühlt und 51 mg (0.14 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 900 μ L (7.58 mmol) Benzylbromid langsam zugefügt. Anschließend wurde 2 h bei rt gerührt und mit Zugabe von 15 mL MeOH beendet, mit 40 mL H₂O verdünnt und anschließend 4 mal mit 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 35 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE: EtOAc = 1:1) gereinigt.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 274 mg (0.58 mmol, 12% bezogen auf **34**) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Variante B:

Die Darstellung wurde nach Maddali *et al.* unter Nutzung von Phasentransferkatalyse durchgeführt. [90]



 $C_{28}H_{28}O_7 \label{eq:model}$ M=476.52 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.67-7.15 (m, 15H, arom.), 5.51 (s, 1H, C**H**-Phe), 5.18 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 3.8 Hz, **H**-3), 4.89 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.5 Hz, Bn-C**H**₂), 4.71 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.5 Hz, Bn-C**H**₂), 4.49 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 3.4 Hz, **H**-4), 4.48 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.8 Hz, **H**-1), 4.39 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 12.3 Hz, **H**-6), 4.11 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 12.3 Hz, **H**-6), 3.98 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 7.8 Hz, **H**-2), 3.63 (s, 3H, -OC**H**₃), 3.58 (m, 1H, **H**-5).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 133.2/129.9/128.8/128.4/128.2/128.0/127.8/127.5/126.2 (arom.), 104.9 (C-1), 100.8 (CH-Phe), 76.1 (C-2), 74.8 (Bn-CH₂), 74.0 (C-3), 73.9 (C-4), 69.1 (C-6), 66.3 (C-5), 57.2 (-OCH₃).

HR-ESI-MS:
$$m/z = 477.1908 [M+H]^+ (gef.), 477.1913 [M+H]^+ (ber.),$$

 $499.1719 [M+Na]^+ (gef.), 499.1733 [M+Na]^+ (ber.).$

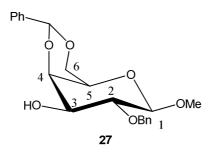
$$[\alpha]_D^{20} =$$
 +79.6 (c = 1.0, CHCl₃)

Smp.: 56 °C

6.8.23 Methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden-β-D-galactopyranosid (**27**)

Es wurden 104 mg (0.22 mmol) **35** in 20 mL 1% iger NaOH in trockenem MeOH gelöst und 1.5 h bei rt gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand in 10 mL H_2O aufgenommen. Es wurde mit 20 mL Toluol und dreimal mit je 20 mL Et_2O extrahiert. Die organische Phase wurde mit 30 mL H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 77 mg (0.21 mmol, 96% bezogen auf **35**) eines farblosen Feststoffes erhalten.



 $C_{21}H_{24}O_6$ M = 372.41 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.41-7.13 (m, 10H, arom.), 5.56 (s, 1H, C**H**-Phe), 4.95 (d, 1H, 2J = 12.0 Hz, Bn-C**H**₂), 4.72 (d, 1H, 2J = 12.0 Hz, Bn-C**H**₂), 4.36 (m, 1H, **H**-6), 4.32 (d, 1H, 3J = 7.8 Hz, **H**-1), 4.23 (d, 1H, 3J = 3.8 Hz, **H**-4), 4.09 (d, 1H, 2J = 12.3 Hz, **H**-6), 3.74 (d, 1H, 3J = 3.8 Hz, **H**-3), 3.63 (d, 1H, 3J = 7.8 Hz, **H**-2), 3.59 (s, 3H, -OC**H**₃), 3.46 (s, 1H, **H**-5).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 129.1/128.4/128.2/127.9/127.7/126.5 (arom.), 104.7 (C-1), 101.5 (CH-Phe), 79.3 (C-2), 75.5 (C-4), 74.8 (Bn-CH₂), 72.5 (C-3), 69.2 (C-6), 66.5 (C-5), 57.1 (-OCH₃).

HR-ESI-MS:
$$m/z = 373.1646 \text{ [M+H]}^+ \text{ (gef.)}, 373.1651 \text{ [M+H]}^+ \text{ (ber.)},$$

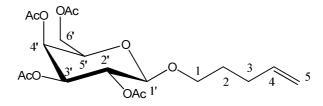
 $395.1473 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (gef.)}, 395.1471 \text{ [M+Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

$$[\alpha]_D^{20} =$$
 +22.9 (c = 1.0, CHCl₃)

Smp.: 54 °C

6.8.24 Pent-4-enyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosid (**38**)

38 wurde unter Koenigs-Knorr Bedingungen aus **37**^[99] dargestellt. ^[93]



38

$$C_{19}H_{28}O_{10}$$
 $M = 416.43 \text{ g/mol}$

Charakterisierung:

Hellgelber Sirup

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 5.91-5.72 (m, 1H, **H**-4), 5.38 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 3.5 Hz, ${}^{3}J$ = 0.9 Hz, **H**-4'), 5.20 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 10.6 Hz, ${}^{3}J$ = 7.9 Hz, **H**-2'), 5.04-4.95 (m, 3H, **H**-5, **H**-3'), 4.45 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.9 Hz, **H**-1'), 4.15 (dq, 2H, ${}^{2}J$ = 11.2 Hz, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-1), 3.93-3.86 (m, 2H, **H**-5', **H**-6'), 3.49 (ddd, 1H, ${}^{2}J$ = 9.8 Hz, ${}^{3}J$ = 6.1 Hz, ${}^{3}J$ = 2.2 Hz, **H**-6'), 2.18-2.02 (m, 11 H, 3 x C**H**₃ + **H**-3), 1.98 (s, 3H, C**H**₃), 1.76-1.62 (m, 2H, **H**-2).

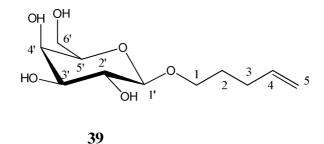
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 170.3/170.2/170.1/169.3 (C(O)CH₃), 137.8 (C-4), 115.0 (C-5), 101.4 (C-1'), 71.0 (C-3'), 70.7 (C-5'), 69.3 (C-6'), 69.0 (C-2'), 67.1 (C-4'), 61.3 (C-1), 29.8 (C-3), 28.6 (C-2), 20.7/20.6/2 x 20.5 (C(O)CH₃).

HR-ESI-MS: $m/z = 439.1560 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (gef.)}, 439.1574 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

 $R_f = 0.6$ (PE:EtOAc = 1:1)

6.8.25 Pent-4-enyl β-D-galactopyranosid (**39**)

39 wurde aus **38** durch Entschützung unter Zemplénbedingungen $^{[100]}$ bzw. aus **36** nach Clausen *et al.* $^{[94]}$ dargestellt.



 $C_{11}H_{20}O_6 \label{eq:mass_model}$ M=248.27 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 5.82 (ddt, 1H, ${}^{3}J$ = 17.5 Hz, ${}^{3}J$ = 10.4 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-4), 4.99 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 1.5 Hz, ${}^{3}J$ = 17.5 Hz, **H**-5 trans), 4.93 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 0.9 Hz ${}^{3}J$ = 10.2 Hz, **H**-5 cis), 4.29 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.9 Hz, **H**-1'), 3.90-3.80 (m, 2H, **H**-1, **H**-4'), 3.74-3.53 (m, 5H, 2 x **H**-6', **H**-1, **H**-5', **H**-3'), 3.41 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 7.9 Hz, ${}^{3}J$ = 9.9 Hz, **H**-2'), 2.06 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 7.1 Hz, **H**-3), 1.63 (quint, 2H, ${}^{3}J$ = 6.8 Hz, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, **H**-2).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ /ppm = 139.1 (C-4), 114.9 (C-5), 102.9 (C-1'), 75.2 (C-5'), 73.0 (C-3'), 71.0 (C-2'), 70.0 (C-1), 68.8 (C-4'), 61.1 (C-6'), 29.4 (C-3), 28.2 (C-2).

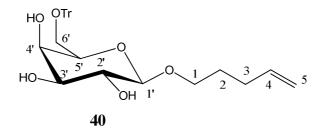
HR-ESI-MS: $m/z = 271.1147 [M + Na]^{+} (gef.), 271.1152 [M + Na]^{+} (ber.).$

$$[\alpha]_D^{25} =$$
 -21.0 (c = 1.0, CHCl₃)

 $R_f = 0.33 \text{ (DCM:MeOH} = 6:1)$

6.8.26 Pent-4-enyl 6-*O*-trityl-β-D-galactopyranosid (**40**)

40 wurde nach Clausen *et al.* dargestellt. [94]



 $C_{30}H_{34}O_6$ M = 490.59 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.51-7.43 (m, 5H, arom.), 7.34-7.20 (m, 10H, arom.), 5.80 (ddt, 1H, ${}^{3}J$ = 17.0 Hz, ${}^{3}J$ = 10.3 Hz, ${}^{3}J$ = 6.7 Hz, **H**-4), 5.02 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 1.8 Hz, ${}^{3}J$ = 17.0 Hz, **H**-5 *trans*), 4.95 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 0.9 Hz, ${}^{3}J$ = 10.3 Hz, **H**-5 *cis*), 4.19 (d, 1H, dd, 1H, ${}^{3}J$ = 7.6 Hz, **H**-1'), 3.99 (t, 1H, dd, 1H, ${}^{3}J$ = 3.1 Hz, **H**-4'), 3.92 (dt, 1H, ${}^{2}J$ = 9.6 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-1), 6.68–3.51 (m, 4H, **H**-5', **H**-3', **H**-2', **H**-1), 3.44 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 9.4 Hz, ${}^{3}J$ = 5.5 Hz, **H**-6'), 3.36 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 9.6 Hz, ${}^{3}J$ = 6.2 Hz, **H**-6'), 2.13 (q, 2H, ${}^{3}J$ = 6.8 Hz, **H**-3), 1.74 (quint, 2H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, **H**-2).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 143.7 (**C**(Ph)₃), 138.0 (**C**-4), 128.6/127.9/127.2/127.0 (arom.), 114.9 (**C**-5), 103.0 (**C**-1'), 73.6 (**C**-3'), 72.2 (**C**-2'), 69.2 (**C**-5'), 69.1 (**C**-1), 62.7 (**C**-4'), 60.3 (**C**-6'), 30.1 (**C**-3), 28.8 (**C**-2).

HR-ESI-MS: $m/z = 513.2246 [M + Na]^+ (gef.), 513.2248 [M + Na]^+ (ber.).$

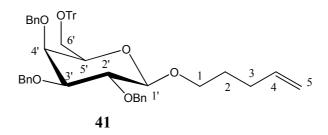
$$[\alpha]_D^{25} =$$
 -23.2 (c = 1.0, CHCl₃)

Smp: 90 °C

 $R_f = 0.5$ (EtOAc)

6.8.27 Pent-4-enyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-trityl-β-D-galactopyranosid (**41**)

41 wurde unter Verwendung von **40**, BnBr und NaH in DMF unter Standardbedingungen erhalten. [94,101]



 $C_{51}H_{52}O_6$ M = 760.95 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.35-7.01 (m, 30H, arom.), 5.73 (ddt, 1H, ${}^{3}J$ = 17.2 Hz, ${}^{3}J$ = 10.4 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-4), 4.92 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 1.7 Hz, ${}^{3}J$ = 17.2 Hz, **H**-5 *trans*), 4.86 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 1.3 Hz, ${}^{3}J$ = 10.4 Hz, **H**-5 *cis*), 4.83 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 10.8 Hz, Bn-C**H**₂), 4.73 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.6 Hz, Bn-C**H**₂), 4.69 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.9 Hz, Bn-C**H**₂), 4.66 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 10.8 Hz, Bn-C**H**₂), 4.60 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.9 Hz, Bn-C**H**₂), 4.41 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.6 Hz, Bn-C**H**₂), 4.22 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.8 Hz, **H**-1'), 4.86 (td, 1H, , ${}^{2}J$ = 9.5 Hz, ${}^{3}J$ = 6.3 Hz, **H**-1), 3.77 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 2.7 Hz, **H**-4'), 3.69 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 10.4 Hz, ${}^{3}J$ = 7.8 Hz, **H**-2'), 3.49-3.35 (m, 3H, **H**-1, **H**-5', **H**-3'), 3.28 (*pseudo*-t, 1H, ${}^{3}J$ = 6.3 Hz, **H**-6'), 3.13 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 9.6 Hz, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, **H**-6'), 2.11 (m, 2H, **H**-3), 1.66 (m, 2H, ${}^{3}J$ = 6.7 Hz, **H**-2).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 143.9 (C(Ph)₃), 138.2 (C-4), 128.7/128.3/128.2/128.1/128.0/127.9/127.5/127.2/127.0 (arom.), 114.8 (C-5), 103.9 (C-1'), 82.2 (C-3'). 79.6 (C-2'), 75.1 (Bn-CH₂), 74.3 (Bn-CH₂), 74.1 (C-5'), 73.6 (C-4'), 73.1 (Bn-CH₂), 69.2 (C-1), 62.8 (C-6'), 30.3 (C-3), 29.0 (C-2).

HR-ESI-MS:
$$m/z = 783.3656 [M + Na]^{+} (gef.), 783.3656 [M + Na]^{+} (ber.),$$

799.3395 $[M + K]^{+} (gef.), 799.3395 [M + K]^{+} (ber.).$

$$[\alpha]_D^{25} =$$
 -30.1 (c = 0.9, CHCl₃)

$$R_f = 0.4 \text{ (PE:EtOAc} = 1:1)$$

6.8.28 Pent-4-enyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosid (**42**)

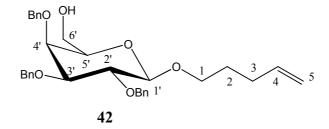
Variante A:

190 mg (0.25 mmol) **41** wurden in 2 mL trockenem DCM gelöst und mit 407 μL 1.83 M TFA/1.83 M TFAA in DCM versetzt. Nach 2 h wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt, der pH mit NEt₃ auf pH 8 eingestellt, 10 mL MeOH hinzugefügt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in 20 mL DCM gelöst und mit je 20 mL 5%iger NaCl-Lösung und H₂O gewaschen. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (PE:EtOAc = 1:1) gereinigt.

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 88 mg (0.17 mmol, 68% bezogen auf **41**) eines farblosen Sirups erhalten.

Variante B:

42 wurde nach Clausen *et al.* ohne Reinigung von **41** aus **40** dargestellt.^[94]



 $C_{32}H_{38}O_{6}$ M = 518.27 g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.49-7.26 (m, 15H, arom.), 5.84 (ddt, 1H, ${}^{3}J$ = 17.0 Hz, ${}^{3}J$ = 10.4 Hz, ${}^{3}J$ = 6.5 Hz, **H**-4), 5.04 (dd, 1H, ${}^{2}J$ = 17.2 Hz, ${}^{3}J$ = 1.5 Hz, **H**-5 trans), 5.01-4.94 (m, 3H, ${}^{2}J$ = 11.5 Hz, ${}^{2}J$ = 10.8 Hz, 2 x Bn-C**H**₂, **H**-5 cis), 4.84 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.8 Hz, Bn-C**H**₂), 4.81 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 10.9 Hz, Bn-C**H**₂), 4.77 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.8 Hz, Bn-C**H**₂), 4.69 (d, 1H, ${}^{2}J$ = 11.9 Hz, Bn-C**H**₂), 4.38 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.7 Hz, **H**-1'), 3.97 (td, 1H,

 ${}^{2}J$ = 9.3 Hz, ${}^{3}J$ = 6.2 Hz, **H**-1), 3.86 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 9.8 Hz, ${}^{3}J$ = 7.8 Hz, **H**-2'), 3.82-3.75 (m, 2H, **H**-4', **H**-6'), 3.60-3.42 (m, 3H, **H**-1, **H**-3', **H**-5'), 3.39 (*pseudo*-t, 1H, ${}^{3}J$ = 5.9 Hz, ${}^{3}J$ = 6.3 Hz, **H**-6'), 2.25-2.13 (m, 2H, **H**-3), 1.85-1.70 (m, 2H, ${}^{3}J$ = 6.8 Hz, **H**-2).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 138.1 (C-4), 128.7/128.4/128.3/128.1/128.0/127.7/ 127.6 (arom.), 114.9 (C-5), 104.1 (C-1'), 82.3 (C-3'). 79.7 (C-2'), 75.2 (Bn-CH₂), 74.5 (Bn-CH₂), 74.1 (C-5'), 73.4 (C-4'), 72.9 (Bn-CH₂), 69.4 (C-1), 62.1 (C-6'), 30.3 (C-3), 29.0 (C-2).

HR-ESI-MS: $m/z = 541.2561 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (gef.)}, 541.2563 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (ber.)}.$ $[\alpha]_D^{25} = -22.2 \text{ (c} = 1.0, \text{CHCl}_3)$ $R_f = 0.3 \text{ (PE:EtOAc} = 2:1)$

6.8.29 Pent-4-enyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-methansulfonyl-β-D-galacto-pyranosid (**28**)

70.5 mg (0.136 mmol) **42** und 20 μ L (0.258 mmol) Mesylchlorid wurden in 1.5 mL trockenem Pyridin gelöst und für 2.5 h bei rt gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 10 mL H₂O verdünnt und mit 10 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (PE:EtOAc = 3.5:1).

<u>Ausbeute</u>: Es wurden 75 mg (0.125 mmol, 92% bezogen auf **42**) eines farblosen Sirups erhalten.

 $C_{33}H_{40}O_8S$ M=596.73~g/mol

Charakterisierung:

Farbloser Sirup

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.32-7.19 (m, 15H, arom.), 5.73 (ddt, 1H, ${}^{3}J = 17.0 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 10.3 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 6.6 \text{ Hz}$, **H**-4), 4.97-4.84 (m, 4H, **H**-5, 2 x Bn-C**H**₂), 4.75 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.5 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.70 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.1 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.67 (d, 1H, ${}^{2}J = 12.1 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.55 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.5 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.28 (d, 1H, ${}^{3}J = 7.5 \text{ Hz}$, **H**-1'), 4.24 (dd, 1H, ${}^{2}J = 10.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 6.9 \text{ Hz}$, **H**-6'), 3.97 (dd, 1H, ${}^{3}J = 10.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 5.1 \text{ Hz}$, **H**-6'), 3.83 (td, 1H, ${}^{2}J = 9.5 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 6.4 \text{ Hz}$, **H**-1), 3.78-3.71 (m, 2H, **H**-2', **H**-4'), 3.56 (t, 1H, ${}^{3}J = 6.0 \text{ Hz}$, **H**-5'), 3.50-3.42 (m, 2H, **H**-3', **H**-1), 2.85 (s, 3H, C**H**₃), 2.17-2.02 (m, 2H, **H**-3), 1.74-1.60 (m, 2H, ${}^{3}J = 6.8 \text{ Hz}$, **H**-2).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 138.5 (C-4), 128.6/128.4/128.3/128.1/127.9/127.8/127.7/127.6 (arom.), 115.0 (C-5), 104.0 (C-1'), 81.9 (C-3'), 79.3 (C-2'), 75.3 (Bn-CH₂), 74.4 (Bn-CH₂), 73.6 (Bn-CH₂), 73.0 (C-4'), 72.2 (C-5'), 69.6 (C-1), 68.8 (C-6'), 37.2 (CH₃), 30.2 (C-3), 28.9 (C-2).

HR-ESI-MS:
$$m/z = 619.2334 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (gef.)}, 619.2336 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (ber.)},$$

 $635.2075 \text{ [M+ K]}^+ \text{ (gef.)}, 635.2075 \text{ [M+ K]}^+ \text{ (ber.)}.$

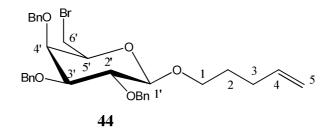
$$[\alpha]_D^{25} = +1.5 \text{ (c} = 1.2, \text{CHCl}_3)$$

 $R_f = 0.2 \text{ (PE:EtOAc} = 3.5:1)$

6.8.30 Pent-4-enyl 6-bromo-6-deoxy-2,3,4-tetra-*O*-benzyl-β-D-galacto-pyranosid (**44**)

58.1 mg (0.09 mmol) **28** wurde mit 280 mg (3.15 mmol) und 0.8 mL Butanon für 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt, mit 1 mL H₂O versetzt und 3-mal mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE:EtOAc = 4:1)

Ausbeute: Es wurden 6.6 mg (0.01 mmol, 12% bezogen auf 28) eines gelblichen Öls erhalten.



 $C_{32}H_{37}BrO_{5}$ M = 580.54 g/mol

Charakterisierung:

Gelbliches Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 7.38-7.26 (m, 15H, arom.), 5.80 (ddt, 1H, ${}^{3}J = 17.1 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 10.2 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 6.6 \text{ Hz}$, **H**-4), 5.06-4.99 (m, 2H, **H**-5, Bn-C**H**₂), 4.97 (dd, 1H, ${}^{3}J = 6.9 \text{ Hz}$, ${}^{2}J = 1.5 \text{ Hz}$, **H**-5 cis), 4.92 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.0 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.82 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.9 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.78-4.72 (m, 2H, ${}^{2}J = 10.6 \text{ Hz}$, ${}^{2}J = 11.9 \text{ Hz}$, 2 x Bn-C**H**₂), 4.66 (d, 1H, ${}^{2}J = 11.4 \text{ Hz}$, Bn-C**H**₂), 4.35 (d, 1H, ${}^{3}J = 7.7 \text{ Hz}$, **H**-1'), 4.00 (d, 1H, ${}^{3}J = 2.8 \text{ Hz}$, **H**-4'), 3.94 (td, 1H, ${}^{2}J = 9.5 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 6.3 \text{ Hz}$, **H**-1), 3.81 (dd, 1H, ${}^{3}J = 9.6 \text{ Hz}$, ${}^{3}J = 7.7 \text{ Hz}$, **H**-2'), 3.56-3.49 (m, 3H, **H**-3', **H**-5', **H**-1), 3.44-3.39 (m, 2H, **H**-6'), 2.20-2.09 (m, 2H, **H**-3), 1.82-1.67 (m, ${}^{3}J = 6.9 \text{ Hz}$, **H**-2).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta/ppm = 138.1$ (C-4), 128.5/128.4/128.3/128.2/127.9/127.7/127.6/127.5 (arom.), 114.8 (C-5), 104.0 (C-1'), 82.2 (C-3'), 79.2 (C-2'), 75.2 (Bn-CH₂), 74.9 (Bn-CH₂), 73.5 (C-5'), 73.4 (C-4'), 69.5 (C-1), 30.2 (C-3), 30.0 (C-6'), 28.9 (C-2).

HR-ESI-MS: $m/z = 603.1705 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (gef.)}, 603.1722 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (ber.)},$ $605.1712 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (gef.)}, 603.1702 \text{ [M+ Na]}^+ \text{ (ber.)}.$

6.9 Syntheseversuche

6.9.1 Syntheseversuche zur Darstellung von 5-Nitroso-6-D-ribitylaminouracil (7)

Variante A:

48.2 mg (0.33 mmol) **5** und 96.3 mg (0.64 mmol) **6** wurden in 2 mL H₂O gelöst und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurden 144.6 mg (2.10 mmol) NaNO₂ bei 0 °C hinzugefügt, der pH Wert mit 10% iger Essigsäure auf pH 4.5 eingestellt und das Reaktionsgemisch für 30 min bei 0 °C und 1 h bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in 1.5 mL 1.5 M ammoniakalischer Lösung aufgenommen und auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1x8, 1x2 cm, HCOO⁻) aufgetragen. Es wurde versucht, mit H₂O, 0.01 M Ameisensäure und 0.1 M Ameisensäure das Produkt zu eluieren. Die Bildung von **7** konnte nicht nachgewiesen werden

Variante B:

14.6 mg (0.10 mmol) **5** und 60.5 mg (0.40 mmol) **6** wurden in 1 mL H₂O gelöst und unter Verwendung von Mikrowellen bei 50 W erhitzt. Die Reaktionsdauer und die Temperatur wurden dazu variiert (Tabelle 10). Es konnte in keinem Fall eine Produktbildung nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Variationen der Reaktionsbedingungen für die Synthese von 6-D-Ribitylaminouracil unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung.

Ansatz	<i>t</i> [min]	T [°C]	Leistung [W]
A	15	100	50
В	20	100	50
C	40	105	50
D	60	105	50

Variante C:

48.2 mg (0.33 mmol) **5** und 96.3 mg (0.64 mmol) **6** wurden in 2 mL H₂O gelöst und anschließend das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde für 1 h bei 95 °C und anschließend für 2 h bei 110 °C im Ölpumpenvakuum erhitzt. Das Gemisch wurde nun bei 0 °C und 1 bar in 1.5 mL H₂O aufgenommen und mit 68.4 mg (0.99 mmol) NaNO₂ versetzt. Der pH Wert wurde mit 10% iger Essigsäure auf pH 4.5 eingestellt und für 2 h bei rt gerührt. Dabei trat eine deutliche Rotfärbung der Lösung auf. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 1 mL 0.15 M ammoniakalischer Lösung gelöst und auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1x8, 1x2 cm, HCOO) aufgetragen. Es wurde mit 7 mL H₂O, 10 mL 0.01 M Ameisensäure und 65 mL 0.1 M Ameisensäure eluiert. Rotgefärbte Fraktionen wurden eingeengt, in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

Das Produkt konnte durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden (ESI-MS: 313 [M+Na]⁺, 329 [M+K]⁺), jedoch konnte durch NMR Spektroskopie die Bildung von 7 nicht zweifelsfrei geklärt werden.

6.9.2 Syntheseversuche zu 5-Nitroso-6-(5-O-α-D-galactopyranosyl)-5-D-arabinitylaminouracil

Variante A:

30 mg (0.1 mmol) **21** und 7 mg (0.05 mmol) **5** wurden in 2 mL H₂O für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und 21 mg (0.3 mmol) NaNO₂ hinzugefügt

der pH Wert auf pH 4.5 eingestellt (10%ige Essigsäure) und für 1 h bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Die Produktbildung konnte nicht nachgewiesen werden.

Variante B:

15 mg (0.1 mmol) 5 und 61 mg (0.2 mmol) 21 wurden in 1 mL H_2O gelöst und für 13 min bei 50 Watt bei 100 °C im Mikrowellenreaktor umgesetzt. Es konnte jedoch kein gewünschtes 6-(5-O- α -D-Galactopyranosyl)-5-D-arabinitylaminouracil nachgewiesen werden.

6.9.3 Syntheseversuch von H_2N -Cys(StBu)-Gly-Ser-Thr-Pro-Cys(StBu)-C(O) NH_2

Das Peptid H₂N-Cys-Gly-Ser-Thr-Pro-Cys-C(O)NH₂ sollte durch manuelle Festphasenpeptidsynthese dargestellt werden. Die Synthese wurde in einem 200 μM Ansatz durchgeführt, wobei die Aminofunktionen der Aminosäuren Fmoc-geschützt eingesetzt wurden. Die Cysteinreste wurden orthogonal geschützt (S*t*Bu) eingesetzt, um Polymerisierungen zu vermeiden. Threonin wurde *t*Bu-geschützt eingesetzt.

Für die Synthese wurden 210 mg Rink-Amid Harz (Belegung 0.95 mmol/g) in DMF über Nacht gequellt. Für die Entschützung der Aminofunktion (Fmoc-Abspaltung) wurde das Harz mit 2 mL Piperidin:DMF = 1:4 versetzt und für 20 min bei 50 °C geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde der Vorgang einmal wiederholt. Das Harz wurde dreimal mit 2 mL DMF gewaschen und mit einer frisch angesetzten Lösung aus 0.5 M TBTU in DMF und 1 M DIPEA in DMF sowie 1.8 mL einer 0.5 M Lösung der ersten C-terminalen Aminosäure in DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nun für 2-3 h bei 50 °C geschüttelt und anschließend dreimal mit 2 mL DMF gewaschen. Die Reaktionslösung wurde entfernt und mit 2 mL 10% Essigsäureanhydrid in DMF versetzt, um nicht reagierte Aminofunktionen zu deaktivieren (*capping*). Dieser Vorgang wurde zweimal für 30 – 60 min durchgeführt.

Nach einem erneuten Waschvorgang (3 x 2 mL DMF) wurde durch Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe an der terminalen Aminofunktion die Kupplung mit der nächsten Aminosäure vorbereitet und der Synthesecyclus erneut gestartet.

Nach der Kupplung der letzten (N-terminalen) Aminosäure wurde das Peptid mit 10 mL TFA:TIPS:H₂O = 95:5:2 für 10 min bei rt geschüttelt, um das Harz abzuspalten und der

Vorgang wiederholt. Das Harz wurde mit der Abspaltlösung und TFA gründlich gewaschen und das Filtrat in H_2O aufgenommen, im Ultraschallbad für 5 min homogenisiert und gefriergetrocknet.

Der Rückstand wurde nun in 10 mL Et₂O aufgenommen, im Ultraschallbad für 5 min suspendiert und anschließend für 20 min bei 10 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand erneut in 10 mL Et₂O aufgenommen und die Prozedur wiederholt. Das Rohpeptid wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Peptids erfolgte mittels präparativer HPLC (Agilent; Macherey Nagel: Nucleodur C18 Isis 5 μ m, 250 x 21 mm, 100% H₂O:MeCN = 95:5 \rightarrow 0% H₂O:MeCN = 95:5, 27 min), wobei die Masse des gewünschten Produkts zwar detektiert, aber keinem eindeutigen UV-Peak zugeordnet werden konnte. Durch eine weitere Überprüfung aller Fraktionen mittels ESI-MS konnte die Produktfraktion nicht identifiziert werden.

6.9.4 Versuch der Darstellung von Pent-4-enyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*- (trifluormethansulfonyl)-β-D-galactopyranosid (**43**)

543 mg (1.04 mmol) 42 wurden in 10.8 mL trockenem Toluol gelöst und bei 0 °C 178 µL NEt₃ hinzugefügt. Nach 10 min wurden 178 μL (1.08)mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid langsam hinzugegeben, 5 min bei 0 °C gerührt und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde über 2.5 g Kieselgel filtriert und mit 50 mL trockenem Toluol gewaschen. Das farblose Filtrat wurde eingeengt, wobei sich in schwarzbrauner Rückstand bildete. Die NMR-spektroskopischen Daten konnten nicht eindeutig dem Produkt zugeordnet werden.

6.9.5 Versuche zur Darstellung von Pent-4-enyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*(methyl-2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden-β-D-galactopyranosid-3-*O*-yl)-β-Dgalactopyranosid (**29**)

Variante A:

25.1 mg (70.1 mmol) **27** wurden in 3mL DMF gelöst und nach Zugabe von 1.8 mg (75μmol) NaH für 2,5 h bei rt gerührt. Dann wurde langsam eine Lösung von 34 mg (57.0 mmol) **28** in 1 mL DMF hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei rt gerührt und anschließend das Lösungsmittel eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE:EtOAc = 2:1) getrennt und die einzelnen Fraktionen massenspektrometrisch untersucht. Es konnte nicht das gewünschte Produkt erhalten werden.

Variante B:

20 mg (0.53 mmol, 1.3 Äq.) **27** wurden in 0.5 mL DMF gelöst, mit 2 mg NaH (60% in Öl) und 8.1 mg 18-Krone-6- Ether versetzt und für 1.5 h bei rt gerührt. Die Lösung wurde auf die in Tabelle 11 angegebene Temperatur gekühlt und 25 mg (0.42 mmol, 1 Äq) **28** in 1 mL DMF hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei gerührt und anschließend über Nacht auf rt erwärmt. Es wurden 5 mL DCM hinzugegeben, dreimal mit 5 mL H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Trennung wurden die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert, wobei nur das Eliminierungsprodukt (zwischen *C-5* ' und *C-6* ') von **28** als Hauptprodukt identifiziert werden konnte.

Tabelle 11: Variation der Temperatur bei dem Darstellungsversuch von 29, Variante B.

Reaktion	T [°C]	
A	0	
В	-12	
С	-50	

Variante C:

15 mg (4.0 μ mol) 27 wurden in trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 5.5 mg (9.5 μ mol) 44 in 500 μ L trockenem THF wurden langsam hinzugefügt und das

Reaktionsgemisch bei rt für 2 h gerührt. Die Reaktion wurde per DC verfolgt und nach 2 h 1.9~mg ($7.9~\mu\text{mol}$, 2~Äq) NaH hinzugefügt, um die Reaktion zu beschleunigen. Die Reaktion wurde über Nacht bei rt gerührt, mit Essigsäure das NaH vernichtet und eingeengt.

Variante D:

23 mg (6.1 μ mol) **27** und 17 mg K₂CO₃ wurden in 1 mL trockenem THF suspendiert, 1 h bei 0 °C gerührt und mit 44 mg (7.3 μ mol) **28** in 0.5 mL trockenem THF versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei rt gerührt.

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	(b) (!)	225, 319, 336, EUH066	210, 233, 305 + 351 + 338
Acetonitril		225, 302 + 312 + 332, 319	210, 305 + 351 + 338, 403 + 235
N-Acetyllactosamin	(1)	315, 319, 335	P261, P305 + P351 + P338
Ameisensäure		226, 314	P280, P305 + P351 + P338, P310
2-(2-Aminoethoxy)ethanol		312, 314	P280, P305 + P351 + P338, P310
Ammoniakalische Lösung 25%		314, 335, 400	P280, P273, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P309, P310
Benzaldehyd	<u>(1)</u>	302	1305,1310
Benzaldehyddimethylacetal	<u>(1)</u>	302	
Benzoylchlorid		302 + 312 + 332, 314, 317	280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 305 + 351 + 338
Benzylbromid	(1)	319, 335, 315	305 + 351 + 338, 302 + 352
Benzyl-2,2,2- trichloracetmidat	(1)	302, 315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
BF ₃ ·Et ₂ O		226, 302, 314, 330, 372	260, 280, 284, 305 + 351 + 338, 310
BisTris, BisTris- d_{19}	(315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
2-Butanon		301, 311, 331, 370	260, 280, 301 + 310, 311
n-Butylammoniumiodid		302. 315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
Bromwasserstoffsäure in Eisessig, 33%		314, 335	261, 280, 305 + 351 + 338, 310
Chloroform, CDCl ₃	(!)	302, 315, 351, 373	281
Camphersulfonsäure		314	280, 305 + 351 + 338, 310
Dichlormethan		351	281
Diethylether		224, 302, 336	210, 261

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Dioxan, Dioxan- d_8		225, 319, 335-351	210, 261, 281, 305 + 351 + 338
DIPEA		225, 301, 314, 412	210, P273, 280, 301 + 310, 305 + 351 + 338, 310
DMF		226, 312, 319, 332, 360D	201, 280, 305 + 351 + 338, 308 + 313
DTT, DTT- d_{12}	<u>(1)</u>	302, 315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
EtOH		225	210
EtOAc		225, 319, 336	210, 261, 305 + 351 + 338
Ethylchlorformiat		225, 302, 314, 330	210, 260, 280, 284, 305 + 351 + 338, 310
Essigsäure		226, 314	280, 305 + 351 + 338, 310
Essigsäureanhydrid		226, 302, 314, 332	280, 305 + 351 + 338, 310
Heptan		225, 304, 315, 336, 410	210, 261, 273, 301 + 310, 331, 501
Hexan		225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	210, 261, 273, 281, 301 + 310, 331
Hydroxylaminhydrochlorid		290, 302, 312, 315, 317-, 319, 351, 373, 400	273, 280, 305 + 351 + 338
LiBr	(302	
MeOH		225, 301, 311, 331, 370	210, 260, 280, 301 + 310, 311
Methansulfonylchlorid		300, 310, 314, 330, 335	260, 264, 280, 284, 301 + 310, 302 + 350
$MnCl_2$		301	301 + 310
MOPS	<u>(1)</u>	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
Natrium		260, 314	223, 231 + 232, 280, 305 + 351 + 338, 370 + 378, 422
NaNO ₂		272, 301, 400	220, 273, 301 + 310
NaH (60% in Öldispersion)		260, 319	223, 231 + 232, 305 + 351 + 338, 370 + 378, 422
	1	1	1

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
NaOH		314	280, 305 + 351 + 338, 310
4-Penten-1-ol		226	
Petrolether 50-70		225, 304, 340, 350, 361f, 373, 412	201, 210, 273, 281, 301 + 310, 308 + 313
Piperidin		225, 311, 314, 331	210, 261, 280, 305 + 351 + 338, 310
PtO ₂	(2)	272, 319	220, 305 + 351 + 338
Pyridin		225, 302, 312, 332	210, 280
Salpetersäure, rauchend		272, 311, 314, 331	220, 261, 280, 305 + 351 + 338, 310
Salzsäure 37%	(I)	314, 335	261, 280, 305 + 351 + 338, 310
Schwefelsäure		314	280, 305 + 351 + 338, 310
Silbercarbonat	(315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
TBTU	(1)	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
Tetrahydrofuran		225, 319, 335	210, 261, 305 + 351 + 338
Toluol		225, 304, 315, 336, 361d-373	210, 261, 281, 301 + 310, 331
2,4,6-Trichlorpyrimidin	!	302, 312, 315, 319, 332, 335	261, 280, 305 + 351 + 338
Triethylamin		225, 302, 312, 314, 332	210, 280, 305 + 351 + 338, 310
Trifluoressigsäure		314, 332, 412	273, 280, 305 + 351 + 338, 310
Trifluoressigsäureanhydrid	(I)	314, 332	280, 305 + 351 + 338, 310
Triisopropylsilan	(1)	226, 315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
Trifluormethansulfonsäure	(I)	302, 312, 314	280, 305 + 351 + 338, 310
Trifluormethansulfon- säureanhydrid	(I)	302, 314	280, 305 + 351 + 338, 310
TMS Triflat		226, 314	280, 305 + 351 + 338, 310

TOXIKOLOGISCHE DATEN

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Tritylchlorid		314	280, 305 + 351 + 338, 310
Wasserstoff		220	210
$ZnCl_2$		302, 314, 410	273, 280, 305 + 351 + 338, 310, 501

8 Literatur

- [1] A. H. Varki, Essentials of Glycobiology, 1999.
- [2] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu Rev Biochem* **2008**, 77(1), 521-555.
- [3] L. Tu, D. K. Banfield, Cell Mol Life Sci 2010, 67(1), 29-41.
- [4] C. Breton, L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca, A. Imberty, *Glycobiology* **2006**, *16*(2), 29R-37R.
- [5] J. Errey, S. Lee, R. Gibson, C. Martinez Fleites, C. Barry, P. Jung, A. O'Sullivan, B. Davis, G. Davies, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*(7), 1234-1237.
- [6] L. L. Lairson, S. G. Withers, *Chem Commun* **2004**(20), 2243-2248.
- [7] M. L. Sinnott, *Chem Rev* **2002**, *90*(7), 1171-1202.
- [8] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, J Mol Biol 2003, 328(2), 307-317.
- [9] J. E. Pak, P. Arnoux, S. Zhou, P. Sivarajah, M. Satkunarajah, X. Xing, J. M. Rini, J Biol Chem 2006, 281(36), 26693-26701.
- [10] C. Breton, A. Imberty, Curr Opin Struct Biol 1999, 9(5), 563-571.
- [11] J. Liu, A. Mushegian, *Protein Sci* **2003**, *12*(7), 1418-1431.
- [12] M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda, EMBO J 2008, 27(1), 234-243.
- [13] K. M. Byrne, P. C. Byrne, *Immunohematology* **2004**, 20(1), 50-58.
- [14] F. F. Wagner, W. A. Fliegel, *Immunohematology* **2004**, 20(1), 23-36.
- [15] C. M. Westhoff, M. E. Reid, *Immunohematology* **2004**, 20(1), 37-49.
- [16] F. Yamamoto, *Immunohematology* **2004**, 20(1), 3-22.
- [17] K. Landsteiner, Zentralblatt Bakteriologie **1900**, 27, 357-362.
- [18] W. M. Watkins, W. T. J. Morgan, *Nature* **1957**, *180*(4594), 1038-1040.
- [19] S.-I. Hakomori, *Biochim Biophys Acta General Subjects* **1999**, *1473*(1), 247-266.
- [20] H. Masamune, *Tohoku J Exp Med* **1958**, *68*(1), 81-91.
- [21] K. Stellner, S.-i. Hakomori, G. A. Warner, *Biochem Biophys Res Commun* **1973**, 55(2), 439-445.
- [22] T. F. Orntoft, P. Greenwell, H. Clausen, W. M. Watkins, *Gut* **1991**, *32*(3), 287-293.
- [23] F. Piller, J.-P. Cartron, H. Tuppy, *Rev Fr Transfus Immun* **1980**, 23(5), 599-611.
- [24] M. Nagai, V. Dave, B. E. Kaplan, A. Yoshida, *J Biol Chem* **1978**, 253(2), 377-379.

- [25] M. Nagai, V. Dave, H. Muensch, A. Yoshida, *J Biol Chem* **1978**, 253(2), 380-381.
- [26] F. Yamamoto, H. Clausen, T. White, J. Marken, S. Hakomori, *Nature* **1990**, 345(6272), 229-233.
- [27] S. I. Patenaude, N. O. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic,S. V. Evans, *Nat Struct Biol* 2002, 9(9), 685-690.
- [28] J. A. Letts, N. L. Rose, Y. R. Fang, C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. L. Seto, M. M. Palcic, S. V. Evans, *J Biol Chem* 2006, 281(6), 3625-3632.
- [29] 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(15), 10097-10108.
- [30] N. Soya, G. K. Shoemaker, M. M. Palcic, J. S. Klassen, Glycobiology 2009, 19(11), 1224-1234.
- [31] 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*(41), 13529-13538.
- [32] N. Sindhuwinata, E. Munoz, F. J. Munoz, M. M. Palcic, H. Peters, T. Peters, *Glycobiology* **2010**.
- [33] G. K. Shoemaker, N. Soya, M. M. Palcic, J. S. Klassen, *Glycobiology* **2008**, *18*(8), 587-592.
- [34] A. Blume, J. Angulo, T. Biet, H. Peters, A. J. Benie, M. Palcic, T. Peters, *J Biol Chem* **2006**, 281(43), 32728-32740.
- [35] H. J. Lee, C. H. Barry, S. N. Borisova, N. O. L. Seto, R. B. Zheng, A. Blancher, S. V. Evans, M. M. Palcic, *J Biol Chem* 2005, 280(1), 525-529.
- [36] K.-H. Jung, R. R. Schmidt, in *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**, pp. 609-659.
- [37] P. Compain, O. R. Martin, *Bioorg Med Chem* **2001**, *9*(12), 3077-3092.
- [38] M. Izumi, H. Yuasa, H. Hashimoto, Curr Top Med Chem 2009, 9, 87-105.
- [39] T. Kajimoto, M. Node, Synthesis **2009**, 19, 3179-3210.
- [40] T. Pesnot, R. Jorgensen, M. M. Palcic, G. K. Wagner, *Nat Chem Biol* **2010**, *6*(5), 321-323.
- [41] M. M. Palcic, L. D. Heerze, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *J Biol Chem* **1989**, 264(29), 17174-17181.
- [42] B. Waldscheck, M. Streiff, W. Notz, W. Kinzy, R. Schmidt, R., *Angew Chem Int Ed* **2001**, *40*(21), 4007-4011.
- [43] S. Fox, S. Farr-Jones, M. A. Yund, *J Biomol Screen* **1999**, *4*(4), 183-186.

- [44] W. Jhoti, A. R. Leach, Structure Based Drug-Discovery 2007, 49-61.
- [45] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv Drug Deliver Rev* **1997**, 23(1-3), 3-25.
- [46] W. L. Jorgensen, *Science* **2004**, *303*(5665), 1813-1818.
- [47] H. Kubinyi, *Pharm Unserer Zeit* **1998**, 27(3), 92-106.
- [48] H. Kubinyi, *Pharm Unserer Zeit* **1998**, 27(4), 158-172.
- [49] I. D. Kuntz, Science **1992**, 257(5073), 1078-1082.
- [50] J. Albers, Diplomarbeit **2007**, Hamburg.
- [51] F. Niemeyer, Diplomarbeit 2011, Hamburg.
- [52] D. Horton, M. J. Miller, *J Org Chem* **1965**, *30*(7), 2457-2459.
- [53] D. Horton, J. D. Wander, *Carbohydr Res* **1969**, *10*(2), 279-288.
- [54] G. A. Jeffrey, H. S. Kim, *Carbohydr Res* **1970**, *14*(2), 207-216.
- [55] R. M. Cresswell, Wood, H. C. S., *J Chem Soc* **1960**, 4768-4775.
- [56] W. Traube, *Chem Ber* **1900**, *33*(1), 1371-1383.
- [57] W. Traube, *Chem Ber* **1900**, *33*(3), 3035-3056.
- [58] M. Cushman, D. Yang, K. Kis, A. Bacher, *J Org Chem* **2001**, 66(25), 8320-8327.
- [59] W. Pfleiderer, G. Nübel, *Liebigs Ann Chem* **1960**, *631*(1), 168-174.
- [60] G. W. E. Plaut, *J Biol Chem* **1963**, 238(6), 2225-2243.
- [61] G. W. E. Plaut, Harvey, R. A., *Methods Enzymol* **1971**, *18b*, 515-538.
- [62] R. Kuhn, P. Desnuelle, F. Weygand, *Chem Ber (A and B Series)* **1937**, *70*(6), 1293-1301.
- [63] R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand, R. Ströbele, *Chem Ber (A and B Series)* **1935**, 68(9), 1765-1774.
- [64] W. Römisch, Dissertation 2005, München, 43.
- [65] S. S. Al-Hassan, R. J. Kulick, D. B. Livingstone, C. J. Suckling, H. C. S. Wood, R. Wrigglesworth, R. Ferone, *J Chem Soc Perkin Trans 1* **1980**, 2645-2656.
- [66] P. Nielsen, A. Bacher, *Z Naturforsch* **1988**, *43B*, 1358-1364.
- [67] T. Neilson, H. C. S. Wood, *J Chem Soc (Resumed)* **1962**, 44-51.
- [68] O. Ruff, Chem Ber **1898**, 31(2), 1573-1577.
- [69] U. Jonsson, L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas,B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg, *Biotechniques* 1991, 11, 620-627.
- [70] J. A. Maynard, N. C. Lindquist, J. N. Sutherland, A. Lesuffleur, A. E. Warrington, M. Rodriguez, S.-H. Oh, *Biotech J* **2009**, *4*(11), 1542-1558.
- [71] M. Mayer, B. Meyer, *Angew Chem Int Ed* **1999**, *38*(12), 1784-1788.

- [72] B. Meyer, T. Peters, *Angew Chem Int Ed* **2003**, *42*(8), 864-890.
- [73] M. Blanc-Muesser, J. Defaye, D. Horton, *Carbohydr Res* **1979**, 68(2), 175-187.
- [74] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochem Pharmacol* **1973**, 22(23), 3099-3108.
- [75] K. Schaefer, *Diplomarbeit* **2008**, *Hamburg*.
- [76] J. O. Deferrari, B. N. Zuazo, M. E. Gelpi, *Carbohydr Res* **1973**, *30*(2), 313-318.
- [77] B. N. Zuazo, I. M. E. Thiel, Carbohydr Res 1988, 172(1), 156-159.
- [78] C. T. Goudar, S. K. Harris, M. J. McInerney, J. M. Suflita, *J Microbiol Methods* **2004**, 59(3), 317-326.
- [79] F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, *Biochim Biophys Acta Proteins and Proteomics* **2011**, *accepted*.
- [80] M. P. Kötzler, S. Blank, E. Spillner, B. Meyer, *Insect Biochem Molec Biol* **2011**, accepted.
- [81] N. O. L. Seto, C. A. Compston, S. V. Evans, D. R. Bundle, S. A. Narang, M. M. Palcic, *Eur J Biochem* **1999**, 259(3), 770-775.
- [82] T. Hennet, Cell Mol Life Sci 2002, 59(7), 1081-1095.
- [83] S. Hase, S.-i. Kawabata, H. Nishimura, H. Takeya, T. Sueyoshi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Takao, Y. Shimonishi, T. Ikenaka, *J Biochem* **1988**, *104*(6), 867-868.
- [84] S. Hase, H. Nishimura, S. Kawabata, S. Iwanaga, T. Ikenaka, *J Biol Chem* **1990**, 265(4), 1858-1861.
- [85] D. J. Moloney, L. H. Shair, F. M. Lu, J. Xia, R. Locke, K. L. Matta, R. S. Haltiwanger, *J Biol Chem* **2000**, 275(13), 9604-9611.
- [86] H. Nishimura, S. Kawabata, W. Kisiel, S. Hase, T. Ikenaka, T. Takao, Y. Shimonishi,
 S. Iwanaga, *J Biol Chem* 1989, 264(34), 20320-20325.
- [87] A. V. Demchenko, P. Pornsuriyasak, C. De Meo, *J Chem Educ* **2006**, *83*(5), 782-784.
- [88] E. Gros, *Carbohydr Res* **1966**, *2*(1), 56-62.
- [89] I. n. F. Pelyvás, T. K. Lindhorst, H. Streicher, J. Thiem, Synthesis 1991, 1991(11), 1015-1018.
- [90] U. B. Maddali, A. K. Ray, N. Roy, *Carbohydr Res* **1990**, 208, 59-66.
- [91] T. Iversen, D. R. Bundle, *J Chem Soc, Chem Commun* **1981**(23), 1240-1241.
- [92] J. Kihlberg, T. Frejd, K. Jansson, G. Magnusson, *Carbohydr Res* **1986**, *152*(0), 113-130.
- [93] C.-T. Chen, Y. S. Munot, S. B. Salunke, Y.-C. Wang, R.-K. Lin, C.-C. Lin, C.-C. Chen, Y. H. Liu, Adv Funct Mater 2008, 18(4), 527-540.

- [94] M. H. Clausen, M. R. Jorgensen, J. Thorsen, R. Madsen, *J Chem Soc Perkin Trans 1*2001(5), 543-551.
- [95] E. Krainer, F. Naider, J. Becker, *Tetrahedron Lett* **1993**, *34*(11), 1713-1716.
- [96] N. O. L. Seto, M. M. Palcic, C. A. Compston, H. Li, D. R. Bundle, S. A. Narang, Journal of Biological Chemistry 1997, 272(22), 14133-14138.
- [97] H. Jamaluddin, P. Tumbale, T. A. Ferns, N. Thiyagarajan, K. Brew, K. R. Acharya, *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, *385*(4), 601-604.
- [98] J. K. Dale, C. S. Hudson, J Am Chem Soc 1930, 52(6), 2534-2537.
- [99] B. Iselin, T. Reichstein, *Helv Chim Acta* **1944**, *27*(1), 1146-1149.
- [100] G. Zemplén, Chem Ber 1927, 60, 923-930.
- [101] C. Girard, M.-L. Miramon, T. de Solminihac, J. Herscovici, *Carbohydr Res* **2002**, *337*(19), 1769-1774.

DANKSAGUNG

Danksagung

Ich möchte mich sehr gerne bei einer Reihe an Menschen bedanken:

Meinen Eltern für die Unterstützung in den vielen Studienjahren

Meinen Geschwistern dafür, dass sie immer für mich da sind

Dem ganzen AK Meyer für die sehr schönen letzten Jahre

meinem Labor 13a für den coolsten Ort, um zu promovieren

Bea für die gemeinsamen Jahre in der 13a (¡Nos volvamos a ver en la Baja California!), Hymnen, alle Spitzenideen und nicht klein zu kriegende Fröhlichkeit

Moritz für die gute Laune, Verlässlichkeit, Hilfsbereitschaft und für den Spaß außerhalb der Uni

Patrizia für den frischen Wind, Kathrin für den Spaß und einfach Kalthi sein, Miriam für die Hilfe mit allem NMR Nerdkram und Geduld am 700er, Nadja für jede Menge laute und gute Musik, Felix für die Modelhilfe und Ausgeglichenheit, Karsten für sehr viel gute Laune und eine Superreisebegleitung, Alex für die Adminhilfe und das Niveau am Freitag, Henning und seiner WG für das leckere Essen bei den Moleküldes-Monats-Abenden und allen, die für die gute Stimmung gesorgt haben

Den ehemaligen AK Mitgliedern Anna und Kolja für alle gefeierten und noch kommenden Feste und Der Dirk, der mich im Erdgeschoss eingesammelt und zu Thomas gelotst hat

Ilona für ihre liebenswürdige Art und Kerstin für den Sprung ins kalte Wasser

Herrn Sinnwell und Thomas Hackl sowie dem ganzen Serviceteam für die Messung aller NMR Spektren (es lebe udeft!) und Thomas für den Einsatz bei der enzymatischen Reaktionsverfolgung

Der Massenabteilung für die Unterstützung bei allen massentechnischen Problemen

Dem AK T. Peters an der Uni Lübeck für die netten Wochen, vor allem möchte ich mich bei Nora Sindhuwinata bedanken, ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen

DANKSAGUNG

Meinen Praktis Anne, Sascha, Björn, Jan-Hendrik, Dirk, Nguyen, Hasan, Marcel, sowie meinem Bachelor Nils und meinem Schwerpunktprakti Marco

Patrizia, Dirk, Felix und Moritz für das Korrekturlesen der Arbeit

Den Chemiemädels für die gemeinsame Zeit

Paulin für die Durchhaltekarten, die Urlaubsatmosphäre in der Schweiz und dass sich eigentlich nichts ändert

LEBENSLAUF

Lebenslauf

ZUR PERSON

Geburtsdatum 08.08. 1981

Geburtsort Hamburg

Nationalität Deutsch

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

06/08 – 10/11 Doktorarbeit in Organischer Chemie an der Universität Hamburg,

betreut durch Prof. Dr. Bernd Meyer

Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren der humanen Blutgruppe B spezifischen

 ${\it Galactosyltrans ferase}$

06/07 - 03/08 Diplomarbeit in Organischer Chemie an der Universität Hamburg, betreut durch Prof.

Dr. Bernd Meyer

Titel: Synthesen zur Darstellung von Donorsubstratanaloga der humanen

Galactosyltransferase B

05/07 mündliche Diplomprüfung

10/01 - 03/08 Chemiestudium an der Universität Hamburg

01/06 - 04/06 Auslandsaufenthalt an der Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

in Trondheim, Norwegen, betreut durch Prof. Anne Fiksdahl

Thema: Synthetic route to a β -carboline derivative derived from pyridine

02/04 Diplomvorprüfung

06/01 Abitur

AKADEMISCHE BERUFSERFAHRUNG

06/08 – 09/10 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg

06/08 - heute Assistent für Studierende des Hauptstudiums bzw. Masterstudiengangs im

Forschungspraktikum für Organische Chemie an der Universität Hamburg

06/09 - 09/09 Betreuung der Bachelorarbeit von N. Lindenmeyer

Titel: Synthese und Charakterisierung neuartiger Inhibitoren der humanen

Galactosyltransferase B

10/08 – 09/11 Assistent für Studenten des Grundstudiums bzw. des Bachelorstudeingangs Chemie

im Grundpraktikum für Organische Chemie

10/09 – 09/11 Assistent für Bachelor-und Masterstudenten der Strukturbiologie in NMR für

Struktubiologie

10/07 - 03/08 Assistent für Studenten des Grundstudiums in Medizin im Praktikum der Chemie

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

K. Schaefer, J. Albers, N. Sindhuwinata, T. Peters and B. Meyer, A new concept for glycosyltransferase inhibitors: Non-ionic mimics of the nucleotide donor of the human blood group B galactosyltransferase, *ChemBioChem* **2012**, 13(3), 443-450.

POSTERPRÄSENTATIONEN

Katrin Schaefer, Joachim Albers, Thomas Peters and Bernd Meyer ICS, 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan, 2010 Synthesis of an Inhibitory Donor Substrate Analogue of the Human Galactosyltransferase B

Katrin Schaefer, Nora Sindhuwinata, Thomas Peters and Bernd Meyer Eurocarb, 16th European Carbohydrate Symposium, Sorrento, Italy, 2011 Synthesis of an Inhibitor of the Human Blood Group B Galactosyltransferase

ERKLÄRUNG

Erklärung

Hiermit erkläre ich des Eides statt, das ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 24. 11. 2011

Katrin Schaefer