

Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren der humanen Galactosyltransferase B (GTB)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Patrizia Leccese

aus Hamburg

Hamburg 2016

Für meine Familie

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

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

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit Oktober 2011 bis Juli 2015 am Institut für Organische Chemie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Stark, durchgeführt.

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

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke danke ich für die Übernahme des Koreferats.

I. Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
abs.	absolutes
Bn	Benzyl
BF ₃ ·OEt ₂	Bortrifluoridetherat
Cs ₂ CO ₃	Cäsiumcarbonat
d	Dublett
dq	Dublett vom Quartett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
ges.	gesättigt
GT	Glycosyltransferase
GTA	α-1,3- <i>N</i> -Acetylgalactosaminyltransferase
GTB	α-1,3-Galactosyltransferase
<i>J</i>	Kopplungskonstante
m	Multiplett

M	molar, mol/L
MeCN	Acetonitril
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MeOH	Methanol
NaOMe	Natriummethanolat
m/z	Masse/Ladung
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PE	Petrolether
PG	<i>protecting group</i>
ppm	<i>parts per million</i>
rt	Raumtemperatur
R _f	<i>ratio of fronts</i>
RU	<i>Resonance Unit</i>
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
t	Triplett
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat
Tol	Toluol
Tr	Trityl
TrCl	Tritylchlorid
q	Quartett
3-D	dreidimensional

II Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Abstract.....	3
3	Einleitung	5
3.1	Glycosyltransferasen.....	6
3.1.1	Klassifizierung und Strukturen von Glycosyltransferasen	7
3.1.2	Katalysemechanismen	10
3.2	Einführung in das ABO Histo Blutgruppensystem	13
3.3	Die humane Galactosyltransferase B	16
3.4	Glycosyltransferaseinhibitoren	19
3.5	Strukturbasiertes Liganddesign: Die Entwicklung eines Inhibitors	24
4	Aufgabenstellung	25
5	Ergebnisse und Diskussion	26
5.1	Design und Synthese bisubstratähnlicher Inhibitoren der GTB.....	28
5.1.1	Weiterentwicklung der Leitstruktur mittels molecular modelling	30
5.1.2	Entwicklung der neuen Synthesestrategien.....	41
5.2	Design, Synthese und Analyse von Thiadiazolderivaten als nicht-substratbasierte Inhibitoren der GTB	60
5.2.1	Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	63
5.2.2	Kompetitive STD-NMR-Experimente der Thiadiazolderivate	75
5.2.3	Progresskurvenanalyse der Inhibition der Thiadiazolderivate gegenüber GTB83	
5.2.4	In silico Bewertung der Bindung der Thiadiazolderivate	98
6	Experimenteller Teil.....	117
6.1	Verwendete Geräte und Software	117
6.2	Verwendete Puffer	120
6.3	Verwendete Chemikalien	122
6.4	<i>Molecular Modelling</i> und <i>Docking</i> -Studien.....	124
6.4.1	Allgemeines Vorgehen bei Minimierungsrechnungen	124

6.4.2	Docking-Studien.....	125
6.5	Surface Plasmon Resonance (SPR) Experimente.....	128
6.6	Saturation Transfer Difference (STD) NMR Experimente	130
6.7	Progresskurvenanalyse	133
6.8	Synthesen	134
6.8.1	Darstellung der Saccharide	134
6.8.2	Darstellung der Thiadiazolderivate	149
6.8.3	Syntheseversuche.....	155
7	Toxikologische Daten	157
8	Literaturverzeichnis	162
9	Danksagung	167
10	Eidesstattliche Erklärung	168

1 Zusammenfassung

Glycokonjugate üben diverse, essentielle Funktionen bei unterschiedlichen biologischen Vorgängen aus. Sie sind unter anderem bei der Zellerkennung und in Signaltransduktionskaskaden involviert. Bei pathologischen Veränderungen, wie beispielsweise der Entstehung von Krebs, können veränderte Glycanstrukturen nachgewiesen werden. Ihre Analyse trägt dazu bei zelluläre und physiologische Prozesse zu verstehen und im Falle pathologischer Veränderungen in einem therapeutischen Sinne beeinflussen zu können.

Der Aufbau von Glycokonjugaten erfolgt durch eine spezielle Klasse von Enzymen: den Glycosyltransferasen (GT). Ein wichtiger Kontrollmechanismus zum besseren Verständnis der biologischen Vorgänge ist die spezifische Hemmung von Glycosyltransferasen.

Die Entwicklung und die Darstellung von selektiven und spezifischen Inhibitoren steckt heute noch in den Kinderschuhen, da zum einen die enzymatisch katalysierten Reaktionen äußerst komplex sind und die Glycosyltransferasen als Transmembranproteine schwer zugänglich sind. Aber auch der synthetische Zugang zu derartigen Strukturen ist sehr schwierig und kostenintensiv.

Im Rahmen dieser Arbeit diente die humane Galactosyltransferase B (GTB) als Modellsystem zur Entwicklung verschiedener Inhibitoren. Sie bietet sich als Modellsystem an, da die dreidimensionale Struktur durch die Lösung mehrerer Kristallstrukturen aufgeklärt werden konnte. Zudem lieferten mechanistische Studien erste Erkenntnisse über die Wirkungsweise des Enzyms.

GTB katalysiert den finalen Schritt zur Bildung des Blutgruppenantigens B. Dabei findet die Übertragung einer Galactoseeinheit vom Donorsubstrat UDP- α -D-Galactose (UDP-Gal) auf die O-3-Position der terminalen Galactose des Akzeptorsubstrates, dem H-Antigen statt.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil befasst sich mit der Entwicklung und dem strukturbasierten Design, sowie der synthetischen Darstellung von bisubstratbasierten Inhibitoren der GTB. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Synthese und Analyse von nicht-substratbasierten Inhibitoren der GTB.

In einer früheren Arbeit wurde das Disaccharidmimetikum **18** mittels *molecular modelling* entwickelt. **18** stellt einen potentiellen Inhibitor der GTB dar. Das Disaccharidmimetikum setzt sich aus zwei Motiven zusammen. Das Akzeptormotiv besteht aus einem L-Fucosebaustein, der über einen Pentyllinker mit einem Teil des Donormotivs verknüpft ist. Das Donormotiv besteht aus einem D-Galactosebaustein. Durch die Verbindung des Akzeptormotivs mit dem

Donormotiv verspricht dieser Ligand größtmögliche Spezifität sowie Selektivität, da in ihm die Strukturelemente des Akzeptorsubstrates und des Donorsubstrats miteinander vereint sind. Aufbauend auf diese Struktur wurden weitere Inhibitoren *in silico* entwickelt und mittels *molecular modelling* auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht.

Die *in silico* entwickelten Bisubstratanaloga dienten nachfolgend als Vorlage für zu synthetisierende Disaccharidmimetika. Das Disaccharidmimetikum **28** wurde ausgewählt und es wurde eine Synthesestrategie entworfen. Diese sah die Verwendung mehrerer Bausteine vor. Ausgehend von Ligand **28** konnte Ligand **39** entwickelt werden, der noch einen großen Teil des Akzeptors abdecken soll. Für **39** wurde ebenfalls eine Synthesestrategie entworfen und optimiert. **28** und **39** konnten nach Optimierung und Verifizierung erfolgreich dargestellt werden. Beide stellen potentielle Inhibitoren der GTB dar.

Der zweite Teil der Arbeit umfasst die synthetische Darstellung und Ermittlung der Bindungseigenschaften von nicht-substratbasierten Inhibitoren der GTB. Diese wurden von Felix Niemeyer (F. Niemeyer, unveröffentlichte Ergebnisse) durch *Docking*-Studien als erfolgversprechende Kandidaten zur Inhibierung der GTB ermittelt. Die ermittelten Strukturen leiten sich von dem bereits bekannten Inhibitor **16** einem Phenylpiperazinothiadiazol (Ligand 382) der GTB ab.

Vier dieser Kandidaten (**54**, **55**, **56**, **57**), die am Piperazin mit verschiedenen Resten amidiert sind wurden erfolgreich synthetisiert und anschließend auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht. Die Bindungseigenschaften von **54**, **55** und **56** gegenüber GTB wurden durch SPR-Bindungsstudien ermittelt. Ligand **54** zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Wechselwirkung mit GTB. Die kinetisch ermittelten Dissoziationskonstanten für die Verbindungen **55** und **56** liegen im niedrig mikromolaren Bereich. Das inhibitorische Potential von **55**, **56** und **57** gegenüber GTB konnte durch kompetitive STD-NMR-Experimente und Progresskurvenanalyse bestätigt werden. Die ermittelten K_I -Werte liegen im niedrig mikromolaren Bereich und bestätigen damit die kinetisch-bestimmten K_D -Werte der SPR-Bindungsstudien. Für Verbindung **57** konnte zusätzlich durch Progresskurvenanalyse ein K_I -Wert von 41.5 μM bestimmt werden. Damit zählt **57** zu den stärksten momentan bekannten Inhibitoren der GTB.

2 Abstract

Glycoconjugates play a key role in various biological processes e.g. cell recognition and signal transduction cascades. Furthermore, they are involved in pathological processes such as oncogenesis. Hence there is a great interest in their analysis to further understand their biological role. Especially because of their involvement in cellular and physiological processes it is important to include glycans as targets in therapeutic approaches.

The synthesis of glycoconjugates is carried out by a special class of enzymes: glycosyltransferases (GT). The specific inhibition of glycosyltransferases is an important control mechanism to understand biological processes. Considering the complexity of the enzymatic reactions it is still challenging to find suitable inhibitors. Furthermore the synthesis of inhibitors is very difficult and expensive.

In this work the human blood group B galactosyltransferase (GTB) served as a model system for the development of various inhibitors. GTB catalyzes the transfer of a galactose unit from UDP-galactose to the H-antigen forming the blood group B-antigen. The crystal structure of GTB revealed the bioactive conformation of the donor and the location of the acceptor substrate and further elucidates the mechanism of the binding event.

This thesis is divided into two parts. The first part describes the structure based approach of the design and synthesis of new bisubstrate inhibitors for GTB. The second part deals with the synthesis and the binding analysis of non-substrate based inhibitors of GTB. This is a class of alternative inhibitor chemotypes that are not structurally derived from GT donors or acceptors. The identified structures are derivatives from the known inhibitor **16** (compound 382) a piperazinyl phenyl thiadiazole.

In earlier work ligand **18** was designed *in silico*. This molecule was used as a lead structure for disaccharide mimics. The selected disaccharide mimics combine both requirements of bisubstrate analogues: selectivity and specificity. The selected molecules have a covalent linkage between the donor motive and the acceptor motive. The disaccharide mimic **28** was selected and a synthetic strategy consisting of two building blocks was developed. Another ligand **39** that should cover the acceptor site better was designed based on the structure of the ligand **28**. Also for **39** a synthetic strategy was developed and optimized. After optimization and verification **28** and **39** were successfully synthesized. Both are potential inhibitors of GTB.

The second part of this work focuses on the synthesis and analysis of binding affinity of non-substrate based inhibitors of GTB. They were found by Felix Niemeyer (Niemeyer, F. unpublished work) by docking studies. The non-substrate based inhibitors that are modified by

amidation of the piperazinyl group are derivatives of a known inhibitor **16** of GTB. Four candidates were selected.

The compounds **54**, **55**, **56** and **57** were synthesized and subsequently analyzed with a focus on the inhibitory potential of GTB. The binding affinity of **54**, **55**, **56** was determined by surface plasmon resonance experiments (SPR).

Ligand **54** exhibits no competitive behavior in the analyzed concentration range. The kinetically determined dissociation constants of **55** and **56** were consistently in the low micromolar range.

The inhibitory potential of **55**, **56** and **57** was determined by competitive saturation transfer difference (STD) NMR experiments and progress curve analysis. The resulting K_i values are in low micromolar range. The results confirm the kinetically determined K_D values of the SPR experiments. In addition for ligand **57** a K_i value of 41.5 μM was determined by progress curve analysis. Thus, **57** is currently the strongest known inhibitor of GTB without changes.

3 Einleitung

Kohlenhydrate stehen nicht nur als Energiespeicher (Glucose, Glycogen, Stärke) und Strukturmaterialien (Cellulose, Chitin) zur Verfügung. Sie zählen zu einer der biologisch bedeutsamsten Naturstoffklassen und zeichnen sich durch eine außerordentliche strukturelle Diversität in Form von unterschiedlichen Monosacchariden, Oligo- und Polysacchariden sowie von Verbindungen mit anderen wichtigen Biomolekülen wie beispielsweise Proteinen und Lipiden aus. Derartige Verbindungen werden unter dem Synonym der Glykokonjugate zusammengefasst.^[2, 3]

So sind pro- und eukaryontische Zellen in unterschiedlicher Weise von Kohlenhydratstrukturen umgeben. Diese befinden sich bei Bakterien an einer der Zellmembran angrenzenden extrazellulären Schicht. Die Kohlenhydrate liegen im Regelfall als Glykokonjugate vor. Diese sind bei tierischen Zellen die Lipiddoppelschicht, welche die Zellmembran aufbaut, eingebettet.

Die Gesamtheit aller Zuckermoleküle, die an Oberflächenproteine und -lipide der äußeren Seite der Zellmembran gekoppelt sind, wird z.T. unter dem Begriff Glycocalyx zusammengefasst.

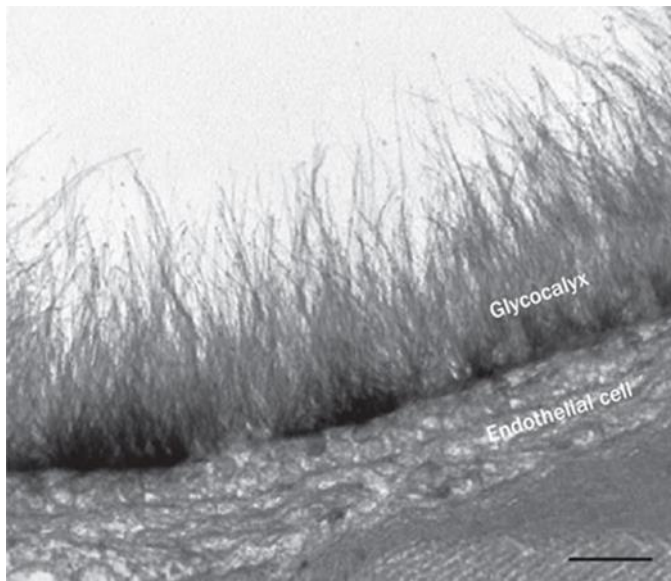


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalyx einer Endothelzelle einer Koronararterie.^[1]

Der Aufbau der Glycocalyx ist zellspezifisch und zeichnet dadurch Zellen nach Entwicklungsstadium, Typ und Status aus. Unter anderem verleiht die Glycocalyx den Zellen Antigen- und Blutgruppeneigenschaften und ist somit für Immunreaktionen sehr wichtig (z.B. bei der Transplantatabstoßung).

Ein großer Beitrag liegt in ihrer Beteiligung an vielen Vorgängen der Zellkommunikation. So sind saccharidbindende Proteine (Lektine) darauf spezialisiert, Teile der Zelloberflächensaccharide der

Glycocalyx als Liganden zu erkennen und zu binden.^[4]

Solche Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sind für zelluläre Prozesse von zentraler Bedeutung. Ihre Analyse liefert die Voraussetzungen um zelluläre und physiologische Prozesse verstehen und, im Falle pathologischer Veränderungen, in einem therapeutischen Sinne beeinflussen zu können.

In eukariotischen Zellen werden Oligosaccharide durch ein Wechselspiel von Glycosylhydrolasen (GHs) und Glycosyltransferasen (GTs) dargestellt. Die Erforschung dieser Enzyme kann demnach zum Verständnis des biologischen Potentials von Kohlenhydraten beitragen.

3.1 Glycosyltransferasen

Trotz der Schlüsselrolle der GTs in der Biosynthese von komplexen Oligosacchariden, Glycoproteinen, Glycolipiden und weiteren Glycoconjugaten, war lange Zeit nur sehr wenig Information über die mechanistischen Details der GTs verfügbar. Erst mit Einsatz der rekombinanten DNA-Technologien konnten die Probleme der geringen Verfügbarkeit und Stabilität weitestgehend bewältigt werden. Dadurch konnte sich die Forschung an GTs enorm weiterentwickeln.^[5]

Im Gegensatz zu den sehr detailliert charakterisierten Proteasen und Proteinkinasen sind die Glycosyltransferasen (GTs) immer noch unzureichend beschrieben. Die Mehrheit der GTs sind Typ II Transmembranproteine, die im Golgi lokalisiert sind.^[6, 7] GTs (E.C. 2.4.x.y.) katalysieren den Transfer einer Saccharideinheit eines aktivierten Donorglycosids auf spezifische Akzeptormoleküle. Die Substratspezifität der GTs ist dabei der Schlüssel zur strukturellen Diversität der Glycoside.^[5]

Da Glycosyltransferasen bei zahlreichen Biosynthesen beteiligt sind, ergibt sich ein sehr breites Spektrum verschiedener Akzeptormoleküle. Diese beinhalten unterschiedliche Arten von Biomolekülen z.B. Oligosaccharide, Proteine, Nucleinsäuren, Lipide sowie auch unzählige Naturstoffe. Jedoch werden überwiegend mit etwa 90 % Nucleotidzucker als aktivierte Zucker verwendet, man findet aber auch Dolicholphosphatmonosaccharide und unsubstituierte Phosphatzucker.^[8, 9] Die Übertragung der Kohlenhydrat-Einheit von einem aktivierten Donorzucker auf ein Akzeptorsubstrat erfolgt dabei regiospezifisch. Durch den sukzessiven Einsatz mehrerer GTs kann so eine Vielzahl unterschiedlicher Glycanstrukturen bzw. Glycokonjugate entstehen.

In der Regel handelt es sich bei der Akzeptorfunktion um die Hydroxyfunktion eines Oligo- oder Monosaccharids. Ebenso können aber auch Lipide, Glycokonjugate, Proteine, Nucleinsäuren, Antibiotika und weitere kleine Moleküle als Akzeptormoleküle fungieren.

Bei Proteinen werden die *N*-Glycosylierung und *O*-Glycosylierung voneinander differenziert. Bei der *N*-Glycosylierung erfolgt die Bindung von Glycanen an die Amidgruppe von Asparaginresten, während bei der *O*-Glycosylierung die Bindung an Hydroxylgruppen von Serin- und Threoninresten erfolgt.

Enzymabhängig erfolgt die Übertragung der Kohlenhydrateinheit auf das Akzeptormolekül unter Inversion oder Retention am anomeren Zentrum. Somit ist die Synthese von α - und β -Glycosiden aus einem identischen Donorsubstrat möglich (Abbildung 2).

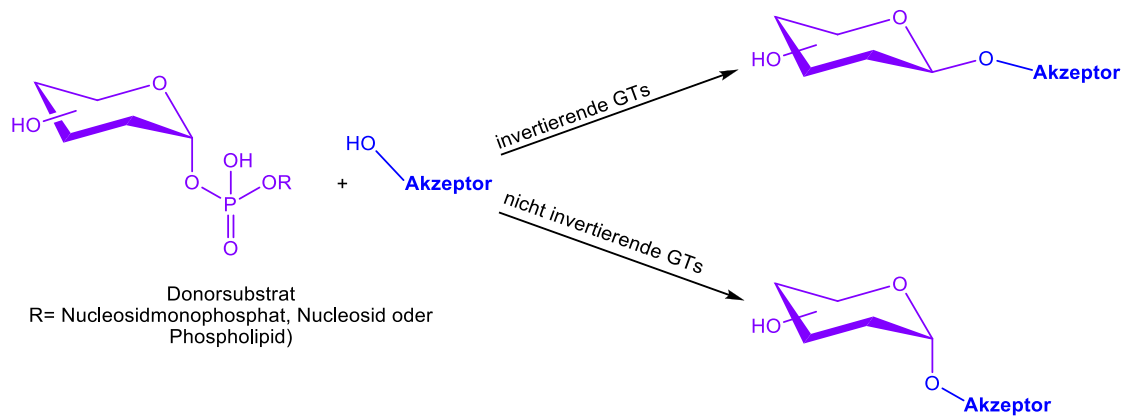


Abbildung 2: Allgemeine schematische Darstellung der GT-katalysierten Reaktion. Ein aktivierter Zucker wird spezifisch auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Dabei kommt es zur Freisetzung eines Nucleosidmonophosphates (NMP) oder Nucleosiddiphosphates (NDP) als Nebenprodukt.

Während der Mechanismus von invertierenden Glycosyltransferasen bekannt ist, ist der Katalysemechanismus von nicht invertierenden GTs in vielen Fragen noch ungeklärt.

3.1.1 Klassifizierung und Strukturen von Glycosyltransferasen

Die Enzyme GTA und GTB sind für die Differenzierung der Antigene verantwortlich. Obwohl das AB0- Blutgruppensystem schon 1901 entdeckt wurde, konnte erst 1990 die Nucleotidsequenz der AB0-Gene bestimmt werden. Basierend auf diesen Sequenzen wurden die humanen Glycosyltransferasen GTA und GTB als Typ-II-Transmembranproteine bestätigt. Beide Enzyme gehören zur Superfamilie mit GT-A-Faltung und werden in die GT6-Familie eingeordnet. GTA und GTB enthalten jeweils 354 Aminosäuren und sind zu 99 % homolog zueinander. Ihr Molgewicht beträgt 41 kDa.^[10]

Unter allen bekannten Glycosyltransferasen konnte keine annähernd so hohe Homologie wie zwischen GTA und GTB festgestellt werden. Die Gene der zwei Enzyme unterscheiden sich durch sieben Punktmutationen. Dies bewirkt, dass sich beide Enzyme in vier Aminosäuren (R176G, G235S, L266M, und G268A) unterscheiden. Die vier Aminosäuren sind im katalytischen Zentrum lokalisiert.^[10]

Kristallstrukturanalysen beweisen, dass die Aminosäurereste 266 und 268 verantwortlich sind für die Donorspezifität, während die Aminosäurereste 235 und 266 eine Rolle bei der Akzeptorerkennung und dem Umsatz spielen.^[10, 11]

Sowohl GTA als auch GTB sind membranständig und im Golgi lokalisiert. Sie sind aber auch in löslicher Form in Körperflüssigkeiten nachweisbar und enzymatisch aktiv.^[5] Seit Mitte der 1990er stehen rekombinante Gene zur Verfügung, deren Produkte nur noch die lösliche Domäne besitzen. Diese setzt sich aus der katalytischen Domäne und Teilen der Stammregion zusammen. Diese Enzyme besitzen ein Molgewicht von ca. 35 kDa. In *E.coli* können sie in größeren Mengen synthetisiert werden (~95 mg/L Kultur), sie sind in ihrem Verhalten bezüglich Kinetik und Substratspezifität vergleichbar mit den aus humanen Seren isolierten löslichen Formen von GTA und GTB.^[12-14]

Üblicherweise wurden Glycosyltransferasen anhand ihrer Donor-, Akzeptor- und Produktspezifität klassifiziert (EC-Klassifikation), wobei jedoch eine Verwandtschaft von Sequenz oder Struktur unberücksichtigt bleibt. Um diese Limitierung zu umgehen erfolgte alternativ eine Klassifizierung auf Grundlage der Aminosäuresequenz der Glycosyltransferasen. Diese sind in der CAZY Datenbank (www.cazy.org)^[15] als Familien gelistet. Bis heute sind 97 Glycosyltransferase-Familien (Stand September 2015) bekannt. Sie machen ca. 1-2 % des jeweiligen Genoms aus; dies unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit dieser Enzymfamilie.

Trotz der weitreichenden Diversität der Gensequenzen, sind bisher nur drei Faltungstypen für GTs bekannt. Diese heißen GT-A, GT-B und GT-C.

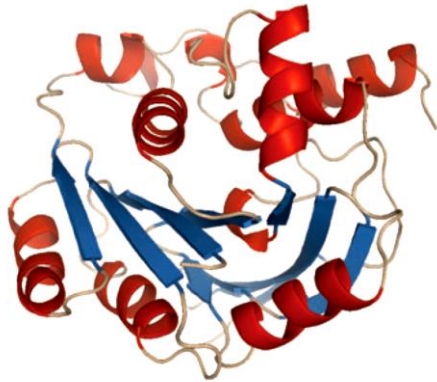
Der GT-C Faltungstyp wurde anhand von Sequenzanalysen vorhergesagt. Es konnten mittlerweile Strukturen aufgeklärt werden, die diesem Faltungstyp entsprechen. GTs vom GT-C Typ sind in der ER- oder Plasma-Membran lokalisiert.^[16, 17] Sie besitzen mehrere Transmembranhelices und übertragen vorwiegend Lipidphosphatzucker als Donorsubstrate.^[9]

Die GT-B Faltung wird durch zwei separate $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-ähnliche Domänen, welche locker durch eine Linker-Region miteinander assoziiert sind, charakterisiert. Das katalytische Zentrum ist in der Mitte der beiden Domänen lokalisiert. Das übliche Rossmann-Motiv beinhaltet sechs β -Faltblätter verbunden durch α -Helices, wobei die β -Faltblätter dabei ein gedrehtes paralleles Faltblatt bilden. Rossmann-Falten stellen typischerweise Nukleotidbindungsstellen dar. GTs die der GT-B Faltung entsprechen sind metallionen-unabhängig.^[18, 19]

Die GT-A Faltung weist zwei im Gegensatz zur GT-B sehr eng beieinanderliegende $\beta/\alpha/\beta$ -rossmannähnliche Domänen auf. Durch diese kompakte Anordnung ergibt sich nur eine Domäne, die Bindungsstellen für Akzeptor- und Donorsubstrat sind jedoch deutlich

voneinander separiert. Viele der GT-A-Enzyme besitzen ein DXD-Motiv (Asp-X-Asp), welches ein zweiwertiges Kation, meist Mn^{2+} , bindet. Das Metall-Ion ist essentiell für die Katalyse, da es die Bindung der aktivierten Phosphatgruppe des Donorzuckers, unterstützt. Das DXD-Motiv ist jedoch nicht konserviert, es gibt GTs, die der GT-A Faltung folgen aber kein DXD-Motiv beinhalten.^[19]

A



B

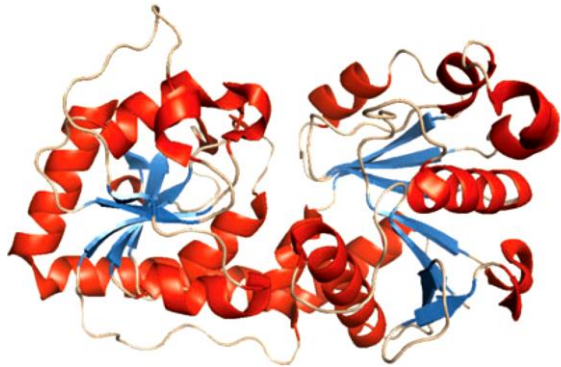


Abbildung 3: Proteinfaltungen der Glycosyltransferasen **(A)** Die GT-A Faltung dargestellt durch das invertierende Enzym *SpsA* aus *Bacillus subtilis*, protein Data Bank (pdb) 1 QGQ **(B)** die GT-B Faltung dargestellt durch die T4-Glucosyltransferase Bacteriophage, pdb 1JG7.^[9]

Fast alle golgiständigen GTs sind identisch in ihrem Aufbau.^[5] Sie gehören zu den Typ-II-Transmembranproteinen. Ihr Aufbau erfolgt aus einem N-terminalen cytoplasmatischen Schwanz, gefolgt von einer Transmembranregion, einer Stammregion und einer großen C-terminalen katalytischen Domäne. Die katalytische Stammregion ragt dabei in das Golgilumen hinein. Die löslichen Formen der GTs entstehen durch protolytische Spaltung im Bereich der Stammregion aus dem membranständigen Teil.

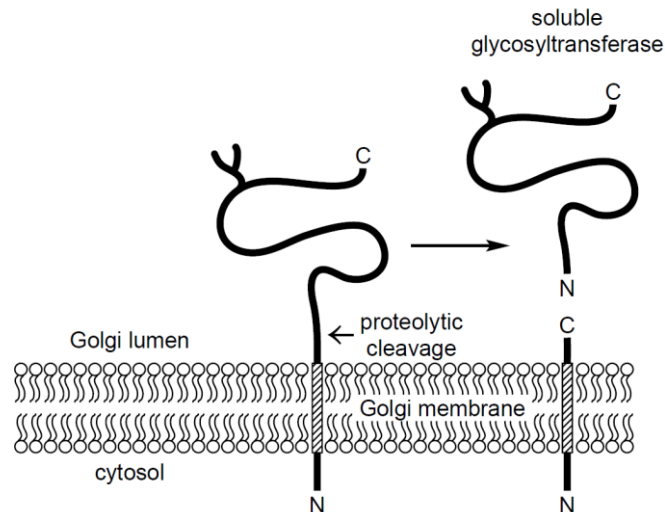


Abbildung 4: Die schematische Darstellung zeigt, wie durch proteolytische Spaltung die löslichen Formen der GTs entstehen.^[10]

3.1.2 Katalysemechanismen

Die Übertragung des Donorsaccharids erfolgt in von GTs katalysierten Reaktionen unter Erhalt oder Inversion der Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des zu übertragenden Zuckers. Dadurch ist eine Klassifizierung der Glycosyltransferasen aus mechanistischer Sicht in nicht-invertierende und invertierende Glycosyltransferasen möglich. Diese Einteilung ist unabhängig vom Faltungstyp der GTs.

Der Mechanismus der invertierenden Glycosyltransferasen folgt wahrscheinlich dem S_N2 -Mechanismus, d.h. einer nucleophilen Substitutionsreaktion. Dabei fungiert eine aktive Seitenkette des Proteins als Base. Sie katalysiert die Abstraktion des Protons des Akzeptorsubstrats. Dieses greift dann nucleophil das anomere Kohlenstoffatom des Donorsubstrats an. Unter Abspaltung der aktivierten Phosphatgruppe entsteht die glycosidische Bindung.^[19]

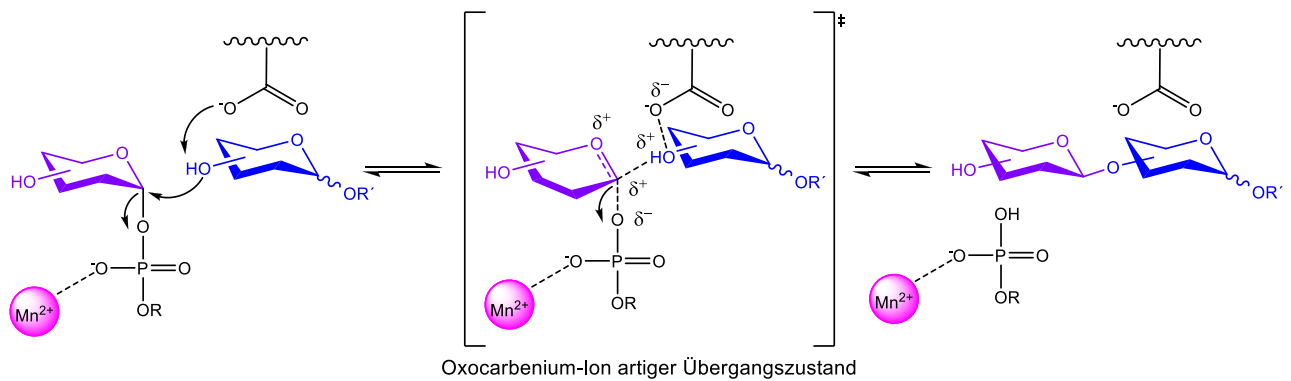


Abbildung 5: Invertierende Glycosyltransferasen nutzen einen direkten S_N2 -artigen Mechanismus, wodurch Inversion am anomeren Kohlenstoff auftritt. R = Nucleosid oder Nucleosid-Monophosphat, $R'OH$ = eine Akzeptor-Gruppe z.B. ein weiteres Saccharid.

Hingegen ist der Katalysemechanismus nicht-invertierender GTs noch nicht eindeutig aufgeklärt. Zur Diskussion stehen zwei Mechanismen, einmal ein S_{Ni} -Mechanismus und ein doppelter S_{N2} - Mechanismus.^[19, 20]

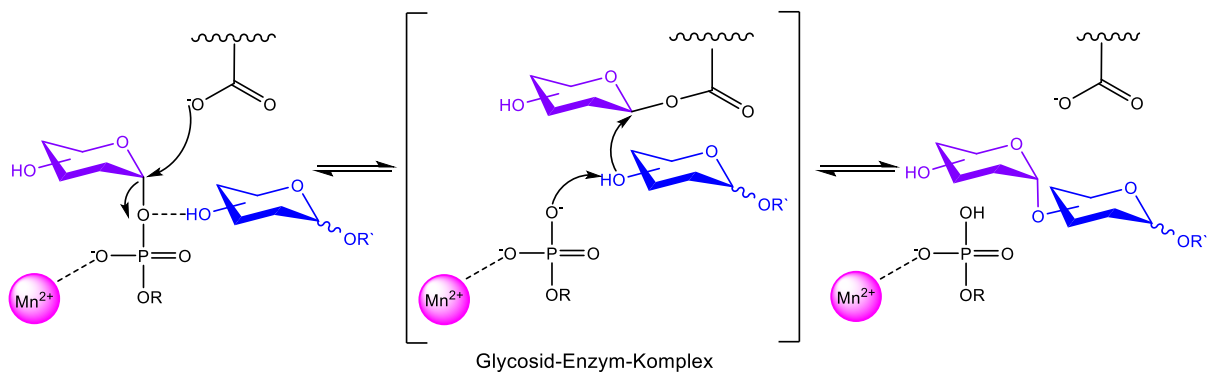


Abbildung 6: Angenommener doppelter S_{N2} -Mechanismus der nicht-invertierenden Glycosyltransferasen. Dabei wird die Bildung eines kovalent gebundenen Glycosid-Enzym-Komplex-Intermediats vermutet, R = Nucleosid oder Nucleosid-Monophosphat $R'OH$ = ein Akzeptor-Gruppe z.B. ein weiteres Saccharid.

Bei der doppelten Substitution greift im ersten Schritt eine nucleophile Seitenkette des aktiven Zentrums des Enzyms unter Austritt der Phosphatgruppe das Donorsubstrat an. Unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum wird intermediär ein Glycosid-Enzym-Komplex gebildet. Die Phosphatgruppe deprotoniert anschließend das Akzeptorsubstrat, wodurch dieses unter erneuter Inversion der Konfiguration und Zerfall des Glycosid-Enzym-Komplexes an das Donorsubstrat bindet.

Der alternativ diskutierte S_{Ni} -Mechanismus geht von der Bildung eines Oxocarbeniumions bzw. von der Bildung eines oxocarbenium-ähnlichen Übergangszustandes aus.

Einleitung

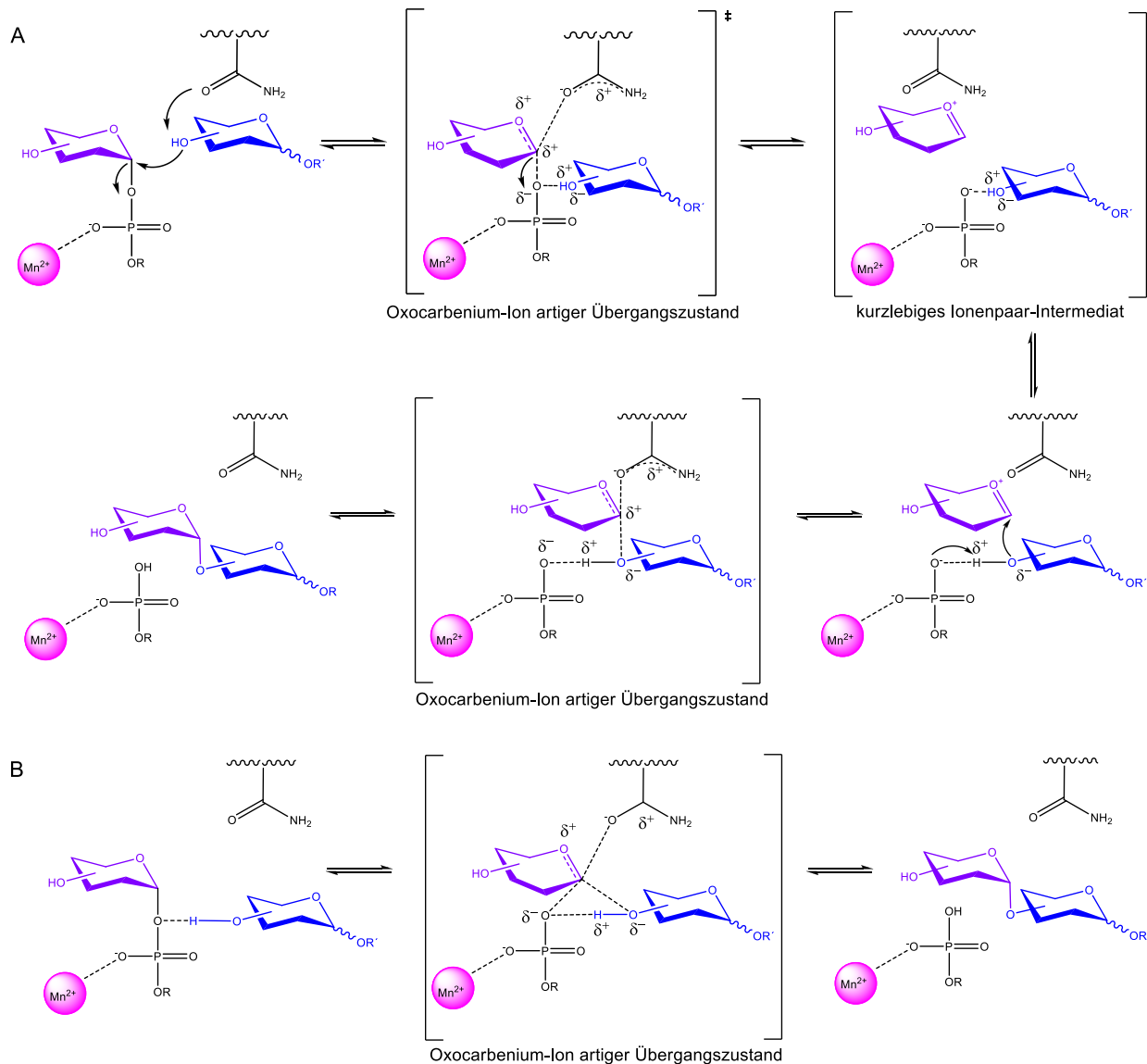


Abbildung 7: (A), (B) Schematische Darstellung der zwei vorgeschlagenen S_NI -Mechanismen. Die Reaktion könnte entweder schrittweise **(A)** über ein kurzlebiges Ionenpaar oder **(B)** konzertiert ablaufen. R = Nucleosid oder Nucleosid-Monophosphat, R'OH = eine Akzeptor-Gruppe z.B. ein weiteres Saccharid.

Durch Erkenntnisse aus Untersuchungen mit Glycosylhydrolasen wird eher von einer doppelten Substitutionsreaktion ausgegangen, dies konnten jedoch bis heute nicht eindeutig belegt werden.^[21]

3.2 Einführung in das AB0 Histo Blutgruppensystem

Das menschliche Blut kann in verschiedene Gruppen, die Blutgruppen eingeteilt werden. Diese werden durch ein genetisch festgelegtes Sortiment von Antigenen, welche sich aus Glycoproteinen und Glycolipiden zusammensetzen, unterschieden. Diese werden an der Membran der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und auf vielen weiteren Zellen verschiedener Epithelien exprimiert. Darüber hinaus sind einige Gewebetypen in der Lage, die Blutgruppenderminanten zu sezernieren, sodass sie auch in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können.^[4]

Das AB0-Histo-Blutgruppensystem gehört zu den wichtigsten Blutgruppensystemen der Transfusionsmedizin. In diesem System werden die Blutgruppen in vier Hauptklassen unterteilt: A, B, AB und 0 (null). Es basiert auf den Glycolipid-Antigenen A und B. Sie wurden erstmals 1900 von K. Landsteiner beschrieben.^[22]

Personen mit Blutgruppe A besitzen nur das Antigen A. Bei Blutgruppe B ist nur das Antigen B präsent. Bei Individuen mit Blutgruppe AB sind Antigen A und Antigen B vorhanden. Und Personen mit Blutgruppe 0 besitzen keine der Antigene.

Zusätzlich sind im Blutplasma noch Antikörper, die Agglutinine enthalten. Diese sind gegen die fehlenden Blutgruppenantigene gerichtet. Personen mit Blutgruppe A besitzen anti B-Antikörper. Personen mit Blutgruppe B anti-A-Antikörper. Im Falle von Blutgruppe AB sind beide Antigene auf den Erythrozyten vorhanden und keine Antikörper im Serum enthalten. Keine Antigene, aber A-Antikörper und B-Antikörper, sind bei der Blutgruppe 0 präsent.

Bei den Glycolipid-Antigenen A und B handelt es sich um Oligosaccharide, die sich nur durch eine Monosaccharid-Einheit unterscheiden. Die Oligosaccharide sind über ein Trägermolekül in der Zellmembran verankert, liegen aber auch zum Teil in löslicher Form vor.^[23]

Die Grundstruktur der Histo-Blutgruppenantigene bildet das H-Antigen.

Personen mit Blutgruppe 0 bilden nur das H-Antigen. Es besteht aus dem terminalen Disaccharid α -L-Fucp-(1,2)- β -D-Galp. Dieses ist mit Glycolipiden oder Glycoproteinen

verknüpft. Es werden fünf grundlegende H-Antigenstrukturen unterschieden (Abbildung 8).^[24]

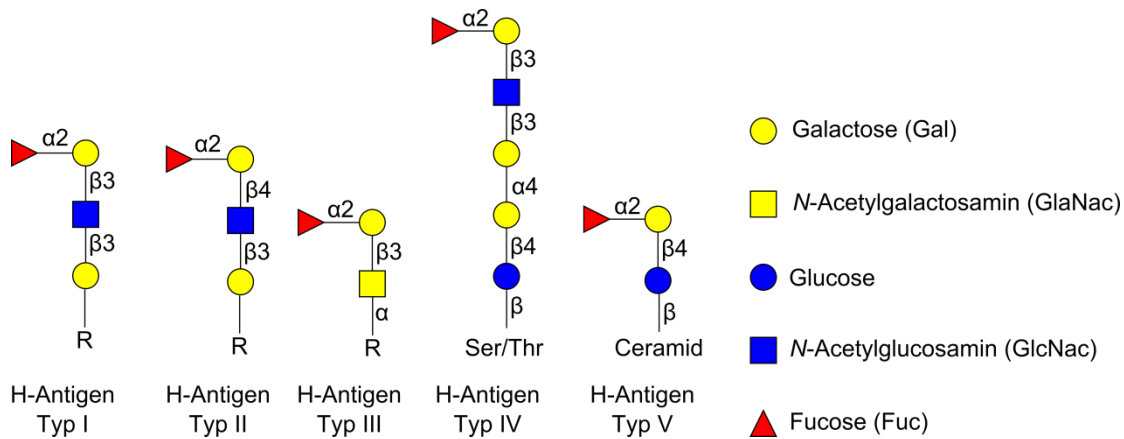


Abbildung 8: H-Antigene vom Typ I - V. R steht für ein N- oder O-Glycan oder ein Glycolipid.^[4, 24]

Durch Identifizierung von Oligosacchariden als Determinanten des ABO-Systems erfolgte die Grundlage zur Charakterisierung der an der Biosynthese beteiligten GTs.^[25, 26] Die blutgruppenbildenden Glycosyltransferasen A und B (GTA bzw. GTB für die humanen GTs) sind für die Synthese der A- und B-Antigene verantwortlich.^[27, 28] Bei der Bildung des A-Antigens (3) wird ein N-Acetylgalactosamin-Monosaccharid vom Donorsubstrat UDP-GalNAc (2) auf das H-Antigen (1) durch die α -1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) übertragen.

Die Veränderung des H-Antigens erfolgt bei der Antigen B-Bildung durch die α -1,3-Galactosyltransferase B (GTB). Diese überträgt eine Galactose vom aktivierten Donorsubstrat UDP-Gal (4) auf das H-Antigen. (Abbildung 9).^[29]

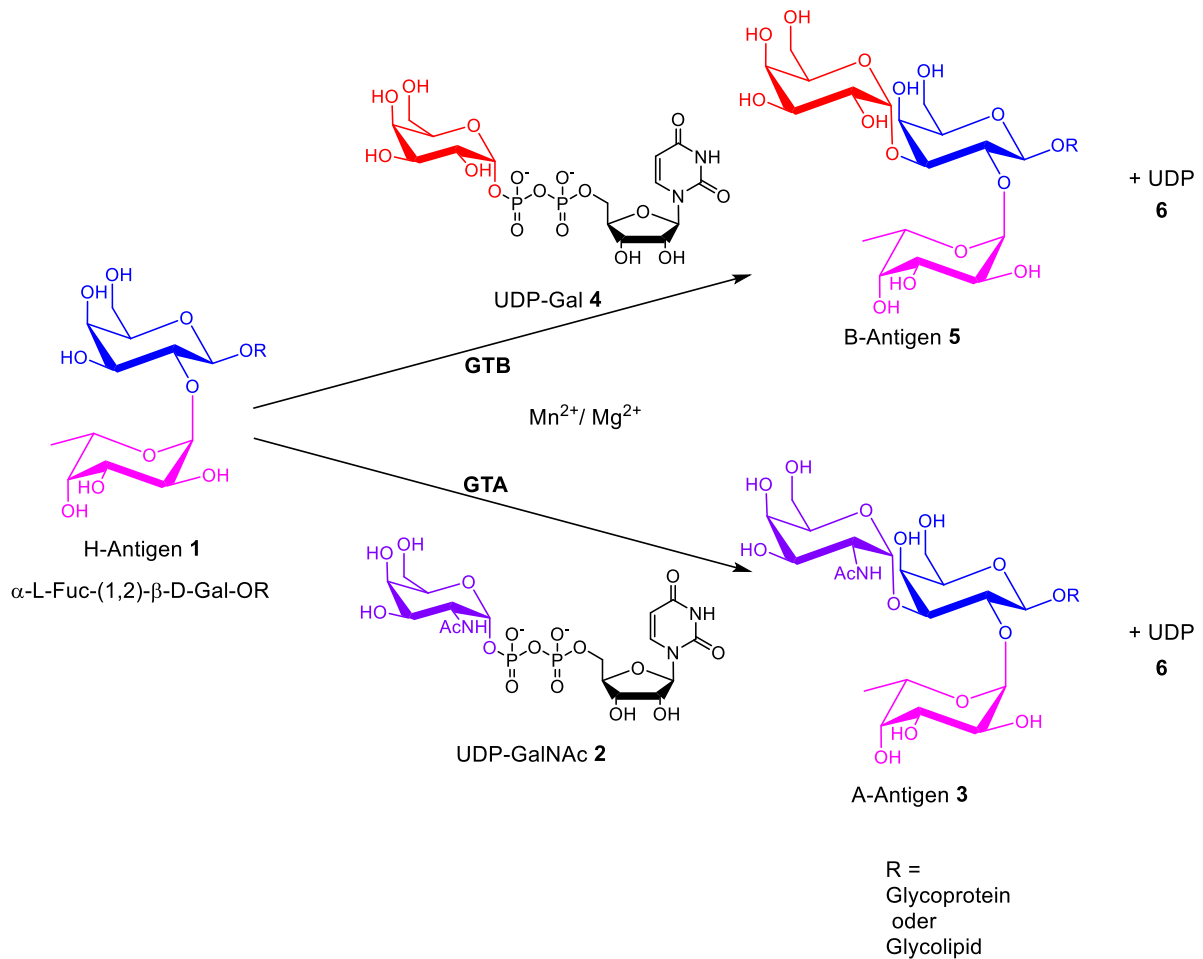


Abbildung 9: Bildung der Blutgruppen A- und B-Antigene durch GTA bzw. GTB. Die Anwesenheit eines bivalenten Kations, Mn²⁺ oder Mg²⁺, ist für die Katalysereaktion essentiell.

GTA und GTB unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren ihrer Sequenz und gehören damit bis heute zu den Glycosyltransferase-Paaren, die die höchste Homologie aufweisen.^[11]

Veränderte Expressionslevel der Antigene sind beim Menschen in den verschiedenen Entwicklungsstadien normal. Neugeborene besitzen ca. 20-25 % weniger A/B-Antigene auf den Oberflächen ihrer Erythrozyten als Erwachsene.^[30]

Ebenso scheint die Expression der Antigene in pathologischen Prozessen, vorrangig in der Carcinogenese, einen entscheidenden Einfluss zu haben. Der Verlust der Expression der AB0(H) Antigene ist dabei am häufigsten zu beobachten und wurde erstmalig 1957 in Zusammenhang mit Leukämie beschrieben.^[31] Dieses wurde später mit der Verringerung der Enzymtätigkeit erklärt. Im Gegensatz dazu wurde bei Dickdarmkrebs eine gesteigerte Expression von A/B-Antigenen beobachtet. Im fortschreitenden Entwicklungsverlauf verringert sich diese Expression im Darm normalerweise.^[32-35]

3.3 Die humane Galactosyltransferase B

Die humane α -(1,3)-Galactosyltransferase B (GTB) gehört zur Gruppe der nicht-invertierenden Galactosyltransferasen. Sie katalysiert die Bildung des Blutgruppen B-Antigens, wobei die katalysierte Reaktion von einem bivalenten Kation abhängig ist. Bei der Katalyse erfolgt die Übertragung von α -Galactose vom aktivierten Donorsubstrat UDP-Gal auf das terminale Disaccharid α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-OR des H-Antigens. Dabei wird eine neue α -(1,3)-glycosidische Bindung zwischen dem H-Antigen und der Galactose gebildet. Im Jahr 2002^[36] gelang die Strukturaufklärung der humanen GTB mittels Röntgenkristallographie. Mittels massenspektrometrischer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass GTB in wässriger neutraler Lösung als Homodimer vorliegt. Monomere können erst bei einem pH Wert < 3.7 detektiert werden.

Die GTB-Struktur weist eine GT-A Faltung auf.^[10, 11] Die katalytische Domäne besteht aus zwei Hälften, in deren Mitte das aktive Zentrum lokalisiert ist. Im katalytischen Zentrum sind die vier Aminosäuren, durch die sich die GTA und GTB unterscheiden, lokalisiert. Die Domänen sind durch eine flexible Schleife verbunden, die in der Röntgenkristallstruktur von 2002, ebenso wie die letzten zehn Aminosäurereste des C-Terminus nicht vollständig aufgelöst ist. Beide Domänen sind für die Substraterkennung der GTB verantwortlich. Dabei erfolgt an der C-terminalen Hälfte die Akzeptorsubstraterkennung. An der N-terminalen Hälfte findet hingegen die Donorsubstratbindung statt. Das konservierte DXD-Motiv (²¹¹DVD²¹³), welches die Bindung des bivalenten Kations koordiniert, befindet sich im aktiven Zentrum, dieses kann durch eine flexible *loop* geschlossen und geöffnet werden.

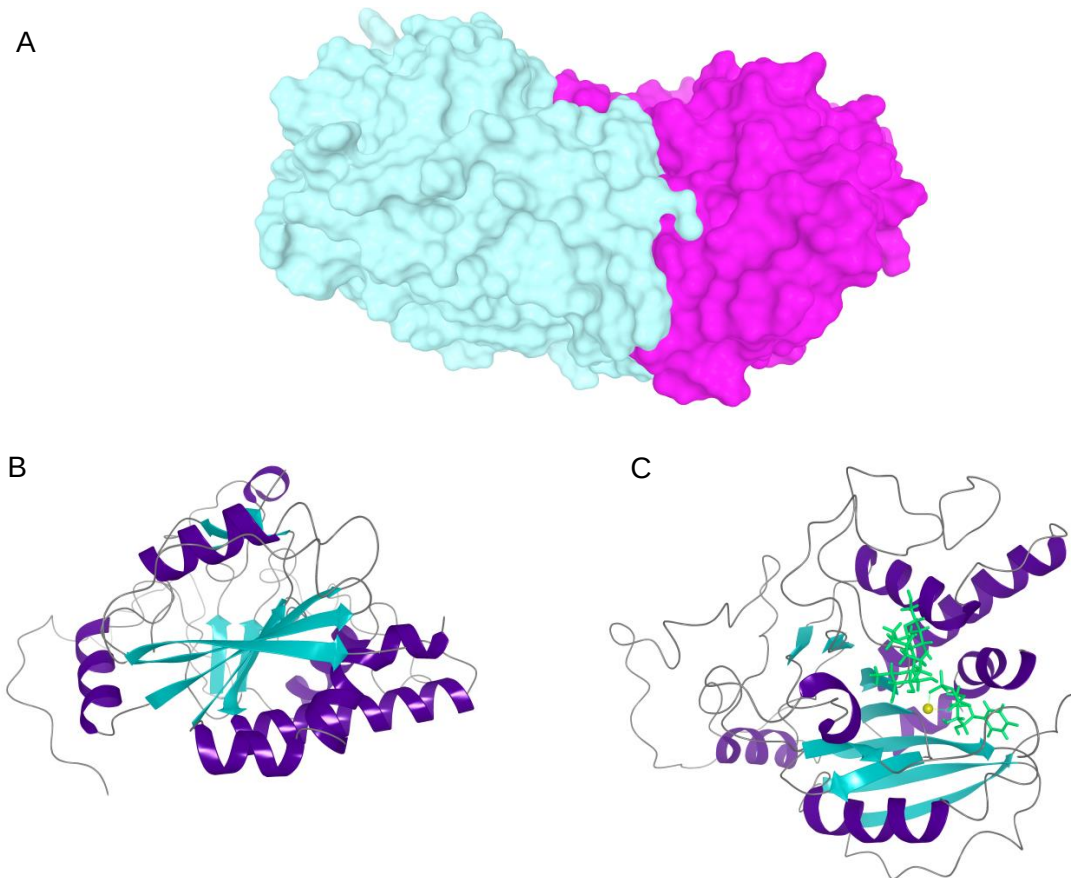


Abbildung 10: Verschiedene Kristallstrukturen der GTB. Dargestellt sind jeweils die löslichen Domänen. Die Liganden UDP und H-Dis-octyl sind grün und Mn^{2+} in gelb dargestellt. **(A)** GTB-Dimer (PDB ID: 3U0X), **(B)** GTB-Monomer ohne Liganden (PDB ID: 2RIT) und **(C)** GTB-Monomer mit UDP und H-Dis-octyl (PDB ID: 2RJ8).

2008 veröffentlichten Alfaro *et al.*^[37] Kristallstrukturen von GTB und den GTB/GTA-Mutanten ABBB und AABB. Neben den C-terminalen Resten konnte auch der interne *loop*, der von Aminosäure 176 bis 195 reicht, aufgelöst werden. Es zeigte sich, dass die Enzyme eine Konformationsänderung während der Substratbindung durchlaufen. Dabei wurden drei konformationelle Änderungen detektiert: ein geschlossener, ein halboffener und ein offener Zustand.

Die offene Konformation liegt vor, wenn kein Ligand oder nur das Akzeptorsubstrat H-Dis-Octyl gebunden ist. Zwei α -Helices bilden die interne *loop*, diese und die flexible C-terminale *loop* lagen ungeordnet vor und sind daher nicht in der Struktur aufgelöst.

Bei Bindung von UDP kommt es zu einer konformationellen Umordnung. Die zwei α -Helices verbinden sich zu einer, dadurch bewegt sich die interne *loop* und bildet so Wechselwirkungen zum UDP aus. Dieser Zustand wird als halbgeschlossen definiert. Der geschlossene Zustand

wird bei Bindung von H-Dis-Octyl und UDP erreicht. Dabei liegen die interne und die C-terminale *loop* über dem aktiven Zentrum in einem geordneten Zustand vor. Die C-terminale *loop* bildet dabei Wechselwirkungen zur internen *loop*, Akzeptor- und dem Donorsubstrat aus. Dabei ist es wahrscheinlich, dass nur aus dieser Konformation eine effiziente Katalyse möglich ist.

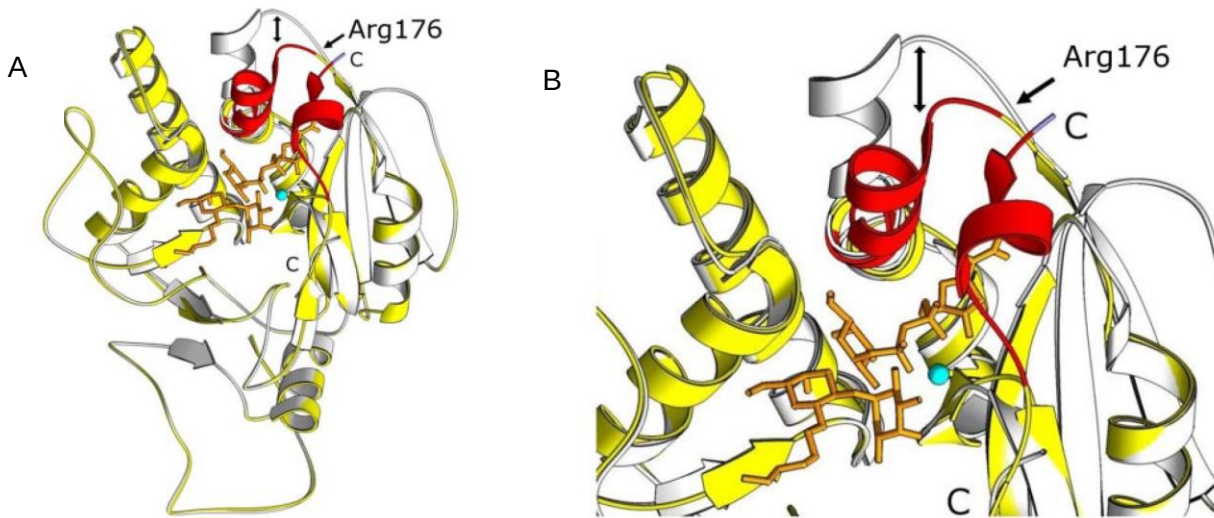


Abbildung 11: Schematische Darstellung der konformationellen Änderung welche durch die Substratbindung hervorgerufen wird. **(A)** Überlagerung der Strukturen der ungebundenen Mutante AB3B in der offenen Konformation (weiss) mit AB3B, UDP-Gal und dem H-Dis-Octyl in der geschlossenen Konformation (gelb, rot). Die interne *loop* und die C-terminale *loop* sind in rot UDP-Gal, H-Dis-Octyl in orange und Mangan in grün dargestellt. **(B)** Vergrößerter Ausschnitt des katalytischen Zentrums von AB3B. Der Pfeil deutet die Bewegung der internen *loop* bei der konformationellen Umordnung der geöffneten zur halbgeschlossenen Konformation an.^[37]

Zudem lassen bisherige Erkenntnisse die Annahme zu, dass die Donorsubstratbindung der Akzeptorsubstratbindung vorangeht.^[37-40] Dabei zeigen NMR-spektroskopische Untersuchungen, dass UDP-Gal in einer zurückgefalteten Konformation gebunden wird. Die zu übertragende Galactose liegt dabei über der Nucleotideinheit.^[38] Das Akzeptorsubstrat H-Dis-Octyl wird ebenfalls in einer dominierenden Konformation gebunden. Dabei beweisen sowohl Kristallstrukturen als auch STD-NMR-Experimente eine Dominanz der Galactose bei der Bindung. Kinetische Studien hingegen zeigen, dass der Fucoserest von Bedeutung für eine effiziente Katalyse ist.^[41]

3.4 Glycosyltransferaseinhibitoren

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, leisten GTs und Glykokonjugate einen elementaren Beitrag in biologischen Prozessen. Trotzdem ist das komplette Spektrum ihrer Funktionen bis heute nicht aufgeklärt. Die spezifische Regulation sowie die genaue Untersuchung der Glycosylierung und deren Funktionen im Zellgeschehen, stehen daher im Fokus der naturwissenschaftlichen Forschung.

Als ein Ansatzpunkt zur gelenkten Regulation gelten GT-Inhibitoren. Ebenso sind spezifische Inhibitoren für therapeutische Applikationen und die Produktion von Glykokonjugaten mit speziellen Glycosylierungsmustern von Belang.^[42]

Traditionell stellen Substratanaloga dabei den Großteil, der bis heute entwickelten Inhibitoren dar. Zu ihnen zählen die Donor- Akzeptor und Bisubstratanaloga.

Donorsubstratanaloga enthalten häufig ein NDP- bzw. NMD-Motiv. Alternativ mimikrieren sie die Diphosphateinheit des Donorsubstrats.

Akzeptorsubstratanaloga hingegen leiten sich vom Akzeptormotiv ab, bei ihnen handelt es sich häufig um modifizierte Disaccharide.

Bisubstratanaloga enthalten Struktur motive der Donor- und der Akzeptor-Einheit, wobei diese kovalent miteinander verlinkt sind. Daneben wurden auch Übergangszustandsanaloga des Donorsubstrats entwickelt. Diese leiten sich meist von den entsprechenden Glycalen ab, da man annimmt, dass sie den Übergangszustand nachahmen.^[43, 44]

Akzeptorsubstratanaloga besitzen i.d.R. eine höhere Spezifität als Donorsubstratanaloga, jedoch ist ihre Affinität häufig gering. Donor- und Übergangszustandsanaloga zeigen hingegen aufgrund der starken Affinität der GTs zu ihren Donorsubstraten gute Inhibierungseigenschaften (normalerweise im mikromolaren Bereich). Jedoch ist es schwierig eine selektive Inhibition basierend auf dem Donorsubstratmotiv zu erreichen, da gleiche oder ähnliche Substrate mehrheitlich von verschiedenen GTs genutzt werden.^[45]

Das größte Potential der substratbasierten Inhibitoren besitzen daher Bisubstratanaloga, da in ihnen die benötigten Eigenschaften der Selektivität und Affinität vereint sind.^[45]

Die Entwicklung von Verbindung **7** gelang unter Verwendung struktureller und mechanistischer Informationen. Verbindung **7** stellt ein Donorsubstratanalogon verschiedener GTs u.a. auch der GTB dar. Die inhibitorische Konstante wurde auf $K_i = 0.45 \mu\text{M}$ bis $38.8 \mu\text{M}$ gegenüber verschiedenen GTs bestimmt. Der K_i wurde für GTB in Gegenwart von UDP-Gal auf $K_i = 2.4 \mu\text{M}$ bestimmt.

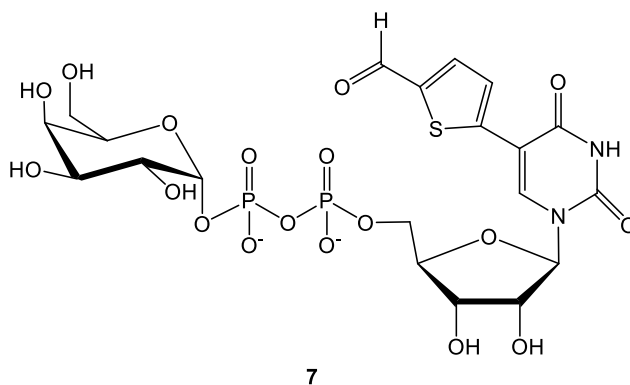


Abbildung 12: Donorsubstratanalogon für zwei verschiedene GalTs. Kristallstrukturen belegen eine Besetzung der Bindungstasche des Basenfragments. Durch eine Einstufenreaktion gelang die Derivatisierung der 5-Position innerhalb der Pyrimidinbase von UDP-Gal. Mit **7** gelang in Gegenwart von UDP-Gal eine Inhibition der α -(1,4)-Galactosyltransferase (*Neseria meningitidis*) mit $K_i = 0.45 \mu\text{M}$.

Röntgenkristallstrukturen deuten darauf hin, dass die Inhibierung von solchen Uracil-modifizierten Basen dadurch erreicht wird, dass eine wichtige *loop*-Bewegung nicht mehr ausgeführt werden kann, wodurch die geschlossene Konformation des Enzyms nicht mehr eingenommen werden kann.

K.Schaefer *et al.*^[46] gelang die Synthese des donorsubstratanalogen Inhibitors **8** (Abbildung 13). Dieser verspricht aufgrund seiner nichtionischen Eigenschaften eine bessere Bioverfügbarkeit. Der K_i wurde per kompetitiver STD-NMR für GTB in Gegenwart von Magnesium auf $K_i = 117 \mu\text{M}$ bestimmt.

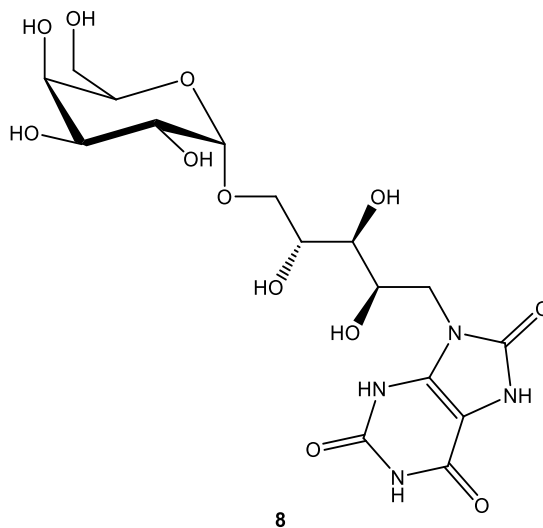


Abbildung 13: Der von Schaefer *et al.* nichtionische Inhibitor. **8**. Dieser weist donorsubstratanaloges Verhalten auf. Für GTB konnte eine inhibitorische Konstante von $K_i = 117 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Eine Inhibierung von GTA konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein natürlich vorkommendes Bisubstratanalogum stellt Tunicamycin (**9**) dar, es inhibiert die *N*-Acetylglucosaminyl-Phosphotransferase. Dagegen stehen nur eine geringe Anzahl synthetisch dargestellter Bisubstratanaloga zur Verfügung. Interessante Beispiele stellen die Verbindungen **11**, **12** und **13** dar (Abbildung 14). Sie inhibieren die α -1,3-Galactosyltransferase (α -1,3-GalT) des Schweins. α -1,3-GalT ist eine nicht-invertierende Glycosyltransferase. Sie katalysiert die Bildung des Gal α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal-Epitops, welches für hyperakute Abstoßungsreaktionen bei Xeno-Transplantationen verantwortlich ist. Die dargestellten Verbindungen sind die einzigen, bis dato entwickelten Bisubstratinhibitoren einer nicht-invertierenden Glycosyltransferase.^[43, 45] Die geringe Anzahl an Inhibitoren für nicht-invertierende GTs resultiert aus der erschwerten synthetischen Realisierung solch komplexer Strukturen.

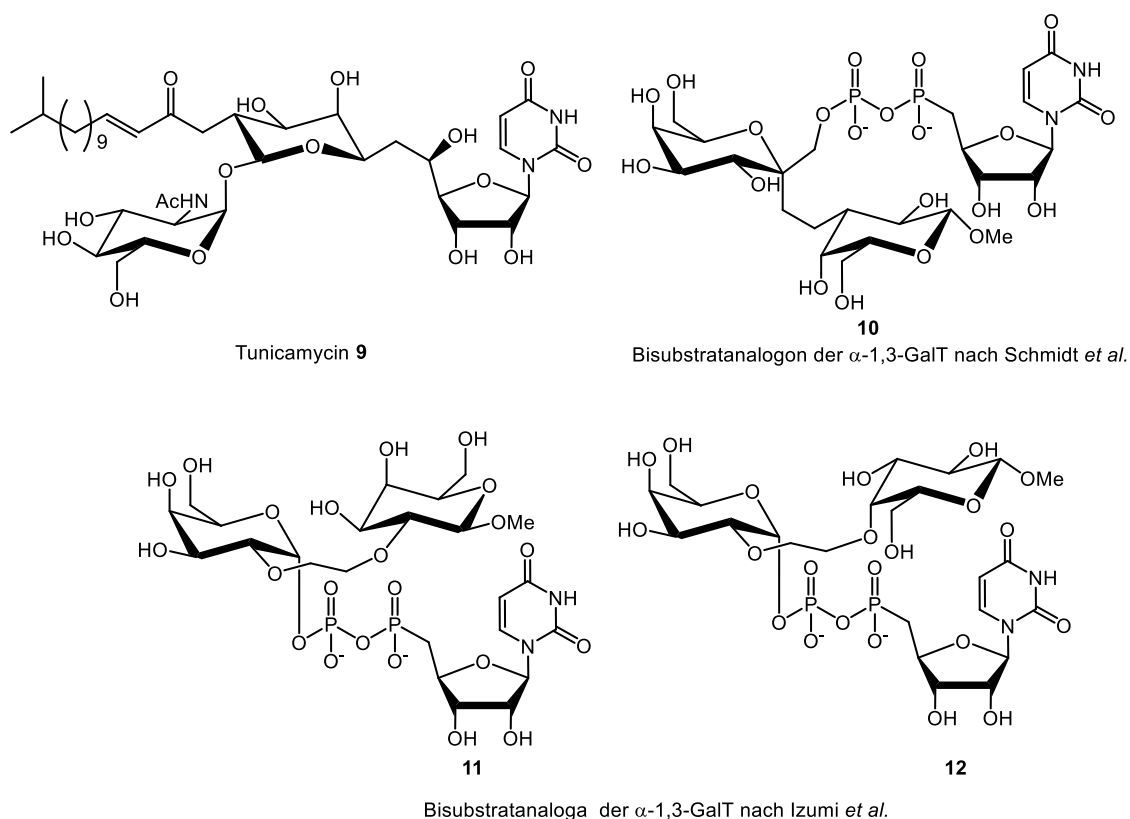


Abbildung 14: Gezeigt ist eine Auswahl an Bisubstratinhibitoren: Tunicamycin (**9**) ist ein natürlich vorkommendes Bisubstratanalogum, es inhibiert die *N*-Acetylglucosaminyl-Phosphotransferase. Die Verbindungen **10**, **11** und **12** sind synthetisch dargestellte Inhibitoren der α -1,3 GalT vom Schwein. Verbindung **10** wurde von Schmidt *et al.* und **11** und **12** wurden von Izumi *et al* entwickelt.^[43, 45]

Als wichtige Ergänzung der Klasse von Inhibitoren gelten die nicht-substratbasierten Inhibitoren. Sie leiten sich nicht von den natürlichen Substraten der GTs ab. Ihre Identifizierung erfolgt v.a. in Programmen zur Identifizierung neuartiger Wirkstoffe wie z.B. Hochdurchsatz-Screenings.

Strukturell lassen sich diese Inhibitoren in die unterschiedlichsten chemischen Gruppen einteilen. Als wichtige Beispiele seien die Iminozucker und die synthetisch dargestellten Heterozyklen erwähnt.

Ein prominentes Beispiel eines Iminozuckers stellt Miglustat (**13**) dar. Es wird klinisch zur Inhibitortherapie zweier seltener erblicher Stoffwechselkrankheiten dem Morbus Gaucher Typ 1 und der Niemann-Pick-Krankheit Typ C eingesetzt. Beide Krankheiten zählen zu den lysosomalen Speicherkrankheiten. Miglustat wirkt durch Blockierung der Glucosyltransferaseceramidsynthase (GCS), wobei es das native Akzeptorsubstrat Ceramid (**14**) mimikriert. Durch die Therapie mit Miglustat wird die krankhafte Akkumulation von Glycosphingolipiden in den betroffenen Organen vermindert. Miglustat weist einen IC_{50} von 20 μ M auf.

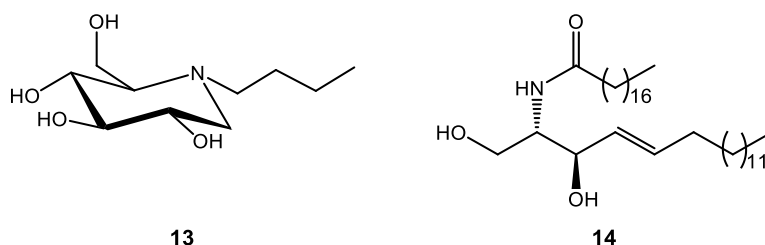


Abbildung 15: *N*-Butyl-1-desoxynojirimycin (**13**) (Miglustat, Zavesca®) und Ceramid **14**.

Thiazolidinone werden zu den synthetischen Heterocyclen gezählt. Sie konnten in unterschiedlichen Screenings als Inhibitoren für verschiedene GTs identifiziert werden.

Thiazolidinone der *core*-Struktur **15** inhibieren Dolicholphosphatmannosese synthase (DPMS) von *T. brucei*. *T. brucei* bezeichnet einen parasitären Erreger, welcher beim Menschen Auslöser für die Afrikanische Schlafkrankheit ist. Bei Nichtbehandlung verläuft diese Krankheit letal.^[47]

DPMS katalysiert eine essentielle Glykokonjugatbiosynthese von *T. brucei* Verbindung **15** inhibiert bei einer Konzentration von 1 mM 80 % DPMS Aktivität.

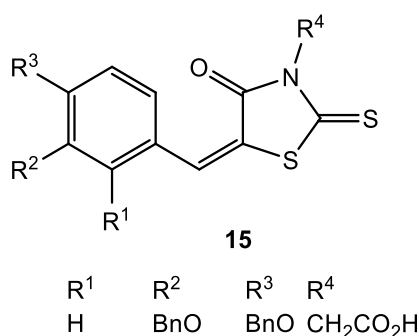
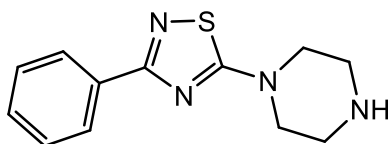


Abbildung 16: Thiazolidinone-*core*-Struktur **15** stellt einen Inhibitor für DPMS von *T. brucei* dar. Der parasitäre Erreger wird durch die Tsetsefliege übertragen und löst beim Menschen die tödliche Schlafkrankheit aus.

Strukturell ähnliche Thiazolidinone zeigen ebenfalls donorkompetitives Verhalten bei drei verschiedenen anderen GTs.

3-Phenyl-5-piperazinyl-1,2,4-thiadiazol (nachfolgend als Ligand 382 bezeichnet) ist ebenfalls ein Vertreter der nicht-substratbasierten Inhibitoren. Ligand 382 (**16**) wurde 2010 erstmalig von Rademacher *et al.*^[48] in einem NMR-basierten-Screening als Inhibitor für GTB identifiziert.



Ligand 382 (**16**)

Abbildung 17: 3-Phenyl-5-piperazinyl-1,2,4-thiadiazol stellt einen potentiellen Inhibitor für verschiedene GTs in Anwesenheit der jeweiligen Donorsubstrate dar: GTB $K_i = 0.8$ mM, GTA $K_i = 5.1$ mM, α -1,-3-GalT $K_i = 6.3$ mM, AAGlyB $K_i = > 15.0$ mM.

In einem radiochemischen Assay wurde 2012 von Jørgensen *et al.*^[49] die Inhibitionskonstante für GTB in Anwesenheit der natürlichen Substrate und Ligand 382 auf $K_i = 0.8$ mM bestimmt. Untersuchungen an weiteren GTs zeigten schwächeres inhibitorisches Verhalten. Für GTA wurde K_i zu 5.1 mM und für die Mutante AAGlyB > 15.0 mM bestimmt.

Für bovine α -1,3 GalT konnte ebenfalls inhibitorisches Verhalten mit $K_i = 6.3$ mM detektiert werden.

Zusätzlich konnten für GTB und AAGlyB Röntgenkristallstrukturen in Gegenwart von Ligand 382 erzeugt werden. Diese liefern Hinweise auf einen neuen Bindungsmodus. Das Verhalten kann vorsichtig als bisubstratanalog gedeutet werden. Denn der 3-Phenyl-1,2,4-thiadiazol-Rest besetzt innerhalb der Kristallstrukturen Teile der Akzeptorbindungstasche, zusätzlich werden noch Teile der Donorbindungstasche besetzt. Dadurch orientiert sich der Piperazin-Ring so in der Bindungstasche, dass Wasserstoffbrückenbindungen an das DXD-Motiv koordiniert werden. Dadurch wird das für die Katalyse benötigte Mangan aus der Bindungstasche verdrängt.

3.5 Strukturbasiertes Liganddesign: Die Entwicklung eines Inhibitors

Die Suche von neuartigen Liganden mit neuen Zielstrukturen ist schwierig und sehr komplex. Bei der Suche nach derartigen Strukturen werden zwei alternative Ansätze verfolgt.

Das in der kombinatorischen Chemie verfolgte Hochdurchsatz-Verfahren (*high throughput screening*, *HTS*) ermöglicht durch Automatisierung, das *screening* einer großen Anzahl von Substanzen, wobei diese mehr oder weniger nach dem Zufallsprinzip dargestellt wurden.^[50]

Beim strukturbasierten Ligand-/Wirkstoffdesign liegt der Fokus in der Entwicklung und der Optimierung eines Zielmoleküls. Der so entwickelte Ligand soll dabei energetisch günstige Wechselwirkung mit dem Zielprotein ausüben.^[51]

Um verlässliche Aussagen von Ligand-Protein-Interaktionen treffen zu können, gilt die Kenntnis der Struktur des Zielmoleküls in der Bindungstasche des zu inhibierenden Proteins, als Grundvoraussetzung für das strukturbasierte Wirkstoffdesign.^[51]

Die Analyse der Struktur des Zielmoleküls kann durch NMR-spektroskopische Experimente, massenspektrometrische Methoden, Röntgenstrukturanalyse sowie durch computergestützte Methoden erfolgen.^[52]

Im besten Fall stehen hochaufgelöste kristallographische Daten der Protein-Ligand-Komplexe mit den verwendeten Leitstrukturen zur Verfügung, auf Grundlage derer entsprechende Design-Entwürfe erfolgen können. Jedoch sind kristallographische Daten meist nur unter großem Aufwand zu erhalten. Als Alternative steht die computergestützte Methode des *molecular modellings* zur Verfügung.^[53]

4 Aufgabenstellung

Glycanstrukturen sind an der Zellkommunikation, der Zellerkennung und vielen weiteren essentiellen biologischen Vorgängen beteiligt. So werden bei vielen pathologischen Veränderungen, wie beispielsweise der Entstehung von Krebs, veränderte Glycanstrukturen beobachtet. Der Aufbau dieser bedeutsamen Klasse von Naturstoffen erfolgt durch Glycosyltransferasen (GT). Diese Enzyme katalysieren dabei hochspezifisch den Transfer eines aktivierten NDP- oder NMP-Saccharids auf ein Akzeptorsubstrat. Bei dem Akzeptorsubstrat handelt es sich häufig um die Hydroxyfunktion eines Oligo- oder Monosaccharids. Zum besseren Verständnis der biologischen Vorgänge ist die spezifische Hemmung von Glycosyltransferasen ein wichtiges Werkzeug. Die Entwicklung von spezifischen und selektiven Inhibitoren für GTs stellt eine komplexe Aufgabe dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Galactosyltransferase B (GTB) als Modellsystem zur Entwicklung verschiedener Inhibitoren ausgewählt. Die GTB ist ein geeignetes Modellsystem, da von ihr bereits eine Vielzahl verschiedener Kristallstrukturen sowohl mit als auch ohne Liganden zur Verfügung stehen. Dies ermöglicht die Entwicklung von potentiellen Inhibitoren durch substratbasiertes, sowie auch nicht-substratbasiertes Liganddesign durch *molecular modelling*.

Durch substratbasiertes Liganddesign sollten aufbauend auf den Ergebnissen einer früheren Arbeit weitere bisubstratähnliche Liganden entwickelt und synthetisiert werden. Um eine größtmögliche Spezifität zu erreichen, sollten die Liganden das Galactosemotiv als Teil des Donorsubstrats beinhalten. Zur Gewährleistung der Selektivität, sollte die Fucose als Teilmotiv des Akzeptorsubstrats enthalten sein. Zur Erzielung des inhibitorischen Potentials sollten die Struktur motive kovalent über einen Linker miteinander verbunden sein. Die *in silico* designten Bisubstratanaloga sollten als Vorlage für Disaccharidmimetika dienen. Diese enthalten die natürlichen Substrate Fucose und Galactose. Damit besitzen sie die für einen bisubstratähnlichen Inhibitor benötigten Forderungen von Selektivität und Affinität. Für die Disaccharidmimetika sollte eine geeignete Syntheseplanung stattfinden und nachfolgend verifiziert werden.

Im Rahmen eines nicht-substratbasierten Liganddesigns sollten aufbauend auf den Ergebnissen von F. Niemeyer (F. Niemeyer, unveröffentlichte Ergebnisse) nicht-substratbasierte Thiadiazolderivate synthetisiert werden. Diese sollten im Anschluss auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber GTB untersucht werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

In meiner Diplomarbeit^[54] habe ich das Bisubstratanalogon **17** durch *molecular modelling* entworfen. Es stellte das Leitstrukturmotiv zu dem Disaccharidmimetikum **18** dar. Dieses ist ein potentieller Inhibitor der GTB. Die Struktur enthält eine thiomethylierte Fucose. Die Thiomethylgruppe an Position 1 bietet die Möglichkeit einer nachfolgenden Verknüpfung mit einer Galactose. Die Verknüpfung mit einer weiteren Galactoseeinheit kann zu einer größeren Selektivität des Inhibitors führen.

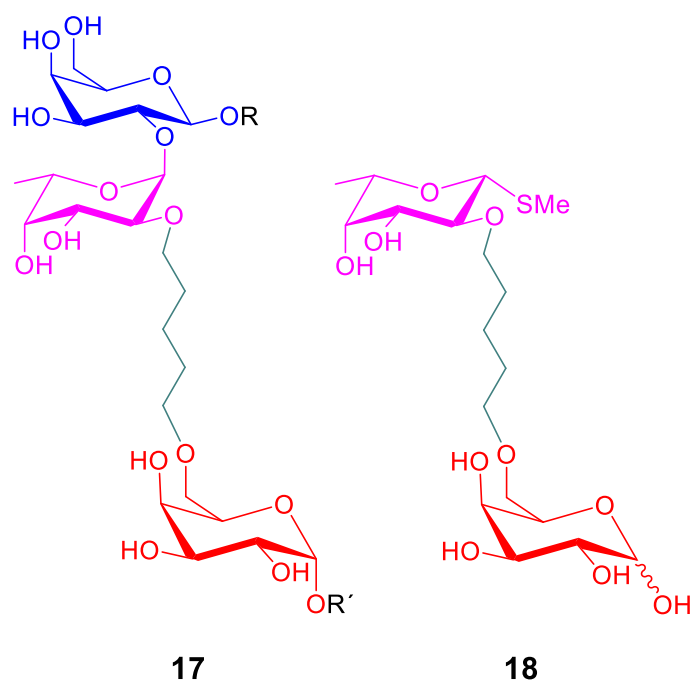


Abbildung 18: Das in meiner Diplomarbeit^[54] entworfene Bisubstratanalogon **17**, R= Octyl, R' = UDP (links). Dieses stellte das Leitstrukturmotiv zur Darstellung des sich daraus ableitenden Disaccharidmimetikums **18** (rechts) dar.

Die Vorstufe **21** des Disaccharidmimetikums **18** konnte erfolgreich über acht Stufen dargestellt werden.

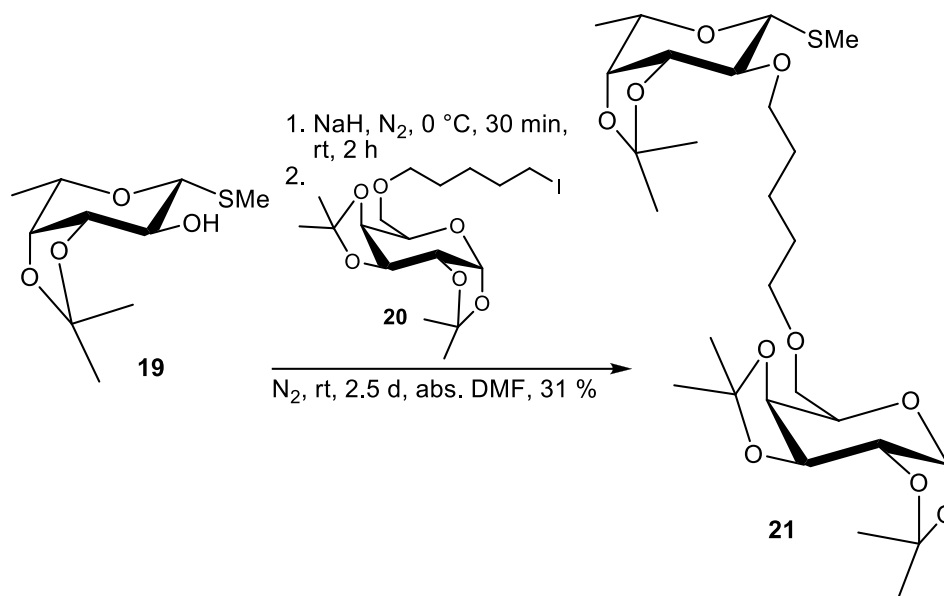


Abbildung 19: Die Darstellung der Vorstufe **21** des Disaccharidmimetikums **18** gelang über acht Stufen. Gezeigt ist die Verknüpfung des Galactose- mit dem Fucose-Baustein.

Um zur Zielverbindung **18** zu gelangen, wurde nachfolgend eine säurekatalysierte Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen durchgeführt.

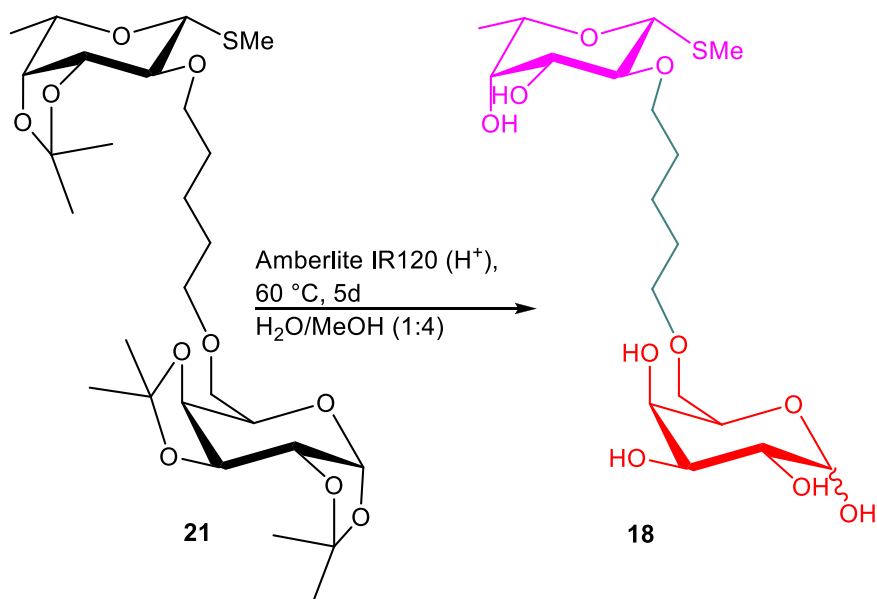


Abbildung 20: Um zur Verbindung **18** zu gelangen wurde nachfolgend eine Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen zwar im Gemisch gelang, jedoch konnte nur ein massenspektrometrischer Nachweis der Verbindung **18** erbracht werden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte eine Vielzahl verschiedener

Nebenprodukte. U.a. wiesen die Nebenprodukte eine unvollständige Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen auf. Eine Trennung der verschiedenen Substanzen konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Daher sollte zunächst die Abspaltung der Schutzgruppen optimiert werden.

5.1 Design und Synthese bisubstratähnlicher Inhibitoren der GTB

Zahlreiche Versuche der Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen wurden durchgeführt. Die Untersuchung der einzelnen Ansätze erfolgte zunächst nur durch dünnschichtchromatographische Kontrolle. Dafür wurde zunächst eine methanolische Stammlösung hergestellt und auf die Anzahl der Ansätze verteilt. Anschließend wurde die Abspaltung der Schutzgruppen über vierzehn Tage mit verschiedenen Säuren bei RT und 40 °C dünnschichtchromatographisch untersucht.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe zur Darstellung von **18**.

Ansatznr.	LM	Reagenz	Temperatur
1	H ₂ O/MeOH (1:1)	CSA	40°C
2	H ₂ O/MeOH (1:1)	CSA	RT
3	H ₂ O/MeOH (1:1)	TFA	40 °C
4	H ₂ O/MeOH (1:1)	TFA	RT
5	H ₂ O/MeOH (1:1)	p-TSOH	40 °C
6	H ₂ O/MeOH (1:1)	p-TSOH	RT
7	AcOH/H ₂ O/MeOH (1:1:1)	AcOH	40 °C
8	AcOH/H ₂ O/MeOH (1:1:1)	AcOH	RT
9	AcOH/H ₂ O (1:1)	AcOH	37 °C
10	AcOH/H ₂ O (1:1)	AcOH	RT

Ergebnisse und Diskussion

Die Ansätze in welchen TFA und Essigsäure als Reagenz verwendetet wurden, wiesen den Retentionswert des Produkts auf. Diese Bedingungen wurden anschließend weiter untersucht. In einem weiteren Ansatz wurden diese Bedingungen erneut variiert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Es wurde ebenfalls eine methanolische Stammlösung hergestellt. Jedoch wurde das Methanol nach Aufteilung der Ansätze entfernt, da befürchtet wurde, dass im sauren Milieu, welches zur Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe benötigt wird, eine zusätzliche Glycosidierung der Hydroxygruppe in Position 1 der Galactose stattfinden könnte. Die Reaktionen wurden insgesamt für 32 Stunden gerührt und dabei mehrmals dünnschichtchromatographisch untersucht. Eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung zeigte, dass bei Verwendung von TFA (Ansatz 13 und 15) neben der Abspaltung der Schutzgruppen, eine Substitution der Thiomethylgruppe an Position 1 der Fucose durch eine Hydroxygruppe stattfand.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe zur Darstellung von **18**.

Ansatznr.	LM	Reagenz	Temperatur
11	AcOH 80 %	AcOH 80 %	55 °C
12	AcOH 60 %	AcOH 60 %	55°C
13	THF/H ₂ O (4:1)	TFA	0°C-RT, 55 °C
14	HCl 1 mol/L	HCl 1 mol/L	55 °C
15	THF/H ₂ O (4:1)	TFA	55 °C

In Ansatznummer 12 hingegen konnte massenspektrometrisch nur das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Ein anschließendes *upscaling* des Reaktionsansatzes und anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten als Hauptprodukt ein einfach Isopropyliden-geschütztes Produkt.

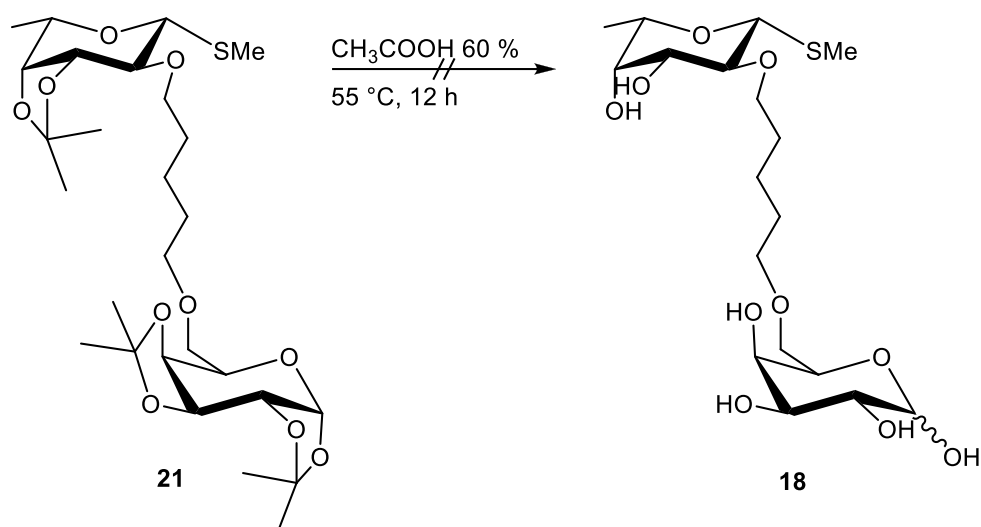


Abbildung 21: Versuch der Darstellung von **18**. Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen unter essigsauen Bedingungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine der durchgeführten Bedingungen zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führte.

Um aus dieser synthetischen Sackgasse zu entkommen, wurde die bisherige Leitstruktur modifiziert. Der Focus dieser Weiterentwicklung sollte dabei auch zu einer Reduzierung des synthetischen Aufwandes führen.

5.1.1 Weiterentwicklung der Leitstruktur mittels molecular modelling

Die Modifizierung der Leitstruktur erfolgte unter Verwendung der Software SYBYL-X 1.1. Zunächst wurde die 2008 von Alfaro *et al.* publizierte Kristallstruktur der humanen GTB (pdb 2RJ8) in SYBYL-X 1.1 geladen. Röntgenkristallstrukturen sind über die RCSB Protein Data Banc^[55] zugänglich. Die Kristallstruktur pdb 2RJ8 beinhaltet das native Protein als Monomer kokristallisiert mit Uridindiphosphat (UDP) als Donorsubstrat, dem H-Antigen-Akzeptoranalogen Octyl-2-O-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-galactopyranosid (BHE, **22**), sowie Mangan als Cofaktor und Kristallwasser. Aufgrund der hohen Hydrolaseaktivität der GTB gelang bis dato keine Kristallisation des nativen Proteins mit dem natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal. Um die fehlende Galactose des Donorsubstrats zu ersetzen, wurde UDP entfernt und durch das natürliche Donorsubstrat UDP-Gal (**4**) ersetzt. Verbindung **4** stammt aus der Röntgenkristallstruktur pdb 2RJ7. Diese ist eine Chimäre der GTB mit zwei Punktmutationen (Gly 176 Arg und Ser 235 Gly). Mit dieser Chimäre gelang die Kokristallisation von dem natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal mit Mangan als Cofaktor und BHE (**22**) als Akzeptorsubstrat.

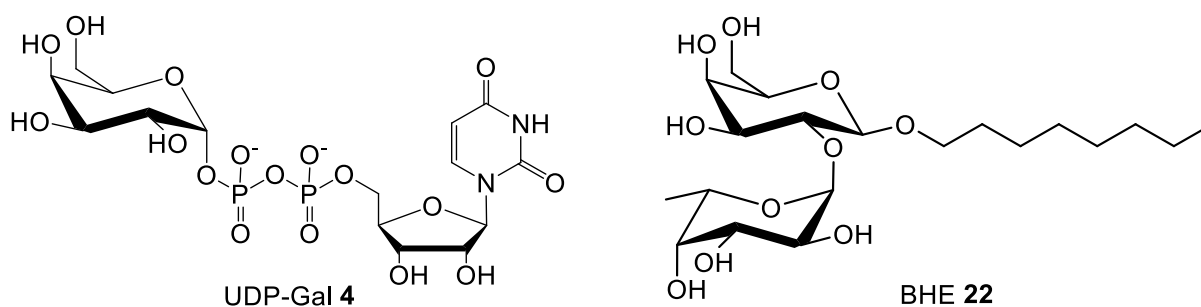


Abbildung 22: Schematische Darstellung der miteinander zu verknüpfende Liganden **4** und **22**.

Um eine größtmögliche Spezifität für einen Inhibitor zu erreichen, sollten die Bisubstratanaloga das Galactosemotiv als Teil des Donorsubstrats beinhalten. Zur Gewährleistung der Selektivität, sollte die Fucose als Teilmotiv des Akzeptorsubstrats enthalten sein. Zur Erzielung der Affinität wurden die Struktur motive kovalent über einen Pentyllinker miteinander verbunden. Die Galactose des Donorsubstrats (Gal_{Donor}) ist optimalerweise weiterhin über einen Pentyllinker in Position 6 mit der Fucose des Akzeptors (Fuc_{Akzeptor}) in Position 2 verknüpft. Jedoch sollte die Galactose des Akzeptors (Gal_{Akzeptor}) durch eine einfachere Ringstruktur substituiert werden, da dies eine erhebliche Reduzierung des synthetischen Aufwands bedeutet. Die Verknüpfung der Galactose-ersetzenden Ringstruktur durfte nur in α -Position erfolgen. Eine β -Orientierung der Ringstruktur ist nicht möglich, da die Größe der Bindungstasche einen limitierenden Faktor darstellt. Zudem wurde der Octyllinker des Akzeptorsubstrats entfernt.

Die Verknüpfung und die Substitution der Gal_{Donor} wurden wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Strukturen mit 1000 Iterationen minimiert. Um einen Vergleich der Liganden unter einander zu ermöglichen, wurden nachfolgend die Bindungsenergien berechnet.

Dazu wurde jeweils die Energie des Protein-Ligand-Komplexes $E_{Komplex}$ berechnet und die Energien des Proteins ohne Liganden $E_{Protein}$ und die Energie des freien Liganden E_{Ligand} von dieser subtrahiert.

$$E_{Bindung} = E_{Komplex} - (E_{Protein} + E_{Ligand}) \quad (1)$$

Die erhaltenen Bindungsenergien stellen jedoch keine absoluten, sondern relative Werte dar. Sie bieten damit eine Möglichkeit zur Beurteilung, ob die Liganden im Vergleich zur Ausgangsverbindung verbesserte oder schlechtere Bindungsenthalpien erzielen.

Zunächst wurde die kombinierte Bindungsenergie der natürlichen Substrate **22** und **4** berechnet. Diese beträgt -112.7 kcal/mol. Eine Berechnung der Bindungsenergie von **4** ohne das Akzeptorsubstrat **22** ergibt einen Wert von -65.6 kcal/mol.^[56]

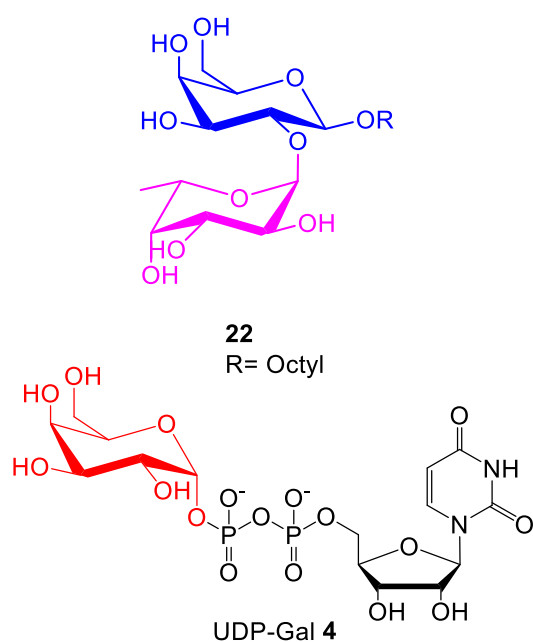


Tabelle 3: Berechnete Bindungsenergie der beim *molecular modelling* verwendeten natürlichen Liganden **22** und **4** (inkl. Mangan).

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]
22 und 4	-112.7
4	-65.6

Abbildung 23: Schematische Darstellung der im *molecular modelling* verwendeten Liganden **22** (R=Octyl) und **4**. An ihnen erfolgte die Modifizierung zu den nachfolgend vorgestellten Bisubstratanaloga. Die Galactose des Donorsubstrats (Gal_{Donor}) ist in rot, die des Akzeptoranalogs in blau (Gal_{Akzeptor}) und die Fucose des Akzeptors (FuC_{Akzeptor}) in pink dargestellt.

In Abbildung 24 ist ein Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit den beiden Liganden dargestellt. Das Donorsubstrat ist auf der Donorseite der Bindungstasche orientiert und das Akzeptorsubstrat auf Akzeptorseite der Bindungstasche. Zwischen beiden Verbindungen bietet die Bindungstasche einen begrenzten Raum für eine Verknüpfung der beiden Substrate.

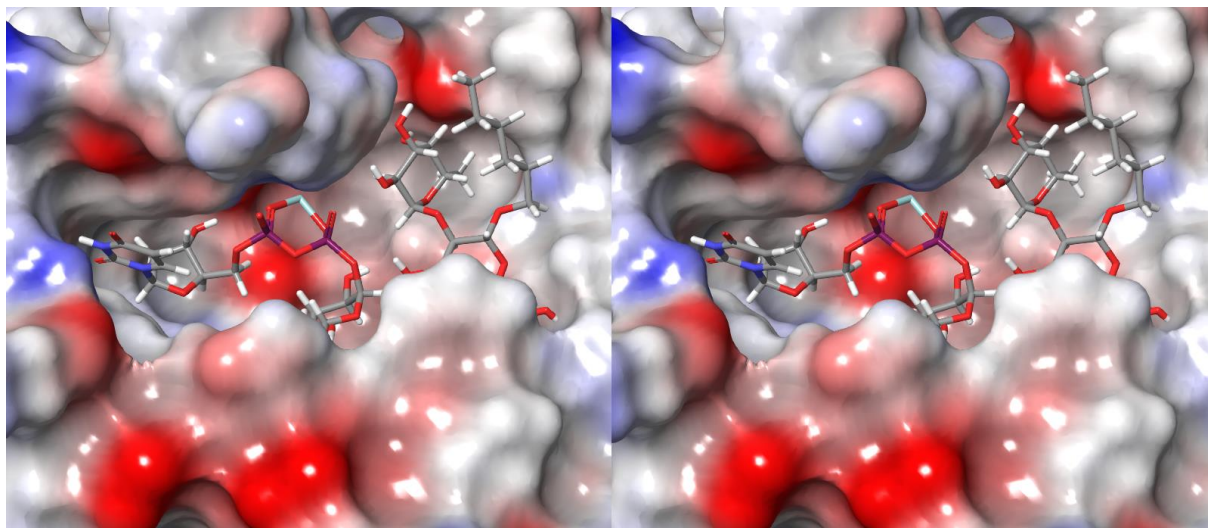


Abbildung 24: Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit den natürlichen Liganden **22** und **4** (*crossed eye stereo* Modus). Die Oberfläche des Enzyms ist anhand des elektrochemischen Potentials eingefärbt, negative Oberflächenladungen sind in Rot, positive in Blau dargestellt.

In Verbindung **23** wurde, wie erwähnt, die Position 2 der $\text{Fuc}_{\text{Akzeptor}}$ mit der $\text{Gal}_{\text{Donor}}$ in Position 6 über einen Pentyllinker verknüpft. Die $\text{Gal}_{\text{Akzeptor}}$ wurde durch einen Cyclohexylring ersetzt. Die ermittelte Bindungsenergie beträgt -87.7 kcal/mol und ist damit 25.0 kcal/mol schlechter als die Summe beider Ausgangsverbindungen, jedoch 22.1 kcal/mol besser als **4**. Dies ist nicht verwunderlich, da ein Großteil zur Protein-Ligand-Interaktionen durch die $\text{Gal}_{\text{Akzeptor}}$ beigetragen wird.

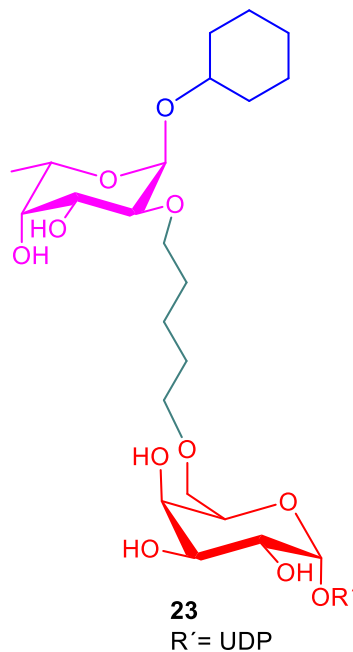


Tabelle 4: Berechnete Bindungsenergie des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **23**.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	ΔE zu 22 + 4 [kcal/mol]	ΔE zu 4 [kcal/mol]
23	-87.7	+25.0	-22.1

Abbildung 25: Schematische Darstellung des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **23**, R' = UDP. Die Gal_{Donor} ist in Rot, der Cylohexylring, der die Gal_{Akzeptor} ersetzt ist in Blau, die FuCA_{Akzeptor} in Pink und der Pentyllinker ist in Grün dargestellt.

Die so erhaltene Struktur nimmt eine Orientierung ein, die nahezu identisch ist mit der ursprünglichen Lage der nativen Liganden in der Kristallstruktur. Der Cyclohexylring nimmt dabei exakt den Platz der ursprünglichen Gal_{Akzeptor} ein. Der Pentyllinker nimmt den ursprünglich freien Raum zwischen der Donorseite und der Akzeptorseite der Bindungstasche ein.

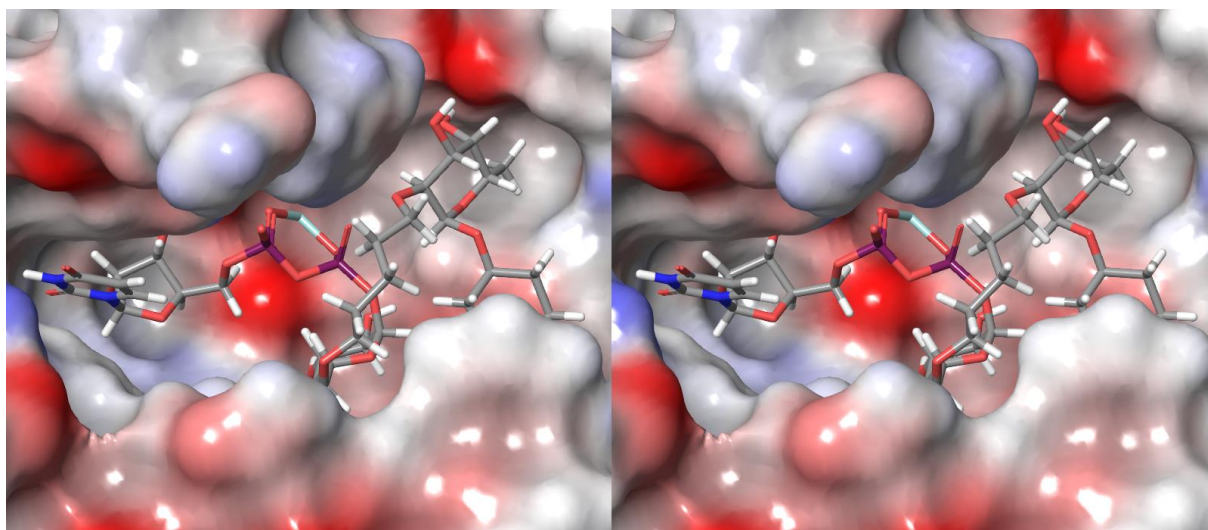


Abbildung 26: Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit dem Liganden **23** (*crossed eye stereo* Modus). Die Gal_{Akzeptor} wurde durch einen Cyclohexylring ersetzt. Die Fuc_{Akzeptor} wurde in Position 2 über einen Pentyllinker mit der Gal_{Donor} in Position 6 verknüpft. Die Oberfläche des Enzyms ist anhand des elektrochemischen Potentials eingefärbt, negative Oberflächenladungen sind in Rot, positive in Blau dargestellt.

Die Gal_{Akzeptor} wurde im Falle der Verbindung **24** durch einen Benzylring ersetzt. Die ermittelte Bindungsenergie beträgt -87.1 kcal/mol und ist damit 25.6 kcal/mol schlechter als die beiden Ausgangsverbindungen **22** und **4**. Jedoch -21.5 kcal/mol besser als das alleinige Donorsubstrat **4**.

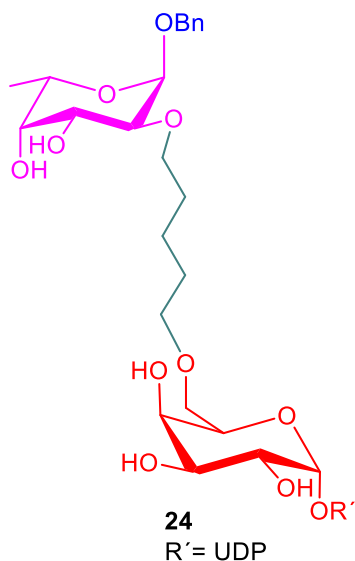


Tabelle 5: Berechnete Bindungsenergie des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **24**.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	ΔE zu 22 + 4 [kcal/mol]	ΔE zu 4 [kcal/mol]
24	-87.1	+25.6	-21.5

Abbildung 27: Schematische Darstellung des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **24**, R' = UDP. Die Gal_{Akzeptor} (rot) wurde durch einen Benzylring (blau) ersetzt. Fuc_{Akzeptor} ist in Pink und der Pentylspacer ist in Grün dargestellt.

Struktur **24** nimmt ebenfalls eine nahezu identische Orientierung, wie die nativen Liganden, in der Bindungstasche ein.

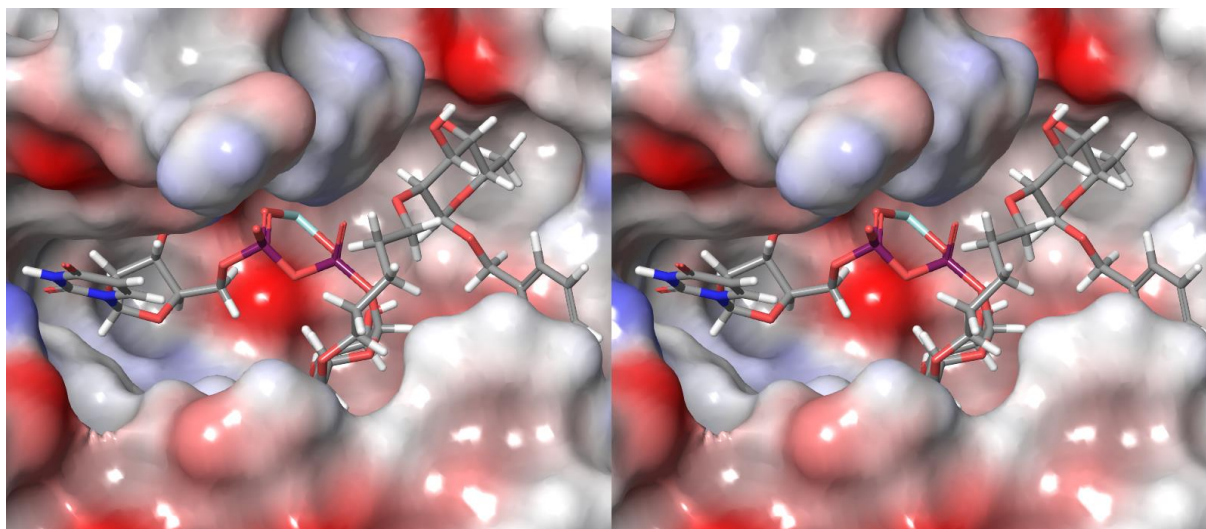


Abbildung 28: Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit dem Liganden **24** (*crossed eye stereo* Modus). Die Gal_{Akzeptor} wurde durch einen Benzylring ersetzt. Die Fucose wurde in Position 2 über einen Pentyllinker mit der Gal_{Donor} in Position 6 verknüpft. Die Oberfläche des Enzyms ist anhand des elektrochemischen Potentials eingefärbt, negative Oberflächenladungen sind in Rot, positive in Blau dargestellt.

In Struktur **25**, wurde die Gal_{Akzeptor} durch einen Phenylring ersetzt. Die ermittelte Bindungsenergie beträgt -84.3 kcal/mol.

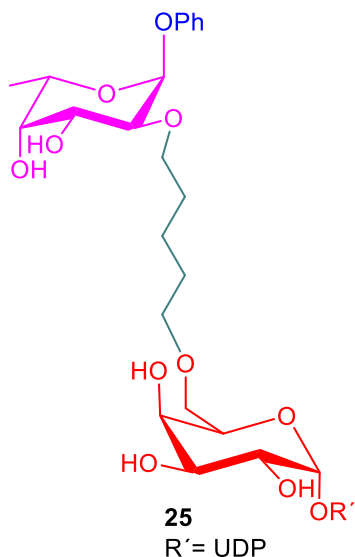


Tabelle 6: Berechnete Bindungsenergie des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **25**.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	ΔE zu 22 + 4 [kcal/mol]	ΔE zu 4 [kcal/mol]
25	-84.3	+28.4	-18.7

Abbildung 29: Schematische Darstellung des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **25**, R' = UDP. Die Gal_{Akzeptor} (rot) wurde durch einen Phenylring (blau) ersetzt. Fuc_{Akzeptor} ist in Pink und der Pentylspacer ist in Grün dargestellt.

Die Gal_{Akzeptor} wurde durch einen Phenylring ersetzt (siehe Abbildung 30). Durch die Verkürzung der Ringstruktur um eine Methyleneinheit ergibt sich eine leicht andere Orientierung des aromatischen Ringes in der Bindungstasche (nahe des C-Terminus).

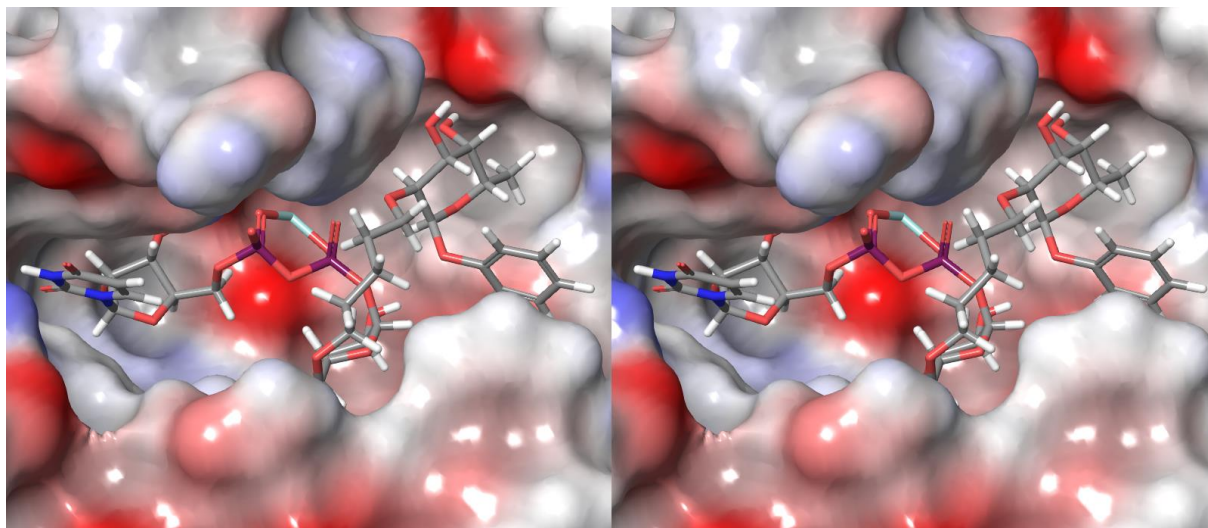


Abbildung 30: Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit dem Liganden **25** (*crossed eye stereo* Modus). Die Gal_{Akzeptor} wurde durch einen Phenolring ersetzt. Zusätzlich wurden die Fuc_{Akzeptor} in Position 2 über einen Pentyllinker mit der Donor_{Gal} in Position 6 verknüpft. Die Oberfläche des Enzyms ist anhand des elektrochemischen Potentials eingefärbt, negative Oberflächenladungen sind in Rot, positive in Blau dargestellt.

In Analogie zu den vorherigen Strukturen, wurden die Gal_{Akzeptor} in diesem Falle durch einen Thiophenylring ersetzt (siehe Abbildung 32). Die ermittelte Bindungsenergie beträgt -84.9 kcal/mol.

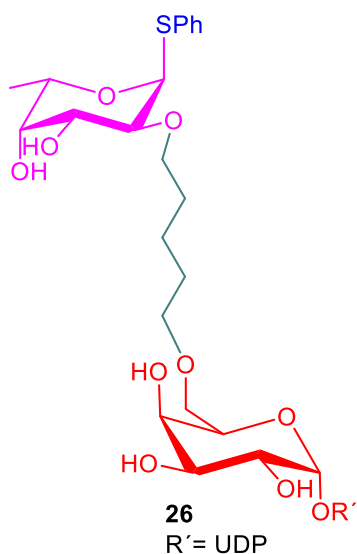


Tabelle 7: Berechnete Bindungsenergie des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **26**.

Ligand	Bindungsenergie [kcal/mol]	ΔE zu 22 + 4 [kcal/mol]	ΔE zu 4 [kcal/mol]
26	-84.9	+27.4	-19.3

Abbildung 31: Schematische Darstellung des mittels *molecular modelling* entworfenen Liganden **26**, R' = UDP. Die Galactose des Akzeptorsubstrates (Gal_{Akzeptor}) wurde durch einen Thiophenylring ersetzt.

Die Verkürzung der Ringstruktur bewirkt auch hier eine leicht andere Orientierung der Ringstruktur im Gegensatz zu der nativen Gal_{Akzeptor}. Die Orientierung des Liganden **26** ist fast identisch zur Struktur **25**.

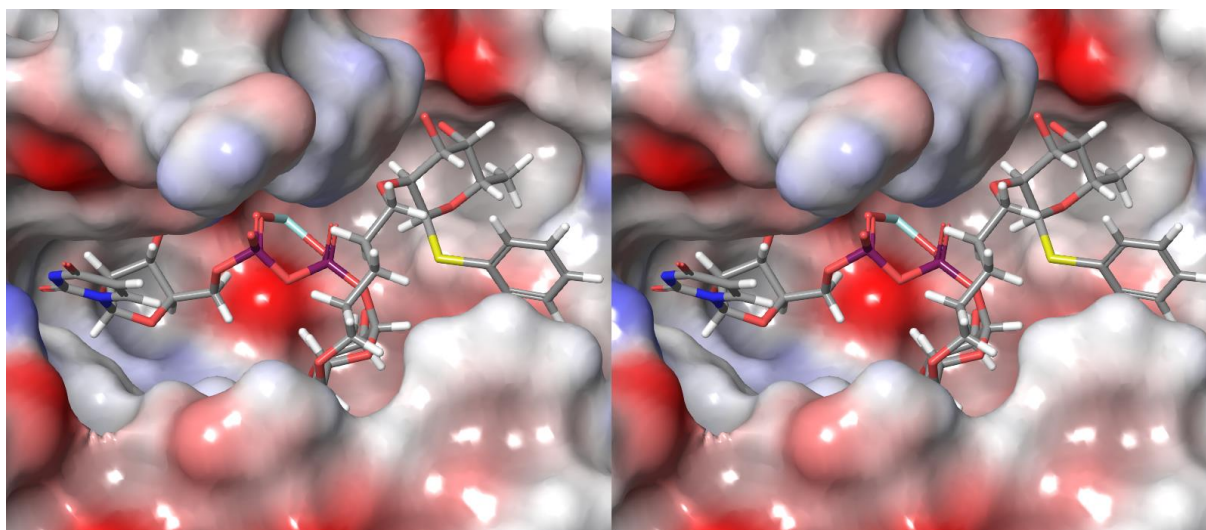


Abbildung 32: Ausschnitt der Bindungstasche der GTB mit dem Liganden **26** (*crossed eye stereo* Modus). Die Gal_{Akzeptor} wurde durch einen Phenolring ersetzt. Analog zur Verbindung **25** wurden die Fucose in Position 2 über einen Pentyllinker mit der Donor_{Gal} in Position 6 verknüpft. Die Oberfläche des Enzyms ist anhand des elektrochemischen Potentials eingefärbt, negative Oberflächenladungen sind in Rot, positive in Blau dargestellt.

Die erhaltenen Verbindungen weisen zwar insgesamt eine schlechtere Bindungsenergie als die ursprünglichen Liganden **22** und **4** auf, jedoch war sie in allen Fällen etwa 19 kcal/mol besser als das alleinige Donorsubstrat **4**. Dabei ist zu beachten, dass die untersuchten Systeme sehr unterschiedlich sind. Zudem lag der Fokus ihrer Entwicklung nicht in der Verbesserung der Bindungsenergien, sondern in der Entwicklung neuer Leitstrukturmotive, die eine Minimierung des synthetischen Aufwandes ermöglichen sollte.

5.1.2 Entwicklung der neuen Synthesestrategien

Die *in silico* designten Bisubstratanaloga wurden anschließend als Leitstrukturmotive für funktionalisierte Disaccharidmimetika genutzt. Es wurden zwei Bisubstratanaloga (**25**, **26**) ausgewählt und modifiziert.

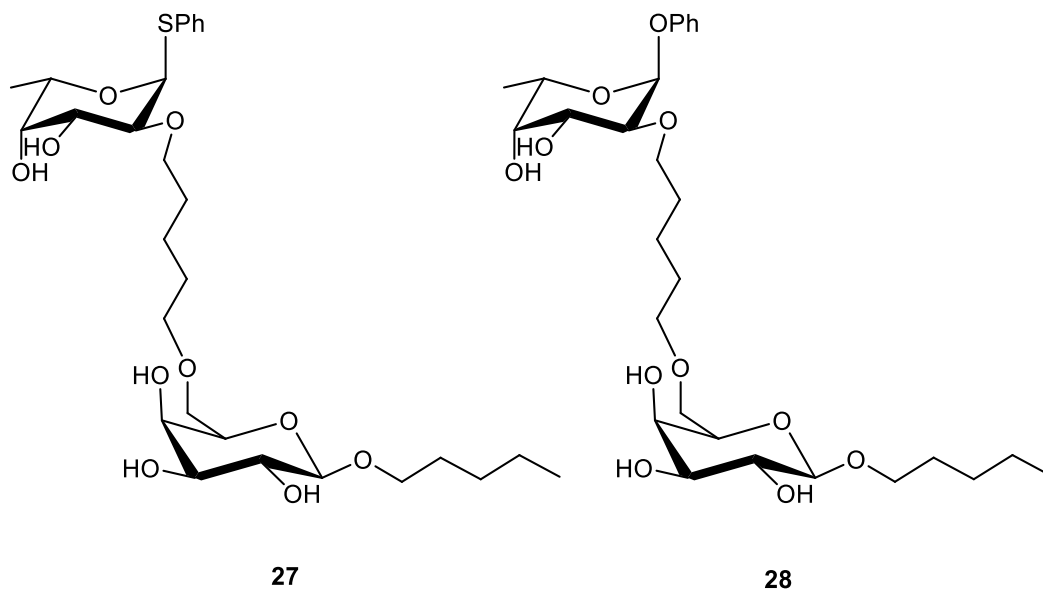


Abbildung 33: Disaccharidmimetika **27** und **28**. Die Strukturen leiten sich aus den durch *molecular modelling* entwickelten Bisubstratanloga **25** und **26** ab. Der UDP-Teil der Verbindungen, der sich an Position 1 der Galactosen befand, wurde jeweils durch eine Pentylkette ersetzt.

Die retrosynthetische Betrachtung der beiden Inhibitoren sah eine konvergente Synthesestrategie bestehend aus zwei Synthesebausteinen vor. Beide Inhibitoren lassen sich in einen L-Fucose- und einen D-Galactosebaustein aufteilen. Beide Saccharide sind durch zwei Etherbindungen über einen Pentyllinker miteinander verbunden. Das C-1-Atom der Galactose soll mit einer Pentenylgruppe funktionalisiert werden, um das anomere Zentrum während der Synthese zu schützen.

Zunächst sollte der Pentyllinker an den Galactosebaustein durch die Veretherung mit einem Dihalogenenalkan gekuppelt werden. Nachfolgend sollte die Verknüpfung beider Bausteine erfolgen. Anschließend sollen die Schutzgruppen entfernt werden. Die Pentylgruppe am anomeren Zentrum der Galactose bleibt erhalten. Die Wahl der Schutzgruppen muss je nach Wahl der Methode zur Glycosylierung entsprechend angepasst werden.

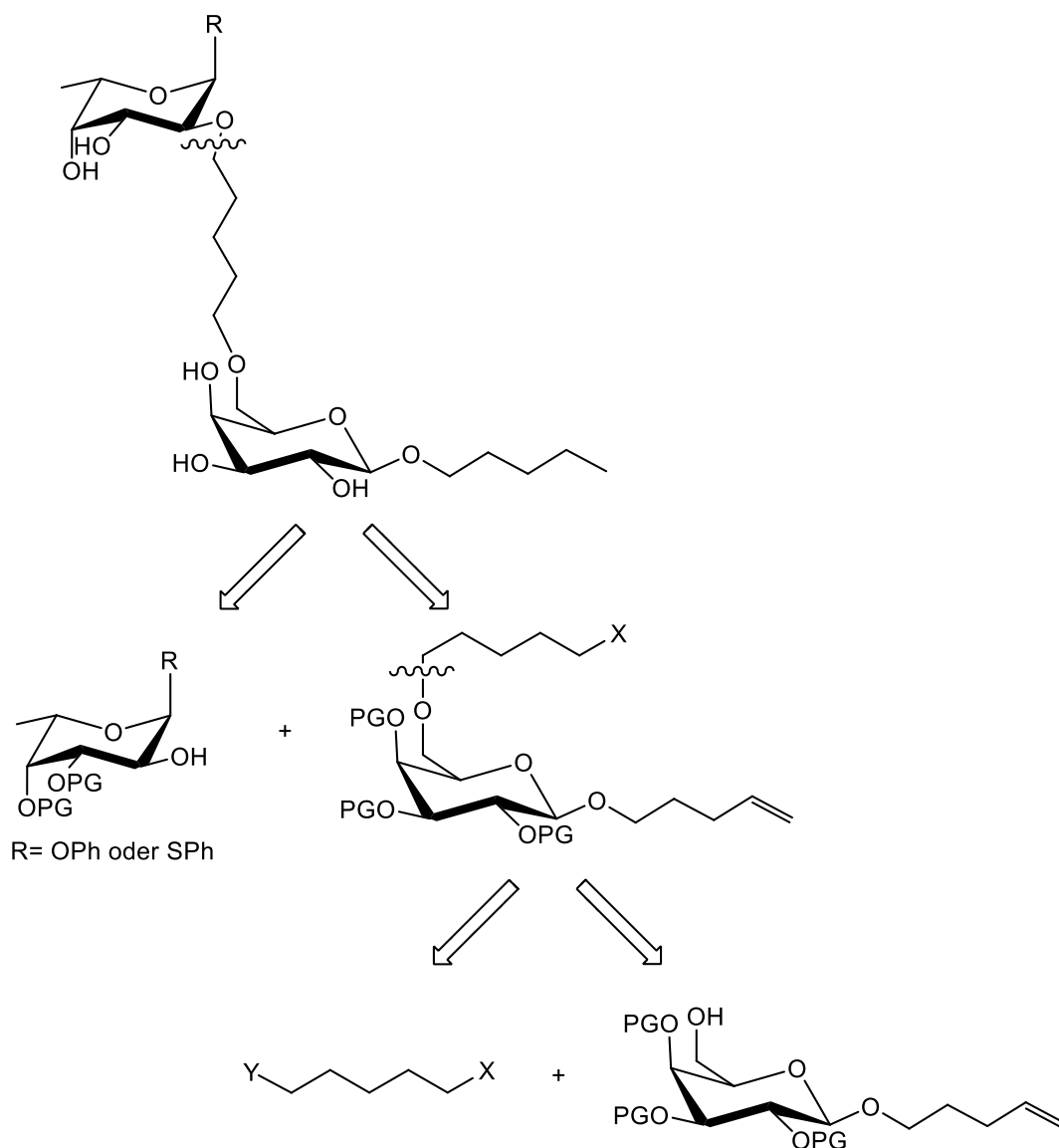


Abbildung 34: Retrosynthetische Analyse der Disaccharidmimetika, R= SPh oder OPh, X, Y= Halogensubstituent. Die konvergente Synthese setzt sich aus einem L-Fucose- und einem D-Galactosebaustein zusammen. Die Einführung des Pentyllinkers in Position 6 der Galactose sollte durch eine Veretherung des Galactosebausteins mit einem Dihalogenalkan erreicht werden.

5.1.2.1 Synthetische Studien zur Darstellung des Thioglycosids **27**

Darstellung des L-Fucose-Bausteins

Bei der Darstellung des Fucosebausteins stellte sich die grundsätzliche Frage einer geeigneten Glycosylierungsmethode zur selektiven Darstellung des α -Thioglycosids. Es stehen mehrere mögliche Verfahren zur Verfügung.

Zu einer der populärsten Methoden zählt die von R.R. Schmidt^[57] entwickelte Trichloracetimidat-Methode. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Kupplung des

aktivierten Glycosyldonors an die Hydroxyfunktion eines geeigneten Akzeptors. Als Katalysatoren werden Lewis-Säure verwendet.

Als Donoren werden Glycosyltrichloracetimide verwendet. Diese werden aus den Kohlenhydraten, die an Position 1 ungeschützt vorliegen unter basenkatalysierter Addition von Trichloracetonitril dargestellt. Durch die Wahl der Base, sowie der Art der Reaktionsführung (thermodynamische oder kinetische Reaktionskontrolle) lässt sich die Konfiguration des entstehenden Trichloracetimidates steuern. Mit einer schwachen Base wie z.B. Kaliumcarbonat wird unter kinetischer Reaktionskontrolle bevorzugt das β -Produkt gebildet. Unter thermodynamischer Kontrolle und einer starken Base wie z.B. Natriumhydrid oder DBU entsteht bevorzugt das α -Produkt.

Die Trichloracetimide lassen sich unter Lewis-saurer Katalyse mit z.B. $\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt})_2$ oder TMSOTf mit verschiedenen Nucleophilen zu dem entsprechenden Glycosid umsetzen. In den anderen klassischen Glycosidsynthesen werden mit nachbargruppenaktiven Substituenten an C-2 i.d.R. vorwiegend β -Glycoside erhalten. Hier liegt der große Vorteil der Trichloracetimidat-Methode, denn bis zu einem gewissen Grad lässt sich mit dieser Methode die Stereochemie durch die geeignete Wahl der Lewissäure, des Lösungsmittels, der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit steuern.

Jede Glycosidsynthese erfordert jedoch einen individuellen Lösungsansatz. Das bedeutet, dass die möglichen Variablen, wie z.B. die Wahl der Schutzgruppen, Lösungsmittel, Katalysatoren, Reaktionstemperatur und Zeit für jedes Problem aufeinander angepasst werden müssen, um bei so schwierigen synthetischen Aufgaben, wie Saccharidsynthesen überhaupt zum gewünschten Produkt gelangen zu können.

Trichloracetimidat-Methode

In einem ersten Verfahren wurde sich für die Trichloracetimidat-Methode mit Acetylschutzgruppen zur Darstellung des L-Thiofucosebausteins entschieden.

Die entsprechenden Trichloracetimide wurden ausgehend von L-Fucose (**29**) synthetisiert. Dafür wurde L-Fucose (**29**) zunächst peracetyliert. Anschließend folgte die selektive Entschützung der Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum über Hydrazinolyse mit Hydraziniumacetat.

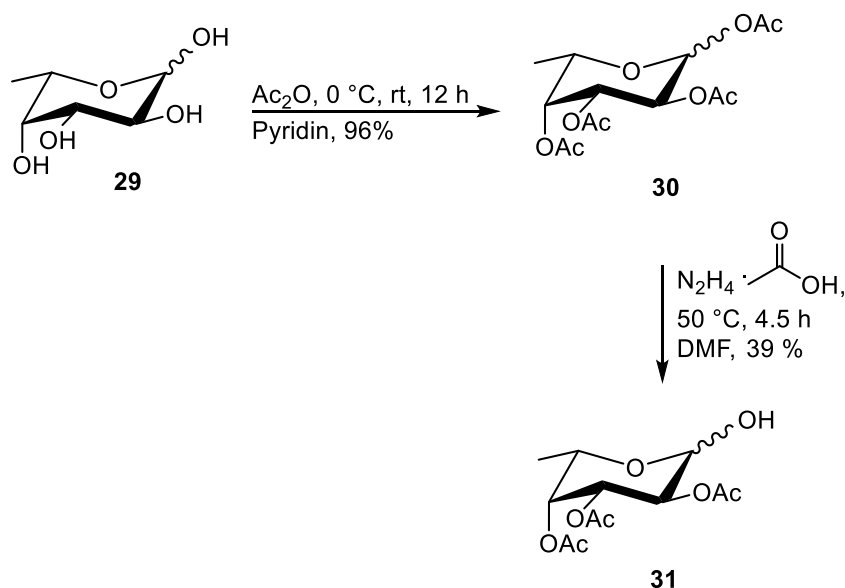


Abbildung 35: Für die Darstellung von **31** wurde L-Fucose zunächst peracetyliert und durch Hydrazinolyse mit Hydraziniumacetat selektiv in Position 1 entschützt.

Für die weitere Umsetzung zum Thioglycosids wurden zwei Varianten getestet. In den beiden Varianten wurde die Darstellung des Thioglycosid aus den unterschiedlichen Anomeren des acetylgeschützten Trichloracetimidates getestet.

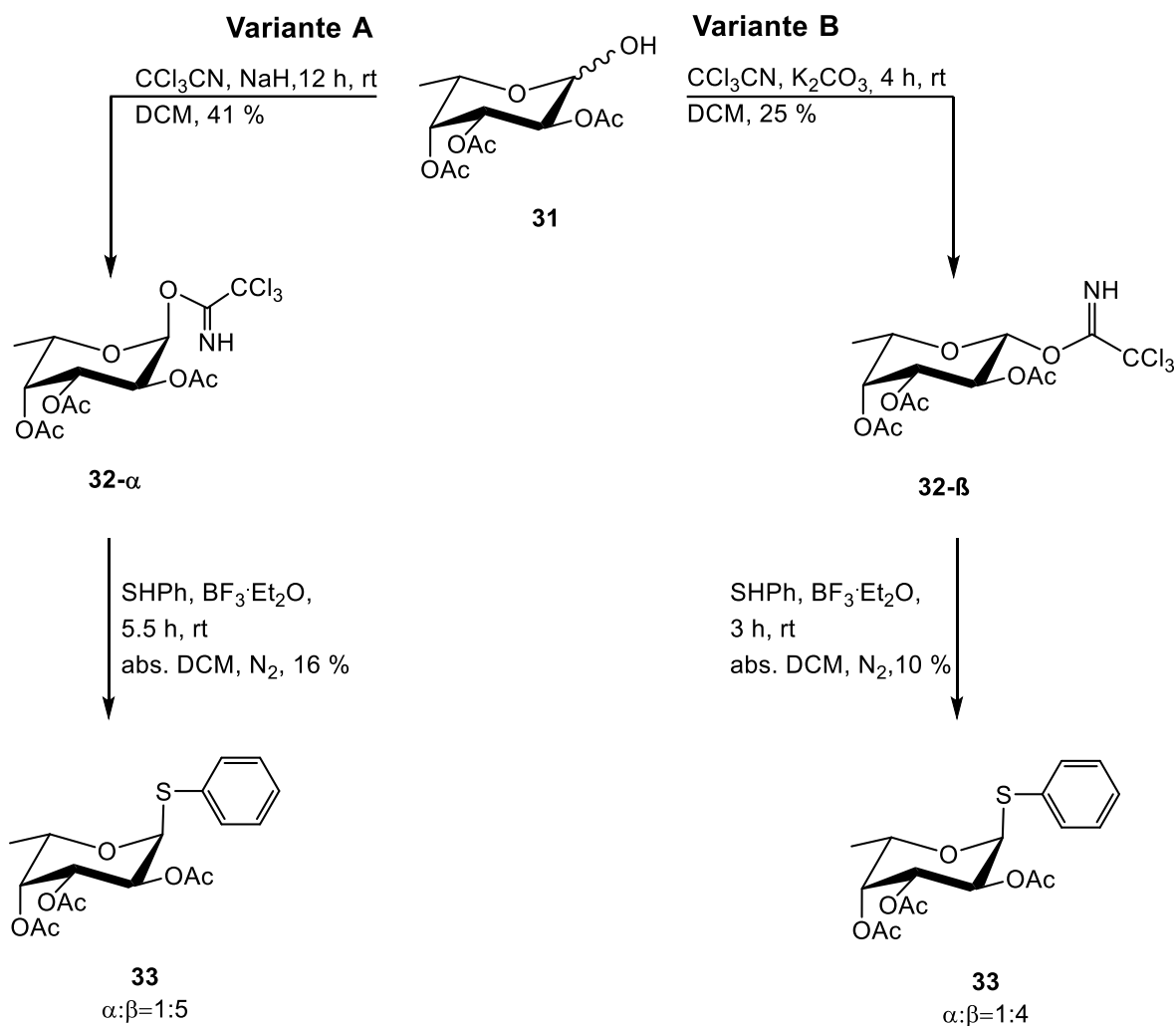


Abbildung 36: Selektive Darstellung der Trichloracetimide **32-α** und **32-β**. Nachfolgend erfolgte die Umsetzung zum Thioglycosid.

Für Variante A konnte das α-Trichloracetimidat mit Natriumhydrid unter thermodynamischer Reaktionskontrolle mit einer Ausbeute von 41 % anomenenrein dargestellt werden. Nach Schmidt *et. al.*^[58] erfolgte die anschließende Lewisäure-katalysierte Glycosylierungsreaktion von **32-α** mit Bortrifluorid. Die Synthese führte zu einem Anomerengemisch mit einem Anomenenverhältnis von α:β = 1:5. Das α-Anomer konnte säulenchromatographisch abgetrennt werden und in einer Ausbeute von 16 % isoliert werden.

Im Gegensatz zu Schmidt *et. al.*^[58] gelang die selektive Umsetzung zum reinem α-Anomer nicht. Der Mechanismus der Bildung des Thioglycosides ist unklar, es ist jedoch von einem nenneswerten Anteil von S_N1 auszugehen.

In Variante B wurde das β-Trichloracetimidat **32-β** unter kinetisch kontrollierter Reaktionskontrolle mit Kaliumcarbonat als Base, in einer Ausbeute von 25 %, anomenenrein erhalten. Für die anschließende Umsetzung des β-Trichloracetimidates zum Thioglycosid **33**

wurden die analogen Reaktionsbedingungen, wie zur Darstellung von **33** aus dem α -Trichloracetimidat, gewählt. Ausgehend vom β -Trichloracetimidat konnte ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:4$ erreicht werden. Das α -Anomer des Thioglycosids konnte ebenfalls säulenchromatographisch abgetrennt werden, jedoch konnte lediglich eine Ausbeute von 10 % isoliert werden.

Der mögliche Grund für den Überschuss des β -Anomers bei der Darstellung des Thioglycosids ausgehend vom β - sowie vom α -Trichloracetimidat, könnte die bereits erwähnte Nachbargruppenaktivität der Acetylenschutzgruppe an C-2 der L-Fucose sein.

Nach Aktivierung des Trichloracetimidates durch die Lewissäure kommt es zur Abspaltung von Trichloracetonitril, dadurch kommt es zur Bildung eines Oxocarbeniumions. Anschließend kommt es zum nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der Acetylgruppe an das anomere Kohlenstoffatom der Fucose. Dies führt zur Bildung des Acetoxocarbeniumions, wodurch die α -Position für den Angriff des Thiophenols blockiert wird. Es ist möglich durch eine Erhöhung des Anteils der Lewissäure eine Komplexierung der Acetylgruppe an C-2 durch die Lewissäure zu erreichen und so die Nachbargruppenaktivität zu reduzieren. In Versuchen zu diesem Verfahren konnte keine Verbesserung des Anomerenverhältnisses zugunsten des α -Anomers erreicht werden.

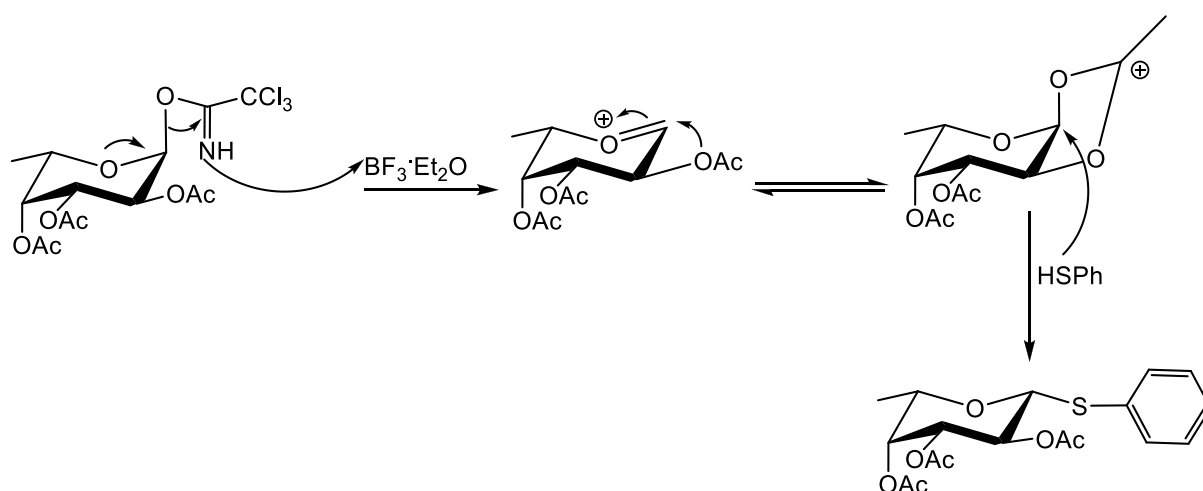


Abbildung 37: Schematische Darstellung zur Bildung des β -Thioglycosids durch Nachbargruppenbeteiligung der Acetylenschutzgruppe an C-2. Nach Abspaltung von Trichloracetonitril kommt es zur Bildung eines Oxocarbeniumions, welches sich durch O-nucleophilen Angriff der Acetylenschutzgruppe an C-2 zum Acetoxocarbeniumion umlagert. Dieses blockiert die α -Position des Glycosids, wodurch die Bildung des β -Thioglycosids bevorzugt stattfindet.

Durch die Darstellung des Thioglycosids aus dem β -Trichloracetimidat konnte eine Verbesserung des Anomerenverhältnisses zugunsten des gewünschten α -Anomers erreicht werden. Das dabei erhaltene Anomerengemisch ist säulenchromatographisch trennbar.

Jedoch ist aufgrund des hohen Preises von L-Fucose das erhaltene Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:4$ für eine effiziente Synthese nicht tragbar. Daher wurde eine neue Glycosidsynthese zur selektiven Darstellung des α -Thioglycosids erprobt.

Lemieux *in situ* Anomerisierung

Lemieux *et al.*^[59] entwickelten eine Glycosylierungsmethode ausgehend von α -Halogenosen. Dabei wird in einer *in situ* Anomerisierung der α -Halogenose die Bildung zu dem reaktiveren β -Halogenosid forciert. Diese reagieren aufgrund des anomeren Effekts bevorzugt zu den thermodynamisch stabileren α -Glycosiden. Wichtig ist, dass die gewählten Schutzgruppen des Glycosids keine Nachbargruppenaktivität aufweisen dürfen.

Es wurde sich für Benzylschutzgruppen entschieden. Entsprechend wurde L-Fucose zunächst perbenzyliert. Ursächlich für die schlechte Ausbeute von 22 % war die Bildung von Furanoseformen der Fucose, deren säulenchromatographische Abtrennung sich schwierig gestaltete.

Anschließend folgte die selektive Entschützung an Position 1 der Fucose durch saure Hydrolyse mit 80 %iger Essigsäure

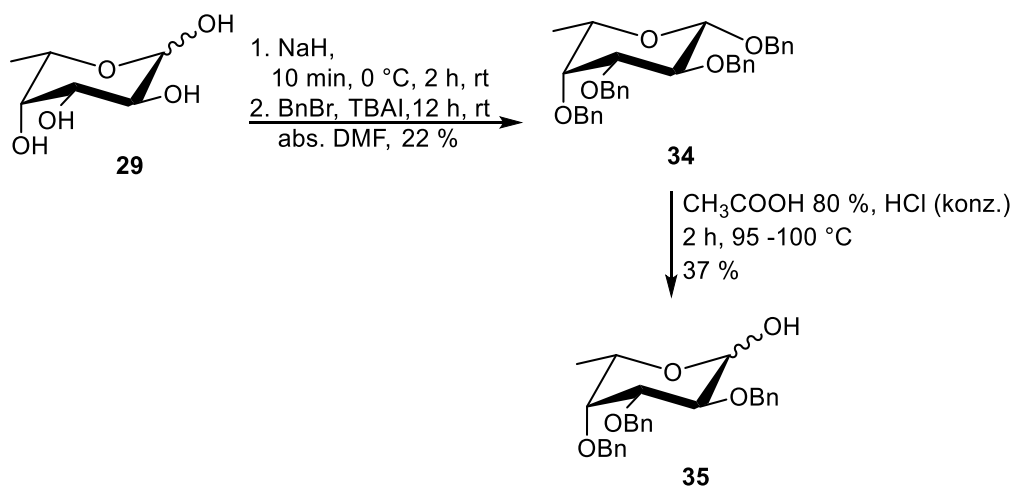


Abbildung 38: Zur Darstellung des L-Fucose-Bausteins **35** wurde L-Fucose zunächst perbenzyliert und anschließend durch saure Hydrolyse an der 1-O-Position entschützt.

Nachfolgend sollte die Umsetzung zum Thioglycosid über eine *in situ* Anomerisierungsreaktion nach Lemieux erfolgen. Dabei erfolgt erst die Umsetzung der tribenzylierten Fucose zum α -Bromid durch Umsetzung mit Oxalylbromid unter DMF-Zugabe. Die nachfolgende *in situ*

Anomerisierung zum β -Bromid erfolgt durch Zusatz von Tetrabutylammoniumbromid. Durch nachfolgende Zugabe von Thiophenol soll die Umsetzung zum α -Thioglycosid erfolgen.

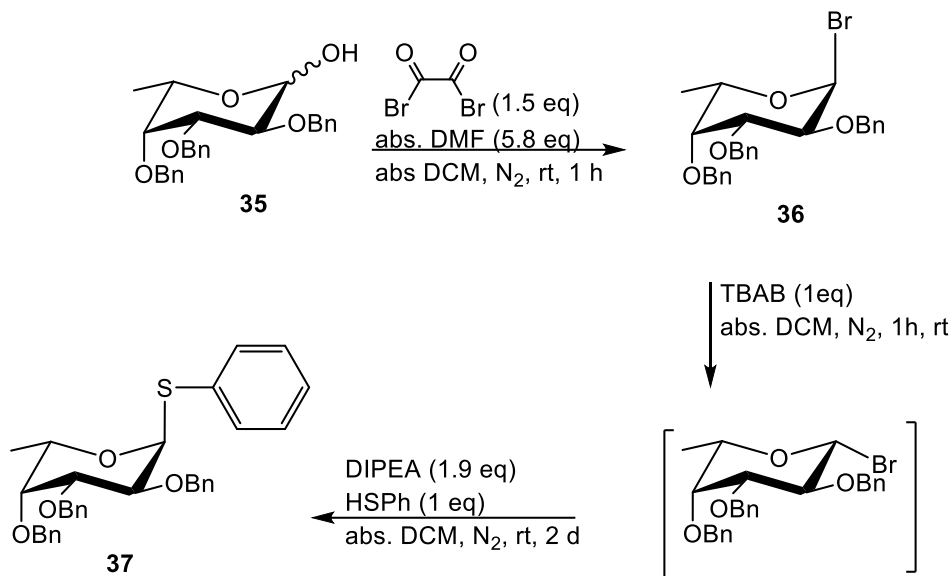


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Thioglycosids **37** über eine *in situ* Anomerisierungsreaktion nach Lemieux.

Da bisher keine Daten zur Umsetzung von Fucosylhalogeniden mit Thiolen in einer *in situ* Anomerisierungsreaktionen vorliegen, wurde zunächst eine Reaktionsverfolgung per NMR durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, ob auf diesem Wege die bevorzugte Bildung des α -Thioglycosids erreicht werden kann.

Für die Reaktionsverfolgung zur Bildung des α -Thioglycosids wurde CDCl_3 als Lösungsmittel verwendet. Die Probe wurde im N_2 -Gegenstrom in einen NMR-Röhrchen angesetzt. Die Umsetzung zum α -Bromid wurde, eine Stunde nach Zugabe von Oxalylbromid und DMF zu einer Lösung aus Tribenzylfucose in CDCl_3 , durch Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums überprüft. Nach Einstellung aller wesentlichen NMR-spektroskopischen Parametern erfolgte die Zugabe von TBAB, DIPEA und des Thiophenols. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte direkt am Spektrometer und die Aufnahme des Spektrums wurde umgehend gestartet. Die Reaktion wurde dabei für 28 Stunden bei 27°C verfolgt, wobei alle 30 Minuten ein ^1H -NMR Spektrum mit 64 scans aufgenommen wurde.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung bestätigte die Bildung des α -Thioglycosids.

Für die Auswertung wurden die Protonen H-6 und H-1 des α -Bromids sowie die Protonen H-6 und H-1 des sich bildenden α -Thioglycosids untersucht (siehe Abbildung 40).

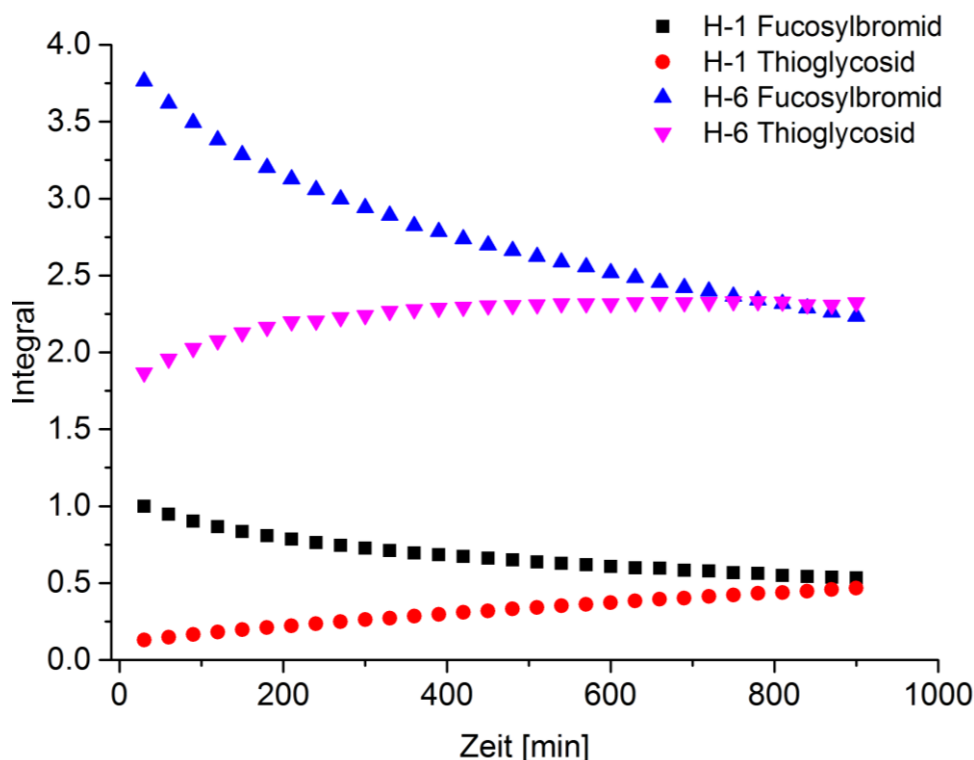


Abbildung 40: Konzentrationsverlauf anhand des H-6 und des H-1-Integrals des α -Fucosylbromids und des sich bildenden α -Thioglycosids als zeitlicher Verlauf der Reaktion.

Neben der Bildung des α -Thioglycosids konnte der unvollständige Umsatz des α -Fucosylbromids sowie die Bildung unerwünschter Nebenprodukte beobachtet werden.

Die Reaktion konnte anschließend so optimiert werden, dass ein vollständiger Umsatz der Edukte erreicht wurde. Dies geschah durch eine Senkung der Temperatur auf $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei Zugabe des Thiophenols, sowie eine Erhöhung der Äquivalente des Thiophenols von einem Äquivalent auf fünf Äquivalente. Das so erhaltene Produkt konnte abschließend ohne weitere Reinigung verwendet werden.

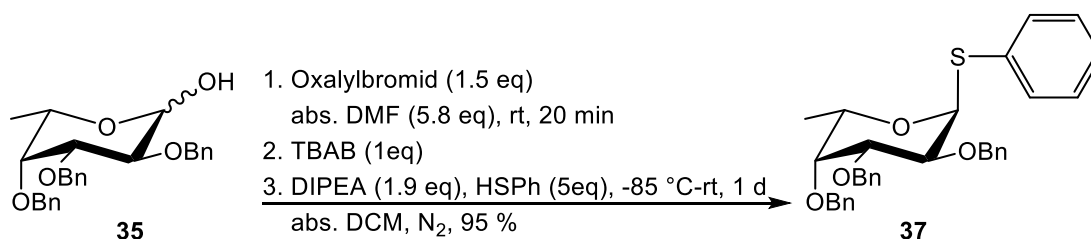


Abbildung 41: Darstellung des vollgeschützten α -Thioglycosids, durch eine *in situ* Anomerisierung nach Lemieux.

Ergebnisse und Diskussion

Die Standardreaktion zur Abspaltung von Benzylschutzgruppen ist die Palladium-katalysierte Hydrogenolyse. Diese Methode ist für das dargestellte Thioglycosid nicht geeignet, da Schwefelverbindungen den Katalysator vergiften, wodurch die Aktivität des Katalysators stark herabgesetzt wird. Als Alternative wurde die Lewisäure katalysierte Abspaltung der Benzylgruppen getestet. Hierbei wird eine Kombination einer Lewis-Säure und eines Nucleophils verwendet. In Tabelle 8 ist eine Übersicht der durchgeführten Reaktionen zu finden.

Tabelle 8: Übersicht der Versuche zur Abspaltung der Benzylgruppen unter Verwendung der Lewisäure $\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt})_2$.

Ansatznr.	$\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt})_2$	LM	Zusatz (eq.)	T [°C]
1	1 eq.	abs. MeCN	Nal (1 eq.)	0 °C, RT
2	30 eq.	abs. MeCN	Nal (3 eq.)	0 °C, RT
3	3 eq.	abs. MeCN	Nal (3 eq.)	0 °C, RT
4	1 eq.	abs. CHCl_3	Nal (1 eq.)	65 °C
5	3 eq.	abs. CHCl_3	Nal (3 eq.), TBAI (1 eq.)	65 °C
6	8 eq.	EtSH (abs. DCM als Co-Solvens)	/	RT

In den Ansätzen 1-5 konnte das gewünschte Produkt massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Ansatz 3 bewies den Verbleib einer Benzylgruppe an Position 2 der Fucose.

In Ansatznummer 6 konnte NMR-spektroskopisch die Abspaltung aller Benzylgruppen nachgewiesen werden, zusätzlich wurden deutliche Änderung der Kopplungskonstanten beobachtet. Diese stimmten nicht mehr mit einer Pyranosestruktur der Fucose überein, dies deutet auf eine Ringöffnung der Fucose hin.

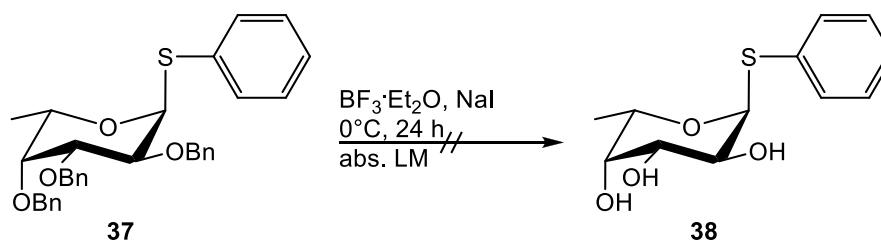


Abbildung 42: Versuch zur Darstellung von **37**.

Alternativ ist auch möglich Benzylether mit Lewis-Säuren unter sauren Bedingungen in Gegenwart von Essigsäureanhydrid in die entsprechenden Acetate zu überführen. Das gewünschte Produkt konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte zwei Acetylgruppen und eine verbleibende Benzylgruppe.

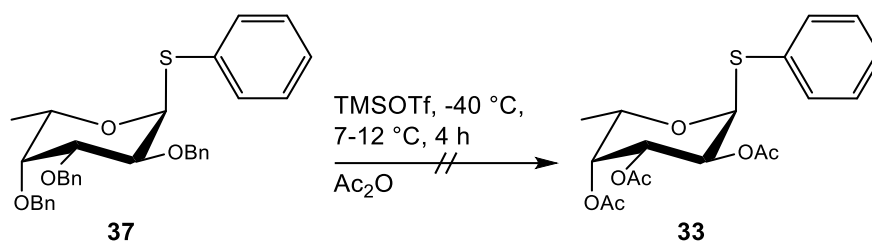


Abbildung 43: Versuch der Überführung der Benzylschutzgruppen in Acetatschutzgruppen.

Da die vollständige Abspaltung aller Benzylgruppen sich als äußerst problematisch erwies, wurde von dem Versuch der Darstellung des Disaccharidmimetikums **27** abgesehen.

5.1.2.1 Darstellung von *n*-Pentyl-6-O-(5-(methyl- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**39**)

Um die Syntheseroute zur Darstellung des Disaccharidmimetikums **28** zu verifizieren wurde zunächst der Fucose-Baustein des Disaccharidmimetikums simplifiziert. Die Phenylgruppe an Position 1 der Fucose wurde durch eine Methylgruppe ersetzt. Dies verspricht eine einfachere Synthese als die Darstellung des Phenylglycosids. Denn das benötigte Methylglycosid lässt sich über eine Fischer-Glycosylierung in nur drei Stufen darstellen. Die Darstellung des Phenylglycosids ist wesentlich aufwändiger.

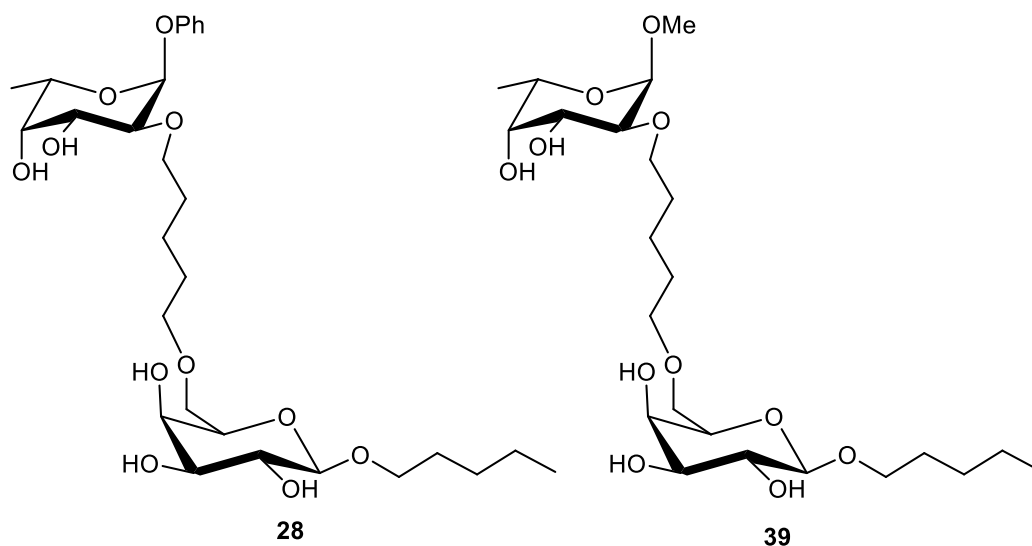


Abbildung 44: Disaccharidmimetikum **28** (links). Zur Verifizierung der Syntheseroute des Disaccharidmimetikums **28** wurde der Fucosebaustein simplifiziert, hierzu wurde die Phenylgruppe zu einer Methylgruppe vereinfacht (rechts). Das Ergebnis der Vereinfachung stellt das Disaccharidmimetikum **39** dar. Der synthetische Zugang zum Methylglycosid **39** ist einfacher, als der zum Phenylglycosid.

Darstellung des D-Galactose-Bausteins

Die Vorstufe **44** des D-Galactose-Bausteins **45** erfolgte über 4 Stufen ausgehend von der ungeschützten D-Galactose nach einer Syntheseroute von Clausen *et al.*^[60]

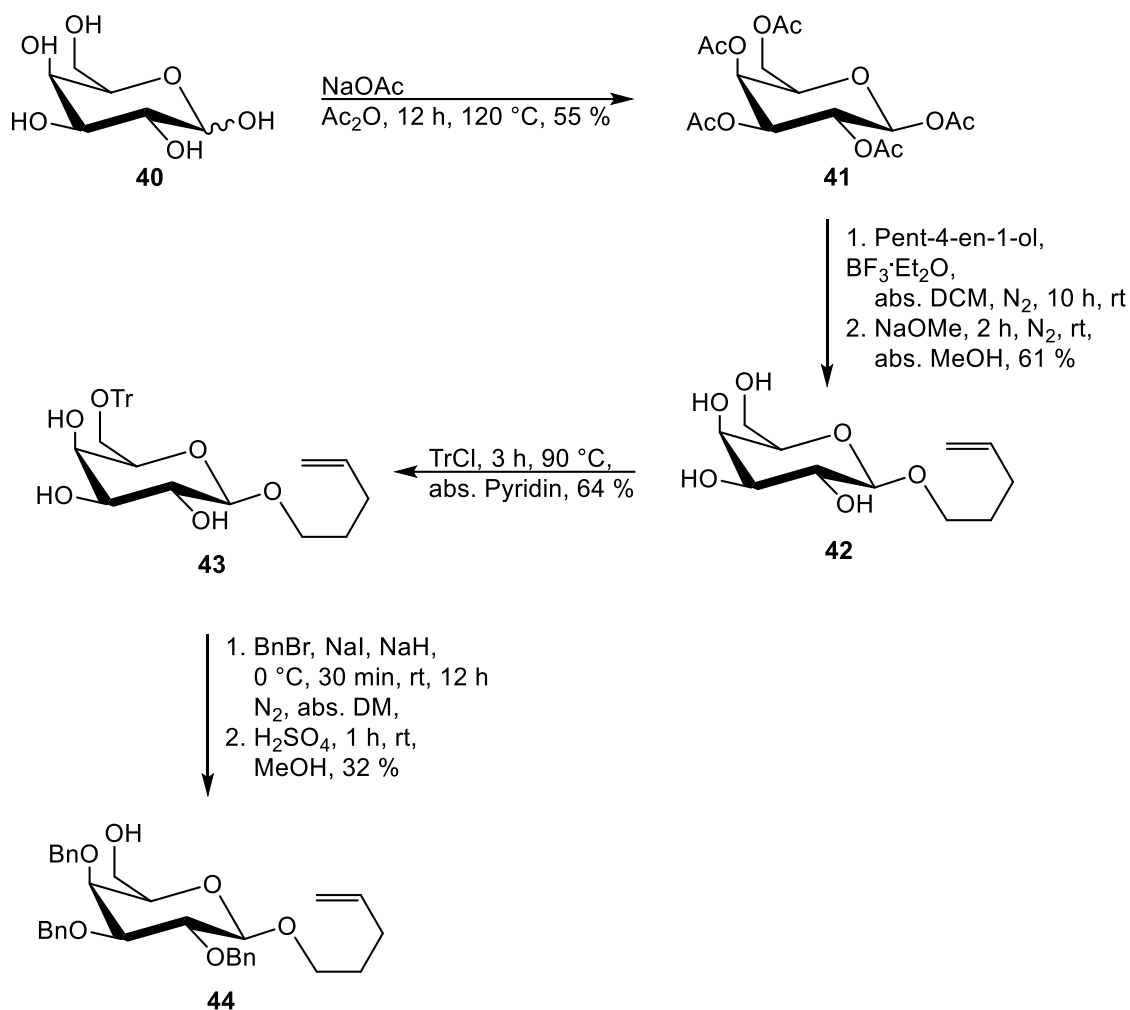


Abbildung 45: Darstellung von **44** ausgehend von D-Galactose (**40**) über 4 Stufen nach einer Syntheseroute von Clausen *et al.*^[60]

Ausgehend von der geschützten Galactose **44** wurde an der freien 6-Hydroxylgruppe durch eine Ethersynthese der 5'-Chlorpentyllinker eingeführt. Dieser wurde in einer nucleophilen Substitutionsreaktion eingeführt. In dieser Reaktion reagiert das Alkylhalogenid mit einem Alkoholat zu einem Ether. Zunächst erfolgte die Darstellung des Alkoholats durch Deprotonierung mit NaH unter Schlenk-Bedingungen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Dihalogenalkans. Zwar gelang nach säulenchromatographischer Reinigung die Isolierung von **45** unter diesen Bedingungen. Jedoch waren die erreichten Ausbeuten 37-42 % nicht zufriedenstellend. Es erfolgte ein Wechsel der Base auf 50 %ige NaOH-Lösung. Nach Variation der Menge des Dihalogenalkans konnte so eine Ausbeute von 99 % erreicht werden.

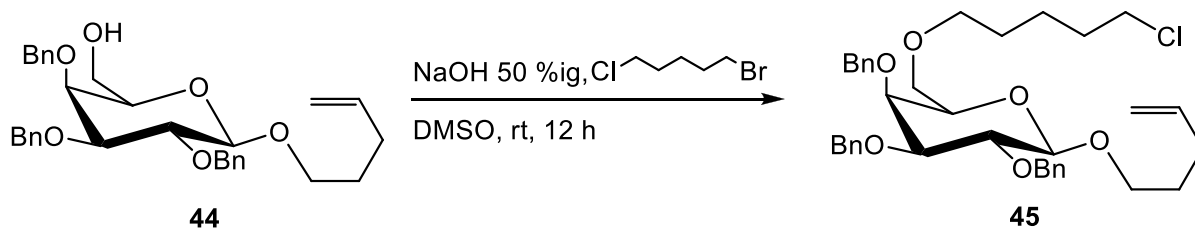


Abbildung 46: Die Darstellung von **45** erfolgte durch Kupplung von **44** mit 1-Brom-5-chlorpentan. Als Base wurde 50 %ige NaOH-Lösung verwendet. Es konnte eine Ausbeuten von 99 % erreicht werden.

Das nach Aufarbeitung und Extraktion erhaltene Rohprodukt konnte anschließend ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe eingesetzt werden. Tabelle 9 zeigt einen Überblick zur Variation der Reaktionsbedingungen mit den erhaltenen Ausbeuten.

Tabelle 9: Übersicht zur Variation der Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **45**.

Ansatznr.	Base	1-Brom-5-chlorpentan	Lösemittel	Ausbeute
1	NaH 1.7 eq.	5 eq.	abs. DMSO	37 %
2	NaH 2 eq.	1.8 eq.	abs. DMSO	42 %
3	NaOH (50 %ig)	2 eq.	DMSO	30 %
4	NaOH (50 %ig)	5 eq.	DMSO	37 %
5	NaOH (50 %ig)	1.8 eq.	DMSO	99 %*

* Das Rohprodukt kann nach Aufarbeitung und Extraktion ohne weitere Reinigung verwendet werden.

Der so erhaltene Galactose-Baustein **45** stand damit für die nachfolgende Kupplung mit dem L-Fucose-Baustein **47** zur Verfügung.

Darstellung des L-Fucose-Bausteins

Die Darstellung des L-Fucose-Bausteins **47** erfolgte ausgehend von L-Fucose in drei Stufen.

Im ersten Schritt wurde L-Fucose in einer Fischer Glycosylierung zum Methylglycosid **46** umgesetzt. Das Produkt **46** wurde mit einer Ausbeute von 13 % dargestellt.^[61] Das α -Anomer wurde im Überschuss ($\alpha:\beta = 5:1$) erhalten. Für die Kupplung mit dem Galactose-Baustein musste die 2-Hydroxylgruppe frei sein, hingegen mussten die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 geschützt vorliegen. Daher folgte im Anschluss die Benzylidenschützung dieser

Positionen. Das Produkt **47** wurde als (R)/(S)- Epimerengemisch (bezogen auf die Konformation der Benzylidengruppe) im Verhältnis (R)/(S) = 0.8:1 erhalten. Die Synthese erfolgte nach Demchenko^[62]. Eine chromatographische Trennung des Gemisches wurde nicht angestrebt und das Gemisch konnte in einer Gesamtausbeute von 70 % erhalten werden. Es folgte die Kupplung mit dem Galactose-Baustein **45**.

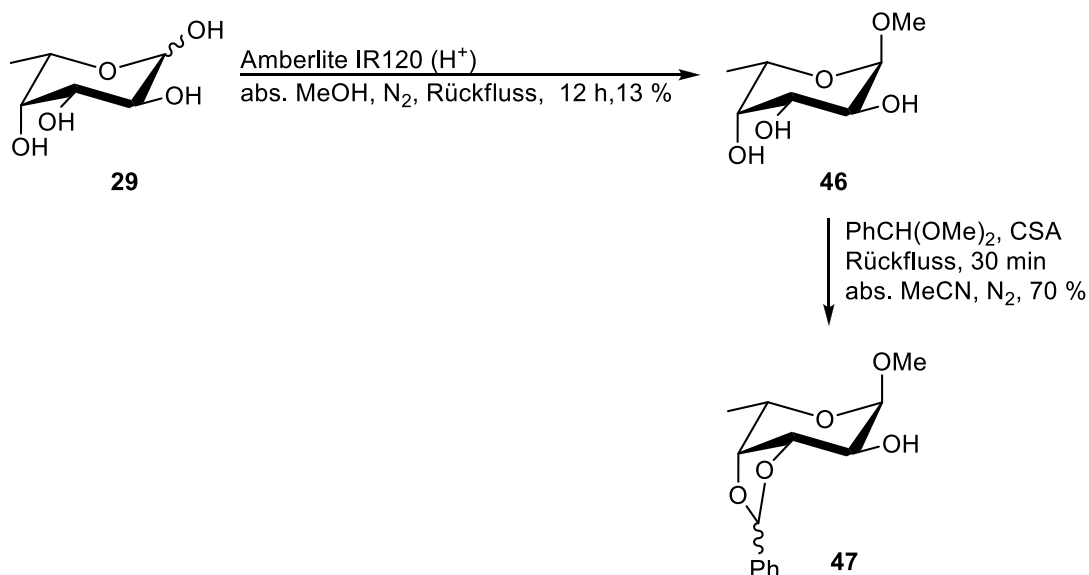


Abbildung 47: Die Darstellung von **47** erfolgte über 3 Stufen. Im ersten Schritt wurde L-Fucose methyliert. Aus der so dargestellten Verbindung **46**^[61] wurde durch Benzylidenschützung nach Demchenko^[62] L-Fucose-Baustein **47** erhalten. Dieser wurde nachfolgend mit dem Galactose-Baustein **45** gekuppelt.

Darstellung des Disaccharids **39**

Die Verknüpfung der beiden Saccharid-Bausteine **45** und **47** erfolgte durch basische Veretherung. Dafür wurde **47** zunächst mit NaH deprotoniert. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe des Galactose-Bausteins **45**. Das Produkt **48** konnte bereits nach 30 Minuten dünnschichtchromatographisch detektiert werden. Um einen vollständigen Umsatz zu erreichen wurde die Reaktion insgesamt für zwölf Stunden gerührt.

Das Produkt konnte nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 26 % erhalten werden.

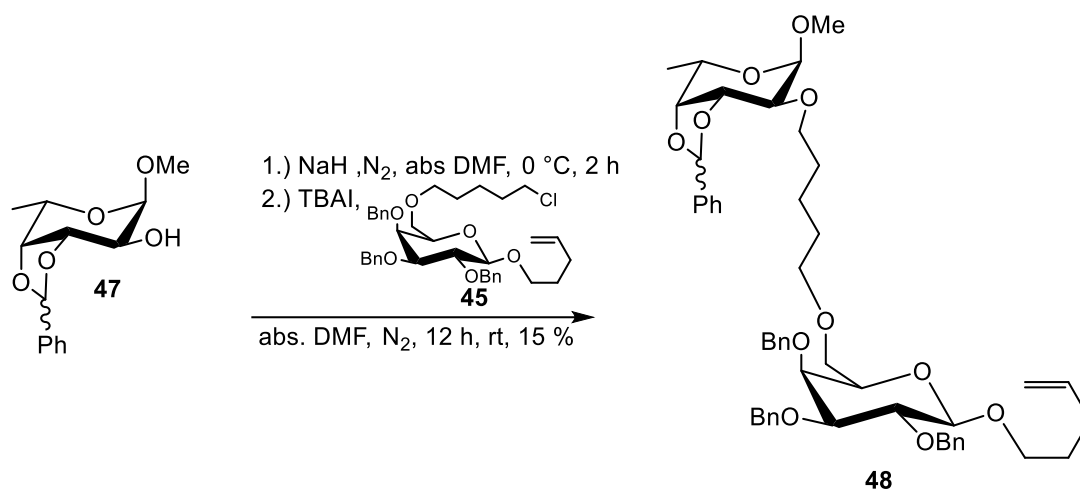


Abbildung 48: Verknüpfung des Galactose-Bausteins **45** mit dem Fucose-Baustein **47** zur Darstellung von Verbindung **48**. Die Kupplung der beiden Saccharid-Bausteine wurde unter basischen Bedingungen durchgeführt.

Nach der erfolgreichen Synthese von **48** erfolgte die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl- und der Benzyliden-Schutzgruppe. Zusätzlich erfolgte die Reduktion der Doppelbindung der Alkenylgruppe. Die gewünschte Zielverbindung **39** wurde nach der Aufarbeitung im Gemisch detektiert.

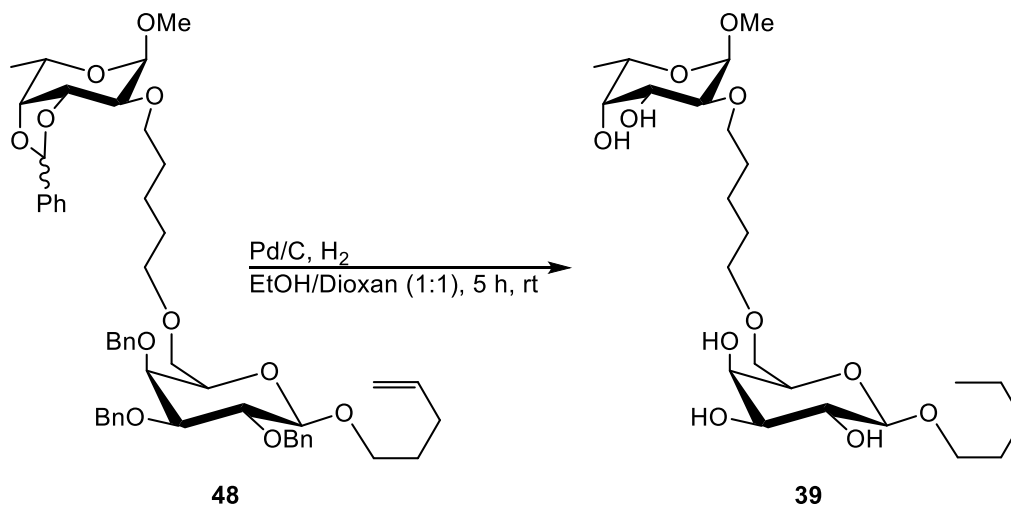


Abbildung 49: Darstellung von **39**. Die Hydrierung wurde mit Pd/C als Katalysator durchgeführt.

5.1.2.1 Darstellung von *n*-Pentyl-6-O-(5-(phenyl- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**28**)

Zur Darstellung des Disaccharids **28** wird wie zur Darstellung des Disaccharids **39**, der Galactosebaustein **45** verwendet.

Darstellung des L-Fucose-Bausteins **52**

Die Darstellung des L-Fucose-Bausteins **52** gelang ausgehend von L-Fucose in sechs Stufen. Für die Darstellung des zweiten L-Fucose-Bausteins sollte eine Glycosylierung an der 1-O-Position erfolgen, zusätzlich sollte die Kupplung mit dem Galactose-Baustein an der 2-O-Position durchgeführt werden. Die Darstellung der tribenzylierten Fucose **45** wurde in Kapitel 5.1.2.1 beschrieben. Nachfolgend gelang die Umsetzung zum Trichloracetimidat **50**. Der Einsatz von Cäsiumcarbonat als Base ermöglichte hierbei eine quantitative Ausbeute des Trichloracetimidates **50**. Dies ist u.a. auf die bessere Löslichkeit von Cäsiumcarbonat im Gegensatz zu anderen Basen wie z.B. Kaliumcarbonat im organischen Lösemittel sowie auf die nicht notwendige säulenchromatographische Reinigung zurückzuführen. Der Reaktionsansatz wurde zur Entfernung der anorganischen Base mehrfach mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Bei diesem Vorgang konnte dünnschichtchromatographisch keine Zersetzung des Trichloracetimidates **50** festgestellt werden. Das auf diese Weise gewonnene Produkt konnte ohne weitere Reinigung direkt in der sich anschließenden Glycosylierungsreaktion eingesetzt werden.

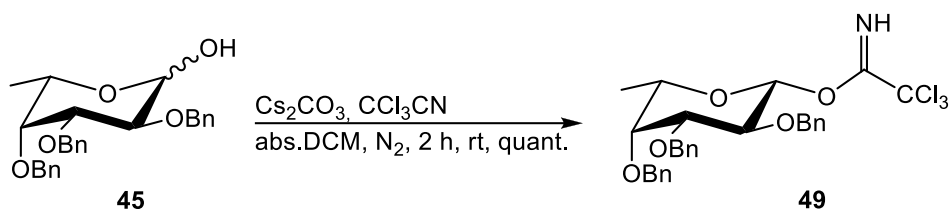


Abbildung 50: Die Darstellung vom Trichloracetimidat **49**, wurde unter thermodynamischer Reaktionskontrolle durchgeführt.

Für die nachfolgende Glycosylierung mit Phenol wurde auf das konventionelle Verfahren von Schimdt *et al.*^[57] zurückgegriffen. Als Aktivator wurden 0.8 eq. TMSOTf bezogen auf **50**, verwendet. Die Reaktion wurde für dreißig Minuten unter strikter Einhaltung der Temperatur bei -20 °C gerührt. Nach dem Neutralisieren und säulenchromatographischer Reinigung konnte **51** in einer befriedigenden Ausbeute von 51 % isoliert werden.

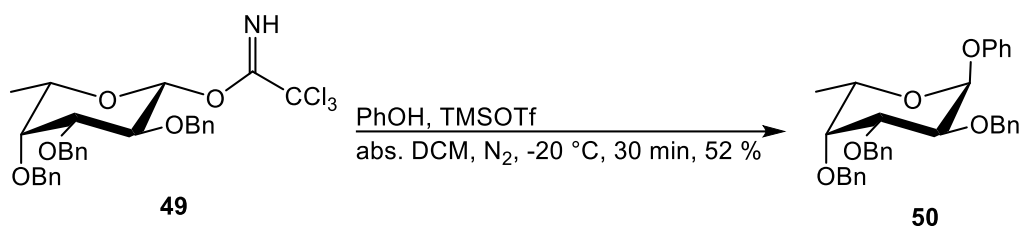


Abbildung 51: Glycosylierungsreaktion zur Darstellung von **50**. Für die Glycosylierung wurde das Trichloracetimidat **50** mit Phenol umgesetzt. Die Reaktion wurde Lewis-sauer mit TMSOTf aktiviert.

Nach Abspaltung der Benzylgruppen durch Hydrogenolyse mit Pd/C als Katalysator im Autoklaven bei 30 bar, wurde das α -Fucosid in einer Ausbeute von 62 % erhalten.

Für die angestrebte Kupplung mit dem Galactose-Baustein **45** in der 2-O-Position wurden die Hydroxylgruppen an Position drei und vier mit der bereits erprobten Benzylidenschutzgruppe versehen. Das Verhältnis des (*R*)- Epimers zum (*S*)- Epimer betrug 0.9:1. Auch hier wurde keine Trennung der Epimere durchgeführt. Das Epimerengemisch wurde in einer Ausbeute von 85 % erhalten.

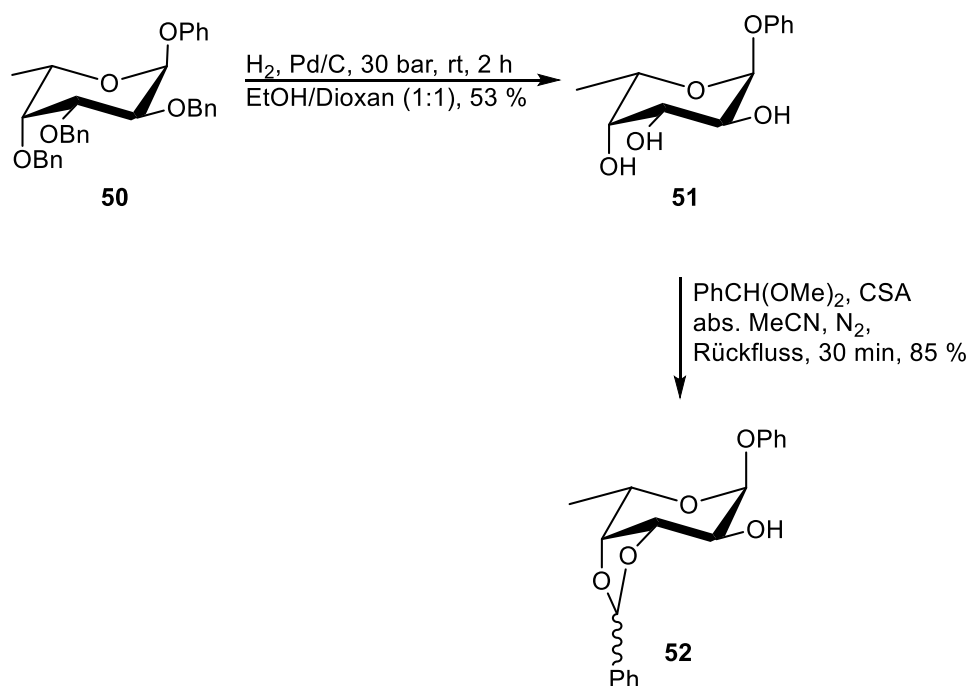


Abbildung 52: Nach erfolgter Hydrogenolyse mit Pd/C als Katalysator wurde **51** benzylidengeschützt.

Darstellung des Disaccharids **28**

Nachfolgend erfolgte die Kupplung des Fucose-Bausteins **52** mit dem Galactose-Baustein **45** ebenfalls unter identischen Bedingungen, wie zur Darstellung des Disaccharids **39**. Das gewünschte Disaccharid **53** konnte nach zweimaliger säulenchromatographischer Reinigung isoliert werden. Die Gesamtausbeute betrug dabei 22 %.

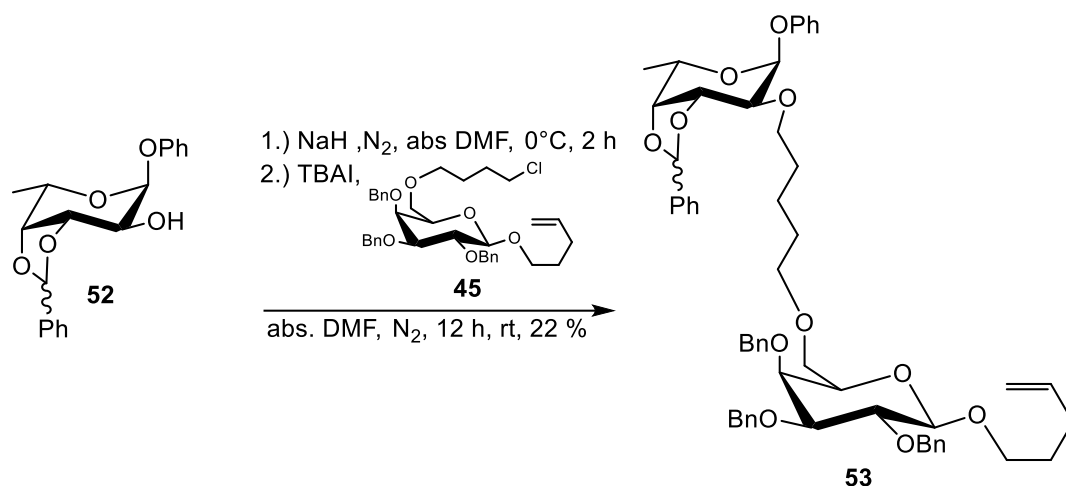


Abbildung 53: Kupplung des Fucose-Bausteins **52** mit dem Galactose-Baustein **45**.

Anschließend wurde analog zur Darstellung von **39** eine Palladium-katalysierte Hydrierung durchgeführt. Diese diente zur Abspaltung der Benzyl- und Benzylidenschutzgruppen sowie zur Reduktion der Doppelbindung. Für eine schnellere Umsetzung wurde die Reduktion mit 30 bar Überdruck durchgeführt. Die gewünschte Zielverbindung **28** wurde nach Aufarbeitung im Gemisch detektiert.

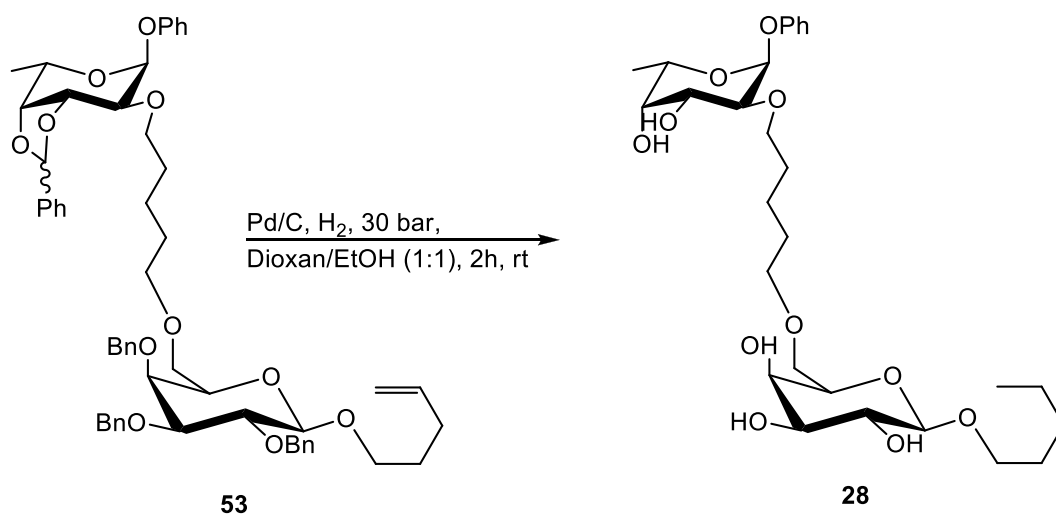


Abbildung 54: Darstellung von **28**. Die Hydrierung wurde mit Pd/C als Katalysator im Autoklaven, bei 30 bar Überdruck durchgeführt.

5.2 Design, Synthese und Analyse von Thiadiazolderivaten als nicht-substratbasierte Inhibitoren der GTB

Aufbauend auf den Ergebnissen von Rademacher *et al.*^[48] gelang es Felix Niemeyer (F. Niemeyer, unveröffentlichte Ergebnisse) durch *Docking*-Experimente, welche den 382-Körper als Grundgerüst enthielten, weitere mögliche nicht-substratbasierte Inhibitoren der GTB zu identifizieren.

Die zu dockenden Strukturen der Zinc-Datenbank^[63] wurden daher nach bestimmten Kriterien gefiltert, u.a. sollten die Strukturen gewerblich erhältlich sein. In Kooperation mit F. Niemeyer wurden anschließend bestimmte Strukturen zur Synthese ausgewählt. Die ausgewählten Strukturen sollten in Hinblick auf eine Kupplung mit Ligand 382 ein Halogen-Acetamidrest enthalten. Ziel war es Ligand 382 mit dem entsprechenden halogensubstituierten Acetamid in einer nucleophilen Substitutionsreaktion umzusetzen, da dies in einer einstufigen Synthese möglich sein sollte. Zur besseren Ansicht ist in Abbildung 55 die retrosynthetische Analyse der gedockten Strukturen dargestellt.

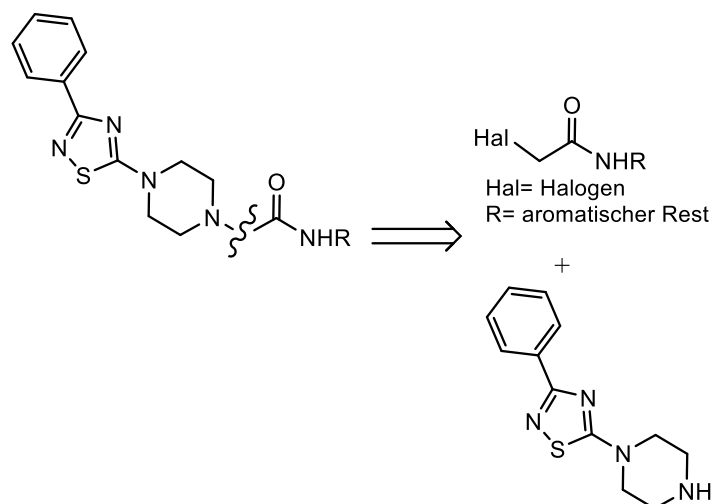
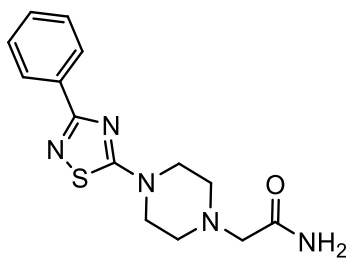
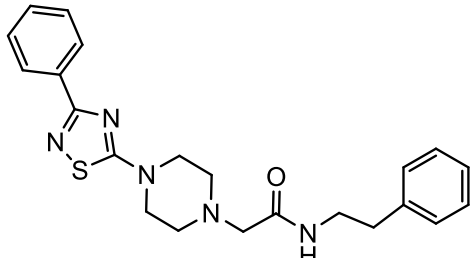
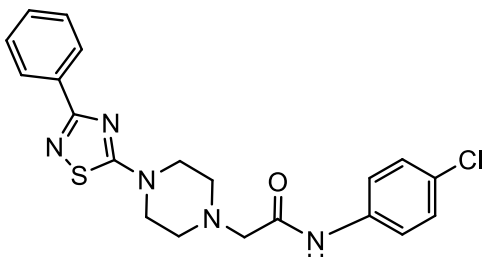
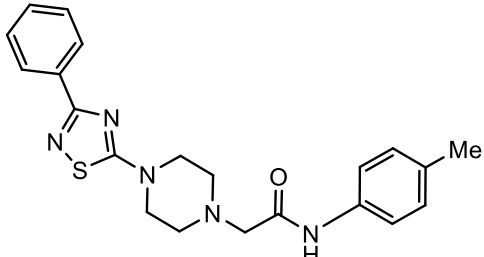


Abbildung 55: Retrosynthetische Analyse zum Aufbau der Thiadiazolderivate. Die Zerlegung ergibt Ligand 382 und einen entsprechend substituierten Halogen-Acetamidrest.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht der Strukturen, die nach den erwähnten Kriterien ausgesucht wurden.

Tabelle 10: Gezeigt sind die zur Synthese ausgewählten Liganden **54**, **55**, **56** und **57**. Diese wurden von F. Niemeyer *in silico* entworfen. Sie leiten sich von Ligand 382 ab.

 54	 55
 56	 57

Für die Darstellung der gewählten Liganden **54**, **55**, **56** und **57** war eine einheitliche Synthesestrategie möglich. Wie geplant war die Darstellung aller Liganden in einer einstufigen Reaktion ausgehend von 382 und dem zu kuppelnden halogensubstituierten Acetamid in einer nucleophilen Substitutionsreaktion möglich.

Als weiteren Substituenten enthielten die gewählten Halogenacetamide einen Aromaten. Diese zeichnen sich durch eine besondere Stabilität unter z.T. drastischen Bedingungen aus.

Ligand 382 wurde daher entsprechend mit 1 bis 2.1 Äquivalenten des zu kuppelnden Acetamids in einer nucleophilen Substitutionsreaktion umgesetzt. Dafür wurden 1 bis 1.1 Äquivalente Cäsiumcarbonat als milde Base verwendet. Die anschließende Darstellung der ausgewählten Liganden verlief in Ausbeuten von 55-84 %.

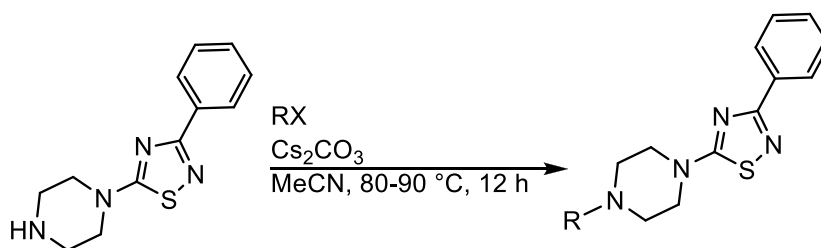


Abbildung 56: Synthese der Thiadiazole **54**, **55**, **56** und **57**. Ligand 382 wurde in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit dem entsprechenden Halogen-Acetamid umgesetzt. R= aromatischer Rest, X= Halogen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Übersicht der eingesetzten Menge an Edukt bei der Darstellung von **54**, **55**, **56** und **57**. Zusätzlich sind die erhaltenen Ausbeuten aufgelistet.

Verbindung	RX	Eingesetzte Menge an Äquivalenten von RX	Ausbeuten
54	$\text{R} = \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---CH}_2\text{---NH}_2$ $\text{X} = \text{I}$ 58	2.1 eq.	56 %
55	$\text{R} = \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---NH---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C}_6\text{H}_5$ $\text{X} = \text{Br}$ 59	1 eq.	84 %
56	$\text{R} = \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---NH---C}_6\text{H}_4\text{---Cl}$ $\text{X} = \text{Br}$ 60	1 eq.	55 %.
57	$\text{R} = \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C(=O)---NH---C}_6\text{H}_4\text{---Me}$ $\text{X} = \text{Br}$ 61	1 eq.	78 %

Zur Entwicklung der geeigneten Reaktionsbedingungen wurde zunächst ein Testansatz zur Darstellung von **54** geführt. Ligand **382** und **58** wurden in Acetonitril aufgenommen und mit Cäsiumcarbonat versetzt. Es wurde für zwölf Stunden bei RT gerührt. Durch dünnschichtchromatographische und massenspektrometrische Kontrolle konnte die Produktbildung von **54** detektiert werden. Um die Reaktion zu beschleunigen wurde anschließend für zwölf Stunden zum Rückfluss erhitzt. Dieses Vorgehen führte zum kompletten Umsatz der eingesetzten Edukte. Nachfolgende Darstellungen der Liganden wurden nur noch unter Rückflussbedingungen unter Variation der eingesetzten Menge an Äquivalenten des Halogenacetamides durchgeführt.

5.2.1 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Um festzustellen ob die synthetisierten Thiadiazolderivate in der Lage sind eine Interaktion mit dem Zielenzym GTB einzugehen, wurden SPR-Bindungsstudien durchgeführt.

SPR ist einzigartig in der Hinsicht, da es unter optimalen Bindungen die Bestimmung von Bindungskonstanten (Affinität) und die kinetische Analyse des Bindungsereignisses in einer Messung ermöglicht. SPR ist eine optische, biosensorische Technik. Ein großer Vorteil der SPR ist, dass es sich um eine *label*-freie Analysenmethode handelt. Zudem handelt es sich im Gegensatz zu STD-NMR (statisches System) um ein strömendes Messsystem, dadurch wird eine bessere Annäherung an ein biologisches System, mit membrangebundenen Enzymen erreicht.

Die SPR beruht auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz. Diese tritt auf, wenn planar polarisiertes Licht von einem Prisma, welches mit einem dünnen Metallfilm (z.B. Gold) beschichtet ist, reflektiert wird.^[64, 65] Unter bestimmten Grundvoraussetzungen (Wellenlänge, Polarisierung und Einfallswinkel) werden die Photonen des polarisierten Lichts von freien Elektronen der Metalloberfläche absorbiert und in Oberflächenplasmonen (elektromagnetische Wellen) umgewandelt. Unter diesen SPR-Bedingungen kommt es zu einem Abfall der Intensität des reflektierten Lichts. Der genaue Winkel ist abhängig vom Brechungsindex sowohl im optisch dichteren als auch im dünneren Medium.

Im SPR-Experiment wird ein Bindungspartner auf einer gold- und matrixbeschichteten Sensorchipoberfläche immobilisiert. Der zweite Bindungspartner wird anschließend über ein internes mikrofluidisches System (*Integrated Fluidic Cartridge* = IFC) über die Chipoberfläche geleitet. Der hier verwendete CM5-Chip besitzt vier identische Flusszellen (Fc1 bis Fc4). Dabei dient eine Flusszelle als Referenzzelle. Diese wird normalerweise nicht oder mit einem nicht aktiven Protein belegt.

Findet ein Bindungsereignis statt, tritt eine Änderung der Resonanzbedingungen auf. Diese spiegelt sich wiederum in messbaren Änderungen des Winkels, bei dem Oberflächenplasmonenresonanz stattfindet wider. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Intensitätsminiums. Dieser Vorgang wird in Echtzeit detektiert. Das dabei aufgezeichnete Signal entspricht der Änderung des SPR-Winkels. Es wird in RU (*response units*) in Form eines Differenzsensorgramms aus Messzelle und Referenzzelle ausgegeben. Die Messung gegen eine Referenzzelle ist zum einen nötig, um spezifische Bindungsereignisse von unspezifischen Bindungsereignissen welche z.B. an der Matrix auftreten können, zu unterscheiden. Zusätzlich dient es der Differenzierung von durch *bulk*-Effekte hervorgerufenen Änderungen im Brechungsindex während der Injektionen. Als *bulk*-Effekt werden Differenzen im Brechungsindex zwischen dem Laufpuffer und der Injektionslösung bezeichnet.

Im Falle des Bindungsereignisses tritt ein Gleichgewichtszustand zwischen den beteiligten Bindungspartnern auf. Liegt ein 1:1 Bindungsereignis vor, lässt sich die thermodynamische Dissoziationskonstante K_D über Vermessung von Konzentrationsreihen bestimmen (Gleichung 2):

$$RU = \frac{RU_{max}[Ligand]}{K_D + [Ligand]} \quad (2)$$

Dabei werden die Gleichgewichtswerte der SPR-Antworten (RU) bestimmt und gegen die Konzentration an gelöstem Liganden [Ligand] aufgetragen.

Alternativ kann die Ermittlung der Bindungseigenschaften durch kinetische Analyse der Messungen erfolgen. Ausgehend von einer einfachen bimolekularen Interaktion, in der ein Ligand [A] mit dem immobilisierten Protein (B) unter Bildung des Komplexes AB interagiert, kann der zeitliche Verlauf der RU-Antwort mit der Zeit (R_t) durch Gleichung 3 beschrieben werden.

$$R_t = \frac{k_{on}[A]B_{max}}{k_{on}[A] + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on}[A] + k_{off})t}\right) \quad (3)$$

Die Konstanten k_{on} und k_{off} beschreiben die Assoziations- und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall des Komplexes AB. Dabei ist R_t proportional zur Menge des gebildeten Komplexes AB. B_{max} beschreibt die maximale Bindungskapazität der Sensorchipoberfläche.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} wird aus dem Abfall der Bindungskurve ermittelt. Aus der Bestimmung der Assoziationsphase ergibt sich der neue Parameter k_{obs} . Dieser wird definiert nach:

$$k_{obs} = k_{on}[A] + k_{off} \quad (4)$$

Bei Auftragung von k_{obs} gegen die Ligandkonzentration [A] ergibt sich aus der Steigung der Geraden k_{on} und aus dem Ordinatenabschnitt k_{off} .

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D erfolgt mittels der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} nach Gleichung 5:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (5)$$

Die Auswertung der thermodynamischen Analyse und der kinetischen Analyse können stark voneinander abweichen. Dies ist u.a. davon abhängig, dass eine kinetische Analyse sehr

sensibel auf Massentransporteffekte (*mass transfer limitation*, MTL) reagieren kann. Ebenso üben *bulk*-Effekte einen starken Einfluß auf das Ergebniss einer Analyse aus. Diese Effekte können somit zu einer Verfälschung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} führen.

5.2.1.1 Methodenentwicklung für die SPR Messungen

Die Untersuchung mittels SPR brachte unerwartet viele Schwierigkeiten mit sich, ursächlich hierfür waren die geringe Löslichkeit der Thiadiazolderivate unzureichende Regenerationsbedingungen und Instabilität des Proteins unter den benötigten Parametern der Messungen. Daher wurden die Messungen auf verschiedenen Chips durchgeführt.

Zunächst wurde GTB auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert (ca 4000 RU). GTB wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Peters (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung des Messsystems wurden UDP als natürliches Donorsubstratanalogon in Konzentrationen von 13.3 μM bis 2 mM vermessen. Als Laufpuffer hierfür wurde MOPS pH 6.7 (SPR-Puffer I) verwendet. GTB benötigt zur Katalyse ein zweiwertiges Kation. Dies kann entweder Mn^{2+} oder Mg^{2+} sein. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit anschließenden STD-NMR Experimenten zu gewährleisten wurde dem Puffer 5 mM Mg^{2+} zugesetzt. Durch die paramagnetische Natur von Mangan ist es nicht für NMR-Experimente geeignet. Der pH-Wert von 6.7 entspricht dem Optimum der Enzymaktivität von GTB. Die Messungen wurden bei 25 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt.

5.2.1.2 SPR Bindungsstudien von UDP

Die Untersuchung von UDP in MOPS pH 6.7 erfolgte im Konzentrationsbereich von 0-2 mM.

Die zugehörigen Sensorgramme und die Anpassung an das *one site binding* Modell sind in Abbildung 57 dargestellt. Betrachtet man die Sensorgramme, zeigt sich ein charakteristisches Verhalten für eine Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Trotz deutlicher Injektionspeaks ist eine Assoziationsphase zu beobachten, diese ist die Kontaktzeit über konstant. Dies erklärt sich durch die Gleichgewichtseinstellung der beiden Bindungspartner. Nach Beendigung dissoziiert der Enzym-Substrat-Komplex sofort wieder, dies spricht für eine schwache Bindung.

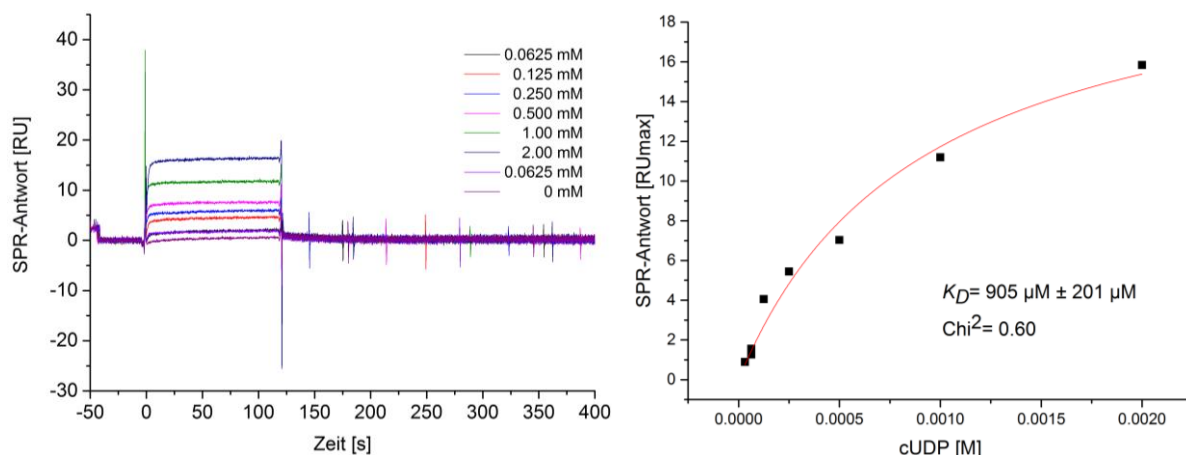


Abbildung 57: Links: Sensorgramme der SPR-Experimente von GTB in Anwesenheit von $13.3 \mu\text{M}$ - 2.00 mM UDP in MOPS-Puffer pH 6.7 mit 5 mM Mg^{2+} als Kation. Gezeigt ist die SPR-Antwort in Abhängigkeit von der Zeit. Die Injektionsspiques zu Beginn und Ende der Injektionsdauer kommen durch leichte Unterschiede zwischen Analyt- und Laufpuffer, sowie durch eine leichte Differenz im Volumen der beobachteten Flusszelle gegenüber der Referenzzelle zustande. Die Referenzzelle besitzt durch das fehlende Protein ein größeres freies Volumen. Trotz des starken Injektionspeaks ist eine deutliche Assoziation erkennbar. Es gibt eine schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen den an der Bindung beteiligten Partnern. Der Enzym-Substrat-Komplex dissoziiert direkt nach Beendigung der Injektion wieder. Dies ist durch den starken Abfall der SPR-Antwort auf Basislinienniveau nach Wechsel auf Laufpuffer bei $t=120 \text{ s}$ erkennbar. **Rechts:** Bindungsisotherme von UDP an GTB. Aufgetragen sind die Konzentrationen von UDP gegen den Maximalwert der SPR-Antwort [RU_{max}]. Gefittet nach dem *one site binding* Modell ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 905 \mu\text{M}$.

Es zeigte sich, dass die zu untersuchenden Liganden sich kaum im Laufpuffer MOPS pH 6.7 (SPR-Puffer I) lösen ließen. Konzentrationen von $50 \mu\text{M}$ präzipitierten bereits. Um eine Löslichkeitsverbesserung zu erzielen wurde daher das Puffersystem überarbeitet. Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 4.5 gesenkt. Da MOPS nur im pH-Bereich von 6.5 bis 7.9 puffert, wurde Acetat als neuer Puffer gewählt; die Ionenstärke wurde beibehalten. Zusätzlich wurden 5 % DMSO als Lösungsvermittler hinzugesetzt (SPR-Puffer III). Der Laufpuffer und die Probenlösungen sollten die gleiche Konzentration an DMSO beinhalten, da DMSO einen hohen Brechungsindex besitzt und so schon kleine Unterschiede deutliche *bulk*-Effekte hervorrufen. Eine 1 %ige Differenz resultiert in einem *bulk*-Effekt von $\sim 1200 \text{ RU}$. Dies bedeutet, dass kleine Differenzen der Konzentration, welche unvermeidbar in der Probenpräparation sind, zu großen Unterschieden in den *bulk*-Effekten der einzelnen Proben führen können. Es gibt die Möglichkeit diese Differenzen durch eine *solvent-correction* auszugleichen. Diese muss bedingt durch die verwendete Biacore®-Messsoftware nach Messung einer Konzentrationsreihe erfolgen und im Messzyklus implementiert sein. Dabei

werden Konzentrationen 4.5-5.8 % DMSO vermessen. Abschließend kann entschieden werden, ob die Messung durch die *solvent-correction* korrigiert werden muss. Zu beachten ist, dass sich die wiederholenden höheren DMSO-Expositionen wie sie bei der *solvent-correction* benötigt werden, negativ auf die Enzymaktivität und Lebensdauer des Enzyms auswirken können.

Da unbekannt war ob GTB noch Aktivität unter diesen neuen nicht-nativen Parametern aufwies, wurden zunächst Messungen mit dem natürlichen Donorsubstrat UDP durchgeführt. Abbildung 58 zeigt eine exemplarische Messung von 13.3 μM - 2 mM UDP in Acetat-Puffer pH 4.5 mit 5 % DMSO, welche nachfolgend auf die Messung von UDP in MOPS pH 6.7 (Abbildung 57) durchgeführt wurde. Eine *solvent-correction* der Daten war nicht notwendig. Jedoch zeigte sich, dass GTB unter diesen neuen Bedingungen eine ca. 3-fach schlechtere Aktivität aufwies. Weitere Messungen an verschiedenen Chips bestätigten diesen Trend, so konnte eine Abnahme der Aktivität bis zum 10 fachen beobachtet werden. Diese lässt sich u.a. dadurch erklären, dass GTB bei einem pH-Wert von 4.5 eine geringere Enzymaktivität aufweist. Ebenso scheinen die höheren DMSO-Konzentrationen der *solvent correction* einen negativen Einfluss zu haben.

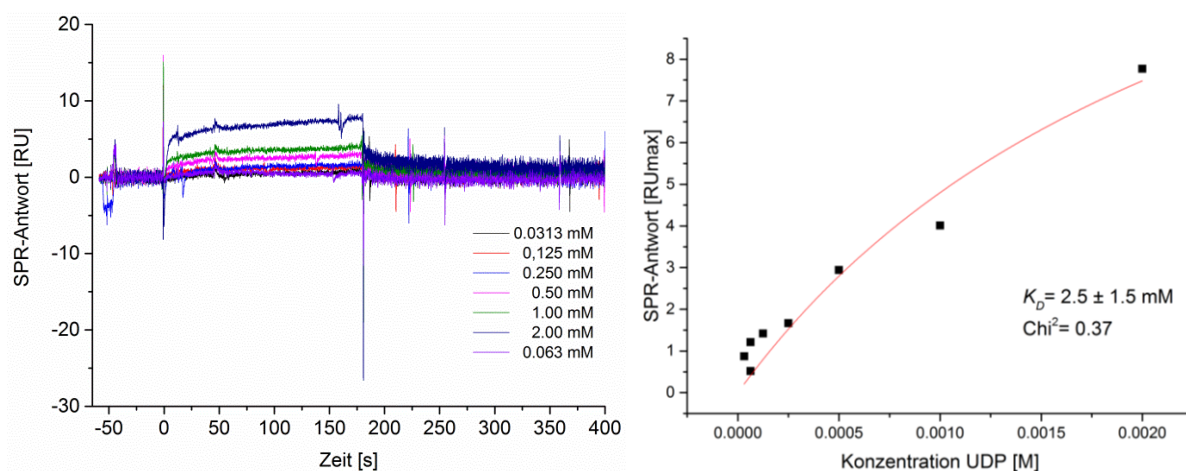


Abbildung 58: Darstellung der von UDP in Acetat pH 4.5 erhalten Sensorgramme (**links**) und der dazu gehörigen Bindungsisotherme (**rechts**). Durch Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2.5 \pm 1.5 \text{ mM}$.

5.2.1.3 SPR Bindungsstudien von 54

Nachdem das Messsystem durch Vermessung von UDP in MOPS pH 6.7 und UDP in Acetat pH 4.5 (5 % DMSO) validiert worden war, erfolgte die Vermessung der Liganden. Nachdem ein Ligand vermessen wurde, erfolgte eine erneute Validierung des Proteins mit UDP in Acetat pH 4.5 (5 % DMSO) um zu gewährleisten, dass das Enzym noch genügend Restaktivität für

weitere Messungen aufwies. War dies nicht der Fall, wurde auf einer neuen Flusszelle erneut GTB immobilisiert und das System wie beschrieben validiert.

Die Untersuchung von **54** erfolgte im Konzentrationsbereich von 0-600 μM . In dem untersuchten Konzentrationsbereich konnte keine spezifische Bindung an GTB beobachtet werden. Dies zeigt sich deutlich am linearen Verlauf der Bindungsisotherme bei Auftragung der SPR-Antworten [RUmax] gegen die Konzentration des Liganden, zudem wird keine Sättigung der Bindungskurve erreicht (Abbildung 59). Eine *solvent-correction* der Daten war daher nicht notwendig. Eine Anpassung an das *one site binding* Modell brachte keine Ergebnisse. Dieses Ergebnis führte dazu, dass Verbindung **54** für weitere Untersuchungen nicht in Frage kam, da nur niedrig μmolare Inhibitoren der GTB näher untersucht werden sollten.

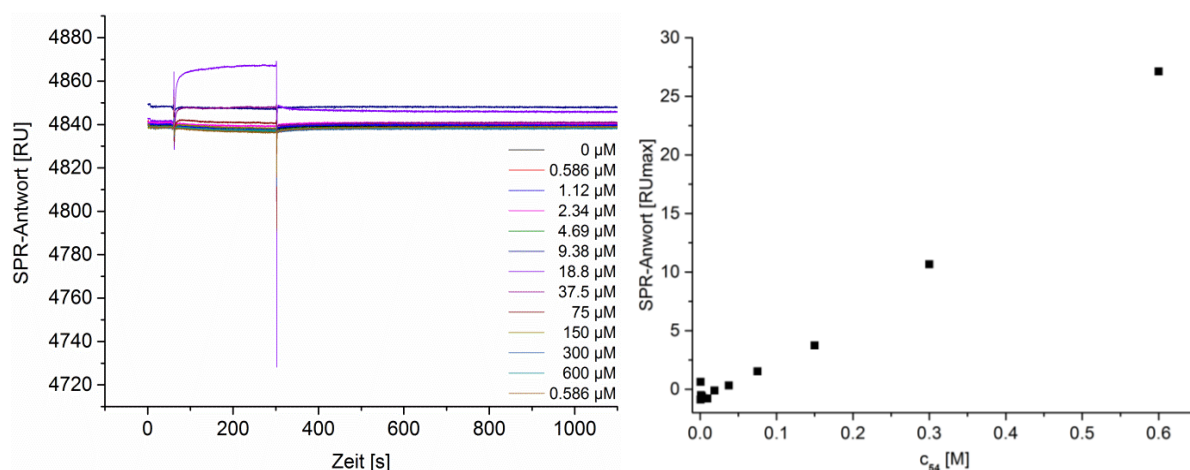


Abbildung 59: Darstellung der von **54** erhaltenen Sensorgramme (**links**) und der dazugehörigen Bindungsisotherme (**rechts**). Eine Dissoziationskonstante durch Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell konnte nicht bestimmt werden.

5.2.1.4 SPR Bindungsstudien von **56**

Testmessungen von **56** zeigten eine starke Assoziation an GTB. Um die Dissoziationsphase in Vorbereitung für weitere Messungen abzukürzen, wurden Regenerationslösungen getestet. Diese sollen den gebundenen Analyten wieder von der Oberfläche entfernen. Idealerweise wird eine vollständige Regeneration ohne Verlust der Bindungsaktivität des immobilisierten Liganden erhalten. Es wurde jeweils mit einem 30 Sekunden Puls bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 10 mM Glycin HCl pH 1.5, 2.0 und 2.5 getestet. Diese Art der Regeneration funktioniert bei einer Vielzahl von Proteinen, da diese bei einem kleinen pH-Wert positiv geladen vorliegen und sich teilweise entfalten. Dadurch stoßen sich die Proteinbindungsstellen voneinander ab und die

gebundenen Moleküle lösen sich. Jedoch erwiesen sich die getesteten Bedingungen als unwirksam.

Daher wurde sich für eine Regeneration mit 0.1 % SDS (30 Sekunden Puls, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) entschieden.

Die Untersuchung von **56** erfolgte im Konzentrationsbereich von 0-12 μM . Die Konzentrationen von 6 und 12 μM wiesen unspezifische Wechselwirkungen auf. Sie wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Eine *solvent-correction* der Daten war nicht notwendig. In Abbildung 60 sind die Sensorgramme (links) und die Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts) gezeigt.

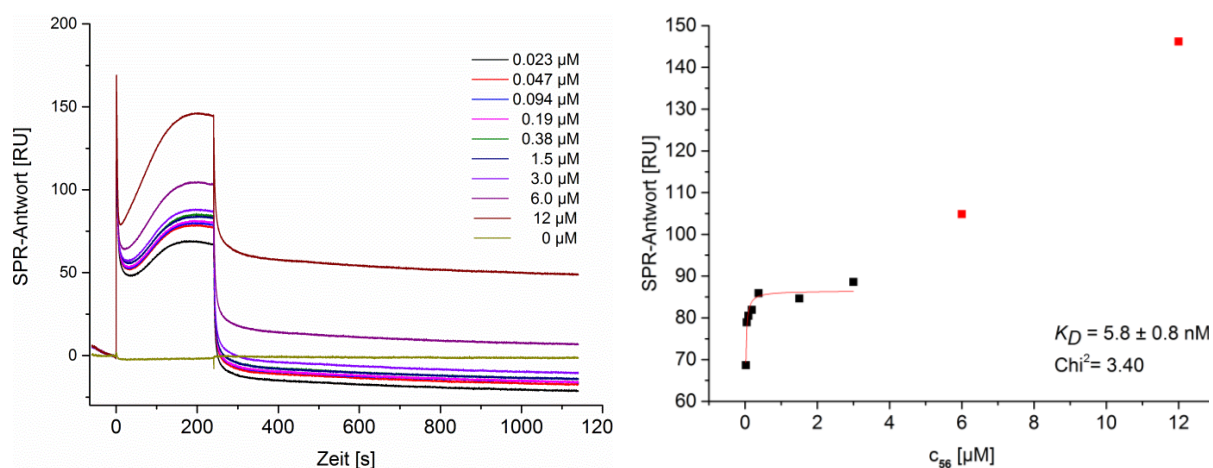


Abbildung 60: Darstellung der von **56** erhaltenen Sensorgramme (**links**) und der dazugehörigen Bindungsisotherme (**rechts**). Durch Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 5.8 \pm 0.8$ nM.

Nach Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 5.8 \pm 0.8$ nM. Deutlich in Abbildung 60 (links) zu erkennen ist ein Abfall des Verlaufs der Basislinien, zusätzlich bleibt das Niveau der Basislinie unterhalb der Messung von 0 μM . Dies deutet auf eine zunehmende Denaturierung des Proteins hin.

Nachfolgend wurde eine kinetische Analyse mit dem Programm *Origin 9.1* durchgeführt. Durch den DMSO-haltigen Puffer ist ein sehr starker *bulk*-Effekt sichtbar. Dieser wirkte sich nachteilig auf einen möglichen *fit* der Kurven aus. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden daher die betroffenen Teile der jeweiligen Kurve nicht in die Bestimmung der *fits* einbezogen. Die Grenzen wurden dabei willkürlich so gesetzt, dass sie einen möglichst guten *fit* der Kurven gewährleisten.

Exemplarisch ist in Abbildung 61 (links) der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} dargestellt. Um einen *fit* der Assoziation zu gewährleisten wurde ein virtueller Nullpunkt in den Kurven gesetzt. Um eine Abschätzung für k_{off} zu erhalten, wurden die erhaltenen Dissoziationskurven zusätzlich basislinien-korrigiert (Abbildung 61, rechts).

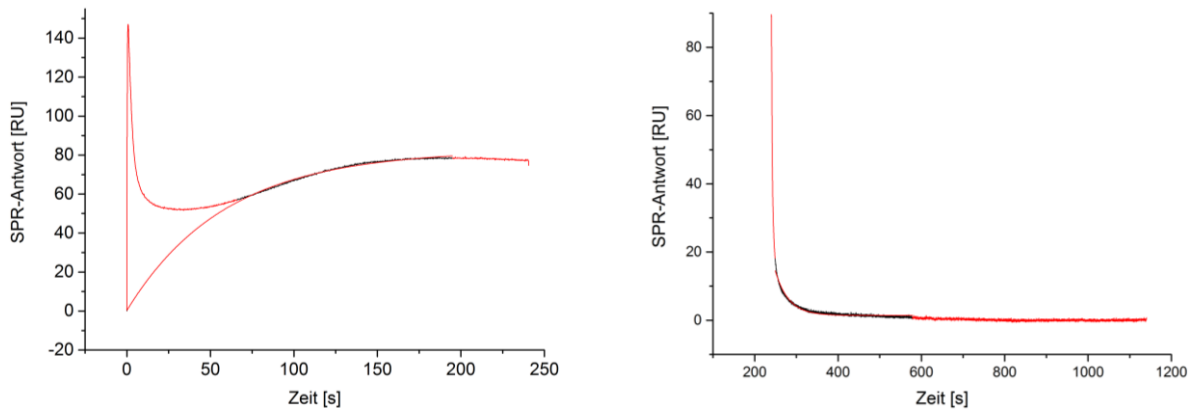


Abbildung 61: Beispielhafte Darstellung der Assoziationsphase (**links**) und der Dissoziationsphase (**rechts**) von **56** bei $c = 0.047 \mu\text{M}$. k_{off} und k_{obs} wurden durch Anpassung an eine exponentielle Funktion (*ExpDecay1*, Origin) erhalten.

Hieraus ergaben sich für die Konzentrationen von $0.023 \mu\text{M}$ bis $3 \mu\text{M}$ Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{off} zwischen 0.031 und 0.025 s^{-1} . Tabelle 12 enthält nachfolgend eine Übersicht der ermittelten Werte für k_{off} und k_{obs} . Die Bestimmung von k_{on} aus k_{obs} ergab negative Werte für k_{on} . Eine Bestimmung für K_D nach Gleichung 5 war auf diesem Wege nicht möglich.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Übersicht der erhaltenen Daten für k_{off} und k_{obs} für **56** im Konzentrationsbereich von 0.023 μM bis 3 μM .

C_{56} [μM]	t_{off} [s]	k_{off} [s^{-1}]	t_{on} [s]	k_{obs} [s^{-1}]
0.023	32.55	0.031	54.00	0.019
0.047	32.14	0.031	58.76	0.017
0.094	34.59	0.029	59.30	0.017
0.19	38.42	0.026	58.85	0.017
0.38	40.13	0.025	60.73	0.016
1.5	37.67	0.027	57.92	0.017
3.0	36.46	0.027	59.13	0.017

Daher wurden nachfolgend die ermittelten Werte für k_{obs} gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen. Die Steigung der Kurve lieferte ein k_{on} von 49.45 $\text{L/mol}\cdot\text{s}$ der Ordinatenabschnitt entspricht $k_{off} = 0.017 \text{ s}^{-1}$. Die nach Gleichung 4 ermittelte Dissoziationskonstante beträgt $K_D = 341.8 \mu\text{M}$.

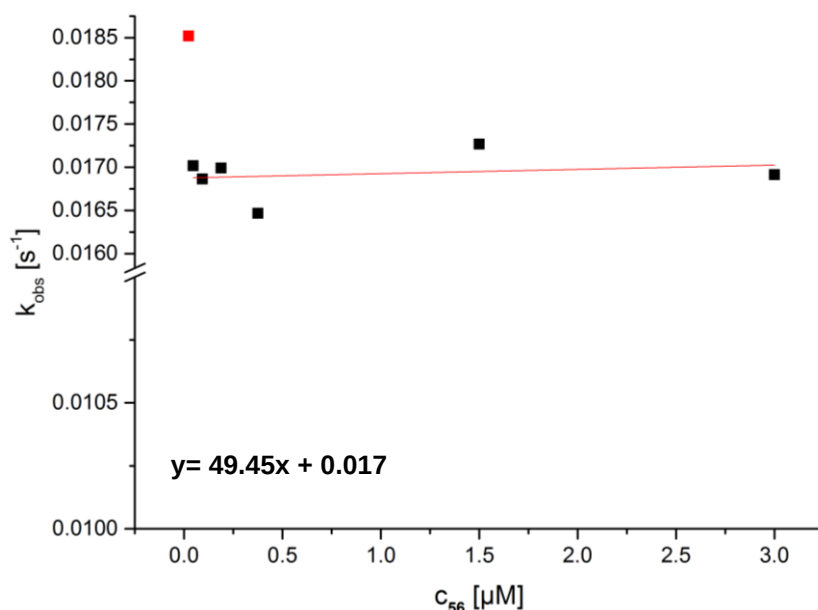


Abbildung 62: Ermittlung von k_{on} und k_{off} durch lineare Regression. Die ermittelten Werte von k_{obs} wurden gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse ergibt einen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von $k_{\text{off}} = 0.017 \text{ s}^{-1}$. Die Steigung ergibt einen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von $k_{\text{on}} = 49.45 \text{ L M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die daraus resultierende Dissoziationskonstante wurde zu $K_D = 341.8 \mu\text{M}$ bestimmt. Der Wert bei $c = 0.023 \mu\text{M}$ wurde für den *fit* nicht berücksichtigt, da eine zu große Abweichung zu den anderen Werten bestand. Die große Abweichung kommt dadurch zustande, dass bei kleineren Konzentrationen kleinere RU-Antworten erreicht werden, wodurch der *bulk*-Effekt viel stärker zum Tragen kommt.

5.2.1.5 SPR Bindungsstudien von **55**

Die Untersuchung von **55** erfolgte im Konzentrationsbereich von 0-12 μM . Es wurde mit einem Regenerationspuls von 30 Sekunden 0.01 % SDS regeneriert. Die Konzentrationen von 3, 6 und 12 μM wiesen eine unspezifische Wechselwirkung auf. Sie wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Auch die Wiederholungsmessung von 0.0234 μM konnte aufgrund unvollständiger Regeneration nicht berücksichtigt werden. Eine *solvent-correction* der Daten war nicht notwendig. In Abbildung 63 sind die Sensorgramme (links) und die Anpassung an das *one site binding* Modell (rechts) gezeigt.

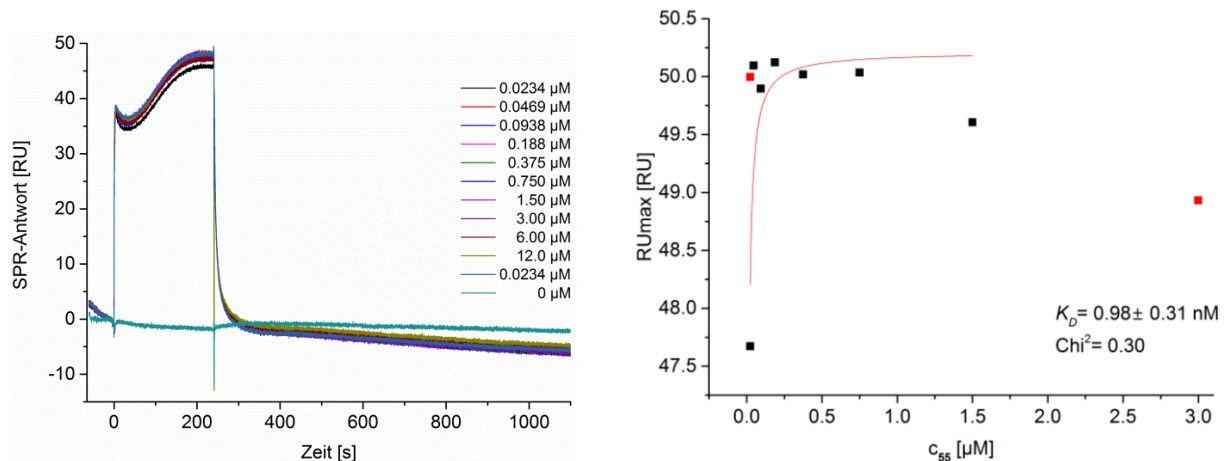


Abbildung 63: Darstellung der von **55** erhaltenen Sensorgramme (**links**) und der dazugehörigen Bindungsisotherme (**rechts**). Durch Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 0,98 \pm 0,31$ nM.

Nach Anpassung der Daten an das *one site binding* Modell ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 0,98 \pm 0,31$ nM.

Die hier gewählten Regenerationsbedingungen sind zwar weniger harsch als bei **56**, jedoch ist immer noch ein Abfall der Basislinie zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass das Protein unter den gewählten Bedingungen nicht über mehrere Messungen stabil ist. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass im linearen Teil der Bindungsisotherme ein Abfall der RU-Antworten zu verzeichnen ist. Ebenso konnte auch keine vollständige Regenerierung erreicht werden, was sich in einem Anstieg der Basislinie zu Beginn und Ende der einzelnen Messungen zeigte. Dies wurde in der gezeigten Abbildung 63 korrigiert.

Analog zu **56** wurde eine kinetische Analyse durchgeführt. In Abbildung 64 (**links**) ist exemplarisch der *fit* der Assoziationsphase zur Bestimmung von k_{obs} dargestellt. Im Gegensatz zu **56** war der *bulk*-Effekt deutlich weniger ausgeprägt, sodass mehr Datenpunkte zur Bestimmung des *fits* herangezogen werden konnten. Um einen *fit* der Assoziation zu gewährleisten wurde ebenfalls ein virtueller Nullpunkt in den Kurven gesetzt. Um eine Abschätzung für k_{off} zu erhalten wurden die erhaltenen Dissoziationskurven basislinienkorrigiert (Abbildung 64, **rechts**).

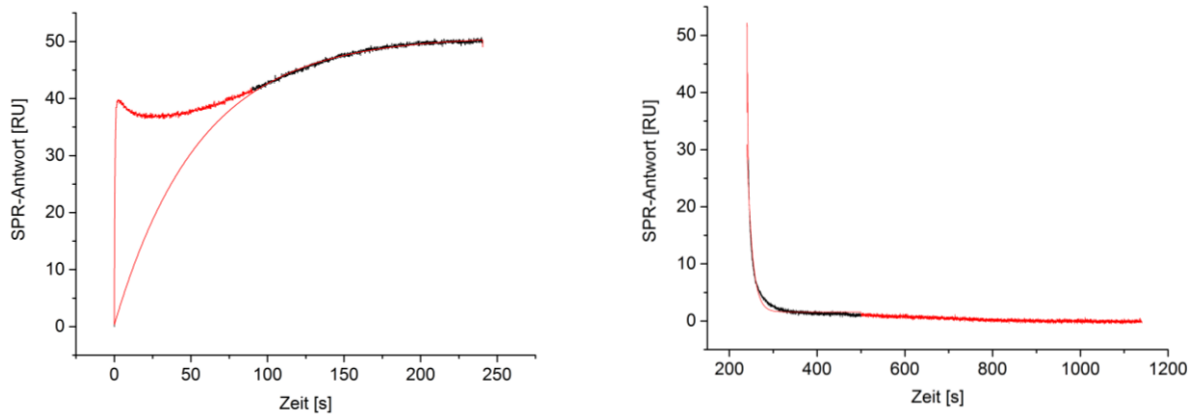


Abbildung 64: Beispielhafte Darstellung der Assoziationsphase (**links**) und der Dissoziationsphase (**rechts**) von **55** bei $c = 0.047 \mu\text{M}$. k_{off} und k_{obs} wurden durch Anpassung an eine exponentielle Funktion (*ExpDecay1, Origin*) erhalten.

Hieraus ergaben sich für die Konzentrationen von $0.023 \mu\text{M}$ bis $1.5 \mu\text{M}$ Werte für die Geschwindigkeitskonstante k_{off} zwischen 0.031 s^{-1} und 0.025 s^{-1} . Tabelle 13 enthält nachfolgend eine Übersicht der ermittelten Werte für k_{off} und k_{obs} . Die Bestimmung von k_{on} aus k_{obs} ergab negative Werte für k_{on} . Eine Bestimmung für K_D nach Gleichung 5 war auf diesem Wege nicht möglich.

Tabelle 13: Übersicht der erhaltenen Daten für k_{off} und k_{obs} für **55** im Konzentrationsbereich von $0.023 \mu\text{M}$ bis $1.5 \mu\text{M}$

$c_{55} [\mu\text{M}]$	$t_{\text{off}}[\text{s}]$	$k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]$	$t_{\text{on}}[\text{s}]$	$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]$
0.023	11.52	0.087	56.01	0.018
0.047	12.02	0.083	55.37	0.018
0.094	12.52	0.080	56.67	0.018
0.19	11.79	0.085	54.71	0.018
0.38	11.62	0.086	55.05	0.018
0.75	12.11	0.083	56.00	0.018
1.5	11.52	0.087	54.33	0.018

Auch für **55** wurden nachfolgend die ermittelten Werte für k_{obs} gegen die Ligandkonzentrationen aufgetragen. Die Steigung der Kurve lieferte ein k_{on} von 269.96 L/s·mol, der Achsenabschnitt entspricht $k_{off} = 0.018 \text{ s}^{-1}$. Die nach Gleichung 4 ermittelte Dissoziationskonstante beträgt $K_D = 66.3 \text{ }\mu\text{M}$.

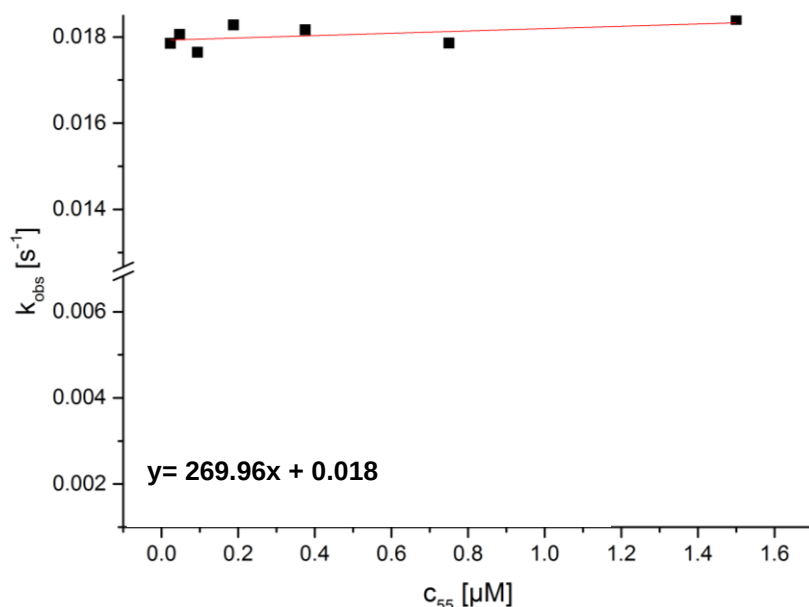


Abbildung 65: Ermittlung von k_{on} und k_{off} durch lineare Regression. Die ermittelten Werte von k_{obs} wurden gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse ergibt einen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von $k_{off} = 0.018 \text{ s}^{-1}$. Die Steigung ergibt einen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von $k_{on} = 269.96 \text{ L M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die daraus resultierende Dissoziationskonstante wurde zu $K_D = 66.3 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt.

5.2.2 Kompetitive STD-NMR-Experimente der Thiadiazolderivate

Die Ergebnisse der SPR-Studien lassen die Aussage zu, dass die Thiadiazole **55** und **56** in der Lage sind, an GTB zu binden. Zur Verifizierung der Dissoziationskonstanten, welche in den SPR-Studien ermittelt werden konnten, wurden kompetitive *Saturation Transfer Difference* (STD)-NMR Messungen durchgeführt. Die Dissoziationskonstante des Thiadiazols **57**, welches nicht durch SPR untersucht wurde, sollte ebenfalls durch kompetitive STD-NMR bestimmt werden.

Mittels kompetitiver STD-Messung kann durch die vorliegende Konkurrenzsituation ermittelt werden, ob die Thiadiazolderivate dieselbe Bindungstasche wie das natürliche Donorsubstrat belegen. Wird ein STD Effekt des bekannten Binders detektiert, der sich abhängig von der Inhibitorkonzentration abschwächt, kann davon ausgegangen werden, dass durch die

vorliegende Konkurrenzsituation dieselbe Bindungstasche besetzt wird. Der entgegengesetzte Fall würde darauf hindeuten, dass der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms bindet. Dabei wird durch schrittweise Zugabe des Kompetitors der Binder aus der Bindungstasche verdrängt.

Die STD-NMR erlaubt dabei, die Beobachtung der Bindung eines niedermolekularen Liganden an ein Protein. Das Bindungsereignis wird dabei aus Ligandsicht betrachtet.

Ursächlich für den STD- Effekt ist eine Übertragung der selektiven Proteinsättigung auf den Liganden. Diffundiert der gesättigte Ligand wieder in Lösung, kann dieser Zustand detektiert werden. Für kleine Moleküle liegt die Zeitkonstante der $T1/T2$ -Relaxation in der Größenordnung von einer Sekunde. Die Übertragung der Sättigung vom Protein zum Liganden erfolgt in etwa 100 ms. Bei einer schnellen Kinetik und einem großen Ligandüberschuss kann durch mehrmaliges Belegen derselben Bindungstasche mit unterschiedlichen Liganden Sättigung in Lösung akkumuliert und detektiert werden.^[66]

Ein STD-Spektrum wird durch Differenzbildung eines *on-resonance*- und eines *off-resonance* Spektrums erzeugt. Im *on-resonance* Spektrum sind die Ligandsignale durch die Sättigungsübertragung vom Protein vermindert. Im *off-resonance* Experiment wird der Sättigungspuls ebenfalls eingestrahlt, jedoch außerhalb des Messbereiches wodurch keine Proteinsättigung erzeugt wird. Die Einstrahlung des *off-resonance* Sättigungspulses ist nötig, um Differenzartefakte durch Temperaturschwankungen zu vermeiden.

Es sei erwähnt, dass im Falle der Thiadiazole von einer starken Wechselwirkung mit langsamer Kinetik auszugehen war. Dies hätte zu Problemen bei der Analyse mittels „klassischer“ STD-NMR führen können. Bei Durchführung einer kompetitiven STD-Analyse werden diese Probleme vermieden, da nur die Kinetik des vorgelegten Kompetitors für die beobachteten Signale von Bedeutung ist.

Zudem ermöglicht eine kompetitive STD-Messung, die Bestimmung des konzentrationsabhängigen IC_{50} -Wertes des Kompetitors in Anwesenheit eines bekannten Binders. Daraus resultierend erfolgt die Bestimmung der inhibitorischen Konstante K_I .

Die Bestimmung des IC_{50} und des K_I -Wertes erfolgt durch Umformung der Cheng-Prusoff-Gleichung^[67] (Gleichung 6). Mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung wird die Korrelation zwischen K_I und dem IC_{50} -Wert beschrieben. Der K_I -Wert ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Protein-Inhibitor-Komplexes. Je niedriger er ist, desto stärker bindet die untersuchte Substanz an das Protein. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M gibt die Substratkonzentration an, bei der für das untersuchte System die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist ($v = \frac{1}{2} v_{max}$). K_M gibt damit die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren der an der Reaktion beteiligten Enzyme besetzt ist.

Unter Kenntnis der Ligandkonzentration $[Ligand]$ und K_M kann der K_I für das beobachtete System bestimmt werden.

$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{K_M}{[Ligand]} \right) \quad (6)$$

Umgeformt nach K_I ergibt sich:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_M}{[Ligand]}} \quad (7)$$

Die Dissoziationskonstante K_D stellt einen Grenzfall der Michaelis-Menten-Konstante K_M dar. K_M ist nach Gleichung 8 definiert.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8)$$

Im Falle einer kompetitiven Hemmung gilt $k_2 \ll k_{-1}$, somit ist k_2 vernachlässigbar und Gleichung 8 wird zu:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_D \quad (9)$$

Dieser Ausdruck für K_M wird als Dissoziationskonstante K_D bezeichnet. Daraus ergibt sich für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes:

$$IC_{50} = K_I \left(1 + \frac{K_D}{[Ligand]} \right) \quad (10)$$

Wie auch bei den SPR-Studien konnte aufgrund der geringen Löslichkeiten der zu untersuchenden Liganden (**55**, **56** und **57**) kein „klassischer“ Ansatz einer STD-Titration durchgeführt werden, zudem bedurfte es einiger Ansätze der Optimierung verschiedener Parameter, die nachfolgend erläutert werden. **54** wurde nicht weiter untersucht, da der zu erwartende K_I -Wert im millimolaren Bereich liegt.

Im Falle einer klassischen NMR-Titrationsreihe mit z.B. Sacchariden erfolgt die schrittweise Zugabe aus einer hochkonzentrierten Stammlösung zu einem einzigen NMR-Röhrchen. Dieser Ansatz konnte hier nicht durchgeführt werden. Denn um eine Annäherung an physiologische Bedingungen zu erreichen wurde der pH-Wert auf 5.0 (dies entspricht einem korrigierten pD-Wert von pD 5.4, der abgelesene pH-Wert muss um den Wert 0.4 korrigiert werden, da in deuteriertem Puffer gemessen wurde)^[68] erhöht, wodurch sich jedoch die Löslichkeit der Liganden noch weiter herabsenkte.

NMR-Konzentrationsversuche in reinem Puffer zeigten, dass z.T. kein Ligand bzw. nur nanomolare bis niedrig mikromolare Mengen der Liganden in Lösung gingen. Daher wurde weiterhin DMSO als Lösungsvermittler benötigt.

Um eine Vergleichbarkeit mit den SPR-Ergebnissen zu erreichen, wurde eine konstante Konzentration von 5 % DMSO- d_6 pro Messpunkt gewählt. Das Gesamtvolumen der Probe betrug dabei 180 μL . Um dies zu erreichen, wurde der Ligand in DMSO- d_6 gelöst. Die benötigten Verdünnungsreihen wurden ebenfalls mit DMSO- d_6 angesetzt. Um die Konzentration von 5 % DMSO nicht zu überschreiten, wurden die benötigten Titrationsreihen nicht wie im „klassischen Fall“ in einem einzigen NMR-Röhrchen durchgeführt, sondern es wurde pro Messpunkt je ein Röhrchen mit der benötigten Menge GTB und UDP als zu verdrängender Ligand angesetzt.

Zunächst wurden die benötigten Mengen von GTB und UDP einzeln pro Messpunkt in ein Röhrchen pipettiert. Es zeigten sich jedoch minimale Abweichungen der UDP-Konzentrationen, welche durch den Standardfehler der Pipette^[69] erklärt werden können. Daher wurde das Vorgehen dahingehend optimiert, dass eine Stammlösung bestehend aus den benötigten Konzentrationen von GTB und UDP vorab hergestellt wurde und diese auf die einzelnen Röhrchen aufgeteilt wurde. Durch dieses Vorgehen konnte eine gleichbleibende Konzentration von UDP gewährleistet werden. Das Gesamtvolumen wurde dabei je Probe auf 171 μL festgesetzt.

Um das Endvolumen von 180 μL zu erreichen, wurden im Anschluss 9 μL der zu untersuchenden Ligandlösung zugegeben. Dabei war zu beachten, dass der Ligand in einer entsprechend höheren Konzentration in purem DMSO- d_6 gelöst war, damit die Endkonzentration von 5 % DMSO im NMR-Röhrchen eingehalten werden konnte. Die Konzentration der Stammlösungen der Liganden wurde durch Bestimmung des S/N-Verhältnisses per NMR bestimmt. Als Vergleichssubstanz diente eine 2 mM Sucroslösung (D_2O). Bei den Liganden handelt es sich um *para*-substituierte Aromaten. Durch die daraus resultierende magnetische Inäquivalenz der Protonen ergeben sich Spektren höherer Ordnung, dieser Effekt wird durch DMSO- d_6 noch verstärkt. Die erwartete Signalintensität ist deswegen niedriger als erwartet. Dieser Effekt muss bei der Bestimmung des S/N-Verhältnisses beachtet werden. Daher wurden die bestimmten S/N-Verhältnisse der Liganden mit einem empirisch bestimmten Faktor von 1.7 korrigiert.

Zu erwähnen ist noch, dass es nicht möglich war einen 5 %-DMSO-haltigen Puffer zu verwenden, da die Dialysemembranen (Amicon®) welche für das Umpuffern der GTB in NMR-Puffer benötigt wurden, nicht DMSO-beständig sind.

Weiterhin wurde das Verhältnis der UDP- zu Proteinkonzentration optimiert. In ersten Ansätzen wurde mit einer höheren Proteinkonzentration von 14 μM GTB und einer sich daraus ergebenden Rezeptorbelegung von $r = 0.9$ gearbeitet. Die daraus resultierenden Messungen bewiesen ein kompetitives Verhalten, jedoch waren Bestimmungen des IC_{50} -Wertes nicht eindeutig möglich. Daher wurde für die nachfolgenden Messungen das Verhältnis der UDP- zu Proteinkonzentrationen auf $r = 0.4$ gesenkt. Dies bewirkte indirekt eine Erhöhung des Ligandüberschusses und ermöglichte so die eindeutige Bestimmung des IC_{50} - und des K_I -Wertes.

Die für die folgenden Messungen verwendeten Protein- und Ligandkonzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Der Bereich der untersuchten Ligandkonzentration wurde so gewählt, dass die höchstmögliche Konzentration der zu untersuchenden Liganden unter den gewählten Parametern vermessen werden konnte. Die gemessenen Spektren wurden mit einer *watergate* Wasserunterdrückung aufgenommen.

Tabelle 14: Übersicht der für die kompetitiven STD-Titrations verwendeten UDP-, Protein- und Ligandkonzentrationen sowie der daraus resultierenden berechneten Rezeptorbelegung r bei einem K_D von 0.43 mM für UDP.

Ligand	Konzentration UDP [mM]	Konzentration GTB [μM]	r	Konzentration Ligand [μM]
55	0.33	4.5	0.4	14.3-0.111
56	0.33	2.8	0.4	17.3-0.539
57	0.33	4.5	0.4	7.31-0.229

55 wurde mit 512 *scans* vermessen. Die logarithmische Auftragung der Konzentration von **55** gegen die abs. STD% des H-1' Protons von UDP lieferte nach Anpassung mit dem *one site competition* Modell eine mittlere Inhibitorische Konzentration von $IC_{50} = 25.8 \mu\text{M}$. Nach Gleichung 6 ergibt sich dadurch für **55** eine inhibitorische Konstante von $K_I = 14.6 \mu\text{M}$.

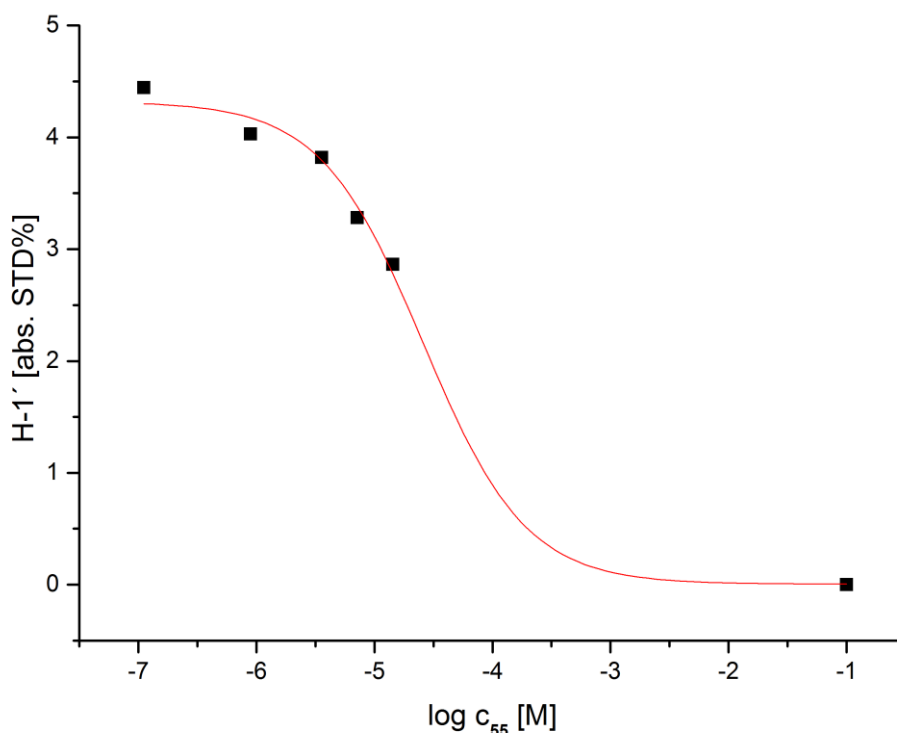


Abbildung 66: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **55** in Gegenwart von 4.5 μ M GTB und 0.33 mM UDP mittels STD-NMR. Gezeigt ist die Auftragung der absoluten STD% (H-1') gegen die logarithmische Konzentration von **55**. Unter Verwendung des *one site competition* Modells wurde ein Wert von IC_{50} = 25.8 μ M bestimmt. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung wurde der IC_{50} -Wert in den K_i umgerechnet. Der K_i wurde zu K_i = 14.6 μ M bestimmt. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei $\log c$ = -1 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil.

Das inhibitorische Potential von **56** wurde ebenfalls untersucht. Allerdings wurde **56** mit 1k scans vermessen, da sich das S/N-Verhältnis mit 512 scans als nicht zufriedenstellend erwies. Zudem zeigte sich, dass die höchste angestrebte Konzentration von 17.3 μ M nicht erreicht werden konnte, da bei dieser Konzentration der Ligand präzipitierte. Der Messpunkt wurde für die nachfolgende Auswertung nicht miteinbezogen. Die logarithmische Auftragung der Konzentration von **56** gegen die abs. STD% des H-5 Protons von UDP lieferte nach Anpassung mit dem *one site competition* Modell eine mittlere Inhibitorische Konzentration von IC_{50} = 14.5 μ M. Nach Gleichung 6 ergibt sich dadurch für **56** eine inhibitorische Konstante von K_i = 8.2 μ M.

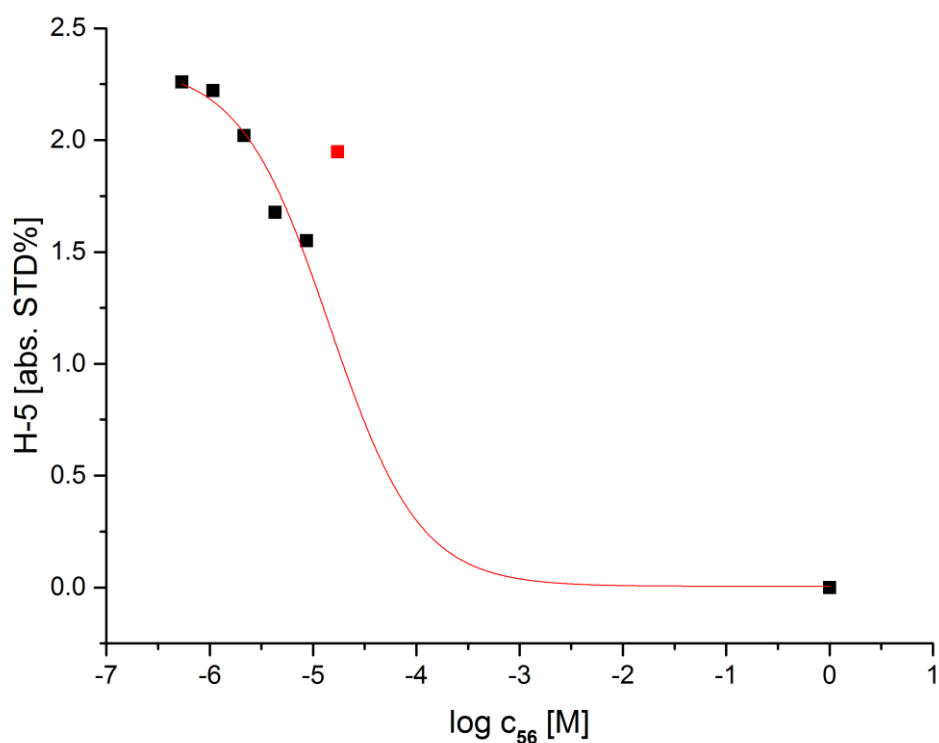


Abbildung 67: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **56** in Gegenwart von 2.8 μM GTB und 0.33 mM UDP mittels STD-NMR. Gezeigt ist die Auftragung der absoluten STD% (H-5) gegen die logarithmische Konzentration von **56**. Unter Verwendung des *one site competition* Modells wurde ein Wert von $IC_{50} = 14.5 \mu\text{M}$ bestimmt. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung wurde der IC_{50} -Wert in den K_i umgerechnet. Der K_i wurde zu $K_i = 8.2 \mu\text{M}$ bestimmt. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei $\log c = 0$ gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil. Der Wert mit der Konzentration $c = 17.3 \mu\text{M}$ (entspricht $\log c = -4.76$) wurde für die Anpassung nach dem *one site competition* Modell ignoriert, da die Löslichkeit des Liganden überschritten wurde. Die Löslichkeitsüberschreitung führte zur Präzipitation des Liganden.

57 wurde ebenfalls mit 1k scans vermessen. Die logarithmische Auftragung der Konzentration von **57** gegen die abs. STD% des H-5 Protons von UDP lieferte nach Anpassung mit dem *one site competition* Modell eine mittlere Inhibitorische Konzentration von $IC_{50} = 21.8 \mu\text{M}$. Nach Gleichung 6 ergibt sich dadurch für **57** eine inhibitorische Konstante von $K_i = 12.3 \mu\text{M}$.

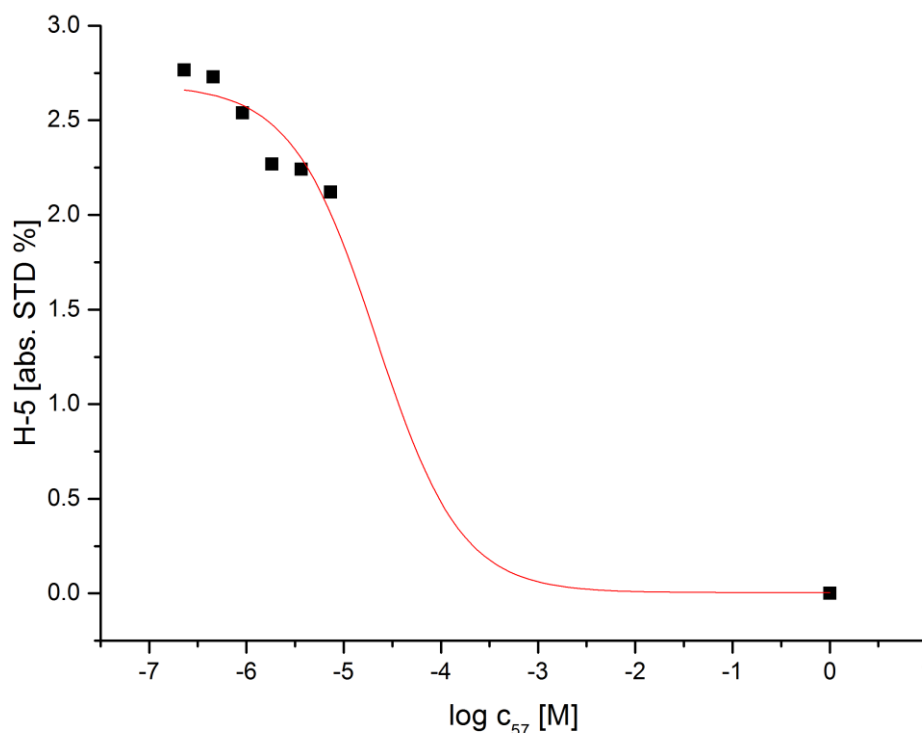


Abbildung 68: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **57** in Gegenwart von 4.5 μ M GTB und 0.33 mM UDP mittels STD-NMR. Gezeigt ist die Auftragung der absoluten STD% (H-5) gegen die logarithmische Konzentration von **57**. Unter Verwendung des *one site competition* Modells wurde ein Wert von IC_{50} = 21.8 μ M bestimmt. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung wurde der IC_{50} -Wert in den K_i umgerechnet. Der K_i wurde zu K_i = 12.3 μ M bestimmt. Der virtuelle Nullpunkt wurde bei log c = 0 gesetzt. Der bestimmte IC_{50} -Wert ist gegenüber einem Verschieben des virtuellen Nullpunktes stabil.

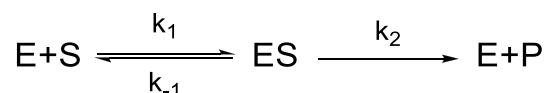
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist trotz erschwelter Bedingungen eine DMSO-basierte Methode zur kompetitiven STD-NMR der hier zu analysierenden Liganden zu entwickeln und erfolgreich durchzuführen.

So zeigen die Liganden **55**, **56** und **57** in den untersuchten Konzentrationsbereichen ein eindeutig kompetitives Verhalten im untersuchten System UDP/GTB. Der K_i wurde für **55** zu K_i = 14.6 μ M bestimmt. Im gleichen Konzentrationsbereich liegen die bestimmten Inhibitionskonstanten für die Liganden **56** (K_i = 8.2 μ M) und **57** (K_i = 12.3 μ M). Die ermittelten Werte weichen von den Bindungskonstanten welche in den SPR-Bindungsstudien thermodynamisch ermittelt wurden ab. Dies kann vielfältige Gründe haben. Ursächlich können u.a. Artefakte in den SPR-Messungen sein, welche durch die Verwendung von DMSO als Lösungsvermittler stammen könnten. Dies kann in der hier verwendeten Methode ausgeschlossen werden, da vorhergehende Artefaktmessungen durchgeführt wurden. Jedoch

stehen die ermittelten Werte im guten Einklang mit den kinetisch bestimmten Bindungskonstanten der SPR-Bindungsstudien. Die kinetisch ermittelten Werte bestätigen die durch kompetitive STD-NMR erhaltenen Werte, obwohl sie um etwa eine Größenordnung abweichen. Die Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass durch die *bulk*-Effekte bei der Injektion ein großer Teil der Datenpunkte nicht für die Auswertung herangezogen werden konnte.

5.2.3 Progresskurvenanalyse der Inhibition der Thiadiazolderivate gegenüber GTB

Enzymkinetik ist ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung der Mechanismen von Enzymreaktionen. Im Jahre 1913 schlugen Leonor Michaelis und Maud Menten ein einfaches Modell vor, welches enzymatische Reaktionen beschreiben konnte.^[70] Entscheidend in ihrem Modell ist die Annahme eines irreversiblen ES-Komplexes welcher als Zwischenprodukt auftreten muss. Das Modell beschreibt dabei die Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und der Substratkonzentration. Mithilfe des Modells lassen sich die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Geschwindigkeit $v_{\max}$ bestimmen. Die Reaktionsgleichung lautet:



Die Geschwindigkeitsgesetze können bereits für diese einfachste Form nicht explizit gelöst werden. Basierend auf der Annahme, dass $k_{-1} \gg k_2$ gilt und der Umsatz k_2 einer Kinetik erster Ordnung folgt, postulierten Michaelis und Menten eine Lösung. Dabei muss das Substrat im Überschuss eingesetzt werden. Denn so stellt sich ein Gleichgewicht für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ein und die Umsetzung des Produktes stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

1925 wurde das Modell von Briggs und Haldane in der Annahme eines quasistationären Zustands (*steady state*) für den Enzymsubstratkomplex vereinfacht. Dies erlaubte die Anwendung des Modells auf alle Enzymreaktionen.^[71]

$$\text{Mit } v = \frac{d[S]}{dt} = -\frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad v_{max} = k_{cat}[E]_0 \quad (11)+(12)$$

mit [S]: Substratkonzentration

v_{max} : Maximalgeschwindigkeit

K_M : Michaelis-Menten-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante wurde bereits in Kapitel 5.2.2 erwähnt (Gleichung 8) und ist definiert nach:

$$\text{und } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8)$$

Zur Untersuchung der Enzymkinetik gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden z.B. radiochemische oder chromatographische Verfahren. Gängig ist dabei die Messung der Initialgeschwindigkeiten, da hier die Bedingung der Substratsättigung erfüllt ist. Bei Auftragung der Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit ergibt sich eine Sättigungskurve, mit v_{max} als Sättigungswert und K_M als Substratkonzentration bei $v_{max}/2$. Gilt die Michaelis-Menten-Bedingung $k_{-1} \gg k_2$ entspricht die Michaelis-Menten-Konstante der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes (siehe auch Kapitel 5.2.2, Gleichung 9, $K_M = K_D$). Damit kann Gleichung 11, auf komplexere Reaktionsschemata angewendet werden; k_{cat} und K_M gehen zu der apparenten Dissoziationskonstante K'_M und der apparenten Geschwindigkeitskonstante k'_{cat} über. Als Maß für die Substratspezifität gilt der Quotient aus k_{cat}/K_M , er wird als katalytische Effizienz definiert.

Der erhaltene K_M -Wert gibt die Affinität des Substrats für das Enzym wider. Einflüsse, die zu einem verzögerten oder unvollständigen Umsatz führen können, beispielsweise bei dem Auftreten von Produktinhibition oder Gleichgewichtsreaktionen, sind dabei nicht von Belang. Die Michaelis-Menten-Gleichung bietet ein einfaches, leicht auszuwertendes, mathematisches Modell zur kinetischen Analyse von Enzymreaktionen.

Die enzymkinetische Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie bietet viele Vorteile u.a. ermöglicht es Reaktionsverfolgung in Echtzeit. Im klassischen Ansatz erfolgt auch hier die Messung der Initialgeschwindigkeiten bei definierter Enzymkonzentration und Variation der Substratgeschwindigkeiten.

Als Alternative bietet sich die Analyse der kinetischen Parameter durch Anwendung von Progresskurvenanalytik an. Eine Progresskurve stellt den gesamten Konzentrations-Zeit-Verlauf eines oder mehrerer Reaktanden als Funktion der Zeit dar und beruht nicht auf Messung der Initialgeschwindigkeiten. Dadurch enthält eine Progresskurve die gesamte

kinetische Information, die einer Reaktion zu Grunde liegt. Dies erlaubt weitere Informationen über die Mechanismen der enzymatisch katalysierten Reaktionen wie z.B. Produktinhibierung zu erheben. Ein weiterer Vorteil ist, eine Verminderung des experimentellen Aufwands da die Ermittlung der kinetischen Daten nicht in einer Vielzahl von Messungen erfolgt.

Die Analyse der Progresskurven ist nur computergestützt möglich, da es für die Lösung der benötigten integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 13) keine explizite Lösung gibt.

$$K_M \ln \left(\frac{[S]}{[S]_0} \right) + [S]_0 - [S] = v_{max} t \quad (13)$$

Schnell und Mendoza entwickelten im Jahr 1997 eine Lösung der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung. Ihre Lösung basiert auf der Lambert W-Funktion. Sie wird auch als Omega-Funktion bezeichnet und ist die inverse Funktion von $f(w) = we^w$, w steht für eine beliebige komplexe Zahl.^[72]

$$W(x) + \ln\{W(x)\} = \ln(x) \quad (14)$$

Die Lambert W-Funktion enthält drei Funktionsäste für Werte von x . Nur für den 1. Ast gibt es eine eindeutige Lösung für W , für Werte $-1/e < x < 0$ gibt es zwei Lösungen mit $W > -1$ und $W < -1$ (Abbildung 69).

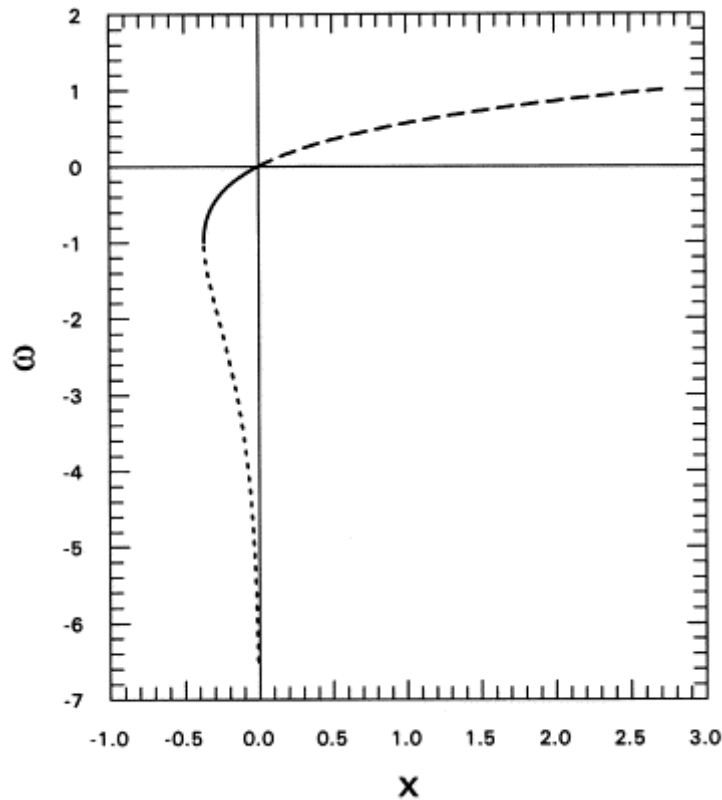


Abbildung 69: Dargestellt ist der Plot der Lambert-W-Funktion für die realen Werte von W . Es gibt drei Funktionsäste für Werte von x . Nur für den 1. Ast gibt es eine eindeutige Lösung für W . Für Werte $-1/e < x < 0$ gibt es zwei Lösungen mit $W < -1$ und $W > -1$.^[73]

Mit Hilfe einer Kombination aus der Lambert W -Funktion und nicht-linearer Regression konnten Goudar *et al.* eine analytische Lösung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung erhalten. Diese kann nach $S(t)$ aufgelöst werden (Gleichung 16).^[73]

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - v'_{max} t}{K'_M} \right) \right\}$$

$$K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (15+16)$$

Mit $[I]$ Inhibitorkonzentration

K_I Inhibitionskonstante

Durch computergestützte numerische Methoden können mit Hilfe von Gleichung 16 die apparente Michaelis-Menten-Konstante K'_M und die apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit v'_{max} bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Gleichung ist es ebenfalls möglich kompetitive Inhibitionen einer Enzymreaktion zu analysieren, so dass die Inhibitionskonstante K_I ermittelt werden kann.

5.2.3.1 Übersicht der zu untersuchenden enzymatisch-katalysierten Reaktion der GTB

GTB katalysiert die Übertragung von α -Galactose vom aktivierten Donorsubstrat UDP-Gal auf das terminale Disaccharid α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-OR des H-Antigens. In den hier durchgeführten Progresskurven wurde die Abnahme des UDP-Gal Signals mit der Zeit verfolgt. Als Akzeptorsubstrat diente α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl, dies wurde ebenfalls freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Peters (Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Um eine Produktinhibierung durch bei der Reaktion entstehendes UDP zu verhindern wurde zusätzlich saure Phosphatase (Apase) zugesetzt. Apase katalysiert die Umsetzung von UDP über UMP (Uridinmonophosphat) zu Uridin.

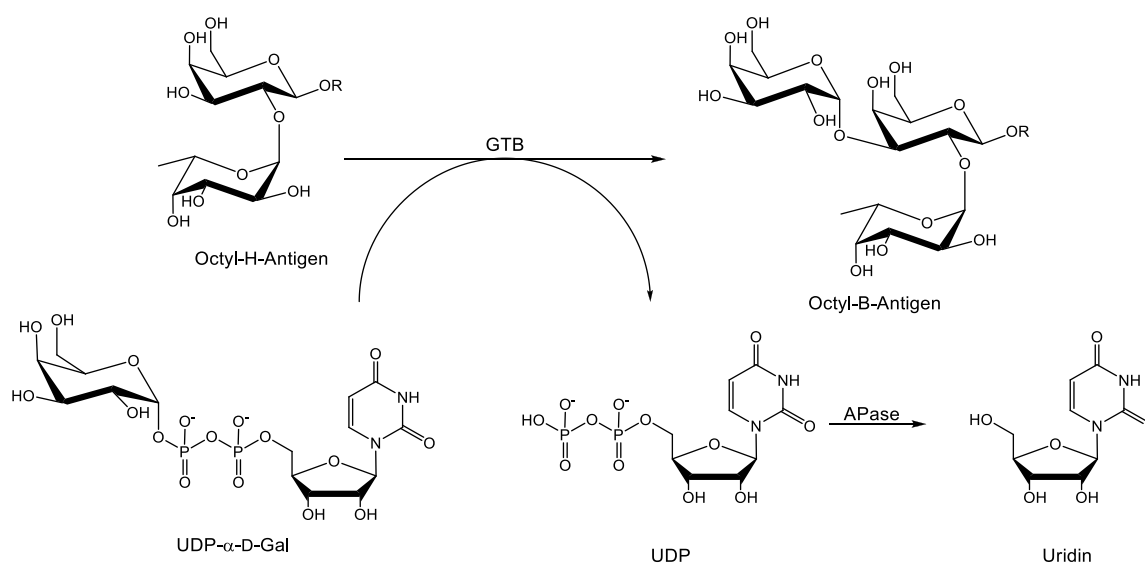


Abbildung 70: Progresskurvenanalyse. Übersicht der durch GTB katalysierten Reaktion. GTB katalysiert die Übertragung von α -Galactose von UDP-Gal auf α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl. Um Produktinhibierung zu vermeiden, wurde der Reaktion zusätzlich Apase zugesetzt. Apase katalysiert den Abbau des freiwerdenden UDPs über UMP zu Uridin.

5.2.3.2 Methodenentwicklung zur Progresskurvenanalytik

Interner Standard

Ein entscheidender Faktor der Progresskurvenanalytik ist die Bestimmung der Startkonzentration des zu untersuchenden Substrats. Eine gängige Methode der NMR-Spektroskopie ist der Vergleich des S/N-Verhältnis der zu analysierenden Substanz mit dem S/N-Verhältnis eines externen Standards bekannter Konzentration.

Als genauere Methode wurde hier der Vergleich der integralen Intensität über einen internen Standard gewählt. Dafür wurde dem Puffer 1.00 mM TSP- d_4 (Na-Acetat- d_3 -

Progresskurvenanalyse-Puffer) zugesetzt. Nach erfolgter Messung wird je ein vollständig separiertes Signal von Analyt und Internem Standard integriert. Unter Korrektur der integralen Intensität durch Berücksichtigung des *relaxation delays* D1, erfolgte die Bestimmung der Konzentration über den Vergleich der Signalintensitäten:

$$c_{Analyt} = \frac{I_{korr_{Analyt}}}{I_{korr_{int. Standard}}} \quad (17)$$

mit: $I_{korr_{Analyt}}$ korrigierte Intensität des Analyten

$I_{korr_{int.Standard}}$ Korrigierte Intensität des internen Standards

Zur Ermittlung der jeweiligen Korrekturfaktoren der integralen Intensitäten wird unter Variation der D1-Zeit die Intensität der zu untersuchenden Integrale des Analyten UDP-Gal und des internen Standards TSP- d_4 bestimmt. Dieses Vorgehen ist nötig, weil die Progresskurven bei einem D1= 2.5 s gemessen wurden. Bei dieser Zeit ist die Relaxation jedoch unvollständig, wodurch sich eine Intensitätsverringering des gemessenen Signals ergibt. Dieser D1 wurde gewählt um eine Verkürzung der Messzeit zu erreichen.

Trägt man die tatsächlich gemessene Signalintensität gegen den D1 auf, wird eine Sättigungskurve erhalten. Durch *fit* nach Gleichung 18 kann man die D1-Zeit ermitteln an welcher das zu untersuchende Integral eine Intensität von 100 % erreicht. Dies ermöglicht die Korrektur der gemessenen Signalintensität bei dem tatsächlich verwendeten *delay* von D1= 2.5 sec.

$$y = A_1 * e^{\left(\frac{-x}{t_1}\right)} + y_0 \quad (18)$$

y_0 gibt die Signalintensität bei 100 % wieder. Abbildung 71 zeigt die gemessenen Sättigungskurven des TSP- d_4 -Signals und des H5/H-1'-Signals von UDP-Gal. Bei dem verwendeten D1= 2.5 s wies TSP- d_4 -Signal eine Signalintensität von 75 % und das H5/H-1'-UDP-Gal eine Intensität von 76 % auf. Damit ergibt sich für TSP- d_4 ein Korrekturfaktor von 1.33 und für UDP-Gal ein Faktor von 1.31.

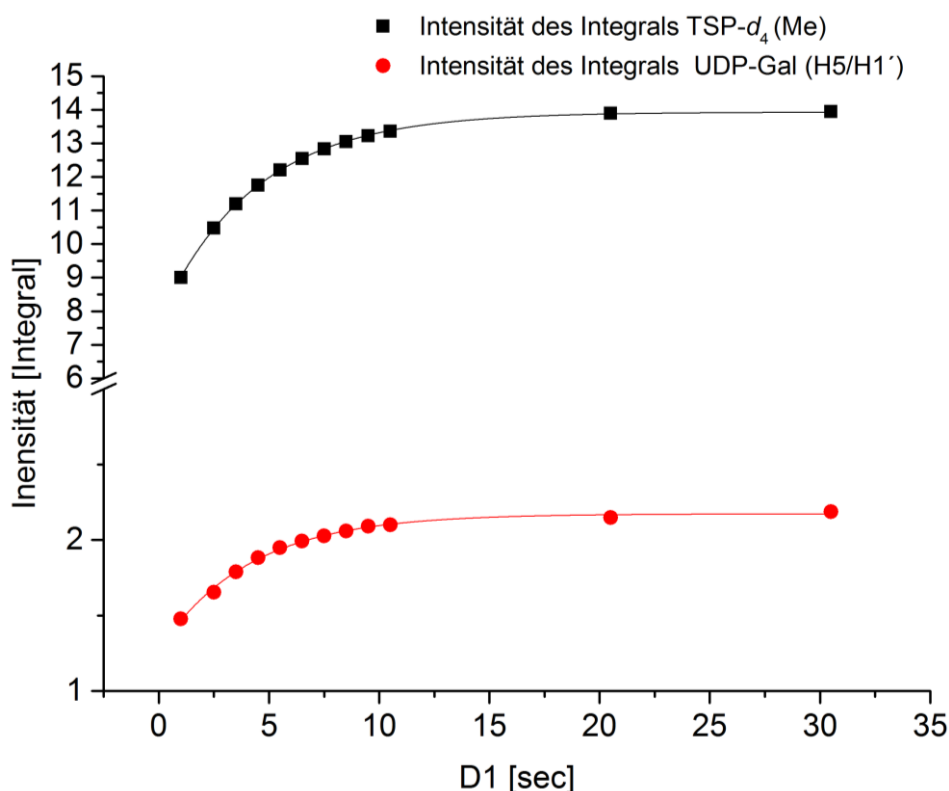


Abbildung 71: Dargestellt sind die ermittelten Signalintensitäten bei Variation der D1-Zeit von UDP-Gal (H5/H-1') (schwarze Kästchen) und TSP- d_4 (rote Kreise).

Verhinderung der Produktinhibition

Um die Produktinhibition zu vermeiden wird der Zusatz eines zweiten Enzyms benötigt. Dieses muss das in der GTB-katalysierten Reaktion entstehende UDP umsetzen. In einer vorangegangenen Arbeit von K. Schaefer^[74] wurde bei einer Progresskurvenanalyse von GTB, für die Umsetzung von UDP zu UMP alkalische Phosphatase verwendet. Das pH-Optimum alkalischer Phosphatase (AP) liegt bei pH 8-10.5. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Liganden musste weiterhin Acetat-Puffer bei pH 5.0 (entspricht einem korrigierten pD-Wert von pD 5.4)^[68] und DMSO als Lösungsvermittler verwendet werden. Daher war anzunehmen das AP aufgrund der Abweichung von ihrem pH- Optimum nicht mehr arbeitete. Testmessungen widerlegten diese Annahme, zeigten aber, dass der Umsatz von UDP zu UMP zu langsam war und eine Produktinhibierung sich so nicht vermeiden ließe.

Als Ersatz wurde daher saure Phosphatase (Apase) aus Weizenkleie gewählt. Ihr pH-Optimum liegt im Bereich von pH 4.0-7.0. Sie katalysiert den Umsatz von UDP über UMP zu Uridin. Im Gegensatz zu AP weist Apase eine geringere katalytische Effizienz aus.

Daher musste in ersten Messungen die Menge an Apase für die Bestimmung der kinetischen Parameter der GTB evaluiert werden.

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

Um das inhibitorische Potential der Verbindungen **55**, **56** und **57** ermitteln zu können, mussten zunächst die kinetischen Parameter unter den benötigten Messbedingungen von GTB ohne Inhibitor ermittelt werden. Daher wurde vor Beginn der Inhibitionsassays die Michaelis-Menten-Konstante K'_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v'_{max} ohne Zusatz eines Inhibitors bestimmt.

Für die Enzymreaktion von GTB wurde Na-Acetat- d_3 (Progresskurvenanalyse)-Puffer verwendet. Dieser enthielt 1.00 mM TSP- d_4 als internen Standard. Zusätzlich wurde der Probe noch 1 μ g/ μ L BSA und 0.4 mg/mL Apase und 5 % DMSO- d_6 zugesetzt.

Als Akzeptorsubstrat dienten 2.5 mM α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl. Um den K_M Wert des Donorsubstrats bestimmen zu können, wurde das H-Antigen Disaccharid in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat eingesetzt. Dies gewährleistet die Annahme einer quasi konstanten Konzentration über den gesamten Reaktionsverlauf.

Das Donorsubstrat UDP-Gal wurde mit 250 μ M eingesetzt und GTB in einer Konzentration von 483 nM.

Die Probe wurde ohne das Donorsubstrat UDP-Gal angesetzt und alle NMR-spektroskopischen Parameter wurden eingestellt. Die Zugabe des UDP-Gal erfolgte direkt am Spektrometer und die Aufnahme des Spektrums wurde umgehend gestartet. Die Reaktion wurde dabei für 14.05 Stunden bei 37 °C verfolgt, wobei alle 7 Minuten ein ^1H NMR Spektrum mit 64 *scans* aufgenommen wurde. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch *excitation sculpting*.

Für die Auswertung der kinetischen Parameter wurden die Protonen H-5/H-1' des UDP-Gal untersucht. Hier ist eine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung zwischen dem Edukt UDP-Gal und dem assay-resultierenden Produkt UMP zu beobachten. Zudem liegen die beobachteten Signale separiert von den *bulk*-Signalen der Disaccharidstrukturen des H-Octyl-Antigens und der UDP-Gal (Abbildung 72).

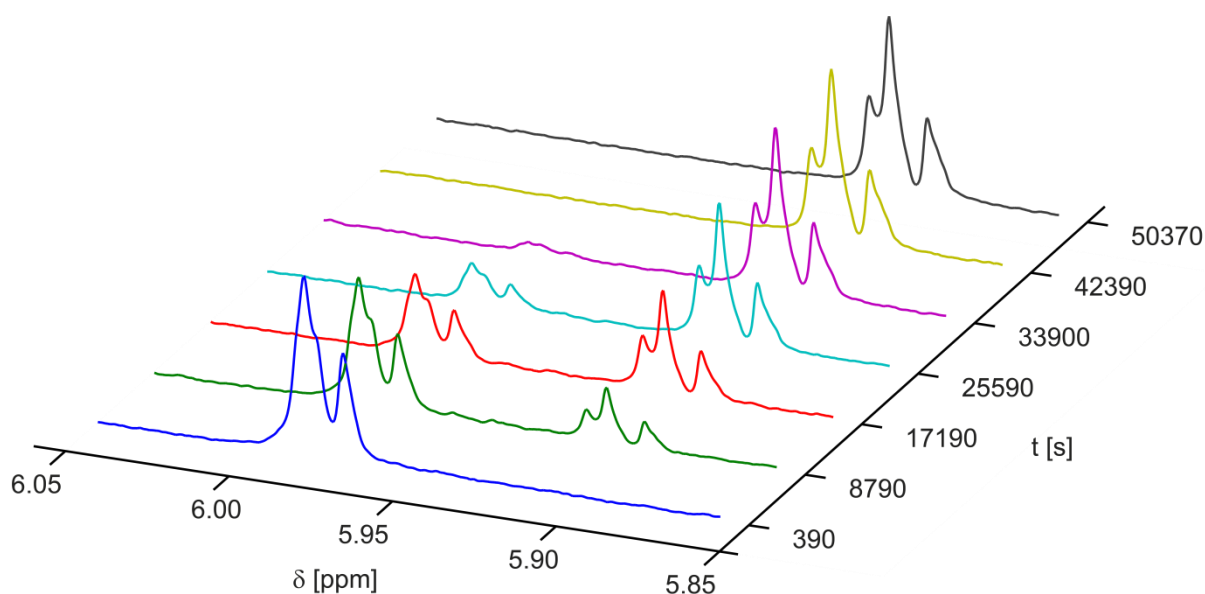


Abbildung 72: Zeitlicher Verlauf der von GTB enzymatisch katalysierten Reaktion anhand der H5- und der H-1'-Protonen von UDP-Gal und Uridin. Zu Beginn der Reaktion bei $t = 390$ s entspricht die chemische Verschiebung der Protonen UDP-Gal. Im zeitlichen Verlauf verringert sich die Intensität des beobachteten Signals und ein neues Signal (5.9-5.87 ppm) nimmt an Intensität zu. Nach 10.5 Stunden ($t = 37770$ s) sind die charakteristischen Signale des Donorsubstrats nicht mehr zu detektieren und die enzymatische Übertragung von UDP-Gal auf das H-Octyl-Antigen ist beendet.

Zu erwähnen ist, dass es nicht möglich war eine Basislinienkorrektur über das gesamte Spektrum durchzuführen. Um die zu analysierenden Signale der UDP-Gal und des TSP-Signals auswerten zu können, wurden daher die Signale getrennt ausgewertet. In einem Spektrensatz wurde das Signal des H5/H-1' von UDP-Gal Basislinien-korrigiert und anschließend seriell integriert. Und in dem anderen Spektrensatz wurde das zur Konzentrationsbestimmung benötigte TSP-Signal Basislinien-korrigiert und anschließend seriell integriert. Die tatsächliche enthaltene Startkonzentration der UDP-Gal wurde anschließend durch lineare Regression ermittelt.

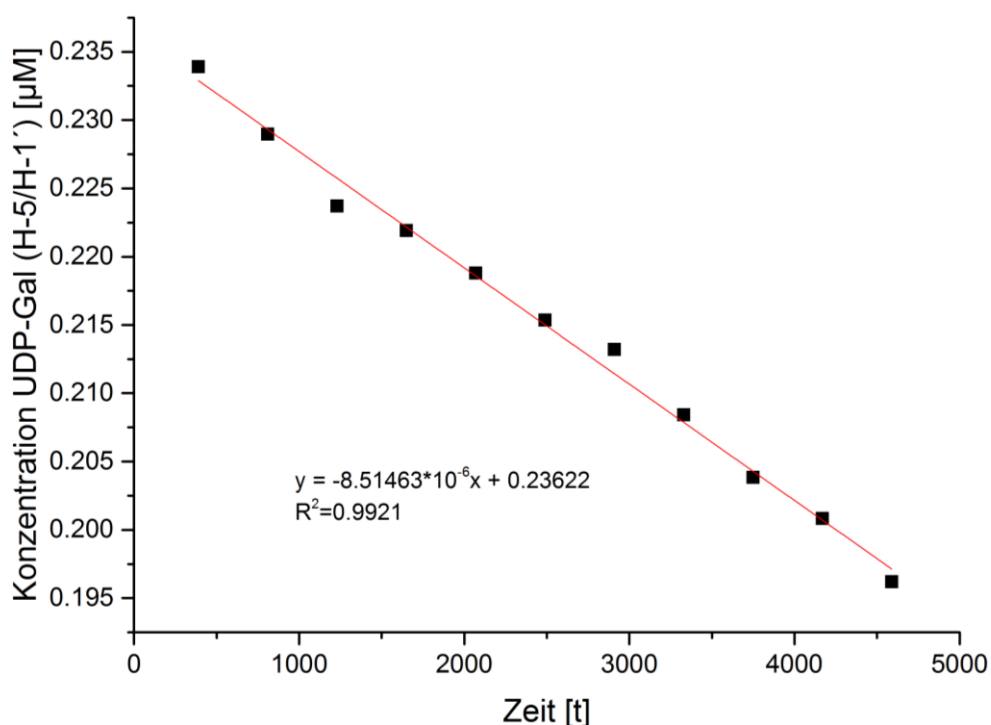


Abbildung 73: Exemplarische Darstellung zur Ermittlung der tatsächlich eingesetzten Startkonzentration von UDP-Gal durch lineare Regression. Dafür wurden die ersten 11 Konzentrationen welche durch Vergleich der integralen Intensität von UDP-Gal mit TSP- d_4 erhalten wurden gegen die Zeit aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt die Startkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$. In diesem Fall wurde eine Startkonzentration von 236.3 μM ermittelt.

Abbildung 74 zeigt exemplarisch die erhaltene Progresskurve von UDP-Gal. Diese wurde durch Auftragung der Konzentration von UDP-Gal gegen die Zeit erhalten. Die anschließende Progresskurvenanalyse mit Hilfe des Computerprogramms MATLAB® ergab für das untersuchte System eine Michaelis-Menten Konstante von $K'_M = 28 \pm 2.7 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit von $v'_{max} = 8.9 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$. Die Auswertung für das H-6 Signal von UDP-Gal ergab eine Michaelis-Menten Konstante von $K'_M = 26 \pm 4.8 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit von $v'_{max} = 9.5 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$, diese Werte sind aber mit einem größeren Fehler (19 % für K'_M) behaftet und werden daher nicht weiter berücksichtigt.

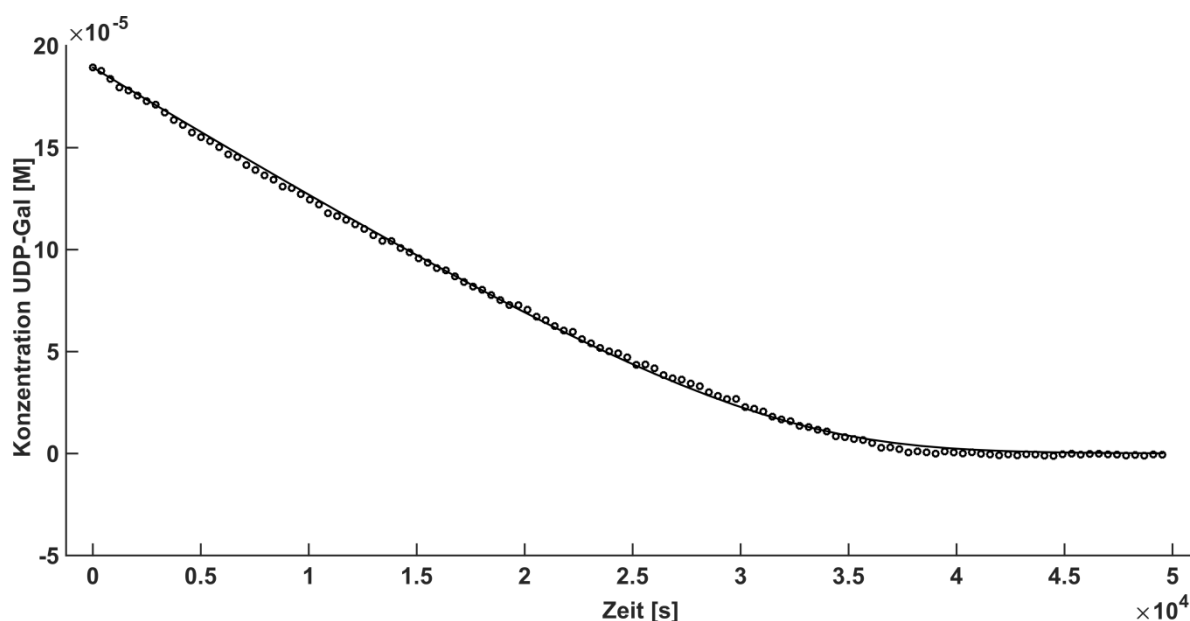


Abbildung 74: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal anhand des H-5/H-1'-Integrals im zeitlichen Verlauf der enzymatisch katalysierten Reaktion von GTB. Mithilfe des Computerprogrammes MATLAB® wurde unter Verwendung der kombinierten Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung K'_M zu $28 \pm 2.7 \mu\text{M}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu $v'_{max} = 8.9 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$ bestimmt.

5.2.3.4 Untersuchung der Inhibition von GTB durch die Thiadiazolderivate

Zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials von GTB durch die Verbindungen **55**, **56** und **57** wurde anschließend für jede der Verbindungen eine Progresskurvenanalyse durchgeführt. Für den Inhibitionsassay wurde die Experimentdauer von 14.05 Stunden auf bis zu 24 Stunden verlängert, da durch die zu erwartende Inhibition mit einer Verlangsamung der enzymatischen Reaktion gerechnet wurde. Das Donorsubstrat UDP-Gal wurde mit $250 \mu\text{M}$ eingesetzt und GTB in einer Konzentration von 483 nM . Das Akzeptorsubstrat $\alpha\text{-L-Fuc-(1-2)-}\beta\text{-D-Gal-octyl}$ wurde im zehnfachen Überschuss (2.5 mM) eingesetzt. Dadurch konnte eine quasi konstante Konzentration über die gesamte Messdauer gewährleistet werden. Die Inhibitoren wurden in ihrer höchstmöglichen Konzentration eingesetzt. Dafür wurden die gleichen Stammlösungen wie sie für die STD-Studien verwendet wurden benutzt. Die Stammlösungen wurden für die benötigte Konzentration entsprechend verdünnt. Die Konzentration an $\text{DMSO-}d_6$ betrug in der Endkonzentration ebenfalls 5% . Eine Übersicht der verwendeten Konzentrationen ist in Tabelle 15 zu finden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Übersicht der für die Inhibitionsassays eingesetzten Konzentrationen.

		Eingesetzte Konzentration
Donorsubstrat:	UDP-Gal	483 nM
Akzeptorsubstrat:	α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl	2.5 mM
Protein:	GTB	483 nM
Inhibitor:	55	7.15 μ M
	56	14.00 μ M
	57	14.63 μ M

Die Proben wurden ohne das Donorsubstrat UDP-Gal angesetzt und alle NMR-spektroskopischen Parameter eingestellt. Die Zugabe des UDP-Gal erfolgte direkt am Spektrometer und die Aufnahme des Spektrums wurde umgehend gestartet. Die Reaktion wurde dabei bis zu 24 Stunden (24 Stunden= **55**, 22.5 Stunden= **56**, 21.3 Stunden= **57**) bei 37 °C verfolgt, wobei alle 7 Minuten ein ^1H -NMR Spektrum mit 64 *scans* aufgenommen wurde, die Wasserunterdrückung erfolgte durch *excitation sculpting*.

Als Startpunkt der Reaktion diente die Zugabe des Donorsubstrats. Die tatsächliche Konzentration wurde ebenfalls durch lineare Regression ermittelt. Abbildung 75 zeigt die erhaltenen Progresskurven mit und ohne Inhibitor. Dort sind die Daten zur besseren Veranschaulichung normiert und gegen eine verkürzte Zeit aufgetragen. Der inhibitorische Effekt der Liganden ist deutlich zu erkennen. Es zeigt sich, dass die Progresskurven mit Inhibitor eine langsamere Kinetik aufweisen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist geringer, sodass das Ende der enzymatisch-katalysierten Reaktion zu einem späteren Zeitpunkt als ohne Inhibitor erreicht wird.

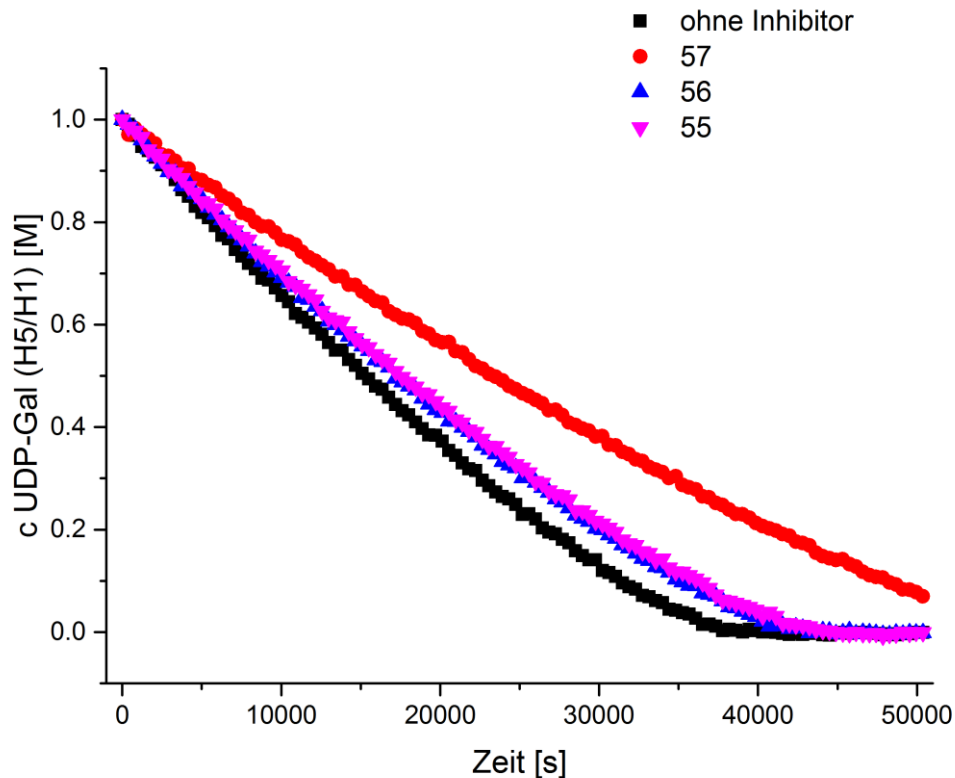


Abbildung 75: Übersicht der erhaltenen Progresskurven. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die erhaltenen Daten normiert aufgetragen. Es wurde ebenfalls nur maximal bis zum Zeitpunkt $t = 50401$ s aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die erhaltenen Kurven mit Inhibitor eine langsamere maximale Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen, sodass das Ende der enzymatisch-katalysierten Reaktion zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird.

Die anschließende Analyse der erhaltenen Progresskurven mithilfe des Computerprogramms MATLAB® bestätigt die Reduktion der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Auffällig sind die erniedrigten Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_M'' im Vergleich zur Michaelis-Menten-Konstante K_M' welche ohne die Anwesenheit eines Inhibitors bestimmt wurde. Eine Bestimmung von K_i nach Gleichung 19 konnte daher nicht durchgeführt werden. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 16 zu finden.

$$K_I = \frac{K'_M \cdot [I]}{K''_M - K'_M} \quad (19)$$

mit: $[I]$	Inhibitorkonzentration
K'_M	Michaelis-Menten-Konstante ohne Inhibitor
K''_M	Michaelis-Menten-Konstante mit Inhibitor

Tabelle 16: Übersicht der ermittelten kinetischen Parameter aus den durchgeführten Progresskurven.

Inhibitor	55	56	57	ohne Inhibitor
$C_{\text{Inhibitor}} [\mu\text{M}]$	7.15	14.00	14.63	/
$K'_M [\mu\text{M}]$	22.2 ± 1.6	22.3 ± 1.7	26.2 ± 1.9	28.3 ± 2.7
$\dot{V}_{\text{max}} [\text{M/s}]$	$6.6 \cdot 10^{-09} \pm 0.08 \cdot 10^{-09}$	$6.7 \cdot 10^{-09} \pm 0.09 \cdot 10^{-09}$	$5.5 \cdot 10^{-09} \pm 0.07 \cdot 10^{-09}$	$8.9 \cdot 10^{-09} \pm 0.16 \cdot 10^{-09}$
$K_I [\mu\text{M}]$	n.b.	n.b.	n.b.	/

n.b.= nicht bestimmbar

Um eine Bestimmung von K_I durchführen zu können wurden die erhaltenen Progresskurven nur bis zum Zeitpunkt $t=50401$ s ausgewertet. Dies wurde durchgeführt um eine Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Daten zu ermöglichen. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse dieser Auswertung aufgeführt. Die erhaltenen Werte für $\dot{V}_{\text{max}}$ sind identisch bzw. liegen im Bereich der ermittelten Fehlergrenzen der nicht-normierten Auswertung. Für die Liganden **55** und **56** ergab sich keine Änderung für die bestimmten Werte von K'_M , sodass weiterhin keine inhibitorische Konstante bestimmt werden konnte. Für **57** ergab sich ein K'_M -Wert von $K'_M = 38.2 \pm 2.8 \mu\text{M}$. Durch diese Auswertung ergab sich für **57** eine inhibitorische Konstante $K_I = 41.5 \mu\text{M}$. Damit zählt **57** zu den stärksten momentan bekannten Inhibitoren der GTB.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17: Übersicht der ermittelten kinetischen Parameter aus den durchgeführten Progresskurven.

Inhibitor	55	56	57
$C_{\text{Inhibitor}} [\mu\text{M}]$	7.15	14.00	14.63
$K_M [\mu\text{M}]$	22.2 ± 1.9	22.5 ± 2.2	38.2 ± 2.8
$v_{\text{max}} [\text{M/s}]$	$6.55 \cdot 10^{-9} \pm 0.102 \cdot 10^{-9}$	$6.74 \cdot 10^{-9} \pm 0.118 \cdot 10^{-9}$	$5.94 \cdot 10^{-9} \pm 0.102 \cdot 10^{-9}$
$K_I [\mu\text{M}]$	n.b.	n.b.	41.5
bis t [s] aufgetragen	50401	50380	50316

n.b.= nicht bestimmbar

Die durchgeführten Progresskurvenanalysen beweisen eindeutig das inhibitorische Potential der Liganden **55**, **56** und **57**. Dies zeigt sich in der deutlichen Reduktion der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{max} in Anwesenheit der Inhibitoren. Durch die zeitnormierte Auswertung der Progresskurven konnte zusätzlich eine inhibitorische Konstante K_I von $K_I = 41.5 \mu\text{M}$ für **57** bestimmt werden. Dieser Wert steht in gutem Einklang mit dem durch kompetitive STD-NMR bestimmten K_I von $12.3 \mu\text{M}$

Die geringeren Werte für K_M und die Reduktion von v_{max} der anderen Inhibitoren könnten für eine gemischte Hemmung vom Typ kompetitiv/ unkompetitiv sprechen, dies sollte jedoch durch weitere Progresskurven mit veränderter Konzentration des Donorsubstrats überprüft werden.

Abschließend wäre zu sagen, dass es gelungen ist trotz erschwelter Bedingungen DMSO-basierte Methoden zur kompetitiven STD-NMR, Progresskurvenanalyse und SPR, der hier zu analysierenden Liganden, zu entwickeln und erfolgreich durchzuführen. Die ermittelten Werte für K_I die sich aus der kompetitiven STD-NMR und den Progresskurvenanalysen ergeben stehen im sehr guten Einklang zueinander.

Die SPR-Messungen erwiesen sich als besonders schwierig, da der durch DMSO resultierende *bulk*-Effekt sowohl bei der thermodynamischen als auch bei der kinetischen Analyse besonders großen Einfluss auf das resultierende Ergebniss hat. Die kinetische Analyse liefert jedoch Werte für K_D , die vergleichbar sind mit den durch STD- und Progresskurvenanalyse erhaltenen Werten.

5.2.4 *In silico* Bewertung der Bindung der Thiadiazolderivate

Zur Bewertung des inhibitorischen Potentials der Liganden **55**, **56** und **57** wurden *in silico* Studien durchgeführt. Dabei wurden *Docking*-Studien durchgeführt und die theoretischen Bindungsenergien berechnet.

Die GTB zeichnet sich durch eine fast ovale Bindungstasche aus, die in geschlossener Konformation ca. 11 Å tief ist. Die Bindungstasche ist in der geschlossenen Konformation erheblich kleiner als in der geöffneten Konformation.

Um ein detaillierteres Bild des *in silico* Verhaltens der Liganden zu erhalten, wurden die geschlossene und die geöffnete Konformation der GTB untersucht.

Die Liganden sind durch ihre Modifikationen erheblich größer als Ligand 382. Es stellte sich die Frage, ob in der kleineren Bindungstasche der geschlossenen Konformation eine analoge Positionierung der Liganden zum Liganden 382 erreicht werden kann.

Zusätzlich stellte sich im Hinblick auf die offene Konformation die Frage, ob trotz der größeren Bindungstasche eine ähnliche Positionierung der Liganden erreicht wird.

Zur Beurteilung der Lage der Liganden in der Bindungstasche in der geschlossenen Konformation der GTB wurde die Kristallstruktur 3U0X verwendet. Diese beinhaltet das native Protein als Dimer kokristallisiert mit dem Liganden 382.

Da bis dato keine Kristallstruktur der GTB existiert, in der das native Protein in geöffneter Konformation mit Donor- und Akzeptorsubstrat vorliegt, wurde das Modell **2RIZ-Arg176Gly** *in silico* erstellt. Diese beinhaltet die native Form der GTB als Monomer mit dem Donorsubstrat UDP-Gal, dem Akzeptoranalogen Octyl-3-desoxy-2-O-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-xylohexopyranosid, sowie Mangan als Cofaktor (Abbildung 76). Das genaue Vorgehen zur Modellentwicklung ist in Kapitel 6.4.2 beschrieben.

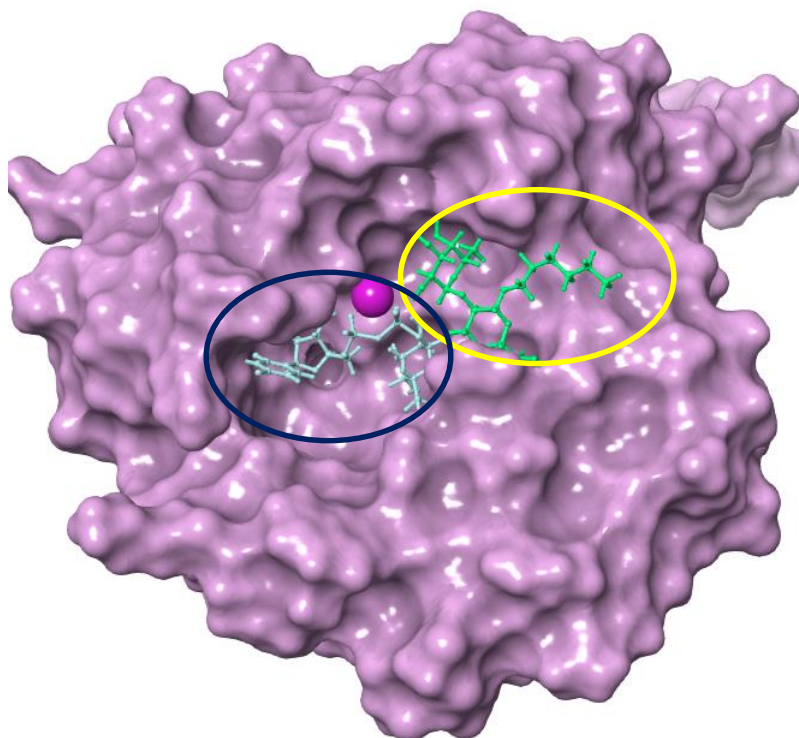


Abbildung 76: Darstellung der GTB (**2RIZ-Arg176Gly**) in der geöffneten Konformation. Das Donorsubstrat UDP-Gal ist in Blau, das Akzeptoranalogen Octyl 3-desoxy-2-O-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-xylo-hexopyranosid in Grün und Mangan in Pink dargestellt. Der gelbe Kreis dient zur Veranschaulichung der Akzeptorseite der Bindungstasche. Der blaue Kreis begrenzt die Donorseite der Bindungstasche.

Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden nach entsprechender Vorbereitung der Modelle die zu untersuchenden Strukturen über die Maestro-Anwendung *Glide* automatisch in die jeweilige Kristallstruktur gedockt. Anschließend wurde der so erhaltene Protein-Ligand-Komplex mit 1200 Iterationen minimiert.

Die Ermittlung der theoretischen Bindungsenergie E_{Bindung} der Liganden an das Protein erfolgte nach Gleichung 1. Dazu wurde jeweils die Energie des Protein-Ligand-Komplexes E_{Komplex} berechnet und die Energien des Proteins ohne Liganden E_{Protein} und die Energie des freien Liganden E_{Ligand} von dieser subtrahiert.

Die erhaltenen Bindungsenergien stellen jedoch keine absoluten, sondern relative Werte dar. Sie bieten damit eine Möglichkeit zur Beurteilung, ob die Liganden im Vergleich zur Ausgangsverbindung Ligand 382 bessere oder schlechtere Bindungsenthalpien erzielen. Ein Schwachpunkt bei dieser Methode ist die gänzliche Vernachlässigung von entropischen Effekten.

5.2.4.1 *In silico* Analyse von Ligand 382 (**16**)

Zur Vergleichbarkeit der *Docking*-Experimente der synthetisierten Liganden mit der Ausgangsverbindung Ligand 382 (**16**) wurde auch diese Struktur unter identischen Parametern gedockt. Die so erhaltene Struktur nimmt eine Orientierung ein, die nahezu identisch ist mit der ursprünglichen Lage in der Kristallstruktur. Der Ligand sitzt überwiegend auf der Akzeptorseite der Bindungstasche. Im Anschluss wurde ebenfalls minimiert und die Bindungsenergien wurden berechnet (Abbildung 77). Die berechnete Bindungsenergie des Liganden 382 beträgt -20.5 kcal/mol und dient als Ausgangswert für den Vergleich mit den modifizierten Liganden.

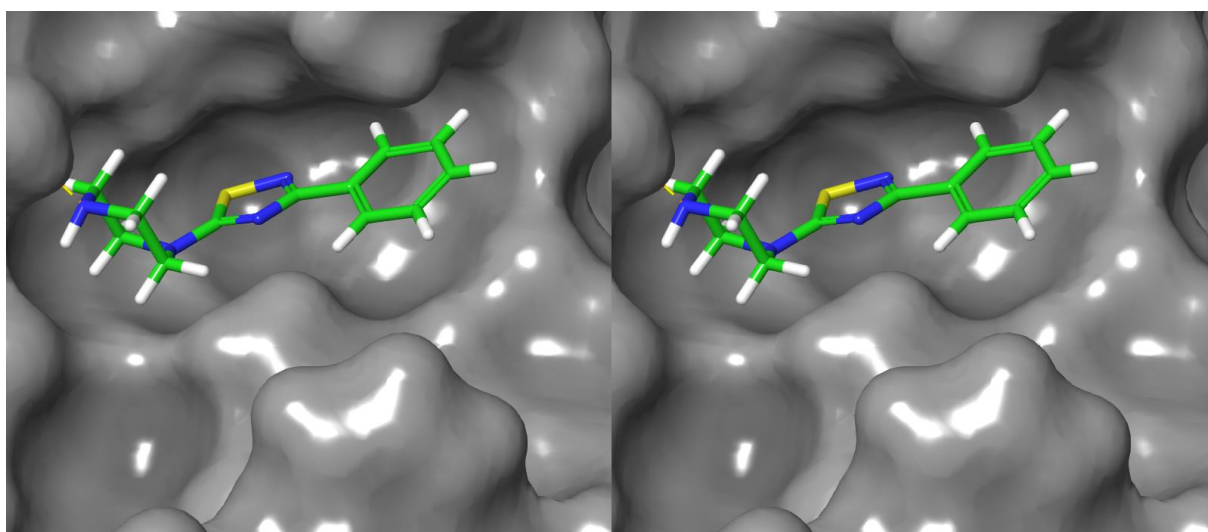
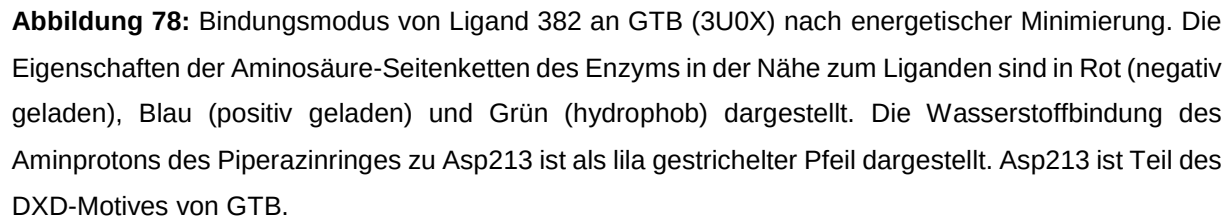


Abbildung 77: Ausschnitt aus der Bindungstasche der geschlossenen GTB-Struktur 3U0X (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden 382 nach energetischer Minimierung. Der Ligand ist auf der Donorseite der Bindungstasche orientiert. Die Oberfläche des Proteins ist in grau eingefärbt.

Auffällig ist, dass eine vor der Minimierung bestehende π - π -Wechselwirkung des Phenylrings des Liganden mit His233, sowie die Wasserstoffbrückenbindung des Aminprotons des Piperazinrings zum Asp211 (Teil des DXD-Motivs), nach der Minimierung nicht mehr bestehen. Lediglich die Wasserstoffbrückenbindung des Aminprotons des Thiadiazolrings zum Asp213 (ebenfalls Teil des DXD-Motivs) blieb bestehen. Zusätzlich bestehen noch hydrophobe Interaktionen, beispielsweise von Leu329 und Leu330 zum Aromaten des Liganden. Um diesen Einfluss besser graphisch darzustellen, wurde ein Ligand-Interaktions-Diagramm angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 78 dargestellt. Gezeigt sind die Aminosäuren des Enzyms, die in räumlicher Nähe zum Liganden liegen. Dadurch werden günstige oder ungünstige Umgebungen zur Orientierung des Liganden, wie beispielsweise hydrophobe oder geladene Aminosäureseitenketten, anschaulich dargestellt.



5.2.4.2 In silico Analyse von Ligand **55**

101

Die berechnete theoretische Bindungsenergie von **55** beträgt -27.5 kcal/mol und ist damit um 7 kcal/mol besser im Vergleich zum Liganden 382.

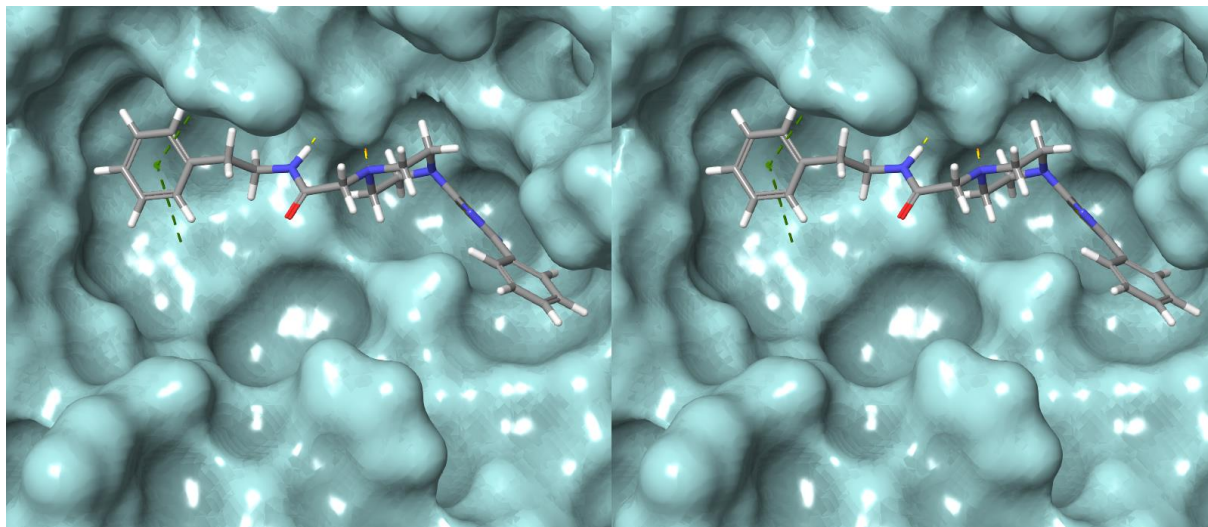


Abbildung 79: Ausschnitt aus der Bindungstasche der geschlossenen GTB-Struktur 3U0X (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **55** nach energetischer Minimierung. Der Ligand ist analog zu Ligand 382 auf der Akzeptorseite der Bindungstasche orientiert. Jedoch reicht ein Teil des Liganden schon auf die Donorseite der Bindungstasche und geht dort eine π - π -Bindung (grün) ein. Wasserstoffbrücken-Bindungen sind in Gelb eingezeichnet. Die Oberfläche des Proteins ist in Blau eingefärbt.

Das Ligand-Interaktions-Diagramm zu dieser Struktur ist in Abbildung 80 zu finden. Die Wasserstoffbrückenbindung zum DXD-Motiv (Asp213) ist erhalten geblieben. Das tertiäre Amin des Liganden agiert als Donor der Wasserstoffbrücke wohingegen das Amidproton als Wasserstoffbrückenakzeptor agiert. Zusätzlich wird eine π - π -Wechselwirkung des Phenylethylrestes zum Tyr126 ausgebildet. Daneben gibt es zahlreiche hydrophobe Interaktionen.

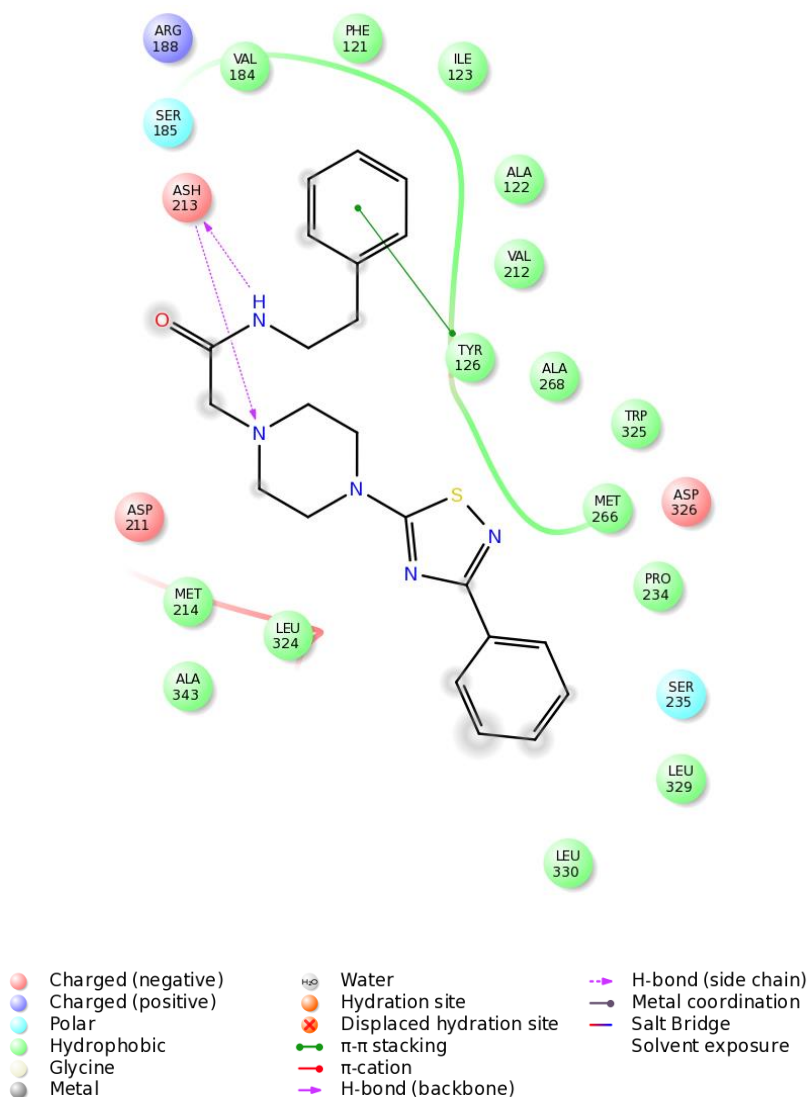


Abbildung 80: Bindungsmodus von **55** an GTB (3U0X) nach energetischer Minimierung. Die Wasserstoffbrückenbindung des Asp213 zu dem Amidproton und zum tertiären Amin des Piperazinringes ist als lila Pfeil dargestellt. Die π - π -Wechselwirkung der Phenylethylgruppe zu Tyr126 ist als grüne Linie dargestellt. Zusätzlich besteht eine Vielzahl von hydrophoben Interaktionen (grün).

Das *Docking* und die anschließende Minimierung von **55** an das Modellsystem **2RIZ Arg176Gly** liefert eine deutlich andere Orientierung des Liganden in der Bindungstasche (Abbildung 81). Die ursprünglichen Strukturelemente des Liganden 382 sind teilweise auf der Akzeptorseite der Bindungstasche orientiert, nun jedoch sehr nahe zum C-Terminus (Leu 329 und Leu 330). Die theoretische Bindungsenergie von **55** beträgt -31.9 kcal/mol und ist damit um 11.9 kcal/mol besser im Vergleich zu Ligand 382.

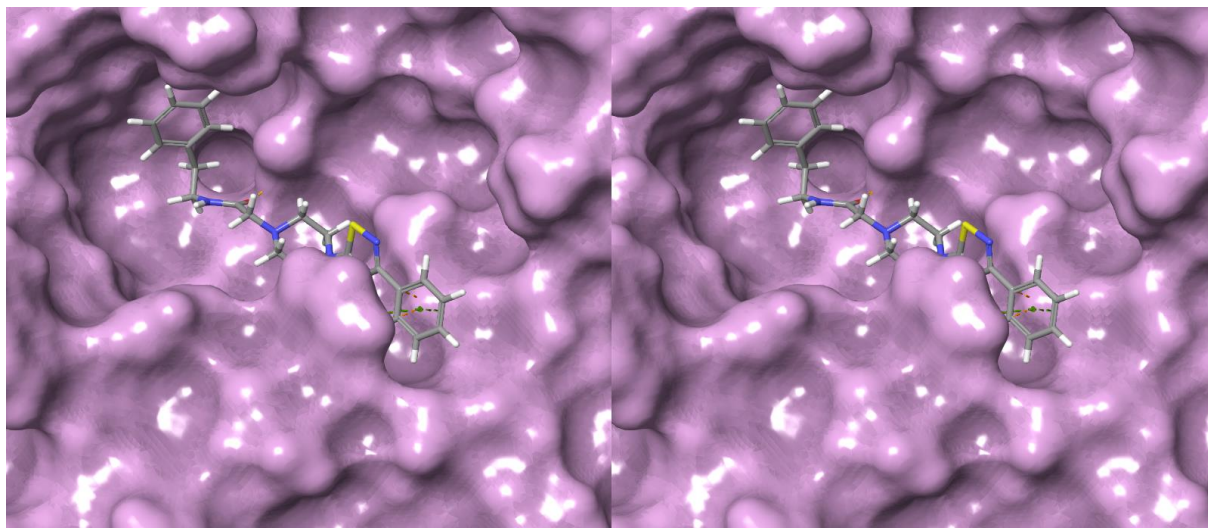


Abbildung 81: Ausschnitt aus der Bindungstasche der offenen GTB-Struktur **2RIZ Arg176Gly** (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **55** nach energetischer Minimierung. Der Ligand nimmt eine völlig andere Orientierung als in der Struktur 3U0X ein. Der Großteil des Liganden befindet sich auf der Donorseite, dort geht jedoch der Phenylring, der mit dem Thiadiazolring verknüpft ist, eine π - π Bindung (grün) ein. Wasserstoffbrückenbindungen sind in orange eingezeichnet. Die Oberfläche des Proteins ist in Rosa eingefärbt.

Das zu dieser Struktur angefertigte Ligand-Interaktions-Diagramm ist in Abbildung 82 dargestellt. Die Beteiligung des DXD-Motives wird nun durch die Wasserstoffbrückenbindung von Asp211 zum Carbonylsauerstoff der Amidgruppe dargestellt. Zusätzlich gibt es eine Wasserstoffbrückenbindung des tertiären Amins des Piperazinringes zu Gly303, sowie zwei π - π -Interaktionen des Phenylringes zu His233 und Trp300, sowie hydrophobe Interaktionen. Die vergrößerte Anzahl der Interaktionen liefert eine Erklärung der deutlichen Verbesserung der Bindungsenergien im Vergleich zum Liganden 382.

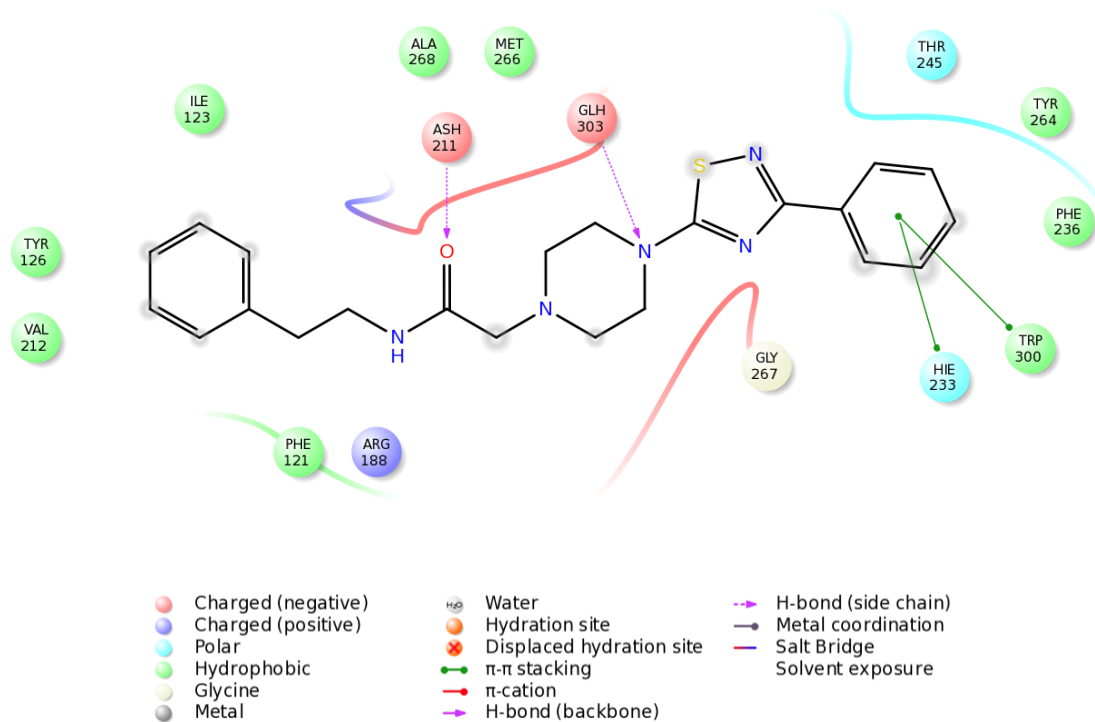


Abbildung 82: Bindungsmodus von **55** an GTB (**2RIZ-Arg176Gly**) nach energetischer Minimierung. Die Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten des Enzyms in der Nähe zum Liganden sind in Rot (negativ geladen), Lila (positiv geladen) und Grün (hydrophob) dargestellt. Mögliche Wasserstoffbrücken sind als lila Pfeile dargestellt. π - π -Bindungen werden als grüne Striche angezeigt.

Zur Übersicht der verschiedenen Orientierungen sind in Abbildung 83 alle Strukturen im Vergleich gezeigt. Die unterschiedliche Orientierung von **55** in den verschiedenen Kristallstrukturen ist dabei deutlich zu erkennen.

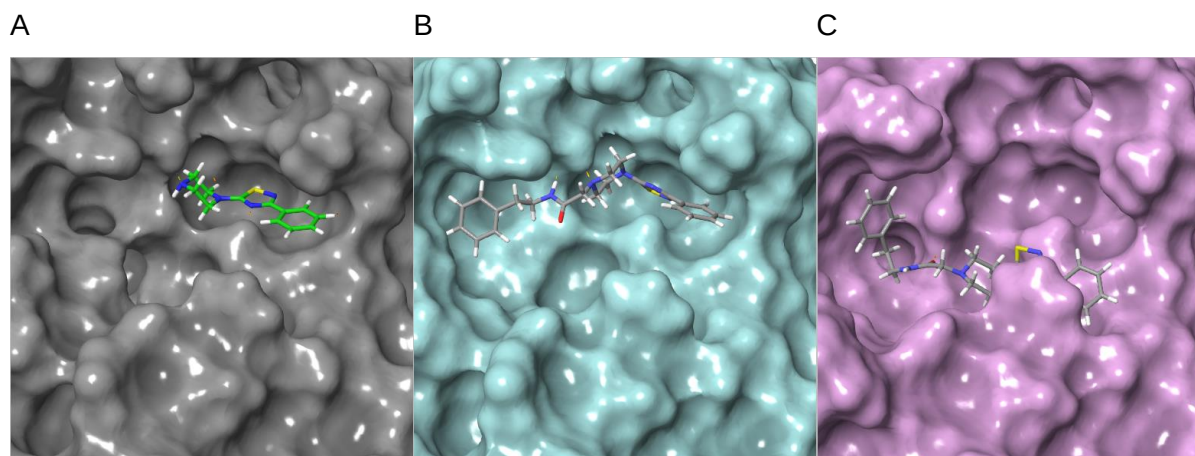


Abbildung 83: Vergleichende Darstellung von **55** in den Strukturen **(B)** 3U0X (blau), **(C)** 2RIZArg176Gly (rosa) und **(A)** Ligand 382 (grau). Deutlich ist die ähnliche Orientierung des Liganden in der Struktur 3U0X im Vergleich zum Liganden 382 zu erkennen. Die Orientierung von **55** im 2RIZ-Modell unterscheidet sich hingegen deutlich von der Orientierung im 3U0X-Modell.

5.2.4.3 *In silico* Analyse von Ligand **56**

Das Ergebnis des *Docking*-Experimentes und der anschließenden energetischen Minimierung von **56** in der 3U0X ist in Abbildung 84 zu finden. Die Strukturelemente des Ligand 382 befinden sich auf der Akzeptorseite der Bindungstasche. Die neu hinzugefügten Elemente orientieren sich auf der Donorseite der Bindungstasche. Die Kavität der Akzeptorbindungstasche wird jedoch kaum ausgenutzt. Die berechnete theoretische Bindungsenergie von **56** beträgt -27.1 kcal/mol und ist damit um 7.4 kcal/mol besser im Vergleich zu Ligand 382.

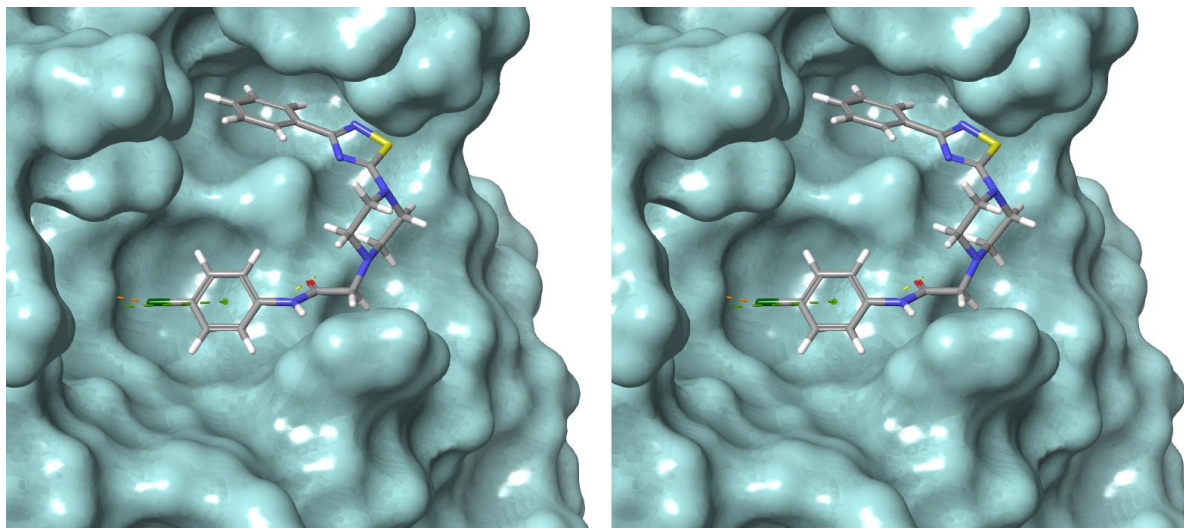


Abbildung 84: Ausschnitt aus der Bindungstasche der geschlossenen GTB–Struktur 3U0X (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **56** nach energetischer Minimierung. Gut zu erkennen ist die π -kationische Wechselwirkung des Chlorphenylringes (grün dargestellt). Die Oberfläche des Proteins ist in Blau eingefärbt.

Das zu dieser Struktur angefertigte Ligand-Interaktions-Diagramm ist in Abbildung 85 gezeigt. In dieser Struktur liefert keine Aminosäure des DXD-Motives eine Interaktion mit dem Liganden. Jedoch werden durch die Aminosäuren His233 und Gly303 Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoffatom der Amidgruppe des Liganden ausgebildet.

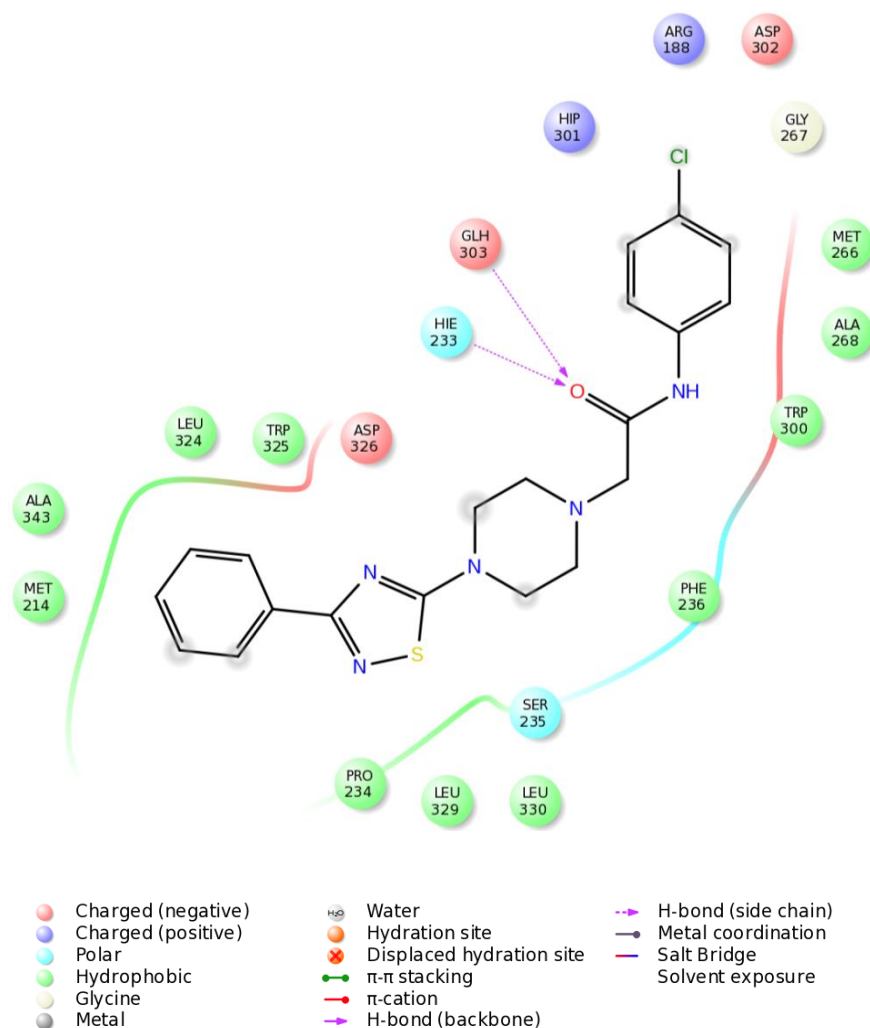


Abbildung 85: Bindungsmodus von **56** an GTB (3U0X) nach energetischer Minimierung. Die Wasserstoffbrückenbindungen des Gly303 und His233 zum Carbonylsauerstoff der Amidgruppe sind als lila Pfeil dargestellt. Die π -Kation-Wechselwirkung der Chlorphenylethylgruppe zu Arg188 ist nicht dargestellt.

Das Docking und die anschließende Minimierung von **56** an das Modellsystem **2RIZ Arg176Gly** ergab eine völlig neue Orientierung des Liganden. Der 382-Grundkörper ist in diesem System auf der Donorseite der Bindungstasche orientiert. Bezogen auf das Docking-Ergebnis des Liganden 382 liegt die Orientierung von **56** um 180° gedreht, in der Bindungstasche vor. Die berechnete Bindungsenergie beträgt -32.1 kcal/mol.

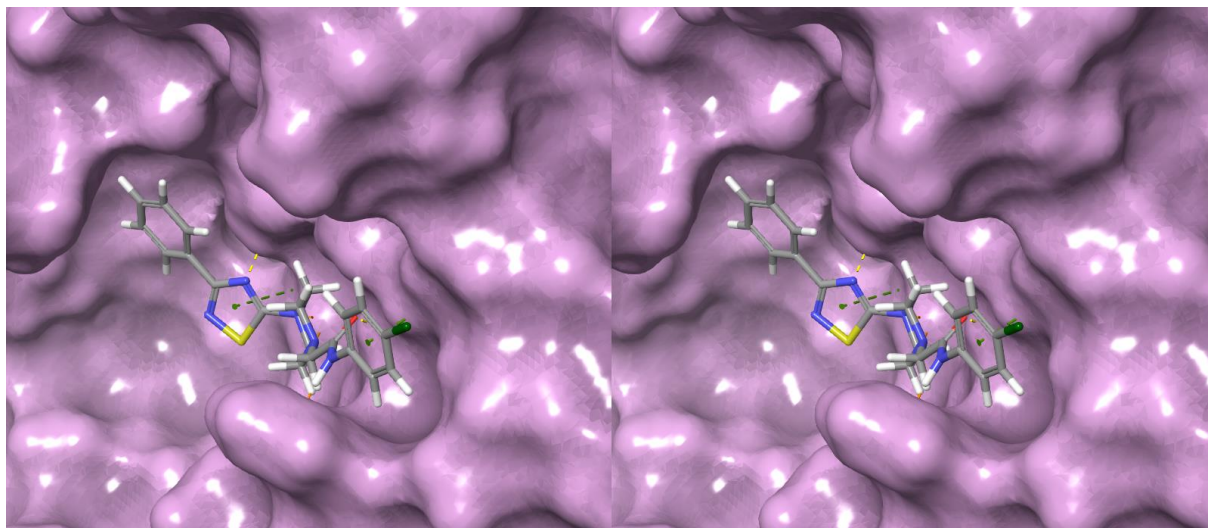


Abbildung 86: Ausschnitt aus der Bindungstasche der offenen GTB-Struktur **2RIZ Arg176Gly** (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **56** nach energetischer Minimierung. Der Ligand nimmt eine völlig andere Orientierung als in der Struktur 3U0X ein.

Das zugehörige Ligand-Interaktions-Diagramm ist in Abbildung 87 gezeigt. Es zeigt sich, dass die zum DXD-Motiv zugehörige Aminosäure Asp211 eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Stickstoffatom des Thiadiazolringes ausbilden könnte. Zusätzlich wird diese Ausrichtung durch π -kationische- und π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Arg188 und dem Thiadiazolring begünstigt. Weiterhin sind eine π - π -Wechselwirkung des Chlorphenylringes zum His233, sowie zahlreiche hydrophobe Interaktionen möglich.

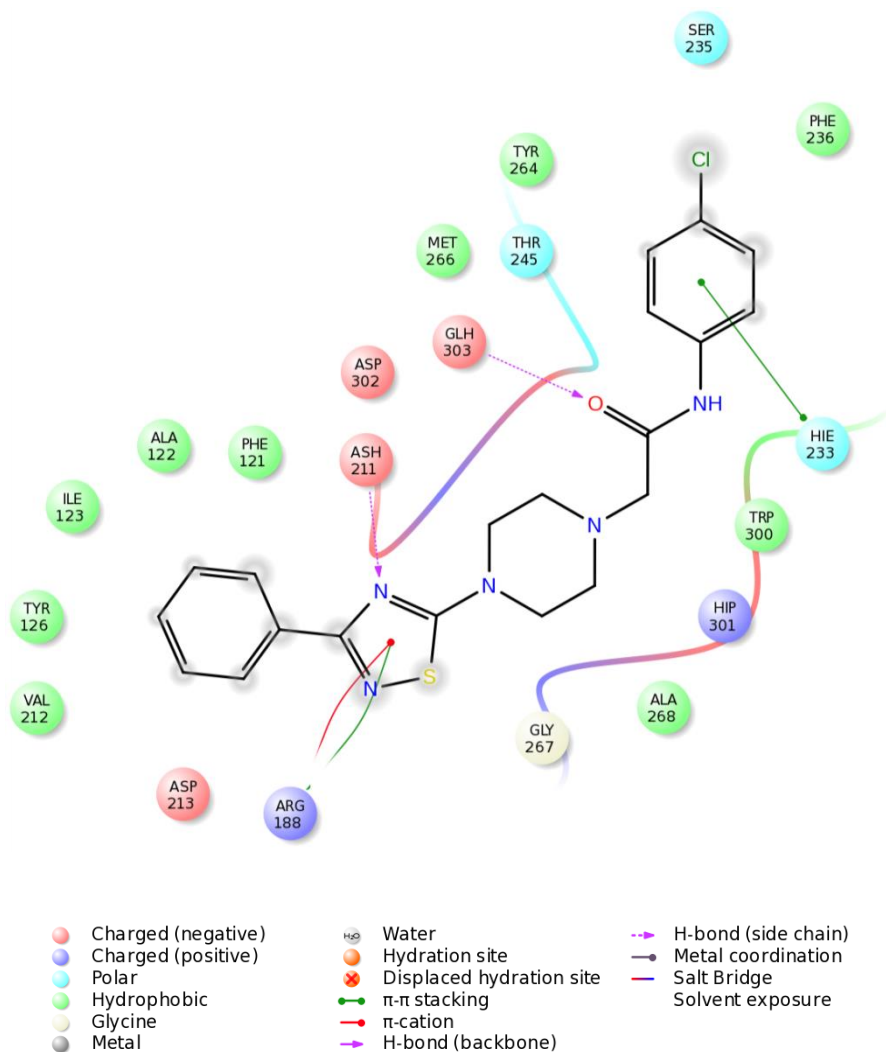


Abbildung 87: Bindungsmodus von **56** an GTB (**2RIZ Arg176Gly**) nach energetischer Minimierung. Die Wasserstoffbrückenbindungen des Gly303 zum Carbonylsauerstoff der Amidgruppe, sowie von Asp211 zum Stickstoffatom des Thiadiazolringes sind als lila Pfeile dargestellt. Die π - π -Wechselwirkung des Thiadiazolringes zu Tyr126 ist als grüne Linie und die π -kationische-Interaktion als rote Linie dargestellt.

Zur Übersicht der verschiedenen Orientierungen sind in Abbildung 88 alle Strukturen im Vergleich gezeigt. Die unterschiedliche Orientierung von **56** in den verschiedenen Kristallstrukturen ist dabei deutlich zu erkennen.

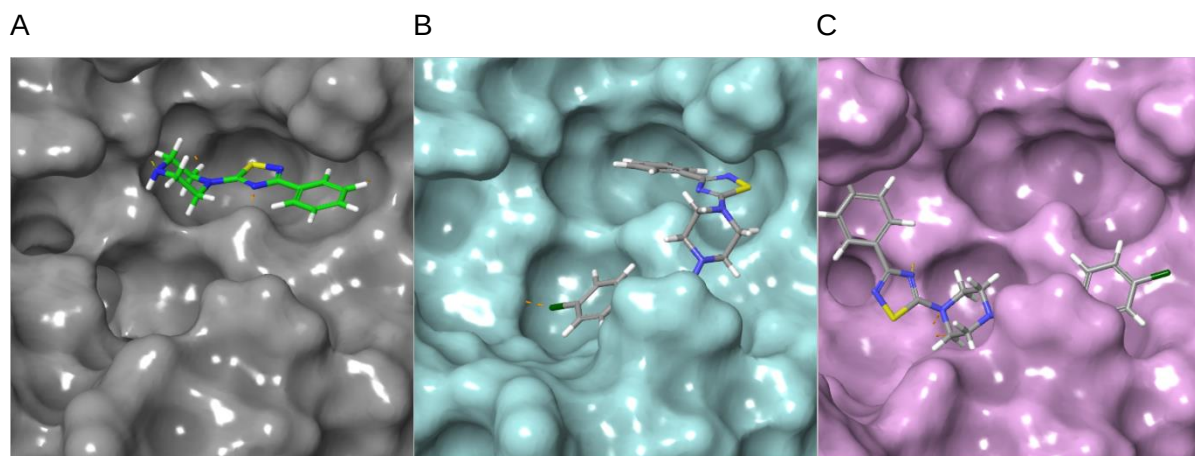


Abbildung 88: Vergleichende Darstellung von **56** in den Strukturen **(B)** 3U0X (blau), **(C)** 2RIZ Arg176Gly (rosa) und **(A)** Ligand 382 (grau). Der Ligand **56** nimmt sowohl in der Kristallstruktur 2RIZ Arg176Gly als auch in der 3U0X-Kristallstruktur, bezogen auf Ligand 382, eine neue Orientierung ein.

5.2.4.4 *In silico* Analyse von Ligand **57**

Das Ergebnis des *Dockings* und der anschließenden energetischen Minimierung von **57** an 3U0X ist in Abbildung 89 zu sehen. Die ursprünglichen Strukturelemente des Liganden 382 nehmen dabei eine ähnliche Orientierung wie der Ligand 382, auf der Akzeptorseite der Bindungstasche ein. Der zugefügte Amid-Rest orientiert sich auf der Donorseite der Bindungstasche. Jedoch wird die Kavität der Bindungstasche nicht voll ausgenutzt. Die theoretische Bindungsenergie beträgt -29.3 kcal/mol. Im Vergleich zum Ligand 382 ergibt sich eine Verbesserung der Bindungsenergie um 9 kcal/mol.

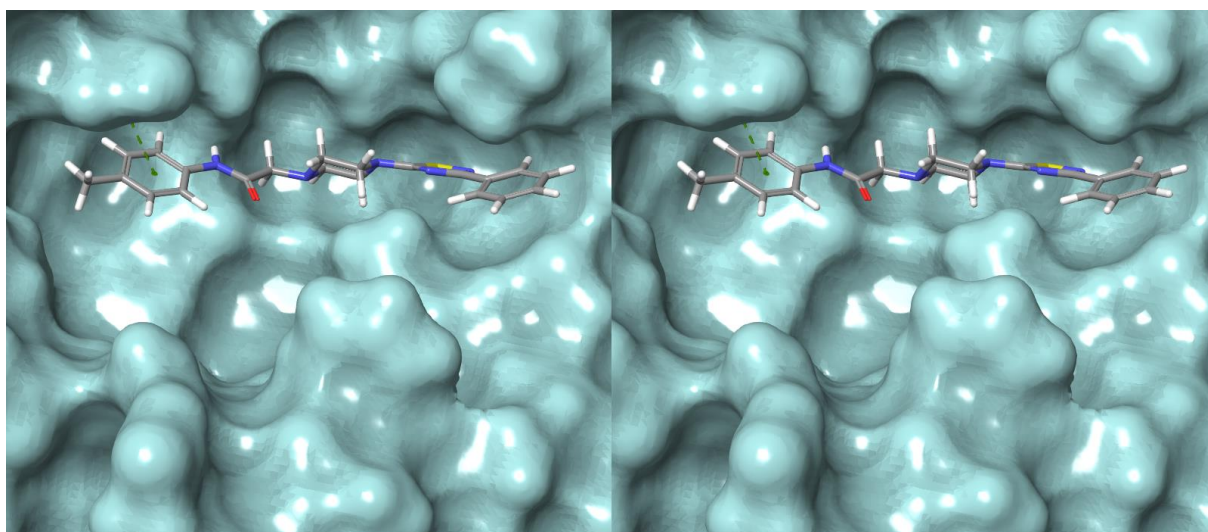


Abbildung 89: Ausschnitt aus der Bindungstasche der geschlossenen GTB-Struktur 3U0X (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **57** nach energetischer Minimierung.

Das zugehörige Ligand-Interaktions-Diagramm ist in Abbildung 90 dargestellt. Auch hier ist eine Beteiligung des DXD-Motivs durch die Wasserstoffbrückenbindung von Asp213 zum Amidproton des Liganden möglich. Zusätzlich wird eine π - π -Wechselwirkung des Chlorphenylringes zu Tyr126 ausgebildet.

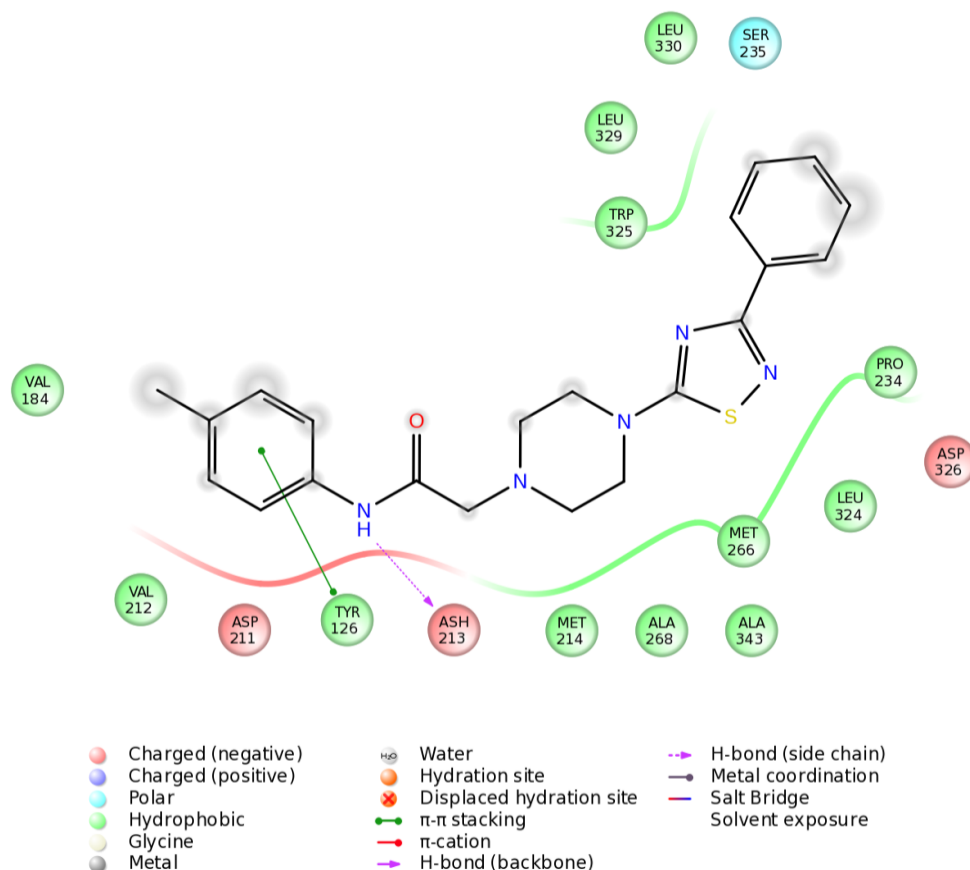


Abbildung 90: Bindungsmodus von **57** an GTB (3U0X) nach energetischer Minimierung. Die Beteiligung des DXD-Motives wird durch die Wasserstoffbrückenbindung von Asp213 zum Amidproton als lila Pfeil dargestellt. Die π - π -Wechselwirkung des Chlorphenylringes zu Tyr126 ist als grüne Linie dargestellt.

Das *Docking* und die anschließende Minimierung von **57** an das Modellsystem **2RIZ Arg176Gly** ist in Abbildung 91 dargestellt. Es ergibt sich eine sehr ähnliche Orientierung zum Liganden **55** an **2RIZ Arg176Gly**. Die theoretische Bindungsenergie beträgt -32.7 kcal/mol. Im Vergleich zum Ligand 382 ergibt sich eine Verbesserung der Bindungsenergie um 12.3 kcal/mol.

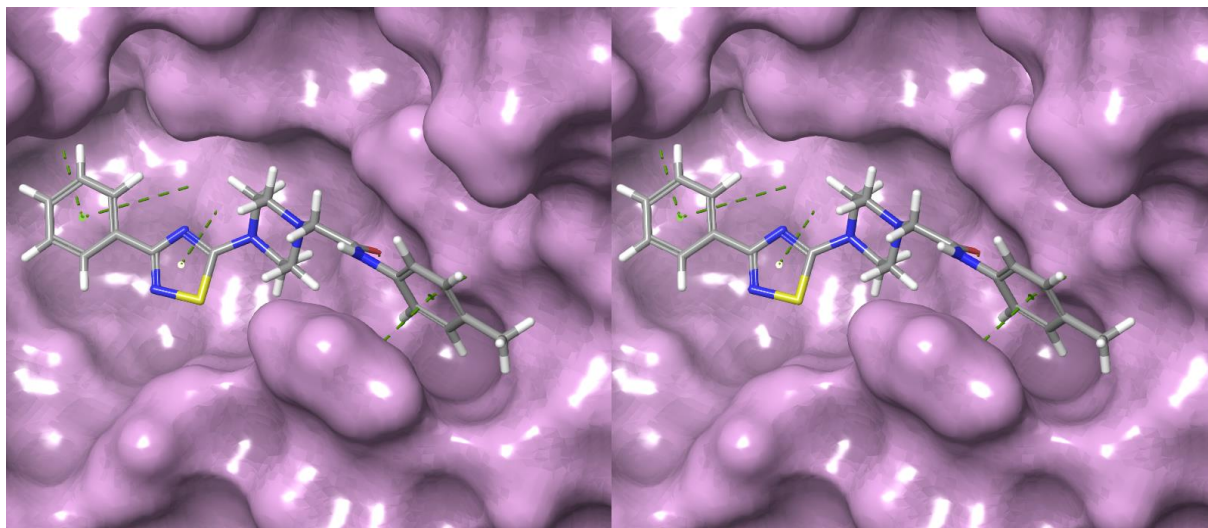


Abbildung 91: Ausschnitt aus der Bindungstasche der offenen GTB-Struktur **2RIZ Arg176Gly** (*crossed eye* Darstellung) mit dem Liganden **57** nach energetischer Minimierung. Der Ligand nimmt eine völlig andere Orientierung als in der Struktur 3U0X ein.

Das zugehörige Ligand-Interaktions-Diagramm ist in Abbildung 92 gezeigt. Eine Beteiligung des DXD-Motivs ist in diesem Fall nicht gegeben. Vom Phenylring der mit dem Thiadiazolring verknüpft ist findet eine π - π -Wechselwirkung zum Phe121 statt. Des Weiteren sind Wasserstoffbrückenbindungen von Gly303 zum Carbonylsauerstoff der Amidgruppe, und von Arg188 zu einem Stickstoffatom des Piperazinrings möglich. Auch können π - π -Wechselwirkungen des Methylphenylringes zu den Aminosäuren His233 und Trp300 ausgebildet werden.

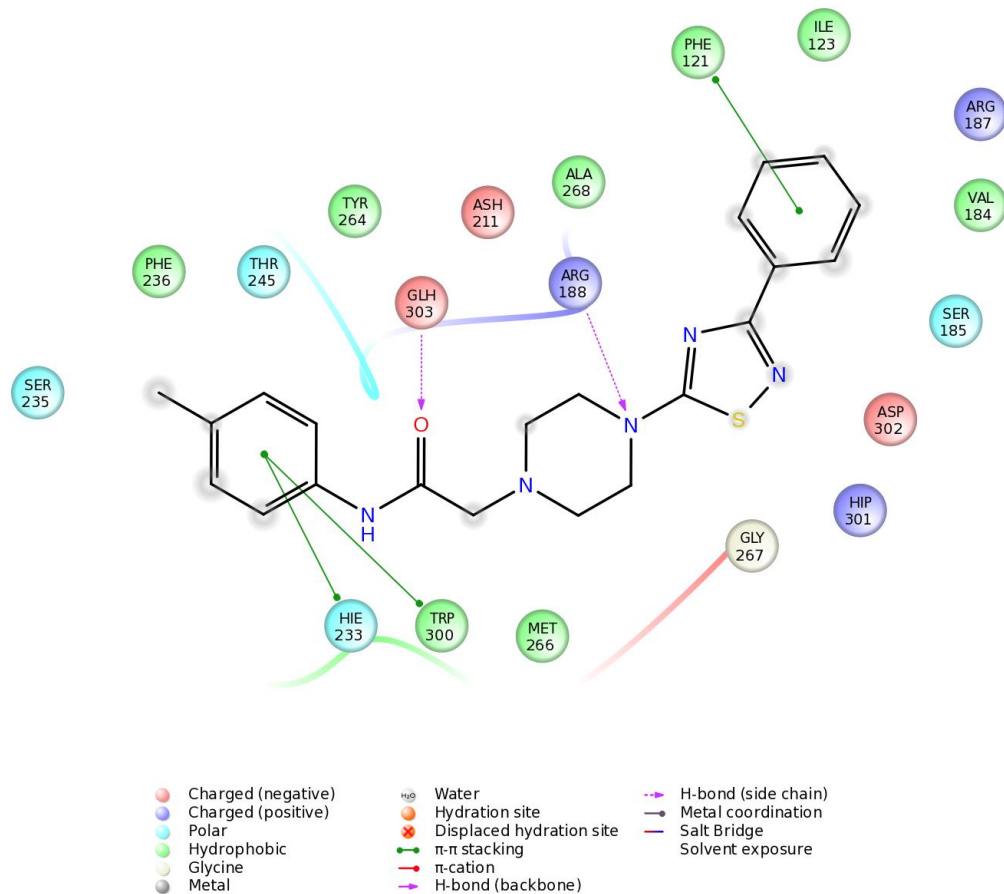


Abbildung 92: Bindungsmodus von **57** an GTB (**2RIZ Arg176Gly**) nach energetischer Minimierung. Die π - π -Wechselwirkungen sind als grüne Linie dargestellt. Die Wasserstoffbrückenbindungen von Gly303 zum Carbonylsauerstoff und von Arg188 zu Stickstoffatom des Piperazinrings werden als lila Pfeile dargestellt

Zur Übersicht der verschiedenen Orientierungen sind in Abbildung 93 alle Strukturen im Vergleich gezeigt. Auch hier ist die unterschiedliche Orientierung von **57** in den verschiedenen Kristallstrukturen deutlich zu erkennen.

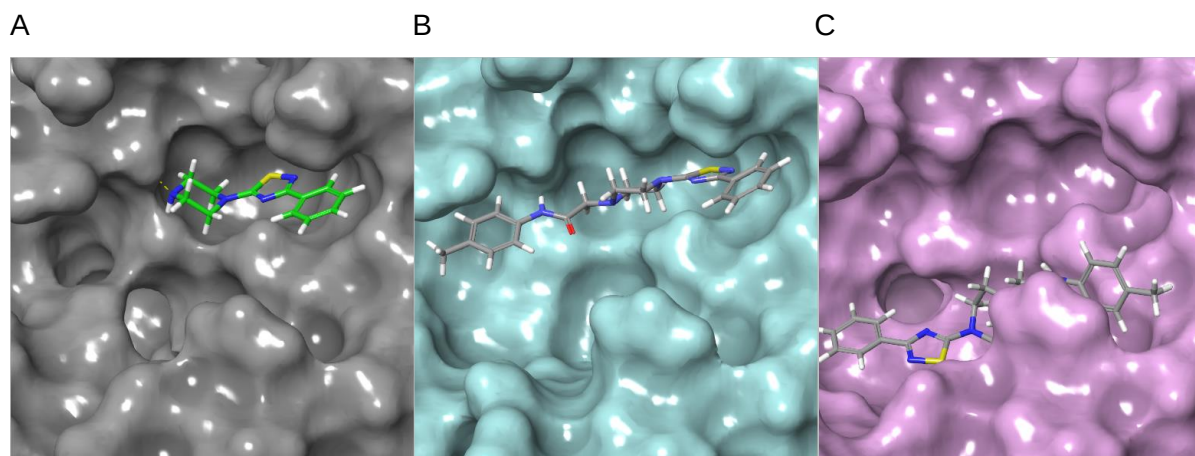


Abbildung 93: Vergleichende Darstellung von **57** in den Strukturen **(B)** 3U0X (blau), **(C)** **2RIZ Arg176Gly** (rosa) und **(A)** Ligand 382 (grau). Der Ligand **57** nimmt in der 3U0X-Kristallstruktur, bezogen auf die Ursprungsstruktur Ligand 382 eine neue Orientierung ein. Hingegen ergibt sich für die Orientierung des Liganden in der Kristallstruktur **2RIZ Arg176Gly** eine ähnliche Orientierung wie für den Liganden **56**.

Unabhängig von der Kristallstruktur nehmen die Liganden eine Orientierung ein in der die volle Kavität der Bindungstasche nicht ausgenutzt wird. In der 3U0X Struktur findet eine Orientierung der Liganden auf der Donorseite mit Beteiligung der Akzeptorseite der Bindungstasche statt, hingegen findet in der **2RIZ Arg176Gly**-Struktur eine überwiegende Orientierung auf der Akzeptorseite statt. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis zur Erklärung der Ergebnisse der Progresskurvenanalyse sein. In dieser deutet sich ein Mischtyp der Hemmung von kompetitiv/nicht-kompetitiv an. Nehmen die Liganden tatsächlich eine Orientierung ein wie sie sich aus den Docking-Ergebnissen mit der Struktur **2RIZ Arg176Gly** ergibt, wäre noch genug Platz auf der Donorseite der Bindungstasche vorhanden, sodass das verwendete Donorsubstrat UDP-Gal noch binden könnte. Dies würde zu einer nicht-kompetitiven Hemmung führen. Die Ergebnisse der theoretischen Bindungsenergien sind zusammenfassend in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 18: Übersicht der berechneten Bindungsenergien nach *Docking* und anschließender energetischer Minimierung mit 1200 Iterationen.

Ligand	Kristallstruktur (offene/geschlossene Konformation)	Berechnete Bindungsenergien [kcal/mol]
Ligand 382 (16)	3U0X (offene Konformation)	-20.5
55	3U0X (offene Konformation)	-20.5
	2RIZ Arg176Gly (geschlossene Konformation)	-31.9
56	3U0X (offene Konformation)	-27.1
	2RIZ Arg176Gly (geschlossene Konformation)	-32.1
57	3U0X (offene Konformation)	-29.3
	2RIZ Arg176Gly (geschlossene Konformation)	-32.7

Die *in silico* ermittelten Ergebnisse welche durch die *Docking*-Studien erhalten wurden, stehen im sehr guten Einklang mit den experimentell erzielten Ergebnissen (SPR, STD, Progresskurvenanalyse). Die *in silico* Studien zeigen, dass die Liganden in der Lage sind sowohl in der geöffneten als auch geschlossenen Konformation an GTB zu binden. Dies konnte mit den durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Der Vergleich der berechneten Bindungsenergien weist für die Liganden **55**, **56** und **57** deutliche bessere Bindungsenergien als für den ursprünglichen Liganden 382 auf. Die daraus anzunehmende stärkere Bindung von **55**, **56** und **57** im Vergleich zu Ligand 382 an GTB konnte ebenso mit den durchgeführten Experimenten bestätigt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Software

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
ESI-TOF	6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies
DC-Alufolie	Alugram® Xtra SIL G/UV ₂₅₄	Machery-Nagel
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen
HPLC-MS	1200er Series mit Active Splitter G1986C und 6120 Quadrupol MS	Agilent Technologies
LC-ESI-TOF-MS	1200er Series mit 6224 TOF LC/MS	Agilent Technologies
NMR 400 MHz	AMX 400 (9.34 T, $\nu_L(^1\text{H}) = 400.13 \text{ MHz}$, 5 mm BBI-Probenkopf mit ATM und z-Gradient)	Bruker Biospin GmbH
NMR 500 MHz	DRX 500 (11.67 T, $\nu_L(^1\text{H}) = 499.87 \text{ MHz}$, inverser 5 mm Tripelresonanz- Probenkopf)	Bruker Biospin GmbH
NMR 600 MHz	Avance III HD 600 (14.09 T, $\nu_L(^1\text{H}) = 600.13 \text{ MHz}$, 5 mm BB Smartprobe)	Bruker Biospin GmbH

Experimenteller Teil

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
NMR 700 MHz	Avance I 700 (16.44 T, $\nu_L(^1\text{H}) = 700.13$ MHz, inverser 5 mm Tripelresonanz- Cryoprobenkopf)	Bruker Biospin GmbH
NMR Probenröhrchen	3 mm <i>match</i>	Hilgenberg
pH-Meter	pH 526	WTW
Polarimeter	P8000	A.Kruss Optronic
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SGwater
RP-HPLC Säule	VP 250/21 Nucleodur C ₁₈ Isis, 5 μM	Machery Nagel
SPR	T100 Biacore®	GE Healthcare
SPR-Sensorchip	CM5	GE Healthcare
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/Vis Spektralphotometer	NanoDrop® 2000c	Thermo SCIENTIFIC
Zentrifugen	5804R, 5417R, 5415D	Eppendorf

Tabelle 20: Auflistung derverwendeten Software.

Software	Hersteller
Biacore T100 Control (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation (Vers. 1.1.1)	GE Healthcare
ChemDraw Pro 11.0	CambridgeSoft
LC/MSD Chemstation	Agilent Technologies
Maestro	Schrödinger
MATLAB R2015a	MathWorks
Origin 9.1G	Origin Lab
Sybyl X 1.1	Tripos
Topspin 3.1	Bruker Biospin GmbH

6.2 Verwendete Puffer

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
MOPS (Dialyse-Puffer)	50 mM MOPS 100 mM NaCl 5 mM MnCl pH 6.7
MOPS (SPR-Puffer I)	50 mM MOPS 100 mM NaCl 5 mM MnCl pH 6.7
Na-Acetat (SPR-Puffer II)	50 mM Na-Acetat 100 mM NaCl 5 mM MgCl pH 4.5

Experimenteller Teil

Puffer	Zusammensetzung
Na-Acetat (SPR-Puffer III)	50 mM Na-Acetat 100 mM NaCl 5 mM MgCl 5 % DMSO
Na-Acetat (Immobilisierungs-Puffer)	10 mM Na-Acetat pH 6.0
Na-Acetat- d_3 (Progresskurvenanalyse)	50 mM Na-Acetat- d_3 100 mM NaCl 5 mM MgCl 1.00 mM TSP- d_4 pH 5.0

6.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Hersteller	Chemikalie
abcr	3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol
Acros Organics	Hydrazinacetat, TFA, Thiophenol, Ethanol
Alfa Aesar	1-Brom-5-chlorpentan, Bortrifluoridetherat, Cäsiumcarbonat
Applichem	L-Fucose, MOPS
Apollo Scientific Limited	2-Brom-N-(4-chlorphenyl)acetamid
Chemsolute	NaOH
Euriso-top	CDCl ₃ , D ₂ O
GPR Rectapur	NaCl
Fluka	Benzylbromid, abs. DMSO, TBAB, NaH, 60 %ige Suspension, Benzaldehyddimethylacetal, Essigsäureanhydrid
Grüssing	Dioxan, Essigsäure, Na ₂ SO ₄ , Salzsäure- <i>d</i> ₁ , Triethylamin, Natriumacetat
Lancaster	Pd/C (10 %)
Lilly	TrCl
Honeywell	NaI
Merck	Kaliumcarbonat, TMSOTf, EDTA, Trichloracetonitril, Molsieb, SDS
Sigma Aldrich	2-Brom-N-(2-phenylethyl)acetamid 2-Brom-N-(4-methylphenyl)acetamid abs. Chloroform, abs. Diethylether, abs. DCM, abs. DMF TBAI, abs. Pyridin, abs. Methanol, Manganchlorid,

Experimenteller Teil

Hersteller	Chemikalie
	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Na-Acetat- d_3 , Oxalylbromid, abs. Toluol
Riedel de Haen	Natrium, Natriumcarbonat
Roth	D-Galactose
TCI	Saure Phosphatase, 4-Penten-1-ol
VWR	Salzsäure, Acetonitril
Westphalen	H ₂

6.4 *Molecular Modelling* und *Docking*-Studien

Molecular Modelling-Studien wurden mit der Software SYBYL-X 1.1 auf einer *hp* Workstation z 600 durchgeführt.

Die verwendeten Röntgenkristallstrukturen der GTB stammten aus der RCSB Protein Data Base.^[55]

6.4.1 *Allgemeines Vorgehen bei Minimierungsrechnungen*

Die Röntgenkristallstrukturen pdb 2RJ7 und 2RJ8 wurden in unterschiedlichen Ebenen geladen. Nach *alignment* der C α -Atome, wurde das Donorsubstrat UDP aus der pdb 2RJ8-Ebene extrahiert. Dann wurde UDP-Gal (**4**) aus der pdb 2RJ7-Ebene in die pdb 2RJ8-Ebene eingeführt. Anschließend folgte der Aufbau der entsprechenden Verlinkung zwischen **22** und dem neu eingeführten Liganden **4**. Zum Schluss wurde **4** wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben entsprechend modifiziert.

Das aufgebaute Linkerfragment und die Modifizierungen wurden zunächst manuell in die Bindungstasche eingepasst. Frei drehbare Bindungen so rotiert, dass keine Verletzung, Berührung oder gar Durchdringung der Proteinoberfläche stattfand. Störendes Kristallwasser wurde gegebenenfalls aus der Bindungstasche entfernt.

Nach Hinzufügen aller fehlenden Wasserstoffatome wurden die ermittelten Strukturen mit 1000 Iterationsschritten minimiert.

Alle Rechnungen basierten auf dem Tripos-Kraftfeld ($\epsilon = 18$, Dielektrizitätsfunktion: *distance*, Terminierung $\Delta E < 0.05$). Die Atomladungen wurden nach Gasteiger & Marsili berechnet.

6.4.2 Docking-Studien

Die *Docking*-Studien wurden mit der Software Maestro 9.9.013 auf einer *hp* Workstation z 600 durchgeführt.

Die verwendeten Röntgenkristallstrukturen der GTB stammten aus der RCSB Protein Data Base.^[55]

Die ebenfalls genutzten Hilfsprogramme werden nachfolgend kurz erläutert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Standardeinstellungen des jeweiligen Programms benutzt.

Protein Preparation Wizard (Prep Wizard):

Zur Optimierung der geladenen Proteinstruktur wurde *das tool Prep Wizard* verwendet. Die einzelnen Preprozessierungsschritte waren:

- *Assign bond orders*
- *Add hydrogens*
- *Create zero-order bond to metals*
- *Create disulfide bonds*
- *Delete water beyond 5 Å from het groups*

Zur Definition der Wasserstoffbrückenbindungen wurden folgende Einstellungen verwendet:

- *Use PROPKA: pH: 5.0*
- *Sample water orientations*

Vorbereitung der GTB-Strukturen: 2RIZ Arg176Gly

Die pdb Struktur 2RJ7 wurde in maestro geladen und mit der Funktion *Prep Wizard* bearbeitet. Bei der Struktur 2RJ7 handelt es sich um eine AABB-Mutante der GTB diese enthält die Liganden UDP-Gal (**4**) und BHE (**22**).

Für eine offene Konformation der GTB wurde die pdb Struktur 2RIZ in maestro geladen. 2RIZ ist eine ABBB Mutante der GTB. Die Kristallstruktur enthält keine Liganden und das Enzym liegt in der offenen Konformation vor.

Da es sich bei der 2RIZ um eine ABBB Mutante der GTB handelt, wurde mit der Funktion *residue and loop Mutation* die betreffende Aminosäure Arginin 176 zurück auf Glycin mutiert. Anschließend wurde das Protein mit der Funktion *Prep Wizard* bearbeitet. Dabei werden überflüssige Moleküle und Ionen sowie Wassermoleküle entfernt. Fehlende Wasserstoff-

Atome und fehlende Seitenketten des Proteins wurden ergänzt. Der Protonierungsgrad wurde entsprechend des STD-Experiments auf pH 5.0 eingestellt. Mit der Funktion *Alignment* wurden beide Proteinstrukturen aneinander angepasst. Dann wurden über die Funktion *merge* die Liganden der Struktur 2RJ7 extrahiert und in die Proteintasche der bearbeiteten Struktur 2RIZ geladen. Die Proteinstruktur 2RJ7 wurde im Anschluss nicht mehr benötigt und daher gelöscht. Die so erhaltene Struktur wurde **2RIZ Arg176Gly** genannt.

Vorbereitung der GTB-Strukturen: 3U0X

Die GTB Struktur pdb 3U0X wurde ebenfalls in maestro geladen und mit der Funktion *Prep Wizard* bearbeitet. Bei der Struktur 3U0X handelt es sich um die BBBB-Form der GTB, diese enthält den Liganden 382 (**16**). Der Protonierungsgrad wurde entsprechend der des STD-Experiments auf $\text{pH } 5.0 \pm 0.2$ eingestellt. Da für die *Docking*-Studien nur die monomere Struktur der GTB untersucht werden sollte, wurde nur Proteinkette A benötigt. Die Kette B wurde daher gelöscht. Anschließend wurde das Protein mit der Funktion *Prep Wizard* bearbeitet.

LigPrep

Das Konvertierungsprogramm *LigPrep* überführt zweidimensionale Strukturen in dreidimensionale Strukturen. Tautomere und stereochemische Variationen der Molekülstrukturen können berücksichtigt werden. Es wurde ein pH-Wert von 5.0 ± 0.2 eingestellt. Die mit *LigPrep* vorbereiteten Liganden wurden nachfolgend für das *Ligand Docking* verwendet.

Docking der Liganden

Die Liganden wurden mit der Software *ChemDraw* gezeichnet und als sdf-Dateien in Maestro geladen. Nachfolgend wurden die Strukturen in eine dreidimensionale Struktur überführt. Dafür wurde das *tool LigPrep* genutzt. Es wurde ebenfalls ein Protonierungsgrad von pH 5.0 eingestellt.

Glide

Das Programm *Glide* ermöglicht das virtuelle *Screening* von Liganden. Dabei werden Prognosen über den möglichen Bindungsmodus aufgestellt. Nachfolgende Einstellungen wurden benutzt:

Grid Generation:

Erfolgte durch Markierung des Liganden.

Ligand Docking:

- Ligand: flexible
- Precision: Extra Precision (XP)

MacroModel:

Mit dem Programm *Macro Model* wurden unter Zuhilfenahme der Funktion *Current Energy* die Energien des Protein-Ligand Komplexes berechnet. Dabei wurde ein OPLS-2005-Kraftfeld und Wasser als Lösungsmittel ausgewählt.

6.5 Surface Plasmon Resonance (SPR) Experimente

SPR-Experimente wurden mit Hilfe des Biacore T100, UDP, **54**, **55** und **56** durchgeführt. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte auf einem CM5 Sensorchips der Firma GE Healthcare. Die Immobilisierung der GTB erfolgte mit Hilfe des Immobilisierungs-wizards, der in der Biacore™ T100 Control Software implementiert ist.

Zuvor wurde, zur Ermittlung des für die Immobilisierung benötigten optimalen pH-Wertes, ein pH-scouting ausgeführt.

Der Immobilisierungs-wizard wurde so programmiert, dass nur nach positiv ausgefallenem *preconcentration*-Test die Chipoberfläche automatisch aktiviert wurde. Die Aktivierung erfolgte mit EDC/NHS. Zuvor wurde die in Dialyse-Puffer (MOPS pH 6.7) gelagerte GTB mit Immobilisierungs-Puffer auf ~ 30 µg/mL verdünnt. Als maximale Belegungsdichte wurde ein Wert von 4000 RU gewählt.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der zu untersuchenden Liganden, wurden Stocklösungen der Liganden in 100 % DMSO hergestellt. Die nachfolgende Verdünnung wurde mit SPR-II-Puffer durchgeführt. Die Endkonzentration an DMSO betrug für jede zu vermessende Konzentration 5 %. Die nachfolgenden Verdünnungen der Konzentrationsreihe wurden mit SPR-Puffer III, welcher 5 % DMSO beinhaltet, hergestellt.

Die Liganden wurden bei einer Flussrate von 10 µL/min und 25 °C über die Chipoberfläche geleitet. UDP wurde in Konzentrationen von 0 bis 2 mM vermessen.

Die Kontaktzeit betrug in allen durchgeführten Experimenten mit Inhibitoren 180 Sekunden, die Dissoziationszeit 900 Sekunden.

Bei Verwendung von UDP betrug die Kontaktzeit 120 Sekunden, die Dissoziationszeit 600 Sekunden. Eine Übersicht der untersuchten Konzentrationsbereiche ist in Tabelle 23 zu finden.

Tabelle 23: Übersicht der untersuchten Konzentrationen.

Verbindung	Puffersystem	Konzentrationsbereich
UDP	MOPS pH 6.7	13.3 μ M-2.00 mM
UDP	Na-Acetat pH 4.5 (5 % DMSO)	13.3 μ M-2.00 mM
54	Na-Acetat pH 4.5 (5 % DMSO)	0-600 μ M
55	Na-Acetat pH 4.5 (5 % DMSO)	0-12 μ M
56	Na-Acetat pH 4.5 (5 % DMSO)	0-12 μ M

Um die Dissoziationsphase in Vorbereitung für weitere Messungen abzukürzen, wurde bei den Liganden **55** und **56** aufgrund der starken Assoziation eine Regeneration durchgeführt. Die verwendeten Regenerationsbedingungen sind in Tabelle 24 zu finden.

Tabelle 24: Verwendete Regenerationsbedingungen bei der Untersuchung der Liganden **54**, **55**.

Verbindung	Regeneration
55	30 sec (30 μ L/min) 0.01 % SDS
56	30 sec (30 μ L/min) 0.1 % SDS

6.6 Saturation Transfer Difference (STD) NMR Experimente

STD NMR-Experimente wurden mit einem 700 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einem Cryoprobekopf, in 3 mm Probenröhrchen bei 300 K durchgeführt.

Alle STD-NMR-Messungen wurden in gepufferter Lösung durchgeführt. Als Puffer wurde Na-Acetat- d_3 (kompetitive STD-Messung) verwendet. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DCl (35 % in D_2O) auf 5.0 eingestellt (dies entspricht einem korrigierten pD-Wert von pD 5.4, der abgelesene pH-Wert muss mit dem Wert 0.4 korrigiert werden, da in deuteriertem Puffer gemessen wurde).^[68]

Umpuffern der GTB

Die GTB wird in Mn^{2+} -haltigem Dialysepuffer (MOPS pH 6.7) gelagert und muss für die Messungen in NMR-Probenpuffer (50 mM Na-Acetat- d_3) umpuffert werden. Jeder Schritt der Umpufferung findet durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C in einem Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa statt. Zu Beginn wurden zweimal je 0.5 ml D_2O durch die Filtereinheit zentrifugiert, um das zur Konservierung der Membran enthaltene Glycerol und mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Um das Mn^{2+} zu komplexieren und dadurch leichter zu entfernen, wurde die Proteinlösung mit 10 mM EDTA versetzt und für dreißig Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die GTB umpuffert. Der Volumenüberschuss des Messpuffers bei diesem Vorgang betrug mindestens 4:1. Die Proteinkonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt und GTB auf die gewünschte Konzentration verdünnt und die Proteinkonzentration anschließend zur Kontrolle erneut photometrisch bestimmt.

Probenvorbereitung

Es wurde pro Messpunkt ein einzelnes Röhrchen mit der benötigten Menge GTB, UDP und Ligand angesetzt. Es wurde eine konstante Konzentration von 5 % DMSO- d_6 pro Messpunkt gewählt. Das Gesamtvolumen der Probe betrug 180 μ L. Dafür wurde vorab eine Stammlösung bestehend aus den benötigten Konzentrationen von GTB und UDP hergestellt und diese auf die einzelnen Röhrchen aufgeteilt. Das Endvolumen wurde dabei pro Probe auf 171 μ L festgelegt. Um das Gesamtvolumen von 180 μ L zu erreichen, wurden im Anschluss 9 μ L der zu untersuchenden Ligandlösung zugegeben. Dafür wurde der Ligand in DMSO- d_6 gelöst. Die benötigten Verdünnungsreihen wurden ebenfalls mit DMSO- d_6 angesetzt. Die Konzentrationen der Stammlösungen der Liganden wurden durch Bestimmung des S/N-

Verhältnisses per NMR bestimmt. Als Vergleichssubstanz diente eine 2 mM Sucroslösung (D_2O).

Die für die Messungen verwendeten Protein- und Ligandkonzentrationen sind in Tabelle 14 (Kapitel 5.2.2) aufgeführt. Der Bereich der untersuchten Ligandkonzentrationen wurde so gewählt, dass die höchstmögliche Konzentration der zu untersuchenden Liganden unter den gewählten Parametern vermessen werden konnte. Die Rezeptorbelegung r wurde mit Hilfe der Gleichungen 20 und 21 ermittelt.

$$[PL] = \left(\frac{1}{2} K_D + [P]_0 [L]_0 \right) - \sqrt{\frac{1}{4} (K_D + [P]_0 + [L]_0)^2 - [L]_0 [P]_0} \text{ und } r = \frac{[PL]}{[P]_0} \quad (20) + (21)$$

STD-Akquisition

Die Aufnahme der STD-Spektren erfolgte mit dem Pulsprogramm *stddiffgp19.3*. Das Pulsprogramm verwendet Trimpulse zur Zerstörung residualer Magnetisierung, einen TOCSY-Spinlock zur Unterdrückung von Proteinsignalen und eine 3-9-19-Watergatesequenz zur Unterdrückung des starken Wassersignals.

Zunächst wurden alle Proben mit 512 *scans* und im Anschluss ggf. zur Verbesserung des S/N-Verhältnisses mit 1k *scans* vermessen. Die programmspezifischen Parameter wurden dabei nicht verändert (siehe Tabelle 25). Für UDP wurde ein Artefaktspektrum in Abwesenheit von GTB unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Es konnten keine Sättigungseffekte detektiert werden.

Experimenteller Teil

Tabelle 25: Pulsprogramm und Aufnahmeparameter.

Experiment	Pulsprogramm	NS/DS	SW (F2)	[ppm]	Programmspezifische Parameter
STD	stddiffgp19.3.	512/4 bzw. 1024/4	8		P1= 11.17 p27= p18= p0= 44.68 PL18= 7.5 dB PL1= -4.5 dB SP13= 35 dB Trimpuls: PL10= 10 dB, P17= 2500 μ s Spinlock: PL29= 5.59 dB P29= D29= 15 ms on-res: -0.7 kHz off-res: 114.3 kHz

6.7 Progresskurvenanalyse

Die Experimente für die Verfolgung der Enzymreaktion zur Bestimmung von K'_M , v'_{max} und K'_i wurden mit einem 700 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einem Cryoprobekopf, in 3 mm Probenröhrchen bei 310 K durchgeführt.

Alle Messungen wurden in gepufferter Lösung durchgeführt. Als Puffer wurde Na-Acetat- d_3 (Progresskurvenanalyse) verwendet. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DCl (35 % in D_2O) auf 5.0 eingestellt (dies entspricht einem korrigierten pD-Wert von pD 5.4, der abgelesene pH-Wert muss mit dem Wert 0.4 korrigiert werden, da in deuteriertem Puffer gemessen wurde).^[68] Der verwendete Puffer enthielt 1.00 mM TSP- d_4 als internen Standard. Das genaue Vorgehen zum Umpuffern der GTB ist in Kapitel 6.6 beschrieben. Zusätzlich wurde der Probe noch 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA und 0.4 mg/mL APase zugeführt. Bei der Bestimmung von v'_{max} und K'_M ohne Inhibitor wurde der Probe zusätzlich 5 % DMSO- d_6 zugeführt.

Für Bestimmung von v'_{max} und K'_M in Gegenwart von **55**, **56** und **57** wurden die Liganden DMSO- d_6 gelöst. Dafür wurden die gleichen Stammlösungen benutzt wie sie für die STD-Studien verwendet wurden. Die Stammlösungen wurden für die benötigten Konzentrationen entsprechend verdünnt. Die Konzentration an DMSO- d_6 betrug ebenfalls in der fertigen Probe 5 %. Eine Übersicht der verwendeten Konzentrationen ist in Tabelle 15 (Kapitel 5.2.3) zu finden.

Als Akzeptorsubstrat dienten 2.5 mM α -L-Fuc-(1-2)- β -D-Gal-octyl. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 180 μL .

Die Proben wurden ohne das Donorsubstrat UDP-Gal angesetzt und alle NMR-spektroskopischen Parameter eingestellt. Die Zugabe des UDP-Gal erfolgte direkt am Spektrometer und die Aufnahme des Spektrums wurde umgehend gestartet. Die Reaktion wurde dabei bis zu 24 Stunden (24 Stunden= **55**, 22.5 Stunden= **56**, 21.3 Stunden= **57**) bei 37 °C verfolgt, wobei alle 7 Minuten ein ^1H NMR Spektrum mit 64 scans aufgenommen wurde, die Wasserunterdrückung erfolgte durch *excitation sculpting*.

Für die Auswertung der kinetischen Parameter wurden die Protonen H-5/H-1' des UDP-Gal untersucht. Die Konzentration zum Zeitpunkt $t=0$ wurde durch lineare Regression über die ersten zehn Datenpunkte ermittelt.

6.8 Synthesen

6.8.1 Darstellung der Saccharide

Die Nomenklatur der Verbindungen **28**, **39**, **48** und **53** erfolgte gemäß IUPAC-Nomenklatur für Disaccharide.

6.8.1.1 Darstellung von *n*-Pentyl-6-O-(5-(phenyl- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**28**)

6.9 mg (7.5 μ mol) das vollgeschützte Disaccharid (**53**) gelöst in 3.45 mL EtOH/Dioxan (1:1) wurde mit einer Microspatelspitze Pd/C (10%) versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend unter Wasserstoffatmosphäre bei 40-10 bar Überdruck für eine Stunde bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.0 mg (1.8 μ mol, 24%)* Produkt erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: C₂₈H₄₆O₁₁

Molgewicht: 558.66 g/mol

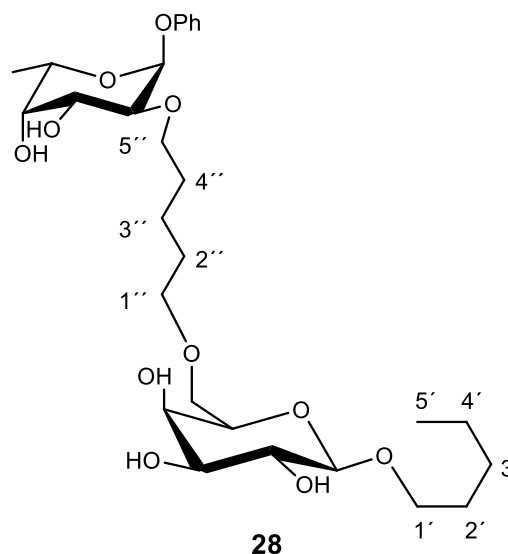
Aussehen: farbloser Sirup

R_F-Wert: 0.94 (EE/MeOH/H₂O= 7:3:1)

ESI MS: gefunden:
m/z= 581.2921 [M+Na]⁺

berechnet:
m/z= 581.2932 [M+Na]⁺

[α]_D²⁴: -76.0° (c= 0.05, DMSO)



¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm]: 7.38-7.33 (m, 2H, H_{Arom}), 7.12-7.07 (m, 3H, H_{Arom}), 5.74 (d-1H, H-1Fuc), 4.23 (d, 1H, H-1Gal), 4.14 (dq, 1H, H-5Fuc), 4.04 (dd, 1H, H-3Fuc), 3.80-3.72 (m, 3H, H-4Fuc, H-4Gal, CH₂-1a'), 3.70-3.61 (m, 3H, H-2Fuc, CH₂-1a''**), 3.61-3.55 (m, 2H, CH₂-1b', H-5Gal), 3.55-3.49 (m, 4H, H-3Gal, H-6aGal, H-6b-Gal, CH₂-1b''**), 3.43-3.35 (m, 3H, H-2Gal, CH₂-5''), 1.58-1.50 (m, 6H, CH₂-2', CH₂-3', CH₂-2''), 1.51-1.43 (m, 2H, CH₂-4'), 1.36-1.17 (m, 4H, CH₂-3'', CH₂-4'), 1.09 (d, 3H, H-6Fuc), 0.86-0.73 (m, 2H, CH₂-5').

$^3J_{1,2\text{Fuc}} = 3.8 \text{ Hz}$, $^3J_{2,3\text{Fuc}} = 10.5 \text{ Hz}$, $^3J_{3,4\text{Fuc}} = 3.5 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5\text{Fuc}} < 1 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6\text{Fuc}} = 6.6 \text{ Hz}$

$^3J_{1,2\text{Gal}} = 8.0 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, D) δ : 156.0 (C_{quart}), 2x 129.8, 122.9, 116.9 (4x C_{Arom}), 102.6 (C-1Gal), 94.9 (C-1Fuc), 75.7 (C-2Fuc), 73.2 (C-5Gal), 72.6 (C-3Gal), 71.6 (C-4Fuc), 71.1 ($\text{CH}_2\text{-5''}$)**, 70.9 ($\text{CH}_2\text{-1''}$ oder C-6Gal), 70.6 ($\text{CH}_2\text{-1'}$), 70.5 (C-2Gal), 69.5 ($\text{CH}_2\text{-1''}$ oder C-6Gal), 68.8 (C-4Gal), 68.7 (C-3Fuc), 67.5 (C-5 Fuc), 59.5 (C-6Gal oder $\text{CH}_2\text{-1''}$), 3x 28.5 ($\text{CH}_2\text{-2''}$, $\text{CH}_2\text{-3'}$, $\text{CH}_2\text{-2'}$), 28.1 ($\text{CH}_2\text{-4''}$), 2x 21.7 ($\text{CH}_2\text{-3''}$, $\text{CH}_2\text{-4'}$), 15.01 (C-6Fuc), 13.2 ($\text{CH}_2\text{-5'}$).

*Es sind 10 % einer zweiten Fucose-Spezies enthalten.

**Zuordnung unsicher.

6.8.1.2 Darstellung von Thiophenyl-2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosid (**33**)

Variante A

Analog zu Schmidt *et al.*^[58] wurden 42.2 mg (97.1 μmol) des α -TCAI der tricetylierten Fucose (**32- α**) in 2.5 mL abs. DCM gelöst und mit Molsieb (0.4 Å) versetzt. Zu der Lösung wurden 20 μL (0.16 mmol) Bortrifluoridetherat und 20 μL (0.19 mmol) Thiophenol hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 3 mL DCM hinzugegeben und die Lösung dreimal mit je 6 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 3 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE = 2:1) und so vom β -Anomer getrennt. Es konnten 6.1 mg (16 μmol , 16 %) des Produkts erhalten werden.

Variante B

Analog zu Schmidt *et al.*^[58] wurden 63.5 mg (146 μmol) des β -TCAI (**32- β**) dreimal mit je 2 mL abs. Toluol codestilliert, in 2.5 mL abs. DCM aufgenommen und mit Molsieb (0.4 Å) versetzt. Unter Rühren wurden 20 μL (0.16 mmol) Bortrifluoridetherat und 20 μL (0.19 mmol) Thiophenol hinzugegeben und das Reaktionsgemisch drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 3 mL DCM hinzugegeben und die Lösung dreimal mit je 5 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit 3 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE= 2:1) und so vom β -Anomer getrennt. Es konnten 5.5 mg (14 μ mol, 10 %) des Produkts erhalten werden.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{18}H_{22}O_7S$

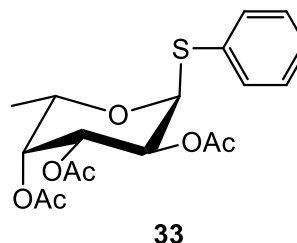
Molgewicht: 382.43 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup

R_f -Wert: 0.29 (PE/EE= 2:1)

ESI-MS: berechnet: $m/z = 405.0984$
 $[M+Na]^+$

gefunden: $m/z = 405.0987$ $[M+Na]^+$



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.44 – 7.41 (m, 2H, H_{Aromat}), 7.32 – 7.27 (m, 3H, H_{Aromat}), 5.93 (d, 1H, H-1), 5.37 – 5.32 (m, 2H, H-2, H-4), 5.29 (dd, 1H, H-3), 4.61 (dq, 1H, H-5), 2.17 (s, 3H, CH_3CO), 2.10 (s, 3H, CH_3CO), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 1.13 (d, 3H, H-6).

$^3J_{1,2} = 5.3$ Hz, $^3J_{2,3} = 11.1$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.1$ Hz, $^3J_{4,5} < 1$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.5$ Hz

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 131.9, 129.2, 127.6 (3x C_{Aromat}), 85.7 (C-1), 71.1 (C-4), 68.8 (C-3), 68.3 (C-2), 65.7 (C-5), 21.0, 20.8, 20.8 (3x CH_3CO), 16.0 (C-6).

6.8.1.3 Darstellung von Thiophenyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosid (**37**)

Analog zu Lemieux *et al.*^[59] wurden 54.1 mg (12.5 μ mol) der tribenzylierten Fucose (**35**) in 1 mL abs. DCM gelöst. Zu der Lösung wurden 56.2 μ L (72.2 μ mol) abs. DMF und 26.7 μ L (18.7 mol) Oxalylbromid gegeben, dabei kam es zu starker Gasentwicklung und ein farbloser Niederschlag fiel aus. Die Reaktion wurde zwanzig Minuten bei RT gerührt, anschließend erfolgte die Zugabe von 41.4 mg (12.5 μ mol) TBAB. Dann wurde die Lösung für weitere 50 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf -85 °C gekühlt und 41.3 μ L (23.7 μ M) DIPEA und 64.1 μ L (62.3 μ M) Thiophenol zugegeben. Die Reaktion wurde für einen Tag bis zum Erreichen der Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann mit ca. 20 mL DCM verdünnt und mit 20 mL dem. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend noch mit 20 mL Salzsäure (1 mol/L) und danach mit 20 mL gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend erneut dreimal mit

je 20 mL dem. Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Produkt konnte ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe eingesetzt werden. Es wurden 62.5 mg (119 µmol, 95 %) Produkt erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: C₃₃H₃₄O₄S

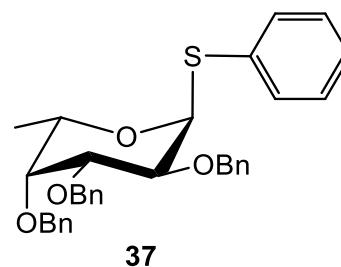
Molgewicht: 526.69 g/mol

Aussehen: farbloser, wachsartiger Feststoff

R_f-Wert: 0.68 (PE/EE= 7:3)

ESI-MS: berechnet: m/z= 544.2513 [M+NH₄]⁺, 549.2070 [M+Na]⁺,
565.1810 [M+K]⁺
gefunden: m/z= 544.2520 [M+NH₄]⁺, 549.2071 [M+Na]⁺,
565.1810 [M+K]⁺

[α]_D²⁷: -70.8° (c=1, CHCl₃)



¹H-NMR (700 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.46-7.20 (m, 20 H, H_{Arom}), 5.72 (d, 1H, H-1), 5.00 (d, 1H, CH₂Bn), 4.91 (d, 1H, CH₂Bn), 4.78 (d, 1H, CH₂Bn), 4.75 (d, 1H, CH₂Bn), 4.71 (d, 1H, CH₂Bn), 4.66 (d, 1H, CH₂Bn), 4.37 (dd, 1H, H-2), 4.32 (dq, 1H, H-5), 3.82 (dd, 1H, H-3), 3.69 (pd, 1H, H-4), 1.12 (d, 1H, H-6).

³J_{1,2}= 5.4Hz, ³J_{2,3}= 10.0 Hz, ³J_{3,4}= 2.7Hz, ³J_{4,5}< 1Hz, ³J_{5,6}= 6.5 Hz

²J_{H,H}= 11.4 Hz, ²J_{H,H}= 11.6 Hz, ²J_{H,H}= 11.8 Hz

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 139.0, 138.7, 138.2, 135.3 (4x C_{quart}), 131.2, 129.0, 3x 128.5, 128.4, 2x 128.1, 127.8, 2x 127.7, 127.6, 126.8 (13x C_{Aromat}), 87.5 (C-1), 80.0 (C-3), 77.8 (C-4), 76.5 (C-2), 75.1, 73.7, 72.7 (3x CH₂Bn), 67.6 (C-5), 16.7 (C-6).

6.8.1.4 Darstellung von *n*-Pentyl-6-O-(5-(methyl- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**39**)

13.1 mg (15.4 μ mol) des vollgeschützten Disaccharids (**48**) gelöst in 6.55 ml EtOH/Dioxan (1:1) wurde mit einer Microspatelspitze Pd/C (10%) versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend unter Wasserstoffatmosphäre für fünf Stunden bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 6.7 mg (14 μ mol, 87%) Produkt erhalten.*

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{23}H_{44}O_{11}$

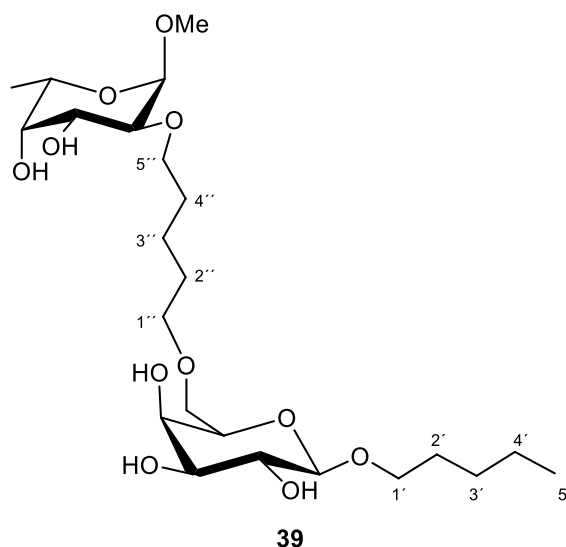
Molgewicht: 496.29 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup

R_F-Wert: 0.48 (EE/MeOH/H₂O= 7:3:1)

[ESI MS: m/z gefunden: 497.2900 [M+H]⁺, 514.3177 [M+NH₄]⁺, 519.2727 [M+Na]⁺, 535.2673 [M+K]⁺
berechnet: 497.2957 [M+H]⁺, 514.3222 [M+NH₄]⁺, 519.2776 [M+Na]⁺, 535.2516 [M+K]⁺

$[\alpha]_D^{24}$: -7.0° (c= 0.3, DMSO)



¹H-NMR (700 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 4.87 (d, 1H, H-1Fuc), 4.31 (d, 1H, H-1Gal), 3.95 (dq, 1H, H-5Fuc), 3.86-3.81 (m, 2H, H-4Gal, CH₂-1'a), 3.77 (dd, 1H, H-3Fuc), 3.74-3.71 (m, 2H, H-5Gal, H-4Fuc), 3.63 (pd, 2H, H-6Gal), 3.62-3.48 (m, 7H, H-2Fuc, H-3Gal, CH₂-1'b, CH₂-5'', CH₂-1''), 3.42 (dd, 1H, H-2Gal), 3.32 (s, 3H, OMeFuc), 1.60-1.50 (m, 6H, CH₂-3', 2x CH₂), 1.37-1.30 (m, 2H, CH₂), 1.29-1.23 (m, 4H, CH₂-4', CH₂), 1.16 (d, 3H, H-6Fuc), 0.85-0.80 (m, 3H, CH₂-5') ppm.

³J_{1,2Fuc} = 3.8 Hz, ³J_{2,3Fuc} = 10.4 Hz, ³J_{3,4Fuc} = 3.4 Hz, ³J_{4,5Fuc} = <1 Hz, ³J_{5,6Fuc} = 6.6 Hz,

³J_{1,2Gal} = 8.0 Hz, ³J_{2,3Gal} = 9.8 Hz, ³J_{5,6Gal} = 5.9 Hz

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 102.7 (C-1Gal), 97.5 (C-1Fuc), 75.9 (C-2Fuc)**, 72.8 (C-3Gal)**, 73.4 (C-5Gal), 71.7 (C-4Fuc), 71.3 (CH₂-5'' oder CH₂-1'), 3x 70.7 (CH₂-1', C-2Gal, CH₂-5'' oder CH₂-1'), 69.7 (C-6Gal), 69.0 (C-4Gal), 54.9 (OCH₃Fuc), 28.8, 28.5, 28.3, 27.3, 21.8 (5x CH₂), 21.7 (CH₂-4'), 15.3 (C-6Fuc), 13.3 (CH₂-5') ppm.

*Es sind zusätzlich 9 % einer zweiten Fucose-Spezies enthalten.

**Zuordnung unsicher.

6.8.1.5 Darstellung von Pent-4'-enyl-6-O-trityl-β-D-galactopyranosid (**43**)

43 wurde nach Clausen et al dargestellt.^[75]

Charakterisierung:

Summenformel: C₃₀H₃₄O₆

Molgewicht: 490.59 g/mol

Aussehen: farbloser Feststoff

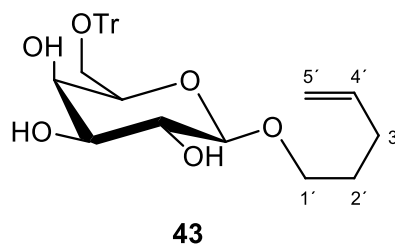
R_f-Wert: 0.43 (EtOAc)

Schmelzpunkt: 89 °C

HR-ESI MS: gefunden: m/z= 513.2261 [M+Na]⁺, 1003.4588 [2M+Na]⁺

berechnet: m/z= 513.2247 [M+Na]⁺, 1003.4602 [2M+Na]⁺

[α]_D²³: -23.1° (c= 1.0, CHCl₃)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.49-7.43 (m, 5H, H_{Arom}), 7.35-7.27 (m, 10H, H_{Arom}), 5.81 (ddt, 1H, H-4'), 5.03 (dq, 1H, H-5'trans), 4.96 (dq, 1H, H-5'cis), 4.21 (d, 1H, H-1), 4.04 (ddd, 1H, H-4), 3.93 (dt, 1H, CH₂-1a'), 3.63-3.52 (m, 4H, H-2, H-3, H-5, CH₂-1b'), 3.45 (dd, 1H, H-6a), 3.39 (dd, 1H, H-6b), 2.59 (d, 1H, OH-2), 2.41 (d, 1H, OH-3), 2.30 (d, 1H, OH-4), 2.20-2.09 (m, 2H, CH₂-3'), 1.81-1.69 (m, 2H, CH₂-2').

$^3J_{1,2} = 7.2$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.3$ Hz, $^3J_{4,5} = 1.2$ Hz, $^3J_{5,6a} = 5.6$ Hz, $^3J_{5,6b} = 6.4$ Hz, $^3J_{OH,2} = 5.8$ Hz,
 $^3J_{OH,3} = 1.9$ Hz, $^3J_{OH,4} = 4.3$ Hz, $^3J_{1',2'} = 6.5$ Hz, $^3J_{4',3'} = 6.7$ Hz, $^3J_{4',5' \text{ cis}} = 10.3$ Hz,
 $^3J_{4',5' \text{ trans}} = 16.9$ Hz

$^2J_{6a,6b} = 9.6$ Hz, $^2J_{5' \text{ cis}, 5' \text{ trans}} = 1.6$ Hz, $^2J_{1',1'} = 9.5$ Hz

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 143.8 (C_{quart}), 128.8, 128.1, 127.4, 127.3 (4x C_{Arom}), 138.2 ($\text{CH}_2\text{-}4'$), 115.1 ($\text{CH}_2\text{-}5'$), 103.1 (C-1), 73.7 (C-2 oder C-3), 73.7 (C-2 oder C-3), 62.9 (C-5)*, 69.4 ($\text{CH}_2\text{-}1'$), 69.2 (C-4), 62.7 (C-6), 30.4 ($\text{CH}_2\text{-}3'$), 28.9 ($\text{CH}_2\text{-}2'$).

* Zuordnung unsicher.

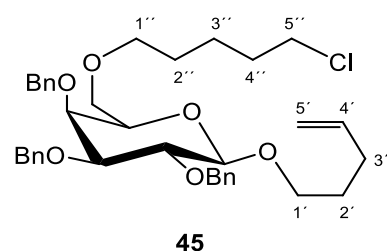
6.8.1.6 Darstellung von *n*-Pent-4'-enyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-(5''-chlorpentyl)- β -D-galactopyranosid (**45**)

Analog zu Wang *et al.*^[76] wurden 351 mg (578 μmol) der in Position 6 nicht-geschützten Galactose (**44**) in 1.35 mL DMSO aufgenommen. Dazu wurden 80 μL einer 50 %igen NaOH-Lösung gegeben, dabei färbte sich die Lösung orangegelb und wurde gelartig. Im Anschluss wurden zur Reaktionslösung 161 μL (1.04 mmol) 1-Brom-5-chlorpentan gegeben. Es wurde bei RT für zwölf Stunden gerührt. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde durch Filtration von der Lösung entfernt. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde dreimal mit ca. 20 mL Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden zweimal mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es wurden 416 mg (668 μmol , 99 %) Produkt erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{ClO}_6$
Molgewicht: 623.22 g/mol
Aussehen: hellgelber Sirup
 R_f -Wert: 0.43 (PE/EE= 4:1)

HR-ESI MS gefunden: $m/z = 640.3392$ [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 645.2948 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 661.2693 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$
berechnet: $m/z = 640.3399$ [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 645.2953 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 661.2693 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$



$[\alpha]_D^{26}$: -4.4° (c= 1, CHCl₃)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.75-7.04 (m, 15H, H_{Arom}), 5.81 (ddt, 1H, H-4'), 4.99 (dq, 1H, H-5'trans), 4.97-4.91 (m, 3H, H-5'cis, CH₂Bn), 4.81-4.69 (m, 3H, CH₂Bn), 4.66 (d, 1H, CH₂Bn), 4.34 (d, 1H, H-1), 3.93 (dt, 1H, CH₂-1'), 3.86 (pd 1H, H-4), 3.81 (dd, 1H, H-2), 3.57-3.44 (m, 7H, H-3, H-5, H-6a, H-6b, CH₂-1', CH₂-5''), 3.41 (dt, 1H, CH₂-1''), 3.31 (dt, 1H, CH₂-1''), 2.24-2.07 (m, 2H, CH₂-3'), 1.84-1.67 (m, 4H, CH₂-2', CH₂), 1.53-1.38 (m, 4H, 2x CH₂) .

³J_{1,2}= 7.6 Hz, ³J_{2,3}= 9.8 Hz ³J_{3,4}= 2.9 Hz, ³J_{4,5}= <1 Hz, ³J_{1',2'}= 6.4 Hz, ³J_{4',3'}= 6.7 Hz,

³J_{4',5'cis}=10.3 Hz, ³J_{4',5'trans}=16.9 Hz, ³J_{1'',2''}= 6.4 Hz

²J_{5cis,5trans}= 1.8 Hz, ²J_{1',1'}= 9.5 Hz, ²J_{1'',1''}= 9.5 Hz, ²J_{H,H}= 12.3 Hz

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 2x 128.5, 128.4, 2x 128.3, 2x 127.7 (7x C_{Arom}), 138.4 (C-4'), 114.9 (C-5'), 104.2 (C-1), 82.5 (C-3), 79.5 (C-2), 75.5 (CH₂Bn), 74.6 (CH₂Bn), 73.5 (C-5), 73.3 (CH₂Bn), 71.3 (CH₂-1''), 69.5 (C-6), 69.4 (CH₂-1'), 45.1 (CH₂Cl), 32.5 (CH₂), 30.4 (CH₂-3'), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂).

6.8.1.7 Darstellung von *n*-Pentyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-(5-(methyl-3,4-*O*-benzyliden- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**48**)

Analog zu Girad *et al.*^[77] wurden zu 26.3 mg NaH (60 %ige Suspension, entspricht, 15.8 mg NaH, 658 μ mol), 190.6 mg (305.8 μ mol) chlorpentyl-funktionalisierte Galactose (**45**) gelöst in 2 mL abs. DMF gegeben. Das NaH wurde zuvor dreimal mit abs. Hexan gewaschen und eine Stunde im Vakuum getrocknet. Die Lösung wurde für zehn Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.75 mg (2.03 μ mol, 0.1 mol%) TBAI und 54.4 mg (204 μ mol) der benzyliden-geschützten Methylfucose (**47**) gelöst in 1 mL abs. DMF zu der Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde für 24 Stunden bei RT gerührt. Während dieser Zeit wurde zweimal je eine Spatelspitze ungewaschene NaH-Suspension zu der Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL Methanol beendet und mit 50 mL Dichlormethan verdünnt. Es wurde dreimal mit ca. 50 mL dem. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Tol/EE= 3:1). Es wurden 26.2 mg (30.8 μ mol, 15 %) Produkt erhalten. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung für die nächste Stufe eingesetzt.

Charakterisierung:

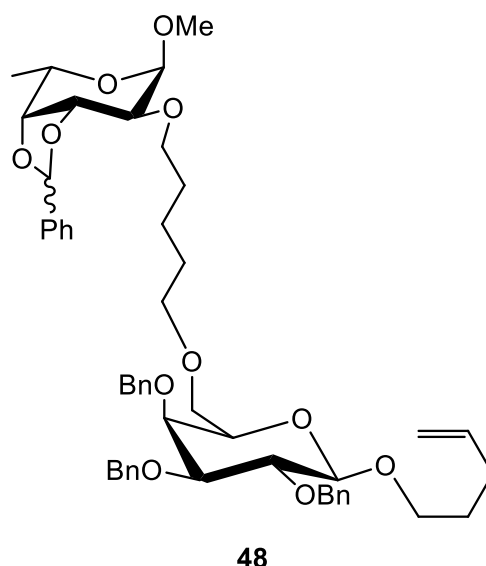
Summenformel: $C_{51}H_{64}O_{11}$

Molgewicht: 852.44 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup

R_f-Werte: 0.52 und
0.46 (Tol/EE= 3:1)

ESI MS: gefunden: m/z= 870.4787 [M+NH₄]⁺, 875.4335 [M+Na]⁺,
891.4081 [M+K]⁺
berechnet: m/z= 870.4787 [M+NH₄]⁺, 875.4334 [M+Na]⁺,
891.4081 [M+K]⁺



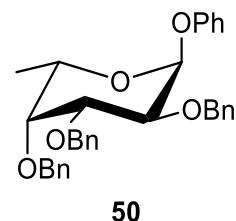
6.8.1.8 Darstellung von Phenyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosid (**50**)

Gemäß der von Schmidt *et al.*^[57] entwickelten Trichloracetimidatmethode wurden 32 mg (34 μ mol) Phenol, 4.8 μ L TMSOTf (25 μ mol) und 4 Å Molsieb auf -20 °C gekühlt und für zwanzig Minuten gerührt. 30 mg (52 mmol) des TCAI der tribenzylierten Fucose (**49**) wurde in 580 μ L abs. DCM gelöst und anschließend langsam zu dem Reaktionsgemisch getropft. Dann wurde das Reaktionsgemisch weitere dreißig Minuten bei -20 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit DCM verdünnt, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltende Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch (PE/EE= 9:1) gereinigt. Es wurden 82.6 mg (162 μ mol, 52 %) des α -Anomers isoliert.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{33}H_{34}O_5$

Molgewicht: 510.62 g/mol



Aussehen: farbloser Sirup

R_f-Wert: 0.50 (PE/EE= 9:1)

ESI-MS: gefunden: m/z= 528.2745 [M+NH₄]⁺, 533.2301 [M+Na]⁺, 549.2038 [M+K]⁺
berechnet: m/z= 528.2744 [M+NH₄]⁺, 533.2298 [M+Na]⁺,
549.2038 [M+K]⁺

[α]_D²⁴: -0.74° (c=1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ [ppm]: 7.39-7.34 (m, 2H, H_{Arom}), 7.31-7.23 (m, 9H, H_{Arom}), 7.23-7.18 (m, 4H, H_{Arom}), 7.18-7.14 (m, 2H, H_{Arom}), 7.02-6.98 (m, 2H, H_{Arom}), 6.95-6.91 (m, 1H, H_{Arom}), 5.42 (d, 1H, H-1), 4.94 (d, 1H, CH₂Bn), 4.87 (d, 1H, CH₂Bn), 4.75 (d, 1H, CH₂Bn), 4.74 (d, 1H, CH₂Bn), 4.62 (d, 1H, CH₂Bn), 4.60 (d, 1H, CH₂Bn), 4.12 (dd, 1H, H-2), 4.08 (dd, 1H, H-3), 3.93 (dq, 1H, H-5), 3.65 (dd, 1H, H-4), 1.03 (d, 3H, H-6).

³J_{1,2}= 3.5 Hz, ³J_{2,3}= 10.1 Hz, ³J_{3,4}= 2.7 Hz, ³J_{4,5}= 1.2 Hz, ³J_{5,6}= 6.4 Hz

²J_{H,H}= 11.4 Hz, ²J_{H,H}= 11.9 Hz, ²J_{H,H}= 12.2 Hz

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ [ppm]: 157.4, 139.1, 138.7, 136.6 (4x C_{quart}), 129.5, 128.6, 2x 128.5, 2x 128.4, 128.1, 2x 127.8, 127.7, 127.6, 122.2, 117.1 (13x C_{Arom}), 96.4 (C-1), 79.4 (C-3), 77.8 (C-4), 76.3 (C-2), 75.1, 73.5, 73.4 (3x CH₂Bn), 67.3 (C-5), 16.7 (C-6).

6.8.1.9 Darstellung von Phenyl-O-α-L-fucopyranosid (**51**)

243.9 mg (477.7 μmol) des tribenzylierten Phenylglycosids (**50**) wurden in 40 mL Dioxan/EtOH (1:1) aufgenommen, dazu wurde eine Spatelspitze Pd/C (10 %) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 30 bar im Autoklaven unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH= 9:1) verfolgt und nach drei Stunden beendet. Die Lösung wurde über Celite® filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt.

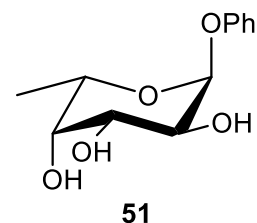
Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (H₂O/MeOH= 3:1) gereinigt. Es wurden 141.8 mg (590.2 µmol, 62 %) Produkt erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₂H₁₆O₅

Molgewicht: 510.62 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup



R_F-Wert: 0.43 (EE/MeOH= 9:1)

ESI-MS: gefunden: m/z= 263.0914 [M+Na]⁺

berechnet: m/z= 263.0890 [M+Na]⁺

[α]_D²⁰ : -218.8° (c= 1, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD₄) δ [ppm]: 7.33-7.23 (m, 2H, H_{Arom}), 7.15-7.06 (m, 2H, H_{Arom}), 7.03-6.96 (m, 1H, H_{Arom}), 5.45 (d, 1H, H-1), 4.06 (dq, 1H, H-5), 3.96 (dd, 1H, H-3), 3.90 (dd, 1H, H-2), 3.74 (dd, 1H, H-4), 1.18 (d, 3H, H-6).

³J_{1,2}= 3.7 Hz, ³J_{2,3}= 10.2 Hz, ³J_{3,4}= 3.3 Hz, ³J_{4,5}= 1.4 Hz, ³J_{5,6}= 6.6 Hz

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD₄) δ [ppm]: 130.4, 123.2, 118.0 (3x C_{Arom}), 99.4 (C-1), 73.5 (C-4), 71.6 (C-3), 69.8 (C-2), 68.5 (C-5), 16.6 (C-6).

6.8.1.10 Darstellung von Phenyl-3,4-O-benzyliden-α-L-fucopyranosid (**52**)

Nach Demenchko *et al.*^[62] wurden 2.4 mg (0.01 mmol) CSA und 50 mg (21 µmol) Phenylglycosid (**51**) für ca. 30 min kurz im Vakuum vorgetrocknet. Zu den Reagenzien wurden 1.8 mL abs. MeCN und 56.4 µL (0.378 mmol) Benzaldehyddimethylacetal gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss für 30 min zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Triethylamin neutralisiert. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit EE verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE/MeOH= 9:1) gereinigt. Es wurden 39.1 mg (119 µmol) Produkt (Verhältnis (R)- zu (S)- Epimer= 0.9:1) erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 52 %.

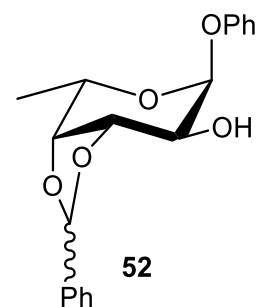
Charakterisierung:

Summenformel: $C_{19}H_{20}O_5$

Molgewicht: 328.36 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup

R_f -Wert: 0.80 (EE/MeOH= 9:1)



ESI-MS: gefunden: m/z = 329.1384 $[M+H]^+$, 351.1261 $[M+Na]^+$, 679.2594 $[2M+Na]^+$

berechnet: m/z = 329.1445 $[M+H]^+$, 351.1203 $[M+Na]^+$, 6979.2514 $[2M+Na]^+$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.59-7.53 (m, 2H, H_{Arom}), 7.50-7.46 (m, 2H, H_{Arom}), 7.44-7.36 (m, 5H, H_{Arom}), 7.36-7.30 (m, 2H, H_{Arom}), 7.15-7.10 (m, 2H, H_{Arom}), 7.10-7.03 (m, 2H, H_{Arom}), 6.24 (s, 1H, $CHPh_{(R)}$), (s, 1H, $CHPh_{(S)}$), 5.59 (d, 1H, $H-1_{(R)}$), 5.54 (d, 1H, $H-1_{(S)}$), 4.61 (dd, 1H, $H-3_{(R)}$), 4.52 (pt, 1H, $H-3_{(S)}$), 4.37 (dq, 1H, $H-5_{(R)}$), 4.27 (dq, 1H, $H-5_{(S)}$), 4.22 (dd, 1H, $H-5_{(S)}$), 4.14 (dd, 1H, $H-4_{(S)}$), 4.14 (dd, 1H, $H-4_{(R)}$), 4.10 (ddd, 1H, $H-2_{(R)}$), 4.03 (ddd, 1H, $H-2_{(S)}$), 2.40 (d, 1H, $OH_{(S)}$), 2.35 (d, 1H, $OH_{(R)}$), 1.38 (d, 3H, $H-6_{(R)}$), 1.36 (d, 3H, $H-6_{(S)}$).

(S): $^3J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $^3J_{2,3}$ = 6.4 Hz, $^3J_{3,4}$ = 6.4 Hz, $^3J_{4,5}$ = 2.4 Hz, $^3J_{5,6}$ =6.7 Hz, $^3J_{H-2,OH}$ = 6.4 Hz

(R): $^3J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $^3J_{2,3}$ =7.0 Hz, $^3J_{3,4}$ = 5.7 Hz, $^3J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.7 Hz, $^3J_{H-2,OH}$ = 7.7 Hz

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 129.8, 129.6, 129.2, 128.6, 127.4, 127.2, 127.0, 126.3, 122.9, 122.8, 116.8, 116.8 (12x C_{Arom}), 104.2 ($CHPh_{(S)}$), 103.3 ($CHPh_{(R)}$), 96.9 ($C-1_{(R)}$), 96.6 ($C-1_{(S)}$), 77.6 ($C-3_{(R)}$), 77.5 ($C-4_{(S)}$), 76.3 ($C-3_{(S)}$), 76.0 ($C-4_{(R)}$), 69.7 ($C-2_{(S)}$), 68.0 ($C-2_{(R)}$), 64.9 ($C-5_{(S)}$), 64.9 ($C-5_{(R)}$), 16.5 ($C-6_{(R)}$ oder $C-6_{(S)}$), 16.4 ($C-6_{(R)}$ oder $C-6_{(S)}$).

6.8.1.11 Darstellung von *n*-Pent-4-enyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-yl-(5-(phenyl-3,4-*O*-benzyliden- α -L-fucopyranosid-2-yl)-*n*-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (53)

Analog zu Girad et al.^[77] wurden 16.6 mg NaH (60 %ige Suspension, entspricht, 9.96 mg NaH, 415 μ mol) mit 0.5 mL abs. DMF versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zuvor wurde das Natriumhydrid dreimal mit *n*-Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dazu wurden 26.9 mg (43.2 μ mol) chlorpentyl-funktionalisierte Galactose (**45**) gelöst in 0.4 mL abs. DMF getropft. Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss für zwei Stunden bei 0 °C gerührt, dann wurden

Experimenteller Teil

vorsichtig eine Microspatelspitze TBAI und 9.5 mg (29 μmol) des benzylden-geschützten Phenylglycosids (**52**) gelöst in 0.45 mL abs. DMF zum Reaktionsgemisch gegeben. Es wurde für zwei Tage bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL Methanol beendet und mit 50 mL Diethylether verdünnt. Es wurde dreimal mit je 50 mL dem. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE= 4:1). Es wurden 5.9 mg (6.5 μmol , 22 %) Produkt erhalten.

Charakterisierung:

Summenformel: $\text{C}_{56}\text{H}_{66}\text{O}_{11}$

Molgewicht: 915.12 g/mol

Aussehen: farbloser Feststoff

R_f-Wert: (PE/EE=4:1): 0.27 (S-Epimer)

(PE/EE=4:1): 0.36 (R-Epimer)

ESI MS: S-Epimer: m/z gefunden: 932.4906 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$,

937.4498 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 953.4228 $[\text{M}+\text{K}]^+$

m/z berechnet: 932.4943 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 937.4497 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,

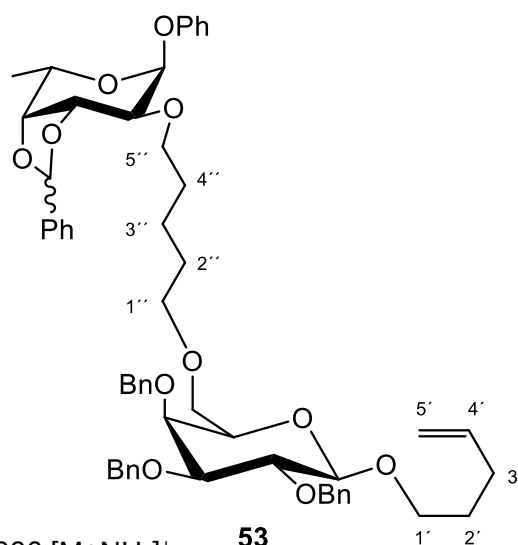
953.4237 $[\text{M}+\text{K}]^+$

R-Epimer: m/z gefunden: 937.4498 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

m/z berechnet: 937.4497 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,

$[\alpha]_D^{24}$: S-Epimer^{**}: -10.0° (c= 0.1, CHCl_3)

R-Epimer^{***}: -9.0° (c= 0.1, CHCl_3)



S-Epimer^{**}:

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.48-7.44 (m, 2H, H_{Arom}), 7.40-7.26 (m, 20H, H_{Arom}), 7.25-7.20 (m, 2H, H_{Arom}), 7.14-7.09 (m, 2H, H_{Arom}), 7.05-6.99 (m, 2H, H_{Arom}), 6.21 (s, 1H, CHPh), 5.80 ddt (1H, H-4'), 5.61 (d, 1H, H-1Fuc), 4.50 (dq, 1H, H-5' trans), 4.96-4.90 (m, 3H, H-5' cis, CH_2Bn), 4.78-4.67 (m, 4H, H-3Fuc, 2x CH_2Bn), 4.63 (d, 1H, CH_2Bn), 4.32 (d, 1H, H-1Gal), 4.21

(dq, 1H, H-5Fuc), 4.07 (dd, 1H, H-4Fuc), 3.92 (dt, 1H, CH₂-1a'), 3.85 (pd, 1H, H-4Gal), 3.80 (dd, 1H, H-2Gal), 3.76-3.69 (m, 2H, H-2Fuc, CH₂-5'' oder CH₂-1''), 3.64 (dt, 1H, CH₂-5'' oder CH₂-1''), 3.53-3.41 (m, 5H, CH₂-1b', H-3Gal, H-5Gal, H-6a, H-6b), 3.35 (dt, 1H, CH₂-5'' oder CH₂-1''), 3.26 (dt, 1H, CH₂-5'' oder CH₂-1''), 2.19-2.08 (m, 2H, CH₂-3'), 1.78-1.67 (m, 2H, CH₂-2'), 1.67-1.57 (m, 2H, CH₂-2'' oder CH₂-4''), 1.52-1.45 (m, 2H, CH₂-2'' oder CH₂-4''), 1.44-1.35 (m, 2H, CH₂-3''), 1.33 (d, 3H, H-6Fuc).

$^3J_{1,2\text{Fuc}} = 3.5 \text{ Hz}$, $^3J_{3,4\text{Fuc}} = 5.3 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5\text{Fuc}} = 2.1 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6\text{Fuc}} = 6.6 \text{ Hz}$,

$^3J_{4'5\text{cis}} = 10.3 \text{ Hz}$, $^3J_{4'5\text{trans}} = 17.1 \text{ Hz}$, $^3J_{4',3'} = 1.8 \text{ Hz}$, $^3J_{5'',4''} = 6.7 \text{ Hz}$, $^3J_{1'',2''} = 6.7 \text{ Hz}$

$^2J_{5'\text{cis},5'\text{trans}} = 1.8 \text{ Hz}$, $^2J_{5'',5''} = 9.4 \text{ Hz}$, $^2J_{1'',1''} = 9.4 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9 \text{ Hz}$

$^3J_{1,2\text{Gal}} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{2,3\text{Gal}} = 9.6 \text{ Hz}$, $^3J_{4,3\text{Gal}} = 3.2 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5\text{Gal}} = 0.7 \text{ Hz}$

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 157.1 (C_{quart}), 138.4 (C-4'), 129.8, 129.7, 2x 128.5, 128.4, 128.3, 127.7, 126.4, 116.8 (9x C_{Arom}), 114.9 (CH₂-5'), 102.8 (CHPh), 138.4 (CH₂-4'), 114.9 (CH₂-5'), 104.2 (C-1Gal), 95.6 (C-1Fuc), 82.4 (C-3Gal), 79.8 (C-2Gal), 77.1 (C-3Fuc), 76.1 (C-4Fuc), 75.2 (C-2Fuc), 75.2, 74.6, (2x CH₂Bn), 73.7 (C-4Gal), 73.5 (C-5Gal)*, 73.2 (CH₂Bn), 69.4 (CH₂-1'), 69.2 (C-6Gal)*, 64.1 (C-5Fuc), 71.5 (CH₂-5'' oder CH₂-1''), 70.9 (CH₂-5'' oder CH₂-1''), 30.4 (CH₂-3'), 29.1 (CH₂-2'), 30.0 (CH₂-4'' oder CH₂-2'').

* Zuordnung unsicher.

**Es sind zusätzlich 10% des *R*-Epimers vorhanden.

R-Epimer***:

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.59-7.52 (m, 2H, H_{Arom}), 7.41-7.25 (m, 20H, H_{Arom}), 7.15-7.09 (m, 2H, H_{Arom}), 7.05-7.00 (m, 1H, H_{Arom}), 5.95 (s, 1H, CHPh), 5.80 ddt (1H, H-4'), 5.52 (d, 1H, H-1Fuc), 5.00 (dq, 1H, H-5'trans), 4.96-4.89 (m, 3H, H-5'cis, CH₂Bn), 4.77-4.68 (d, 1H, CH₂Bn), 4.63 (d, 1H, CH₂Bn), 4.55 (1H, H-3Fuc), 4.32 (d, 1H, H-1Gal), 4.28 (dq, 1H, H-5Fuc), 4.18 (dd, 1H, H-4Fuc), 3.93 (dt, 1H, CH₂-1a'), 3.85 (pd, 1H, H-4Gal), 3.80 (dd, 1H, H-2Gal), 3.60- 3.55 (m, 2H, H-2Fuc, CH₂-5'), 3.55-3.42 (m, 6H, H-3Gal, H-5Gal, H-6aGal, H-6bGal, CH₂-1'b, CH₂-5''), 3.30 (dt, 1H, CH₂-1''), 3.22 (dt, 1H, CH₂-1b') 2.19-2.09 (m, 2H, CH₂-3'), 1.79-1.66 (m, 2H, CH₂-2'), 1.53-1.47 (m, 2H, CH₂), 1.39 (d, 3H, H-6Fuc), 1.33-1.27 (m, 2H, CH₂).

$^3J_{1,2\text{Fuc}} = 3.4 \text{ Hz}$, $^3J_{3,4\text{Fuc}} = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5\text{Fuc}} = 2.8 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6\text{Fuc}} = 6.7 \text{ Hz}$

$^3J_{4'5\text{cis}} = 10.3 \text{ Hz}$, $^3J_{4'5\text{trans}} = 17.0 \text{ Hz}$, $^3J_{4',3'} = 1.6 \text{ Hz}$, $^3J_{1'',2''} = 6.6 \text{ Hz}$

$^2J_{5'\text{cis},5'\text{trans}} = 1.6 \text{ Hz}$, $^2J_{1'',1''} = 9.3 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H,H}} = 11.6 \text{ Hz}$

$^3J_{1,2\text{Gal}} = 7.8 \text{ Hz}$, $^3J_{2,3\text{Gal}} = 9.7 \text{ Hz}$, $^3J_{4,3\text{Gal}} = 2.9 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5\text{Gal}} < 1 \text{ Hz}$

Experimenteller Teil

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 156.8 (C_{quart}), 138.5 (C-4'), 129.5, 2x 128.6, 128.5, 2x 128.4, 127.8, 126.8, 122.6, 116.8, 115.0, (11x C_{Arom}), 115.0 (C-5'), 104.2 (C-1Gal), 95.8 (C-1Fuc), 82.5 (C-3Gal), 79.9 (C-2Gal), 78.7 (C-4Fuc), 78.1 (C-2Fuc), 75.7 (C-3Fuc), 75.4 (CH₂Bn), 74.7 (CH₂Bn), 73.7 (C-4Gal), 73.6 (C-5Gal), 73.2 (CH₂Bn), 70.9 (CH₂-5''), 71.6 (CH₂-1''), 75.7 (C-3Fuc), 69.5 (CH₂-1'), 69.3 (C-6Gal), 64.2 (C-5Fuc) 30.5 (CH₂-3'), 29.9 (CH₂-2'' oder CH₂-4''), 29.6 (CH₂-2'' oder CH₂-4''), 29.2 (CH₂-2'), 22.7 (CH₂-3'), 16.6 (C-6Fuc).

***Es sind zusätzlich 10% des S-Epimers vorhanden

6.8.2 Darstellung der Thiadiazolderivate

6.8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Thiadiazolderivate (**AAV1**)

Es wurden 1 eq. 3-Phenyl-5-piperazino-1, 2, 4-thiadiazol, 1 bis 1.1 eq. Cäsiumcarbonat und 1 bis 2.1 eq. des zu kuppelnden Halogenacetamides in 1 mL Acetonitril gelöst und für zwölf Stunden bei 80-90°C zum Rückfluß erhitzt. Dabei fiel ein farbloser Niederschlag aus. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Toluol/Aceton= 3:1) wurde die Lösung im Vakuum eingengt und das Rohprodukt mittels *RP-HPLC* gereinigt.

6.8.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reinigung der Thiadiazolderivate über *RP-HPLC* (**AAV2**)

Die Reinigung der Thiadiazol-Derivate erfolgte über eine präparative *RP-HPLC*-Säule der Firma Macherey&Nagel (Nucleodur C₁₈ Isis, 250x21 mm, 5 µm, 300 Å) mit einer Flussrate von 20 mL/min. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten eines Laufmittelgemisches aus Laufmittel A (Wasser/Acetonitril 95/5 mit 0.1 % (v/v) FA) und Laufmittel B (Acetonitril/Wasser 95/5 mit 0.1 % (v/v) FA), die Detektion erfolgte massenspektrometrisch und photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm, 254 nm und 280 nm. Für die HPLC-Injektion wurde das Rohprodukt in 1-2 mL des Startlaufmittelgemisches aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde sechs Minuten bei 16000 G zentrifugiert. Der so erhaltende Überstand wurde anschließend nach Methode 1 gereinigt.

Methode 1: Reinigung der Thiadiazol-Derivate

0 - 6 min	80 % B
6 - 10 min	100 % B
10 - 12 min	80 % B

6.8.2.3 Darstellung von 2-[4-(N-phenyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperazin-N'-yl]acetamid (**55**)

Die Reaktion wurde gemäß **AAV1** durchgeführt. Nachfolgend sind in Tabelle 26 die Mengen der verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 26: Menge der verwendeten Reagenzien

Edukt	Menge
3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol (16)	14.7 mg (60 µmol, 1 eq.)
Iodacetamid	23.2 mg (125 µmol, 2.1 eq.)
Cäsiumcarbonat	19.4 mg (60 µmol, 1.1 eq.)

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Toluol/Isopropanol= 8:2) gereinigt. Es konnten 10.2 mg (33.6 µmol) des Produktes erhalten werden. Bezogen auf **16** ergibt sich eine Ausbeute von 56 %.

Charakterisierung:

Summenformel: C₁₄H₁₇N₅OS

Molgewicht: 303.38 g/mol

Aussehen: farbloser Feststoff

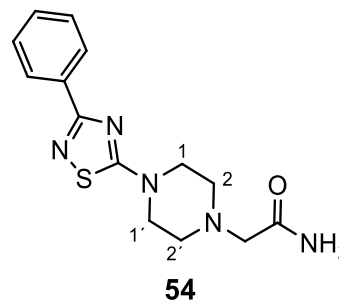
R_f-Wert: 0.22 (Toluol/Isopropanol= 8:2)

ESI-MS: gefunden: m/z= 304.1241 [M+H]⁺

berechnet: m/z= 304.1227 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.20-8.15 (m, 2H_{Arom}), 7.45-7.40 (m, 3H_{Arom}), 6.95 (s, 1H, NH), 5.80 (s, 1H, NH), 3.65 (t, 4H, CH₂-1 und CH₂-1'), 3.11 (s, 2H, CH₂), 2.72 (t, 4H, CH₂-2 und CH₂-2').

³J_{H1,H2}= 5.2 Hz



¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 184.9*, 172.4*, 170.7, 132.9* (4x C_{quant}), 130.2, 128.7, 128.2 (3x C_{Arom}), 61.7 (CH₂), 52.8 (CH₂-2 und CH₂-2'), 49.0 (CH₂-1 und CH₂-1').

*Per HMBC detektiert.

6.8.2.4 Darstellung von N-(2-phenylethyl)-2-[4-(N-phenyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperazin-N'-yl]acetamid (**55**)

Die Reaktion wurde gemäß **AAV1** durchgeführt. Nachfolgend sind in Tabelle 27 die Mengen verwendeter Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 27: Menge der verwendeten Reagenzien

Edukt	Menge
3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol (16)	9.9 mg (40 µmol, 1 eq.)
2-Brom-N-(2-phenylethyl)acetamid (59)	9.4 mg (38 µmol, 1 eq.)
Cäsiumcarbonat	14.0 mg (43 µmol, 1.1 eq.)

Nach Reinigung gemäß **AAV2** konnten 13.2 mg (32.4 µmol) des Produktes erhalten werden. Bezogen auf **16** ergibt sich eine Ausbeute von 84 %.

Charakterisierung:

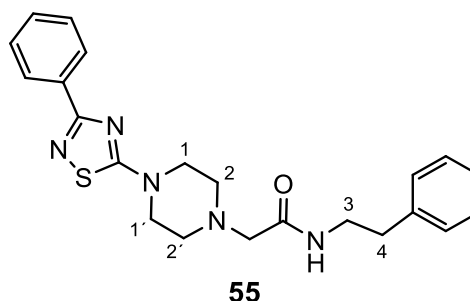
Summenformel: C₂₂H₂₅N₅OS

Molgewicht: 407.52 g/mol

Aussehen: farbloser Sirup

R_t: 4.5 min

R_F-Wert: 0.47 (Toluol/Aceton= 1:1)



ESI-MS: gefunden: $m/z = 408.1868 [M+H]^+$

berechnet: $m/z = 408.1853 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8.21-8.15 (m, 2H_{Arom}), 7.48-7.27 (m, 6H_{Arom}), 7.24-7.22 (m, 2H_{Arom}), 7.09-7.00 (m, 1H, NH), 3.62 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-3}$), 3.45 (bt, 4H, $\text{CH}_2\text{-1}$ und $\text{CH}_2\text{-1'}$), 3.03 (s, 2H, NCH_2CO), 2.89 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-4}$), 2.54 (t, $\text{CH}_2\text{-2}$ und $\text{CH}_2\text{-2'}$).

$^3J_{\text{H3a,H4a}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H3b,H4b}} = 6.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H1,H2}} = 5.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H1',H2'}} = 4.7 \text{ Hz}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 130.1, 2x 128.9, 128.6, 128.1, 126.9 ($6\text{x C}_{\text{Arom}}$), 61.7 (NCH_2CO), 52.6 ($\text{CH}_2\text{-2}$ und $\text{CH}_2\text{-2'}$), 48.9 ($\text{CH}_2\text{-1}$ und $\text{CH}_2\text{-1'}$), 39.7 ($\text{CH}_2\text{-3}$), 35.5 ($\text{CH}_2\text{-4}$).

6.8.2.5 Darstellung von *N*-(4-chlorophenyl)-2-[4-(*N*-phenyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl)piperazin-*N'*-yl]acetamid (**56**)

Die Reaktion wurde gemäß **AAV1** durchgeführt. Nachfolgend sind in Tabelle 28 die Mengen der verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 28: Menge der verwendeten Reagenzien

Edukt	Menge
3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol (16)	10.2 mg (41 μmol , 1eq.)
2-Brom- <i>N</i> -(4-Chlorphenyl)acetamid (60)	10.5 mg (42 μmol , 1eq.)
Cäsiumcarbonat	14.0 mg (43 μmol , 1 eq.)

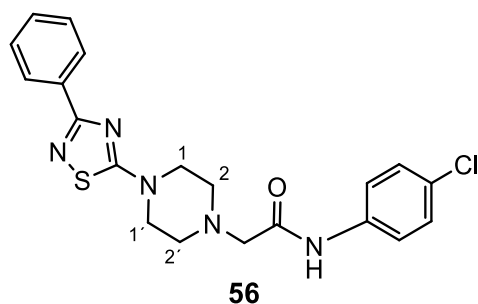
Nach Reinigung gemäß **AAV2** konnten 9.5 mg (23 μmol) des Produktes erhalten werden. Bezogen auf **16** ergibt sich eine Ausbeute von 55 %.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{20}H_{20}ClN_5OS$

Molgewicht: 413.91 g/mol

Aussehen: hellgelber Sirup



R_t : 5.5 min

R_f -Wert: 0.70 (Toluol/Aceton= 1:1)

ESI-MS: gefunden: $m/z = 414.1162 [M+H]^+$

berechnet: $m/z = 414.1150 [M+H]^+$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.99 (bs, 1H, NH), 8.24-8.17 (m, 2H, H_{Arom}), 7.58-7.52 (m, 2H, H_{Arom}), 7.47-7.43 (m, 3H, H_{Arom}), 7.35-7.31 (m, 2H, H_{Arom}), 3.71 (t, 4H, CH_2 -1 und CH_2 -1'), 3.26 (s, 2H, CH_2), 2.81 (t, 4H, CH_2 -2 und CH_2 -2').

$^3J_{H1,H2} = 5.0$ Hz, $^3J_{H1',H2'} = 4.9$ Hz

^{13}C -NMR (175 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 170.6, 167.6, 136.0, 133.4, (4x C_{quart}), 130.2 (C_{Arom}), 129.6 (C_{quart}), 129.3, 128.6, 128.2, 120.9 (4x C_{Arom}), 62.1 (CH_2), 52.7 (CH_2 -2 und CH_2 -2'), 48.9 (CH_2 -1 und CH_2 -1').

6.8.2.6 Darstellung von 2-[4-(N-phenyl-1, 2, 4-thiadiazol-5-yl)piperazin-N'-yl]-N-(p-tolyl)acetamid (**57**)

Die Reaktion wurde gemäß **AAV1** durchgeführt. Nachfolgend sind in Tabelle 29 die Mengen der verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Experimenteller Teil

Tabelle 29: Menge der verwendeten Reagenzien

Edukt	Menge
3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-thiadiazol (16)	10.6 mg (43 μ mol, 1 eq.)
2-Brom-N-(4-methylphenyl)acetamid (61)	9.8 mg (43 μ mol, 1 eq.)
Cäsiumcarbonat	13.7 mg (42 μ mol, 1 eq.)

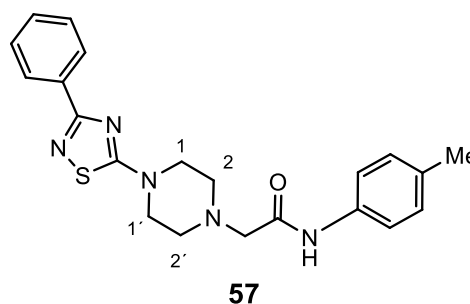
Nach Reinigung gemäß **AAV2** konnten 13.2 mg (34 μ mol) des Produktes erhalten werden. Bezogen auf **16** ergibt sich eine Ausbeute von 78 %.

Charakterisierung:

Summenformel: $C_{21}H_{23}N_5OS$

Molgewicht: 393.51 g/mol

Aussehen: hellgelber Sirup



R_t : 4.7 min

R_f -Wert: 0.69 (Toluol/Aceton= 2:1)

ESI-MS: gefunden: $m/z = 394.1718 [M+H]^+$

berechnet: $m/z = 394.1696 [M+H]^+$

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.87 (bs, 1H, NH), 8.22-8.16 (m, 2H, H_{Arom}), 7.49-7.39 (m, 5H, H_{Arom}), 7.18-7.13 (m, 2H, H_{Arom}), 3.72 (t, 4H, CH_2 -1 und CH_2 -1'), 3.24 (s, 2H, CH_2), 2.80 (t, 4H, CH_2 -2 und CH_2 -2'), 2.33 (s, 3H, CH_3).

$^3J_{H1,H1'} = 4.9$ Hz, $^3J_{H2,H2'} = 5.1$ Hz

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 130.1, 129.8, 128.6, 128.2, 119.7 (5x C_{Arom}), 62.2 (CH_2), 52.7 (CH_2 -2 und CH_2 -2'), 49.0 (CH_2 -1 und CH_2 -1'), 21.0 (CH_3).

6.8.3 Syntheseveruche

6.8.3.1 Versuch der Darstellung von Thiophenyl-6-O-(5-(phenyl- α -L-fucopyranosid-2-yl)-n-pent-1-yl)- β -D-galactopyranosid (**18**)

Nach Hanessian *et al.*^[78] wurden 200 μ g (355 nmol) des isopropyliden-geschützten Disaccharids (**21**) in 500 μ L 60 %iger Essigsäure bei 55 °C für zwölf Stunden gerührt. Anschließend wurde mit 0.1 mol/L NaOH neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. In der nachfolgenden NMR-spektroskopischen Untersuchung wurde als Hauptprodukt ein einfach isopropyliden-geschütztes Produkt identifiziert.

6.8.3.2 Versuch der Darstellung von Thiophenyl-(2,3,4-Tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosid) (**33**)

Analog zu Alzeer *et al.*^[79] wurden 4.9 mg (9.3 μ mol) des tribenzylierten Thiophenylglycosids (**37**) in 200 μ L Ac₂O gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden anschließend 113 μ L einer TMSOTf-Stammlösung (bestehend aus 25 μ L TMSOTf und 200 μ L Ac₂O) bei -42 °C gegeben. Die Lösung wurde vier Stunden bei 7-12 °C gerührt. Dann wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und 226 μ L eisgekühlte, gesättigte NaHCO₃-Lösung hinzugegeben. Bei der Zugabe kam es zu starker Gasentwicklung. Im Anschluss wurde die Lösung mit ca. 10 mL DCM verdünnt und dreimal mit je 10 mL NaHCO₃-Lösung gewaschen. Danach wurde die organische Phase noch dreimal mit je 10 mL dem. Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. In der nachfolgenden NMR-spektroskopischen Analyse konnten nur das zweifach acetyl-geschützte sowie einfach benzyl-geschützte Produkt detektiert werden.

6.8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Versuch der Darstellung von Thiophenyl- α -L-fucopyranosid (38**) (AAV3)**

Analog zu Mandal *et al.*^[80] wurde 1 eq. des tribenzylierten Thiophenylglycosids (**37**) für zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Dann wurde **37** in 1 mL abs. LM aufgenommen und 1-3 eq. NaI/TBAI zu der Lösung gegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung gekühlt/erhitzt und 1-30 eq. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ zugegeben. Es wurde für eine Stunde bei 0 °C und anschließend bei RT für zwölf Stunden gerührt. Dann wurde mit festem NaHCO_3 neutralisiert. Nach Filtration wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeengt. In den nachfolgenden NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Untersuchungen konnte das gewünschte Produkt nicht detektiert werden. Die eingesetzten Äquivalente der Edukte, die verwendeten Lösungsmittel und Temperaturen sind in Tabelle 8 (Kapitel 5.1) angegeben.

7 Toxikologische Daten

Tabelle 30: Toxikologische Daten der verwendeten Chemikalien.

Substanz	CAS	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	67-64-1	 	225, 319, 336, EUH066	210, 280, 304+340, 312, 305+351+338, 337+313, 403+235
Acetonitril	75-05-8	 	225, 302+312+332, 319	210, 305+351+338, 403+235
Benzaldehyd-dimethylacetal	1125-88-8		302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
1-Brom-5-chlor-pentan	54512-75-3		319, 335, 315	261, 280, 302+352, 305+351+338
2-Brom-N-(2-phenylethyl)-acetamid	64297-92-3		301, 319	301+310-305+351+338
2-Brom-N-(4-Chlorphenyl)-acetamid	5343-64-6	Der Stoff ist gemäß CLP-Verordnung nicht eingestuft.		
Bortrifluoridetherat	109-63-7	   	226, 302, 314, 330, 372	260, 280, 284, 305, 351+338, 310

Toxikologische Daten

Substanz	CAS	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Chlortriphenylmethan	76-83-5		314	280, 305+351+338, 310
Chloroform, CDCl_3	67-66-3	 	302, 315, 351, 373	281
Cäsiumcarbonat	534-17-8		315, 319, 335	261, 305+35+338
Dichlormethan	75-09-2		351	281
Diethylether	60-29-7	 	224, 302, 336	210, 261
1,4-Dioxan	123-91-1	  	EUH019, EUH066, 225, 319, 335, 351	201, 202, 210, 240, 264
DMF	68-12-2	 	226, 312, 319, 332, 360D	201, 280, 305+351+338, 310
DMSO	67-68-5	Der Stoff ist gemäß CLP-Verordnung nicht eingestuft.		
Essigsäure	64-19-7	 	226, 314	280, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid	108-24-7	  	226, 302, 314, 332	210, 233, 240, 241, 310

Toxikologische Daten

Substanz	CAS	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Ethylacetat	141-78-6	 	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
EDTA	60-00-4		319	305+351+338
EDC	1892-57-5		314	280, 305+351+338, 310
Ethanol	64-17-5		225	210
n-Hexan	110-54-3	   	225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	201, 210, 273, 301+310, 308+313, 331
Hydrazinacetat	7335-65-1	  	301+311+331-317, 350, 410	201, 261, 273, 280, 301+310, 311
Kaliumcarbonat	584-08-7		302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	7791-18-6		335, 319	261, 280, 305+351+338
Manganchlorid	7773-01-5	   	302, 318, 373, 411	273, 280, 301+312+330, 305+351+338+310, 391, 501

Toxikologische Daten

Substanz	CAS	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
MOPS	1132-61-2		315, 319, 335	261,305+351+338
Natrium	7440-23-5	 	260, 314	223, 231+232-280-305+351+338, 370+378,422
Natriumacetat	127-09-3	Der Stoff ist gemäß CLP-Verordnung nicht eingestuft.		
Natriumhydrid (60 %ige Suspension)	7646-69-7		260	223, 231+232, 370 +378, 422
Natriumhydroxid	1310-73-2		314	280, 305+351+338, 310
Natriummethanolat	124-41-4	 	EUH014, 251, 314	235+410, 260, 264, 280, 301+330+331
NHS	6066-82-6	Der Stoff ist gemäß CLP-Verordnung nicht eingestuft.		
4-Penten-1-ol	821-09-0		226	210, 240, 280, 303+361+351, 403+235, 501
Phenol	108-95-2	  	301+311+331, 314, 341,373	202, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338 308+313
3-Phenyl-5-piperazino-1,2,4-	306935-14-8		301	301+310

Toxikologische Daten

Substanz	CAS	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
thiadiazol				
Pyridin	110-86-1	 	225, 302+312+332, 315, 319	210, 280, 305 +351+338
Salzäure 37%	7647-01-0	 	314, 335	261, 280, 305+351+338, 310
Thiophenol	108-98-5	    	226, 300+310+330, 318, 335, 361, 371, 373, 410	P210, 260, 280, 301+310 +330, 302+352+310, 304+340+310, 305+351+338 +310, 403+233
Trifluoressigsäure	76-05-1	 	314, 332, 412	273, 280, 305 +351+338, 310
Toluol	108-88-3	  	225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 261, 281, 301, 310, 331
Wasserstoff	1333-74-0	 	220, 280	210, 377, 381, 410+403

8 Literaturverzeichnis

- [1] J. C. Rutledge, K. F. Ng, H. H. Aung, D. W. Wilson, Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology* **2010**, 6, 361-370.
- [2] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, vollst. überarb. u. erw. Aufl. ed., Springer Verlag, Berlin, **2011**.
- [3] N. K. Khare, Glycosylation Strategies in Oligosaccharide Synthesis. *Trends In Carbohydrate Research* **2009**, 1, 18-51.
- [4] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, P. Stanley, C. Bertozzi, G. Hart, M. Etzler, *Essentials of Glycobiology, 2nd edition.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [5] J. C. Paulson, K. J. Colley, Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, 17615-17618.
- [6] Y. T. Pan, A. D. Eilbein, *Glycoproteins*, Elsevier Amsterdam, **1995**.
- [7] L. Tu, D. Banfield, Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2010**, 67, 29-41.
- [8] J. T. Weadge, M. M. Palcic, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**, 1-13.
- [9] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* **2008**, 77, 521-555.
- [10] N. L. Rose, M. M. Palcic, S. V. Evans, Glycosyltransferases A and B: Four Critical Amino Acids Determine Blood Type. *Journal of Chemical Education* **2005**, 82, 1846-1852.
- [11] F. Yamaoto, H. Clausen, T. White, J. Marken, S.-I. Hakomori, Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* **1990**, 345, 229-233.
- [12] S. L. Marcus, R. Polakowski, N. O. L. Seto, E. Leinala, S. Borisova, A. Blancher, F. Roubinet, S. V. Evans, M. M. Palcic, A Single Point Mutation Reverses the Donor Specificity of Human Blood Group B-synthesizing Galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 12403-12405.
- [13] N. O. L. Seto, M. M. Palcic, C. A. Compston, H. Li, D. R. Bundle, S. A. Narang, Sequential Interchange of Four Amino Acids from Blood Group B to Blood Group A Glycosyltransferase Boosts Catalytic Activity and Progressively Modifies Substrate Recognition in Human Recombinant Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 14133-14138.
- [14] N. O. L. Seto, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, D. R. Bundle, S. A. Narang, Expression of a Recombinant Human Glycosyltransferase from a Synthetic Gene and its Utilization for Synthesis of the Human Blood Group B Trisaccharide. *European Journal of Biochemistry* **1995**, 234, 323-328.
- [15] <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>, Website zuletzt aufgerufen am: 15.09.2015
- [16] L. J. Alderwick, G. S. Lloyd, H. Ghadbane, J. W. May, A. Bhatt, L. Eggeling, K. Fütterer, G. S. Besra, The C-Terminal Domain of the Arabinosyltransferase Mycobacterium tuberculosis EmbC Is a Lectin-Like Carbohydrate Binding Module. *PLoS Pathogens* **2011**, 7, 1001299- 1100129.

- [17] M. Igura, N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka, D. Kohda, Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *The EMBO Journal* **2008**, 27, 234-243.
- [18] G. Rossman, D. Moras, K. W. Olsen, Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **1974**, 250, 194-199.
- [19] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry* **2008**, 77, 521-555.
- [20] L. L. Lairson, S. G. Withers, Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chemical Communications* **2004**, 2243-2248.
- [21] D. L. Zechel, S. G. Withers, Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. *Accounts of Chemical Research* **2000**, 33, 11-18.
- [22] K. Landsteiner, Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralblatt Bakteriologie* **1900**, 27, 357-362.
- [23] T. J. Painter, W. M. Watkins, W. T. Morgan, Serological active fucose-containing oligosaccharides isolated from human blood-group A and B substances. *Nature* **1965**, 206, 594-597.
- [24] J. Milland, M. S. Sandrin, ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens* **2006**, 68, 459-466.
- [25] W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, Some aspects of the biochemistry of the human blood-group substances. *British Medical Bulletin* **1959**, 15, 109-112.
- [26] W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, Genetic and biochemical aspects of human blood-group A-, B-, H-, Lea - and Leb- specificity. *British Medical Bulletin* **1969**, 25, 30-34.
- [27] A. Kobata, E. F. Grollman, V. Ginsburg, An enzymatic basis for blood type B in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, 32, 272-277.
- [28] S. Komba, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, Synthesis and biological activities of three sulfated sialyl Lex ganglioside analogues for clarifying the real carbohydrate ligand structure of L-selectin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 1833-1847.
- [29] M. Nagai, V. Davé, H. Muensch, A. Yoshida, Human blood group glycosyltransferase. II. Purification of galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, 253, 380-381.
- [30] F. Yamamoto, ABO blood group system—ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology* **2004**, 20, 3-22.
- [31] J. J. Van Loghem, H. Dorfmeier, M. Van Der Hart, Two A Antigens with Abnormal Serologic Properties. *Vox Sanguinis* **1957**, 2, 16-24.
- [32] S.-I. Hakomori, Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/General Subjects* **1999**, 1473, 247-266.
- [33] H. Masamune, Molisch-positive Mucopolysaccharides of Gastric Cancers as Compared with the Corresponding Components of Gastric Mucosae. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **1958**, 68, 81-91.
- [34] T. F. Orntoft, P. Greenwell, H. Clausen, W. M. Watkins, Regulation of the oncodevelopmental expression of type 1 chain ABH and Lewis b blood group antigens in human colon by ac-2-L-fucosylation. *Gut* **1991**, 32, 287-293.

- [35] F. Piller, J.-P. Cartron, H. Tuppy, Increase of blood group A and loss of blood group Sda activity in the mucus from human neoplastic colon *Revue française de transfusion et immuno-hématologie* **1980**, 23, 599-611.
- [36] S. I. Patenaude, N. O. L. Seto, S. N. Borisova, Szpacenko, Adam, S. L. Marcus, Palcic, Monica M., S. V. Evans, The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nature Structural Biology* **2002**, 9, 685-690.
- [37] 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, ABO(H) Blood Group A and B Glycosyltransferases Recognize Substrate via Specific Conformational Changes. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 10097-10108.
- [38] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters, Blood Group B Galactosyltransferase: Insights into Substrate Binding from NMR Experiments. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 13529-13538.
- [39] V. Kamath, N. L. Seto, C. Compston, O. Hindsgaul, M. Palcic, Synthesis of the acceptor analog α Fuc(1 $\rightarrow$ 2) α Gal-O(CH₂)₇ CH₃: A probe for the kinetic mechanism of recombinant human blood group B glycosyltransferase. *Glycoconjugate Journal* **1999**, 16, 599-606.
- [40] P. K. Qasba, B. Ramakrishnan, E. Boeggeman, Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* **2005**, 30, 53-62.
- [41] 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, Differential Recognition of the Type I and II H Antigen Acceptors by the Human ABO(H) Blood Group A and B Glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 3625-3632.
- [42] J. R. Brown, B. E. Crawford, J. D. Esko, Glycan Antagonists and Inhibitors: A Fount for Drug Discovery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2007**, 42, 481-515.
- [43] B. Waldscheck, M. Streiff, W. Notz, W. Kinzy, R. R. Schmidt, Hemmung von α (1-3)-Galactosyltransferase durch ein neuartiges Disubstratanalogon. *Angewandte Chemie* **2001**, 113, 4120-4124.
- [44] K. Frische, R. R. Schmidt, Glycal-1-ylmethylphosphonates – precursors of glycosyltransferase inhibitors. *Liebigs Annalen der Chemie* **1994**, 1994, 297-303.
- [45] M. Izumi, H. Yuasa, H. Hashimoto, Bisubstrate Analogues as Glycosyltransferase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2009**, 9, 87-105.
- [46] K. Schaefer, N. Sindhuwinata, T. Hackl, M. P. Kötzler, F. C. Niemeyer, M. M. Palcic, T. Peters, B. Meyer, A Nonionic Inhibitor with High Specificity for the UDP-Gal Donor Binding Site of Human Blood Group B Galactosyltransferase: Design, Synthesis, and Characterization. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 2150-2154.
- [47] T. K. Smith, B. L. Young, H. Denton, D. L. Hughes, G. K. Wagner, First small molecular inhibitors of *T. brucei* dolicholphosphate mannose synthase (DPMS), a validated drug target in African sleeping sickness. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 1749-1752.
- [48] C. Rademacher, J. Landström, N. Sindhuwinata, M. Palcic, G. Widmalm, T. Peters, NMR-based exploration of the acceptor binding site of human blood group B galactosyltransferase with molecular fragments. *Glycoconjugate Journal* **2010**, 27, 349-358.
- [49] R. Jørgensen, L. L. Grimm, N. Sindhuwinata, T. Peters, M. M. Palcic, A Glycosyltransferase Inhibitor from a Molecular Fragment Library Simultaneously

- Interferes with Metal Ion and Substrate Binding. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 4171-4175.
- [50] U. Holzgrabe, Antibiotika-Entwicklung gestern und heute. *Chemotherapie Journal* **2004**, 13, 142-147.
- [51] G. Klebe, in *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**, 303-315.
- [52] D. A. Erlanson, R. S. McDowell, T. O'Brien, Fragment-Based Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, 3463-3482.
- [53] M. Zentgraf, H. Steuber, C. Koch, C. La Motta, S. Sartini, C. A. Sotriffer, G. Klebe, Wie verlässlich sind aktuelle Docking-Ansätze für strukturbasiertes Wirkstoffdesign? – Fallstudie zur Aldose-Reduktase. *Angewandte Chemie* **2007**, 119, 3645-3649.
- [54] P. Leccese, *Design und Synthese von Disaccharidmimetika zur Inhibierung der humanen Galactosyltransferase B*, Diplomarbeit, Universität Hamburg (Hamburg), **2011**.
- [55] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, Website zuletzt aufgerufen am: 15.09.2015
- [56] F. Niemeyer, *Synthese neuer Inhibitoren der humanen Galactosyltransferase B*, Diplomarbeit, Universität Hamburg (Hamburg), **2011**.
- [57] R. R. Schmidt, Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese – gibt es Alternativen zur Koenigs-Knorr-Methode? *Angewandte Chemie* **1986**, 98, 213-236.
- [58] R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, Glycosyl imidates, 47. Stereospecific synthesis of α - and β -L-fucopyranosyl phosphates and of gdp-fucose via trichloroacetimidate. *Liebigs Annalen der Chemie* **1991**, 1991, 121-124.
- [59] R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, Halide ion catalyzed glycosidation reactions. Syntheses of alpha-linked disaccharides. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, 4056-4062.
- [60] M. R. J. Mads H. Clausen, Jesper Thorsen, Robert Madsen A strategy for chemical synthesis of selectively methyl-esterified oligomers of galacturonic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 543-551.
- [61] Y. Nishi, T. Tanimoto, Preparation and Characterization of Branched β -Cyclodextrins Having α -L-Fucopyranose and a Study of Their Functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2009**, 73, 562-569.
- [62] A. V. Demchenko, P. Pornsuriyasak, C. De Meo, Acetal Protecting Groups in the Organic Laboratory: Synthesis of Methyl 4,6-O-Benzylidene- α -D-Glucopyranoside. *Journal of Chemical Education* **2006**, 83, 782.
- [63] <http://zinc.docking.org/>, Website zuletzt aufgerufen am: 15.09.2015
- [64] N. J. de Mol, M. J. E. Fischer, in *Surface Plasmon Resonance*, Vol. 627, Humana Press, Utrecht, **2010**, 1-14.
- [65] A. J. Tudos, R. B. M. Schasfoort, in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**, 1-14.
- [66] B. Meyer, T. Peters, NMR-Techniken zum Screening und zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteinrezeptoren. *Angewandte Chemie* **2003**, 115, 890-918.
- [67] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, 22, 3099-3108.

-
- [68] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (paD) scale and the operational pH in heavy water. *Analytical Chemistry* **1968**, 40, 700-706.
 - [69] R. Lorenz, Über den Einfluß des Pipettierfehlers auf die Genauigkeit bei der Konzentrationsmessung von Viruslösungen. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **1961**, 10, 551-559.
 - [70] L. Michaelis, M. L. Menten, Die Kinetik der Invertwirkung. *Biochem.Z.* **1913**, 333-369.
 - [71] G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* **1925**, 338-339.
 - [72] S. Schnell, C. Mendoza, Closed Form Solution for Time-dependent Enzyme Kinetics. *Journal of Theoretical Biology* **1997**, 187, 207-212.
 - [73] C. T. Goudar, J. R. Sonnad, R. G. Duggleby, Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, 1429, 377-383.
 - [74] K. Schafer, *Design, Synthese und Analyse von Inhibitoren für die humane Blutgruppe-B-spezifische galactosyltransferase*, Dissertation, Universität Hamburg (Hamburg), **2011**.
 - [75] M. H. Clausen, M. R. Jorgensen, J. Thorsen, R. Madsen, A strategy for chemical synthesis of selectively methyl-esterified oligomers of galacturonic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, 543-551.
 - [76] H. Wang, L. Sun, S. Glazebnik, K. Zhao, Peralkylation of saccharides under aqueous conditions. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 2953-2956.
 - [77] C. Girard, M.-L. Miramon, T. de Solminihac, J. Herscovici, Synthesis of 3-C-(6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-1-propene: a caveat. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 1769-1774.
 - [78] S. Hanessian, D. Delorme, P. C. Tyler, G. Demailly, Y. Chapleur, Total synthesis of the C-3 – C-17 segment of boromycin. *Canadian Journal of Chemistry* **1983**, 61, 634-637.
 - [79] J. Alzeer, A. Vasella, Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides. Part 2. Regioselective deprotection of monosaccharide-derived monomers and dimers. *Helvetica Chimica Acta* **1995**, 78, 177-193.
 - [80] A. K. Mandal, N. R. Soni, K. R. Ratnam, Boron Trifluoride Etherate/Iodide Ion as a Mild, Convenient and Regioselective Ether Cleaving Reagent. *Synthesis* **1985**, 1985, 274-275.

9 Danksagung

Zum Abschluß möchte ich mich bedanken.

Bei meiner Familie und bei Raffael möchte ich mich für die Unterstützung und die Kraft, die sie mir in all die Jahre gegen haben, bedanken.

Dem AK-Meyer danke ich für die schöne Zeit. Felix als besten Laborpartner in der Welt. Katrin für ihre Freundschaft und Unterstützung. Bea für ihre Fröhlichkeit. Karsten für seine unglaubliche Hilfsbereitschaft. Nadja für ihre liebe Art. Alena und Brita für ihren Zuspruch. Tim und Mirko für die Unterstützung in der Lösung von mathematischen Problemen. Thomas und Moritz für die großartige NMR-Unterstützung. Insa und Ilona für die großartige Unterstützung bei der Synthese. Alex und Kalthi für das Niveau. Mo für seine gute Laune. Wei für seine ruhige Art. Raffael für seine Überlegtheit. Anna-Lena für die Stimmung. Melissa für die Betreuung der HPLC.

Der Massen- und der NMR-Abteilung für die Messung unzähliger Proben. Dem IT-Service für die Behebung von Linux-Problemen.

Dem AK T. Peters an der Uni Lübeck, ganz besonders bei Lena, Sophie und Friedemann für die Bereitstellung von GTB und UDP-Gal.

Raffael, Claas, Karsten, Nadja und Katrin für das Korrekturlesen der Arbeit.

Für ihre über die Jahre andauernde Freundschaft bedanke ich mich bei Katharina.

10 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Hamburg, den