

Design, Synthese und Analyse von nicht-ionischen Inhibitoren für die humane Blutgruppe-A-spezifische *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Wei-Nien Liao

aus Taichung, Taiwan

Hamburg 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

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

Tag der Disputation: 05.07.2019

Druckfreigabe: 05.07.2019

Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Oktober 2011 bis April 2019 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 Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Für meine Eltern

I. Abkürzungsverzeichnis

2D, 3D	zwei-, dreidimensional
abs.	absolutes
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
aq	<i>aqueous</i> , wässrig
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
BF ₃ ·OEt ₂	Bortrifluoriddiethyletherat
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
CSA	Camphersulfonsäure
d	Dublett
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
gef.	gefunden
GT	Glycosyltransferase
GTA	Blutgruppe-A-spezifische <i>N</i> -Acetylgalactosaminyl-transferase
GTB	Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase
<i>i</i> PrOH	2-Propanol, Isopropanol
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>K_D</i>	thermodynamische Dissoziationskonstante
<i>K_I</i>	Inhibitionskonstante
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante
m	Multiplett
<i>m/z</i>	Masse/Ladung

Me	Methyl
MeOD	Methanol- <i>d</i> 4
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NaOEt	Natriumethanolat
NaOMe	Natriummethanolat
n.b.	nicht bestimmt
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PE	Petrolether 50-70
Pent	Pentenyl
PG	<i>Protecting Group</i> , Schutzgruppe
ppm	<i>Parts Per Million</i>
q	Quartett
<i>R_f</i>	<i>Ratio of Fronts</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
t	Triplett
THF	Tetrahydrofuran
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
Tr	Trityl
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Gal	Uridindiphosphat-Galactose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylgalactosamin
UMP	Uridinmonophosphat
δ	chemische Verschiebung

II. Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Glycosyltransferasen.....	5
3.1.1	Klassifizierung von Glycosyltransferasen.....	7
3.1.2	Katalysemechanismus.....	8
3.2	ABO-Blutgruppensystem.....	11
3.3	Die humane Blutgruppe-A-spezifische <i>N</i> -Acetylgalactos-aminyltransferase (GTA)	13
3.4	Glycosyltransferase-Inhibitoren.....	16
3.5	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	19
4	Aufgabenstellung	20
5	Ergebnisse und Diskussion	22
5.1	Design, Synthese und Analyse eines nicht-ionischen UDP-GalNAc analogen Inhibitors	22
5.1.1	In silico Analyse der Liganden 12 und 13.....	25
5.1.2	Synthese.....	33
5.1.3	Progresskurvenanalyse der Inhibition gegenüber GTA und GTB	47
5.2	Verbesserung der nicht-ionischen Inhibitoren: Design, Synthese und Analyse	64
5.2.1	In silico Untersuchung der Harnsäurederivate von 12 und 13.....	65
5.2.2	Synthese der alkylierten Harnsäurederivate	75
5.2.3	Progresskurvenanalyse	78
6	Experimenteller Teil	81
6.1	Verwendete Geräte und Software.....	81
6.2	Verwendete Chemikalien und Materialien.....	82
6.3	Verwendete Puffer.....	84
6.4	Molecular Modelling.....	84
6.4.1	Vorbereitung der Kristallstruktur.....	84
6.4.2	Docking von Liganden	85
6.5	Progresskurvenanalyse	85

6.6	Synthesevorschriften	88
6.6.1	Darstellung von 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D- ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (12)	88
6.6.2	Darstellung von 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D- arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (13)	113
6.6.3	Darstellung von 3-Propyl-1,7,9-trihydropurin-2,6,8-trion (81)	128
7	Toxikologische Daten	133
8	Verwendete KMR-Substanzen	138
9	Literaturverzeichnis.....	139
10	Danksagung.....	142
11	Eidesstattliche Versicherung.....	143

1 Zusammenfassung

Glycane sind an vielen unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt. Vor allem bei der Zell-Zell-Interaktion, und Kommunikation spielen sie eine wichtige Rolle. Mit dieser wichtigen Aufgabe ist es nicht verwunderlich, dass eine Veränderung der Glycanstrukturen mit vielen verschiedenen Krankheiten im Zusammenhang gebracht werden kann. Es gibt zunehmende Beweise dafür, dass eine veränderte Glycanexpression mit der Tumorbildung in Verbindung steht und solche Veränderung sein invasives und metastasenbildendes Verhalten beeinflussen kann. Die Analyse der Glycanstrukturen hilft deshalb nicht nur die zellulären Prozesse zu verstehen, sondern gibt auch den Einblick in der Entstehung von bestimmten Krankheiten oder Tumoren, was zu Entwicklungen von diagnostischen und therapeutischen Methoden führen kann.

Die Vielzahl komplexer Glycanstrukturen wird durch sukzessive Beteiligung von mehreren Glycosyltransferasen (GTs) aufgebaut. Diese wichtige Klasse von Enzymen katalysiert hochspezifisch die Übertragung von NDP- oder NMP-aktivierten Kohlenhydraten auf einen bestimmten Akzeptor. Die Komplexität dieses Reaktionsmechanismus führt dazu, dass eine Entwicklung von Inhibitoren für Glycosyltransferasen äußerst schwierig und anspruchsvoll ist. Hinzu kommt noch die mangelnde Kenntnis über die dreidimensionale Struktur der meisten GTs und die Tatsache, dass die Glycosyltransferasen als Transmembranproteine meist im Golgi-Apparat lokalisiert und somit schwer für Inhibitoren zugänglich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf einem neuen, innovativen Konzept zur Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für GTs, das an der humanen Blutgruppe-B-spezifischen Galactosyltransferase (GTB) als Modellsystem erfolgreich angewandt wurde, zwei neue, nicht-ionische Inhibitoren für die humane, Blutgruppe-A-spezifische *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) entwickelt, synthetisiert und analysiert. Gleichzeitig konnte hier gezeigt werden, dass dieses innovative Konzept erfolgreich auch auf GTA übertragbar ist.

Bei den zwei Inhibitoren **12** und **13** handelt es sich um Mimetika des GTA-Donorsubstrats (UDP-GalNAc), die aus 9-*N*-Ribityl- bzw. Arabinityl-Harnsäure und *N*-Acetylgalactose, welche jeweils α -1-glycosidisch an den Pentityl-Linker koppeln, zusammengesetzt sind. Die beiden Mimetika unterscheiden sich nur in der Konfiguration am C-2 des Linkers. Durch computergestützte Analysen wurde gezeigt, dass die Mimetika **12** und **13** die Bindungstasche von GTA gut besetzen und das Donorsubstrat ersetzen konnten. Die beiden Mimetika konnten jeweils erfolgreich synthetisiert und anschließend auf ihr inhibitorisches Potential analysiert werden. Zudem gelang es beide Liganden mit den zwei unterschiedlichen Pentityl-Linkers experimentell zu untersuchen, um festzustellen, welcher davon hinsichtlich der Inhibition den besseren Linker darstellt. Für die Inhibitionsanalyse wurde ein NMR basierter Inhibitionsassay durchgeführt und durch die Analyse der daraus

resultierenden Progresskurve der Enzymreaktion konnte die inhibitorische Konstante ermittelt werden. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass beide Mimetika gut in der Lage sind, GTA zu inhibieren. Mit einem K_I -Wert von $56 \mu\text{M}$ inhibiert **12** GTA um einen Faktor von 3.8 stärker als Ligand **13**. Somit stellt sich das Ribityl als der bessere Linker dar.

Um die Spezifität der beiden Mimetika zu überprüfen, wurden ebenfalls NMR-basierte Inhibitionsassays mit GTB durchgeführt. Beide Mimetika weisen eine hohe Spezifität gegenüber GTA auf, was mit dem Vergleich der jeweiligen K_I -Werte gegenüber GTA und GTB gezeigt werden konnte. Während die K_I -Werte der Mimetika gegenüber GTB nur im einstelligen millimolaren Bereich liegen, sind die K_I -Werte von **12** und **13** gegenüber GTA jeweils um einen Faktor von 161 bzw. 24 kleiner und befinden sich somit im mikromolaren Bereich. Es ist demnach gelungen, Inhibitoren zu synthetisieren, die spezifisch *N*-Acetylgalactosyltransferasen inhibieren. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das verwendete, innovative Konzept auch auf GTA und vermutlich ebenfalls auf andere Klassen von GTs, die NDP-aktivierten Kohlenhydrate als Donorsubstrat benutzen, übertragbar ist.

Schließlich konnte im letzten Teil der Arbeit eine Möglichkeit zur Verbesserung der Bindungsaffinität von Mimetika **12** und **13** aufgezeigt werden. Das Ersetzen des UDP durch 9-*N*-Pentityl-Harnsäure hinterlässt einen leeren Raum in der Bindungstasche von GTA, welcher durch einen Propyl oder Hydroxyethylrest besetzt werden kann. Diese zusätzlichen Reste können an die 3-*N*- oder 6-*N*-Position der Harnsäure einfach oder doppelt verknüpft werden. Die daraus resultierenden Liganden **51** bis **73** zeigen *in silico* eine Erhöhung der Bindungsaffinität, die sich dem Wert des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc annähert. Zur schnellen experimentellen Überprüfung wurde zunächst 3-Propyl-1,7,9-trihydropurin-2,6,8-trion (**81**) synthetisiert, welches keinen Linker und Zuckerfragment enthält. Hierfür wurde ein allgemeiner Syntheseweg für einfach und doppelt alkylierte Harnsäurederivate entwickelt. Durch eine Progresskurvenanalyse konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der zusätzliche Alkylrest einen deutlichen Beitrag zur Bindung leistet. Im Vergleich zur Harnsäure selbst ergibt sich eine Verbesserung um den Faktor 15 bis 31.

2 Abstract

Glycans are involved in many different cellular processes. They play an important role, especially in cell-cell interactions and –communications, so it is not surprising that a mutation of glycan structures is associated with different diseases. Many studies show that an altered glycan expression is associated with cancer. These alterations might change the invasive and metastasis behavior of the tumor cell. Therefore, the analysis of glycan structure allows not only to understand cellular processes, but also to give an insight into the formation of related diseases, including cancer, in order to develop new diagnostic and therapeutic methods.

The wide varieties of complex glycan structures are formed with the successive participation of multiple glycosyltransferases (GTs). This important class of enzyme catalyzes the highly specific transfer of NDP- and NMP-activated carbohydrate to a designated acceptor. The complexity of this reaction mechanism leads to the fact that the development of glycosyltransferase inhibitors is extremely difficult and challenging. Additionally, there is a lack of information about the three-dimensional structure of most of the GTs, and the fact that glycosyltransferases as a transmembrane protein are mostly located in Golgi apparatus, therefore, difficult to access for inhibitors.

In this work two novel, non-ionic inhibitors for the human blood group A *N*-acetylgalactosyltransferase (GTA) was developed, synthesized and analyzed, based on a novel, innovative concept to develop specific inhibitors for GTs, which was successfully apply to the human blood group B galactosyltransferase (GTB) as a model system. Simultaneously, it can be shown that this innovative concept is applicable to GTA as well.

The two inhibitors **12** and **13** are GTA donor substrate UDP-GalNAc mimics, which consist of 9-*N*-ribityl or arabinityl uric acid, and *N*-acetylgalactose, interconnected at the pentityl fragment through a α -1-glycosidic linkage. These two mimics differ only in the configuration at C-2 of the linker. The in silico analysis shows that the mimics **12** and **13** are able to occupy the binding site of GTA quiet well and can replace the donor substrate. The two mimics were successfully synthesized and their inhibitory potential subsequently analyzed. Furthermore, two ligands with different pentityl linker could be analyzed in order to determine, which linker has the greater potential. For the inhibition analysis, an enzyme inhibition assay was conducted, which uses NMR to track the enzyme reaction. By analyzing the resulting progress curve, the inhibition constant can be calculated. Both mimics show a great inhibitory potential. **12** inhibits, with a K_i -value of 56 μ M, stronger than **13** by a factor of 3.8. Therefore, the ribityl is the better choice as a linker.

To verify the specificity of both mimics, the same enzyme inhibition assay was conducted with GTB as well. Both mimics show a high specificity towards GTA, as shown by comparing

their K_f -values of both GTA and GTB. While the K_f -values of the mimics towards GTB lie within low range of millimolar, the K_f -value of the mimics **12** and **13** towards GTA are by a factor of 161 and 24 smaller. Therefore, the synthesis of inhibitors, which inhibit specifically *N*-acetylgalactosyltransferases, was successful. At the same time, it shows that the innovative concept to develop specific inhibitors for GTs can be applied to GTA and probably to other GTs using NDP activated carbohydrate as donor substrate as well.

Finally, a way to improve the binding of mimics **12** and **13** was discovered. The substitution of UDP from the donor substrate by 9 *N*-pentityl leaves a void within the binding site, which can be occupied by a propyl or hydroxyethyl moiety. These additional moieties can be singly or doubly attached to uric acid at the 3-N or 6-N position. The resulting ligands **51** to **73** show in silico an increase of binding affinity, which approach the value of the natural donor substrate UDP-GalNAc. For a quick verification, 3-propyl-1,7,9-trihydropurine-2,6,8-trione (**81**), containing no linker and sugar fragment, was synthesized. For this purpose, a general synthesis route for single and double alkylated uric acid derivatives was developed. Subsequent progress curve analysis proofs that the additional alkyl moiety does indeed contribute to binding affinity. In comparison with uric acid itself, there is an improvement by a factor of 15 to 31.

3 Einleitung

Kohlenhydrate, die häufigsten Biomoleküle auf der Erde, sind eine der Hauptklassen der Naturstoffe neben Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden. Sie dienen nicht nur als Energielieferant (Stärke, Glykogen) und Stützmaterialien (Cellulose, Chitin), sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Zell-Zellinteraktion und -kommunikation. Sie können in Form von verschiedenen Mono-, Oligo- und Polysacchariden vorliegen und sind häufig kovalent an ein Protein oder Lipid gebunden. Solche Verbindungen werden unter dem Begriff Glykokonjugate zusammengefasst. Darunter gehören Proteoglycane, Glycoproteine und Glycolipide.^[1] Der Anteil der Glycane kann hierbei stark variieren. Bei den meisten Glykokonjugaten jedoch machen die Glycane den wesentlichen Anteil der Masse aus. Die hohe Dichte von verschiedenen Glykokonjugaten auf pro- und eukaryotischen Zellen führt dementsprechend zu einer dichten Kohlenhydratschicht, der sog. Glycocalyx.^[2] Neben ihrer Schutzfunktion für die Zelle enthält die Glycocalyx Kohlenhydratstrukturen, die als Bindungsstelle für bestimmte Kohlenhydrat-bindende Proteine (Lektine) dienen und ist somit an vielen Vorgängen der Zellkommunikation beteiligt. Außerdem können diese Glycane auch spezifische Rezeptoren für verschiedene Viren, Bakterien, pflanzliche Toxine und Antigene für Autoimmun- und Alloimmunreaktionen sein. Das gleiche Glycan kann verschiedene Funktionen innerhalb eines Organismus besitzen. Eine Veränderung der Glycanstruktur auf der Zelloberfläche kann auf eine pathologische Veränderung der Zelle hindeuten. Besonders bei Tumoren kann diese veränderte Glycanexpression zu einem verstärktem invasiven und metastasenbildenden Verhalten führen.^[3, 4] Daher könnten diese veränderten Glycanstrukturen als Biomarker oder *drug targets* dienen. Die Erforschung der Glycane gibt nicht nur den Einblick in den Ablauf zellulärer Vorgänge, sondern hilft auch bei der Entwicklung von neuen diagnostischen und therapeutischen Methoden gegen bestimmte Krankheiten.

3.1 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen (GTs) sind eine der größten und diversesten Enzymgruppen in der Natur. Sie katalysieren die Übertragung einer Kohlenhydrateinheit von einem aktivierten Zuckerdonor auf ein spezifisches Akzeptorsubstrat und spielen eine wichtige Rolle in der Biosynthese von komplexen Oligosacchariden, Glycoproteinen und andere Glycoconjugaten. Dabei ist diese Übertragung stereo- und regiospezifisch, und abhängig von der jeweiligen GT kann sie unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration erfolgen (Abbildung 1). Dadurch ist es möglich, α - und β -Glycoside aus einem identisch konfigurierten Donorsubstrat zu synthetisieren. Hauptsächlich liegen die aktivierten Zuckerdonoren in Form von

Zuckernucleotiden vor, aber auch Lipidphosphat- (z.B. Dolicholphosphatzucker) und unsubstituierte Phosphatzucker werden genutzt. Das Akzeptorsubstrat umfasst verschiedene Arten von Verbindungen inklusive Lipide, Nucleinsäure, Proteine, Antibiotika und andere Kleinmoleküle wie z.B. Flavonole und Steroide, aber im Regelfall sind es anderen Kohlenhydrate.^[5, 6]

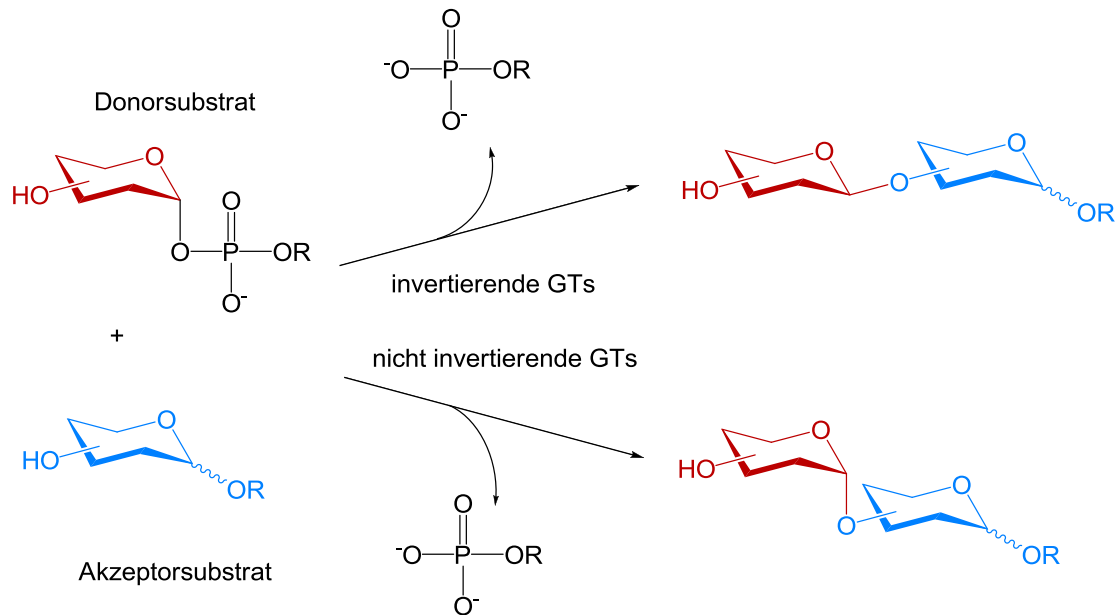


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktion, die durch GTs katalysiert wird. Ein aktivierter Zucker wird unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Als Nebenprodukt wird ein Nucleosidmonophosphat (NMP) oder Nucleosiddiphosphat (NDP) freigesetzt.^[6]

Die meisten GTs sind Typ-II-Transmembranproteine und bilden den Großteil der Transmembranproteine des Golgi-Apparats. Sie bestehen aus einer N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembranregion, gefolgt von einer Stammregion und einer enzymatischen Domäne.^[7, 8] (Abbildung 2)

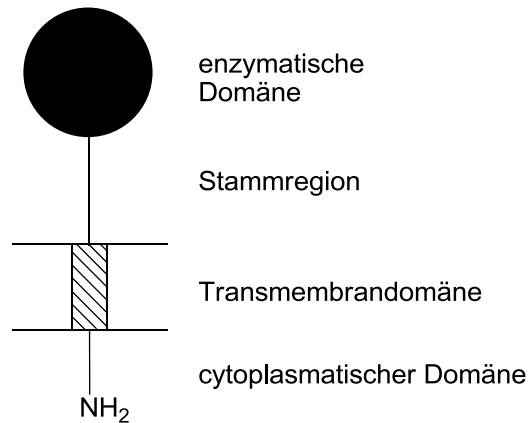


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der GTs. Die Mehrheit der GTs sind Typ-II-Transmembranproteine, die aus einer cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne, einer Stammregion und einer enzymatischen Domäne bestehen.^[7]

3.1.1 Klassifizierung von Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen können entweder anhand des stereochemischen Resultats der Reaktion, die sie katalysieren („*inverting*“ oder „*retaining*“ Enzym), oder anhand ihrer Substratspezifität, wie von *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) vorgeschlagen wird, klassifiziert werden. Bei dieser Art von Klassifizierung wird das strukturelle Merkmal der Enzyme nicht berücksichtigt.^[9] Eine alternative Klassifizierung, welche von der CAZy Datenbank (*Carbohydrate Active enZyme database*, www.cazy.org) benutzt wird, basiert auf die Aminosäuresequenz der GTs.^[5, 10, 11] Diese sind dort als Familien aufgelistet und bis heute sind 106 Familien bekannt (Stand: April 2019).^[12] Trotz dieser Vielfalt an Genfamilien sind bislang lediglich nur drei Faltungsarten bekannt: GT-A, GT-B und GT-C (Abbildung 3).

Die GT-A Faltung besteht aus zwei $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann-artige Domänen, die sehr eng beieinander liegen. Meist besitzen Enzyme mit GT-A Faltung noch ein DXD-Motiv, das ein bivalentes Kation binden kann. Dieses Kation kann die Pyrophosphatgruppe des Donorsubstrats binden und spielt deshalb eine wichtige Rolle für die Katalyse. Das DXD-Motiv ist allerdings nicht konserviert. Es gibt GTs, die kein DXD-Motiv besitzen, obwohl deren Struktur GT-A folgt.^[13] Wie bei der GT-A Faltung besitzt die GT-B Faltung ebenfalls zwei $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann-artige Domänen, die allerdings weniger fest assoziiert sind. Beide Domänen sind über eine Linker Region verknüpft und bilden eine Spalte, wo das aktive Zentrum sich befindet. Außerdem wird ein bivalentes Kation nicht benötigt für Enzyme mit GT-B Faltung.^[6, 11]

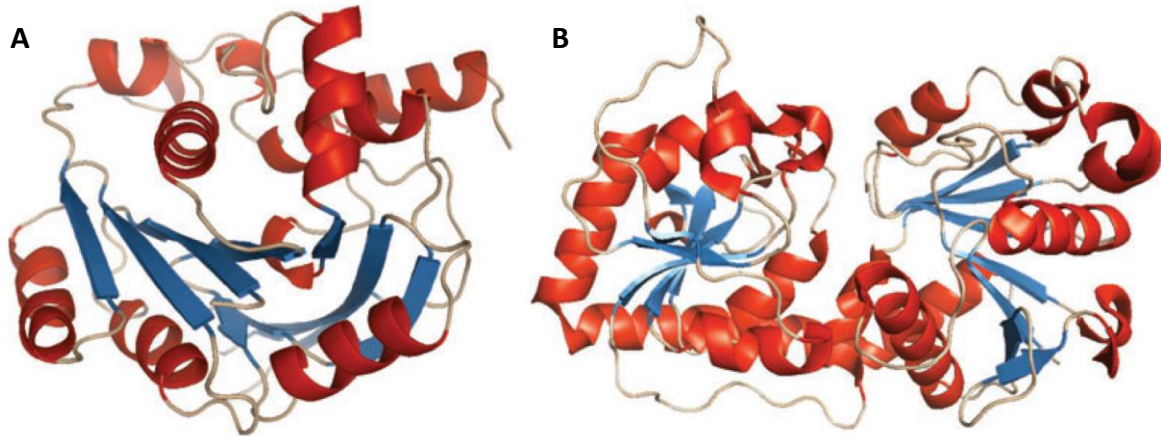


Abbildung 3: Allgemeine Faltungsarten der Glycosyltransferasen. A) die GT-A Faltung besteht aus zwei eng aneinandergrenzende $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann-artige Domänen. Hier wird das invertierende Enzym SpsA aus *Bacillus subtilis*, pdb 1qgq, dargestellt. B) die GT-B Faltung besteht aus zwei $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann-artige Domänen, die sich gegenüberstehen und über einen Linker verknüpft sind. Gezeigt wird hier das Bacteriophage T4 β -Glucosyltransferase, pdb 1jg7.^[6]

Anhand von iterativen Sequenzvergleichen wird die GT-C Faltung vorhergesagt, die ein großes hydrophobes integrales Membranprotein mit 8 bis 13 Transmembranhelices entspricht. Die GT-C Glycosyltransferasen befinden sich in der ER oder Plasmamembran und deren aktives Zentrum ist auf einer long-loop Region lokalisiert.^[14] 10 der 12 GT-Familie, die nach der Vorhersage GT-C Faltung annehmen, verwenden Lipidphosphatzucker als Donorsubstrat.^[6]

3.1.2 Katalysemechanismus

Wie zuvor beschrieben wurde, kann die von GTs katalysierte Übertragung der Kohlenhydrateinheit auf das Akzeptorsubstrat unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration erfolgen. Invertierenden GTs benutzen einen S_N2 -ähnlichen Mechanismus für die Übertragung, die über einen Oxocabeniumion-ähnlichen Übergangszustand verläuft und zu einer Inversion der anomeren Konfiguration führt. (Abbildung 4A). Hierbei fungiert die Seitenkette einer Aminosäure als Base.^[6]

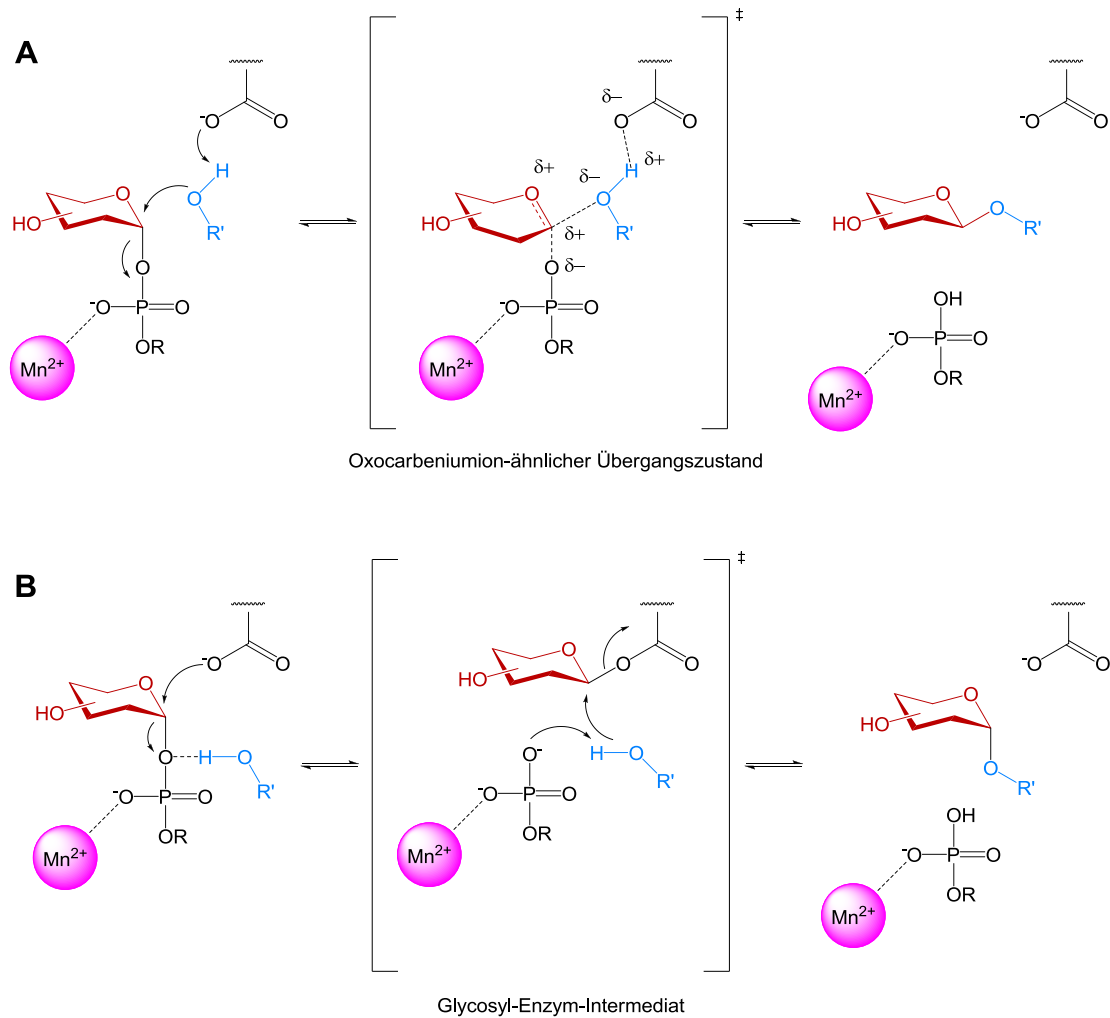


Abbildung 4: Katalysemechanismen der Glycosyltransferasen. A) Mechanismus der invertierenden GTs. Invertierenden GTs benutzen einen S_N2 -ähnlichen Mechanismus für die Übertragung, die über einen Oxocarbeniumion-ähnlichen Übergangszustand verläuft und zu einer Inversion der anomeren Konfiguration führt. B) Vorgeschlagener Mechanismus der nicht invertierenden GTs, der über einen zweifachen S_N2 -ähnlichen Mechanismus verläuft. Bei diesem Mechanismus wird zunächst ein kovalent gebundenes Glycosyl-Enzym-Intermediat gebildet. Anschließend erfolgt ein nucleophiler Angriff des Glycosyl-Enzym-Intermediats durch die Akzeptor-Hydroxygruppe, welche durch das Phosphat aktiviert wird. (R: Nucleosid, Nucleosidmonophosphat, Lipidphosphat oder Phosphat; R'OH: Akzeptorgruppe wie z.B. andere Zucker, Proteine oder Antibiotika)^[6]

Für den Katalysemechanismus von nicht invertierenden GTs wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen. Über welchen Mechanismus die Katalysereaktion tatsächlich verläuft, ist jedoch noch nicht eindeutig bewiesen worden. Beim ersten Vorschlag erfolgt die Reaktion über einen zweifachen S_N2 -ähnlichen Mechanismus (Abbildung 4B). Dabei wird zunächst ein kovalent gebundenes Glycosyl-Enzym-Intermediat gebildet. Die Phosphatgruppe fungiert in diesem Fall als Base und aktiviert die Akzeptor-Hydroxygruppe für einen zweiten nucleophilen Angriff.

Der zweite Mechanismus geht von einem Spezialfall der S_N1 -Reaktion aus, dem sog. S_{Ni} -Mechanismus. Bei diesem Mechanismus findet eine Wechselwirkung zwischen der

Abgangsgruppe und dem Nucleophil statt, sodass die Abgangsgruppe und das Nucleophil eine räumliche Nähe aufweisen. Diese Wechselwirkung, vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung, stabilisiert zusätzlich den sich bildenden Oxocarbeniumion-ähnlichen Übergangszustand. Über diesen Übergangszustand führt die Abspaltung der Phosphatgruppe zu einem intermediären, kurzlebigen Ionenpaar, wobei das Nucleophil und die Abgangsgruppe auf der gleichen Seite des Donorzuckers lokalisiert sind, sodass der Angriff des Nucleophils im nächsten Schritt von der gleichen Seite ermöglicht wird (Abbildung 5).^[6, 15]

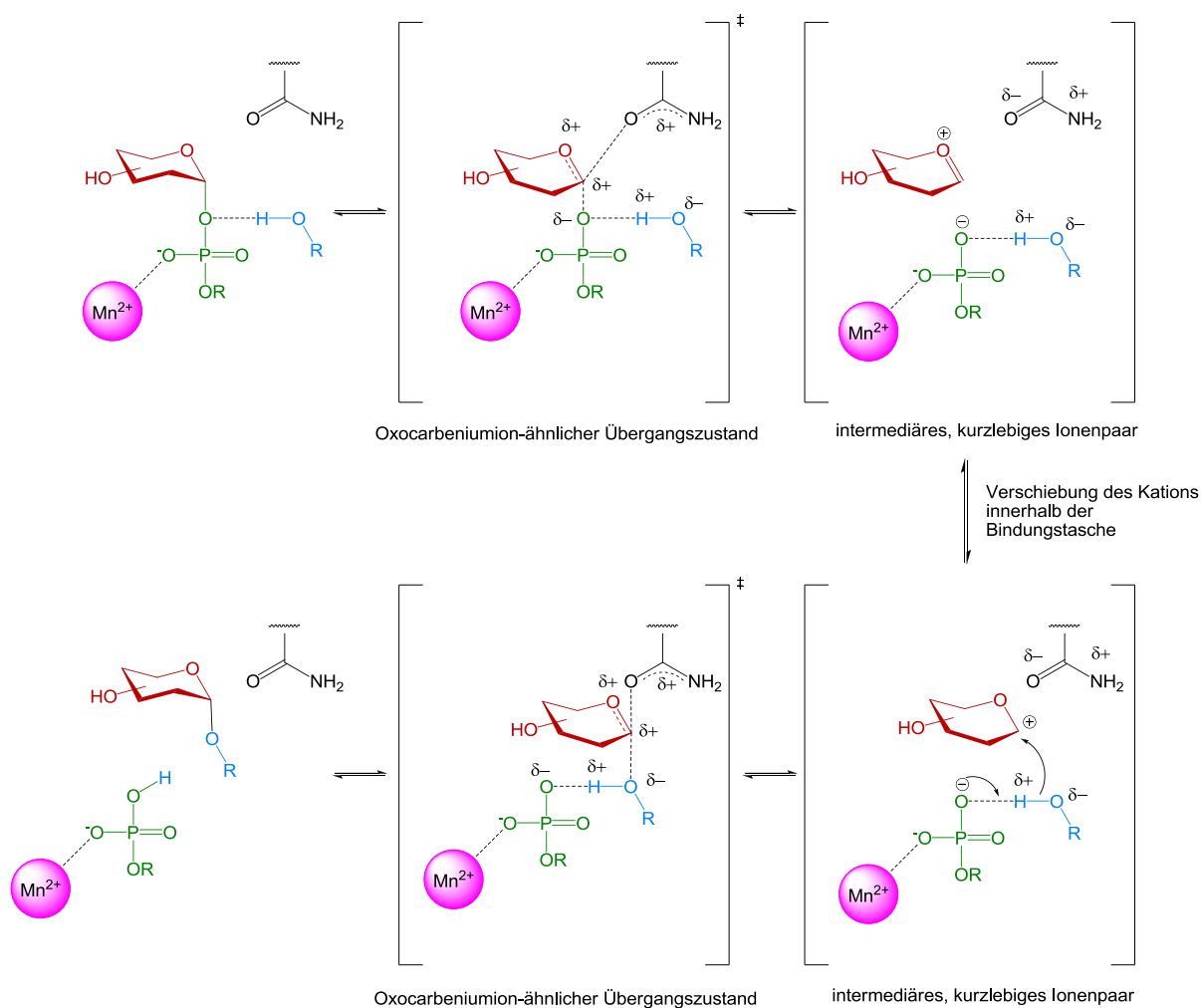


Abbildung 5: Vorgeschlagener S_Ni -Mechanismus der nicht invertierenden GTs. Durch die Abspaltung der Phosphatgruppe wird ein kurzlebige Oxocarbenium-Phosphat-Ionenpaar gebildet, das entweder zurück zu den Ausgangsverbindungen zerfällt oder von dem Nucleophil auf der gleichen Seite angegriffen wird, sodass das Produkt die gleiche anomere Konfiguration besitzt wie das Edukt vor der Reaktion.^[6]

3.2 ABO-Blutgruppensystem

Es gibt verschiedene Systeme, die das menschliche Blut abhängig von der An- oder Abwesenheit bestimmter Antigenen auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen klassifizieren können. Diese Antigene sind je nach System Glycoproteine oder Glycolipide und können auch auf anderen Zelltypen exprimiert werden. Derzeit sind 36 Systeme von der *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) anerkannt und aufgelistet worden (Stand: April. 2019).^[16]

Das ABO-Blutgruppensystem ist das wichtigste System in Bezug auf die Bluttransfusion, Stammzell- und Organtransplantation.^[17] Karl Landsteiner beschrieb am Anfang des 20. Jahrhunderts, dass das Serum gesunder Menschen auf andere menschliche Blutkörperchen agglutinierend wirken kann.^[18] Die Aggregation entsteht durch die Wechselwirkung zwischen den Antigenen auf der Oberfläche der Erythrozyten und den Antikörpern im Blutplasma. Diese Erkenntnisse führten zu einer Aufteilung der Blutgruppe in vier Hauptklassen: A, B, AB und O. Die Erythrozyten der Gruppe A bzw. B besitzen das A- bzw. B-Antigen und das Serum enthält anti-B- bzw. anti-A-Antikörper. Die Erythrozyten der Gruppe O weisen keine der Antigene auf, aber beide Antikörper sind im Serum enthalten. Der zuletzt entdeckten Gruppe AB fehlen die beiden Antikörper, ihre roten Blutkörperchen besitzen allerdings die beide Antigene A und B.

Die Antigene A und B haben den gleichen Precursor, das H-Antigen, das auf das Blutgruppe O Erythrozyten vorhanden ist. Es gibt 5 verschiedene H-Antigene. Gemeinsam haben sie das gleiche Terminus α -L-Fucp-(1,2)- β -D-Galp und werden durch die Addition von ein Fucosemonosaccharide, katalysiert durch H-Typ- α -1,2-fucosyltransferase oder Se-Typ- α -1,2-fucosyltransferase (abhängig von Sekretionsort), am entsprechenden Precursor gebildet. Das H-Typ- α -1,2-fucosyltransferase wird hauptsächlich auf Erythrozyten und deren Precursor exprimiert und katalysiert die Bildung von Typ II und IV-H-Antigene.^[19]

Die A- und B-Antigene entstehen durch eine α -1,3-Kopplung eines weiteren Monosaccharids auf die terminale Galactose des H-Antigens (Abbildung 6). Bei dem A-Antigen wird eine N-Acetylgalactosamin (GalNAc) durch die blutgruppenspezifische α (1,3)-N-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) übertragen. Bei dem B-Antigen erfolgt die Übertragung einer Galactose (Gal) durch die blutgruppenspezifische α (1,3)-Galactosyltransferase (GTB).

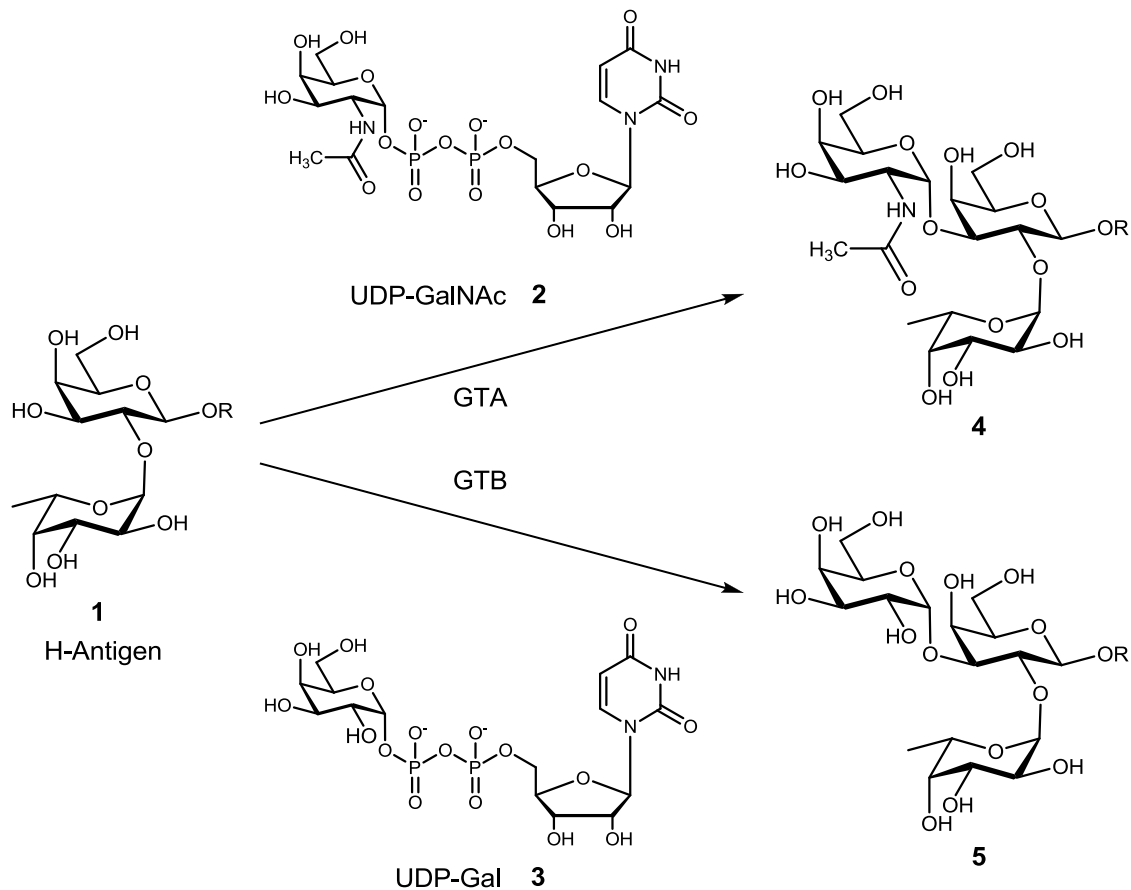


Abbildung 6: Biosynthese des A- und B-Antigens. GTA katalysiert die Übertragung eines *N*-Acetylgalactosamin von UDP-GalNAc auf das H-Antigen α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-OR, während GTB eine Galactose von UDP-Gal auf das H-Antigen überträgt. (R: Glycoprotein oder Glycolipid)^[20]

Die ABH-Antigene können auch auf anderen Geweben gefunden werden, z.B. vaskulären endothelialen Zellen, intestinale Darm-, Gebärmutterhals- und andere Epithelzellen.^[17] Der Expressionsgrad der Antigene verändert sich während des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. So exprimieren z.B. rote Blutkörperchen von Neugeborenen 25-50% weniger A/B-Antigene als die eines Erwachsenen.^[21] Außerdem findet eine Veränderung der Expressionsrate ebenfalls bei pathologischen Prozessen insbesondere der Carcinogenese statt. Eine Abnahme oder ein Verlust der Expression können mit der Malignität und dem metastatischen Potential der Tumorzelle im Zusammenhang stehen.^[21, 22] Beschrieben wurde der Verlust von A/B-Antigenen, der auf einer Abnahme der Transferasenaktivität zurückzuführen ist, bei Magenkrebs.^[23, 24] Bei Dickdarmkrebs wurde hingegen eine Erhöhung der Expression von A/B-Antigenen berichtet. Die Expressionsrate soll bei normalen Dickdarmzellen wegen der reduzierten Aktivität der α (1,2)-Fucosyltransferase zur Synthese von H-Antigenen während des Entwicklungsverlaufs abnehmen.^[21, 25]

3.3 Die humane Blutgruppe-A-spezifische *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA)

Die humane Blutgruppe-A-spezifische *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) ist eine nicht invertierende GT, die die Synthese von dem Blutgruppen-A-Antigen katalysiert. Dabei wird ein α -D-*N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) von Uridindiphosphat-*N*-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc) auf das terminale Disaccharid α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-OR des H-Antigens übertragen. Hierbei wird eine neue α (1,3)-glycosidische Bindung zwischen dem GalNAc und der Galactose-Einheit des H-Antigens gebildet. Für diese Reaktion wird ein bivalentes Kation als Co-Faktor benötigt. In der CAZY Datenbank wird GTA zu der Familie der GT-6 zugeordnet.^[10] Die dreidimensionale Struktur der GTA wurde mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (Abbildung 7).^[26] Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die durch eine Spalte getrennt werden. Die *N*-terminale Domäne enthält die Bindungstasche für das Donorsubstrat und die C-terminale Domäne erkennt das Disaccharid des Akzeptors. In der Mitte der Spalte befindet sich ein DXD-Motiv (211DVD213), welches für die Bindung des bivalenten Kations zuständig ist. Eine flexible Schleife (Aminosäuren 179-194) verbindet die beiden Domänen. In einer wässrigen, neutralen Lösung und bei einer Temperatur zwischen 15-60°C existiert GTA als Homodimer. Die Dimerisierung erfolgt durch eine nicht-kovalente, intermolekulare Wechselwirkung.^[27] Wie die meisten GTs sind GTAs der Säugetiere Typ-II-Transmembranproteine mit 354 Aminosäuren. Durch proteolytische Spaltung im Bereich der Stammregion wird die lösliche Form der GTA freigesetzt, die im Blut oder in der menschlichen Milch enthalten ist.^[28]

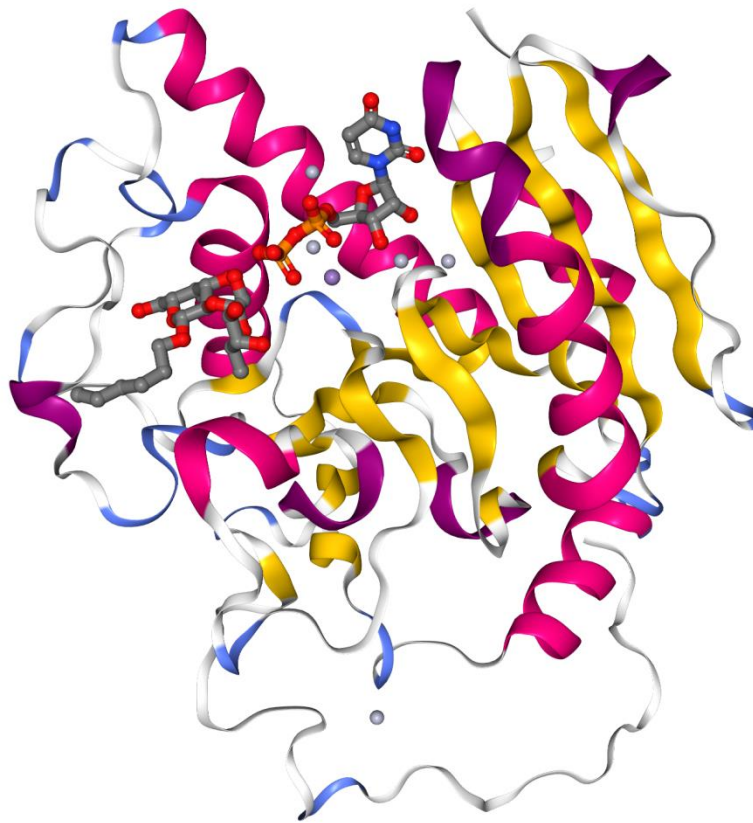


Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur der humanen Blutgruppe-A-spezifischen *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) als Monomer.^[29] Hier ist die Kristallstruktur pdb 1LZ1 gezeigt, die von Patenaude *et al.* im Jahr 2002 veröffentlicht wurde und mit UDP und dem H-Antigen-Disaccharid kokristallisiert ist. Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die durch eine Spalte getrennt werden, in der sich das Mn^{2+} -Ion-koordinierende DXD-Motiv befindet. Die beiden Domänen sind über eine flexible Schleife (Aminosäuren 179-194) miteinander verbunden, welche in der Nähe des aktiven Zentrums liegt und hier nicht vollständig aufgelöst ist. Die *N*-terminale Domäne enthält die Bindungstasche für das Donorsubstrat und die C-terminale Domäne die für das Akzeptor-Disaccharid.^[26]

GTA und GTB sind hoch homologe Enzyme und unterscheiden sich nur in 4 Aminosäuren (Arg/Gly 176, Gly/Ser 235, Leu/Met 266, Gly/Ala 268). Die Rolle dieser 4 Aminosäuren in der Donor- und Akzeptorerkennung wurde untersucht, indem chimäre GTA/GTB Mutanten erzeugt und deren Struktur mit und ohne Liganden betrachtet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuren Leu/Met 266 und Gly/Ala 268 für die Diskriminierung der beiden Donorsubstrate verantwortlich sind, während Gly/Ser 235 und Leu/Met 266 für die Erkennung des Akzeptors zuständig sind. Die Rolle von Arg/Gly 176 ist noch nicht aufgeklärt worden. In der Abbildung 8 ist die Bindungstasche der GTA und GTB schematisch dargestellt. Die beiden kritischen Aminosäurereste Leu/Met 266 und Gly/Ala 268 sind in der Nähe des Donorsubstrats lokalisiert. Leu/Met 266 ist so positioniert, dass es mit der Acetamido- bzw.

Hydroxygruppe im Kontakt stehen und so UDP-GalNAc und UDP-Gal durch einen sterischen Effekt unterscheidet. Während die Bindung des sterisch anspruchsvollen UDP-GalNAc an GTB durch Methionin 266 ausgeschlossen wird, kann das UDP-Gal zwar in die größere Bindungstasche der GTA gelangen, es kann jedoch nicht die komplementären Interaktionen mit dem Protein aufbauen, die für die Substraterkennung und die enzymatischen Aktivitäten notwendig sind. Zusätzlich kann His 233 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Acetamidogruppe des UDP-GalNAc aufbauen, welches eine selektive Positionierung des Zucker-Rests zulässt.^[26, 28, 30]

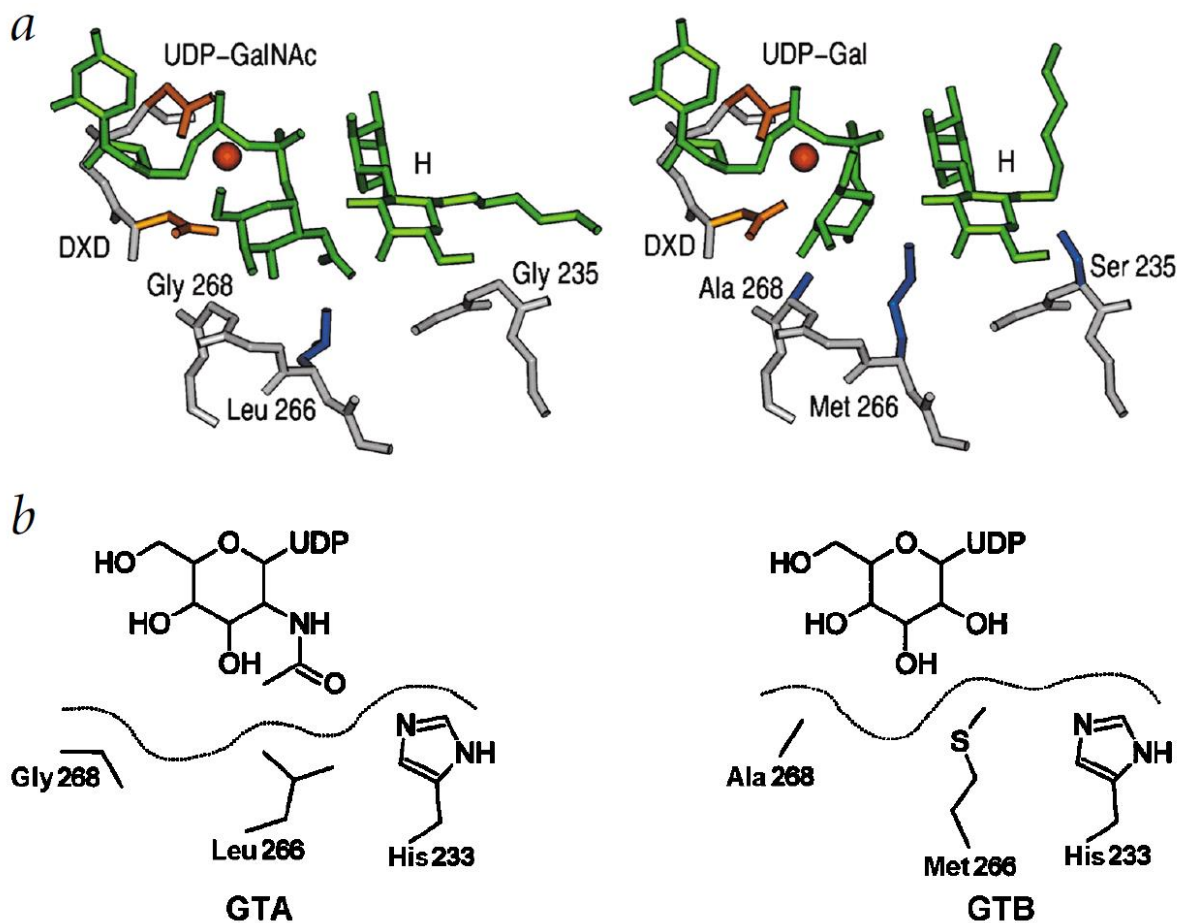


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bindungstasche von GTA (links) und GTB (rechts). Es wird gezeigt, wie die Enzyme zwischen den Substraten UDP-GalNAc und UDP-Gal unterscheiden. Die Aminosäuren Methionin 266 und Alanin 268 in der Bindungstasche von GTB verhindern durch ihre Seitenketten die Bindung des sterisch anspruchsvollen UDP-GalNAc an GTB. Im Gegensatz kann das UDP-Gal wegen der kleineren Aminosäure Leu 266 und Gly 268 zwar in die größere Bindungstasche der GTA gelangen, es fehlt jedoch an komplementären Wechselwirkungen.^[26]

Bei der Strukturaufklärung der chimären GTA/GTB Mutanten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Enzyme drei Konformationen (offene, halboffene und geschlossene) annehmen können. Ohne Ligand oder nur mit dem Akzeptorsubstrat gebunden liegt das

Enzym in der offenen Form vor. Durch die Bindung des UDP wird eine Konformationsänderung induziert, wobei ein interner *loop*, der in der Nähe des katalytischen Zentrums liegt, sich UDP annähert und so teilweise das aktive Zentrum verschließt (halboffene Konformation). Kommt es zusätzlich zur Bindung des H-Antigens, geht das Enzym in die geschlossene Konformation über, wobei die letzten neun C-terminalen Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden Liganden aufbauen. Es ist anzunehmen, dass die geschlossene Konformation für eine effiziente Katalyse erforderlich ist.^[30]

Der genaue Katalysemechanismus ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Mit Hilfe von NMR Experimenten konnte die bioaktive Konformation der UDP-Gal bestimmt werden. Demzufolge wird UDP-Gal in einer zurückgefalteten Konformation an das Enzym gebunden und das bivalente Kation ist essentiell für die Stabilisierung dieser Konformation in der Bindungstasche.^[31] Zudem zeigten massenspektrometrische Analysen, dass das Donorsubstrat in Abwesenheit von Mn^{2+} nicht oder nur schwach gebunden wird.^[27] Außerdem werden Donor- und Akzeptorsubstrat abhängig von der gegenseitigen An- und Abwesenheit unterschiedlich stark gebunden.^[32, 33] Die 4-OH-Gruppe der Galactose vom Donorsubstrat spielt für die Substraterkennung eine wichtige Rolle, da hierdurch die Galactose durch die Aminosäuren Asp 302 und Glu 303 entsprechend einer Pinzette (*tweezer*) festgehalten wird. Mit diesen Erkenntnissen wurde der *tweezers* Mechanismus vorgeschlagen, indem zuerst das Donorsubstrat in der zurückgefalteten Konformation an das Enzym gebunden wird, gefolgt von der Bindung des Akzeptorsubstrats, die zur weiteren Konformationsänderung führt. Die molekulare „*tweezer*“ unterstützt dabei die Umwandlung der UDP-Gal in den für den Galactosentransfer benötigten Übergangszustand. Anschließend wird die Galactose übertragen und das Produkt schnell freigesetzt.^[31] Bei dem Akzeptorsubstrat ist die Galactoseneinheit des H-Antigens wichtig für die Substraterkennung. Die Fucoseneinheit ist dagegen essentiell für eine effiziente Katalyse.^[34]

3.4 Glycosyltransferase-Inhibitoren

Glycosyltransferasen sind an der Biosynthese von komplexen Oligosacchariden, Glycoproteinen und anderen Glycoconjugaten beteiligt, die eine wichtige Rolle in der Zell-Zellinteraktion und -kommunikation spielen können. Durch die gezielte Hemmung von bestimmten GTs durch spezielle Inhibitoren kann daher deren Funktionen in zellulären Prozessen untersucht werden. Da bestimmte Glycanstrukturen wichtige Funktionen bei vielen Krankheiten (z.B. Krebs) übernehmen, können GT-Inhibitoren potentiell auch als Therapeutikum eingesetzt werden.

Bisher sind nur wenig GT-Inhibitoren bekannt. Der Grund dafür ist nicht nur die mangelnde Kenntnis über die dreidimensionale Struktur der meisten GTs, sondern auch die Komplexität des Reaktionsmechanismus bzw. des Übergangszustands mit der Beteiligung von Zucker Nucleotid, Akzeptorsubstrat und Metallion.^[35] Die GT-Inhibitoren können allgemein in drei Klassen aufgeteilt werden.^[36]

Die Donorsubstratsanaloga enthalten ein NDP-, NMP-Motiv oder Diphosphatmimetikum, das für die Bindung an das Enzym essentiell ist, sowie ein Glycosyldonor- oder Übergangszustandsanalogon, das wegen seiner Struktur die Übertragung des Kohlenhydrats unterdrückt oder verzögert.^[36] Die Entwicklung eines enzymespezifischen Inhibitors basierend auf der Donorstruktur ist schwer zu erreichen, da GTs, die das gleiche Kohlenhydrat übertragen, oft das identische Donorsubstrat verwenden. Dennoch besitzen Donoranaloga wegen ihrer hohen Affinität zum Enzym hohes inhibitorische Potential.^[37] Ein donorsubstratanalogen Inhibitor, der unter Verwendung von strukturellen und mechanistischen Informationen entwickelt wurde, veröffentlichte T. Pesnot *et al.* im Jahr 2010. Dieser besitzt eine inhibitorische Konstante von 0.45 bis 38.8 μM gegenüber verschiedenen GTs, inklusive GTB mit einer K_i von 2.4 μM in Gegenwart von UDP-Gal (Abbildung 9).^[38]

Mit einem neuen Konzept gelang K. Schaefer *et al.* die Entwicklung und Synthese eines nicht-ionischen Inhibitors. Die Ersetzung des Pyrophosphat durch einen nicht-ionischen Linker erlaubt dem Inhibitor die Zellmembran zu überqueren und verleiht ihm somit eine bessere Bioverfügbarkeit. Mittels STD-NMR wurde ein K_i -Wert von 117 μM gegenüber GTB in Gegenwart von UDP bestimmt (Abbildung 9).^[39, 40]

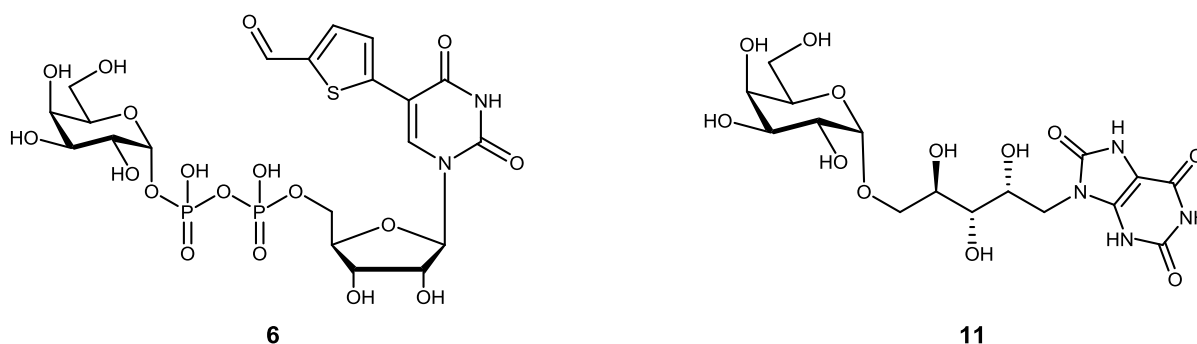


Abbildung 9: Beispiele für donorsubstratanaloge Inhibitoren. Links: UDP-Gal Derivat von T. Pesnot *et al* mit einem Formylthienyl-Substituenten an der Position 5 des Uracils. Dieser Inhibitor besitzt eine inhibitorische Konstante von 0.45 bis 38.8 μM gegenüber verschiedenen GTs, inklusive GTB mit einer K_i von 2.4 μM in Gegenwart von UDP-Gal.^[38] Rechts: Nicht-ionischer Inhibitor von K. Schaefer *et al*, der einen K_i Wert von 117 μM gegenüber GTB in Gegenwart von UDP besitzt. Durch die Substitution des Pyrophosphat mit einem nicht-ionischen Linker verfügt der Inhibitor eine bessere Bioverfügbarkeit.^[39, 40]

Im Gegensatz zum Donorsubstratanalogon sind Akzeptoranaloga spezifische Inhibitoren. Ihre inhibitorische Aktivität ist jedoch aufgrund ihrer schwachen Affinität, die im millimolaren Bereich liegt, gering. Bisubstratsanaloga enthalten sowohl Motive des Donor- als auch des Akzeptorsubstrats, wobei beide Motive kovalent miteinander verknüpft sind. Sie besitzen sowohl die hohe Affinität des Donors als auch die hohe Spezifität des Akzeptors und haben deshalb das größte inhibitorische Potential und die beste Selektivität.^[35, 37] Als Beispiel für einen natürlichen bisubstratanalogen Inhibitor ist das Tunicamycin zu nennen, das die *N*-Acetylglucosaminylphosphotransferase inhibiert (Abbildung 10).^[37] Der erste bisubstratanaloge Inhibitor für Glycosyltransferasen, der aus einem Nucleotid und Akzepterteil, aber ohne Donorzucker, besteht, wurde von Hindsgaul *et al.* dargestellt. Dieser zeigt gegenüber $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase eine inhibitorische Konstante von 16 μM und 2.3 μM , jeweils in Gegenwart von GDP-Fucose und Phenyl- β -D-Galactopyranosid (Abbildung 10).^[41] Schmidt *et al.* synthetisierte einen Bisubstratinhibitor für die $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase des Schweins, der zu den seltenen Inhibitoren für nicht-invertierende GTs gehört (Abbildung 10). Die Entwicklung eines Inhibitors für nicht-invertierende GTs ist im Gegensatz zu den invertierenden GTs wegen der komplexen Mechanismen schwierig und anspruchsvoll.^[42]

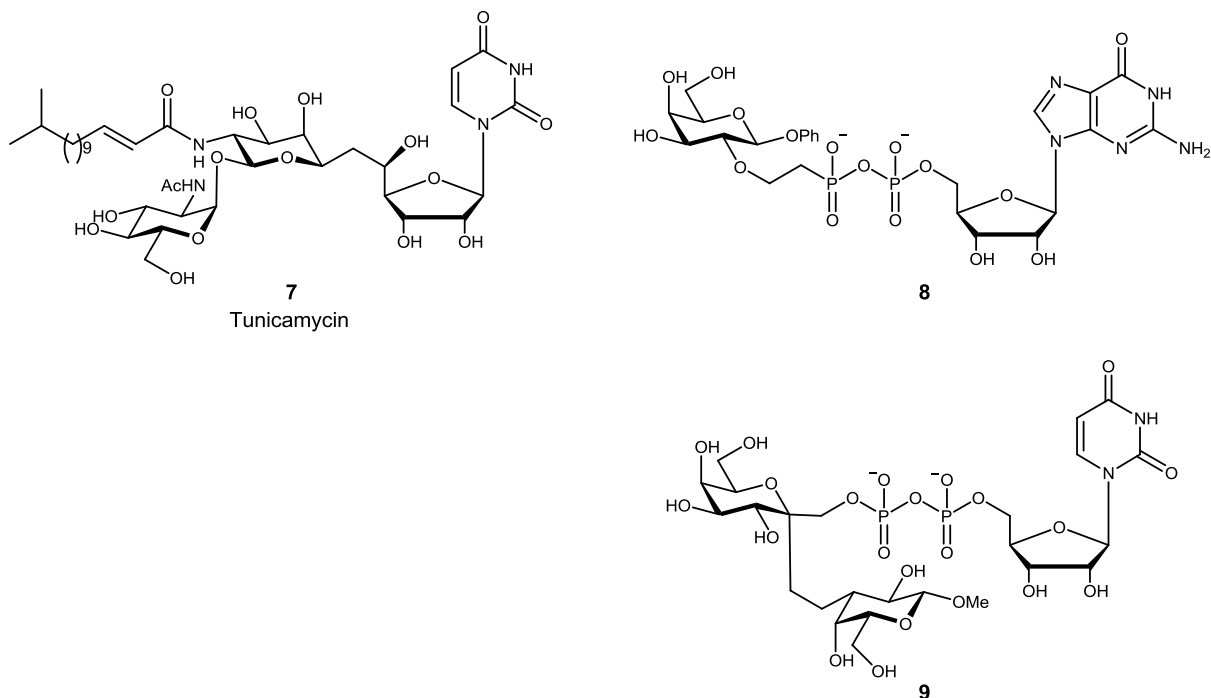


Abbildung 10: Beispiele für bisubstratanaloge Inhibitoren. Dargestellt sind hier der natürliche Inhibitor Tunicamycin (**7**), das *N*-Acetylglucosaminylphosphotransferase inhibiert, der erste bisubstratanaloge Inhibitor **8** für $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase von Hindsgaul *et al.* ($K_i = 16 \mu\text{M}$ und $K_i = 2.3 \mu\text{M}$, jeweils in Gegenwart von GDP-Fucose und Phenyl- β -D-Galactopyranosid), und ein Bisubstratinhibitor **9** für $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase Schmidt *et al.*, welcher zu den seltenen Inhibitoren für nicht-invertierende GTs gehört.^[37, 41, 42]

3.5 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Der Prozess neue Wirkstoffe zu finden ist oft schwierig und komplex. Damit die Wirkstoffe am Ende auch als Medikamente eingesetzt werden können, müssen sie viele Kriterien erfüllen, wie z.B. eine gute Wirksamkeit, gute Bioverfügbarkeit, hohe Spezifität und geringe Toxizität. Die Suche nach einer neuen Leitstruktur mit erwünschter biologischer Wirkung kann durch das *high throughput screening* effizienter durchgeführt werden, indem eine große Anzahl von Substanzen durch automatisierte Systeme gemustert (*screening*) werden.

Bei dem strukturbasierten Wirkstoffdesign wird die Suche nach einem neuen Wirkstoff auf ein Molekül konzentriert. Dabei wird ein Ligand durch computergestützte Methoden entworfen und optimiert, der möglichst energetisch günstige Wechselwirkung mit dem Zielprotein ausbilden kann. Als Grundvoraussetzung erfordert diese Methode gute Kenntnisse der dreidimensionalen Struktur des Zielproteins. Generell lässt sich das strukturbasierte Design in einem vierstufigen Zyklus darstellen (Abbildung 11). Am Anfang wird die 3D Struktur eines Rezeptors mit Hilfe von Computerprogrammen untersucht und Zentren, mit denen der Ligand gut wechselwirken kann, identifiziert. Anhand dieser Informationen wird ein Ligand entworfen, der anschließend synthetisiert und getestet wird. Weist der Ligand ein Bindungsereignis auf, wird die Struktur dieses Liganden als Basis für den nächsten Zyklus verwendet, sodass schrittweise neue Liganden mit verbesserten Bindungseigenschaften entworfen werden.^[43, 44]

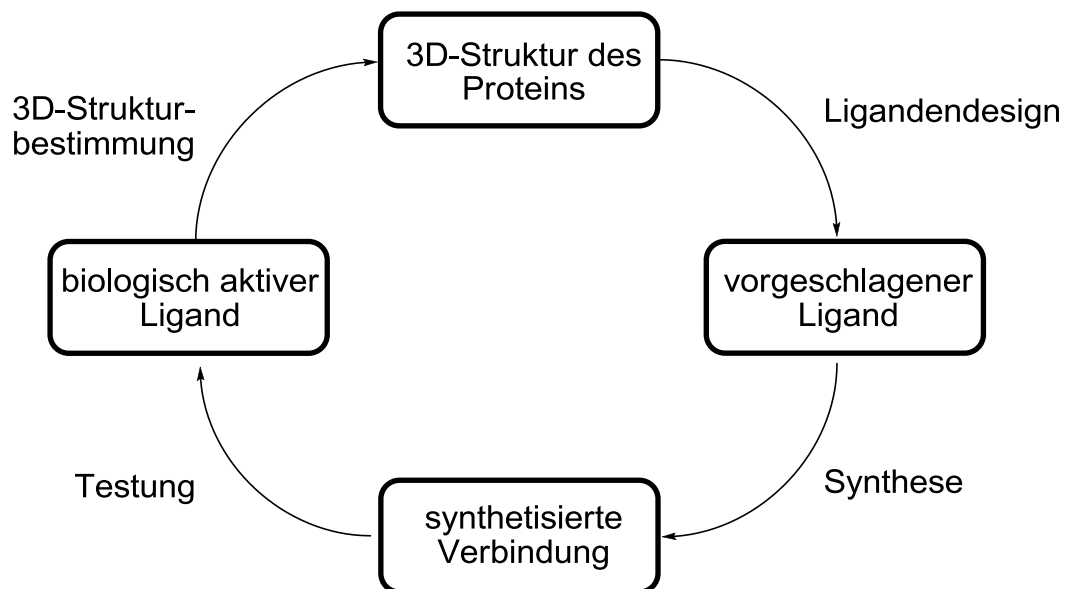


Abbildung 11: Generelles Schema des strukturbasierten Designs. Die Proteinstruktur wird computergestützt analysiert und auf Grundlage der Ergebnisse ein Ligand entworfen, der anschließend synthetisiert und hinsichtlich seiner Aktivität gegenüber dem Protein getestet wird. Im Falle eines Bindungsereignisses wird der Ligand im nächsten Zyklus optimiert.^[44]

4 Aufgabenstellung

Glycanstrukturen spielen eine wichtige Rolle in der Zell-Zellinteraktion und -kommunikation und sind an vielen zellulären Vorgängen beteiligt. Synthetisiert werden sie von Glycosyltransferasen, die hochspezifisch eine Kohlenhydrateinheit von einem aktivierten Zuckerdonor auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Abhängig von den jeweiligen GTs kann diese Übertragung unter Inversion oder Retention der anomeren Konfiguration erfolgen. Die Vielzahl komplexer Glycanstrukturen entsteht durch sukzessive Beteiligung von mehreren GTs. Die Expression von anormaler Glycanstruktur ist verbunden mit einer pathologischen Veränderung der Zelle. Bei Tumorzelle kann die Veränderung der Zelloberflächenglycosylierung zu invasiven und metastasenbildenden Verhalten führen.

Die spezifische Hemmung von GTs ist eine wichtige Methode, um das Verständnis der biologischen Funktion der Glycane zu erhöhen. Außerdem kann ein spezifischer Inhibitor als Wirkstoff eingesetzt werden, da bestimmte Glycanstrukturen auch wichtige Funktionen bei bestimmten Krankheiten übernehmen können. Die Entwicklung von Inhibitoren, die spezifisch und selektiv nur eine bestimmte GT hemmen, ist jedoch schwierig und komplex. Zum einen sind nur dreidimensionale Strukturen von wenigen GTs bisher bekannt, zum anderen erschwert der komplexe Katalysemechanismus mit der Beteiligung eines Donors, Akzeptors und eines bivalenten Kations die Suche nach einem spezifischen Inhibitor.

Als attraktives Modellsystem zur Entwicklung von Inhibitoren dienen die humane, Blutgruppe-A-spezifische *N*-Acetylgalactosaminyltransferase (GTA) und die humane, Blutgruppe-B-spezifische Galactosyltransferase (GTB). Die beiden GTs sind hoch homolog und unterscheiden sich nur in 4 Aminosäuren. Von den beiden Enzymen sind die dreidimensionalen Strukturen sowohl mit und als auch ohne Liganden bekannt. Mit diesen Informationen ist es möglich, durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign potenzielle, spezifische Inhibitoren zu entwickeln und zu testen. So gelang K. Schaefer *et al.* mit einem neuen Konzept die Entwicklung und Synthese eines donorsubstratanalogen Inhibitors für GTB, dessen Pyrophosphatgruppe durch einem nicht-ionischen Linker ersetzt wurde und somit Bioverfügbarkeit erhöht wird. Zusätzlich wurde das Uridin des natürlichen Liganden durch Harnsäure ersetzt. Auf diese Weise wurde das Ribosemotiv überbrückt und die Synthese des Liganden kann deutlich vereinfacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, basierend auf diesem neuen Konzept nicht-ionische, donorsubstratanaloge Inhibitoren für GTA entwickelt und synthetisiert werden. Anschließend sollten die Mimetika hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber GTA und GTB untersucht werden. Hierbei sollte gleichzeitig die Möglichkeit der Anwendung des Konzeptes auf GTA und eventuell ebenfalls auf andere GTs überprüft werden, was neue Möglichkeiten zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren für GTs ermöglichen würde.

Zusätzlich sollte bei erfolgreicher Bindung des nicht-ionischen Inhibitors an GTA dessen Affinität verbessert werden, indem die bestehenden Struktur motive modifiziert werden. Hierfür bieten sich das Harnsäurefragment und der Linker als Ausgangspunkt für eine Modifikation, ohne die Spezifität zu beeinflussen, an. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Fokus auf der Modifikation des Harnsäurefragments liegen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Design, Synthese und Analyse eines nicht-ionischen UDP-GalNAc analogen Inhibitors

Das Bindungsepitop des natürlichen Donorsubstrats UDP-Gal zu GTB wurde mit Hilfe von STD-NMR untersucht.^[20] Es konnte gezeigt werden, dass die Nucleotidbase Uracil hauptsächlich zu der Bindungsaffinität des Substrats beiträgt, während das Zuckerfragment für die Spezifität verantwortlich ist. Der Ribosyl- und Diphosphatteil verbessern zusätzlich die Affinität des Donorsubstrats. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde von J. Albers durch strukturbasiertes Design ein donorsubstratanaloger Inhibitor für GTB entwickelt. Dabei wurde nach Molekülfragmenten gesucht, die von der Nucleotidbase abgeleitet die Freiräume der Bindungstasche besser nutzen und somit die Bindungsaffinität erhöhen können. Nach *docking* Studien und anschließende Verifizierung mittels STD-NMR von verschiedenen Purin- und Pyrimidinderivaten ergab sich Harnsäure als bester Kandidat mit einem K_I -Wert von 1.7 mM. Außerdem konnte ein Linker gefunden werden, der die Pyrophosphat-Einheit und das Ribosylfragment ersetzt. Durch Ersetzen der Pyrophosphat- und Ribose-Einheit mit einem Pentityl-Linker kann der Ligand in seiner acetylierten Form die Zellmembran passieren und außerdem wird die Fähigkeit, Mn^{2+} -Ion zu komplexieren, beibehalten. Damit verfügt der Inhibitor nicht nur eine bessere Bioverfügbarkeit, auch die Synthese des spezifischen Inhibitors konnte deutlich vereinfacht werden.^[45]

Für den Pentityl-Linker gibt es zwei Kandidaten zur Auswahl: Ribityl bzw. Arabinityl, die sich nur in der Konfiguration am C-2 unterscheiden. Deshalb wurden zwei Moleküle für die donorsubstratanalogen Inhibitoren vorgeschlagen: 9-(5-O- α -D-Galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**10**) und 9-(5-O- α -D-Galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**11**) (Abbildung 12). Zwar unterscheiden sie sich nur in der Konfiguration am C-2 des Linkers, jedoch hat dies Einfluss auf die koordinativen Eigenschaften des Liganden gegenüber dem Mn^{2+} -Ion.

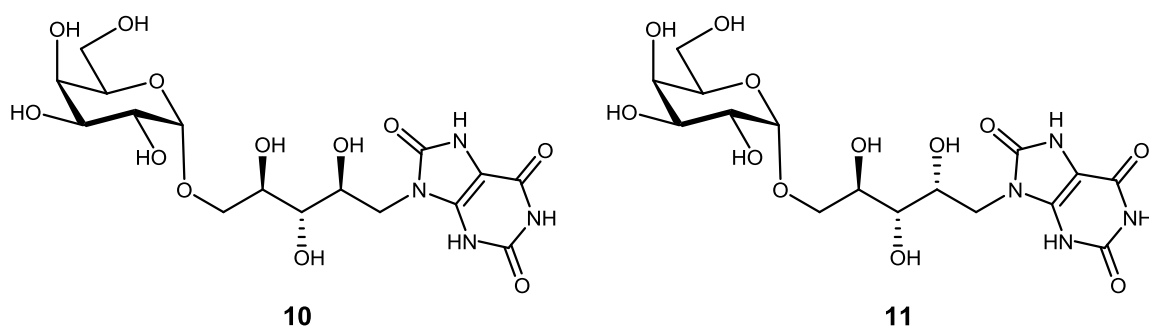


Abbildung 12: Die von J. Albers vorgeschlagenen donorsubstratanalogen Inhibitoren der GTB. Links: 9-(5-O- α -D-Galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**10**) und rechts: 9-(5-O- α -D-Galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**11**). **11** wurde von K. Schaefer synthetisiert und mittel STD-NMR ein K_i Wert von 117 μM gegenüber GTB in Gegenwart von UDP bestimmt.^[39, 40, 45]

Polyalkohole nehmen in der freien Form bevorzugt eine gestreckte Zickzack-Konformation ein. Tritt jedoch eine energetisch ungünstige 1,3-diaxiale Wechselwirkung auf, nimmt das Molekül eine sichelförmige Konformation auf, in der eine C-C-Bindung sich um 120° dreht, um diese ungünstige Wechselwirkung zu umgehen. Bei D-Ribitol findet genau dieses Phänomen statt und im Gegensatz bevorzugt D-Arabinol die Zickzack-Konformation.^[46, 47] Die Komplexierung des Mn^{2+} -Ion wird von den Sauerstoffatomen an C-2 und C-4 des Linkers übernommen. Dabei müssen die beiden Hydroxygruppen eine 1,3-diaxiale Orientierung einnehmen, um eine bidentate Komplexierung zu gewährleisten. Diese Konformation ist jedoch durch die 1,3-diaxiale Wechselwirkung in der freien Form energetisch ungünstig und kann zu einem Verlust an Bindungsentropie führen. Bei den Liganden **10** und **11** wurde von J. Albers *in silico* gezeigt, dass die Hydroxygruppen von **10** in der Bindungstasche der GTB in einer Konformation vorliegen, in der keine ungünstige 1,3-diaxiale Wechselwirkung stattfindet, während der Linker von **11** diese ungünstige Form annimmt.^[45] Es wäre möglich, dass bei **11** dieser Energieverlust durch die bessere Komplexierung an Mn^{2+} -Ion kompensiert wird. Diese und die Frage, welcher Ligand nun besser an das Enzym binden kann, konnte *in silico* nicht abgeschätzt werden und muss noch experimentell aufgeklärt werden.

Trotz allem wies die Positionierung der beiden Moleküle **10** und **11** in der Bindungstasche von GTB *in silico* große Übereinstimmungen mit dem natürlichen Donorsubstrat UDP-Gal auf. Die Ergebnisse von J. Albers wurde von K. Schaefer in *docking* Studien mit einer neuen Röntgenkristallstruktur der GTB bestätigt. Der Ligand **11** konnte synthetisiert werden und mittels STD-NMR ein K_i Wert von 117 μM gegenüber GTB in Gegenwart von UDP bestimmt werden. Für die GTA konnte für Ligand **11** hingegen in Gegenwart von UDP-GalNAc kein K_i bestimmt werden, was bedeutet, dass **11** spezifisch GTB inhibiert.^[39, 40]

Jedoch muss beachtet werden, dass generell GTs, die der gleichen Klasse angehören, das gleiche Donorsubstrat verwenden.^[6, 11] Das bedeutet für die Entwicklung eines spezifischen Inhibitors, dass ein donorsubstratanaloger Inhibitor nicht nur eine bestimmte GT, sondern

alle GTs innerhalb dieser Klasse inhibieren kann. Somit würde z.B. **11** gegenüber anderen Galactosyltransferasen ebenfalls inhibitorisches Potential besitzen. Um einen hochspezifischen Inhibitor, der nur ein einziges Enzym hemmt, zu entwickeln, muss ebenfalls die Akzeptorspezifität berücksichtigt werden, da diese die GTs innerhalb derselben Klasse differenzieren. Die Entwicklung eines solchen bisubstratanalogen Inhibitors wird in dieser Arbeit nicht behandelt und es wird sich zunächst auf die Entwicklung eines donorsubstratanalogen Inhibitors fokussiert.

Da GTA und GTB hoch homologe Enzyme sind und sich nur in 4 Aminosäuren unterscheiden, sollte sich dieses Konzept ebenfalls auf GTA anwenden lassen. Die Spezifität ist bei dem Donorsubstrat allein auf das Zuckerfragment zurückzuführen. Das bedeutet, dass es möglich wäre, aus den Leitstrukturen von **10** und **11** donorsubstratanalogen Inhibitoren für GTs anderer Klassen zu entwickeln, indem die Galactosyleinheit gegen entsprechende Zucker ausgetauscht wird. Strukturmotive wie das Harnsäurefragment und der Pentityl-Linker, die nicht zur Spezifität beitragen, können beibehalten werden. Nach diesem Ansatz wurde für die Entwicklung der GTA-spezifischen donorsubstratanalogen Inhibitoren der Galactopyranosyl-Rest von **10** und **11** gegen ein *N*-Acetylgalactopyranosyl-Fragment ausgetauscht. Daraus resultieren die Liganden **12** und **13** (Abbildung 13), die potentiell inhibitorisches Potential gegenüber GTA oder GTs, die ebenfalls UDP-GalNAc als Donorsubstrat verwenden, besitzen.

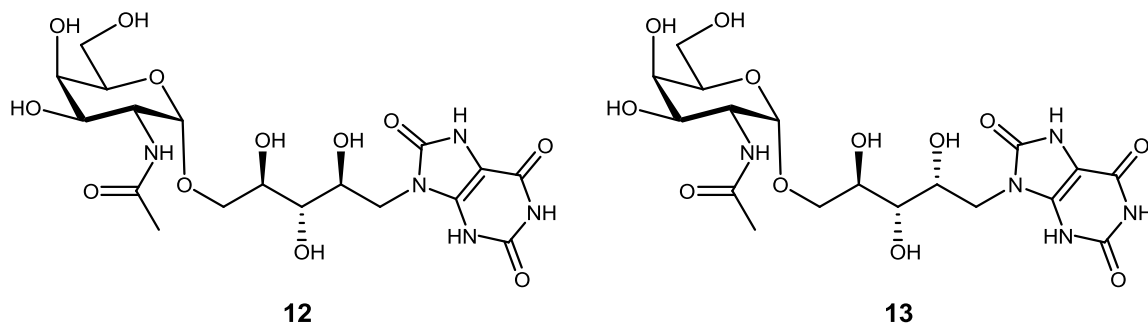


Abbildung 13: Vorgeschlagene donorsubstratanalogen Inhibitoren der GTA. Aus der Leitstruktur **10** und **11** wird jeweils die Galactopyranosyl-Einheit gegen ein *N*-Acetylgalactopyranosyl-Fragment ausgetauscht, die für die Spezifität verantwortlich ist. Strukturmotive wie das Harnsäurefragment und der Pentityl-Linker, die nicht zur Spezifität beitragen, werden beibehalten. Daraus resultierende Moleküle **12** und **13** sollten theoretisch inhibitorisches Potential gegenüber GTA besitzen. Links: 9-(5-*O*-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**12**) und rechts: 9-(5-*O*-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**13**).

Da das Mimetikum **10** noch nicht synthetisiert wurde, liegt noch bisher kein Vergleich der beiden Linker vor. Deshalb wurden die beiden Mimetika **12** und **13** in dieser Arbeit synthetisiert, um die optimale Linker-Konfiguration zu ermitteln. In dem folgenden Teil der Arbeit wird die Synthese und Analyse der Liganden **12** und **13** in drei Abschnitten vorgestellt.

Die Liganden werden zunächst *in silico* analysiert, um die Bindungsaffinität der Liganden gegenüber GTA abschätzen zu können. Gefolgt von der Beschreibung ihrer Synthese, wird anschließend mit den synthetisierten UDP-GalNAc Mimetika ein NMR-basierter Inhibitionsassay durchgeführt und mittels Progresskurve-Analyse kinetische Daten ermittelt. Außerdem wird ebenfalls ein NMR-basierter Inhibitionsassay mit GTB durchgeführt, um die Spezifität der Mimetika zu untersuchen.

5.1.1 *In silico* Analyse der Liganden 12 und 13

Für das *molecular modelling* wurde eine Kristallstruktur der humanen GTA verwendet, die von Patenaude *et al.* im Jahr 2002 veröffentlicht wurde (pdb: 1LZI).^[26] Die Kristallstruktur beinhaltet das native Protein als Monomer, UDP, H-Antigen-Akzeptor, sowie Kristallwasser und die zweiwertigen Ionen Mn^{2+} und Hg^{2+} . Der Bereich der Aminosäuren 346-354, 62 sowie die hochflexible *loop* AS 177-195 sind nicht aufgelöst. Diese wurden durch ein Homologiemodelling ergänzt. Das bivalente Mn^{2+} und das DXD-Motiv (Asp 211, Val 212, Asp 213) wurden als starres Aggregat definiert, damit keine Deformierung des Proteins während der Minimierungsprozedur stattfinden kann.^[48] Vor der Minimierung wurden die Kristallwasser, Hg-Ionen sowie die Liganden entfernt und die fehlenden Wasserstoffe ergänzt. Anschließend wurde die Energie des Proteins mit 1000 Iterationen minimiert.

Die minimierte Proteinstruktur konnte jetzt für *Docking*-Studien mit verschiedenen Liganden benutzt werden. Dazu wurde der Ligand in der Bindungstasche hinzugefügt und zusammen mit dem Protein minimiert und die Energie des Protein-Ligand Komplexes (E_{Komplex}) berechnet. Die Energie des Liganden (E_{Ligand}) und die des Proteins (E_{Protein}) wurden danach separat berechnet und von der Energie des Protein-Ligand Komplexes (E_{Komplex}) subtrahiert. Die Bindungsenergie (E_{Bindung}) ergab sich nach der Gleichung (GI-1):

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

Es muss beachtet werden, dass die mit der Gleichung (GI-1) berechneten Bindungsenergien keine absoluten Werte sind und nur zur Abschätzung dienen, ob ein Ligand relativ zu einem Referenzmolekül eine verbesserte oder verschlechtere Bindungsenthalpie besitzt.

Bevor die Bindungsenergien der Liganden **12** und **13** berechnet wird, wurden zunächst die Bindung des natürlichen Donorsubstrats der GTA (UDP-GalNAc) und die des UDP-Gal in GTA *in silico* betrachtet und deren Bindungsenergien berechnet, um später mit den entworfenen Liganden vergleichen zu können. Dafür wurde die UDP-Gal aus der Kristallstruktur einer GTB Chimäre (AABB, pdb: 2RJ7) verwendet, in der zum ersten Mal GTB mit dem Donorsubstrat kokristallisiert werden konnte. Die UDP-Gal wurde entsprechend am C-2 des Pyranoserings

modifiziert und zur UDP-GalNAc umgewandelt. In der Abbildung 14 ist UDP-GalNAc in der Bindungstasche von GTA dargestellt. Die nach Gleichung (G1-1) berechnete Bindungsenergie der UDP-GalNAc ist mit -55.18 kcal/mol deutlich niedriger als die der UDP-Gal (-47.97 kcal/mol, Tabelle 1 und Abbildung 15).

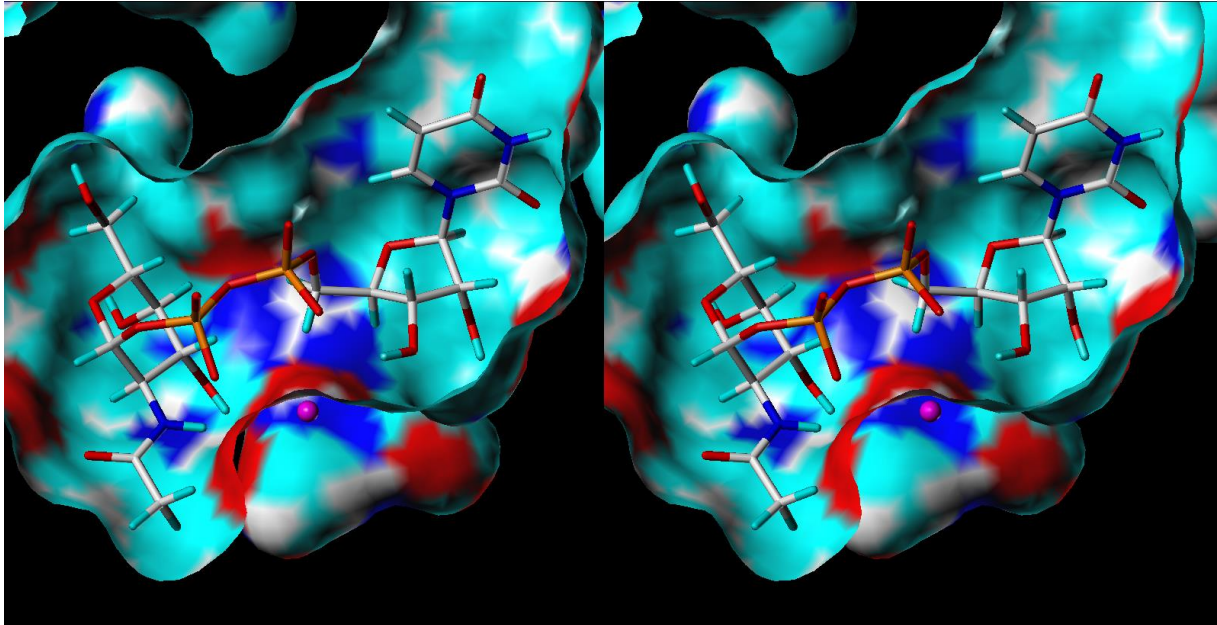


Abbildung 14: *Crossed-eye* Darstellung der UDP-GalNAc in der Bindungstasche von GTA. Die Bindungsaffinität ist hauptsächlich auf das Uracil zurückzuführen und die Ribose- und Diphosphateinheit verstärken zusätzlich die Bindung zum Enzym. Das bivalente Mn^{2+} -Ion (magenta-farbige Kugel) koordiniert die Diphosphateinheit. Die berechnete Bindungsenergie beträgt -55.18 kcal/mol. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff)

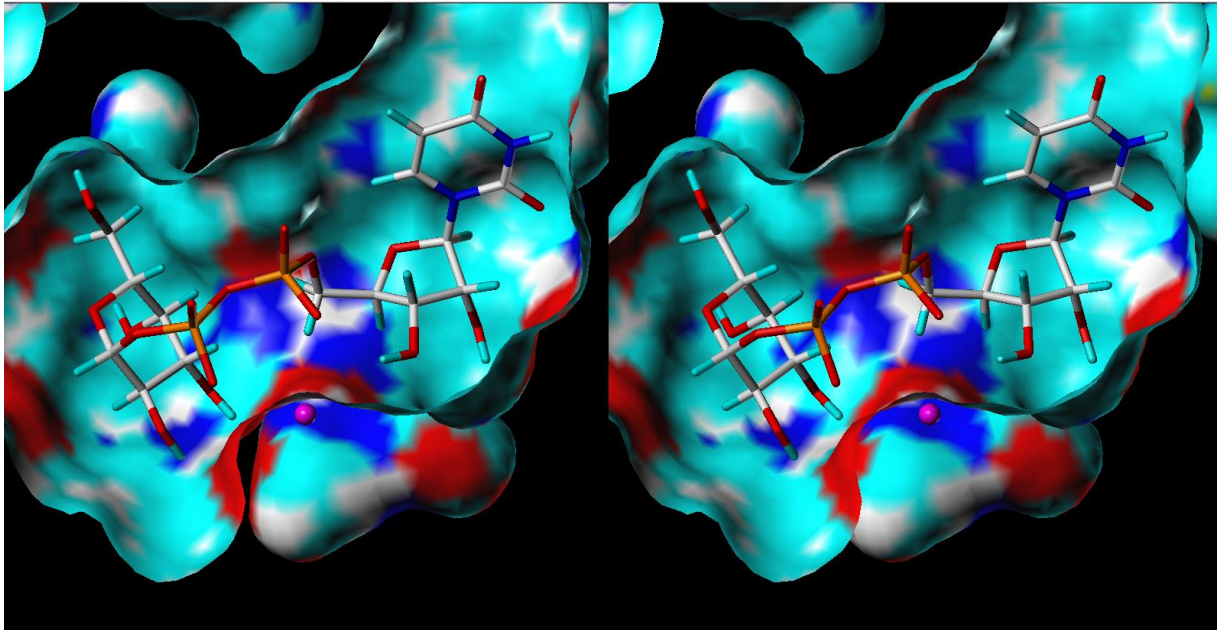


Abbildung 15: *Crossed-eye* Darstellung der UDP-Gal in der Bindungstasche von GTA. Die berechnete Bindungsenergie beträgt -47.97 kcal/mol und ist kleiner als die der UDP-GalNAc. Wegen der fehlenden *N*-Acetylgruppe kann UDP-Gal weniger Interaktionen an das Protein aufbauen, die für die Substraterkennung und enzymatische Aktivitäten notwendig sind.^[26] (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff)

Die Bindung von Ligand **12** und **13** in GTA wurden nun analysiert und ihre Orientierung in der Bindungstasche von GTA betrachtet. In beiden Fällen sind die Liganden in der Bindungstasche so positioniert, dass ihre Lage mit der des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc gut übereinstimmt (Abbildung 16 und Abbildung 17). Das Harnsäurefragment belegt den Teil der Bindungstasche, in der das Uracil des natürlichen Donorsubstrats einmal war. Der Pentityl-Linker, der das Harnsäurefragment mit dem Zuckerteil GalNAc verbindet, ist in der Lage den Ribose- und Pyrophosphatrest zu ersetzen und das bivalente Manganion zu koordinieren. Die Orientierung des Zuckerteils entspricht der des UDP-GalNAc. Zwischen den beiden Liganden **12** und **13** gibt es keinen großen Unterschied hinsichtlich ihrer Positionierung in der Bindungstasche von GTA. Ebenso sind die berechneten Bindungsenergien, die jeweils -44.49 kcal/mol und -43.42 kcal/mol beträgt (Tabelle 1). Um den Einfluss des Zuckerfragments auf die Spezifität zu überprüfen, wurden die Bindungsenergien der Liganden **10** und **11** in GTA ebenfalls berechnet, die statt *N*-Acetylgalactosyl- eine Galactosyleinheit enthalten. Wie erwartet besitzen die Liganden **10** und **11**, sowie UDP-Gal eine kleinere Bindungsaffinität gegenüber ihrem jeweiligen Gegenstück **12** bzw. **13** und UDP-GalNAc (Tabelle 1). Wegen der größeren Bindungstasche der GTA hat der Galactosylrest weniger Möglichkeiten, entsprechenden Interaktionen an das Protein aufzubauen, die für die Substraterkennung und enzymatische Aktivitäten notwendig sind.^[26]

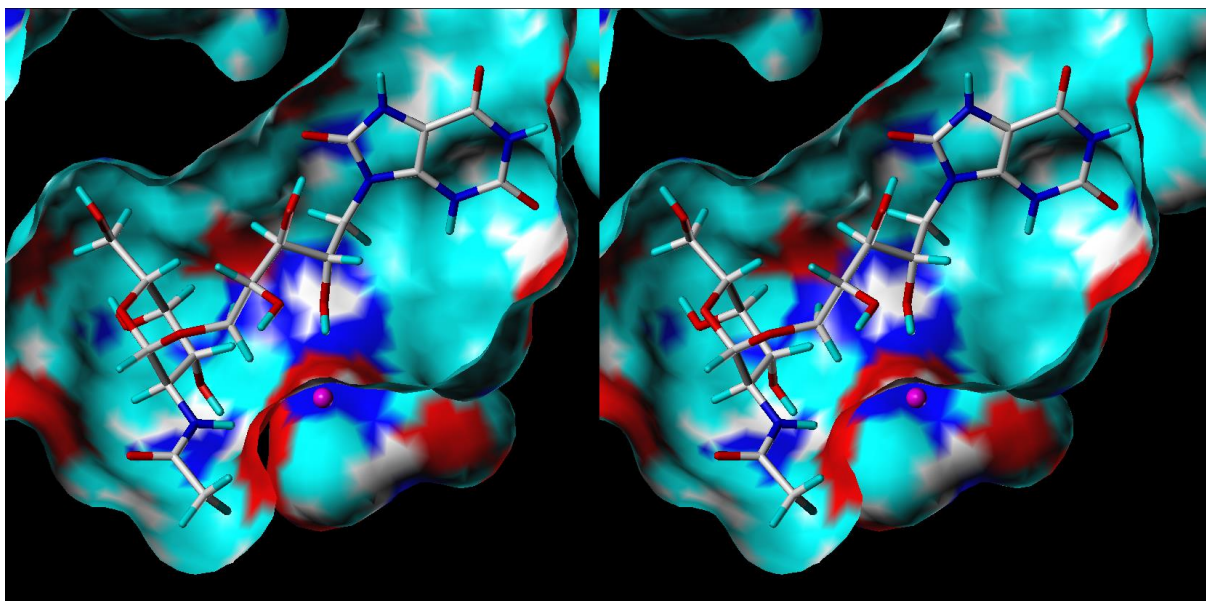


Abbildung 16: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **12** in der Bindungstasche von GTA. Die berechnete Bindungsenergie beträgt -44.49 kcal/mol. Der Ligand ist gut in der Bindungstasche positioniert und seine Lage entspricht gut mit dem natürlichen Substrat UDP-GalNAc überein. Die beiden Hydroxygruppen, die in einer 1,3-Transposition vorliegen, könnten in der Lage sein, das bivalente Mn^{2+} -Ion (magenta-farbige Kugel) zu koordinieren. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff)

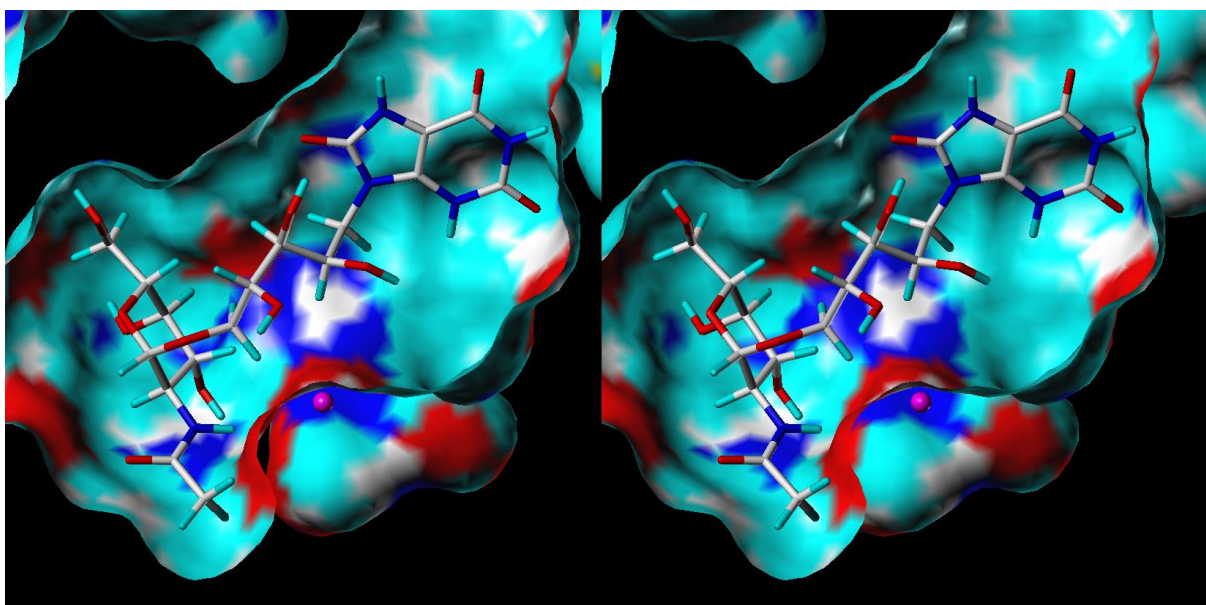


Abbildung 17: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **13** in der Bindungstasche von GTA. Zwischen der beiden Liganden **12** und **13** gibt es keinen großen Unterschied hinsichtlich ihrer Positionierung in der Bindungstasche von GTA. Die berechnete Bindungsenergie beträgt -43.42 kcal/mol. Durch die Existenz der energetisch ungünstigen 1,3-diaxiale Wechselwirkung verliert zwar **13** ein Teil seiner Bindungsenergie, wird jedoch vermutlich durch eine bessere Komplexierung des Mn^{2+} -Ion kompensiert. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff)

Betrachtet man den Pentityl-Linker, so erkennt man, dass die Hydroxygruppen bei **12** keine ungünstige 1,3-diaxiale Wechselwirkung vorliegt, während bei **13** diese vorhanden ist. Dies führt auch dazu, dass die beide Liganden unterschiedlich gut in der Lage sind, das Mn^{2+} -Ion zu komplexieren. Um eine bidentate Komplexierung an Mn^{2+} -Ion zu gewährleisten, müssen die beide Hydroxy-Gruppe eine 1,3-diaxiale Orientierung einnehmen, was zu einem Energieverlust führt. Die beiden Faktoren, die Komplexierung und die Konformation, arbeiten gegeneinander. Entweder hat der Ligand eine günstigere Konformation auf Kosten einer schlechteren Komplexierung wie bei **12**, oder der Ligand nimmt eine ungünstige Konformation ein zu Gunsten einer optimaleren Komplexierung, wie bei **13**. Welche der beiden Faktoren größeren Beitrag zu der Bindungsaffinität leisten konnte man vorerst nicht beurteilen, da die berechnete Bindungsenergie der beiden Liganden fast identisch ist.

Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber dem jeweiligen Gegenstück (in Klammern angegeben) [kcal/mol]
UDP-Gal	-47.974	-
UDP-GalNAc	-55.175	-7.201 (relativ zu UDP-Gal)
10	-37.751	-
11	-37.374	-
12	-44.493	-6.742 (relativ zu 10)
13	-43.422	-6.048 (relativ zu 11)

Tabelle 1: Die berechneten Bindungsenergien der Liganden in GTA und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum ihren jeweiligen Gegenstück zusammengefasst. Man kann erkennen, dass die Liganden mit dem Galactosyleinheit geringere Bindungsenergie besitzen, als die Liganden mit dem *N*-Acetylgalactosyl-Fragment. Zwischen den Epimeren ist jeweils kein signifikanter Energieunterschied zu erkennen.

Zum Vergleich, wie die Liganden gegenüber GTB binden, wurden auch *in silico* Bindungsstudien mit GTB durchgeführt. Hierfür wurde die von Alfaro *et al.* in 2008 publizierte Kristallstruktur der humanen GTB verwendet (pdb: 2RJ8), welche mit UDP, H-Antigen-Akzeptoranalogen Octyl-2-*O*-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-galactopyranosid und Mn^{2+} cokrystallisiert wurde. Durch ein Homologiemodelling wurden die nicht aufgelöste Bereiche

ergänzt und das Enzym wie bei GTA vorbereitet und minimiert. Die berechneten Bindungsenergien sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber dem jeweiligen Gegenstück [kcal/mol]
UDP-Gal	-54.633	-
UDP-GalNAc	-60.779	-6.146 (relativ zu UDP-Gal)
10	-39.666	-
11	-39.844	-
12	-42.497	-2.831 (relativ zu 10)
13	-42.844	-3.000 (relativ zu 11)

Tabelle 2: Die berechnete Bindungsenergie der Liganden in GTB und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum ihren jeweiligen Gegenstück auf einer Blick dargestellt. Die berechneten Energiewerte sind relativ ähnlich im Vergleich zu den Werten im Tabelle 1. Die Energiedifferenz zwischen den jeweiligen Gegenstücken ist zwar jeweils kleiner als bei GTA, trotzdem besitzen die Liganden mit dem Galactosylrest (UDP-Gal, **10** und **11**) schlechtere Bindungsaffinitäten als die Liganden mit dem *N*-Acetylgalactosylrest (UDP-GalNAc, **12** und **13**) gegenüber GTB, was nicht der Realität entsprechen kann.

Die Werte sind allgemein relativ ähnlich im Vergleich zu den im GTA berechneten Bindungsenergien. Die Energiedifferenz zwischen den jeweiligen Gegenstücken ist jeweils kleiner als bei GTA. Überraschenderweise weisen die Liganden mit dem *N*-Acetylgalactosylrest (UDP-GalNAc, **12** und **13**) leicht höhere Bindungsaffinitäten auf, was bedeuten würde, dass sie etwas besser an GTB binden könnten, als ihre jeweiligen Gegenstücke mit dem Galactosylrest (UDP-Gal, **10** und **11**). Betrachtet man genau UDP-GalNAc in der Bindungstasche von GTB nach der Minimierung, dann kann man erkennen, dass die Methylgruppe des Met 266 infolge der Minimierung zur Seite geschoben wurde, so dass die Bindungstasche leicht geweitet wird und der *N*-Acetylgalactosylrest in diesem Fall in der Bindungstasche von GTB hineinpassen kann (Abbildung 18). Entsprechend wird diese Verschiebung auch bei Ligand **12** und **13** in GTB beobachtet. Ob dieses Verhalten die Realität entspricht, in der die kleinere Bindungstasche der GTB mit den sterisch anspruchsvollen Met 266 und Ala 268 eine Bindung der UDP-GalNAc ausschließt^[26], ist sehr unwahrscheinlich. Es muss beachtet werden, dass das Akzeptorsubstrat und anderen Faktoren (z.B. Wasser), die *in vivo* vorhanden sind, nicht bei der Berechnung berücksichtigt wurden, was zur falschen Ergebnisse führen kann. Aminosäureseitenkette könne verschoben werden, was *in vitro*

nicht stattfindet, weil bestimmte Wechselwirkungen *in silico* fehlen. Außerdem wurden die *in silico* Analysen in der geschlossenen Form von GTB durchgeführt. Diese Form wird nur erreicht, wenn das Enzym bereits Donor- und Akzeptorsubstrat gebunden hat. Die Bindung des sterisch anspruchsvollen UDP-GalNac an GTB wird bereits in der offenen Form wegen der kleineren Bindungstasche der GTB ausgeschlossen. Um die Spezifität des Liganden zu simulieren, könnte deshalb die *in silico* Analysen mit der offenen Form der GTB durchgeführt werden und noch andere weitere Faktoren in Betracht gezogen werden. Die bisher durchgeführte Berechnungsmethode ist jedoch vorerst ausreichen, um den Erfolg der Liganden zu beurteilen.

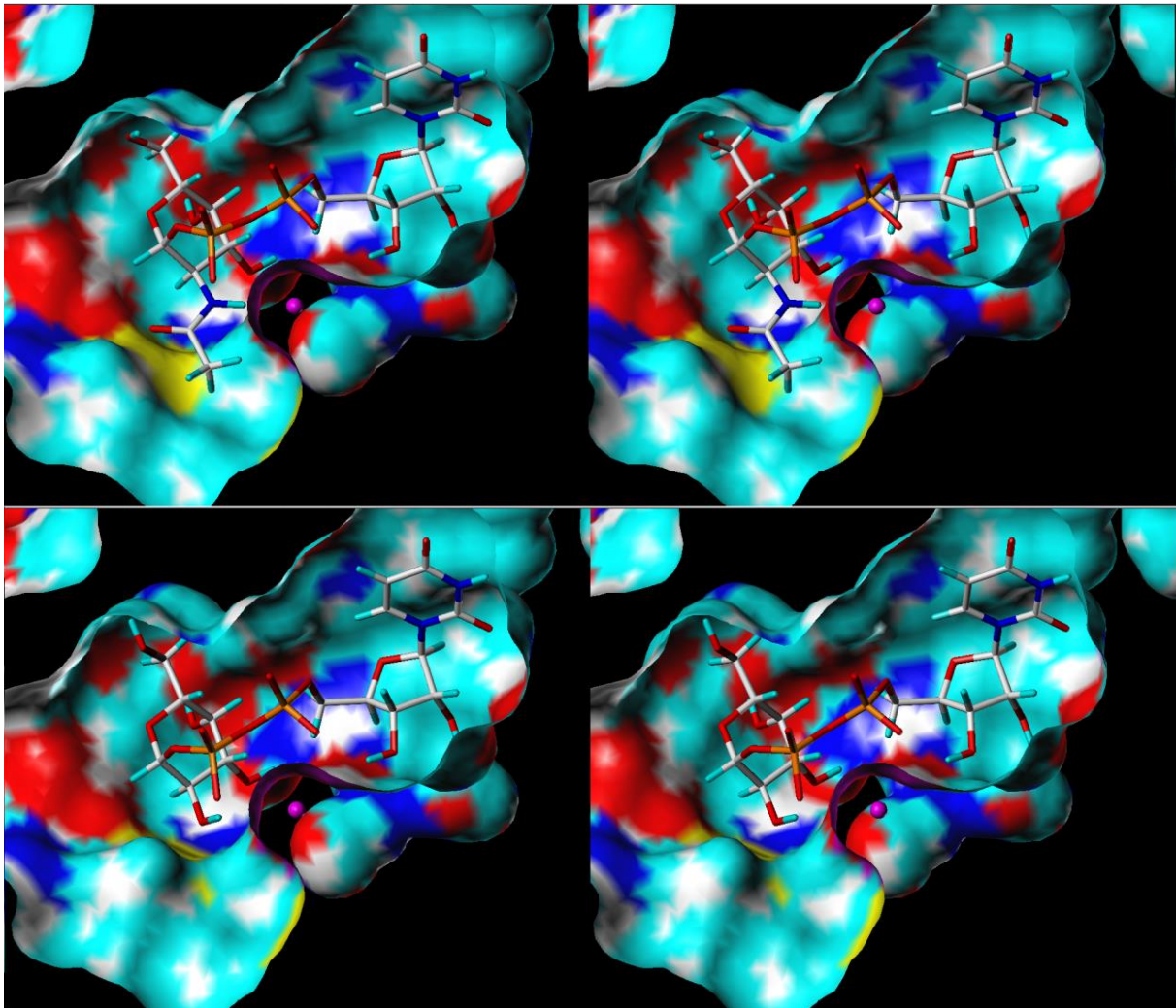


Abbildung 18: *Crossed-eye* Darstellung der UDP-GalNac (oben) und UDP-Gal (unten) in der Bindungstasche von GTB nach der Minimierung. Vergleichen Sie die beiden Abbildungen, um bei UDP-GalNac zu erkennen, dass die Methylgruppe des Met-266 (die hellblaue Wölbung links neben der *N*-Acetylgruppe) etwas zur linken Seite verschoben wird, so dass die Bindungstasche leicht geweitet wird. In der Realität sollte diese Methylgruppe eine Bindung der UDP-GalNac in der Bindungstasche von GTB durch sterische Hinderung verhindern.^[26] (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

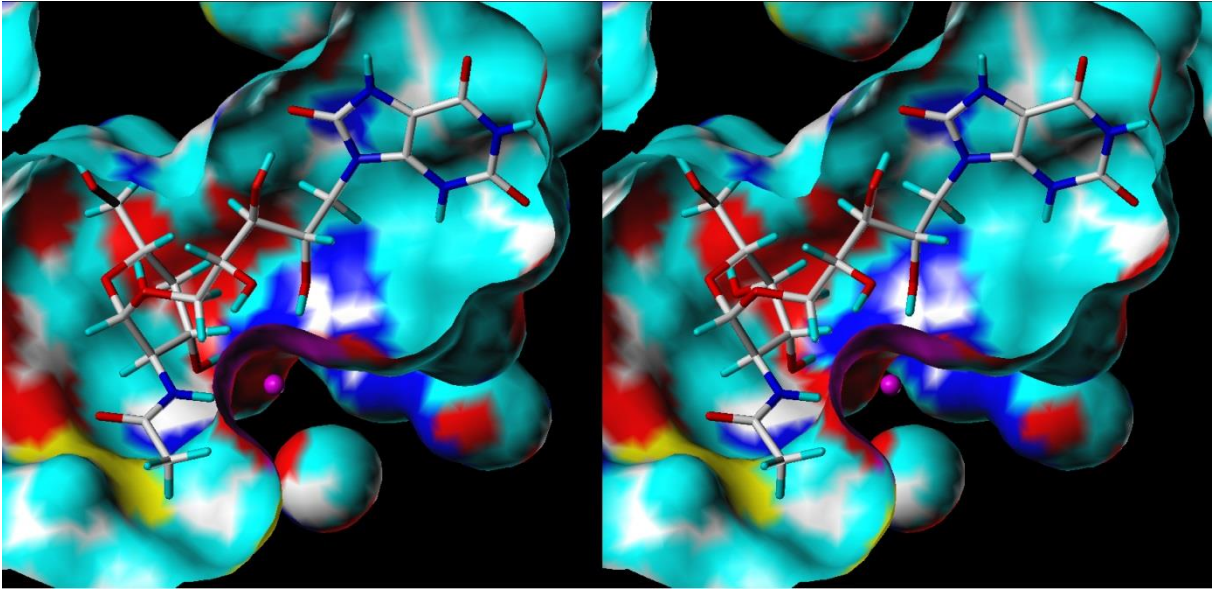


Abbildung 19: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **12** in der Bindungstasche von GTB nach der Minimierung. Wie bei UDP-GalNAc wird auch hier die Methylgruppe des Met-266 (die hellblaue Wölbung links neben der *N*-Acetylgruppe) etwas zur linken Seite verschoben, so dass die Methylgruppe der Acetylgruppen in diesem Teil der Bindungstasche hineinpasst. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

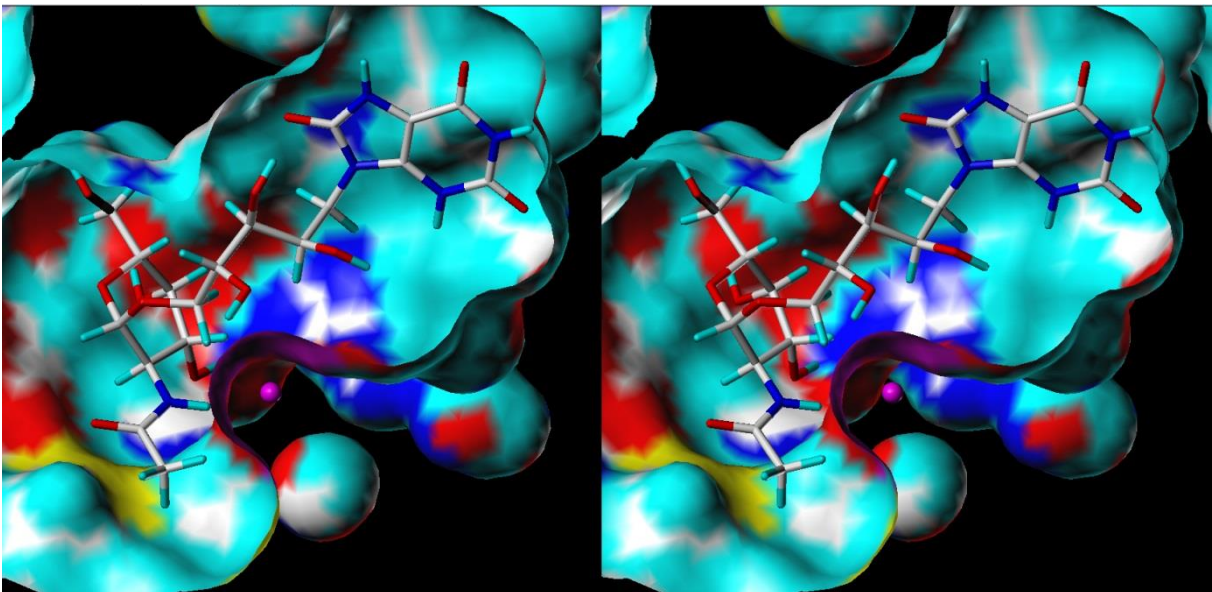


Abbildung 20: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **13** in der Bindungstasche von GTB nach der Minimierung. Hier wird ebenfalls die Methylgruppe des Met-266 (die hellblaue Wölbung links neben der *N*-Acetylgruppe) etwas zur linken Seite verschoben, so dass die Methylgruppe der Acetylgruppen in diesem Teil der Bindungstasche hineinpasst. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des *molecular modelling*, dass die Liganden **12** und **13** mögliche Kandidaten für einen GTA Inhibitor darstellen. Die Liganden positionieren sich gut in der Bindungstasche von GTA und nutzen die freien Räume der Bindungstasche effektiv aus. Obwohl ihre berechneten Bindungsenergien noch nicht dem natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc nahe kommen, entsprechen sie jedoch denen von Ligand **11** in GTB, der erfolgreich synthetisiert und getestet wurde, und als einen bewährten spezifischen nicht-ionischen Inhibitor für GTB darstellt.^[40] Es konnte mittels *in silico* Berechnungen keine Aussage getroffen werden, welches Epimer der bessere Ligand ist. Deshalb werden die beiden Moleküle synthetisiert und mit Hilfe von NMR-basierten Enzymassays bezüglich ihrer Bindungseigenschaften und ihres inhibitorischen Potentials untersucht.

5.1.2 Synthese

Für die Synthese der Liganden **12** und **13** soll eine allgemeine Syntheseroute gefunden werden, die gleichzeitig auf beiden Moleküle anwendbar ist. Allgemein können die Liganden in drei Fragmente aufgeteilt werden: die Harnsäure, der Pentityl-Linker und der Zucker, die mit geeignetem Syntheseweg gekoppelt werden sollen (Abbildung 21). Dabei muss die korrekte Konfiguration des *N*-Acetylgalactosylrestes und des Pentityl-Linkers berücksichtigt werden. Bei dem Harnsäure-Fragment handelt es sich um ein 9-*N*-alkyliertes Harnsäurederivat. Dieses kann nicht durch eine direkte Alkylierung an *N*-9 der Harnsäure erhalten werden, da eine solche Alkylierung nicht regioselektiv verläuft. Stattdessen muss das Harnsäuregerüst aus entsprechenden Pyrimidinderivaten aufgebaut werden, wie Joachim Albers zuvor in seiner Diplomarbeit vorgeschlagen hat.^[45] Dazu bedarf es zuerst des entsprechenden Amin zu synthetisieren, das dann mit einem Uracilderivat gekoppelt wird. Der anellierte Fünfring wird anschließend aufgebaut.

Das Zucker-Pentityl-Linker-Teil kann aus dem entsprechenden Disaccharid mit den korrekten Konfigurationen umgewandelt werden. Dafür wird zuerst das Disaccharid durch eine Glycosylierung zweier orthogonal geschützter Monosaccharide (*N*-Acetylgalactose und *D*-Ribose, bzw. *D*-Arabinose) synthetisiert. Dabei soll das Disaccharid α -1,5 verknüpft werden. Dieses Disaccharid wird dann zu *N*-Acetylgalactose-Ribityl- bzw. *N*-Acetylgalactose-Arabinityl-Amin umgesetzt, das dann für das Aufbauen des Harnstoffgerüsts zur Verfügung steht.

Aufgrund der benachbarten *N*-Acetylgruppe steht die Glycosylierung mit *N*-Acetylgalactosamin in Konkurrenz zur intramolekularen Oxazolin-Bildung. Daher kann die Synthese des Disaccharids nicht nach dem klassischen Trichloracetimidat-Verfahren erfolgen.^[49, 50] Stattdessen muss ein anderer Glycosyldonor (z.B. *N*-geschützte

Zuckerderivate wie *N*-Phthaloyl, *N*-Trichlorethoxycarbonyl und *N*-Allyloxycarbonyl verwendet werden, die nach der Glycosylierung die Umwandlung zur *N*-Acetylgruppe gewährleisten können. Solche *N*-geschützte Zuckerderivate lassen sich zwar aus *D*-Galactosamin darstellen, es ist aber kostspielig. Eine kostensparende Alternative ist die Verwendung vom Azidzucker als Glycosyldonor. Dieser lässt sich mit einer Azidonitrierung nach *R. Lemieux* ^[51] darstellen und die Azidgruppe kann nach der Glycosylierung zum Amin reduziert und anschließend acetyliert werden. Für die vorliegende Arbeit wird als Glycosyldonor das *O*-acetyl-geschützte 2-Azid-2-desoxy-galactose-trichloracetimidat verwendet, das sich über mehrere Stufen aus *D*-Galactose darstellen lässt.

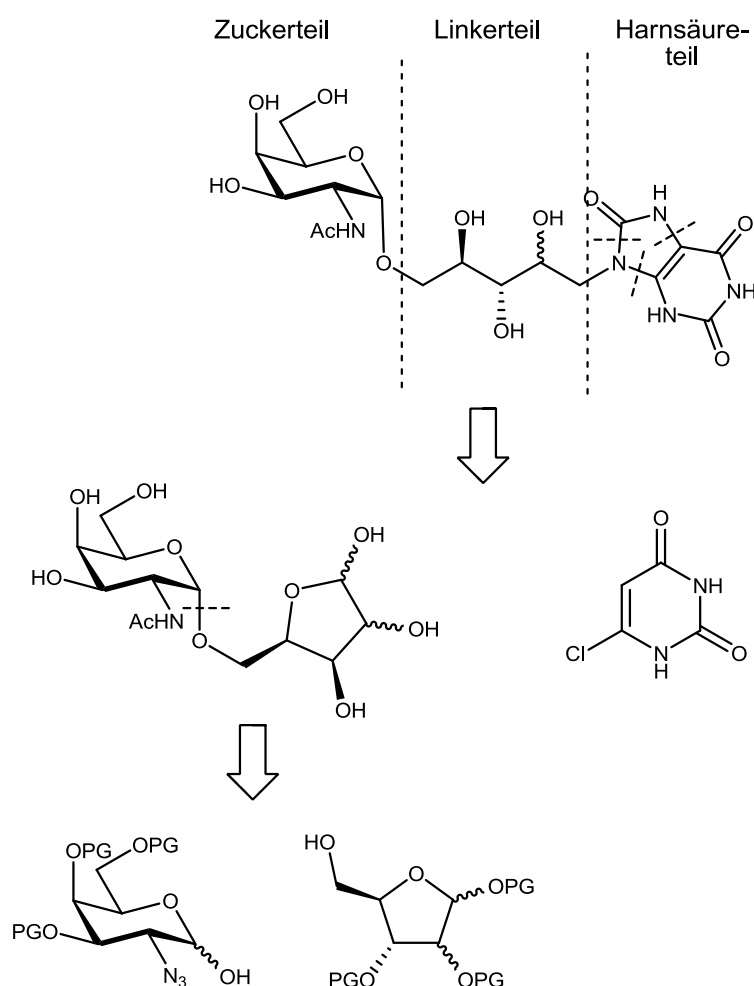


Abbildung 21: Retrosynthetische Analyse des UDP-GalNAc Mimetikums. Die Liganden **12** und **13** können durch die Verknüpfung von Zuckerfragment, Linker und Harnsäure synthetisiert werden. Das Zucker-Linker-Fragment lässt sich aus dem entsprechenden Disaccharid, das durch die Glycosylierung von *D*-Ribose bzw. *D*-Arabinose und Azidzucker synthetisiert wird, darstellen. Die Harnsäure kann nicht direkt für eine Kopplung verwendet werden, sondern wird sie nach der Verknüpfung des Zucker-Linker-Fragments an 6-Chloruracil und die Einführung eines weiteren Stickstoffatoms am Uracil anschließend aufgebaut.

Die vorliegende Synthese sieht also vor, das entsprechende Disaccharid zu synthetisieren, dieses zum Amin umzuwandeln und danach mit einem Uracilderivat zu koppeln, um anschließend 9-*N*-alkylierten Harnsäurederivat zu erhalten. Durch diese Synthesestrategie würde man nicht nur in der Lage sein, Liganden **12** und **13** zu synthetisieren, sondern auch eine Reihe von Molekülen mit dem gleichen Leitstrukturmotiv, die sich nur um das Zuckerfragment unterscheiden und als potentieller Inhibitor für GTs anderer Klassen dienen können.

Der folgende Teil wird zuerst die Synthese des Liganden **12** (9-(5-*O*-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion) und danach die des Ligand **13** (9-(5-*O*-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion) vorgestellt.

5.1.2.1 Synthese der 9-(5-*O*-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**12**)

Für die Synthese von Ligand **12** wurde zuerst der Glycosyldonor-Baustein dargestellt. Dabei handelt es sich um das *O*-acetyl-geschützte 2-Azid-2-desoxy-galactose-trichloracetimidat (**21**). Die Synthese startete mit der Darstellung des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**15**), das nach einer Substitution der anomeren Acetatgruppe des Galactosepentaacetats durch Brom und die nachfolgende reduktive Eliminierung über zwei Stufen synthetisiert wurde.^[52, 53] Dafür wurde D-Galactosepentaacetat (**14**) in einer Lösung von HBr in Essigsäure (33 %) für 3 h bei 18 °C gerührt und danach mit Zinkpulver, Kupfersulfat und Natriumacetat bei -5 °C zum **15** überführt. Das Glycal wurde dann nach Lemieux *et al.* azidonitriert.^[51] Für die Azidonitrierung wurde **15** mit Cer(IV)-ammoniumnitrat (CAN) und Natriumazid bei -25 °C in Acetonitril für 92 h gerührt. Es entstand dabei einer Azid-Nitrat-Zucker Gemisch aus alpha, beta (**16**) und talo-Isomer (**17**) in einem Verhältnis von 1 : 0.9 : 0.2, die ohne Trennung weiter umgesetzt wurde. Laut Literatur entsteht zusätzlich ein Acetamido-Nebenprodukt **18**, das hier jedoch nicht weiter isoliert wurde. Um den Glycosyldonor **21** zu erhalten, wurde das isomere Gemisch zuerst zu dem Azid-Zucker **19** (als einem anomeren Gemisch mit einem α / β -Verhältnis von 1 : 0.6) denitriert und anschließend durch die Umsetzung mit Trichloracetonitril in das Trichloracetimidat **21** überführt, das nach der säulenchromatographischen Reinigung mit einer Ausbeute von 88 % als ein Anomeren-Gemisch mit einem α / β -Verhältnis von 0.6 : 1 erhalten wurde.^[49] Eine Trennung des Gemisches ist säulenchromatographisch mit PE : EE (2 : 1) als Laufmittel möglich, war in diesem Fall nicht notwendig. Der Grund dafür wird nachfolgend erläutert werden. Als Nebenprodukt entstand ebenfalls das Trichloracetimidat des Talo-Isomers **22**, das durch die säulenchromatographische Reinigung entfernt werden konnte.

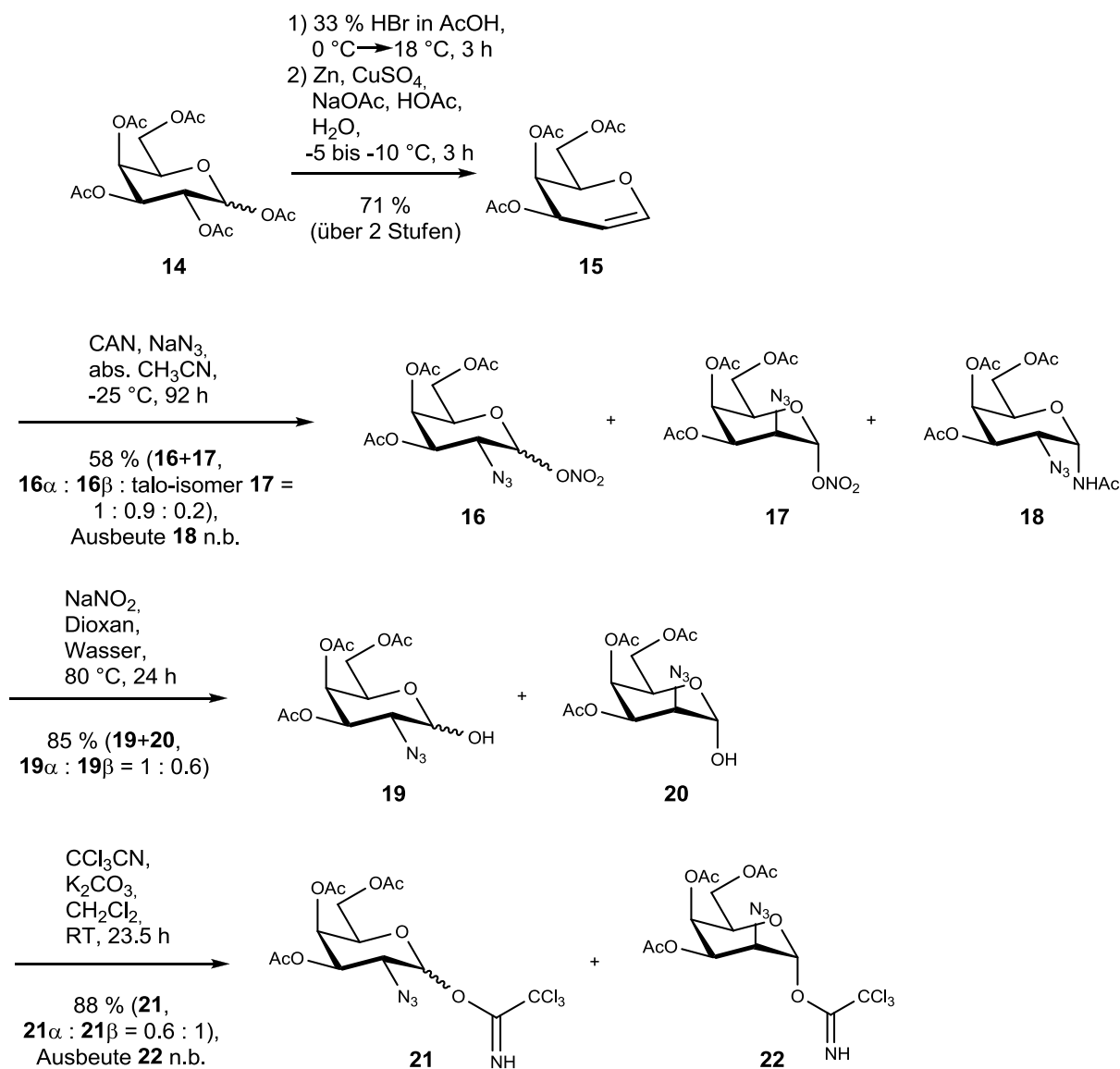


Abbildung 22: Synthese nach Glycosyldonors *O*-(2-Azido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-trichloro-acetimidat (**21**). Galactosepentaacetat (**14**) wurde zuerst über Acetobromgalactose zum 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**15**) überführt, das danach azidonitriert wurde. Das entstandene Gemisch aus alpha, beta (**16**) und talo-Isomer **17** in einem Verhältnis von 1 : 0.9 : 0.2 wurden dann zu **19** denitriert und anschließend durch die Umsetzung mit Trichloracetonitril in das Trichloracetimidat **21** überführt, das aus einem anomeren Gemisch mit einem α / β-Verhältnis von 0.6 : 1 besteht.^[49, 51-53]

Für die Synthese des für die Glycosylierung benötigten Glycosylakzeptors **26** wurde zunächst *D*-Ribose (**23**) entsprechend geschützt, so dass die Glycosylierung nur am C-5 erfolgen kann. Die Hydroxy-Gruppe am C-2 und C-3 wurde durch Acetyl und die anomere OH-Gruppe durch 4-Pentenyl-Reste (Pent) geschützt. Ursprünglich war nur das Schützen des anomeren Zentrums geplant und es wurde angenommen, dass nur die aktivere primäre OH-Gruppe an die Glycosylierung eingehen würde, nicht aber die beide sekundäre OH-Gruppen. Nach dem Versuch wurde jedoch auch mehrfach glycosyliertes Produkt erhalten und folglich muss die

sekundäre OH-Gruppe ebenfalls geschützt werden. Dazu wurde D-Ribose (**23**) nach einer Fischer-Glycosylierung mit 4-Penten-1-ol und Camphersulfonsäure (CSA) am anomeren O-Atom bei Raumtemperatur mit Pentenyl geschützt.^[54] Dabei wurde ein anomeres Gemisch mit einer α/β Verhältnis von 0.3 : 1 erhalten. Die primäre OH-Gruppe des n-Pentenyl-Glycosids **24** wurde zunächst mit einer Trityl-Gruppe geschützt und die sekundären OH-Gruppen wurden zu **25** acetyliert.^[55] Die Trityl-Gruppe von **25** wurde dann in der nachfolgenden Reaktion mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ abgespalten und die für die Glycosylierung benötigte primäre OH-Gruppe freigesetzt.^[56] Das β -Anomer des Glycosylakzeptors konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 41 % erhalten werden (Abbildung 23).

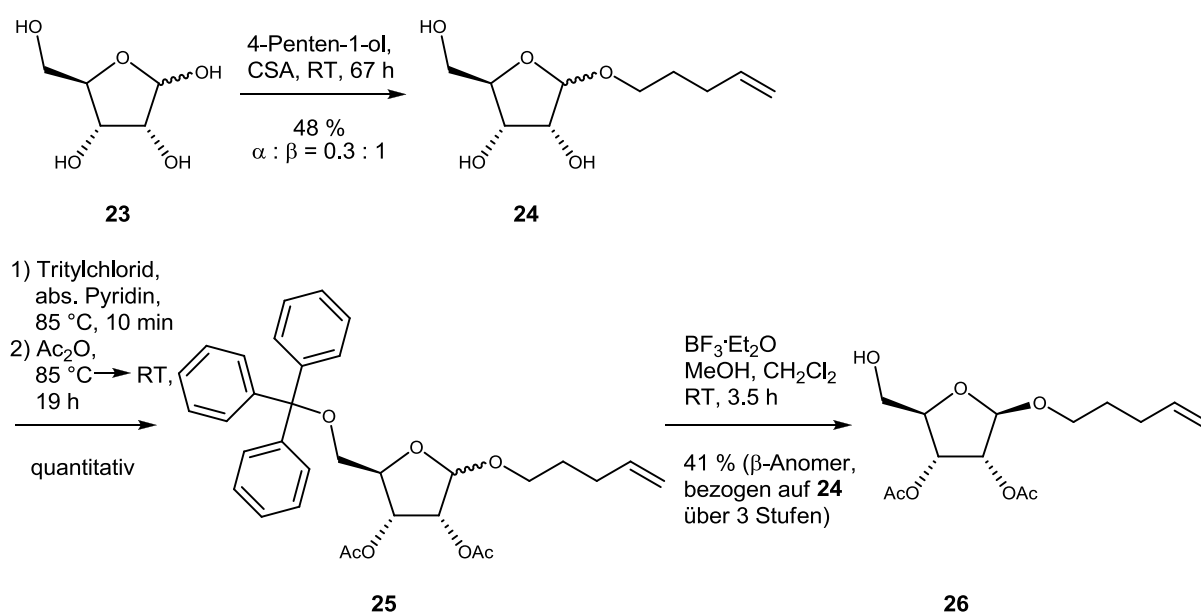


Abbildung 23: Synthese des Glycosylakzeptors 4-Pentenyl-2,3-di-O-acetyl- α/β -D-ribofuranosid (**26**). D-Ribose wurde am anomeren Zentrum durch eine 4-Pentenyl-Schutzgruppe geschützt und die primäre Hydroxygruppe trityliert. Nach Acetylierung der sekundären Hydroxygruppe wurde die Tritylgruppe abgespalten und die für die Glycosylierung benötigte primäre OH-Gruppe freigesetzt.^[54-56]

Die Glycosylierung erfolgt nach Trichloracetimidat-Methode von Grundler und Schmidt.^[49] Glycosiddonor **21** und -akzeptor **26** wurden in abs. Dichlormethan gelöst und mit TMSOTf als Katalysator bei RT gerührt. Es entstand ein Anomeren-Gemisch aus α - und β -1,5-Glycosid **27**. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Reaktion jeweils mit kleineren Testansätze bei verschiedenen Temperaturen mit jeweils dem α - oder β -Imidat durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 dargestellt. Allgemein wurde das thermodynamisch stabilere α -Glycosid in größerem Verhältnis erhalten. Eine höhere Reaktionstemperatur begünstigte die Bildung von α -Glycosid und es gab keinen deutlichen Unterschied in der Stereoselektivität zwischen dem Einsatz von α - und β -Imidat als Glycosiddonor bei gleicher Reaktionstemperatur. Folglich konnte das Imidat auch als anomeres Gemisch für die

Glycosylierung eingesetzt werden und eine säulenchromatographische Trennung der Anomere konnte bei der Synthese von **21** erspart werden. Mit diesen Versuchsergebnissen konnte man vermuten, dass die Reaktion mit der gegebenen Bedingungen und Reagenzien über ein S_N1 Mechanismus verläuft, so dass die Bildung der glycosidischen Bindung über eine Oxocarbenium-Zwischenstufe verläuft.

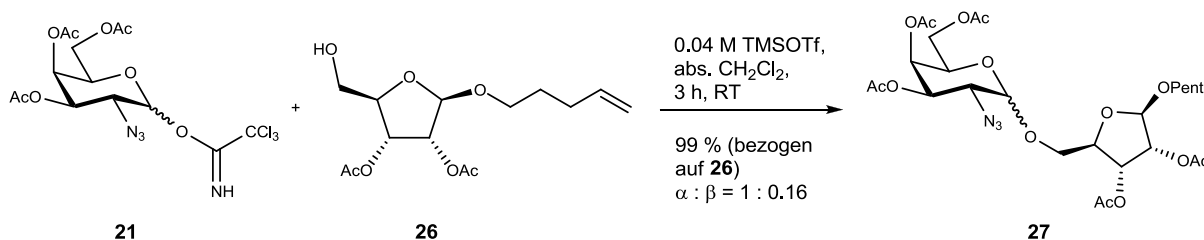


Abbildung 24: Glycosylierungsreaktion von **21** und **26** nach Trichloracetimidat-Methode von Grundler und Schmidt.^[49] Als Katalysator wurde TMSOTf verwendet und das Reaktionsgemisch bei verschiedener Temperatur (Tabelle 3) in abs. Dichlormethan für 3 h gerührt.

Imidat	Reaktionstemperatur	Reaktionszeit	α - β -Verhältnis
β	-20 °C	2 h	1 : 0.22
β	Raumtemperatur	2 h	1 : 0.13
α	-20°C	2 h	1 : 0.27
α	Raumtemperatur	2.5 h	1 : 0.08

Tabelle 3: Die jeweils eingesetzten Trichloracetimidat-Glycosyldonor und die durchgeführten Reaktionstemperaturen bei den Testansätzen der Glycosylierungsreaktion von Abbildung 24 in einem Überblick. Das erwünschte, thermodynamisch stabilere α -Glycosid wurde bei allen Versuchen in größerem Verhältnis erhalten. Es gab keinen deutlichen Unterschied in der Stereoselektivität zwischen dem Einsatz von α - und β -Imidat als Glycosiddonor bei gleicher Reaktionstemperatur. Eine höhere Reaktionstemperatur begünstigte die Bildung von α -Glycosid.

Die Glycosylierung wurde anschließend mit einem größeren Ansatz bei Raumtemperatur für 3 h mit dem Einsatz von α / β -Glycosyl-trichloracetimidat-gemisch von **21** durchgeführt. Das Disaccharid **27** konnte mit einer Ausbeute von 99% (bezogen auf **26**) mit einem α / β -Verhältnis von 1 : 0.16 erhalten werden und wurde ohne eine Trennung der Anomeren in der nächsten Stufe weiter eingesetzt (Abbildung 24).

Die Azidgruppe des Disaccharids **27** wurde in der nächsten Synthesestufe zu der gewünschten *N*-Acetylgruppe umgewandelt, indem sie mit Hilfe von Zink und Ammoniumchlorid zuerst zur Aminogruppe reduziert und danach acetyliert wurde.^[57, 58] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das reine α -1,5-Disaccharid **28** mit einer Ausbeute von 64 % bezogen auf **27** erhalten werden. Bevor dieses zu dem Oxim **31** umgesetzt wurde, wurden zuerst die Schutzgruppen entfernt. Dazu wurde zuerst die OH-Gruppe des anomeren Zentrums mit NBS von dem *n*-Pentenyl befreit. Im Gegensatz zur Literaturvorschrift, die als Lösungsmittel 1%ige wasserhaltiges Acetonitril verwendet,^[59] wurde die Reaktion unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt, da durch die Anwesenheit von Wasser das Bromhydrin als Nebenprodukt entstehen kann (Abbildung 25). Die restliche OH-Gruppe wurde nach Zemplén mit frisch hergestellter Natriummethanolat-Lösung deacetyliert (Abbildung 26).^[60]

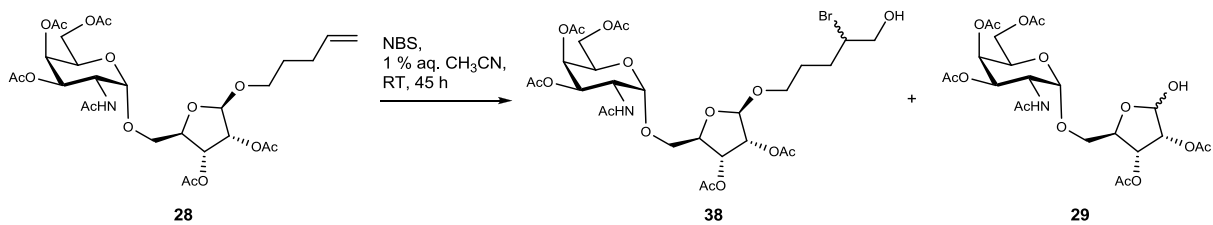


Abbildung 25: Abspaltung der 4-Pentenyl-Gruppe mit NBS und wasserhaltigem Acetonitril. Enthält das Lösungsmittel Acetonitril Wasser, so entsteht neben dem gewünschten Produkt **29** zusätzlich das Bromhydrin **38**. Daher soll diese Reaktion unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt werden.^[59]

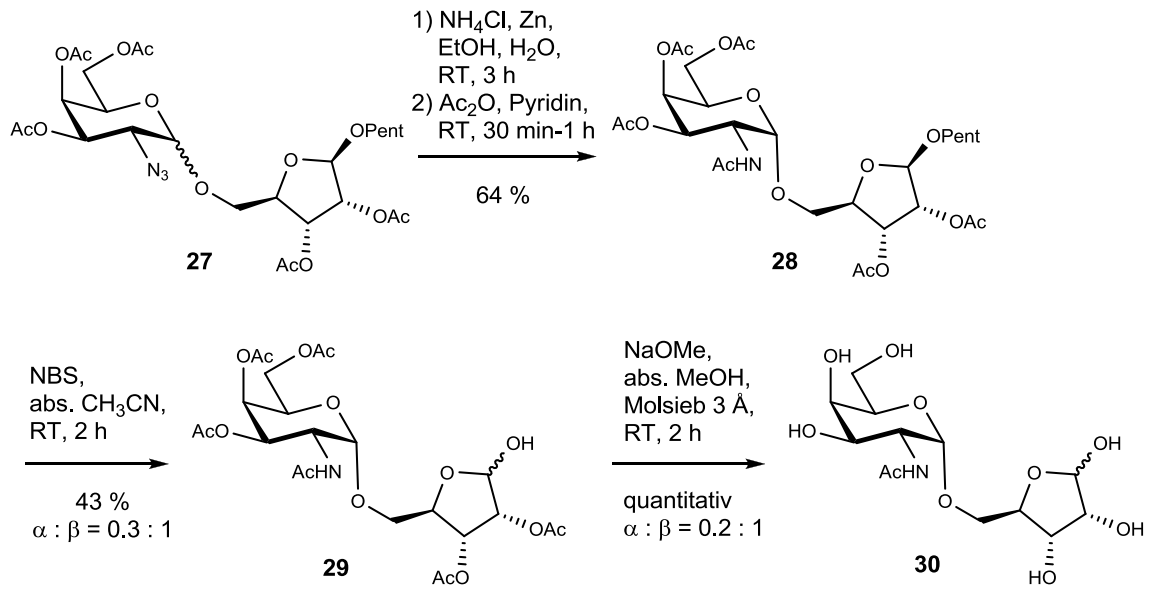


Abbildung 26: Synthese des Disaccharids **30**. Die Azidgruppe des geschützten Disaccharids **27** wurde mit Hilfe von Zink und Ammoniumchlorid zu Aminogruppe reduziert und dann acetyliert.^[57, 58] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das reine α -1,6-Disaccharid **28** erhalten werden. Die Schutzgruppen wurden über 2 Stufen, zuerst die Pentenylgruppe mit NBS unter wasserfreien Bedingungen und anschließend die Acetylgruppen nach Zemplén, abgespalten.^[59, 60]

Das Oxim **31** konnte dann aus dem entschützten Disaccharid **30** und Hydroxylamin, das aus dessen Hydrochlorid und Natriumethanolat frisch hergestellt wurde, erhalten werden.^[61] Es entstand ein Oxim Gemisch aus *E*- und *Z*-Isomer mit einem Verhältnis von 1 : 0.25, das durch eine Hydrierung zu dem Amin **32** weiter umgesetzt wurde (Abbildung 27).^[40]

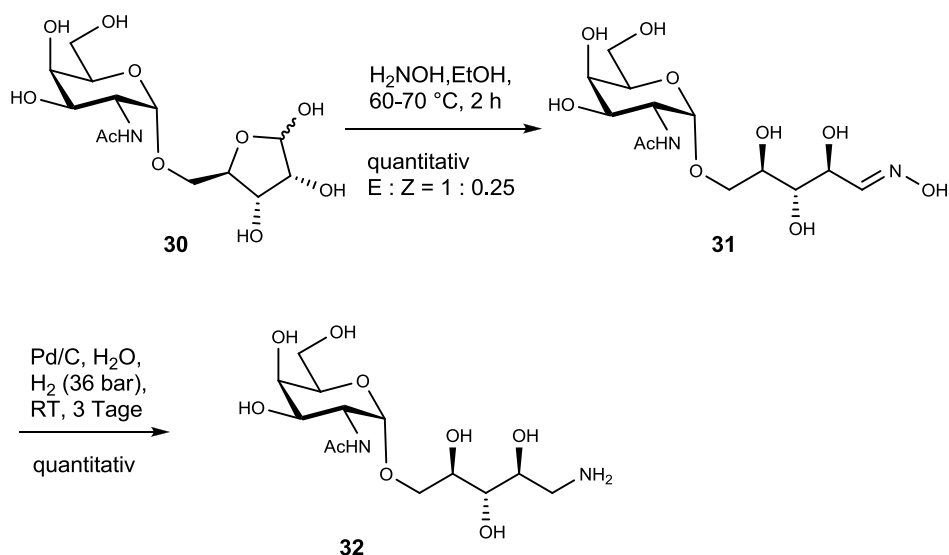


Abbildung 27: Synthese von 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribitylamin (**32**). Das Disaccharid **30** wurde zu dem entsprechenden Oxim **31** umgesetzt, das als ein *E*- und *Z*-isomeres Gemisch mit einem Verhältnis von 1 : 0.25 vorliegt. Danach wurde **31** durch eine Hydrierung in das Amin **32** überführt.^[40, 61]

Um das Gerüst des Harnsäure-Derivates aufzubauen, wurde zuerst das Amin **32** an einem 5-Nitrouracil gekoppelt. Dazu wurde das benötigte 6-Chlor-5-nitrouracil **35** durch die Nitrierung von 6-Chloruracil **34**, das aus 2,4,6-Trichlorpyridin **33** nach Cresswell *et al.* erhalten wurde, dargestellt.^[62, 63] Nach der Kopplung von **32** und **35** zu **36** wurde es mit Hilfe von Pd/C und H_2 zu dem reaktiven Diamin von **36** reduziert. Das Diamin **36** sollte anschließend unter Verwendung von Diphosgen, DIPEA und abs. Ethanol als Lösungsmittel bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ in das gewünschte Endprodukt **12** überführt werden. Die Reaktionstemperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ sollte die Reaktion zwischen Diphosgen und Ethanol, die zu Ethylchlorformiat reagieren, unterdrücken, so dass das Diphosgen bei Zutropfen nicht mit dem Lösungsmittel reagiert und solange noch in der Lösung verbleibt, um mit den beiden Aminogruppen am Uracil eine Reaktion eingehen kann. Es stellte jedoch heraus, dass trotz dem tiefen Temperatur eine Bildung von Ethylchlorformiat aus Diphosgen und Ethanol nicht weitgehend verhindern werden konnte und es entstand ausschließlich das Carbamat **37**. Ein alternatives Lösungsmittel konnte nicht eingesetzt werden, da das Diamin von **36** nur im Alkohol und Wasser löslich war. Das Carbamat **37** konnte jedoch anschließend mit einer 0.03 M Natriumethanolat-Lösung unter Rückfluß zum gewünschten Harnsäurederivat **12** mit einer Ausbeute von 26 % umgesetzt werden (Abbildung 28).^[39, 40, 64, 65]

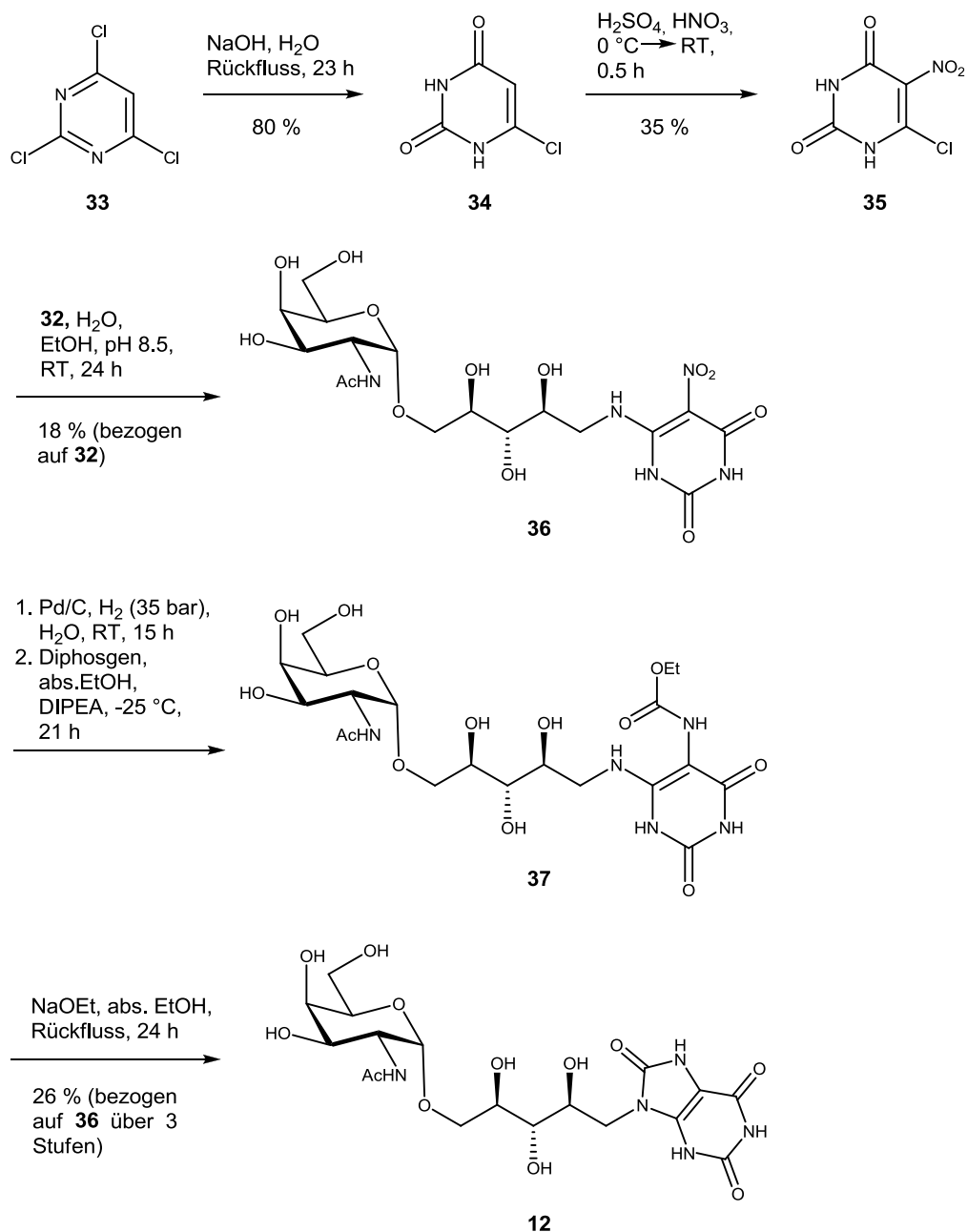


Abbildung 28: Synthese der Mimetikum **12**. Das Amin **32** wurde mit 6-Chlor-5-Nitrouracil **35**, das aus 2,4,6-Trichlorpyridin (**33**) nach Cresswell *et al.* über zwei Stufen erhalten wurde, gekoppelt.^[62, 63] Das erhaltene Nitroaminouracilderivat **36** wurde mit Hilfe von Pd/C und H₂ zu dem reaktiven Diamin reduziert, das anschließend unter Verwendung von Diphosgen, DIPEA und abs. Ethanol als Lösungsmittel bei -25 °C in das Carbamat **37** überführt wurde. Die geplante direkte Überführung des Diamins in das Mimetikum **12** konnte mit den gegebenen Bedingungen und Lösungsmittel nicht erzielt werden. Jedoch konnte anschließend das Carbamat **37** mit einer 0.03 M Natriumethanolat-Lösung unter Rückfluß zum Zielligand **12** umgesetzt werden.^[39, 40, 64, 65]

5.1.2.2 Synthese der 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion

Der Ligand **13** konnte analog **12** mit den gleichen Reagenzien und Reaktionsbedingungen synthetisiert werden. Wie bei Ligand **12** wurde zuerst ein Disaccharid aus dem gleichen Glycosyldonor **21** und, in diesem Fall, einer orthogonal-geschützten D-Arabinose **42** synthetisiert. Für die Pentenylierung der anomeren OH-Gruppe der D-Arabinose (**39**) musste im Gegensatz zum **24** bei Rückfluß erhitzt werden. Bei Raumtemperatur fand trotz mehrtägiger Reaktionszeit keine Reaktion statt. Die α/β -Produkte konnten säulenchromatographisch getrennt werden und das α -Anomer konnte mit einer Ausbeute von 40 % gewonnen werden (Abbildung 29).^[54]

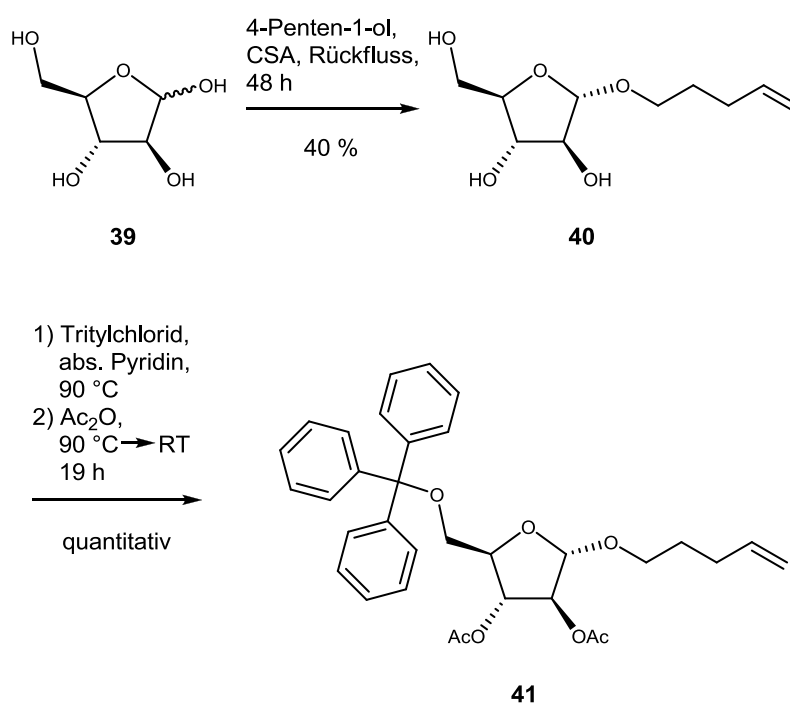


Abbildung 29: Darstellung von (4-Pentenyl)-2,3-di-O-acetyl-6-O-triphenylmethyl- α/β -D-arabinofuranoside **41**. Für die Pentenylierung der anomeren OH-Gruppe der D-Arabinose zu **40** musste in Gegensatz zum **24** zum Rückfluß erhitzt werden. Ansonsten fand bei Raumtemperatur keine Reaktion statt. Danach wurde die 6-OH-Gruppe trityliert und die restlichen OH-Gruppen acetyliert.^[54, 55]

Das Pentenyl-Arabinose **40** wurde dann an der 5-OH-Gruppe trityliert, die restlichen sekundären OH-Gruppen acetyliert und anschließend die primäre OH-Gruppe mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ wieder freigesetzt, um den für die Glycosylierung benötigte Akzeptor **42** zu erhalten.^[55, 56] Für die Detritylierung der primären OH-Gruppe wurde eine alternative Abspaltungsmethode mit Zinkbromid durchgeführt.^[66, 67] Über beide Variante konnte **42** mit einer Ausbeute von ca. 30 % erhalten werden (Abbildung 30).

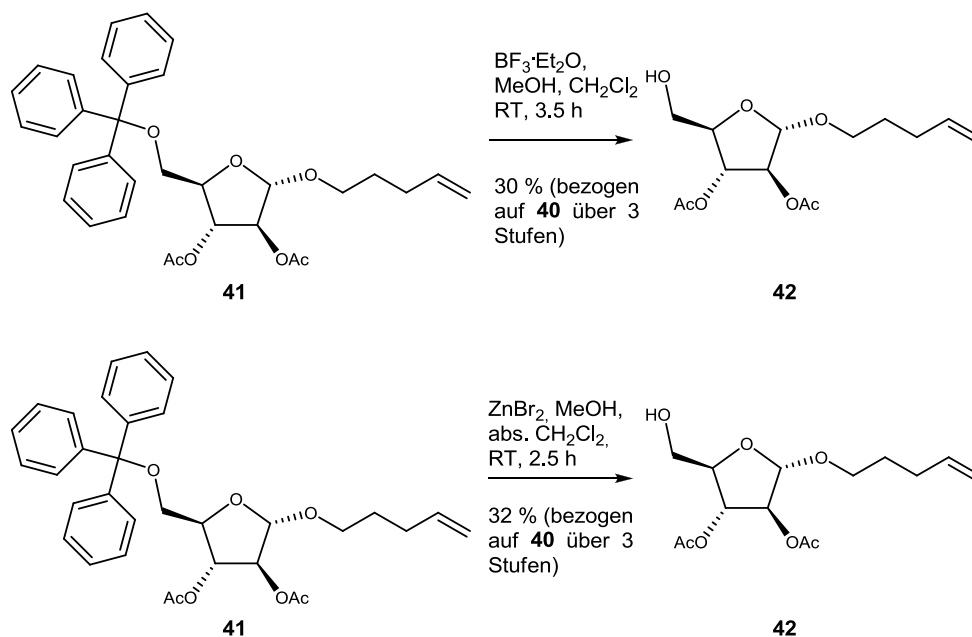


Abbildung 30: Detritylierung der geschützten D-Arabinose **42**. Für die Abspaltung der Tritylgruppe an primärer OH-Gruppe wurde jeweils $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ und Zinkbromid verwendet. Über beide Varianten konnte **42** mit einer Ausbeute von ca. 30 % erhalten werden.^[56, 66, 67]

Die Synthese des Disaccharids **43** wurde nach den bei der Synthese von **27** gewonnenen Erkenntnissen (siehe Tabelle 3) bei RT für 3 h mit TMSOTf als Katalysator durchgeführt.^[49] Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde ein Anomeren-Gemisch mit einem α / β Verhältnis von 1 : 0.03 erhalten. Nach der Synthese des Disaccharids **43** und der Überführung der Azidgruppe zum entsprechenden *N*-Acetyl-Disaccharid **44**, das als reines α -1,5-Disaccharid nach der säulenchromatographischen Reinigung gewonnen werden konnte, wurden die Schutzgruppen entfernt.^[57, 58] Zuerst wurden das 4-Pentenyl mit NBS und danach die Acetylgruppen nach Zemplén mit frisch hergestellter Natriummethanolat-Lösung abgespalten.^[59, 60] Das entschützte Disaccharid **46** wurde in das Oxim **47** überführt, das danach zum Amin **48** unter Verwendung von Pd / C und H_2 bei 36 bar mit einer Ausbeute von 91 % reduziert wurde (Abbildung 31).^[40, 61]

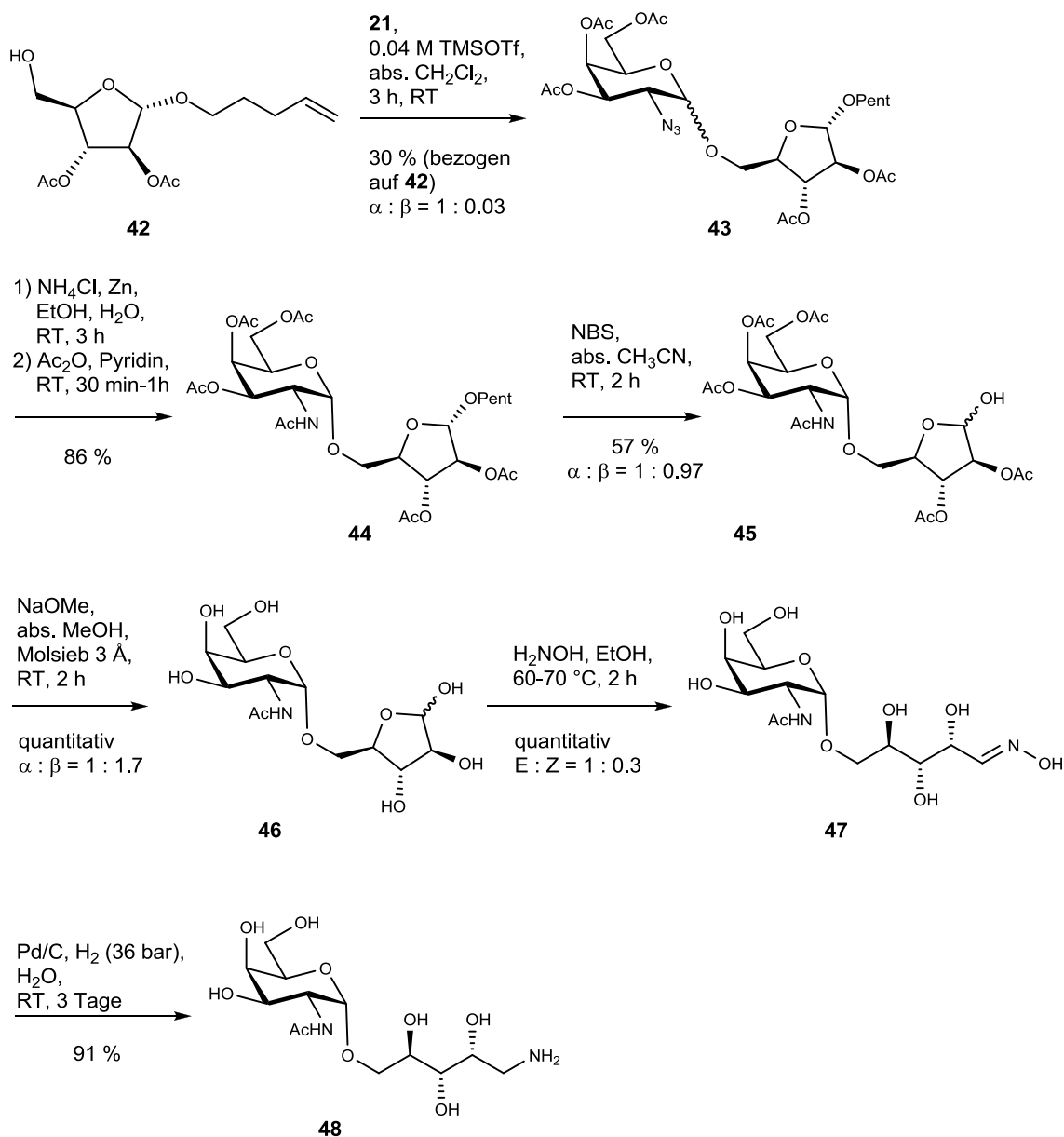


Abbildung 31: Darstellung von 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinitylamin **48**. Das Disaccharid **43** wurde mit der Trichloracetimidat-Methode von Grundler und Schmidt aus **42** und **21** synthetisiert.^[49] Die Azid-Gruppe konnte dann zum Amin reduziert und *in situ* zu **44** acetyliert werden.^[57, 58] Die 4-Pentenyl-Schutzgruppe wurde danach mit NBS und die Acetylgruppen mit Natriummethanolat-Lösung entfernt.^[59, 60] Das entschützte Disaccharid **46** wurde in das Oxim **47** überführt, das danach zum Amin **48** mit einer Ausbeute von 91 % reduziert werden konnte.^[40, 61]

Das Amin **48** wurde am **35** zum 6-Amino-5-nitrouracil-Derivat **49** gekoppelt. Anschließend wurde **49** unter Verwendung von Pd / C und H₂ zu dem entsprechenden Diamin reduziert und mit Diphosgen bei -25°C in abs. Ethanol im basischem Milieu umgesetzt. Auch hier findet kein direkter Aufbau des annellierten Fünfrings statt und es entsteht zunächst das Carbamat **50**. Mit dem Erhitzen zum Rückfluss des Carbamats in einer 0.03 M

Natriumethanolat-Lösung für 24 h konnte anschließend der Ligand **13** mit einer Ausbeute von 34 % bezogen auf **49** erhalten werden (Abbildung 32).^[39, 40, 64, 65]

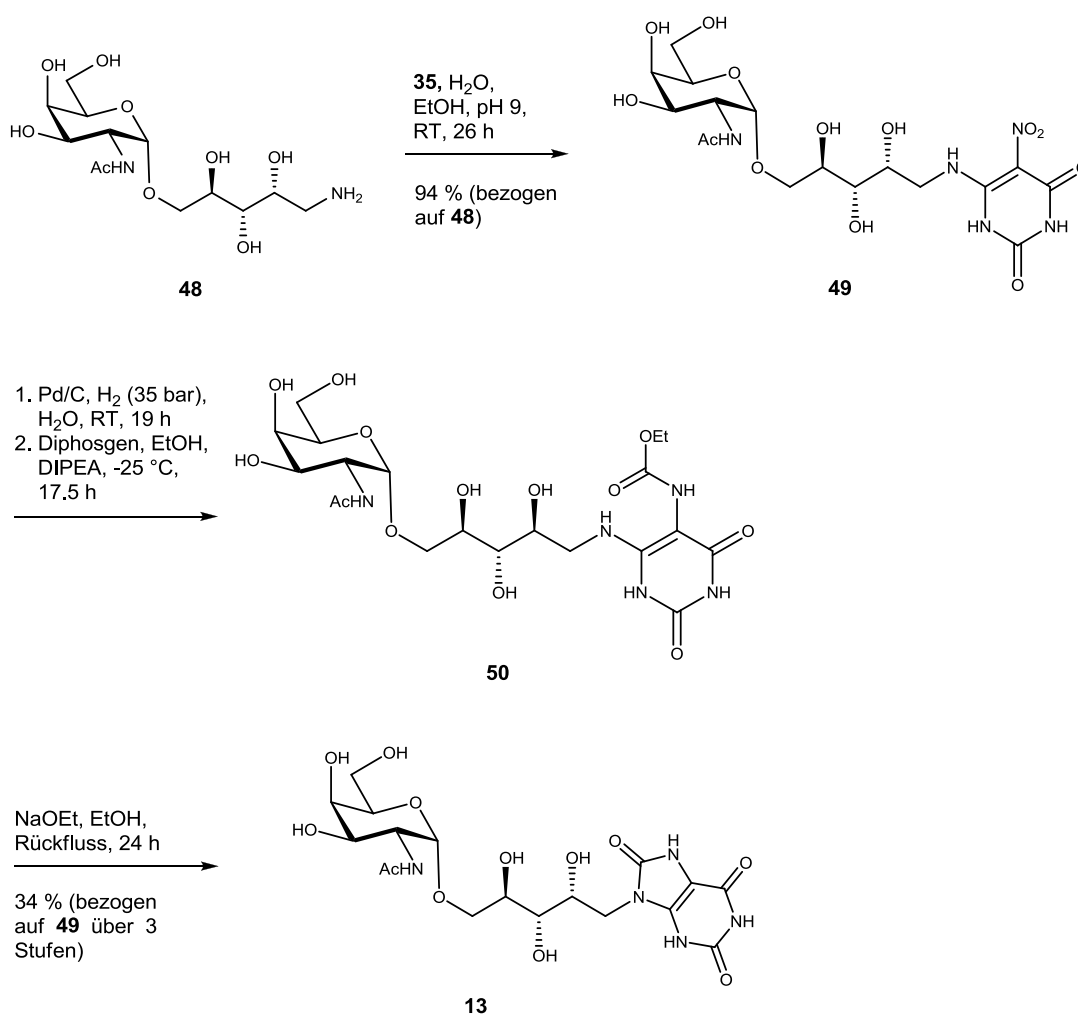
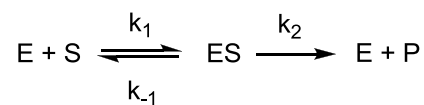


Abbildung 32: Synthese des 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl))-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**13**). **48** wurde mit **35** zu **49** gekoppelt, das zuerst unter Verwendung von Pd / C und H_2 zu dem entsprechenden Diamin reduziert und mit Diphosgen bei -25°C in abs. Ethanol im basischem Milieu umgesetzt. Es entstand zunächst das Carbamat **50** anstatt des Endprodukts **13**, da eine direkte Cyclisierung wegen des verwendeten Lösungsmittels nicht stattgefunden hat. Anschließend konnte **13** durch Erhitzen unter Rückfluss in einer 0.03 M Natriumethanolat-Lösung erfolgreich mit einer Ausbeute von 34 % (bezogen auf **49**) erhalten werden.^[39, 40, 64, 65]

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Liganden **12** und **13** mit der vorgeschlagene Synthesestrategie erfolgreich synthetisiert werden können. Mit dieser Synthesestrategie ist es ebenfalls möglich, andere Donorsubstrat-Mimetika mit der gleichen Leitstruktur für andere Klasse von GTs darzustellen, die sich in dem Zuckerteil unterscheiden und potentieller Inhibitor sein könnten. Um das inhibitorische Potential der beiden Moleküle **12** und **13** zu untersuchen, wurden nun in dem nachfolgenden Teil NMR-basierte Enzymassays mit den Mimetika durchgeführt.

5.1.3 Progresskurvenanalyse der Inhibition gegenüber GTA und GTB

Die Michaelis-Menten-Kinetik ist eine einfache und eine der wichtigsten Methoden um enzymatische Vorgänge zu beschreiben.^[68] Basierend auf der Annahme, dass Enzym (E) und Substrat (S) einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) als Zwischenprodukt bilden, der irreversibel zum Enzym (E) und Produkt (P) zerfällt, und die Existenz des *steady state* (eng. quasistationären Zustands)^[69] für den Enzym-Substrat-Komplex, dessen Konzentration im Laufe der Reaktion konstant bleibt, erlaubt dieses Modell die quantitative Bewertung der Enzymaktivitäten und die Analyse der Enzym Inhibition.^[70] Die Michaelis-Menten-Gleichung (GI-2) gibt die zeitunabhängige Beziehung zwischen Initialgeschwindigkeit und Substratkonzentration.



$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (GI-2)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (GI-3)$$

$$V_{max} = k_2[E]_0 \quad (GI-4)$$

Dabei ist [S] die Substratkonzentration, V_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_M die Michaelis-Menten-Konstante, die aus den Assoziationskonstante k_1 und Dissoziationskonstante k_{-1} sowie der Wechselrate k_2 besteht.

Wenn der Enzym-Substrat-Komplex schneller zurück zu Enzym und Substrat zerfällt als die Bildung vom Produkt, d.h. $k_2 \ll k_{-1}$, ist K_M gleich der Dissoziationskonstante K_D des Enzym-Substrat-Komplexes und stellt die Affinität des Substrats für das Enzym dar. Ist k_2 die Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Reaktion, so ist k_2 gleich k_{cat} , die sog. Wechselzahl oder *turnover number* und gibt die Anzahl der Substratmolekülen, die bei vollständiger Substratsättigung pro Zeiteinheit ins Produkt umgesetzt wird. Der Quotient k_{cat}/K_M ist ein Maß für die katalytische Effizienz des Enzyms. Die Bestimmung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_M macht es möglich, Enzymaktivitäten quantitativ zu analysieren und untereinander zu vergleichen. Die Michaelis-Menten-Gleichung kann auch die Kinetik der Enzyminhibition beschreiben. In diesem Fall werden die experimentell bestimmten Parameter zu den jeweiligen apparenten Parametern. Durch eine

doppelt-reziproke Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung (Lineweaver-Burk-Diagramm) kann einfach bestimmt werden, welche Form von Enzyminhibition vorliegt.^[2, 71]

Die Bestimmung der kinetischen Parameter durch die Michaelis-Menten-Gleichung hat auch seine Nachteile. Zum einen ist es manchmal schwierig, die Steigung der Progresskurve zum Zeitpunkt null präzise zu extrapolieren. Zum anderen gehen viele Informationen, die im Kurvenverlauf enthalten sind, verloren, da nur die Initialgeschwindigkeit für die Bestimmung untersucht wird.

Eine alternative Methode stellt die Analyse der Progresskurve dar. Diese hat der Vorteil, dass der experimentelle Aufwand reduziert wird, da die kinetischen Parameter aus einer Messung mit einer einzigen Substratkonzentration bestimmen können. Hierfür wird eine Lösung für die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (GI-5) benötigt.^[70]

$$V_{max}t = ([S]_0 - [S]) - K_M \ln \frac{[S]}{[S]_0} \quad (GI-5)$$

Schnell und Mendoza haben mit Hilfe von einem Computer Algebra System eine Lösung für die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung vorgeschlagen. Hierzu setzten sie die Lambert W-Funktion oder Omega Funktion, die Umkehrfunktion von $f(x)=xe^x$ ein.^[70]

$$[S] = K_M W \left(\frac{[S]_0}{K_M} \exp \left(\frac{-V_{max}t + [S]_0}{K_M} \right) \right) \quad (GI-6)$$

Die Lambert W-Funktion besitzen je nach dem Wert von x drei Funktionsästen (Abbildung 33). In der Region 1 mit $x>0$ ist W positiv und es gibt eine eindeutige Lösung für W. Für x-Werte mit $-1/e < x < 0$ existieren zwei Lösungen für $W > -1$ (Region 2) und $W < -1$ (Region 3).^[72, 73]

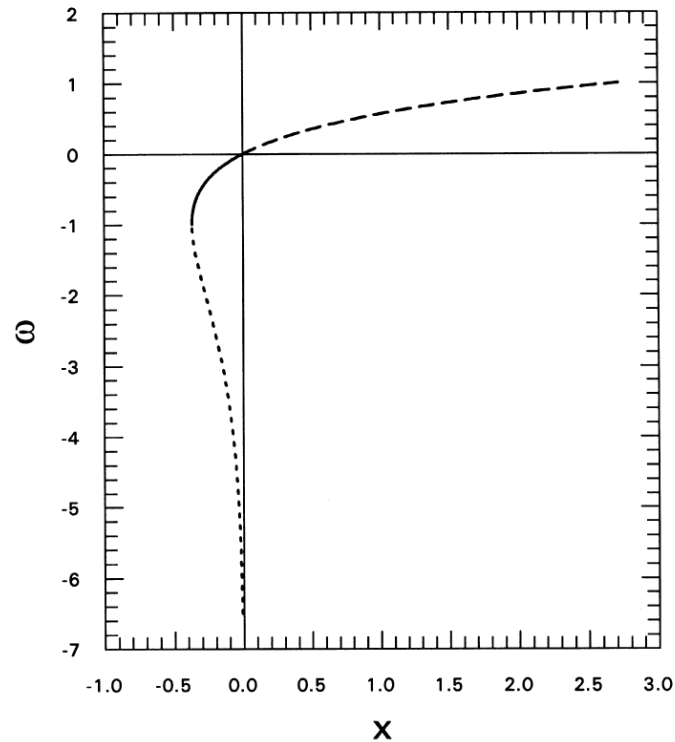


Abbildung 33: Die drei Funktionsäste der Lambert W-Funktion. Je nach Wert von x wird die Lambert W-Funktion in drei Regionen aufgeteilt: Mit $x > 0$ ist W positiv und hat eine eindeutige Lösung (Region 1 mit gestrichene Linie ---). Für x -Werte mit $-1/e < x < 0$ existieren zwei Lösungen für $W > -1$ (Region 2 mit gezogene Linie) und $W < -1$ (Region 3 mit punktierte Linie ...).^[72, 73]

Mit der Lösung der Lambert W-Funktion konnten Goudar *et al.* zeigen, wie die Gleichung (GI-6) auf nicht-lineare Regressionsanalyse von experimentellen Progresskurven angewendet werden kann.^[72] Die Gleichung kann auch zur Analyse von kompetitiver Inhibition einer Enzymreaktion verwendet werden. Die Anwesenheit eines Inhibitors beeinflusst den tatsächlichen Wert von V_{max} und K_M und in diesem Fall werden die apparenten Parameter V'_{max} und K'_M erhalten. Die Gleichung (GI-6) wird zur Gleichung (GI-7).^[72-74] Mit Hilfe von mathematischer Computer Software, z.B. MATLAB, kann die aufgenommene Progresskurve ausgewertet und die kinetischen Parameter V_{max} , K_M sowie K_I bestimmt werden.

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - V'_{max} t}{K'_M} \right) \right\} \quad (GI-7)$$

$$K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (GI-8)$$

Die Verwendung von NMR-Spektroskopie zur Analyse von Enzymreaktionen hat die Vorteile, dass die Messung in homogener Lösung durchgeführt wird und die Reaktion ohne den Einsatz von markierten Substraten oder eine chemische Veränderung der Produkte verfolgt werden kann. Zwar werden größere Mengen an Probe benötigt, was aber durch die Entwicklung von hochauflösender NMR-Spektroskopie wesentlich reduziert werden kann.^[74]

Es wurden NMR basierten Inhibitionsassay mit den Liganden und anschließend Progresskurvenanalyse durchgeführt, um das inhibitorische Potenzial der Liganden **12** und **13** gegenüber GTA zu untersuchen. Außerdem wurde auf die gleiche Weise das inhibitorische Potenzial der Liganden gegenüber GTB bestimmt, um die Substratspezifität der Liganden zu überprüfen.

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

Zunächst wurden die kinetischen Parameter von GTA unter den gewählten Messbedingungen ohne Inhibitor bestimmt. Dafür wurde die Umsetzung von Donorsubstrat UDP-GalNAc mit Akzeptorsubstrat α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl durch GTA in 50 mM BisTris- d_{19} Puffer (50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT- d_{10} , 1 μ g/ μ L BSA und 10 U alkalischer Phosphatase) bei 310 K durchgeführt und mit NMR Spektroskopie verfolgt. Um einer Produktinhibition, die durch das bei der Reaktion entstehenden UDP verursacht wird, zu vermeiden, wurde alkalische Phosphatase hinzugefügt, die das UDP zu UMP umsetzt. α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl wurde im zehnfachen Überschuss gegenüber UDP-GalNAc eingesetzt, um die Annahme einer quasi konstanten Konzentration über dem gesamten Experiment zu gewährleisten, da für die Aufnahme der Progresskurve die Konzentrationsänderung des Donorsubstrats beobachtet werden sollte. Die verwendeten Konzentrationen und Messbedingungen wurden nahe an den Werten, die von Katrin Schaefer für ihre Messungen eingesetzt hat, gehalten, um später einen besseren Vergleich zu gewährleisten.^[40] Das Donorsubstrat UDP-GalNAc wurde in einer Konzentration von 150 μ M und GTA in einer Konzentration von 21 nM eingesetzt.

Bevor das eigentliche Experiment begann, wurde die Probe ohne das Donorsubstrat vorbereitet und ein ¹H-NMR Spektrum mit Wasserunterdrückung aufgenommen, um die benötigten NMR-spektroskopischen Parameter einzustellen. Mit der Zugabe vom Donorsubstrat UDP-GalNAc wurde die Reaktion gestartet und bei 310 K für 19 Stunden NMR spektroskopisch verfolgt. Dabei wurde alle 10 Minuten ein ¹H-NMR Spektrum mit 128 *scans* und *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung aufgenommen.

Für die Verfolgung der Reaktion wurden die Signale der Protonen H-5 und H-1' (bei 6.05 ppm) und des Protons H-6 (bei 8.01 ppm) der UDP-GalNAc analysiert. An diesen zwei Stellen

konnte die Änderung der Signale deutlich beobachtet werden. Die Intensität der Signale von UDP-GalNac Protonen nimmt im Laufe der Reaktion ab, während neue Signale, die hochfeldverschoben sind und zum Produkt UMP gehören, entstehen. Außerdem befinden sich diese Signale im Bereich außerhalb der *bulk*-Signale der Kohlenhydratstruktur von UDP-GalNac und α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl (zwischen 3.5 bis 4.5 ppm) und somit ohne weitere Überlagerung gut auswertbar sind. Zusätzlich konnte das Signal der *N*-Acetylgruppe, das separiert bei 2.15 ppm vorliegt, ebenfalls für die Verfolgung der Reaktion benutzt werden. Hier konnte eine Abnahme der Intensität des *N*-Acetyl-Signals von UDP-GalNac und eine Zunahme der Intensität eines neuen Signals in der unmittelbaren Nähe des Hochfeldbereichs beobachtet werden (Abbildung 34 und Abbildung 35).

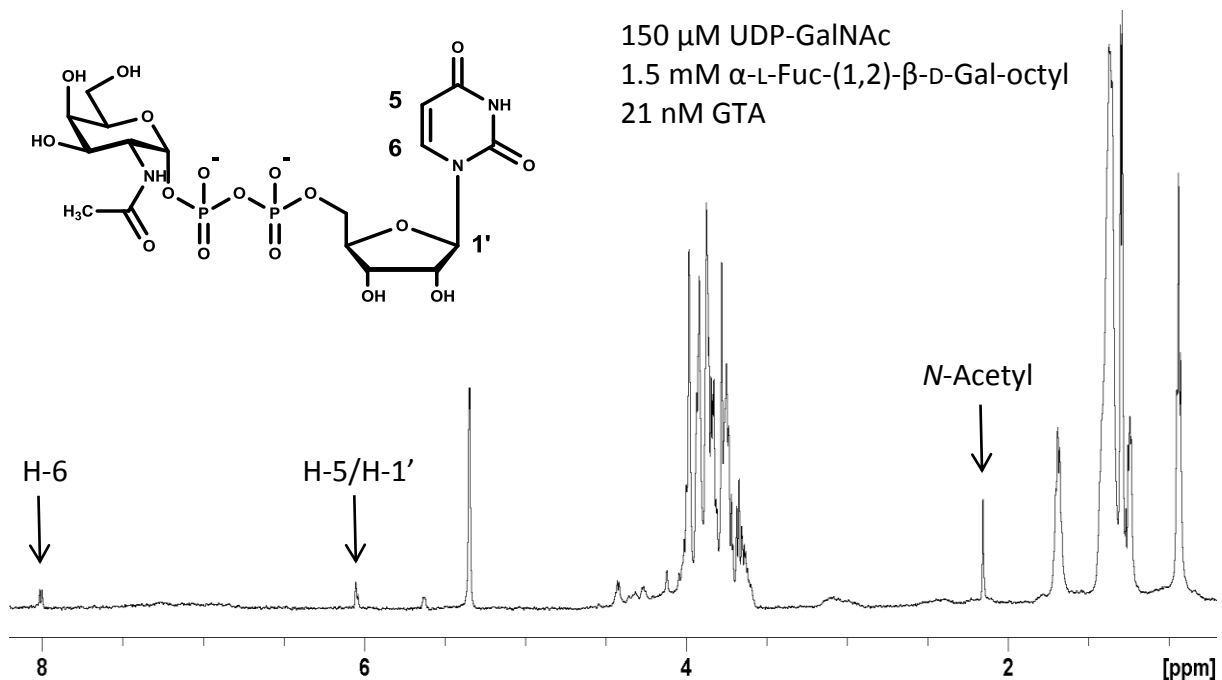


Abbildung 34: ^1H -NMR Spektrum von UDP-GalNac, Akzeptorsubstratanalogon α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl und GTA in BisTris- d_{19} Puffer (600 MHz, 310 K). Zwischen 3.5 bis 4.5 ppm gib es eine starke Signalüberlagerung der Kohlenhydrat-Protonen von den beiden Substraten (*bulk*-Bereich). Die Signale der Protonen H-5 und H-1' (bei 6.05 ppm) und des Protons H-6 (bei 8.01 ppm) von UDP-GalNac befinden sich außerhalb dieses *bulk*-Bereichs und werden für die Reaktionsverfolgung benutzt. Zusätzlich kann das Signal der *N*-Acetylgruppe bei 2.15 ppm zur Auswertung ebenfalls herangezogen werden.

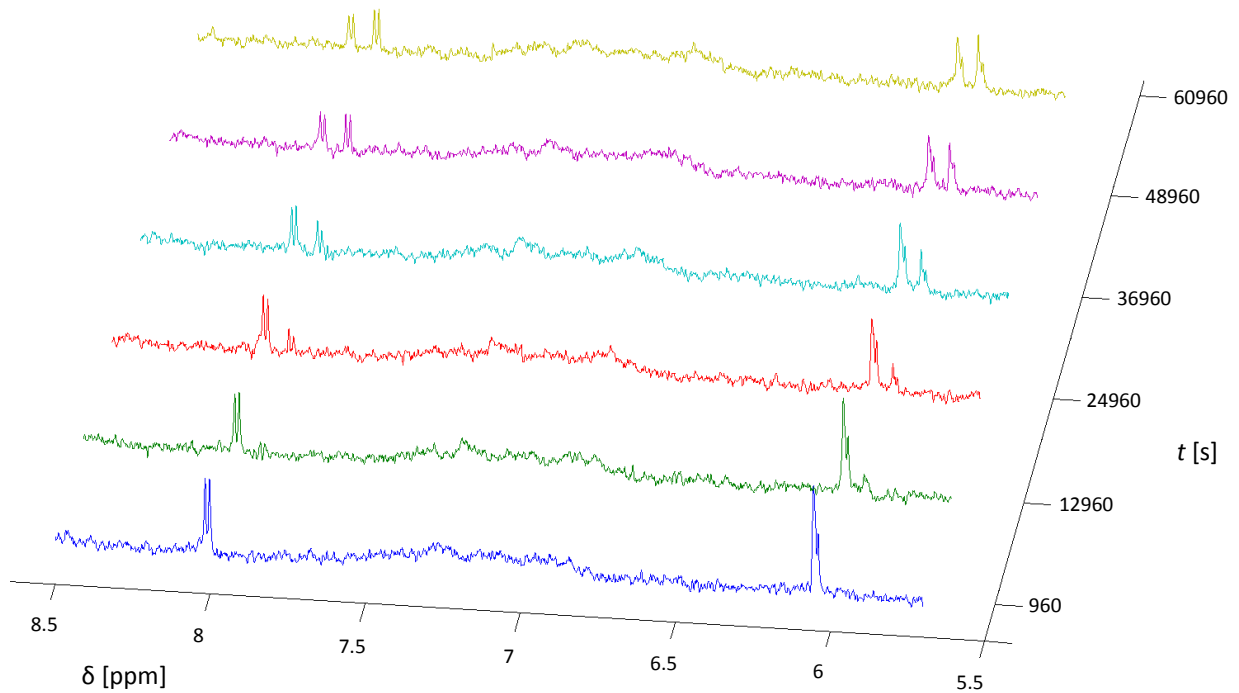


Abbildung 35: Zeitliche Änderung der chemischen Verschiebung von H-6 (bei 8.01 ppm) und H-5/H1' (bei 6.05 ppm) des Uridins im Verlauf der von GTA katalysierter Enzymreaktion. Am Anfang der Reaktion ($t=960$ s) entspricht die chemische Verschiebung der Protonen der UDP-GalNac. Mit fortschreitender Zeit nimmt die Intensität der Signale im Laufe der Reaktion ab, während jeweils ein neues, leicht hochfeldverschobenes Signal an Intensität zunimmt. Mit der Verwendung von 19 h Gesamtmesszeiten war die Reaktion jedoch noch nicht beendet. Die Signale der UDP-GalNac sind bei $t=68760$ s immer noch vorhanden.

Durch die Auftragung der Konzentration von UDP-GalNac gegen die Zeit konnte die Progresskurve erhalten werden (Abbildung 36). Mit Hilfe des Computerprogrammes Matlab konnten unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung die kinetischen Parameter K_M und V_{max} bestimmt werden.

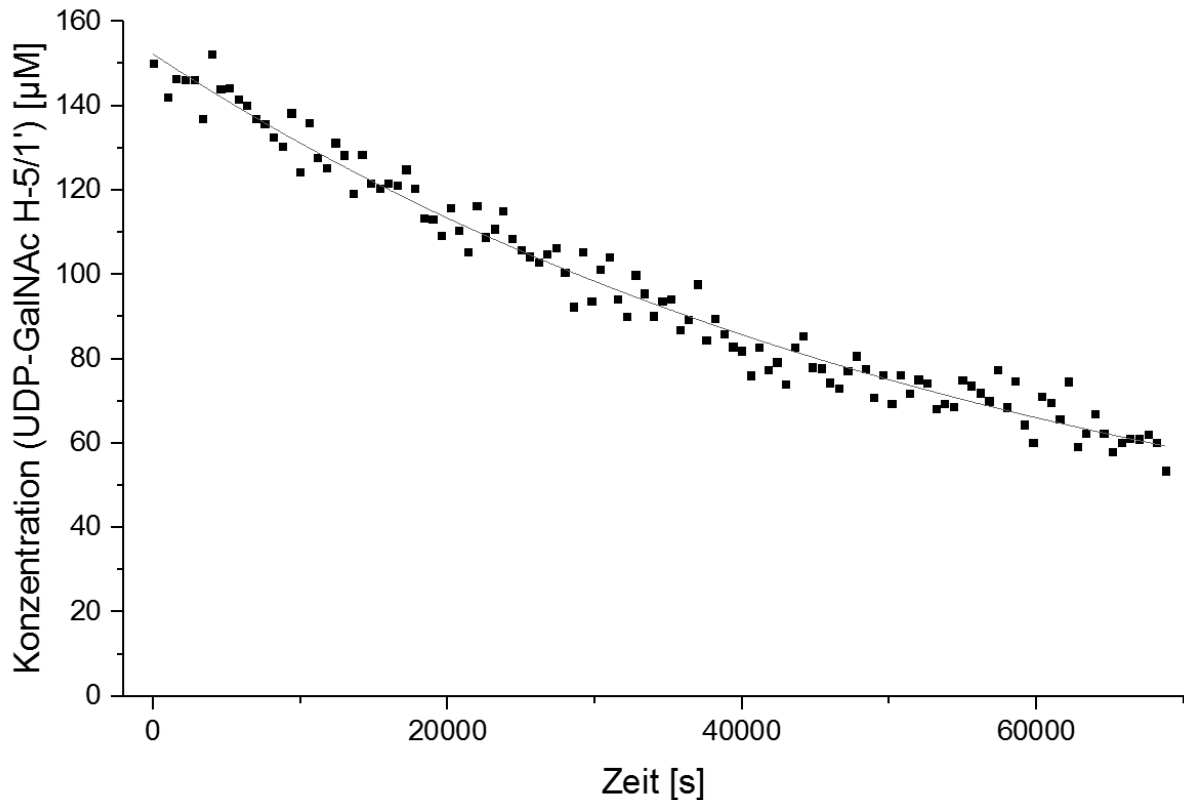


Abbildung 36: Auftragung der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion durch GTA. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung wurde mithilfe des Computerprogrammes MATLAB gefittet und $K_M = 40.6 \pm 4.2 \mu\text{M}$ und Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 2.7 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$ bestimmt.

In der Progresskurve konnte man erkennen, dass die Umsetzung des Donorsubstrats mit der verwendeten Reaktionszeit nicht vollständig war. Damit Matlab die Progresskurve entsprechend korrekt fitten und die kinetischen Parameter berechnen kann, wurde die Lambert-W-Lösung (Gl-7) mit einem Wert x (*Offset*) addiert. Somit wird die Fitkurve angepasst.

$$[S] = K'_M W \left\{ \frac{[S]_0}{K'_M} \exp \left(\frac{[S]_0 - V'_{max} t}{K'_M} \right) \right\} + x \quad (\text{Gl-9})$$

x : *Offset*

Die Bildung des Mittelwerts der letzten 20 Werte ist wegen der unvollständigen Reaktion nicht möglich, deshalb wurde der *Offset* zunächst abgeschätzt und K_M und V_{max} berechnet. Es wurden verschiedene *Offsets* Werte für die Berechnung eingesetzt. Das Ergebnis mit dem niedrigsten RMSE (*eng: root-mean-square error*) ist $K_M = 40.6 \pm 4.2 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 2.7 \cdot 10^{-9} \text{ M/s}$ (Tabelle 4).

<i>Offset</i>	K_M [μM]	V_{\max} [M/s]	RMSE
0.000038	115	$4.07 \cdot 10^{-9}$	$4.191273 \cdot 10^{-6}$
0.000039	107	$3.94 \cdot 10^{-9}$	$4.188496 \cdot 10^{-6}$
0.000045	71.1	$3.31 \cdot 10^{-9}$	$4.172556 \cdot 10^{-6}$
0.000052	42.3	$2.77 \cdot 10^{-9}$	$4.161082 \cdot 10^{-6}$
0.0000524	40.9	$2.74 \cdot 10^{-9}$	$4.161012 \cdot 10^{-6}$
0.0000525	40.6	$2.73 \cdot 10^{-9}$	$4.161010 \cdot 10^{-6}$
0.0000526	40.3	$2.73 \cdot 10^{-9}$	$4.161016 \cdot 10^{-6}$
0.000053	39.0	$2.70 \cdot 10^{-9}$	$4.161109 \cdot 10^{-6}$
0.000055	33.0	$2.58 \cdot 10^{-9}$	$4.163657 \cdot 10^{-6}$
0.00006	20.6	$2.30 \cdot 10^{-9}$	$4.199331 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4: Die berechnete K_M und V_{\max} Werte mit dem eingestellten Offset und die dazugehörigen RMSE (*eng: root-mean-square error*)-Werte. Da die Enzymreaktion nach der Messzeit nicht vollständig abgeschlossen war und demzufolge der *Offset* nicht durch die Bildung des Mittelwerts der letzten 20 Werte bestimmt werden konnte, wurde für die Berechnung verschiedene *Offsets* vorgegeben. Das Ergebnis mit dem niedrigsten RMSE ist fett markiert.

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

Die kinetischen Parameter von GTB wurden ebenfalls unter den gewählten Messbedingungen ohne Inhibitor bestimmt. Wie bei der Bestimmung der Parameter von GTA wurde die Enzymreaktion auch in 50 mM BisTris- d_{19} Puffer (50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1mM DTT- d_{10} , 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA und 10 U alkalischer Phosphatase) bei 310 K durchgeführt und NMR-spektroskopisch verfolgt. Als Akzeptorsubstrat wurde ebenfalls α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl verwendet und in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat UDP-Gal eingesetzt. Somit kann eine quasi konstante Konzentration des Akzeptorsubstrats über der gesamten Reaktion angenommen werden. Das Donorsubstrat UDP-Gal wurde in einer Konzentration von 250 μM verwendet. Da GTB eine niedrigere Wechselzahl k_{cat} im Vergleich zu GTA besitzt, wurde GTB mit einer höheren Konzentration von 480 nM eingesetzt, um die Dauer des Experiments zu verkürzen. Die Probe wurde zunächst ohne das Donorsubstrat

vorbereitet und ein ^1H -NMR Spektrum mit Wasserunterdrückung aufgenommen, um die benötigten NMR-spektroskopischen Parameter zu bestimmen und das Referenzspektrum für $t=0$ zu erhalten. Danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von UDP-Gal gestartet und bei 310 K für 15 Stunden NMR spektroskopisch verfolgt. Dabei wurde alle 10 Minuten ein ^1H -NMR Spektrum mit 128 scans und *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung aufgenommen.

Zur Auswertung der Reaktion eigneten sich wie bei GTA die H-5/H-1'- und H-6-Protonensignale von UDP-Gal, die außerhalb des *bulk*-Bereichs der Kohlenhydratstruktur von UDP-GalNAc und α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl vorliegen und daher ohne weitere Überlagerung gut auswertbar sind (Abbildung 37).

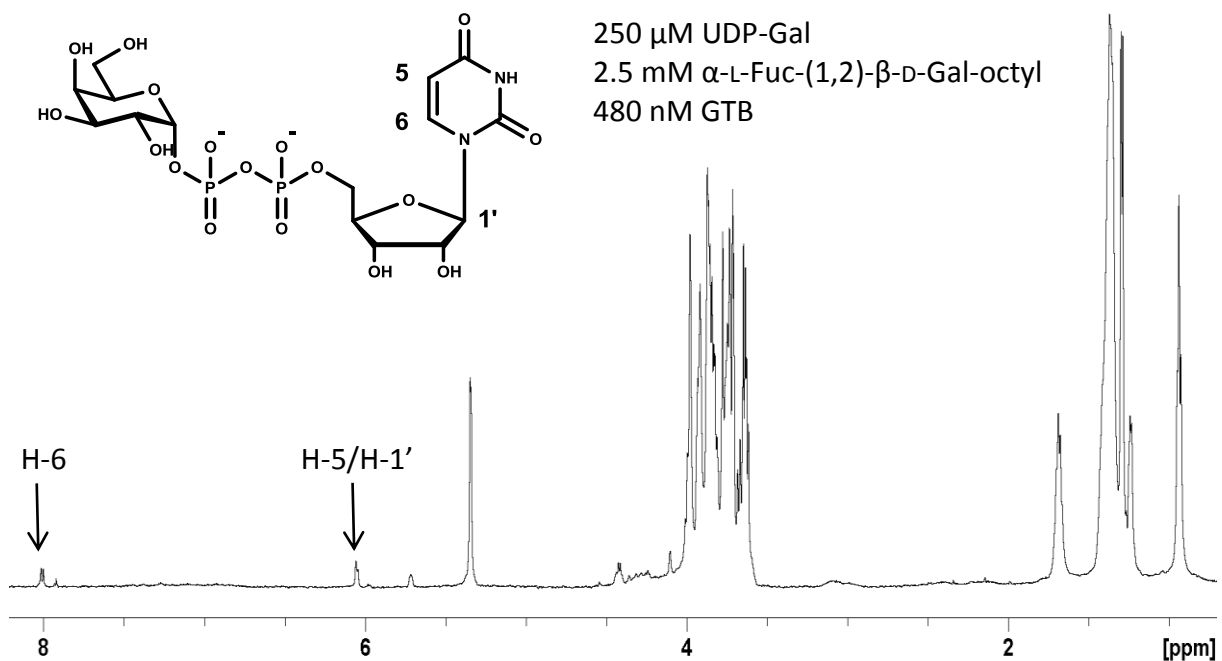


Abbildung 37: ^1H -NMR Spektrum von UDP-Gal, Akzeptorsubstratanalogon α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl und GTB in BisTris- d_{19} Puffer (600 MHz, 310 K). Zwischen 3.5 bis 4.5 ppm gib es eine starke Signalüberlagerung der Kohlenhydrat-Protonen von den beiden Substraten (*bulk*-Bereich). Die Signale der Protonen H-5 und H-1' (bei 6.05 ppm) und des Protons H-6 (bei 8.01 ppm) von UDP-Gal befinden sich außerhalb dieses *bulk*-Bereichs und können für die Reaktionsverfolgung benutzt werden.

Nach der Auftragung der Konzentration von UDP-Gal gegen die Zeit anhand des Integrals der H-5/H-1'-Protonen der UDP-Gal und die anschließende Analyse der Progresskurve, ergab sich eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 484 \pm 5 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit von $V_{max} = 8.0 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$. Damit Matlab die Progresskurve entsprechend korrekt fitten und die kinetischen Parameter berechnen kann, wurde die Gleichung (Gl-9) für die Berechnung verwendet, um die Fitkurve vertikal zu verschieben. Als *Offset* wurde $x = -3.18 \cdot 10^{-7}$ eingesetzt, der aus der Bildung des Mittelwerts der letzten 20 UDP-Gal Konzentrationen resultiert.

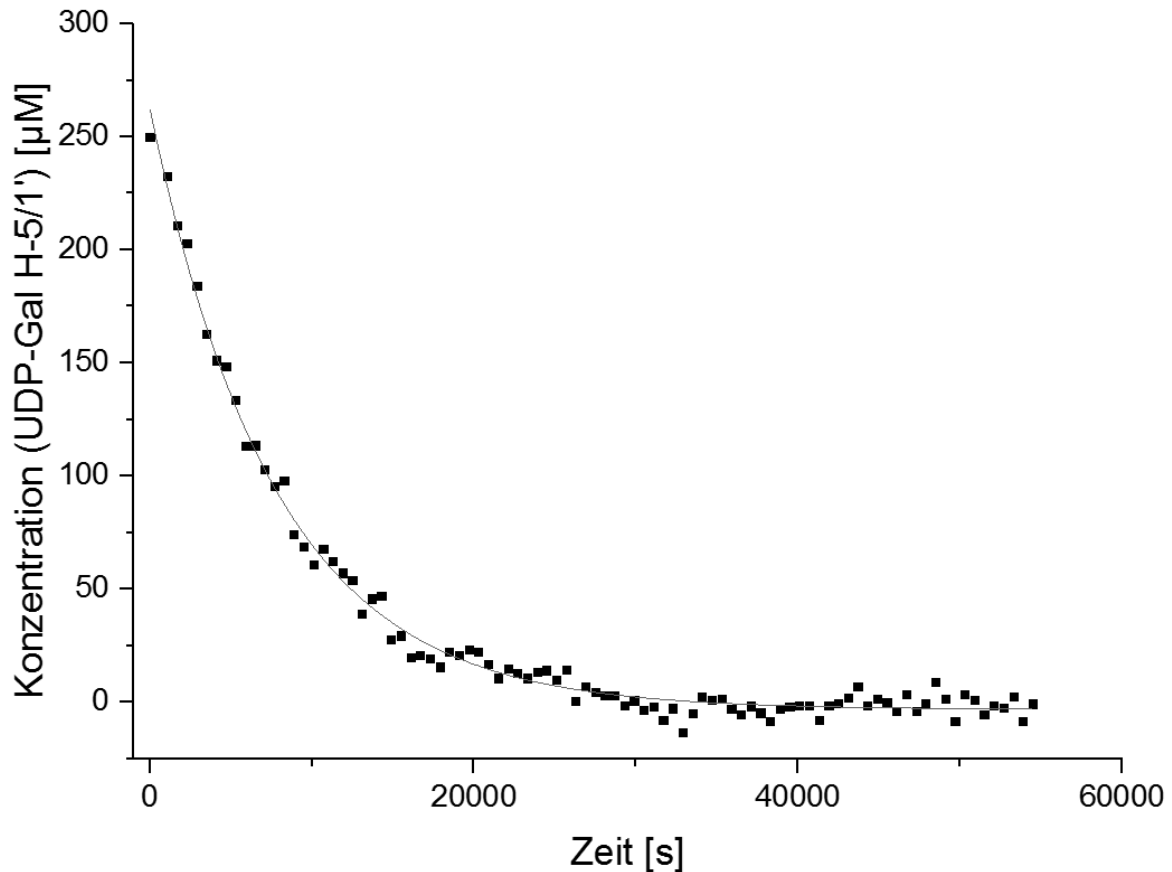


Abbildung 38: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung wurde $K_M = 484 \pm 5 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 8.0 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$ bestimmt.

5.1.3.3 Untersuchung der Inhibition von GTA

Für die Untersuchung des inhibitorischen Potentials der Mimetika **12** und **13** gegenüber GTA wurden Inhibitionsassays mit dem jeweiligen natürlichen Liganden durchgeführt. Die GTA Konzentration wurde auf 100 nM erhöht, da eine längere Reaktionsdauer mit Inhibitoren zu erwarten ist und durch die Erhöhung der Enzymkonzentration die Gesamtexperimentdauer verkürzt wird. Das Donorsubstrat UDP-GalNAc wurde mit einer Konzentration von 150 μM und das Akzeptorsubstrat mit einer Konzentration von 1.5 mM eingesetzt. Die Mimetika wurden alle jeweils in einer Konzentration von 1.5 mM hinzugefügt.

Wie bei der Bestimmung der kinetischen Parameter von GTA wurde die Probe zunächst ohne das Donorsubstrat vorbereitet und die NMR-spektroskopischen Parameter sowie die

Referenz zum Zeitpunkt $t=0$ bestimmt. Nach der Zugabe von Donorsubstrat wurde für die Inhibition durch **12** 18 Stunden alle 10 Minuten ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum bei 310 K mit 128 scans und *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung aufgenommen.

Die Auswertung der Reaktion und die Erstellung der Progresskurve wurde anhand des Integrals der H-5/H-1'-Protonen von UDP-GalNAc durchgeführt. Der *Offset* wurde aus dem Mittelwert der letzten 20 Konzentrationswerte berechnet. Für **12** wurde nach der Analyse der Progresskurve mit Hilfe von Gleichung (Gl-9) $K'_M = 1130 \pm 9 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 1.2 \cdot 10^{-7} \text{ M/s}$ bestimmt. Dies ergibt gemäß der Gleichung (Gl-8) eine Inhibitionskonstante $K_I = 56 \mu\text{M}$.

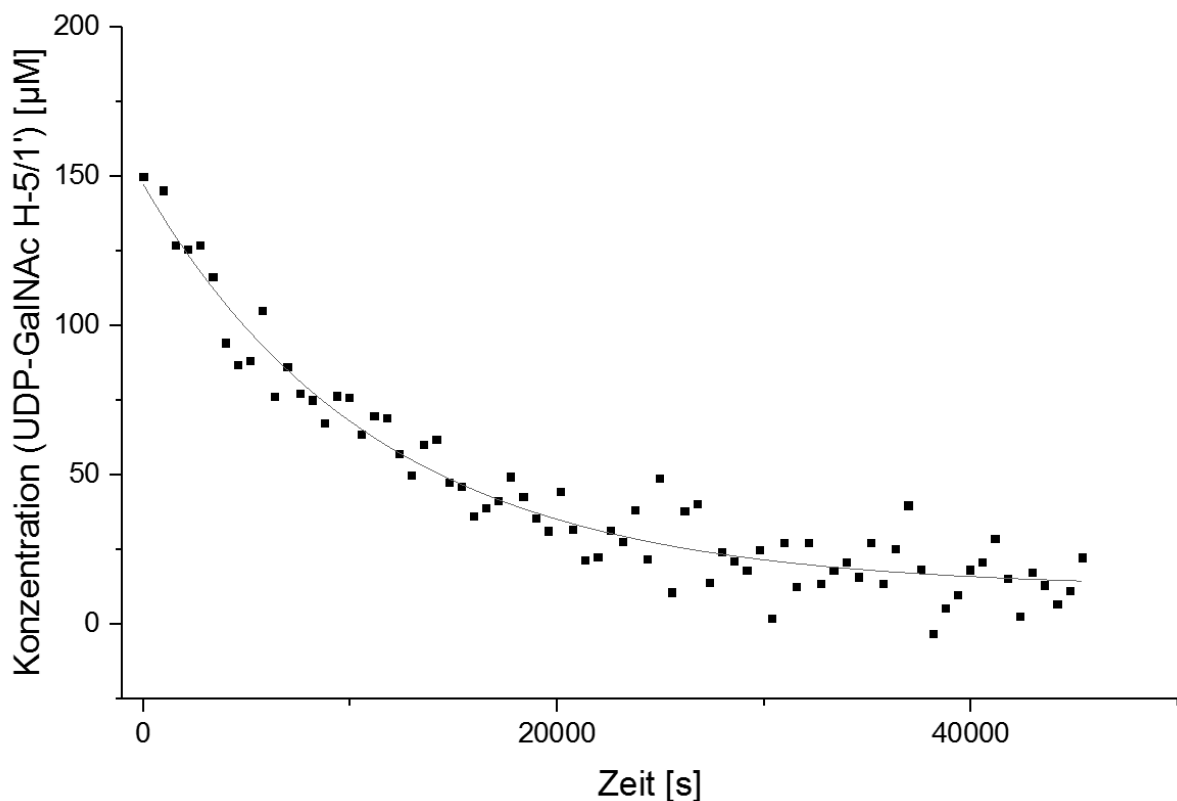


Abbildung 39: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von **12**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition wurde eine Inhibitionskonstante $K_I = 56 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 1.2 \cdot 10^{-7} \text{ M/s}$ bestimmt.

Analog zur Inhibition von GTA durch **12** wurde die Inhibition durch **13** unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Abweichend wurden die Spektren jedoch nur für 16 Stunden aufgenommen. Nach der Auswertung wurde ein K'_M -Wert $K'_M = 328 \pm 5 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 3.1 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$ ermittelt, woraus sich eine Inhibitionskonstante $K_I = 212 \mu\text{M}$ ergibt.

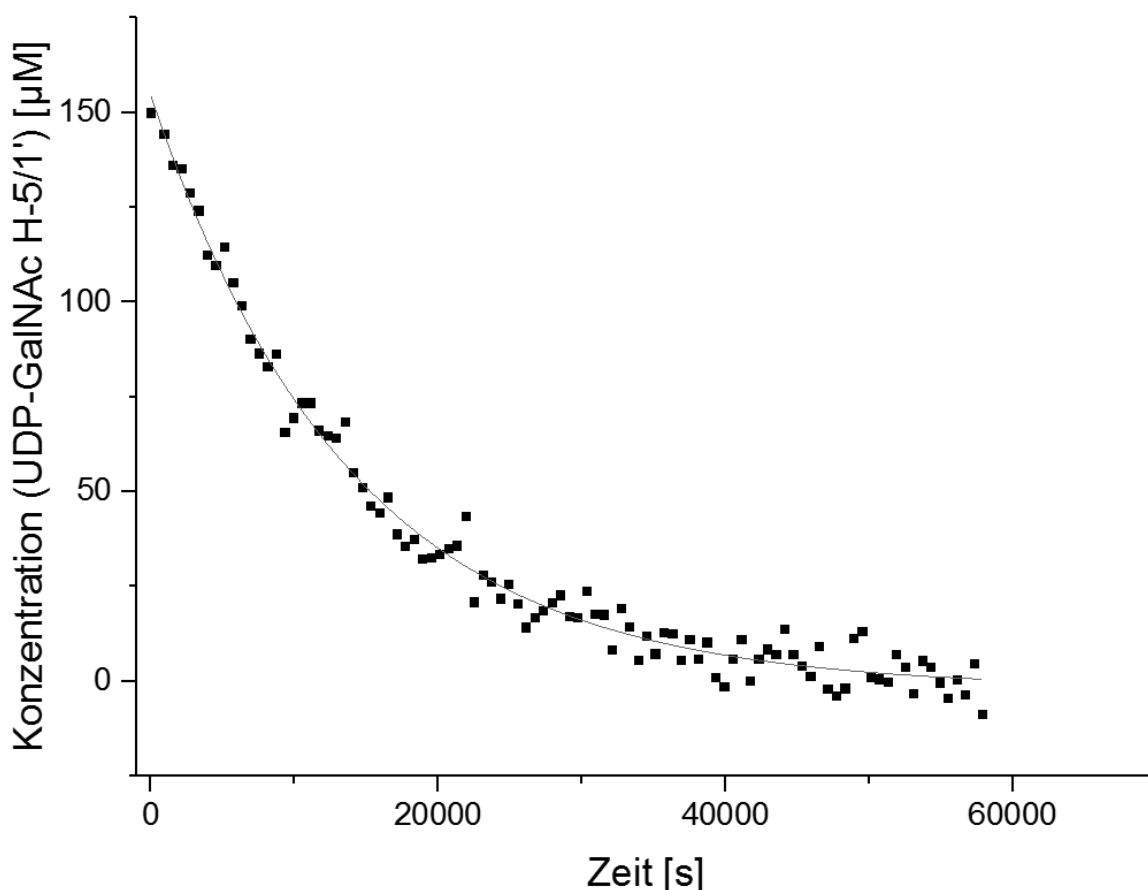


Abbildung 40: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von **13**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition ergibt sich eine Inhibitionskonstante $K_I = 212 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 3.1 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$.

Vergleicht man die K_I -Werte der Mimetika **12** und **13**, kann gezeigt werden, dass beide Liganden durchaus gut in der Lage sind, GTA zu inhibieren. Insbesondere **12**, der mit einem K_I -Wert von $56 \mu\text{M}$ um einen Faktor von 3.8 stärker als **13** mit einem K_I -Wert von $212 \mu\text{M}$ GTA inhibieren kann.

Die Ergebnisse beantworten ebenfalls die bisher offene Frage von der *in silico* Analyse (Kapitel 5.1.1, Seite 25): Welcher Einfluss hat die Konformation des Linkers auf die Bindungsaffinität des Liganden? Bei den Dockingexperimenten kann gezeigt werden, dass die Hydroxygruppen des Linkers bei **12** in einer Konformation vorliegen, in der keine ungünstige 1,3-diaxiale Wechselwirkung vorhanden ist. Bei **13** nehmen die Hydroxygruppen des Linkers dagegen diese ungünstige 1,3-diaxiale Orientierung an. Jedoch kann **13** das bivalente Kation besser komplexieren als **12** aufgrund dieses Konformationsunterschieds. Trotz der besseren Komplexierung ist der K_I -Wert von **13** schlechter als der von **12**. Das zeigt, dass die 1,3-diaxiale Wechselwirkung zwischen den 2- und 4-Hydroxygruppen des Linkers

eine größere Erhöhung der Bindungsenergie bewirkt, als durch die ideale Komplexierung des bivalenten Kations kompensiert werden kann und führt so zu einer insgesamt schlechteren Bindung von **13** zu GTA als durch **12**. Im Gegensatz zu **13** kann **12** zwar das bivalente Kation schlechter komplexieren, es hat jedoch keinen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität. Dies alles lässt den Schluss zu, dass die Konformation des Linkers größeren Beitrag zur Bindung leistet, als die Fähigkeit des Linkers zur Komplexierung des bivalenten Kations.

Nichtsdestotrotz sind beide Linker geeignet die Pyrophosphat-Einheit und das Ribosylfragment des natürlichen Liganden UDP-GalNAc zu ersetzen. Der Ribityl-Linker ist jedoch die bessere Wahl als einen Linker. Diese Tatsache kann nicht durch das Dockingexperiment gezeigt werden, da die berechneten Bindungsenergien keinen signifikanten Unterschied aufweisen, wird jedoch durch die Ergebnisse des Inhibitionsassays in der Praxis bestätigt.

5.1.3.4 Untersuchung der Inhibition von GTB

Um die Spezifität der Liganden zu überprüfen, wurde ebenfalls Inhibitionsassays mit den Mimetika **12** und **13** gegenüber GTB durchgeführt. Um die Reaktionsdauer zu verkürzen, die durch die Zugabe von möglichen Inhibitoren verlängert werden kann, wurde die GTB Konzentration auf 480 nM erhöht. Das Donorsubstrat UDP-Gal wurde mit einer Konzentration von 250 μM und das Akzeptorsubstrat $\alpha\text{-L-Fuc-(1,2)-}\beta\text{-D-Gal-octyl}$ mit einer Konzentration von 2.5 mM eingesetzt. Die Mimetika wurden jeweils mit einer Konzentration von 1.5 mM zugegeben. Die Verfolgung der Enzymreaktion wurde mit der Zugabe des Donorsubstrats begonnen und es wurde jeweils für Mimetika **12** und **13** alle 10 Minuten ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum mit 128 *scans* und *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung bei 310 K aufgenommen. Die Reaktionen wurden mit **12** für 23 Stunden und mit **13** für 17.5 Stunden verfolgt.

Die Auswertung der Spektren und die Erstellung der Progresskurve wurde analog der Inhibition der GTA durchgeführt, wobei die Integrale der H-5/H-1'-Protonen von UDP-Gal für die Bestimmung der Konzentration herangezogen wurden und bei der Berechnung von K'_M und V_{max} das *Offset* aus dem Mittelwert der letzten 20 Konzentrationswerte verwendet wurde. Für **12** wurde ein K'_M -Wert von $K'_M = 562 \pm 4 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 7.2 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$ berechnet, woraus sich eine Inhibitionskonstante $K_I = 9.38 \text{ mM}$ ergibt.

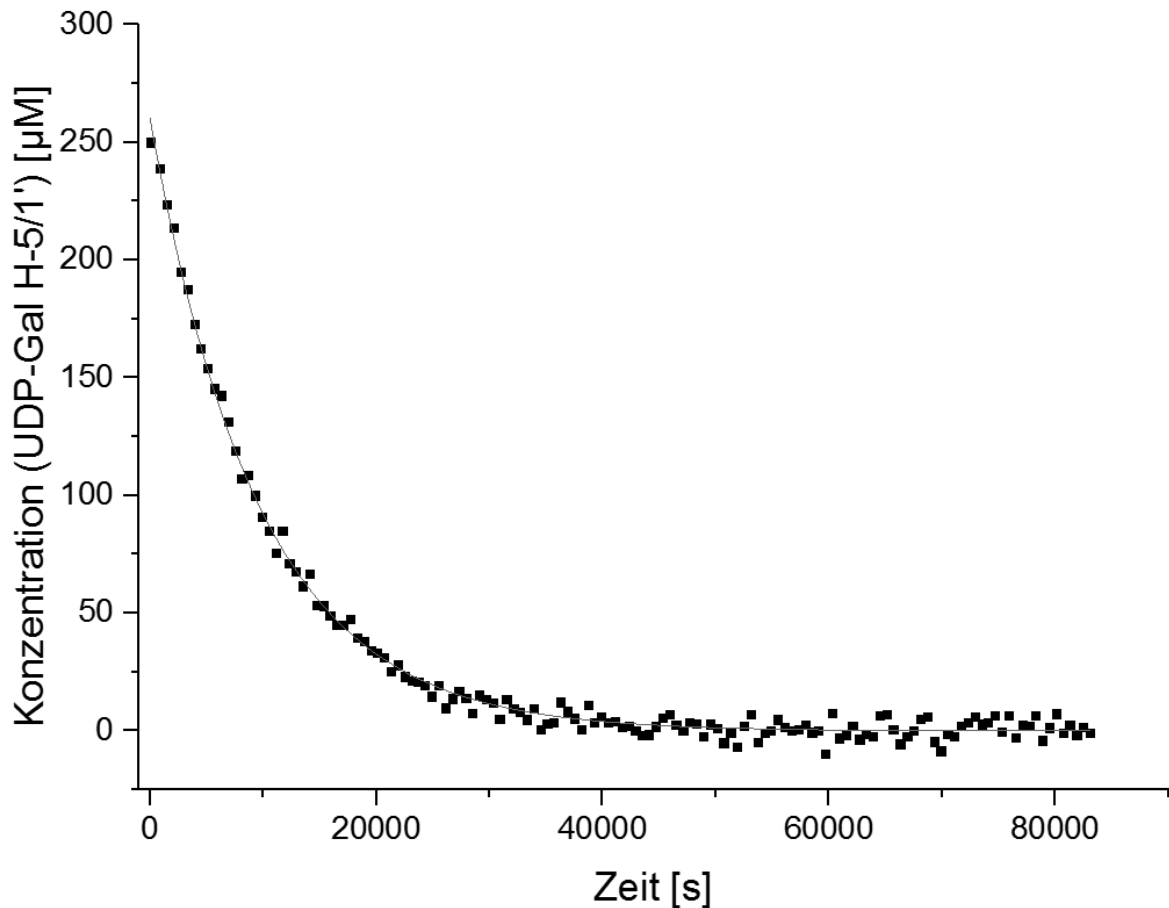


Abbildung 41: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB in Anwesenheit von **12**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition wurde eine Inhibitionskonstante $K_I = 9.38 \text{ mM}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 7.2 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$ ermittelt.

Für **13** ergab nach der Auswertung der experimentellen Daten ein K'_M -Wert $K'_M = 627 \pm 4 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 8.3 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$. Daraus resultiert eine Inhibitionskonstante $K_I = 5.07 \text{ mM}$.

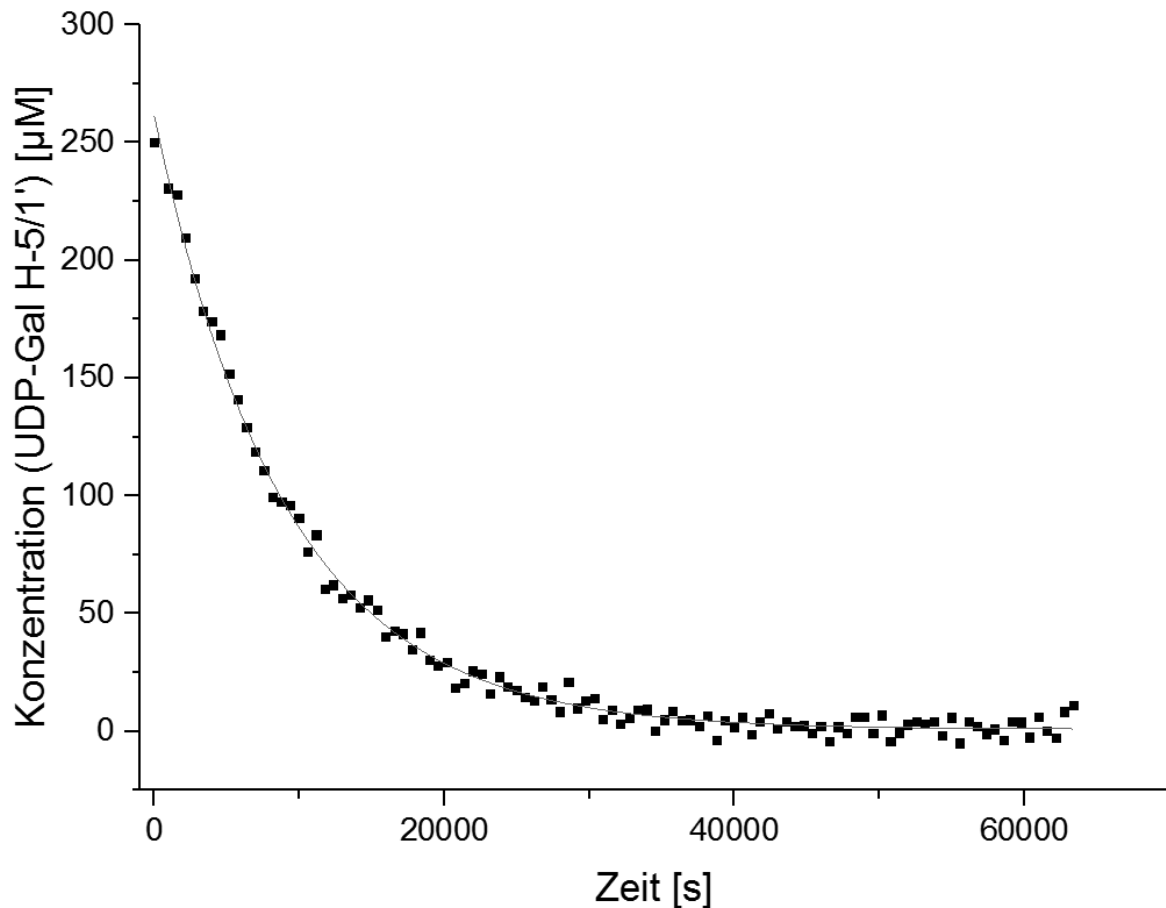


Abbildung 42: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB in Anwesenheit von **13**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition ergibt sich eine Inhibitionskonstante $K_I = 5.07 \text{ mM}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 8.3 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$.

Der Vergleich der K_I - und V_{max} -Werte (Tabelle 5) für GTA und GTB zeigen eindeutig, dass beide Liganden spezifische Inhibitoren für GTA sind. Während der K_I -Wert von **13** für GTA 24-fach größer als der für GTB ist, beträgt der K_I -Wert von **12** für GTA das 161-fache des K_I -wertes für GTB. Der hohe Unterschied beweist die hohe Spezifität der Liganden gegenüber GTA, insbesondere **12**. Vergleich man alle drei Progresskurven von GTB ohne und mit Inhibitoren, so wird deutlich, dass die Umsetzung des Donorsubstrats in Anwesenheit der Inhibitoren **12** oder **13** nicht wesentlich langsamer verläuft als die Umsetzung ohne Inhibitoren (Abbildung 43).

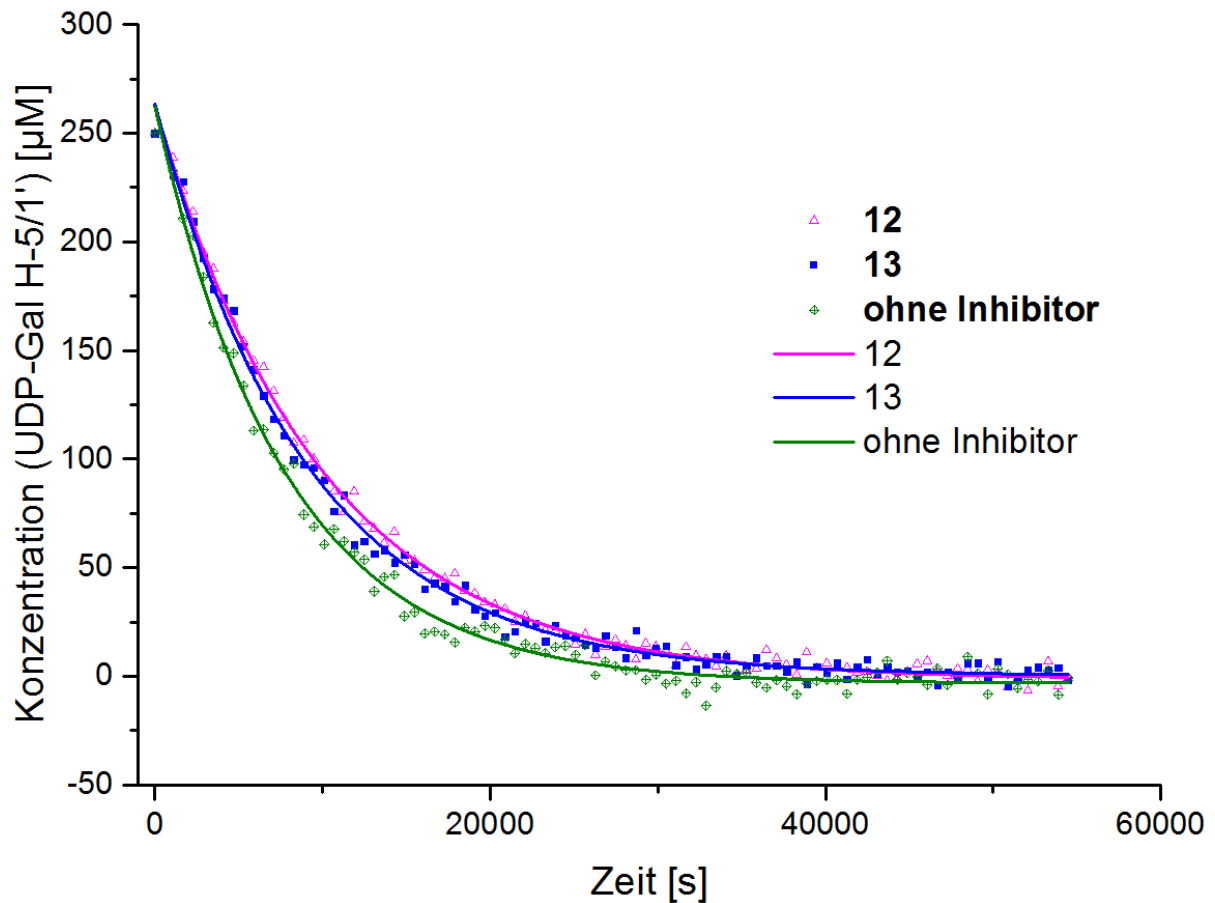


Abbildung 43: Konzentration des Donorsubstrats UDP-Gal, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTB ohne Inhibitor (gekreuzte Vierecke) und in Anwesenheit von **12** (weiße Dreiecke) und **13** (schwarze Quadrate). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe der potentiellen Inhibitoren nicht zu einer Verlangsamung der Umsetzungsgeschwindigkeit von UDP-Gal führt.

	GTA Inhibition durch		GTB Inhibition durch	
	12	13	12	13
K_i [μM]	56.1	212	9383	5069
V_{max} [M/s]	$1.18 \cdot 10^{-7}$	$3.06 \cdot 10^{-8}$	$7.15 \cdot 10^{-8}$	$8.29 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 5: K_i und V_{max} Werte der Inhibitoren **12** und **13** gegenüber GTA und GTB. Deutlich zu erkennen sind die jeweiligen hohen K_i Unterschiede zwischen den Werten gegenüber GTA und GTB, welcher die hohe Spezifität der Liganden zeigt, insbesondere Inhibitor **12**, der 161-fach stärker GTA inhibiert als GTB.

Aus den experimentell bestimmten Daten kann der Schluss gezogen werden, dass die beiden Liganden in der Lage sind, GTA zu inhibieren. Der Inhibitor **12** inhibiert GTA mit einem K_I -Wert von $K_I = 56 \mu\text{M}$ um einen Faktor von 3.8 stärker als **13** mit einem K_I -Wert von $K_I = 212 \mu\text{M}$. Außerdem weisen beiden Mimetika hohe Spezifität gegenüber GTA auf. Während die K_I -Werte der Mimetika gegenüber GTB nur in einstelligem millimolaren Bereich liegen, sind die K_I -Werte von **12** und **13** jeweils um einen Faktor von 161 bzw. 24 kleiner im mikromolaren Bereich. Ob **12** und **13** ebenfalls durch anderen GTs diskriminiert werden, muss durch weitere Experimente mit anderen GTs überprüft werden.

Hier wurde erfolgreich gezeigt, dass der Austausch des Galactosylrestes des nicht-ionischen GTB Inhibitors **11** durch ein *N*-Acetylgalactosylrest zu einem GTA-spezifischen Inhibitor führt. Es besteht die Möglichkeit, dass durch den Tausch der Zuckereinheit die Spezifität dieses donorsubstratanalogen, nicht-ionischen Inhibitors verändert werden kann. Dadurch lassen sich auch Inhibitoren für anderen GTs mit anderem Donorsubstrat synthetisieren und es zeigt das große Potential dieser Molekül-Leitstruktur.

5.2 Verbesserung der nicht-ionischen Inhibitoren: Design, Synthese und Analyse

Bei der Entwicklung des nicht-ionischen Inhibitors für GTA bzw. GTB wurde nach einem alternativen Strukturmotiv gesucht, das die Pyrophosphatgruppe des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal ersetzen kann. Ein solches Motiv soll in der Lage sein, dass für die Katalyse essentielle bivalente Kation Mn^{2+} koordinieren zu können. Der Vorteil eines nichtionischen Inhibitors besteht in seiner verbesserten Bioverfügbarkeit, da er, in seiner acetylierten Form, die Zellmembran passieren kann und so als Wirkstoff eingesetzt werden könnte. Im ersten Teil der Arbeit wurden zwei Inhibitoren **12** und **13** vorgestellt, die statt Uracil ein Harnsäuremotiv besitzen und jeweils ein Pentityl-Linker, der die Harnsäure und das *N*-Acetyl-Galactosefragment miteinander verknüpft. Beide Mimetika sind in der Lage, spezifisch GTA zu inhibieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Pyrophosphatgruppe durch den Pentityl-Linker ersetzt und der Riboseteil des natürlichen Donosubstrats UDP-GalNAc bzw. UDP-Gal überbrückt werden kann, was die Synthese des Liganden deutlich vereinfacht. Durch diese Überbrückung geht ein wenig Bindungsaffinität verloren und es entsteht zusätzlich ein Freiraum in der Bindungstasche von GTA bzw. GTB. Dieser freie Raum kann theoretisch durch eine Modifizierung der Inhibitoren **12** oder **13** mit zusätzlichen Substituenten gefüllt werden. Dadurch können zusätzlichen Wechselwirkungen zum Protein hergestellt werden und die Bindungsaffinität des Liganden kann dadurch verbessert werden. Nach diesem Aspekt werden in diesem Teil der Arbeit nach Modifizierungsmöglichkeiten des nicht-ionischen Inhibitors gesucht.

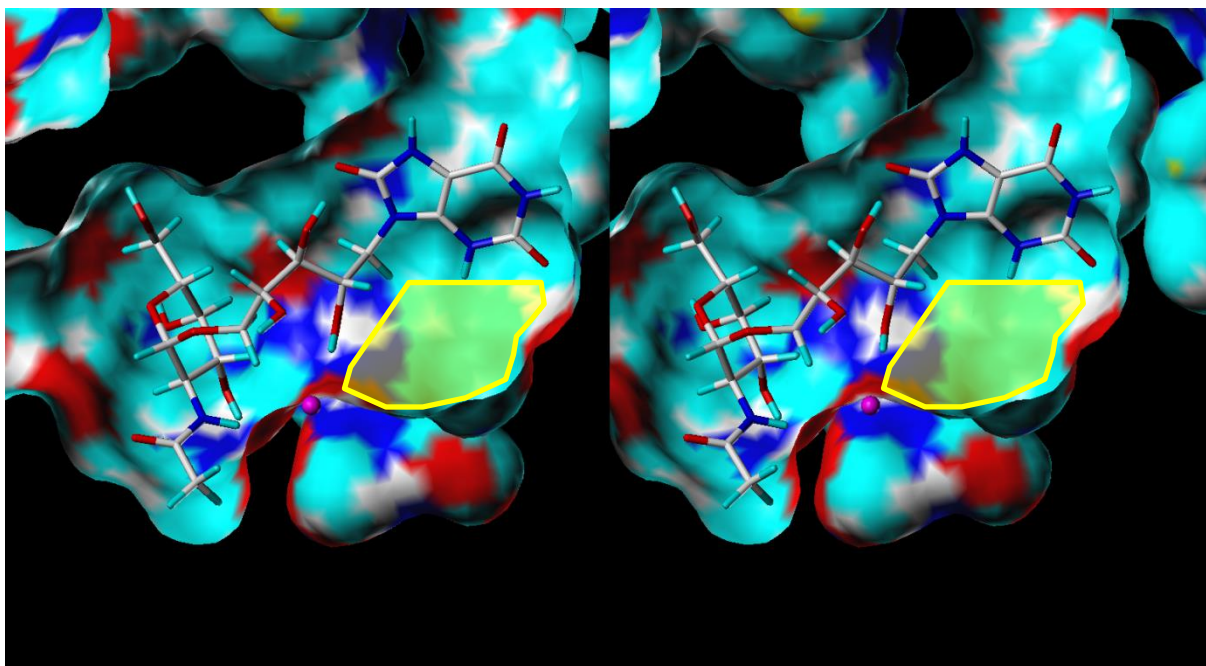
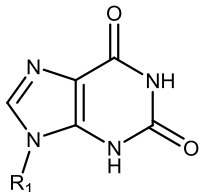
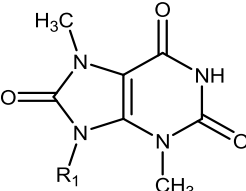
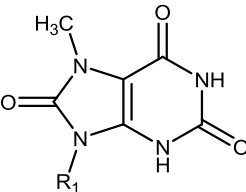
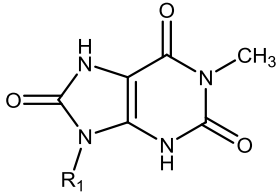
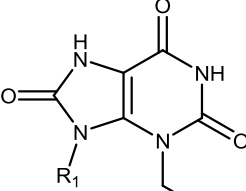
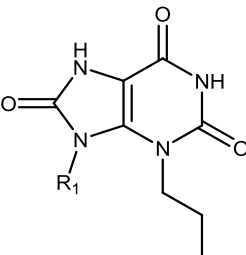


Abbildung 44: *Crossed-eye* Darstellung des Inhibitors **12** in der Bindungstasche von GTA. Durch die Substitution der Pyrophosphatgruppe und der Ribose durch den Ribityl-Linker entsteht ein freier Raum in der Bindungstasche (gelb markierter Bereich). Theoretisch kann dieser freie Raum mit Substituenten gefüllt werden, so dass zusätzliche Wechselwirkungen zum Protein hergestellt werden konnten, die die Bindungsaffinität erhöhen. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

5.2.1 *In silico* Untersuchung der Harnsäurederivate von **12** und **13**

In Abbildung 44 kann man erkennen, dass unterhalb des Harnsäure-Teil des Liganden ein leerer Raum in der Bindungstasche von GTA vorhanden ist, der ursprünglich durch die Ribose des natürlichen Substrat UDP-GalNAc besetzt wird. Dieser Raum kann durch Substituenten besetzt werden, die an der Harnsäure verknüpft sind. Bereits bei den *docking* Studien von bizyklischen Liganden der GTB während der Entwicklung von nicht-ionischem Inhibitor konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Methylgruppen an der Harnsäure zur verbesserten Bindungsenergien führen können.^[45] Um den freien Raum des ursprünglichen Ribosefragment zu füllen, bedarf es einem größeren Alkylrest, der an der 3-*N* Position verknüpft ist. Zusätzliche funktionelle Gruppen an dem Alkylrest, die weitere und stärkere Wechselwirkung mit dem Protein eingehen können, z.B. Wasserstoffbrückenbindung, erhöhen die Bindungsaffinität. Um die geeignete Kettenlänge zu finden, wurden verschiedene *N*-alkylierte Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge von Ligand **12** und **13** in GTA *in silico* analysiert und deren Bindungsenergie berechnet.

Für die Analyse wurde die Kristallstruktur von Patenaude *et al.* verwendet (pdb: 1LZI). Die nicht aufgelösten Regionen wurden durch Homologiemodelling ergänzt und alle anderen Parameter für die Minimierung und die Bindungsenergieberechnung wurden von Abschnitt 5.1.1 übernommen. Die Harnsäurefragmente der Liganden **12** und **13** wurden an 3-*N*-Position mit jeweils zusätzlichen Methyl-, Ethyl- und Propyl-, sowie Hydroxyethylrest ergänzt und ihre berechnete Bindungsenergie jeweils mit der der Liganden **12** und **13** verglichen. Auch für andere Harnsäurederivate, die zusätzlich jeweils an 1-*N* und 7-*N* methyliert sind, wurde die Bindungsenergie berechnet, um zu testen, welche Auswirkung diese Methylierung auf die Bindungsaffinität haben wird. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst. Dabei sind in Tabelle 6 die berechneten Bindungsenergien der Derivate von **12** (mit Ribityl-Linker) und in Tabelle 7 die der Derivate von **13** (mit Arabinityl-Linker). Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Alkylkette am 3-*N* mit steigender Kettenanzahl zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität führt. Die Methylierung am 1-*N* und am 7-*N* verringert jedoch im Allgemeinen die Bindungsaffinität. Dabei besitzt der Ligand **56** mit einer Propylkette und **59** mit einer Hydroxyethylgruppe die beste Bindungsaffinität. In beiden Fällen sind die Positionierungen der beiden Liganden in der Bindungstasche analog zum Ligand **12** bzw. **13**. Die Alkylkette konnte den freien Raum, wo die Ribose ursprünglich war, gut besetzen. Zusätzlich konnte bei Ligand **59** die terminale Hydroxyethylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phe 121 des Proteins eingehen, wie es auch bei der Ribose des natürlichen Liganden der Fall ist (Abbildung 45).^[30] Durch diese Wechselwirkung konnte der Ligand stärker am Protein gebunden werden und die berechnete Bindungsenergie des Liganden **59** nähert sich mit einem Wert von -50.39 kcal/mol dem Wert des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc (-55.18 kcal/mol, siehe Tabelle 1). Es gibt keinen großen Unterschied in den berechneten Bindungsenergien zwischen Liganden mit Ribityl- und Arabinityl-Linker.

Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 12 [kcal/mol]	
	51	-44.263	0.230
	52	-46.133	-1.640
	53	-43.704	0.789
	54	-42.462	2.031
	55	-48.160	-3.667
	56	-48.977	-4.484

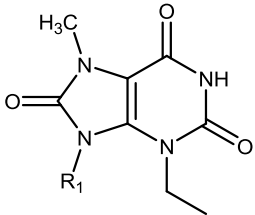
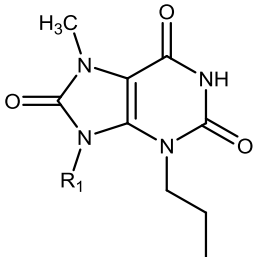
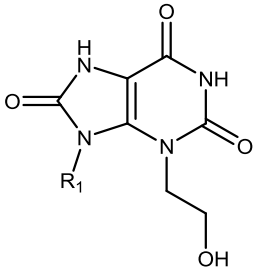
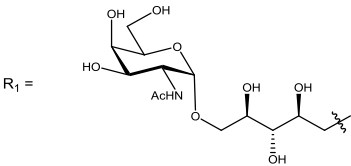
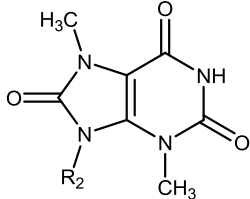
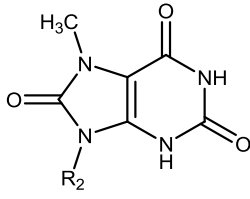
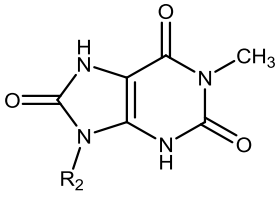
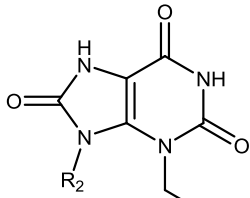
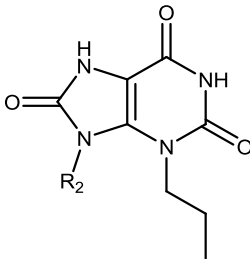
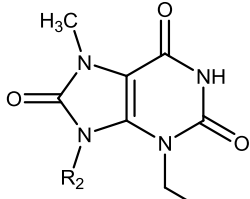
Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 12 [kcal/mol]
	-48.061	-3.568
	-48.493	-4.000
	-50.388	-5.895
		

Tabelle 6: Die berechnete Bindungsenergie der Liganden **51** bis **59** der GTA und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum Ligand **12**. Alle Liganden sind Derivate des Liganden **12** (mit Ribityl-Linker) und unterscheiden sich jeweils in ihrer Alkylkette und deren Position an der Harnsäure. Der Ligand **59** besitzt die beste Bindungsaffinität und kann mit seiner Hydroxyethylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Phe 121 des Proteins bilden. Die Methylierung am 1-N und am 7-N führt zu einer geringen Abnahme der Bindungsaffinität.

Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 13 [kcal/mol]	
	60	-45.800	-2.378
	61	-42.742	0.680
	62	-43.525	-0.103
	63	-48.525	-5.103
	64	-51.245	-7.823
	65	-48.879	-5.457

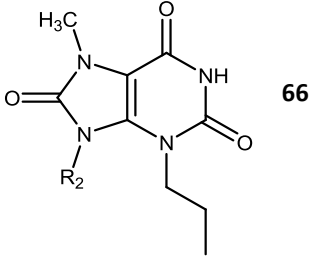
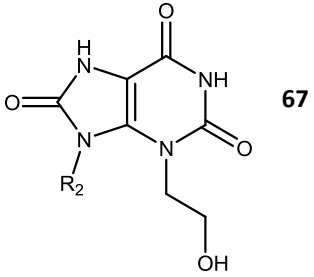
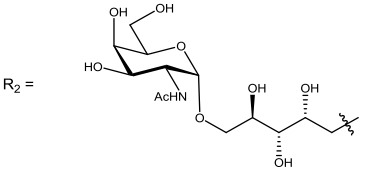
Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 13 [kcal/mol]
 66	-49.113	-5.691
 67	-49.498	-6.076
 R ₂ =		

Tabelle 7: Die berechnete Bindungsenergie der Liganden **60** bis **67** der GTA und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum Ligand **13**. Im Gegensatz zur Tabelle 6 sind alle Liganden hier Derivate des Liganden **13** (mit Arabinityl-Linker) und unterscheiden sich jeweils in ihrer Alkylkette und deren Position an der Harnsäure. Der Ligand **64** besitzt die beste Bindungsaffinität. Die berechneten Bindungsenergien sind relativ ähnlich wie die in Tabelle 6.

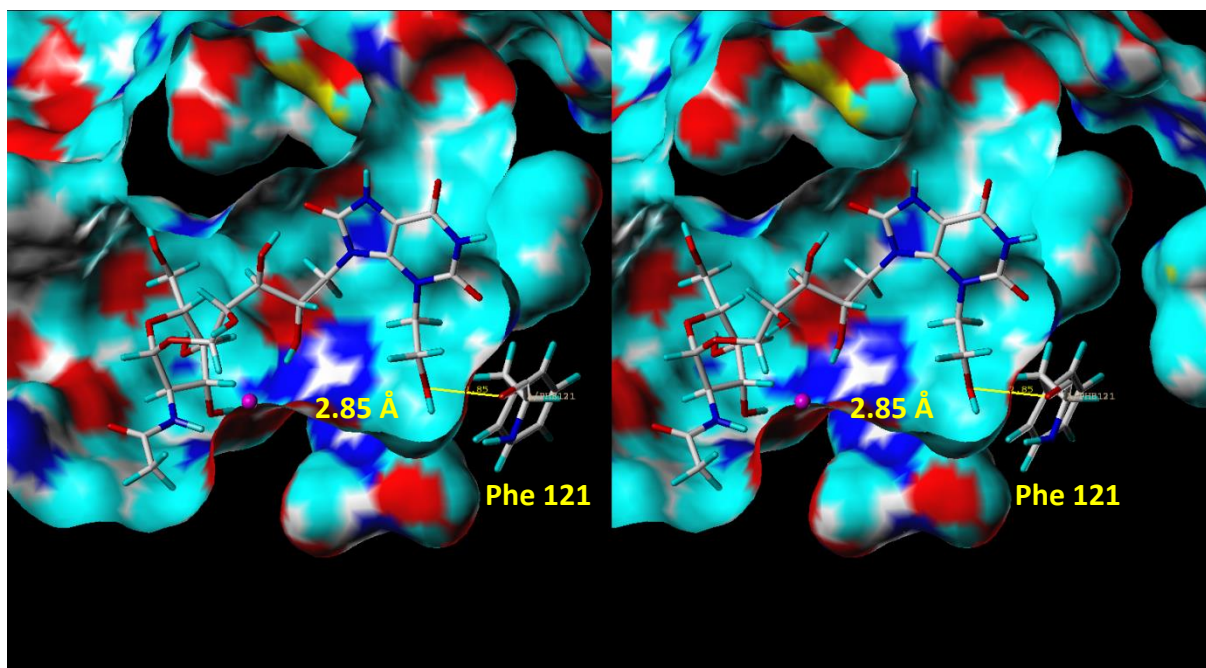


Abbildung 45: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **59** in der Bindungstasche der GTA nach der Minimierung. Der Abstand zwischen dem O-Atom der OH-Gruppe des Liganden und dem Carbonyl-O-Atom des Phe 121 beträgt 2.85 Å. Hier kann eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden. Die berechnete Bindungsenergie nähert sich mit einem Wert von -50.39 kcal/mol dem Wert des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc mit einem Wert von -55.18 kcal/mol. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

In Abbildung 45 kann gezeigt werden, dass die Bindungstasche oberhalb des Harnsäurerests ebenfalls freien Raum aufweist. Auf die gleiche Art und Weise könnte der Raum durch eine Alkylkette besetzt werden. Dafür wurde das Harnsäuregerüst weiter an 7-*N* mit Propyl- und Hydroxyethylgruppen modifiziert und wie zuvor die Bindungsenergien der Derivate berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Alkylkette bzw. Hydroxyethyl-Kette ca. 2 kcal/mol zu der Bindungsenergie beitrug (Tabelle 8 und Tabelle 9). Die zusätzliche Hydroxygruppe kann mit dem Carbonyl-O-Atom des Arg 353, das sich oberhalb in der Bindungstasche befindet, eine Wasserstoffbrückenbindung aufbauen. Der Ligand **69** (mit Ribityl-Linker) bzw. **72** (mit Arabinityl-Linker) besitzen jeweils eine Bindungsenergie von -52.04 kcal/mol bzw. -52.42 kcal/mol, welche sich nahezu dem Wert des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc (-55.18 kcal/mol) annähern. Mit ihren zwei Hydroxygruppen sind sie in der Lage, sowohl mit Phe 121 als auch mit Arg 352 Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (Abbildung 46).

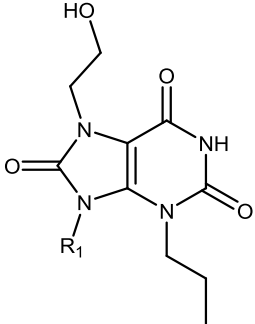
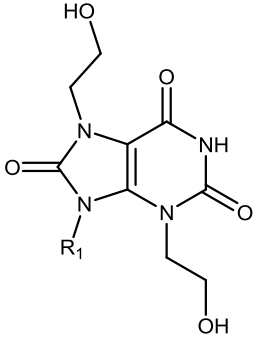
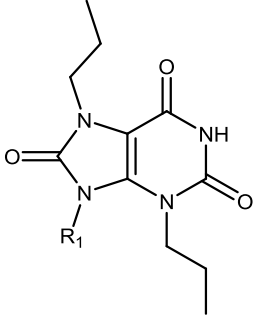
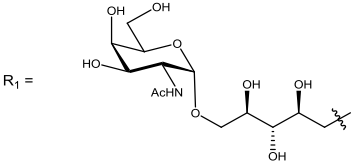
Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 12 [kcal/mol]
	-50.396	-5.903
	-52.044	-7.551
	-51.067	-6.574
		

Tabelle 8: Die berechnete Bindungsenergie der zweifach alkylierten Derivate **68-70** des Liganden **12** der GTA und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum Ligand **12**. Die zwei Hydroxygruppen des Liganden **69** können mit dem Carbonyl-O-Atom des Arg 353 und Phe 121 des Proteins Wasserstoffbrückenbindungen bilden und daher besitzt hier er die beste Bindungsenergie mit einem Wert von -52.044 kcal/mol.

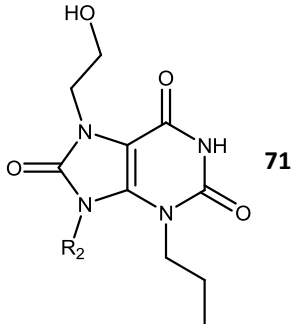
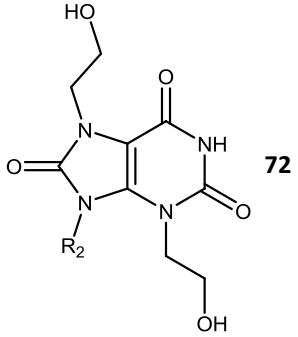
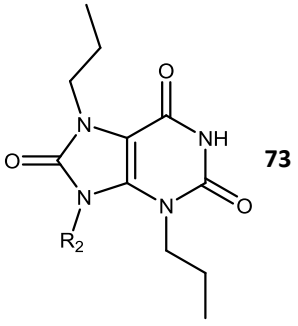
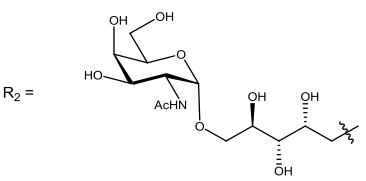
Ligand	Berechnete Bindungsenergie [kcal/mol]	Relative Bindungsenergie ΔE gegenüber Ligand 13 [kcal/mol]
	-52.517	-9.095
	-52.420	-8.998
	-51.936	-8.514
		

Tabelle 9: Die berechnete Bindungsenergie der zweifach alkylierten Derivate **71-73** des Liganden **13** in GTA und ihre relative Bindungsenergie im Vergleich zum Ligand **13**. Wie bei Ligand **69** aus Tabelle 8 können die zwei Hydroxygruppen des Liganden **72** mit dem Carbonyl-O-Atom des Arg 353 und Phe 121 des Proteins Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Mit einem Wert von -52.420 kcal/mol nähert sich die berechnete Bindungsenergie des Liganden **72** nahezu dem Wert des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc (-55.175 kcal/mol) an.

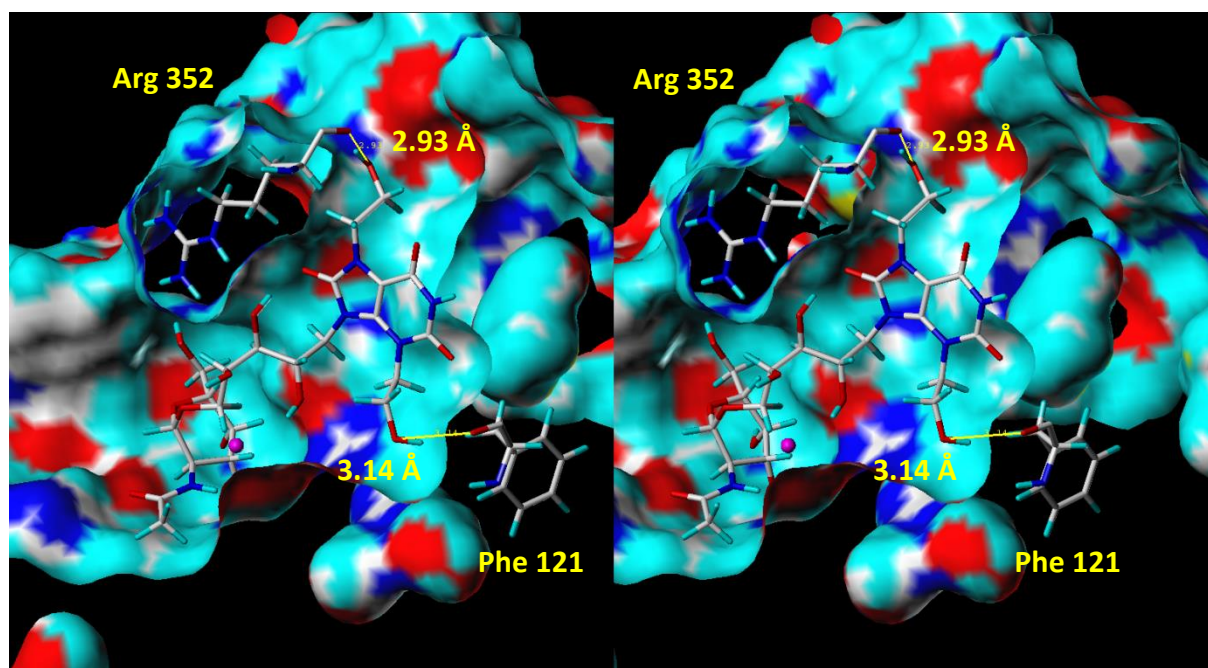


Abbildung 46: *Crossed-eye* Darstellung des Liganden **69** in der Bindungstasche der GTA nach der Minimierung. Der Abstand zwischen dem O-Atom der 3-*N*-Hydroxyethyl-OH-Gruppe des Liganden und dem Carbonyl-O-Atom des Phe 121 beträgt 3.14 Å (unten) und zwischen dem O-Atom der 7-*N*-Hydroxyethyl-OH-Gruppe des Liganden und dem Carbonyl-O-Atom des Arg 353 beträgt 2.93 Å (oben). Dort können jeweils zwei Wasserstoffbrückenbindungen aufgebaut werden. Die berechnete Bindungsenergie hat einen Wert von -52.04 kcal/mol und nähert sich noch weiter an die Bindungsenergie des natürlichen Donorsubstrats UDP-GalNAc mit -55.18 kcal/mol an. (Darstellungsform: Protein: *Connolly* Oberfläche, Ligand: *capped sticks*, Enzymoberfläche nach Atomtyp eingefärbt, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Kohlenstoff, cyan: Wasserstoff, gelb: Schwefel)

Allgemein konnten *in silico* Berechnungen zeigen, dass die zusätzliche Propyl- bzw. Hydroxyethylgruppe zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität beiträgt. Mit den zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen können die Liganden stärker am Protein gebunden werden und die Bindungsaffinität von Ligand **12** bzw. **13** verbessert werden. Bevor diese Derivate synthetisiert und getestet werden, ist es sinnvoll, zuerst nur die modifizierte Harnsäure als Fragment ohne den Linker und *N*-Acetylgalactose zu untersuchen, um zu überprüfen, ob die zusätzlichen Alkylketten tatsächlich zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität beitragen könnten. Dafür werden zuerst die alkylierte Harnsäurederivate (z.B. Ligand **56** ohne R₁) synthetisiert und untersucht.

5.2.2 Synthese der alkylierten Harnsäurederivate

Für die Synthese der alkylierten Harnsäurederivate soll ein Syntheseweg gefunden werden, der sich später in den Syntheseweg von Ligand **12** und **13** integrieren lässt. Wenn sich am Ende heraus stellt, dass die alkylierten Harnsäurederivate tatsächlich eine verbesserte Bindungsaffinität vorweisen, können die *in silico* berechneten Liganden von Tabelle 6 bis Tabelle 9 ohne weitere größere Veränderung des bestehenden Syntheseweges synthetisiert werden. Aus diesem Grund werden die alkylierten Harnsäurederivate nicht ausgehend von Harnsäure gewonnen werden. Außerdem verläuft eine Alkylierung an Harnsäure nicht regioselektiv. Vielmehr soll das Harnsäuregerüst wie bei Ligand **12** und **13** aus Uracilderivat aufgebaut werden. Für die Synthese der alkylierten Harnsäurederivate wurde ein allgemeiner Syntheseweg vorgeschlagen (Abbildung 47). Mit diesem Syntheseweg wird die Kopplung des *N*-Acetylgalactose-Linker-Fragments trotzdem ermöglicht, wenn die vollständigen Alkylderivate von Mimetika **12** oder **13** synthetisiert werden sollen.

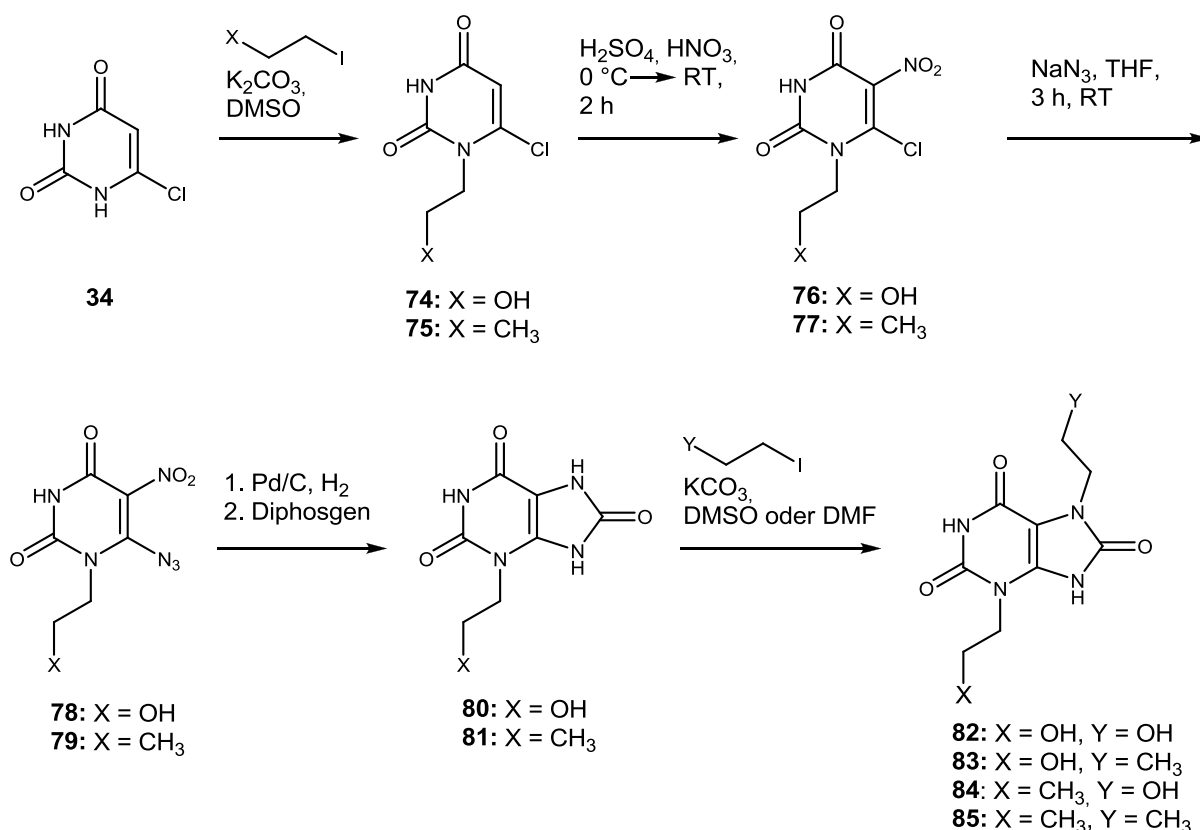


Abbildung 47: Vorgeschlagerener allgemeiner Syntheseweg der alkylierten Harnsäurederivate. Da eine Alkylierung an der Harnsäure nicht regioselektiv verläuft, wird das Harnsäuregerüst wie bei der Synthese von Liganden **12** und **13** aus Uracilderivaten aufgebaut. Außerdem lässt sich dieser Syntheseweg auf dieser Art und Weise einfach in den Syntheseweg von Liganden **12** und **13** integrieren, so dass eine Synthese der Liganden von Tabelle 6 bis Tabelle 9 ohne große Veränderung des bestehenden Syntheseweges ermöglicht wird. Das 6-Chloruracil wird zuerst am 1-*N* alkyliert und danach zu **76** oder **77** nitriert.^[63, 75] Das Chlorid wird in das entsprechende Azid überführt,^[76] das danach zusammen mit der Nitrogruppe zu dem entsprechenden Diamin reduziert wird.^[40] Anschließend wird *in situ* zur Harnsäure **80** oder **81** cyclisiert.^[64] Durch die Zugabe von weiterem Alkyljodid können die zweifach alkylierten Derivate synthetisiert werden.

Das 6-Chloruracil wird zuerst mit Alkyljodid am 1-N alkyliert und danach am C-5 nitriert.^[63, 75] Das Chlorid wird in der nachfolgenden Reaktion durch ein Azid substituiert,^[76] das danach gleichzeitig mit der Nitrogruppe unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium auf Aktivkohle (10%) als Katalysator zu dem entsprechenden Diamin reduziert wird.^[40] Anschließend wird der anellierte Fünfring *in situ* mit dem Zusatz von Diphosgen aufgebaut.^[64] Durch die Zugabe eines weiteren Äquivalents Alkyljodid kann die 3-N-Alkylharnsäure am 7-N alkyliert werden.^[75]

Um die allgemeine Durchführbarkeit dieser Synthesestrategie zu überprüfen, wurde zuerst der Ligand **81** mit 3-N-Propylrest dargestellt. Die Synthese begann mit der Alkylierung des 6-Chloruracil (**34**), das aus 2,4,6-Trichlorpyridin (**33**) nach Cresswell *et al.* erhalten wurde.^[62] Dafür wurde **34** mit 1-Iodpropan und Kaliumcarbonat in DMSO für 3 h bei Raumtemperatur gerührt.^[75]

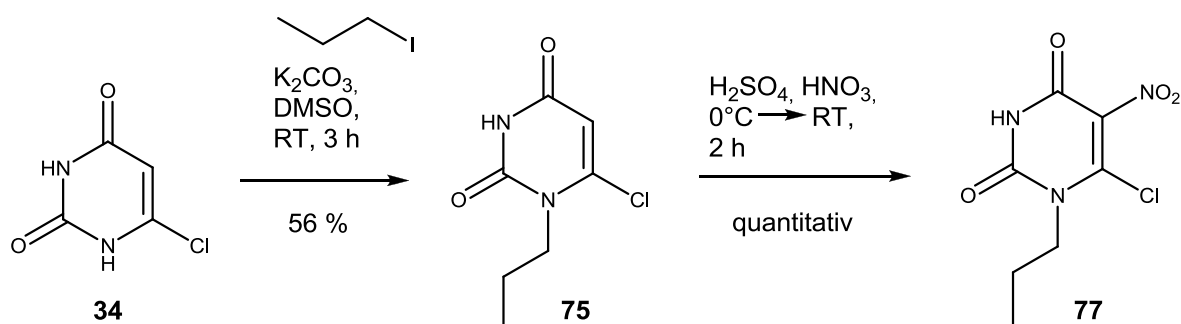


Abbildung 48: Synthese der 1-Propyl-5-Nitro-6-Chloruracil (**77**). Das 6-Chloruracil (**34**) wurde zuerst unter alkalische Bedingung bei Raumtemperatur mit 1-Iodpropan am 1-N alkyliert und danach mit Nitriersäure am C-5 nitriert.^[63, 75]

Das Propyl-Chloruracil (**75**), das mit einer Ausbeute von 56% erhalten wurde, wurde zu **77** nitriert^[63] und es wurde zuerst versucht, das Chloratom des Nitro-Chloruracils **77** mit Ammoniak^[77] zu **86** zu substituieren, in dem **77** in 25%igem Ammoniak für 1 h zum Rückfluss erhitzt wurde. Es konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. Deshalb wurde statt der Substitution des Chlorids zu Amin eine Substitution zu Azid **79** durchgeführt. Diese Azidgruppe konnte in der nachfolgenden Hydrierungsreaktion der Nitrogruppe gleichzeitig zu Amin reduziert werden. Dafür wurde **77** in THF gelöst und mit Natriumazid für 3 h bei Raumtemperatur gerührt.^[76]

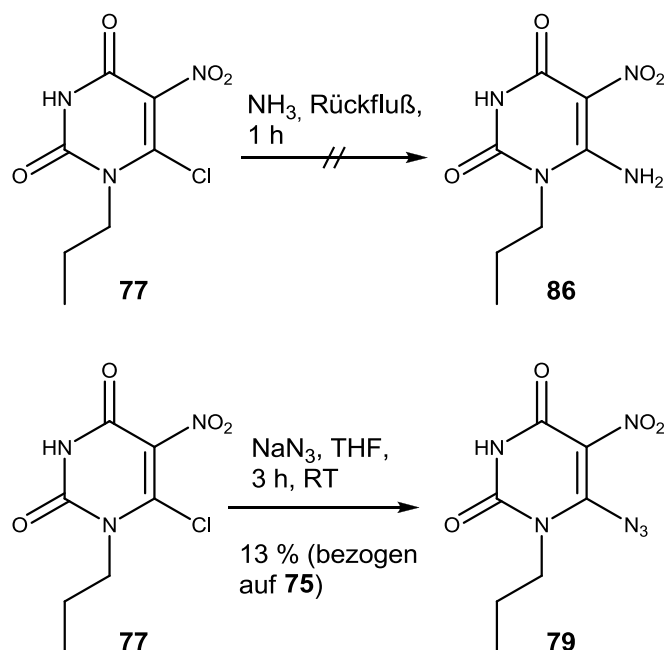


Abbildung 49: Einführung eines Stickstoffatoms am C-6 des Pyrimidingerüsts. Bei dem Versuch eine Aminogruppe am C-6 einzuführen, indem 6-Chlor-5-nitro-1-propyluracil (**77**) in 25%igem Ammoniak für 1 h zum Rückfluss erhitzt wurde, konnte kein Produkt erhalten werden.^[77] Deshalb wurde statt einer Aminogruppe eine Azidgruppe am C-6 eingeführt, die in der nachfolgenden Reaktion gleichzeitig mit der Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert werden kann. Dazu wurde **77** mit Natriumazid in THF für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt 6-Azido-5-nitro-1-propyluracil (**79**) konnte mit einer Ausbeute von 13 % (bezogen auf **75** über zwei Stufen) erhalten werden.^[76]

Die Nitro- und Azidgruppe von Verbindung **79** wurden mit Palladium auf Aktivkohle (10%) als Katalysator unter 36 bar Wasserstoffatmosphäre im Autoklaven bei Raumtemperatur zum Diamin reduziert und anschließend zum Fünfring *in situ* mit dem Zusatz von Diphosgen und DIPEA in abs. THF mit einer Ausbeute von 4 % cyclisiert.^[40, 64] Da in diesem Fall die Reaktion im Gegensatz zur Synthese von Ligand **12** und **13** nicht in Ethanol durchgeführt wurde, entstand kein Ethyl-Carbamat als Zwischenprodukt (siehe Seite 41 und 45).

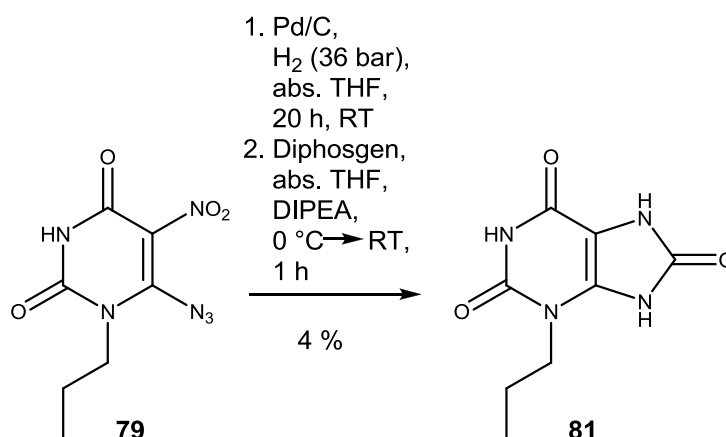


Abbildung 50: Synthese der 3-Propyl-1,7,9-trihydropurin-2,6,8-trion (**81**). Die Reaktion verlief in zwei Stufen. Zuerst wurde die Azid- und Nitrogruppe von **79** mit Hilfe von Pd/C (10%) und H₂ zum Diamin reduziert und anschließend zum Fünfring *in situ* mit dem Zusatz von Diphosgen und DIPEA in abs. THF cyclisiert.^[40, 64]

Mit der Synthese von **81** konnte gezeigt werden, dass der in Abbildung 47 gezeigte allgemeine Syntheseweg durchführbar ist. Die Synthese von weiteren alkylierten Harnsäurederivate wurde jedoch im Rahme dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt.

5.2.3 Progresskurvenanalyse

Das inhibitorischen Potenzial des Liganden **81** gegenüber GTA wurde untersucht. Dafür wurden NMR basierte Inhibitionsassays mit den Liganden durchgeführt und resultierenden Konzentrations-Zeit-Verläufe mittels Progresskurvenanalytik untersucht. Die Enzymreaktion wurde in 50 mM BisTris-*d*₁₉ Puffer (50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT-*d*₁₀, 1 µg/µL BSA und 10 U alkalischer Phosphatase) bei 310 K mit NMR Spektroskopie verfolgt. Die Zugabe von alkalischer Phosphatase verhindert eine Produktinhibition, welche das entstehende UDP zu UMP umsetzt. Als Akzeptorsubstrat wurde α-L-Fuc-(1,2)-β-D-Gal-octyl verwendet, das in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat UDP-GalNAc hinzugefügt wurde, um eine quasi konstante Konzentration über dem gesamten Experiment annehmen zu können. Das Donorsubstrat wurde in einer Konzentration von 150 µM und GTA mit einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Der Ligand **81** wurde mit einer Konzentration von 1.5 mM hinzugefügt.

Die Probe wurde zunächst ohne das Donorsubstrat vorbereitet und die NMR-spektroskopischen Parameter ermittelt. Nach der Zugabe von Donorsubstrat wurde alle 10

Minuten ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum mit 128 *scans* und *excitation sculpting* als Wasserunterdrückung bei 310 K für 18.5 Stunden aufgenommen.

Die Konzentration der UDP-GalNAc wurde anhand des Integrals der H-5/H-1'-Protonen von UDP-GalNAc berechnet und gegen die Zeit aufgetragen, um die Progresskurve aufzustellen. Der *Offset* wurde im Gegensatz zu der Auswertung von **12** und **13** (siehe Seite 57) nicht aus dem Mittelwert der letzten 20 Konzentrationen verwendet, sondern aus dem der letzten 10 Konzentrationswerte, ansonsten führt dies zu einer Fehler in der Kurvenanpassung bei Matlab. Nach Betrachtung der Progresskurve scheint die Reaktion nicht abgeschlossen zu sein. Jedoch näherte sich die Konzentration vermutlich während der letzten 10 Messwerte einem Minimum an und deshalb kann durch Verwendung von dem Mittelwert der letzten 10 Konzentrationen zu einem Ergebnis führen. Mit Hilfe von Gleichung (G1-9) konnte ein K'_M -Wert $K'_M = 578 \pm 8 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 3.8 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$ bestimmt. Dies ergab gemäß der Gleichung (G1-8) eine Inhibitionskonstante $K_I = 113 \mu\text{M}$.

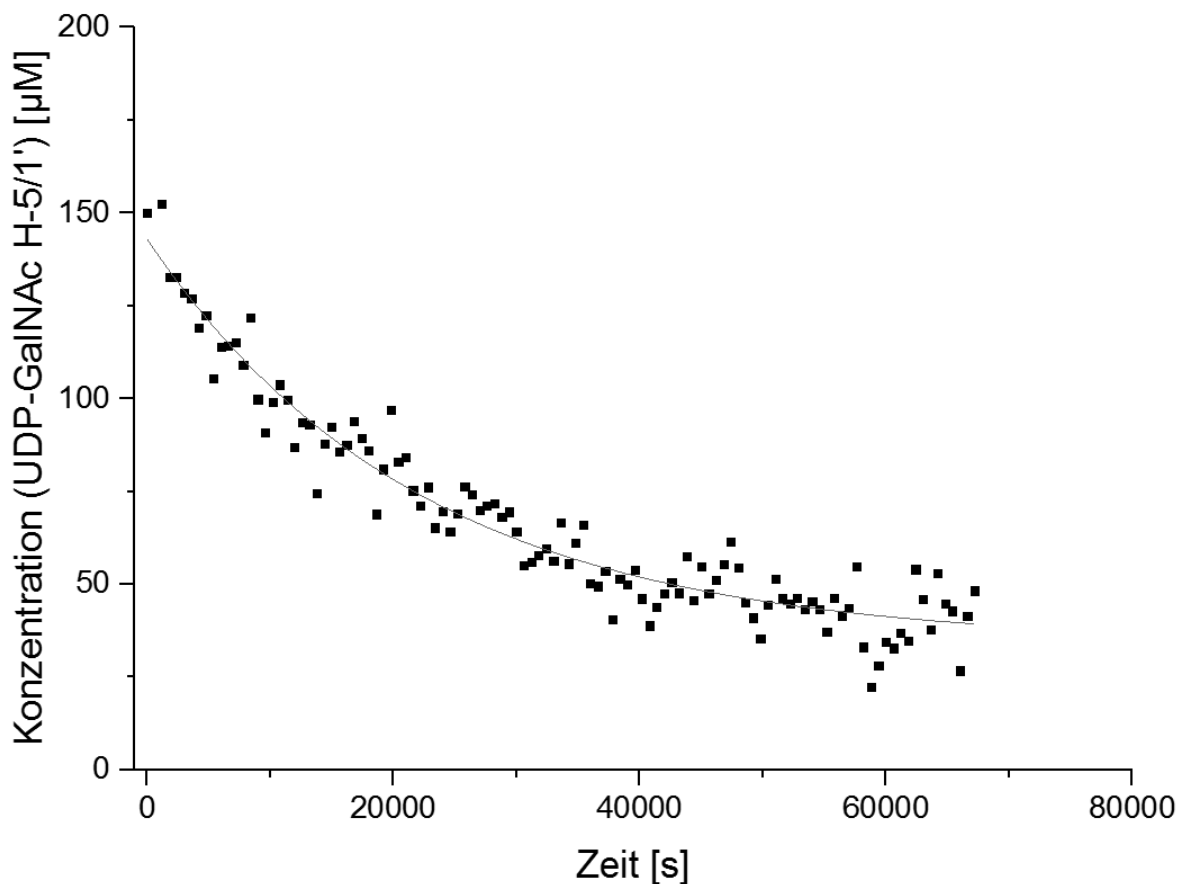


Abbildung 51: Progresskurve der Konzentration des Donorsubstrats UDP-GalNAc, berechnet anhand des H-5/H-1'-Integrals, im zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion von GTA in Anwesenheit von **81**. Unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei kompetitiver Inhibition ergibt sich eine Inhibitionskonstante $K_I = 113 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit $V_{max} = 3.8 \cdot 10^{-8} \text{ M/s}$.

Das Ergebnis zeigt, dass die zusätzliche Propylgruppe das Inhibitionspotential der Harnsäure deutlich verbessert kann. Im Vergleich zur Harnsäure, deren K_I -Wert 1.7-3.5 mM gegenüber GTB beträgt,^[45] ergibt sich eine Verbesserung um den Faktor 15 bis 31. (Da GTA und GTB hoch homologe Enzyme sind, sind die Werte vergleichbar.) Der K_I -Wert von $K_I = 113 \mu\text{M}$ liegt zwischen die K_I von **12** und **13**, ist doppelt so groß wie die K_I von **12** und zweifach kleiner als die K_I von **13**. Das bedeutet, dass **81** mit der Anwesenheit der Propylgruppe und ohne das Linker-Fragment besser an GTA bindet, als **13** mit der Anwesenheit des Linker-Fragments. Die Propylgruppe leistet mit der zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkung zum Protein einen Beitrag zur Bindung, der sogar höher ist als der des Arabinityl-Linkers.

Es kann angenommen werden, dass das strukturell ähnliche Molekül **80** mit seiner OH-Gruppe, die eine weitere Wasserstoffbrücke-Bindung mit dem Enzym eingehen kann, zu noch höhere Bindung führen kann. Allerdings wird die Bioverfügbarkeit schlechter, da die zusätzliche polare Gruppe den Transfer durch die Zellmembran erschwert. Auch ein weiterer zusätzlicher Propyl-Rest an der Harnsäure wie z.B. **85** könne die Bindungsaffinität noch weiter erhöhen. Diese Moleküle konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden und die Annahmen noch nicht bestätigt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Software

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
DC-Alufolie	Alugram [®] Xtra SIL G/UV ₂₅₄	Machery-Nagel
	TLC Silica gel 60 F ₂₅₄	Merck
ESI-TOF	6224 ESI-TOF Gekoppelt an Agilent HPLC 1200 Series	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2, Alpha 1-4	Martin Christ
NMR 400 MHz	AMX 400	Bruker Biospin GmbH
NMR 500 MHz	DRX 500	Bruker Biospin GmbH
NMR 600 MHz	Avance III HD 600	Bruker Biospin GmbH
NMR 700 MHz	Avance I 700	Bruker Biospin GmbH
NMR Probenröhrchen	3 mm match	Hilgenberg
	Typ507-HP7	Norell
pH-Meter	pH 526	WTW
Polarimeter	P8000	A.Kruss Optronic
Reinstwasseranlage	SG Ultra Clear UV 18.2 MΩ	SGwater
Rotationsverdampfer	Laborota 4000,	Heidolph
	Hei-VAP Advantage	
Schmelzpunktbestimmung	Melting Point B-545	Büchi

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Ultraschallbad	Sonorex Super, RK512H	Bandelin
UV/Vis Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000C	Thermo Scientific™
Zentrifugen	5804R, 5417R, 5415D	Eppendorf

Software	Hersteller
ChemDraw Pro 11.0	CambridgeSoft
MATLAB R2012a	MathWorks
OriginPro 9.1G 64Bit	OriginLab
Sybyl X 1.3	Tripos
Topspin 3.2	Bruker BioSpin GmbH

6.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

Hersteller	Chemikalie
abcr GmbH	Trichloracetonitril, Tritylchlorid
Acros Organics	abs. Acetonitril, abs. Dichlormethan, abs. Ethanol, abs. Pyridin, abs. Tetrahydrofuran
Alfa Aesar	Anionenaustauscher Dowex 1x2, BF ₃ ·Et ₂ O, Diphosgen, 2,4,6-Trichlorpyrimidin
BioRad	Biogel P2

6 Experimenteller Teil

Hersteller	Chemikalie
Cambridge Isotope Lab. Inc.	BisTris- <i>d</i> ₁₉ , DTT- <i>d</i> ₁₀
Deutero	D ₂ O, DMSO- <i>d</i> ₆
Eurisotop	CDCl ₃ , Methanol- <i>d</i> ₄
Fluka	Ammoniumformiat, Methanol, Salpetersäure (rauchend), TMSOTf
Grüssing	Ameisensäure, Ammoniak, Essigsäureanhydrid, MgSO ₄ , Natriumacetat, NaHCO ₃ , Natriumnitrit, Natriumthiosulfat
Honeywell	Ammoniumchlorid, Essigsäure
Iris Biotech	DIPEA
Merck	Ammoniumcer(IV)-nitrat (CAN), <i>N</i> -Bromsuccinimid, Celite, Essigsäure, Hydroxylammoniumchlorid, 1-Iodpropan, K ₂ CO ₃ , Kieselgel, Kupfersulfat, Molekularsieb 3 Å und 4 Å, Natriumazid, Pd/C (10 %), Pyridin, Zinkbromid
Riedel de Haen	HBr 33% in Essigsäure, Natrium
Roche Diagnostics	Alkalische Phosphatase
SigmaAldrich	D-Arabinose, Camphersulfonsäure, 1,4-Dioxan, MgCl ₂ , abs. Methanol, Pd/C (10 %), D-Ribose, UDP-Gal, UDP-GalNAc
TCI	4-Penten-1-ol
Th. Geyer	NaOH
VWR	Chloroform, NaCl, Salzsäure 37%, Schwefelsäure 98%, Tetrahydrofuran
Westphalen	H ₂

6.3 Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
50 mM BisTris- <i>d</i> ₁₉	50 mM BisTris- <i>d</i> ₁₉ 5 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mM DTT- <i>d</i> ₁₀ 10 U/180 µL alkalische Phosphatase 1 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA) pH 6.7

6.4 Molecular Modelling

Für das *molecular modelling* wurde der Programm SYBYL-X 1.3 (Tripos) verwendet.

6.4.1 Vorbereitung der Kristallstruktur

Für Dockingstudien mit der GTA wurde die Kristallstruktur von Patenaude *et al.* aus dem Jahr 2002 verwendet (pdb: 1LZI).^[26] Die Auflösung beträgt 1.35 Å und der R-Wert 0.20. Die Kristallstruktur wurde in SYBYL importiert und mit dem *structure preparation tool* das Kristallwasser sowie die Hg²⁺ Ionen entfernt. Die nicht aufgelösten Regionen wurden durch Homologiemodelling ergänzt, die Liganden auf eine neue Ebene extrahiert und Wasserstoffatome hinzugefügt. Um die als kovalente Bindung dargestellt koordinative Bindung des Mn²⁺-Ions zu entfernen, wurde das Mn²⁺-Ion auf eine neue Ebene extrahiert und wieder zurück eingefügt. Das bivalente Mn²⁺ und das DXD-Motiv (Asp 21, Val 212, Asp 213) wurden als starre Aggregate definiert. Die Partialladung wurde mit Amber 7 für das Protein (und Gasteiger-Marsili für die Liganden) berechnet und als Kraftfeld wurde das Tripos-Kraftfeld (Dielektrizitätsfunktion: distance, ε= 15) verwendet. Die Energie wurde in 1000 Iterationen (Terminierung ΔE= 0.05) minimiert. Die Struktur des minimierten Proteins wurde dann mit der des nicht-minimierten Proteins verglichen. Wenn zu große Abweichungen in der Struktur vorliegen, muss die Prozedur nochmal durchgeführt werden.

Für *docking* mit GTB wurde die von Alfaro *et al.* in 2008 publizierte Kristallstruktur der humanen GTB verwendet (pdb: 2RJ8), welche mit UDP, H-Antigen-Akzeptoranalogen Octyl-2-O-(α -L-fucopyranosyl)- β -D-galactopyranosid und Mn^{2+} cokristallisiert wurde.^[30] Die Auflösung beträgt 1.69 Å und der R-Wert 0.22. Die Kristallstruktur wurde analog zur GTA vorbereitet und minimiert.

6.4.2 Docking von Liganden

Für das *docking* wurde der Ligand zuerst im Programm gezeichnet. Dabei wurde das Donorsubstrat UDP-Gal, welches von der Kristallstruktur der chimären GTB (AABB, pdb: 2RJ7) stammt, als Vorlage genommen und entsprechend modifiziert. Danach wurde die fehlenden Wasserstoffatome des Liganden (und des Akzeptors, falls mit Akzeptor gedockt wurde) ergänzt und die Partialladung nach Gasteiger Marsili hinzugefügt. Der Ligand wurde dann in das minimierte Protein eingefügt und zusammen mit Protein in 100 Iterationen minimiert. Die Parameter, die für die Minimierung des Proteins verwendet wurde, wurden hier für die Minimierung ebenfalls eingesetzt. Die Strukturen vor- und nach der Minimierung wurden verglichen, der minimierte Protein-Ligand Komplex wurde auf eine neue Ebene kopiert und der Ligand extrahiert. Nach Berechnungen der Energie des freien Liganden (E_{Ligand}) und des Proteins ohne Ligand (E_{protein}) konnte die Bindungsenergie nach Gleichung (GI-1) berechnet werden.

6.5 Progresskurvenanalyse

Die Experimente für die Verfolgung der Enzymreaktion zur Bestimmung der K_M , V_{max} und K_I Werte wurden mit Hilfe des 600 MHz Spektrometers in 3 mm NMR Probenröhrchen mit einem Gesamtvolumen von 180 μL bei 310 K durchgeführt. Für die Messung wurde 50 mM BisTris- d_{19} Puffer verwendet. Das entsprechende Enzym wurde zuerst in BisTris- d_{19} Puffer überführt, indem die Enzym-Lösung in einem Amicon® Ultra Zentrifugationsröhrchen mit einem Ausschlussgröße von 5000 g/mol bei 4 °C und 4000 G zentrifugiert wurde. Der Volumenüberschuss des Messpuffers bei diesem Vorgang betrug mindestens 4 : 1. Dieser Vorgang wurde 4 Mal durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde danach photometrisch bestimmt und die Enzym-Lösung entsprechend auf die gewünschte Konzentration mit 50 mM BisTris- d_{19} Puffer verdünnt. Um eine Produktinhibition zu vermeiden, wurde die Probenlösung mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA und 10 U (10 μL einer 0.27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Lösung) alkalischer

Phosphatase in BisTris- d_{19} Puffer versetzt. Als Akzeptor wurde α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl verwendet und in einem zehnfachen Überschuss gegenüber dem Donorsubstrat zugesetzt.

Die verwendete Proteine GTA und GTB, sowie das Akzeptorsubstrat α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-octyl wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peters der Universität Lübeck freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Messung wurde zuerst die Probe ohne das Donorsubstrat vorbereitet und ein ^1H -NMR Spektrum mit *excitation sculpting* (Pulsprogramm: zgesgp) als Wasserunterdrückung aufgenommen, um die benötigten NMR-spektroskopischen Parameter zu bestimmen.

Anschließend wurde das entsprechende Donorsubstrat hinzugefügt und das NMR Probenröhrchen nach der Durchmischung der Probe in das Spektrometer hineingebracht. Bevor die eigentliche Aufnahme der Spektren zur Verfolgung der Enzymreaktion begann, wurde für ein paar Minuten gewartet, damit die Probenlösung sich auf die Messtemperatur von 310 K einstellen konnte. Die Zeit zwischen der Zugabe des Donorsubstrats und des Beginns der Reaktionsverfolgung wurde gemessen und später als Totzeit in der Berechnung berücksichtigt. Die Reaktion wurde je nach Experiment unterschiedlich lang bei 310 K verfolgt (Tabelle 10). Dabei wurde das Pulsprogramm zgesgp2D_4.mf verwendet, welches einem Pseudo-2D Experiment entspricht, und alle 10 min ein ^1H -NMR Spektrum mit 128 Scans mit *excitation sculpting* aufgenommen.

Zur Auswertung wurde das Pseudo-2D-Spektrum mit dem Befehl „*splitser*“ in einzelne ^1H -Spektrumsätze aufgeteilt. Alle Spektren wurden einer Phasenkorrektur unterzogen, prozessiert und die Basislinie korrigiert. Anschließend wurden die Signale der Protonen H-5 und H-1' (bei 6.05 ppm) und des Protons H-6 (bei 8.01 ppm) des Donorsubstrats seriell integriert.

Für die Erstellung der Progresskurve wurden die Integrale der H-5/H-1'-Protonen vom Donorsubstrat verwendet und zu der entsprechenden Konzentration umgerechnet. Durch lineare Regression der ersten 10 Konzentrationswerte wurde das Integral bei $t=0$ ermittelt. Durch die Auftragung der Konzentration von Donorsubstrat gegen die Zeit konnte die Progresskurve erhalten werden. Mit Hilfe des Computerprogrammes Matlab konnte unter Verwendung der Lambert-W-Lösung für die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung (Gl-9) die kinetischen Parameter K_M und V_{max} bestimmt werden. Der *Offset* wurde aus dem Mittelwert der letzten 20 Konzentrationswerte (Ausnahme bei GTA ohne Inhibitor und bei Ligand **81**, wobei der Mittelwert der letzten 10 Konzentrationswerte verwendet wurde) berechnet und eingesetzt. Die Inhibitionskonstante K_i wurde mit der Gleichung (Gl-8) berechnen.

Alle Abbildungen der Progresskurven wurden mit Origin fertiggestellt. Die Anpassungskurve dient nur zur Darstellung des Trends der Datenpunkte und entspricht nicht der tatsächlichen *Fit*-Kurve der Lambert-W-Lösung.

6 Experimenteller Teil

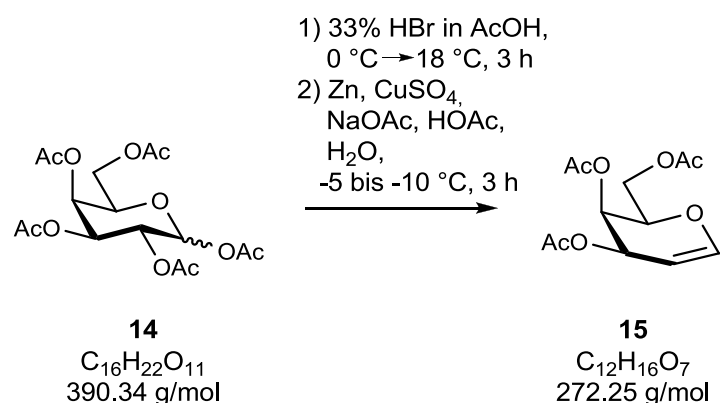
Enzym	c(Enzym) [μM]	c(Donor) [μM]	c(Akzeptor) [mM]	c(Inhibitor) [mM]	Reaktions- verfolgungs- zeit [h]	K_i [μM]
GTA	0.1	150	1.5	1.5 (12)	12.5	56
GTA	0.1	150	1.5	1.5 (13)	16	212
GTB	0.48	250	2.5	1.5 (12)	23	9383
GTB	0.48	250	2.5	1.5 (13)	17.5	5069
GTA	0.1	150	1.5	1.5 (81)	18.5	113

Tabelle 10: Übersicht über die verwendete Konzentration von GTA und GTB, Donor-, Akzeptorsubstrat und Inhibitoren, sowie die durchgeführte Reaktionsverfolgungszeit und die resultierenden K_i -Werte.

6.6 Synthesevorschriften

6.6.1 Darstellung von 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**12**)

6.6.1.1 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galactal (**15**)^[52, 53]



Es wurden 25 g (64 mmol) **14** in 5.9 mL Essigsäure und 5.9 mL Essigsäureanhydrid suspendiert und bei 0 °C langsam mit 42.6 mL 33%ige HBr in Essigsäure versetzt. Die Lösung wurde für 3 h bei 18 °C gerührt und danach bei -5 °C zu einem Gemisch aus 142 mL 50%ige Essigsäure, 35.8 g (436 mmol) Natriumacetat, 42.7 g (653 mmol) Zinkpulver und 2.76 g (17.3 mmol) Kupfersulfat, gelöst in 13 mL Wasser, zugegeben und weiter für 3 h zwischen -5 °C bis -10 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Gemisch saugfiltriert und mit 50 mL kalter Essigsäure (50 %) gewaschen und das Filtrat dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils einmal mit Eiswasser und dreimal mit gesättigter kalter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 2:1) konnten 12.4 g (45.5 mmol) eines hellgelben Sirup erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 71 % bezogen auf **14**.

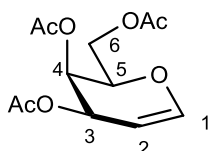
Charakterisierung:

Hellgelber Sirup.

$[\alpha]_D^{23} = -15.0^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃).

R_F-Wert = 0.52 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: m/z = 295.0798 [M+Na]⁺ (gef.), 295.0794 [M+Na]⁺ (ber.).

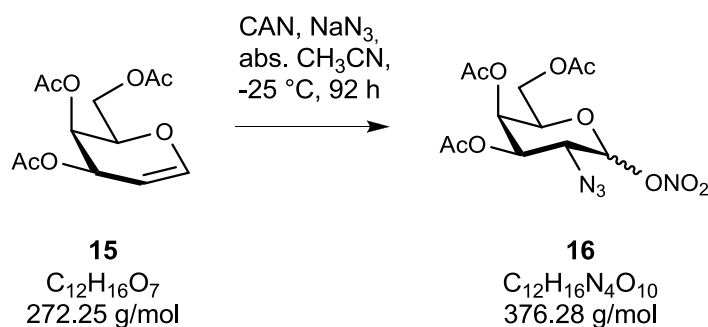


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.46 (dd, 1H, H-1), 5.57-5.53 (m, 1H, H-3), 5.44-5.41 (m, 1H, H-4), 4.75-4.71 (m, 1H, H-2), 4.35-4.17 (m, 3H, H-5, H-6), 2.13, 2.08, 2.03 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 6.3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H}_3, \text{H}_1} = 1.5 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.7, 170.4, 170.3 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 145.6 (C-1), 99.0 (C-2), 72.9 (C-5), 64.0 (C-3), 63.9 (C-4), 62.1 (C-6), 21.0, 20.9, 20.8 (3x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.2 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (16)^[51]



Zu einem Gemisch aus 84 g (0.15 mol) CAN und 4.4 g (68 mmol) Natriumazid wurden 12.3 g (45.2 mmol) **15**, gelöst in 270 mL abs. Acetonitril, bei -20°C unter N_2 -Atmosphäre zugegeben und das Gemisch für 92 h bei -25°C unter Lichtausschluss gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und weitere Reagenzien müssen evtl. zugegeben werden. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch mit 200 mL kaltem Diethylether und 300 mL Eiswasser versetzt und die organische Phase dreimal mit Eiswasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE:EE = 2:1) gereinigt und es konnten 9.80 g (26.0 mmol, 58 % bezogen auf **15**) eines hellgelben Sirups erhalten werden. Es handelt sich um ein Gemisch aus α , β und talo-Isomer in einem Verhältnis von 1 : 0.9 : 0.2.

Charakterisierung:

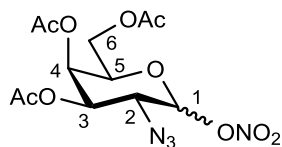
Hellgelber Sirup.

$[\alpha]_D^{25} = 41.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

R_f -Wert = 0.60 (PE:EE = 1:1).

R_f -Wert = 0.47 (PE:EE = 2:1).

HR-ESI-MS: m/z = 399.0759 $[M+Na]^+$ (gef.), 399.0764 $[M+Na]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.34 (d, 1H, H-1), 5.51-5.49 (m, 1H, H-4), 5.25 (dd, 1H, H-3), 4.39-4.34 (m, 1H, H-5), 4.15-4.08 (m, 3H, H-2, H-6), 2.17, 2.07, 2.04 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 4.2$ Hz.

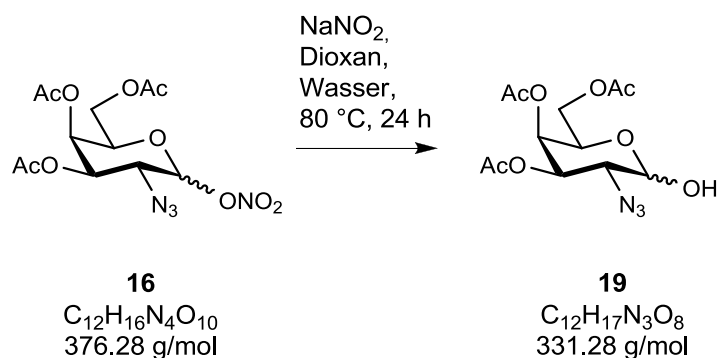
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 97.0 (C-1), 69.7 (C-5), 68.7 (C-3), 66.8 (C-4), 61.0 (C-6), 56.1 (C-2), 20.7 (3x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.57 (d, 1H, H-1), 5.40-5.38 (m, 1H, H-4), 4.96 (dd, 1H, H-3), 4.15-4.08 (m, 2H, H-6), 4.07-4.02 (m, 1H, H-5), 3.83 (dd, 1H, H-2), 2.08, 2.04, 2.04 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 8.8$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 98.2 (C-1), 72.0 (C-5), 71.9 (C-3), 66.0 (C-4), 61.0 (C-6), 57.6 (C-2), 20.7 (3x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.3 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy- α/β -D-galactopyranose (**19**)^[49]

9.8 g (26 mmol) **16** wurden in 112 mL 1,4-Dioxan gelöst und mit 7.6 g (0.11 mol) Natriumnitrit, gelöst in 14 mL Wasser, versetzt. Das Gemisch wurde für 24 h bei 80 °C gerührt und nach Zugabe von 75 mL Wasser dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:1) wurden 7.33 g (22.1 mmol) eines hellgelben Sirups erhalten, was eine Ausbeute von 85 % bezogen auf **16** entspricht. Dabei handelt es sich um ein anomeres Gemisch mit einem α/β -Verhältnis von 1 : 0.6.

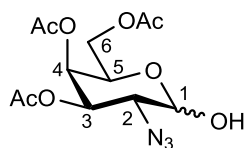
Charakterisierung:

Hellgelber Sirup.

$[\alpha]_D^{25} = 45.2^\circ$ ($c = 0.2$, CHCl_3).

R_f -Wert = 0.38 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 354.0918$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 354.0914 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.48-5.45 (m, 1H, H-4), 5.43 (dd, 1H, H-1), 5.40 (dd, 1H, H-3), 4.49-4.44 (m, 1H, H-5), 4.11 (dd, 2H, H-6a), 4.07 (dd, 2H, H-6b), 3.78-3.74 (m, 1H, H-2), 2.15, 2.06, 2.06 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}1, \text{OH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.2$ Hz, $^2J_{\text{H}6a, \text{H}6b} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H}6a, \text{H}5} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{H}6b, \text{H}5} = 6.4$ Hz.

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.2, 170.0 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 92.6 (C-1), 68.5 (C-3), 67.8 (C-4), 66.8 (C-5), 61.9 (C-6), 58.2 (C-2), 20.8 (3x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

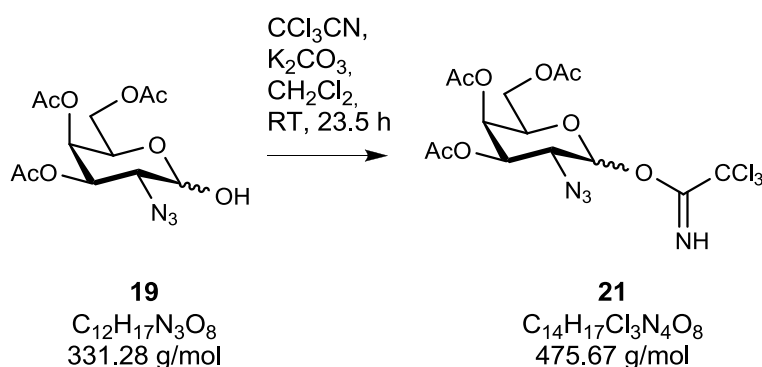
β -Anomer:

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.36-5.33 (m, 1H, H-4), 4.82 (dd, 1H, H-3), 4.71 (dd, 1H, H-1), 4.15-4.11 (m, 2H, H-6), 3.91 (dt, 1H, H-5), 3.66 (dd, 1H, H-2), 2.16, 2.06, 2.05 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{H}1, \text{OH}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 10.9$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H}4, \text{H}5} = 0.6$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6} = 6.5$ Hz.

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 96.6 (C-1), 71.3 (C-3), 71.2 (C-5), 66.6 (C-4), 62.1 (C-2), 61.7 (C-6), 20.8 (3x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.4 O-(2-Azido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat (**21**)^[49]



Unter N_2 -Atmosphäre wurden 7.33 g (22.1 mmol) **19**, gelöst in 45 mL abs. Dichlormethan, mit 6.0 mL (8.6 g, 60 mmol) Trichloracetonitril und 2.84 g (20.5 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und für 23.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch über Celite filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE:EE = 2:1) gereinigt und es konnten 9.20 g (19.3 mmol) eines hellgelben Schaums erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 88 % bezogen auf **19**. Das Produkt besteht aus einem anomeren Gemisch mit einem α/β -Verhältnis von 0.6 : 1. (Eine Trennung der Anomere konnte mit säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 2:1) erzielt werden, ist jedoch für die nächste Stufe nicht zwingend notwendig.)

Charakterisierung:

Hellgelber Schaum.

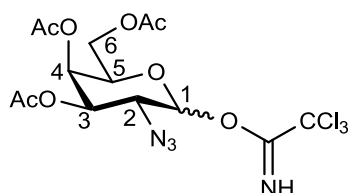
$[\alpha]_D^{25}$ (α -Anomer) = 128.0° (c = 0.1, CHCl₃).

$[\alpha]_D^{25}$ (β -Anomer) = -35.0° (c = 0.1, CHCl₃).

R_f-Wert = 0.33 (α -Anomer; PE:EE = 2:1).

R_f-Wert = 0.25 (β -Anomer; PE:EE = 2:1).

HR-ESI-MS: m/z = 496.9446 [M+Na]⁺ (gef.), 497.0010 [M+Na]⁺ (ber.).

 **α -Anomer:**

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.80 (s, 1H, N-H), 6.51 (d, 1H, H-1), 5.55-5.54 (m, 1H, H-4), 5.39 (dd, 1H, H-3), 4.43-4.41 (m, 1H, H-5), 4.15 (dd, 1H, H-6a), 4.04 (dd, 1H, H-6b), 4.04 (dd, 1H, H-2), 2.17, 2.08, 2.01 (s, 9H, CH₃-CO-).

³J_{H1, H2} = 3.6 Hz, ³J_{H2, H3} = 11.0 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.2 Hz, ³J_{H6a, H6b} = 11.3 Hz, ³J_{H6a, H5} = 6.5 Hz, ³J_{H6b, H5} = 6.7 Hz.

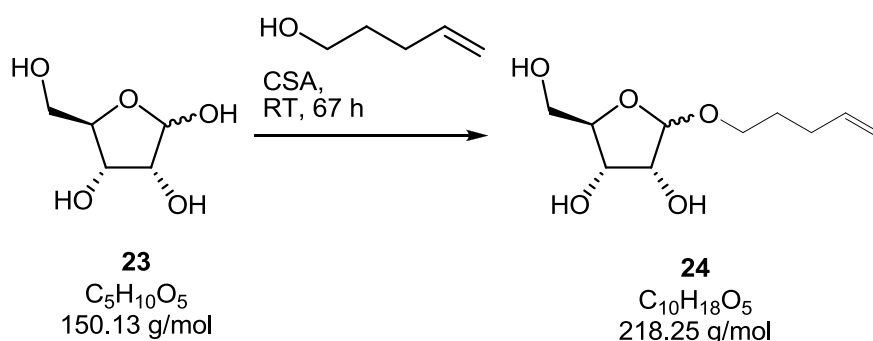
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4, 170.1, 169.8 (CH₃-CO-), 160.9 (C=N), 94.7 (C-1), 69.3 (C-5), 68.8 (C-3), 67.1 (C-4), 61.4 (C-6), 57.2 (C-2), 20.8, 20.8, 20.7 (3x CH₃-CO-).

 β -Anomer:

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.79 (s, 1H, N-H), 5.70 (d, 1H, H-1), 5.41-5.40 (m, 1H, H-4), 4.92 (dd, 1H, H-3), 4.18 (dd, 1H, H-6a), 4.16 (dd, 1H, H-6b), 4.05-4.01 (m, 1H, H-5), 3.95 (dd, 1H, H-2), 2.19, 2.08, 2.04 (s, 9H, CH₃-CO-).

³J_{H1, H2} = 8.5 Hz, ³J_{H2, H3} = 10.7 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.4 Hz, ²J_{H6a, H6b} = 11.3 Hz, ³J_{H6a, H5} = 7.3 Hz, ³J_{H6b, H5} = 6.2 Hz.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4, 170.2, 169.8 (CH₃-CO-), 160.9 (C=N), 96.9 (C-1), 71.8 (C-5), 71.4 (C-3), 66.2 (C-4), 60.9 (C-6), 60.5 (C-2), 20.8, 20.8, 20.7 (3x CH₃-CO-).

6.6.1.5 4-Pentenyl α/β -D-ribofuranosid (**24**)^[54]

2.158 g (14.37 mmol) D-Ribose (**23**) wurden in 22 mL 4-Penten-1-ol suspendiert und mit 190 mg (0.818 mmol) CSA, gelöst in 4 mL 4-Penten-1-ol, versetzt. Die Suspension wurde für 67 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von zwei Spatelspitzen K_2CO_3 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Es wurde filtriert und das Methanol unter vermindertem Druck wieder entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE) gereinigt. Es konnten 1.50 g (6.87 mmol) eines gelben Sirups erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 48 % bezogen auf D-Ribose (**23**). Dabei handelt es sich um ein anomeres Gemisch mit einem α/β -Verhältnis von 0.28 : 1.

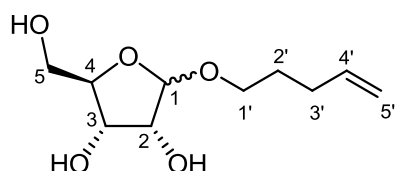
Charakterisierung:

Gelber Sirup.

$[\alpha]_D^{25} = 32.0^\circ$ ($c = 0.1$, $CHCl_3$).

R_f -Wert = 0.28 (EE).

HR-ESI-MS: $m/z = 241.1051 [M+Na]^+$ (gef.), $241.1052[M+Na]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

α -Anomer:

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.81 (ddt, 1H, H-4'), 5.07-5.02 (m, 2H, H-1, H-5'cis), 5.01-4.98 (m, 1H, H-5'trans), 4.10-4.07 (m, 1H, H-2), 4.03 (ddd, 1H, H-4), 3.95 (dd, 1H, H-3), 3.85 (td, 1H, H-1'a), 3.84 (dd, 1H, H-5a), 3.71 (dd, 1H, H-5b), 3.54 (td, 1H, H-1'b), 2.16-2.12 (m, 2H, H-3'), 1.77-1.71 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H_2, H_3} = 6.4$ Hz, $^3J_{H_3, H_4} = 3.7$ Hz, $^3J_{H_{5a}, H_4} = 3.7$ Hz, $^3J_{H_{5b}, H_4} = 4.1$ Hz, $^2J_{H_{5a}, H_{5b}} = 12.0$ Hz, $^2J_{H_{1'a}, H_{1'b}} = 9.6$ Hz, $^3J_{H_{1'a}, H_{2'}} = 6.6$ Hz, $^3J_{H_{1'b}, H_{2'}} = 6.6$ Hz, $^3J_{H_{3'}, H_{4'}} = 6.7$ Hz, $^3J_{H_{5'trans}, H_{4'}} = 10.3$ Hz, $^3J_{H_{5'cis}, H_{4'}} = 17.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 138.0 (C-4'), 115.3 (C-5'), 101.8 (C-1), 84.8 (C-4), 71.7 (C-2), 70.9 (C-3), 68.2 (C-1'), 62.8 (C-5), 30.4 (C-3'), 28.8 (C-2').

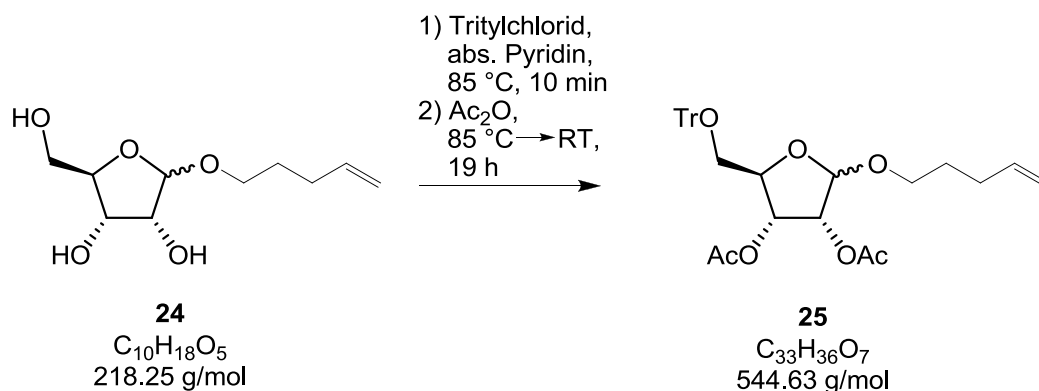
β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.79 (ddt, 1H, H-4'), 5.03 (dq, 1H, H-5'cis), 4.98 (dq, 1H, H-5'trans), 4.96-4.95 (m, 1H, H-1), 4.41 (dd, 1H, H-3), 4.11-4.07 (m, 2H, H-2, H-4), 3.82 (dd, 1H, H-5a), 3.75 (td, 1H, H-1'a), 3.67 (dd, 1H, H-5b), 3.47 (td, 1H, H-1'b), 2.13-2.08 (m, 2H, H-3'), 1.71-1.65 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H_2, H_3} = 5.4$ Hz, $^3J_{H_3, H_4} = 5.4$ Hz, $^3J_{H_{5a}, H_4} = 3.2$ Hz, $^3J_{H_{5b}, H_4} = 3.7$ Hz, $^2J_{H_{5a}, H_{5b}} = 11.9$ Hz, $^2J_{H_{1'a}, H_{1'b}} = 9.6$ Hz, $^3J_{H_{1'a}, H_{2'}} = 6.6$ Hz, $^3J_{H_{1'b}, H_{2'}} = 6.6$ Hz, $^3J_{H_{3'}, H_{4'}} = 6.7$ Hz, $^3J_{H_{5'trans}, H_{4'}} = 10.3$ Hz, $^2J_{H_{5'trans}, H_{5'cis}} = 1.4$ Hz, $^3J_{H_{5'cis}, H_{4'}} = 17.0$ Hz, $^2J_{H_{5'trans}, H_{5'cis}} = 3.3$ Hz, $^4J_{H_{5'cis}, H_{3'}} = -1.7$ Hz, $^4J_{H_{5'trans}, H_{3'}} = -1.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 137.9 (C-4'), 115.3 (C-5'), 107.9 (C-1), 84.6 (C-4), 75.9 (C-2), 71.4 (C-3), 68.2 (C-1'), 63.1 (C-5), 30.3 (C-3'), 28.9 (C-2').

6.6.1.6 (4-Pentenyl) 2,3-di-O-acetyl-6-O-triphenylmethyl- α/β -D-ribofuranosid (**25**)^[55]



Unter N_2 -Atmosphäre wurden 1.5 g (6.87 mmol) **24** und 2.11 g (7.57 mmol) Tritylchlorid in 5.5 mL abs. Pyridin gelöst und für 10 min bei 85 °C gerührt. Dann wurden 3.6 mL (3.9 g, 38 mmol) Essigsäureanhydrid bei 85 °C zugegeben und die Lösung weiter für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung in ein Lösungsgemisch aus 99 mL Eiswasser und 5 mL Essigsäure zugegeben, für 15 min gerührt und filtriert. Der dabei resultierende Feststoff wurde in Ethylacetat gelöst und jeweils einmal mit 5%iger Essigsäure, dreimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit Wasser

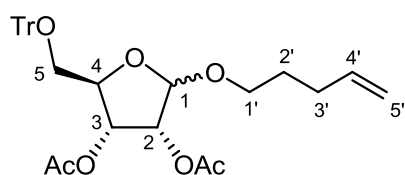
gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es konnten 3.94 g (7.23 mmol) eines braunen Sirups erhalten werden, der ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt wurde.

Charakterisierung:

Brauner Sirup.

R_f -Wert = 0.44 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: m/z = 567.2357 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 567.2359 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).

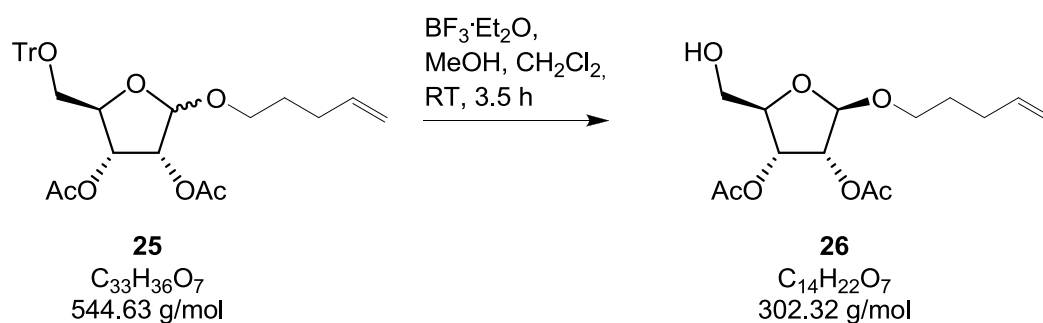


β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.48-7.43 (m, 5H, arom.), 7.33-7.27 (m, 10H, arom.), 5.73 (ddt, 1H, H-4'), 5.35 (dd, 1H, H-3), 5.25 (dd, 1H, H-2), 5.00-4.91 (m, 3H, H-1, H-5'), 4.31-4.25 (m, 1H, H-4), 3.66 (td, 1H, H-1'a), 3.36 (td, 1H, H-1'b), 3.25-3.21 (m, 2H, H-5), 2.10, 2.02 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.03-1.95 (m, 2H, H-3'), 1.60-1.51 (m, 2H, H-2').

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 1.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 6.8 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H}1'a, \text{H}1'b} = 9.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}1'a, \text{H}2'} = 6.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}1'b, \text{H}2'} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 6.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}5'\text{trans}, \text{H}4'} = 10.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}5'\text{cis}, \text{H}4'} = 17.0 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.0 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 143.9 (arom.), 138.2 (C-4'), 128.9, 128.1, 127.9, 127.4 (arom.), 115.0 (C-5'), 105.3 (C-1), 82.5 ($\text{C}(\text{Ph})_3$), 79.7 (C-4), 75.0 (C-2), 72.6 (C-3), 67.7 (C-1'), 65.0 (C-5), 30.3 (C-3'), 28.7 (C-2'), 20.8, 20.7 (2x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.7 4-Pentenyl 2,3-di-O-acetyl- α/β -D-ribofuranosid (**26**)^[56]

Es wurden 3.94 g (7.23 mmol) **25** in 136 mL Dichlormethan gelöst, mit 3.6 mL $BF_3 \cdot Et_2O$ und 6.7 mL Methanol versetzt und für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (weitere Reagenzien müssen evtl. zugegeben werden). Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung in 130 mL Wasser gegeben und die organische Phase zweimal mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE:PE = 1:1) konnte 846 mg (2.80 mmol) eines hellgelben Sirups erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 41 % (β -Anomer) bezogen auf **24**. Das α -Anomer konnte ebenfalls erhalten werden. Es wurde jedoch nicht weiter gereinigt.

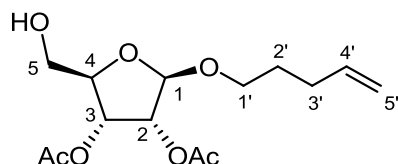
Charakterisierung:

Hellgelber Sirup.

$[\alpha]_D^{22}$ (β -Anomer) = 25.3° ($c = 0.1$, $CHCl_3$).

R_f -Wert = 0.37 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 325.1263 [M+Na]^+$ (gef.), 325.1264 $[M+Na]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

α -Anomer:

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.79 (ddt, 1H, H-4'), 5.20 (dd, 1H, H-3), 5.13-5.10 (m, 1H, H-2), 5.03 (dq, 1H, H-5'cis), 4.98 (dq, 1H, H-5'trans), 4.78 (d, 1H, H-1), 3.98-3.92 (m, 2H,

H-4, H-5a), 3.78 (dd, 1H, H-5b), 3.73 (td, 1H, H-1'a), 3.45 (td, 1H, H-1'b), 2.16, 2.11 (s, 6H, CH₃-CO-), 2.14-2.11 (m, 2H, H-3'), 1.73-1.66 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H1, H2} = 2.2$ Hz, $^3J_{H2, H3} = 3.5$ Hz, $^3J_{H3, H4} = 3.5$ Hz, $^3J_{H4, H5a} = 1.9$ Hz, $^3J_{H4, H5b} = 2.6$ Hz, $^2J_{H5a, H5b} = 12.1$ Hz, $^2J_{H1'a, H1'b} = 9.5$ Hz, $^3J_{H1'a, H2'} = 6.6$ Hz, $^3J_{H1'b, H2'} = 6.5$ Hz, $^3J_{H3', H4'} = 6.7$ Hz, $^3J_{H5'trans, H4'} = 10.4$ Hz, $^3J_{H5'cis, H4'} = 17.2$ Hz, $^2J_{H5'trans, H5'cis} = 3.2$ Hz, $^4J_{H5'cis, H3'} = -1.7$ Hz, $^4J_{H5'trans, H3'} = -1.4$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 137.9 (C-4'), 115.2 (C-5'), 98.1 (C-1), 70.1 (C-2), 67.9 (C-1'), 67.4 (C-4), 67.1 (C-3), 63.9 (C-5), 30.3 (C-3'), 28.6 (C-2'), 21.1, 21.0 (CH₃-CO-).

NMR-Daten aus Reinsubstanz interpretiert.

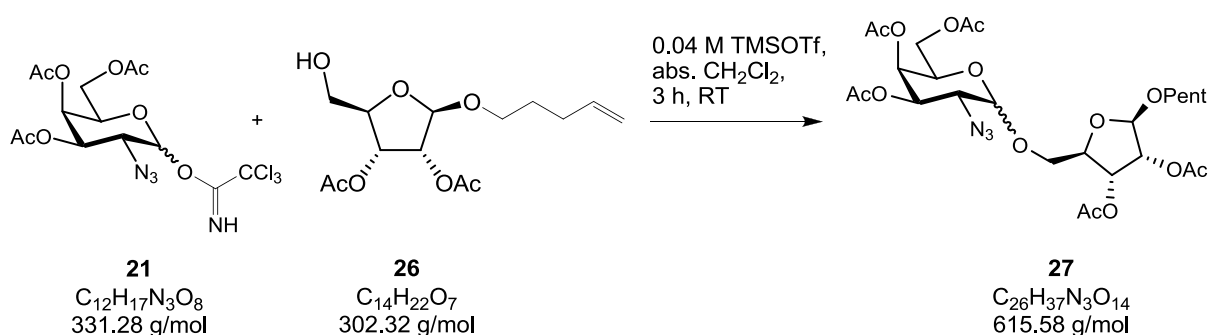
β-Anomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.79 (ddt, 1H, H-4'), 5.78 (dd, 1H, H-3), 5.24 (dd, 1H, H-2), 5.03 (dq, 1H, H-5'cis), 4.98 (dq, 1H, H-5'trans), 4.99 (d, 1H, H-1), 4.22 (ddd, 1H, H-4), 3.80 (dd, 1H, H-5a), 3.74 (td, 1H, H-1'a), 3.65 (dd, 1H, H-5b), 3.48 (td, 1H, H-1'b), 2.11, 2.06 (s, 6H, CH₃-CO-), 2.14-2.08 (m, 2H, H-3'), 1.72-1.66 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H1, H2} = 0.9$ Hz, $^3J_{H2, H3} = 5.2$ Hz, $^3J_{H3, H4} = 6.1$ Hz, $^3J_{H4, H5a} = 3.3$ Hz, $^3J_{H4, H5b} = 4.1$ Hz, $^2J_{H5a, H5b} = 12.1$ Hz, $^2J_{H1'a, H1'b} = 9.3$ Hz, $^3J_{H1'a, H2'} = 6.5$ Hz, $^3J_{H1'b, H2'} = 6.6$ Hz, $^3J_{H3', H4'} = 6.7$ Hz, $^3J_{H5'trans, H4'} = 10.3$ Hz, $^3J_{H5'cis, H4'} = 17.0$ Hz, $^2J_{H5'trans, H5'cis} = 3.3$ Hz, $^4J_{H5'cis, H3'} = -1.7$ Hz, $^4J_{H5'trans, H3'} = -1.3$ Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 137.8 (C-4'), 115.3 (C-5'), 105.6 (C-1), 82.5 (C-4), 75.6 (C-2), 71.4 (C-3), 68.3 (C-1'), 63.0 (C-5), 30.2 (C-3'), 28.7 (C-2'), 20.8, 20.7 (CH₃-CO-).

6.6.1.8 4-Pentenyl 5-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl-α/β-D-ribofuranosid (**27**)^[49]



Unter N₂-Atmosphäre wurden 1.48 g (4.47 mmol) **21** und 0.845 g (2.80 mmol) **26** in 45 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 3 mL 0.04 M TMSOTf-Lösung in Dichlormethan versetzt. Die Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und nach vollständiger Umsetzung wurden 1.8 g NaHCO₃ hinzugegeben. Danach wurde gesättigter NaHCO₃-Lösung zugegeben

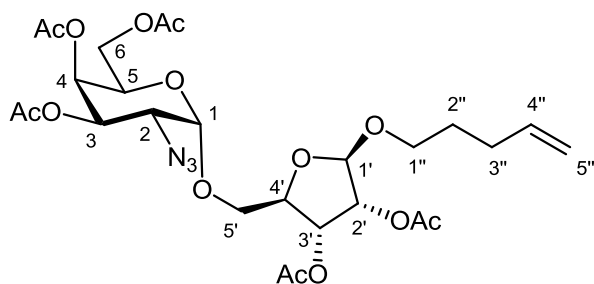
und die Phasen wurden voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde einmal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE:PE = 1:1) gereinigt und es konnten 1.71 g (2.78 mmol) eines gelben Sirups erhalten werden, welcher ein anomeres Gemisch mit einem α/β -Verhältnis von 1 : 0.16 enthält. Dies entspricht einer Ausbeute von 99 % bezogen auf **26**.

Charakterisierung:

Gelber Sirup.

R_f -Wert = 0.37 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: m/z = 638.2177 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 638.2174 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

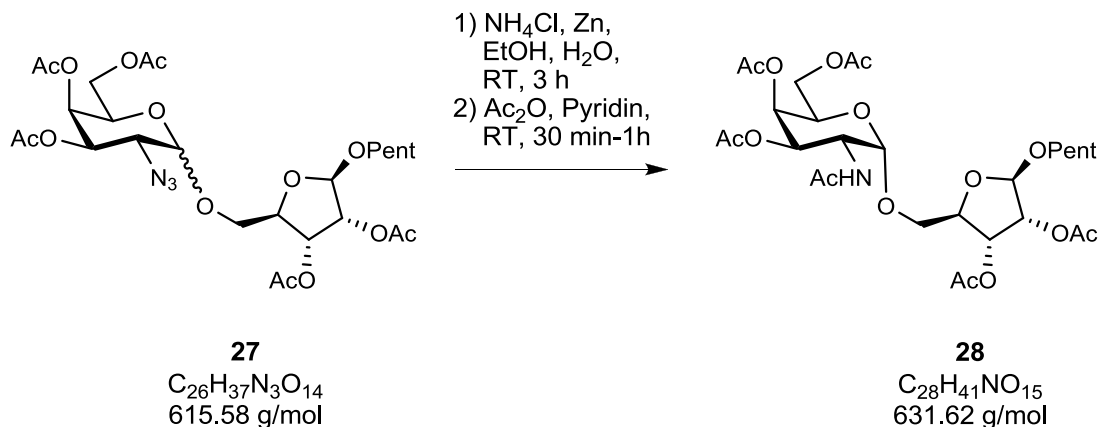
α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.79 (ddt, 1H, H-4''), 5.46 (dd, 1H, H-4), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.29 (dd, 1H, H-3'), 5.24 (dd, 1H, H-2'), 5.02 (ddd, 1H, H-5''cis), 5.02 (d, 1H, H-1), 4.99-4.94 (m, 2H, H-1', H-5''trans), 4.32-4.24 (m, 2H, H-5, H-4'), 4.12 (dd, 1H, H-6a), 4.07 (dd, 1H, H-6b), 3.81 (dd, 1H, H-5'a), 3.76-3.66 (m, 3H, H-1''a, H-5'b, H-2), 3.42 (td, 1H, H-1''b), 2.14, 2.12, 2.06, 2.05, 2.04 (s, 15H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.13-2.08 (m, 2H, H-3''), 1.70-1.61 (m, 2H, H-2'').

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H}4, \text{H}5} = 1.4$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6a} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6b} = 6.8$ Hz, $^2J_{\text{H}6a, \text{H}6b} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 4.9$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 7.0$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5a'} = 6.6$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 10.4$ Hz, $^2J_{\text{H}1''a, \text{H}1''b} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1''b, \text{H}2''} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H}3'', \text{H}4''} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}5''trans, \text{H}4''} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H}5''cis, \text{H}4''} = 17.0$ Hz, $^2J_{\text{H}5''trans, \text{H}5''cis} = 3.3$ Hz, $^4J_{\text{H}5''cis, \text{H}3''} = -1.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.4, 170.1, 169.9, 169.8, 169.8 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 138.0 (C-4''), 115.2 (C-5''), 105.3 (C-1'), 98.2 (C-1), 78.8 (C-4'), 74.8 (C-2'), 72.4 (C-3'), 70.3 (C-5'), 68.4 (C-3), 67.8 (C-1''), 67.5 (C-4), 66.8 (C-5), 61.4 (C-6), 57.6 (C-2), 30.2 (C-3''), 28.7 (C-2''), 20.7, 20.7, 20.7, 20.7, 20.6 (5x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.9 4-Pentenyl 5-O-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl- α / β -D-ribofuranosid (**28**)^[57, 58]



Es wurde 634 mg (1.03 mmol) **27** und 661 mg (12.4 mmol) Ammoniumchlorid in 3 mL Ethanol und 1 mL Wasser gelöst und dann mit 471 mg (7.21 mmol) Zinkpulver versetzt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur stark gerührt und die Reaktion dünn-schicht-chromatographisch verfolgt. Evtl. muss noch weitere Reagenzien zugegeben werden. Nach 3 h wurde das grau-schwarze Gemisch filtriert und mit Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand in 25 mL Pyridin suspendiert, mit 5 mL Essigsäureanhydrid versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Danach wurde das Gemisch dreimal mit Toluol codestilliert und eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE) konnten 413 mg (0.654 mmol) eines gelben Sirups erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 64 % bezogen auf **28**.

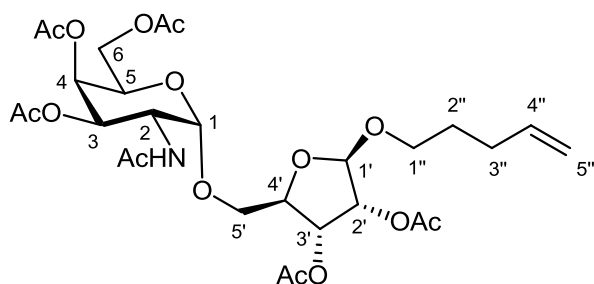
Charakterisierung:

Gelber Sirup.

$[\alpha]_D^{24} = 41.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

R_f -Wert = 0.38 (EE).

HR-ESI-MS: $m/z = 654.2367$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 654.2374 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).

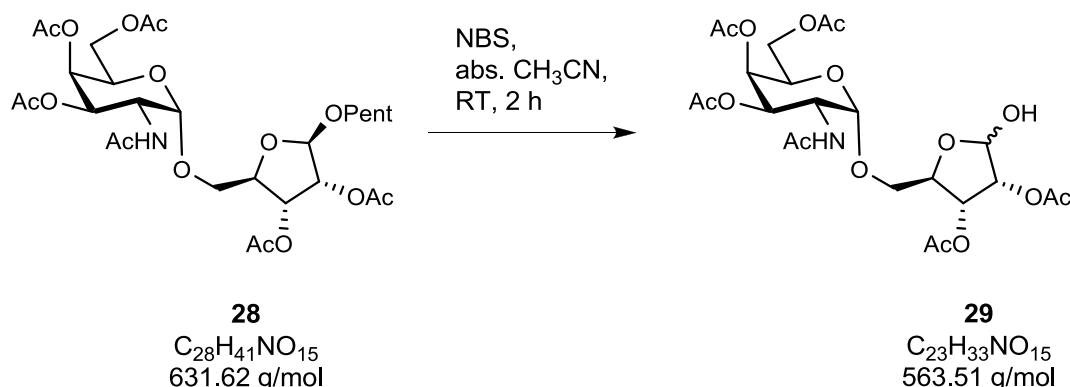


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.20 (d, 1H, N-H), 5.79 (ddt, 1H, H-4''), 5.55 (dd, 1H, H-3'), 5.36 (dd, 1H, H-4), 5.18 (dd, 1H, H-2'), 5.06 (dd, 1H, H-3), 5.05-5.00 (m, 1H, H-5''cis), 5.02 (d, 1H, H-1'), 5.00-4.97 (m, 1H, H-5''trans), 4.87 (d, 1H, H1), 4.63 (ddd, 1H, H-2), 4.19-4.15 (m, 2H, H-4', H-5), 4.12 (dd, 1H, H-6a), 4.07 (dd, 1H, H-6b), 3.91 (dd, 1H, H-5'a), 3.69 (td, 1H, H-1''a), 3.47 (dd, 1H, H-5'b), 3.43 (td, 1H, H-1''b), 2.16, 2.14, 2.10, 2.04, 2.01, 1.98 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.12-2.07 (m, 2H, H-3''), 1.70-1.64 (m, 2H, H-2'').

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{NH}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H}4, \text{H}5} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6a} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6b} = 6.7$ Hz, $^2J_{\text{H}6a, \text{H}6b} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 1.1$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5a'} = 5.3$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5b'} = 7.6$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 9.7$ Hz, $^2J_{\text{H}1''a, \text{H}1''b} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1''a, \text{H}2''} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1''b, \text{H}2''} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}3'', \text{H}4''} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H}5''\text{trans}, \text{H}4''} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H}5''\text{cis}, \text{H}4''} = 17.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.8, 170.7, 170.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 137.8 (C-4''), 115.3 (C-5''), 105.6 (C-1'), 98.3 (C-1), 79.2 (C-4'), 75.3 (C-2'), 72.6 (C-3'), 69.4 (C-5'), 68.3 (C-3), 68.0 (C-1''), 67.4 (C-4), 67.2 (C-5), 61.9 (C-6), 47.5 (C-2), 30.1 (C-3''), 28.6 (C-2'), 23.2 (NH-CO- CH_3), 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (5x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.1.10 5-O-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl- α / β -D-ribofuranose (**29**)^[59]



Eine Lösung von 159 mg (0.252 mmol) **28** gelöst in 10 mL abs. Acetonitril wurde mit 182 mg (1.02 mmol) NBS versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die gelbe Lösung mit wenig 10%iger Natriumthiosulfat-

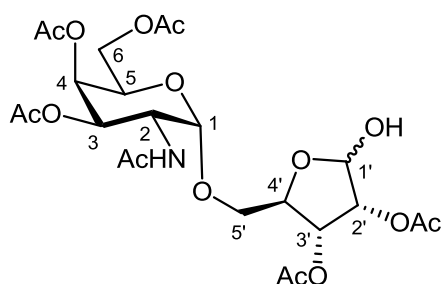
Lösung versetzt, bis die Lösung farblos wurde. Diese wurde dann unter vermindertem Druck eingengt, mit Wasser versetzt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE) gereinigt. Es konnten 61.5 mg (0.109 mmol) eines farblosen Sirups erhalten werden, welcher ein anomeres Gemisch (bezogen auf Ribose) mit einem α/β Verhältnis von 0.34 : 1 enthält. Dies entspricht einer Ausbeute von 43 % bezogen auf **29**.

Charakterisierung:

Farbloser Sirup.

R_f -Wert = 0.18 (EE).

HR-ESI-MS: m/z = 586.1752 $[M+Na]^+$ (gef.), 586.1748 $[M+Na]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.11 (d, 1H, N-H), 5.46 (dd, 1H, H-3'), 5.40 (d, 1H, H-1'), 5.38-5.36 (m, 1H, H-4), 5.23 (dd, 1H, H-2'), 5.17 (dd, 1H, H-3), 4.92 (d, 1H, H-1), 4.59 (ddd, 1H, H-2), 4.34-4.29 (m, 1H, H-5), 4.25-4.22 (m, 1H, H-4'), 4.21 (dd, 1H, H-6a), 4.00 (dd, 1H, H-6b), 3.88 (dd, 1H, H-5'a), 3.68 (dd, 1H, H-5'b), 2.17, 2.13, 2.09, 2.06, 1.99, 1.97 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{NH}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H}4, \text{H}5} = 1.2$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6a} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{H}5, \text{H}6b} = 7.2$ Hz, $^2J_{\text{H}6a, \text{H}6b} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 1.3$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5a'} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5b'} = 3.8$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 10.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.2, 171.0, 170.7, 170.5, 170.2, 170.0 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 100.4 (C-1'), 97.9 (C-1), 79.8 (C-4'), 75.9 (C-2'), 71.7 (C-3'), 68.9 (C-5'), 68.6 (C-3), 67.4 (C-4), 66.5 (C-5), 61.8 (C-6), 47.9 (C-2), 23.3 (NH-CO-CH_3), 20.9, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7 (5x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

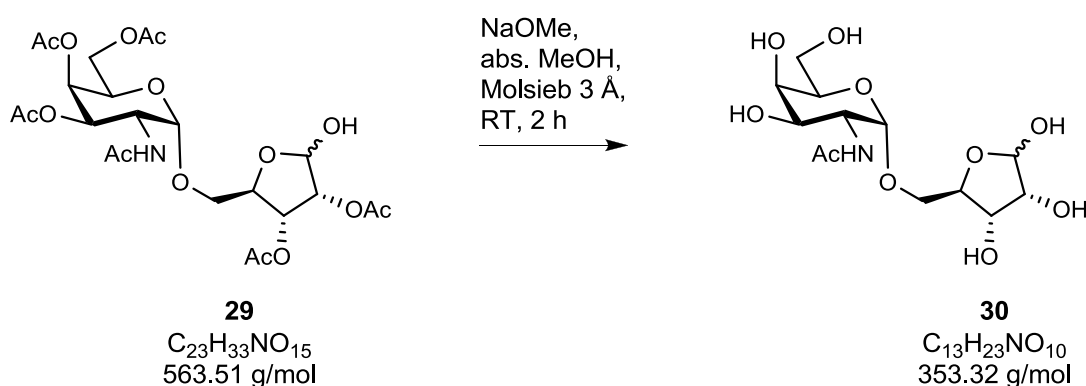
α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.08 (d, 1H, N-H), 5.50 (d, 1H, H-1'), 5.39-5.37 (m, 1H, H-4), 5.33 (dd, 1H, H-3'), 5.11 (dd, 1H, H-3), 5.05 (dd, 1H, H-2'), 4.92 (d, 1H, H-1), 4.66-4.58 (m, 1H, H-2), 4.34-4.29 (m, 1H, H-4', H-5), 3.86 (dd, 1H, H-5'a), 3.51 (dd, 1H, H-5'b), 2.17, 2.16, 2.16, 2.05, 2.00, 1.99 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{H1, H2} = 3.6$ Hz, $^3J_{H2, NH} = 9.7$ Hz, $^3J_{H2, H3} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3, H4} = 3.2$ Hz, $^3J_{H1', H2'} = 4.4$ Hz, $^3J_{H2', H3'} = 6.4$ Hz, $^3J_{H3', H4'} = 3.0$ Hz, $^3J_{H4', H5a'} = 4.7$ Hz, $^3J_{H4', H5b'} = 6.0$ Hz, $^2J_{H5'a, H5'b} = 10.5$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 98.5 (C-1), 95.4 (C-1'), 80.5 (C-4'), 71.2 (C-3'), 71.0 (C-2'), 68.4 (C-3), 67.9 (C-5'), 67.4 (C-4), 67.2 (C-5), 62.0 (C-6), 47.8 (C-2).

6.6.1.11 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)- α/β -D-ribofuranose (30)^[60]



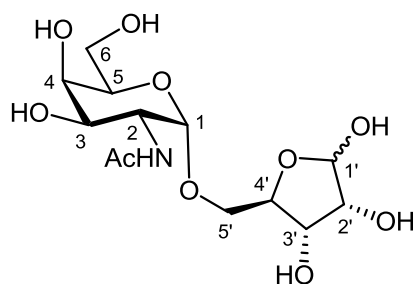
Zu einer Lösung von 168 mg (0.298 mmol) **29**, gelöst in 26 mL abs. Methanol, wurde eine Spatelspitze Molsiebpulver 3 Å unter N_2 -Atmosphäre gegeben, die Suspension mit frisch hergestellter Natriummethanolat-Lösung (1 M) auf pH 10 eingestellt und bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Danach wurde das Gemisch mit 1 M HCl-Lösung neutralisiert, filtriert und unter vermindertem Druck eingeengt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch ($\text{EtOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 5:5:1$) gereinigt und es konnten 112 mg (0.317 mmol) eines farblosen hochviskosen Sirup erhalten werden. Dies entspricht einer quantitativen Ausbeute bezogen auf **29**. Es handelt sich um ein anomeres Gemisch (bezogen auf Ribose) mit einem α/β Verhältnis von 0.23 : 1.

Charakterisierung:

Farbloser Sirup.

R_f -Wert = 0.28 ($\text{EtOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 5:5:1$).

HR-ESI-MS: $m/z = 376.1213$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 376.1220 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.18 (d, 1H, H-1'), 4.82 (d, 1H, H-1), 4.30 (dd, 1H, H-2), 4.17 (dd, 1H, H-3'), 4.05-4.00 (m, 1H, H-4'), 3.91-3.87 (m, 3H, H-4, H-5, H-2'), 3.84 (dd, 1H, H-5'a), 3.77 (dd, 1H, H-3), 3.78-3.69 (m, H, H-6), 3.60 (dd, 1H, H-5'b), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.1$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 1.5$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'a} = 5.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'b} = 3.3$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 10.8$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): δ [ppm] = 174.2 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 103.5 (C-1'), 99.4 (C-1), 82.7 (C-4'), 77.5 (C-2'), 72.7 (C-3'), 72.7 (C-4), 70.5 (C-5), 70.4 (C-3), 69.9 (C-5'), 62.9 (C-6), 51.5 (C-2), 22.8 (NH-CO-CH_3).

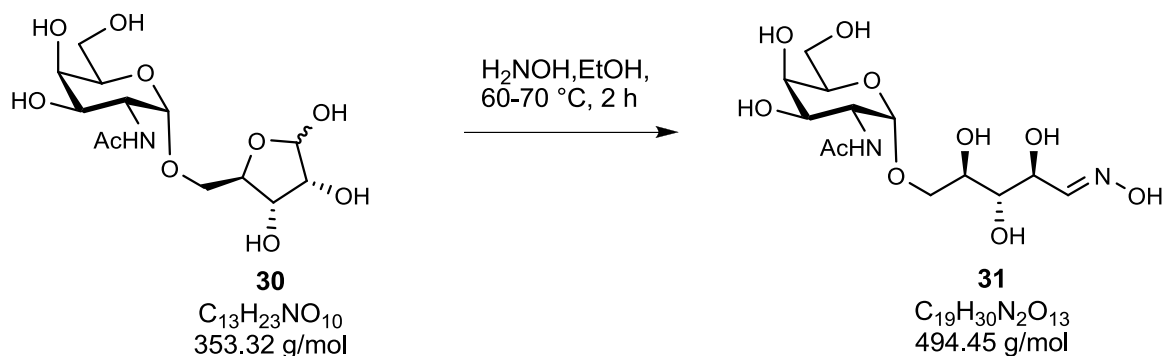
α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.26 (d, 1H, H-1'), 4.87-4.85 (m, 1H, H-1), 4.26 (dd, 1H, H-2), 4.14-4.09 (m, 1H, H-4'), 4.02-3.98 (m, 1H, H-2'), 3.98-3.93 (m, 1H, H-3'), 3.80-3.75 (m, 2H, H-3, H-5'a), 3.61-3.57 (m, 1H, H-5'b), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 4.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): δ [ppm] = 99.2 (C-1), 98.0 (C-1'), 82.6 (C-4'), 72.4 (C-3'), 72.3 (C-2'), 70.4 (C-3), 69.7 (C-5), 68.8 (C-5'), 62.8 (C-6), 51.5 (C-2).

6.6.1.12 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-riboseoxim (31)^[40, 61]



Unter N_2 -Atmosphäre wurden 263 mg (3.78 mmol) Hydroxylammoniumchlorid in 2 mL abs. Ethanol suspendiert, bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ mit Natriumethanolat-Lösung (64 mg (2.78 mmol) Natrium in 1.4 mL abs. Ethanol) versetzt und für 30 min bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Der dabei entstandene Feststoff (NaCl) wurde unter N_2 -Atmosphäre filtriert und mit wenig abs. Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ zu einer Lösung von 73.3 mg (0.207 mmol) **30** in 1.5 mL eines Ethanol/Wasser-Gemisch (1.3:1) langsam zugegeben, die Lösung für 2 h bei $60\text{--}70\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und danach abkühlen gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es wurde 87.0 mg (0.236 mmol) eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten. Dies entspricht einer quantitativen Ausbeute bezogen auf **30**. Es handelt sich um ein Gemisch aus *E*- und *Z*-Isomer mit einem Verhältnis von 1 : 0.25.

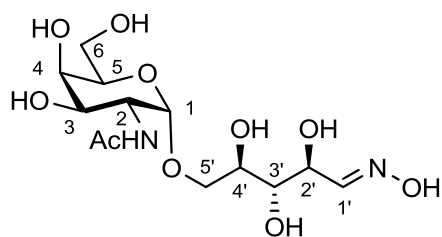
Charakterisierung:

Farbloser, amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{24} = 137.0^\circ$ ($c = 0.1$, H_2O)

R_f -Wert = 0.38 (EtOH:CH₂Cl₂:H₂O = 5:5:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 391.1328$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 391.1329 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).

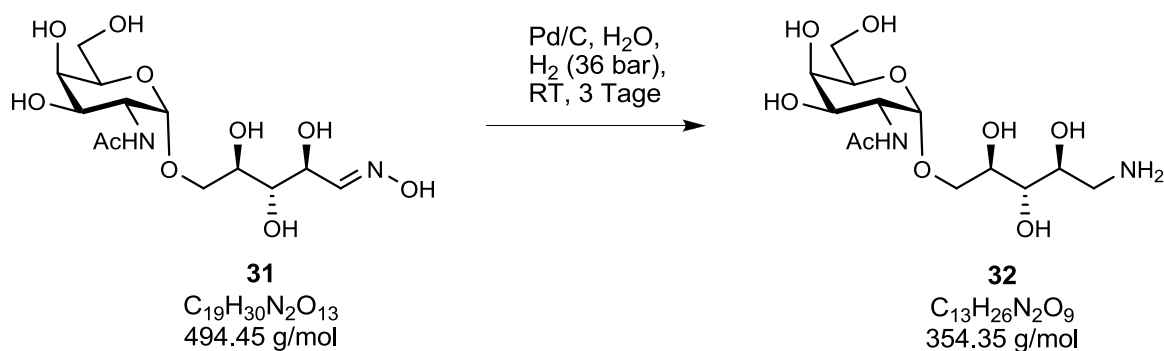


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.45 (d, 1H, H-1', *E*-isomer), 6.80 (d, 1H, H-1', *Z*-isomer), 5.10 (dd, 1H, H-2', *Z*-isomer), 4.80 (d, 1H, H-1), 4.40 (dd, 1H, H-2'), 4.31 (dd, 1H, H-2), 3.97-3.89 (m, 3H, H-4, H-5, H-5'a), 3.87-3.84 (m, 1H, H-3', *Z*-isomer), 3.84-3.80 (m, 1H, H-3), 3.77-3.73 (m, 4H, H-6, H-3', H-4'), 3.58-3.54 (m, 1H, H-5'b), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'}(\textit{E}\text{-isomer}) = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'}(\textit{Z}\text{-isomer}) = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'}(\textit{E}\text{-isomer}) = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'}(\textit{Z}\text{-isomer}) = 3.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): δ [ppm] = 174.3 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 153.0 (C-1', *Z*-isomer), 151.3 (C-1', *E*-isomer), 99.1 (C-1), 74.6 (C-4'), 73.8 (C-3', *Z*-isomer), 72.0 (C-5), 71.9 (C-2'), 71.7 (C-3'), 70.7 (C-4), 70.2 (C-3), 69.8 (C-5'), 67.8 (C-2', *Z*-isomer), 62.9 (C-6), 51.4 (C-2), 22.8 (NH-CO-CH_3).

6.6.1.13 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-ribitylamin (32)^[40]



Es wurde 31 mg Pd/C (10 %) zu 81.1 mg (0.165 mmol) **31**, gelöst in 3 mL Wasser, gegeben. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt und das Gemisch für drei Tage unter Wasserstoffatmosphäre (36 bar) im Autoklaven bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch über Celite filtriert, mit Wasser gewaschen und das Filtrat gefriergetrocknet. Es konnten 93.4 mg (0.264 mmol) eines farblosen Schaums erhalten werden. Dies entspricht einer quantitativen Ausbeute bezogen auf **31**.

Charakterisierung:

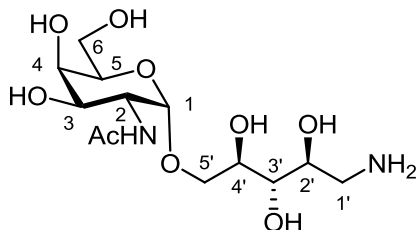
Farbloser Schaum.

$$[\alpha]_D^{24} = 116.0^\circ \quad (c = 0.2, \text{H}_2\text{O})$$

R_f-Wert = 0 (EtOH:CH₂Cl₂:H₂O = 5:5:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 355.1716$ [M+H]⁺ (gef.), 355.1711 [M+H]⁺ (ber.),

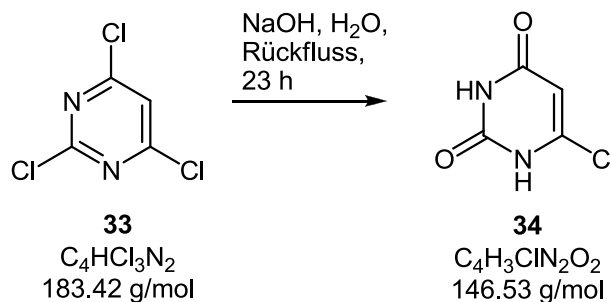
377.1549 [M+Na]⁺ (gef.), 377.1536 [M+Na]⁺ (ber.).



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.96 (d, 1H, H-1), 4.24 (dd, 1H, H-2), 4.12-4.07 (m, 1H, H-2'), 4.05-4.01 (m, 2H, H-4, H-5), 3.98 (dd, 1H, H-3), 3.95-3.81 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'a), 3.82-3.76 (m, 2H, H-6), 3.69-3.63 (m, 1H, H-5'b), 3.31 (dd, 1H, H-1'a), 3.15 (dd, 1H, H-1'b), 2.08 (s, 3H, CH₃-CO-).

³J_{H1, H2} = 3.6 Hz, ³J_{H2, H3} = 11.0 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.1 Hz, ²J_{H1'a, H1'b} = 13.1 Hz, ³J_{H1'a, H2'} = 3.1 Hz, ³J_{H1'b, H2'} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 174.7 (CH₃-CO-), 97.2 (C-1), 72.4 (C-4'), 71.1 (C-5), 70.2 (C-3'), 68.5 (C-4), 68.5 (C-5'), 68.0 (C-2'), 67.8 (C-3), 61.3 (C-6), 49.9 (C-2), 40.9 (C-1'), 22.0 (NH-CO-CH₃).

6.6.1.14 6-Chlorpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (34)^[62]

Nach literaturbekannter Vorschrift^[62] wurden 1.5 mL (2.4 g, 13 mmol) 2,4,6-Trichlorpyridin (**33**) zu einer NaOH-Lösung (2.5 g (63 mmol) NaOH in 21 mL Wasser) gegeben und die

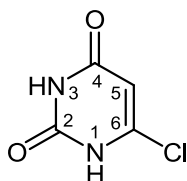
Emulsion für 23 h zum Rückfluss erhitzt. Die entstandene farblose, trübe Lösung wurde nach dem Abkühlen mit konz. HCl angesäuert und filtriert. Der farblose Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und anschließend bei 50°C getrocknet. Es konnten 1.5 g (10 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 80 % bezogen auf **33**.

Charakterisierung:

Farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 300 °C (Zersetzung).

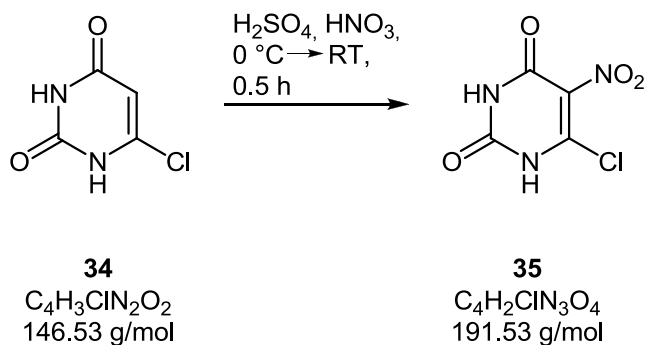
HR-ESI-MS: $m/z = 146.9954$ $[M+H]^+$ (gef.), 146.9962 $[M+H]^+$ (ber.).



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 12.05 (s, 1H, NH-1), 11.29 (s, 1H, NH-3), 5.75-5.74 (m, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 162.7 (C-4), 150.3 (C-2), 144.7 (C-6), 99.9 (C-5).

6.6.1.15 6-Chlor-5-nitro-2,4(1H,3H)-dion (**35**)^[62, 63]



104 mg (0.701 mmol) **34** wurden bei 0 °C mit 0.124 mL konz. Schwefelsäure und 0.111 mL konz. Salpetersäure versetzt und dann bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein Feststoff

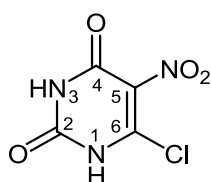
ausfiel. Nach 30 min wurde das Gemisch mit einer Spatelspitze Eis versetzt. Der Feststoff wurde filtriert, jeweils mit 0.2 mL Eiswasser und 0.6 mL eines Ethanol/Ether-Gemisch (1:2) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Es wurden 47.5 mg (0.248 mmol) eines hellgelben Feststoffes erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 35 % bezogen auf **34**.

Charakterisierung:

Hellgelber Feststoff.

Schmelzpunkt: 163 °C (Zersetzung).

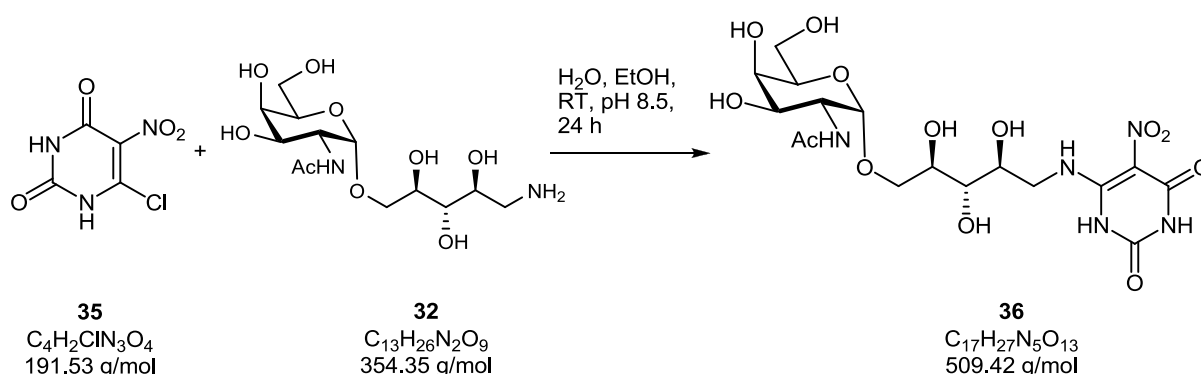
HR-ESI-MS: $m/z = 188.0318$ [M-2H]²⁻ (gef.), 188.9588 [M-2H]²⁻ (ber.).



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.06 (s, 1H, NH-1), 9.84 (s, 1H, NH-3).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 159.1 (C-2), 149.9 (C-6).

6.6.1.16 5-Nitro-6-(5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl))-5-D-riboseaminouracil (**36**)^[40]



93 mg (0.262 mmol) **32** wurden in 1.5 mL Wasser gelöst und mit 53.8 mg (0.280 mmol) **35** gelöst in 1.5 mL Ethanol versetzt. Die gelbe Lösung wurde mit 1M NaOH Lösung auf pH 8.5 eingestellt und bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann unter vermindertem Druck eingengt und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in wenig Ammoniumformiat-Lösung

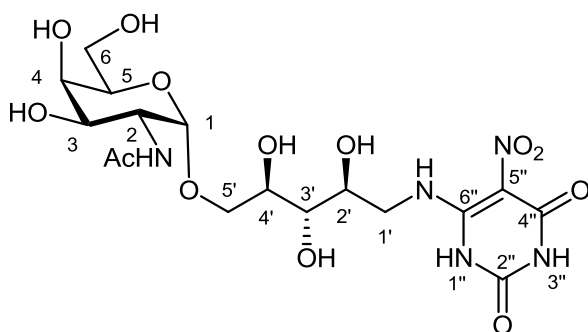
(0.1 M bezogen auf Formiat, pH 10.7) wieder gelöst und auf eine Anionenaustauschersäule Dowex 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen. Es wurde jeweils mit 100 mL Wasser, 100 mL 5%iger Ameisensäure, 100 mL 10%iger Ameisensäure und 50 mL 50%iger Ameisensäure eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthalten, wurden vereinigt, unter vermindertem Druck eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es wurden 24.6 mg (0.048 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 18 % bezogen auf **32**.

Charakterisierung:

Gelber Feststoff.

R_f -Wert = 0.20 (EE:*i*PrOH:H₂O = 1:8:2).

HR-ESI-MS: m/z = 510.1683 [M+H]⁺ (gef.), 510.1678 [M+H]⁺ (ber.).

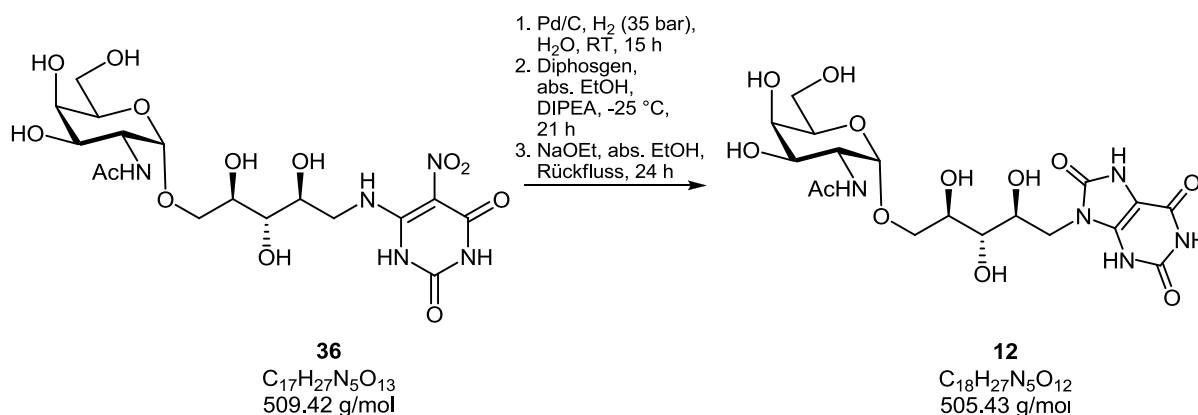


¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.95 (d, 1H, H-1), 4.23 (dd, 1H, H-2), 4.18-4.14 (m, 1H, H-2'), 4.03-3.98 (m, 3H, H-4, H-5, H-4'), 3.96 (dd, 1H, H-3), 3.93-3.88 (m, 1H, H-5'a), 3.88-3.83 (m, 2H, H-1'a, H-3'), 3.80-3.71 (m, 3H, H-6, H-1'b), 3.67 (dd, 1H, H-5'b), 2.06 (s, 3H, CH₃-CO-).

³ $J_{H1, H2}$ = 3.6 Hz, ³ $J_{H2, H3}$ = 11.0 Hz, ³ $J_{H3, H4}$ = 3.3 Hz, ³ $J_{H4', H5'b}$ = 2.5 Hz, ² $J_{H5'a, H5'b}$ = 10.6 Hz.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 97.2 (C-1), 72.0 (C-3'), 71.1 (C-5), 70.6 (C-4'), 69.5 (C-2'), 68.5 (C-4), 68.4 (C-5'), 67.9 (C-3), 61.2 (C-6), 49.8 (C-2), 44.7 (C-1'), 21.9 (NH-CO-CH₃).

6.6.1.17 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl))-D-ribityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**12**)^[40, 64, 65]



27 mg (0.053 mmol) **36** wurden in 2 mL Wasser gelöst, mit 13.4 mg Pd/C (10 %) versetzt und das Gemisch für 15 h unter Wasserstoffatmosphäre (35 bar) im Autoklaven bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in abs. Ethanol suspendiert und die Suspension unter N₂-Atmosphäre bei -25 °C jeweils mit 1 mL DIPEA und 30 μ L (50 mg, 0.25 mmol) Diphosgen versetzt. Nach 21 h Rühren bei -25 °C wurde das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser versetzt, über Celite filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der zurückgebliebene gelbe Feststoff wurde in ein wenig Ammoniumformiat-Lösung (0.1 M bezogen auf Formiat, pH 10.7) gelöst, auf eine Anionenaustauschersäule Dowex 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen und jeweils mit 50 mL Wasser, 50 mL 5%ige Ameisensäure eluiert. Die sauren Fraktionen wurden eingengt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde danach größenausschlusschromatographisch (Biogel, P2) gereinigt. Es wurde 8.5 mg eines gelben Feststoffes erhalten.

Das Zwischenprodukt wurde in 1.6 mL Natriumethanolat-Lösung (0.03 M in Ethanol) suspendiert und für 24 h zum Rückfluss erhitzt. Die trübe Lösung wurde unter vermindertem Druck eingengt, mit wenig Wasser versetzt, mit 7%iger HCl neutralisiert und danach gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Produkt größenausschlusschromatographisch (Biogel, P2) gereinigt. Es konnten 6.9 mg (0.014 mmol, 26 % bezogen auf **36**) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Charakterisierung:

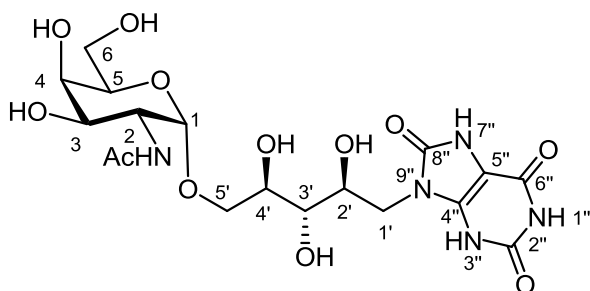
Farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{24} = 50.7^\circ$ (c = 0.08, H₂O)

R_F-Wert = 0.37 (EE:*i*PrOH:H₂O = 1:8:2).

Schmelzpunkt: 330 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: $m/z = 506.5303$ $[M+H]^+$ (gef.), 506.1729 $[M+H]^+$ (ber.).



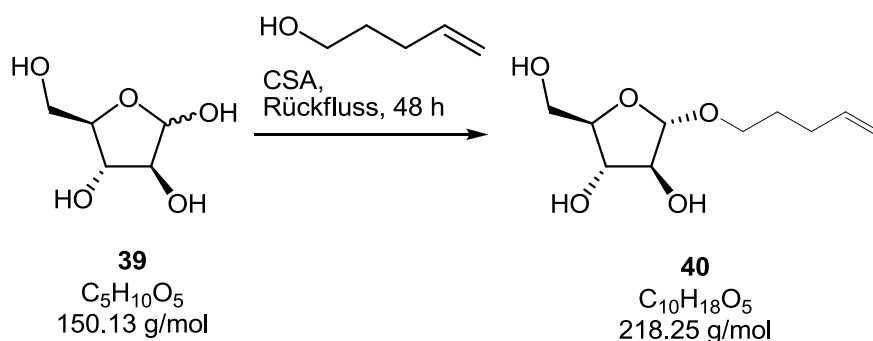
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 4.85 (d, 1H, H-1), 4.14 (dd, 1H, H-2), 4.11-4.07 (m, 1H, H-2'), 3.96-3.92 (m, 4H, H-4, H-1', H-4'), 3.92-3.89 (m, 1H, H-5), 3.84 (dd, 1H, H-3), 3.83 (dd, 1H, H-5'a), 3.7-3.69 (m, 2H, H-6), 3.67 (dd, 1H, H-3'), 3.58 (dd, 1H, H-5'b), 1.97 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.7$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'a} = 5.5$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'b} = 3.2$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 10.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): δ [ppm] = 97.2 (C-1), 71.7 (C-3'), 71.1 (C-5), 70.5 (C-4'), 70.2 (C-2'), 68.5 (C-4), 68.2 (C-5'), 67.9 (C-3), 61.2 (C-6), 49.9 (C-2), 42.2 (C-1'), 21.9 (NH-CO- CH_3).

6.6.2 Darstellung von 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**13**)

6.6.2.1 4-Pentenyl α/β -D-arabinofuranosid (**40**)^[54]



Unter N_2 -Atmosphäre wurden 2.50 g (16.7 mmol) D-Arabinose (**39**) und eine Spatelspitze Molsieb 4 Å in 24 mL 4-Penten-1-ol suspendiert. Zu der Suspension wurden 240 mg (1.03 mmol) CSA, gelöst in 1 mL 4-Penten-1-ol, zugegeben und für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Durch Zugabe von 460 mg K_2CO_3 wurde die Reaktion beendet und das gesamte Reaktionsgemisch auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Zunächst wurde 4-Penten-1-ol mit Toluol und anschließend das Produkt mit Toluol:Aceton 1:1 eluiert. Es konnte 1.47 g (6.74 mmol) eines gelben Sirups erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 40 % bezogen auf D-Arabinose (**39**). Dabei wurde das α -Anomer erhalten.

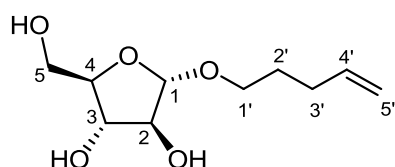
Charakterisierung:

Gelber Sirup.

$[\alpha]_D^{23} = 88.9^\circ$ ($c = 0.75$, $CHCl_3$).

R_f -Wert = 0.29 (EE).

HR-ESI-MS: $m/z = 241.1052$ $[M+Na]^+$ (gef.), 241.1052 $[M+Na]^+$ (ber.).

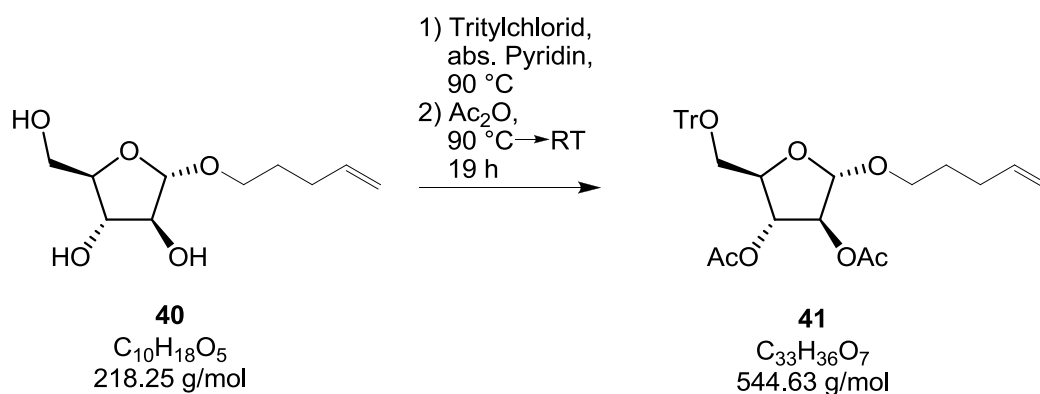


1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.79 (ddt, 1H, H-4'), 5.06-5.00 (m, 1H, H-5'cis), 5.00-4.95 (m, 2H, H-1, H-5'trans), 4.15-4.12 (m, 1H, H-4), 4.03-3.97 (m, 2H, H-2, H-3), 3.86 (dd, 1H, H-5a), 3.82-3.77 (m, 1H, H-5b), 3.74 (td, 1H, H-1'a), 3.45 (td, 1H, H-1'b), 2.14-2.06 (m, 2H, H-3'), 1.73-1.64 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H5a, H4} = 2.5$ Hz, $^2J_{H5a, H5b} = 11.7$ Hz, $^2J_{H1'a, H1'b} = 9.8$ Hz, $^3J_{H1'a, H2'} = 6.6$ Hz, $^3J_{H1'b, H2'} = 6.5$ Hz, $^3J_{H3', H4'} = 6.6$ Hz, $^3J_{H5'trans, H4'} = 10.4$ Hz, $^3J_{H5'cis, H4'} = 17.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 137.9 (C-4'), 115.3 (C-5'), 108.2 (C-1), 87.0 (C-4), 79.1 (C-2), 78.1 (C-3), 67.3 (C-1'), 62.0 (C-5), 30.4 (C-3'), 28.7 (C-2').

6.6.2.2 (4-Pentenyl) 2,3-di-O-acetyl-6-O-triphenylmethyl- α/β -D-arabino-furanosid (**41**)^[55]

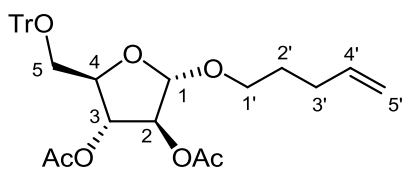


1.47 g (6.74 mmol) **40** wurde nach der Vorschrift von **25** dargestellt. Es konnten 2.69 g (4.94 mmol) eines braunen Sirups erhalten werden, der ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde.

Charakterisierung:

Brauner Sirup.

R_f -Wert = 0.59 (EE).

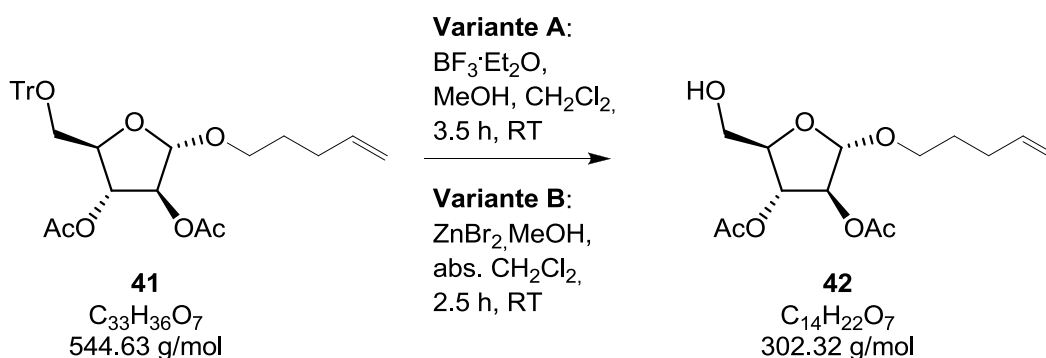


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.47-7.41 (m, 5H, arom.), 7.30-7.19 (m, 10H, arom.), 5.81 (ddt, 1H, H-4'), 5.12 (dd, 1H, H-3), 5.04-5.02 (m, 1H, H-2), 5.04-4.99 (m, 2H, H-1, H-5'a), 4.97-4.93 (m, 1H, H-5'b), 4.15 (ddd, 1H, H-4), 3.70 (td, 1H, H-1'a), 3.46 (td, 1H, H-1'b), 3.35 (dd, 1H, H-5a), 3.30 (dd, 1H, H-5b), 2.16-2.08 (m, 2H, H-3'), 2.05, 2.02 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.74-1.63 (m, 2H, H-2').

$^3J_{H_2, H_3} = 1.5$ Hz, $^3J_{H_3, H_4} = 5.3$ Hz, $^3J_{H_4, H_{5a}} = 4.4$ Hz, $^3J_{H_4, H_{5b}} = 4.9$ Hz, $^2J_{H_{5a}, H_{5b}} = 10.2$ Hz, $^2J_{H_{1'a}, H_{1'b}} = 9.7$ Hz, $^3J_{H_{1'a}, H_{2'}} = 6.8$ Hz, $^3J_{H_{1'b}, H_{2'}} = 6.3$ Hz, $^3J_{H_{3'}, H_{4'}} = 6.6$ Hz, $^3J_{H_{5'trans}, H_{4'}} = 10.3$ Hz, $^3J_{H_{5'cis}, H_{4'}} = 17.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.2, 170.0 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 144.0 (arom.), 138.3 (C-4'), 128.9, 128.0, 127.2 (arom.), 115.0 (C-5'), 105.7 (C-1), 86.9 ($-\text{C}(\text{Ph})_3$), 82.0 (C-2), 81.3 (C-4), 77.6 (C-3), 66.8 (C-1'), 63.5 (C-5), 30.4 (C-3'), 28.8 (C-2'), 21.0, 20.9 (2x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.2.3 4-Pentenyl 2,3-di-O-acetyl- α/β -D-arabinofuranosid (**42**)



Variante A^[56]

Nach der Vorschrift von **26** wurde 1.34 g (2.46 mmol) **41** zu 177 mg (0.585 mmol, 30 % bezogen auf **40** über zwei Stufen) eines hellgelbes Sirups umgesetzt.

Variante B^[66, 67]

Unter N_2 -Atmosphäre wurden 2.69 g (4.94 mmol) **41** in abs. 80 mL Dichlormethan gelöst und mit 2.99 g (13.3 mmol) Zinkbromid, vorgelegt in 10 mL abs. Dichlormethan, versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Dann wurde 1 g (4.44 mmol) Zinkbromid, gelöst in 5 mL Methanol, zugegeben und für weitere 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in ca. 130 mL Wasser aufgenommen, die organische Phase zweimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 3:1) konnten 646 mg (2.14 mmol) eines hellgelben Sirups erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 32% bezogen auf **40** über zwei Stufen.

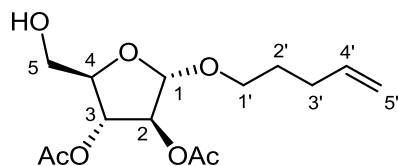
Charakterisierung:

Hellgelber Sirup.

$[\alpha]_D^{26} = 42.6^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

R_f -Wert = 0.36 (PE:EE = 1:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 325.1258$ $[M+Na]^+$ (gef.), 325.1264 $[M+Na]^+$ (ber.).

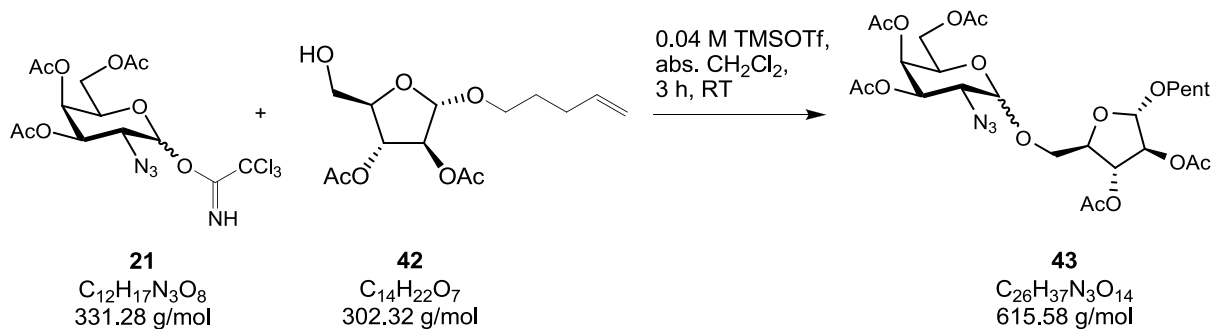


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.80 (ddt, 1H, H-4'), 5.11-5.09 (m, 1H, H-2), 5.05-4.95 (m, 4H, H-1, H-3, H-5'), 4.09 (dd, 1H, H-4), 3.87 (dd, 1H, H-5a), 3.79 (dd, 1H, H-5b), 3.70 (td, 1H, H-1'a), 3.45 (td, 1H, H-1'b), 2.16-2.10 (m, 2H, H-3'), 2.10, 2.09 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.74-1.63 (m, 2H, H-2').

$^3J_{\text{H}_4, \text{H}_{5a}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_4, \text{H}_{5b}} = 4.2$ Hz, $^2J_{\text{H}_{5a}, \text{H}_{5b}} = 12.0$ Hz, $^2J_{\text{H}_{1'a}, \text{H}_{1'b}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_{1'a}, \text{H}_{2'}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_{1'b}, \text{H}_{2'}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3'}, \text{H}_{4'}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_{5'\text{trans}}, \text{H}_{4'}} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_{5'\text{cis}}, \text{H}_{4'}} = 17.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.8, 169.9 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 138.1 (C-4'), 115.1 (C-5'), 105.5 (C-1), 83.0 (C-4), 81.8 (C-2), 77.4 (C-3), 66.7 (C-1'), 62.2 (C-5), 30.3 (C-3'), 28.7 (C-2'), 20.9 (2x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

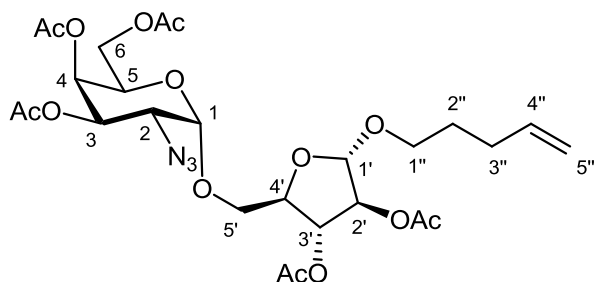
6.6.2.4 4-Pentenyl 5-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl- α/β -D-arabinofuranosid (**43**)^[49]



1.40 g (4.23 mmol) **21** und 0.805 g (2.66 mmol) **42** wurden nach der Vorschrift von **27** zu **43** umgesetzt. Es wurden 494 mg (0.802 mmol, 30 % bezogen auf **42**) eines gelben Sirups erhalten, welcher ein anomeres Gemisch mit einem α/β Verhältnis von 1:0.03 enthält.

Charakterisierung:

Gelber Sirup.

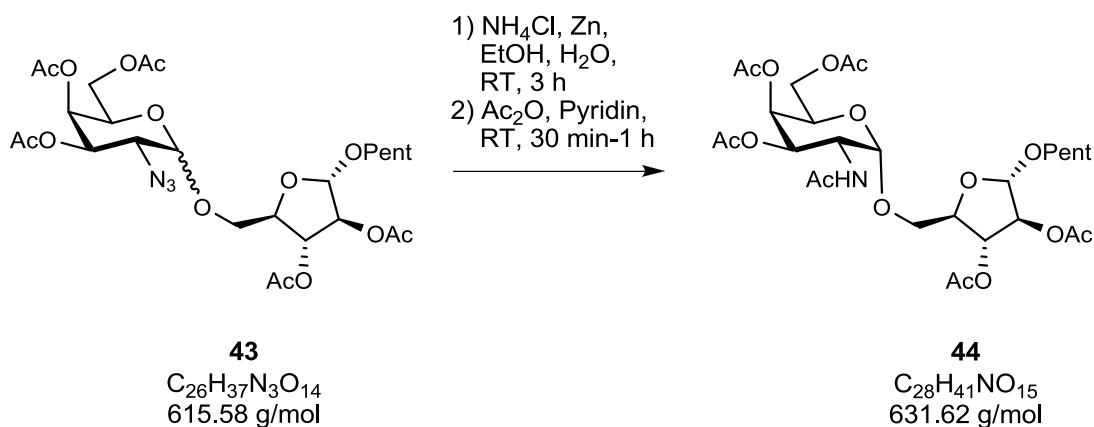
 $[\alpha]_D^{26} = 83.9^\circ$ ($c = 0.71$, CHCl_3). R_f -Wert = 0.37 (PE:EE = 3:2).HR-ESI-MS: $m/z = 638.2436$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 638.2174 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.82 (ddt, 1H, H-4''), 5.47 (dd, 1H, H-4), 5.38 (dd, 1H, H-3), 5.10-5.06 (m, 2H, H-1, H-2'), 5.06-4.94 (m, 4H, H-1', H-3', H-5''), 4.36-4.30 (m, 1H, H-5), 4.12 (ddd, 1H, H-4'), 4.15 (dd, 1H, H-6a), 4.08 (dd, 1H, H-6b), 3.95 (dd, 1H, H-5'a), 3.82 (dd, 1H, H-5'b), 3.71 (td, 1H, H-1''a), 3.63 (dd, 1H, H-2), 3.46 (td, 1H, H-1''b), 2.14, 2.10, 2.09, 2.05 (s, 15H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.12-2.09 (m, 2H, H-3''), 1.74-1.65 (m, 2H, H-2'').

$^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_4, \text{H}_5} = 1.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_{6a}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_{6b}} = 6.7$ Hz, $^2J_{\text{H}_{6a}, \text{H}_{6b}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3'}, \text{H}_{4'}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_{4'}, \text{H}_{5a'}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_{4'}, \text{H}_{5b'}} = 3.2$ Hz, $^2J_{\text{H}_{5'a}, \text{H}_{5'b}} = 11.0$ Hz, $^2J_{\text{H}_{1''a}, \text{H}_{1''b}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_{1''a}, \text{H}_{2''}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_{1''b}, \text{H}_{2''}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3''}, \text{H}_{4''}} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_{5''\text{trans}}, \text{H}_{4''}} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_{5''\text{cis}}, \text{H}_{4''}} = 17.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.5, 170.5, 170.2, 170.2, 169.9 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 138.2 (C-4''), 115.1 (C-5''), 105.6 (C-1'), 98.4 (C-1), 82.0 (C-2'), 81.0 (C-4'), 77.3 (C-3'), 68.1 (C-3), 67.7 (C-4), 67.6 (C-5'), 67.0 (C-5, C-1''), 61.6 (C-6), 57.5 (C-2), 30.3 (C-3''), 28.7 (C-2''), 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.8 (5x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.2.5 4-Pentenyl 5-O-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl- α/β -D-arabinofuranosid (**44**)^[57]



494 mg (0.802 mmol) **43** wurden nach der Vorschrift von **28** zu **44** umgesetzt. Es konnten 435 mg (0.689 mmol, 86% bezogen auf **43**) eines gelben Sirups erhalten werden.

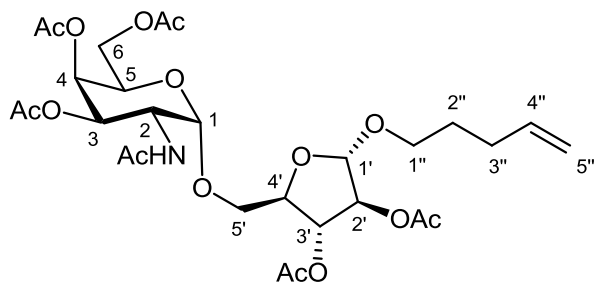
Charakterisierung:

Gelber Sirup.

$[\alpha]_D^{21} = 68.0^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

R_f -Wert = 0.32 (EE).

HR-ESI-MS: $m/z = 632.2561$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gef.), 632.2555 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ber.),
 654.2374 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gef.), 654.2374 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (ber.),
 670.2126 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (gef.), 670.3459 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (ber.).



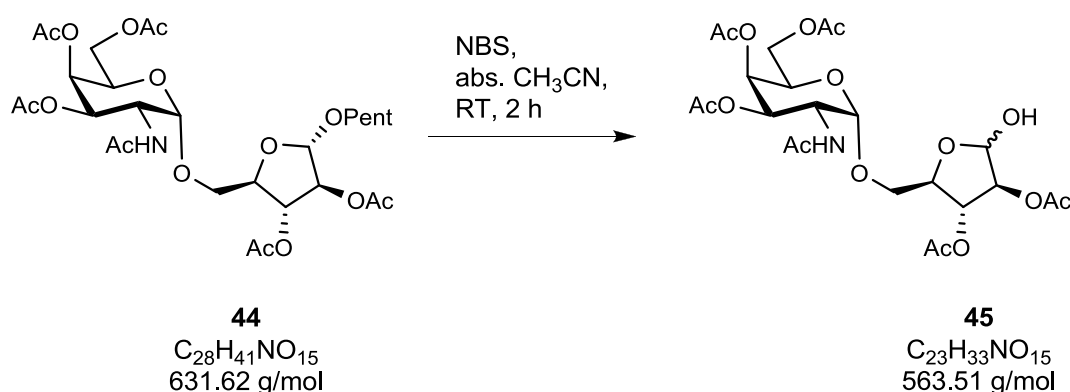
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.26 (d, 1H, N-H), 5.83 (ddt, 1H, H-4''), 5.37 (dd, 1H, H-4), 5.14-5.12 (m, 1H, H-3'), 5.11-5.07 (m, 2H, H-3, H-2'), 5.07-4.96 (m, 3H, H-1', H-5''), 4.90 (d, 1H, H-1), 4.63 (ddd, 1H, H-2), 4.23-4.18 (m, 1H, H-5), 4.17-4.05 (m, 3H, H-6, H-4'), 3.98 (dd,

1H, H-5'a), 3.71 (td, 1H, H-1''a), 3.53 (dd, 1H, H-5'b), 3.47 (td, 1H, H-1''b), 2.16, 2.15, 2.11, 2.05, 1.99 (s, 18H, CH₃-CO-), 2.18-2.13 (m, 2H, H-3''), 1.76-1.67 (m, 2H, H-2'').

³J_{H1, H2} = 3.6 Hz, ³J_{H2, NH} = 10.0 Hz, ³J_{H2, H3} = 11.3 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.3 Hz, ³J_{H4, H5} = 1.1 Hz, ³J_{H4', H5a'} = 4.6 Hz, ³J_{H4', H5b'} = 6.6 Hz, ²J_{H5'a, H5'b} = 10.1 Hz, ²J_{H1''a, H1''b} = 9.6 Hz, ³J_{H1''a, H2''} = 6.6 Hz, ³J_{H1''b, H2''} = 6.3 Hz, ³J_{H3'', H4''} = 6.6 Hz, ³J_{H5''trans, H4''} = 10.3 Hz, ³J_{H5''cis, H4''} = 17.0 Hz.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.9, 170.6, 170.6, 170.5 (CH₃-CO-), 138.1 (C-4''), 115.2 (C-5''), 105.6 (C-1'), 98.6 (C-1), 81.8 (C-2'), 81.4 (C-4'), 77.8 (C-3'), 68.5 (C-3), 67.8 (C-5'), 67.4 (C-4), 67.2 (C-5), 67.0 (C-1''), 61.9 (C-6), 47.5 (C-2), 30.3 (C-3''), 28.7 (C-2''), 23.3 (NH-CO-CH₃), 20.9 (5x CH₃-CO-).

6.6.2.6 5-O-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-galactopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl-α/β-D-arabinofuranose (**45**)^[59]



Nach der Vorschrift von **29** wurden 823 mg (1.30 mmol) **44** zu 420 mg (0.745 mmol, 57 % bezogen auf **44**) eines farblosen Sirups umgesetzt, welcher ein anomeres Gemisch mit einem α/β Verhältnis von 1:0.97 enthält (bezogen auf Arabinose).

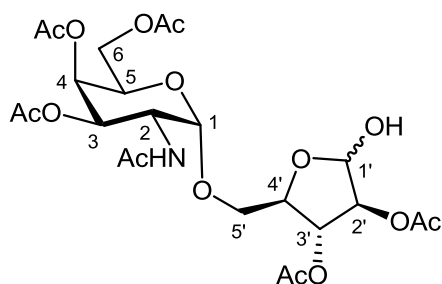
Charakterisierung:

Farbloser Sirup.

R_f-Wert = 0.15 (EE).

HR-ESI-MS: *m/z* = 564.2140 [M+H]⁺ (gef.), 564.1923 [M+H]⁺ (ber.),

586.1972 [M+Na]⁺ (gef.), 586.1748 [M+Na]⁺ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

β -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.20 (d, 1H, N-H), 5.42 (*pseudo-s*, 1H, H-1'), 5.38-5.36 (m, 1H, H-4), 5.14-5.08 (m, 3H, H-3, H-2', H-3'), 4.90 (d, 1H, H-1), 4.62 (ddd, 1H, H-2), 4.34-4.30 (m, 2H, H-5, H-4'), 4.24-4.17 (m, 1H, H-6a), 4.06-3.97 (m, 1H, H-6b), 3.92 (dd, 1H, H-5'a), 3.59 (dd, 1H, H-5'b), 2.17, 2.15, 2.12, 2.07, 1.99, 1.99 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H1}, \text{H2}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H2}, \text{NH}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H2}, \text{H3}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H3}, \text{H4}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{H4}', \text{H5a}'}$ = 5.5 Hz, $^3J_{\text{H4}', \text{H5b}'}$ = 6.2 Hz, $^2J_{\text{H5'a}, \text{H5'b}}$ = 10.2 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.0, 170.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 100.8 (C-1'), 98.5 (C-1), 82.1 (C-3'), 81.8 (C-4'), 77.3 (C-2'), 68.5 (C-3), 68.2 (C-5'), 67.4 (C-4), 66.5 (C-5), 61.7 (C-6), 47.6 (C-2), 23.2 (NH-CO-CH_3), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$).

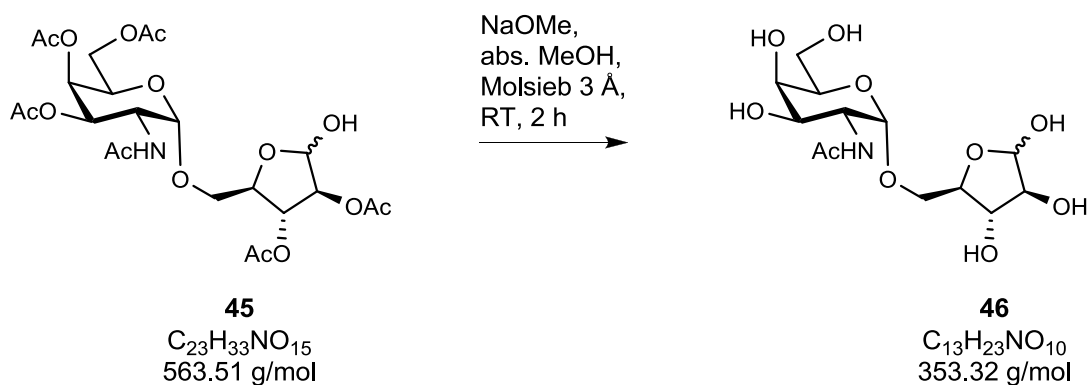
α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.18 (d, 1H, N-H), 5.60 (d, 1H, H-1'), 5.39 (dd, 1H, H-3'), 5.38-5.36 (m, 1H, H-4), 5.17 (dd, 1H, H-3), 5.12-5.10 (m, 1H, H-2'), 4.88 (d, 1H, H-1), 4.60 (ddd, 1H, H-2), 4.24-4.18 (m, 1H, H-5), 4.15-4.07 (m, 2H, H-6), 4.05-3.97 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.71 (dd, 1H, H-5'b), 2.17, 2.16, 2.13, 2.05, 1.99, 1.98 (s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H1}, \text{H2}} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H2}, \text{NH}} = 9.2$ Hz, $^3J_{\text{H2}, \text{H3}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H3}, \text{H4}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H1}', \text{H2}'}$ = 4.6 Hz, $^3J_{\text{H2}', \text{H3}'}$ = 6.4 Hz, $^3J_{\text{H3}', \text{H4}'}$ = 4.8 Hz, $^3J_{\text{H4}', \text{H5b}'}$ = 4.4 Hz, $^2J_{\text{H5'a}, \text{H5'b}}$ = 9.5 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.0, 170.5 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 97.9 (C-1), 95.0 (C-1'), 79.7 (C-4'), 77.7 (C-2'), 76.2 (C-3'), 69.3 (C-5'), 68.6 (C-3), 67.4 (C-4), 67.0 (C-5), 61.9 (C-6), 47.8 (C-2), 23.3 (NH-CO-CH_3), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (5x $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

6.6.2.7 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)- α/β -D-arabinofuranose (**46**)^[60]



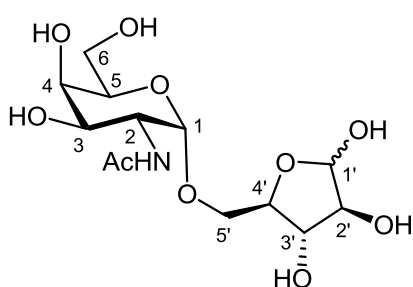
Nach der Vorschrift von **30** wurden 420 mg (0.745 mmol) **45** zu 395 mg (1.11 mmol, quantitativ bezogen auf **45**) eines farblosen Sirups umgesetzt. Es handelt sich um ein anomeres Gemisch mit einem α/β Verhältnis von 1:1.7 (bezogen auf Arabinose).

Charakterisierung:

Farbloser Sirup.

R_f -Wert = 0.52 (EE:Methanol = 4:1).

HR-ESI-MS: m/z = 376.1871 $[M+Na]^+$ (gef.), 376.1220 $[M+Na]^+$ (ber.).



NMR-Daten aus Gemisch interpretiert.

β -Anomer:

1H -NMR (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.14 (d, 1H, H-1'), 4.85-4.83 (m, 1H, H-1), 4.28 (dd, 1H, H-2), 4.15-4.11 (m, 1H, H-4'), 3.96-3.94 (m, 1H, H-2'), 3.94-3.88 (m, 3H, H-3', H-5, H-4), 3.84-3.76 (m, 2H, H-5'a, H-3), 3.75-3.69 (m, 2H, H-6), 3.62 (dd, 1H, H-5'b), 2.00 (s, 3H, CH_3 -CO-).

$^3J_{H1, H2} = 3.7$ Hz, $^3J_{H2, H3} = 10.8$ Hz, $^3J_{H1', H2'} = 1.9$ Hz, $^3J_{H4', H5'b} = 3.4$ Hz, $^2J_{H5'a, H5'b} = 11.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD): δ [ppm] = 103.7 (C-1'), 99.6 (C-1), 84.0 (C-2'), 83.7 (C-4'), 78.7 (C-3'), 72.6 (C-5), 70.4 (C-4), 70.3 (C-3), 68.6 (C-5'), 62.8 (C-6), 51.5 (C-2), 24.2 (NH-CO-CH₃).

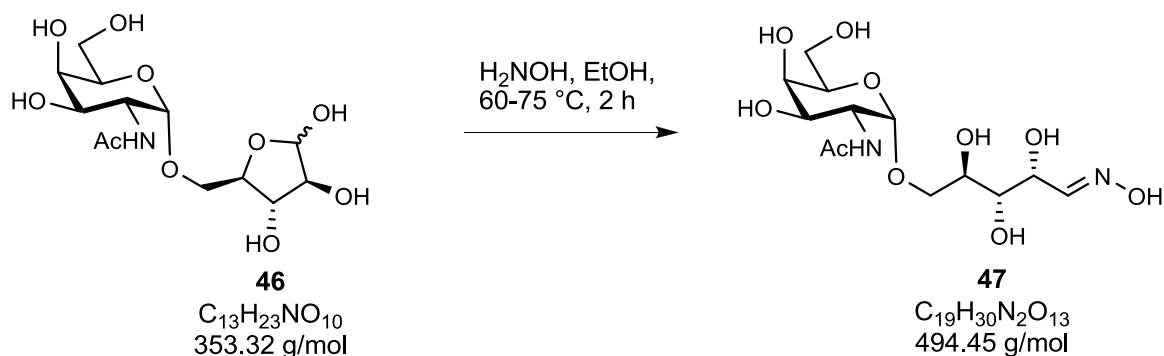
α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.21 (d, 1H, H-1'), 4.82 (d, 1H, H-1), 4.29 (dd, 1H, H-2), 4.06-4.03 (m, 1H, H-3'), 3.94-3.91 (m, 1H, H-2'), 3.87-3.76 (m, 5H, H-5, H-5'a, H-4, H-4', H-3), 3.75-3.69 (m, 2H, H-6), 3.59-3.55 (m, 1H, H-5'b), 2.00 (s, 3H, CH₃-CO-).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 10.9 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 4.4 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD): δ [ppm] = 99.3 (C-1), 97.5 (C-1'), 81.8 (C-4'), 76.7 (C-3'), 72.6 (C-5), 70.5 (C-4), 70.3 (C-3), 69.8 (C-5'), 63.0 (C-6), 51.5 (C-2), 22.8 (NH-CO-CH₃).

6.6.2.8 5-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinoseoxim (47)^[40, 61]



Wie bei **31** beschrieben, wurden 394 mg (1.12 mmol) **46** zu 469 mg (1.27 mmol, quantitativ bezogen auf **46**) eines farblosen, amorphen Feststoffes umgesetzt. Es handelt sich um ein Gemisch aus *E*- und *Z*-Isomer mit einem *E/Z*-Verhältnis von 1:0.3.

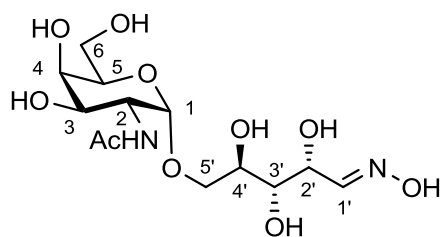
Charakterisierung:

Farbloser, amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{25} = 73.9^\circ$ ($c = 0.67$, Methanol).

R_f -Wert = 0.28 (CH₂Cl₂:EtOH:H₂O = 5:5:1).

HR-ESI-MS: $m/z = 391.1840$ [M+Na]⁺ (gef.), 391.1329 [M+Na]⁺ (ber.).

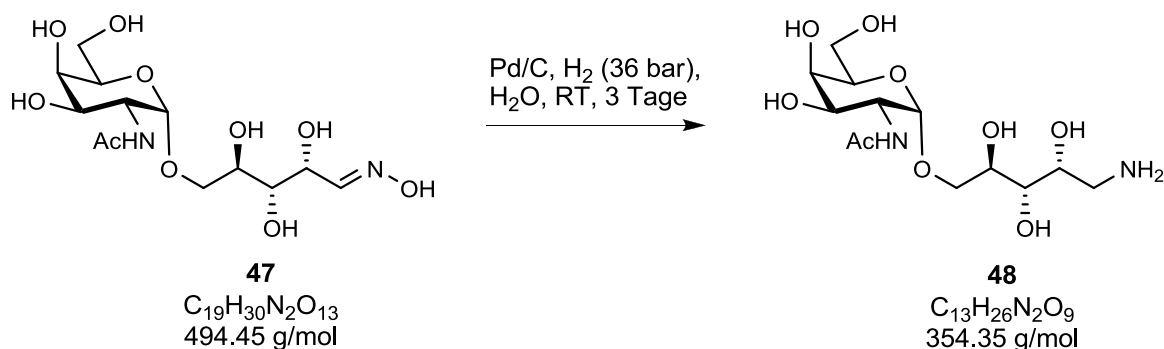


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.48 (d, 1H, H-1', *E*-isomer), 6.80 (d, 1H, H-1', *Z*-isomer), 5.19 (dd, 1H, H-2', *Z*-isomer), 4.79 (d, 1H, H-1), 4.46 (dd, 1H, H-2'), 4.32 (dd, 1H, H-2), 3.93 (dd, 1H, H-5'a), 3.91-3.88 (m, 2H, H-4, H-5), 3.88-3.83 (m, 1H, H-4'), 3.77 (dd, 1H, H-3), 3.73-3.70 (m, 2H, H-6), 3.63 (dd, 1H, H-3'), 3.56 (dd, 1H, H-5'b), 2.00 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 10.9$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.1$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'}(\textit{E}\text{-isomer}) = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1', \text{H}2'}(\textit{Z}\text{-isomer}) = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'}(\textit{E}\text{-isomer}) = 2.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'}(\textit{Z}\text{-isomer}) = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 8.5$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'\text{a}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'\text{b}} = 3.2$ Hz, $^2J_{\text{H}5'\text{a}, \text{H}5'\text{b}} = 10.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD): δ [ppm] = 174.1 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), 152.2 (C-1', *E*-isomer), 99.2 (C-1), 74.1 (C-3'), 72.4 (C-5), 70.7 (C-4'), 70.4 (C-4), 70.3 (C-3), 69.9 (C-2'), 69.7 (C-5'), 62.8 (C-6), 51.5 (C-2), 22.7 (NH-CO- CH_3).

6.6.2.9 5-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-D-arabinitylamin (**48**)^[40]



Nach der Vorschrift von **32** wurden aus 82.2 mg (0.223 mmol) **47** 71.9 mg (0.203 mmol, 91 % bezogen auf **47**) eines farblosen Schaumes erhalten.

Charakterisierung:

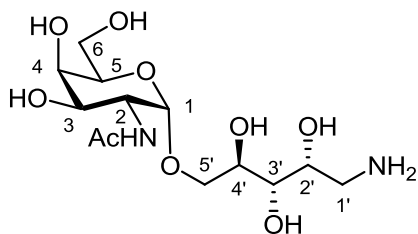
Farbloser Schaum.

$[\alpha]_D^{25} = 71.5^\circ$ ($c = 0.19$, H_2O).

R_f-Wert = 0 (CH₂Cl₂:EtOH:H₂O = 5:5:1).

HR-ESI-MS: *m/z* = 355.1563 [M+H]⁺ (gef.), 355.1711 [M+H]⁺ (ber.),

377.1442 [M+Na]⁺ (gef.), 377.1536 [M+Na]⁺ (ber.).

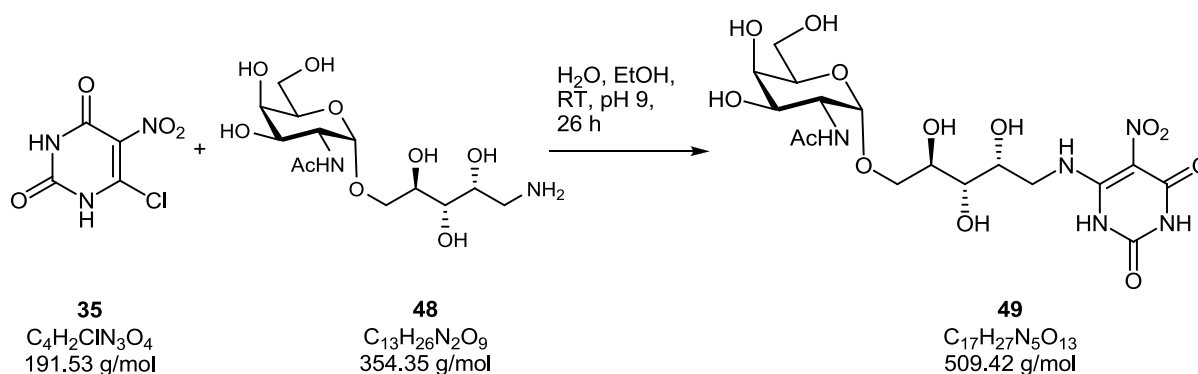


¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.93 (d, 1H, H-1), 4.22 (dd, 1H, H-2), 4.21-4.11 (m, 1H, H-2'), 4.03-3.98 (m, 2H, H-4, H-5), 3.94 (dd, 1H, H-3), 3.93-3.88 (m, 1H, H-3'), 3.79-3.75 (m, 2H, H-6), 3.69-3.64 (m, 1H, H-5'), 3.63-3.58 (m, 1H, H-4'), 3.21-3.16 (m, 2H, H-1'), 2.06 (s, 3H, CH₃-CO-).

³J_{H1, H2} = 3.8 Hz, ³J_{H2, H3} = 11.0 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.2.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 97.3 (C-1), 71.1 (C-5), 70.9 (C-4'), 69.0 (C-3'), 68.7 (C-5'), 68.5 (C-4), 67.9 (C-3), 66.4 (C-2'), 61.2 (C-6), 49.9 (C-2), 42.6 (C-1'), 23.3 (NH-CO-CH₃).

6.6.2.10 5-Nitro-6-(5-O-(2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranosyl))-5-D-arabinitylaminouracil (49)^[40]



65.3 mg (0.184 mmol) **48** wurden in 1.0 mL Wasser gelöst und mit 44.6 mg (0.233 mmol) **35**, gelöst in 1.0 mL Ethanol, versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 M NaOH Lösung auf pH 9 eingestellt und bei Raumtemperatur für 26 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in wenig Ammoniumformiat-Lösung gelöst (0.1 M

bezogen auf Formiat, pH 10.7) und auf eine Anionenaustauschersäule Dowex 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen. Es wurde jeweils mit 80 mL Wasser, 100 mL 1%iger Ameisensäure und 100 mL 5%iger Ameisensäure eluiert. Alle produktthaltige Fraktionen wurden vereinigt und unter vermindertem Druck eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es konnten 45.1 mg (88.5 μmol) eines hellgelben Feststoffes erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 94 % bezogen auf **48**.

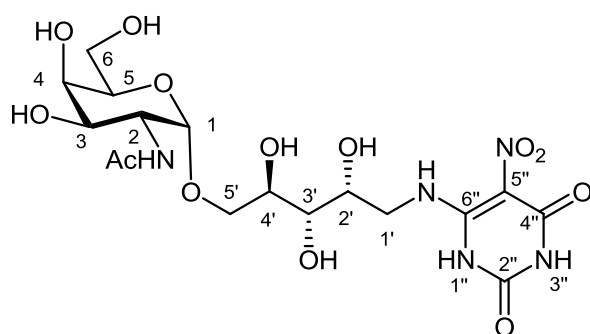
Charakterisierung:

Hellgelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{23} = 63.9^\circ$ ($c = 0.08$, H_2O).

Schmelzpunkt: 247 $^\circ\text{C}$ (Zersetzung).

HR-ESI-MS: $m/z = 510.1604$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gef.), 510.1678 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ber.).

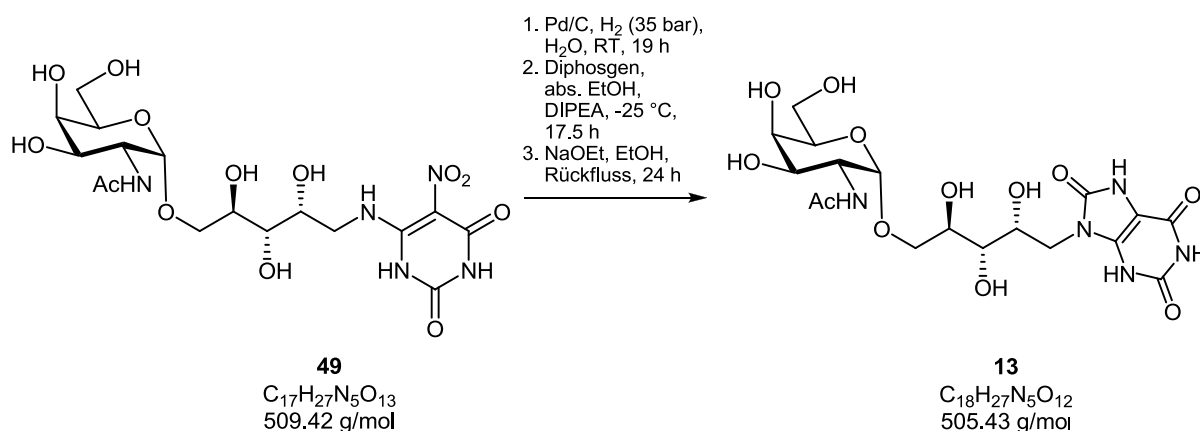


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 4.90 (d, 1H, H-1), 4.21 (dd, 1H, H-2), 4.14 (td, 1H, H-2'), 3.98 (dd, 1H, H-5'a), 3.97-3.89 (m, 3H, H-4, H-5, H-4'), 3.86 (dd, 1H, H-1'a), 3.77 (dd, 1H, H-3), 3.77-3.74 (m, 2H, H-6), 3.66 (dd, 1H, H-3'), 3.63-3.56 (m, 2H, H-1'b, H-5'b), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-}$).

$^3J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H}2, \text{H}3} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3, \text{H}4} = 3.3$ Hz, $^2J_{\text{H}1'a, \text{H}1'b} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'a, \text{H}2'} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 1.4$ Hz, $^3J_{\text{H}3', \text{H}4'} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4', \text{H}5'a} = 3.6$ Hz, $^2J_{\text{H}5'a, \text{H}5'b} = 10.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ [ppm] = 97.0 (C-1), 71.1 (C-5), 69.6 (C-3'), 68.8 (C-4), 68.6 (C-4'), 68.3 (C-5'), 68.1 (C-2'), 68.0 (C-3), 61.3 (C-6), 49.9 (C-2), 43.9 (C-1'), 21.9 (NH-CO- CH_3).

6.6.2.11 9-(5-O-(2-Acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl))-D-arabinityl-1,3,7-trihydropurin-2,6,8-trion (**13**)^[40, 64, 65]



28.9 mg (0.0567 mmol) **49** wurden in 2 mL Wasser gelöst, mit 18 mg Pd/C (10 %) versetzt und das Gemisch für 19 h unter Wasserstoffatmosphäre (36 bar) im Autoklaven bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde unter N₂-Atmosphäre mit 1 mL abs. Ethanol und ca. 1 mL DIPEA bei Raumtemperatur und anschließend bei -25°C mit 20 µL Diphosgen versetzt. Nach 3.5 h Rühren bei -25°C wurde weitere 12 µL Diphosgen zugegeben, der pH-Wert mit DIPEA auf ca. 8 eingestellt und für weitere 14 h bei -25°C und danach für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt und dann gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in wenig Ammoniumformiat-Lösung gelöst (0.1 M bezogen auf Formiat, pH 10.7) und auf eine Anionenaustauschersäule Dowex 1x2 (3 g, Formiat) aufgetragen. Der Rückstand wurde zuerst mit 50 mL Wasser und anschließend mit 50 mL 5%iger Ameisensäure eluiert. Die saure Fraktion wurde eingengt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde danach noch zusätzlich säulen- (Kieselgel, EE:iPrOH:H₂O = 1:8:2) und größen ausschluss chromatographisch (Biogel, P2) gereinigt.

Der erhaltende Feststoff (8.7 mg) wurde in 1.6 mL Natriumethanolat-Lösung suspendiert (0.03 M in Ethanol) und für 24 h zum Rückfluss erhitzt. Die trübe Lösung wurde mit 7%iger HCl neutralisiert, unter vermindertem Druck eingengt und gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Produkt größen ausschluss chromatographisch (Biogel, P2) gereinigt. Es konnten 9.5 mg (0.019 mmol, 34% bezogen auf **49**) eines farblosen Feststoffes erhalten werden.

Charakterisierung:

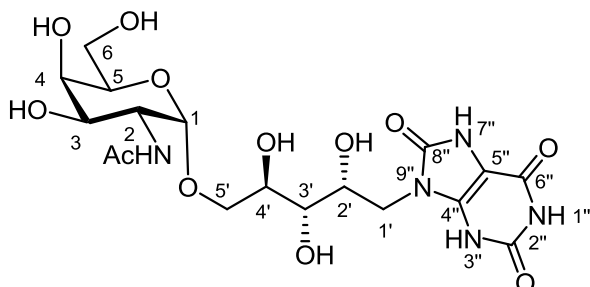
Farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{23} = 37.3^\circ$ (c = 0.08, H₂O).

Schmelzpunkt: 308 °C (Zersetzung).

R_f-Wert = 0-0.35 (Schmierung)(EE:*i*PrOH:H₂O = 1:8:2).

HR-ESI-MS: m/z = 506.5303 [M+H]⁺ (gef.), 506.1729 [M+H]⁺ (ber.).



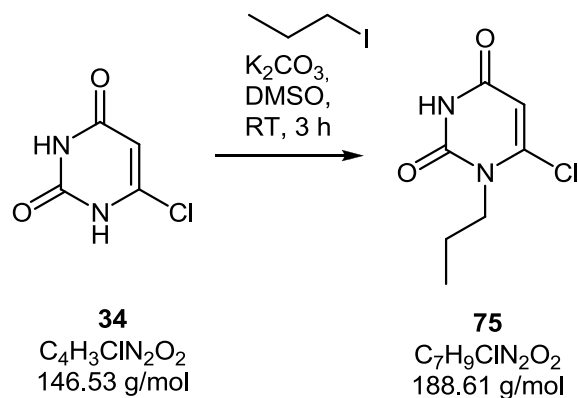
¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.90 (d, 1H, H-1), 4.24 (ddd, 1H, H-2'), 4.22 (dd, 1H, H-2), 4.01 (dd, 1H, H-5'a), 4.01 (dd, 1H, H-1'a), 3.99 (dd, 1H, H-4), 3.95 (ddd, 1H, H-4'), 3.91 (dd, 1H, H-1'b), 3.87-3.84 (m, 1H, H-5), 3.80-3.77 (m, 2H, H-6), 3.67 (dd, 1H, H-3), 3.59 (dd, 1H, H-3'), 3.58 (dd, 1H, H-5'), 2.04 (s, 3H, CH₃-CO-).

³J_{H1, H2} = 3.7 Hz, ³J_{H2, H3} = 11.0 Hz, ³J_{H3, H4} = 3.2 Hz, ³J_{H4, H5} = 0.8 Hz, ²J_{H1'a, H1'b} = 14.2 Hz, ³J_{H1'a, H2'} = 6.9 Hz, ³J_{H1'b, H2'} = 8.0 Hz, ³J_{H2', H3'} = 1.4 Hz, ³J_{H3', H4'} = 9.1 Hz, ³J_{H4', H5'a} = 3.2 Hz, ³J_{H4', H5'b} = 2.5 Hz, ²J_{H5'a, H5'b} = 10.3 Hz.

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 174.8 (CH₃-CO-), 159.3 (C-6''), 155.2 (C-2''), 154.2 (C-8''), 151.4 (C-4''), 97.0 (C-1), 71.3 (C-5), 68.7 (C-3'), 68.6 (C-4, C-4'), 68.2 (C-3), 68.0 (C-5'), 66.9 (C-2'), 61.4 (C-6), 49.9 (C-2), 41.7 (C-1'), 21.9 (NH-CO-CH₃).

6.6.3 Darstellung von 3-Propyl-1,7,9-trihydropurin-2,6,8-trion (81)

6.6.3.1 6-Chlor-1-propylpyrimidin-2,4(3H)-dion (75)^[75]



Eine Lösung von 0.672 g (4.59 mmol) **34**, gelöst in 5 mL DMSO, wurde mit 371 mg (2.68 mmol) K_2CO_3 und 1.30 mL (2.27 g, 13.4 mmol) 1-Iodpropan versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel ein Feststoff aus. Die Suspension wurde in Chloroform und Wasser aufgenommen und die wässrige Phase sechsmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:1) konnten 480 mg (2.54 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 56 % bezogen auf **34**.

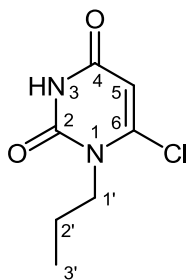
Charakterisierung:

Farbloser Feststoff.

R_f -Wert = 0.26 (PE:EE = 1:1).

Schmelzpunkt: 174 °C.

HR-ESI-MS: $m/z = 189.0438$ $[M+H]^+$ (gef.), 189.0426 $[M+H]^+$ (ber.).

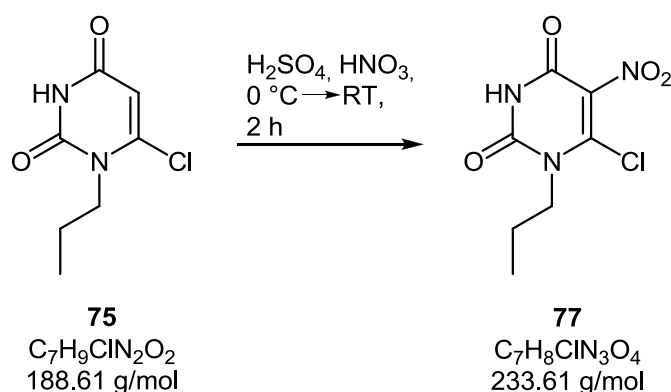


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 11.6 (s, 1H, NH-3), 5.91 (d, 1H, H-5), 3.86 (t, 2H, H-1'), 1.61 (sext., 2H, H-2'), 0.88 (t, 3H, H-3').

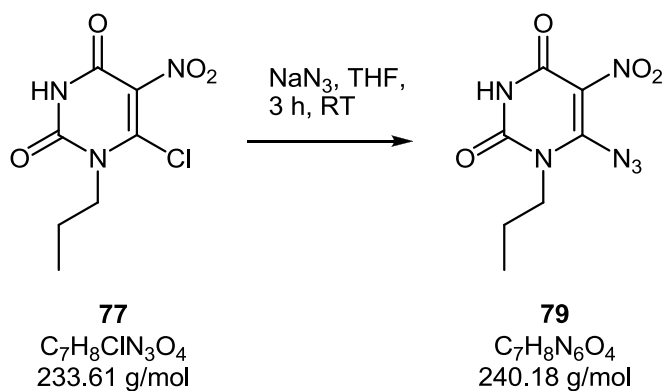
$^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 7.5 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 161.0 (C-4), 150.1 (C-2), 146.7 (C-6), 101.9 (C-5), 46.8 (C-1'), 21.5 (C-2'), 10.7 (C-3').

6.6.3.2 6-Chlor-5-nitro-1-propylpyrimidin-2,4(3H)-dion (**77**)^[62, 63]



114 mg (0.604 mmol) **75** wurden in 116 μL konz. Schwefelsäure suspendiert und bei 0°C mit 100 μL konz. Salpetersäure versetzt. Die gelbe Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt, bis ein Feststoff ausfiel. Die Suspension wurde mit einer Spatelspitze Eis versetzt, der gelbe Feststoff filtriert, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Der Feststoff wurde direkt ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

6.6.3.3 6-Azido-5-nitro-1-propylpyrimidin-2,4(3H)-dion (**79**)^[76]

85.6 mg (0.366 mmol) **77** wurden in 0.6 mL THF gelöst, mit 90 mg (1.4 mmol) Natriumazid versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die orangene Suspension wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (EE:PE = 2:1) gereinigt. Es konnten 19.5 mg (81.2 μmol) eines gelben Feststoffes erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 13 % über zwei Stufen bezogen auf **75**.

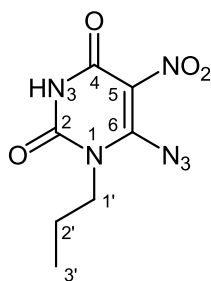
Charakterisierung:

Gelber Feststoff.

R_f -Wert = 0.54 (EE:PE = 2:1).

Schmelzpunkt: 123 °C (Zersetzung).

HR-ESI-MS: $m/z = 279.0589$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ (gef.), 279.1590 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (ber.).

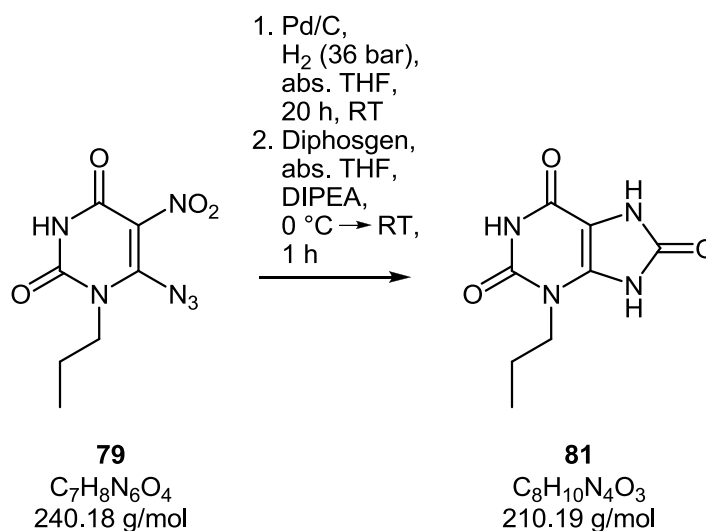


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 12.1 (s, 1H, NH-3), 3.81 (t, 2H, H-1'), 1.62 (sext, 2H, H-2'), 0.89 (t, 3H, H-3').

$^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 7.5 \text{ Hz}$.

^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 154.9 (C-4), 150.9 (C-2), 147.9 (C-6), 120.9 (C-5), 45.6 (C-1'), 21.1 (C-2'), 10.8 (C-3').

6.6.3.4 3-Propyl-1,7,9-trihydropurin-2,6,8-trion (**81**)^[40, 64]



Ein Gemisch aus 134 mg (0.558 mmol) **79**, gelöst in 2.5 mL abs. THF, und 30.6 mg Pd/C (10 %) wurden für 20 h unter Wasserstoffatmosphäre (36 bar) im Autoklaven bei Raumtemperatur gerührt. Die schwarze Suspension wurde zügig in einen Schlenkkolben unter N_2 -Atmosphäre überführt und mit 664 μL DIPEA versetzt. 67 μL (0.559 mmol) Diphosgen wurden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ in 3 mL abs. THF gelöst und die Lösung langsam bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zu der schwarzen Suspension getropft. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension filtriert und das Filtrat mit wenig gesättigter NaHCO_3 -Lösung und später mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Chloroform gewaschen und unter vermindertem Druck vom überschüssigen Chloroform befreit und danach gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde anschließend aus Wasser umkristallisiert. Es konnten 4.1 mg (0.020 mmol) eines gelben Feststoffs erhalten werden. Diese entspricht einer Ausbeute von 3.6 % bezogen auf **79**.

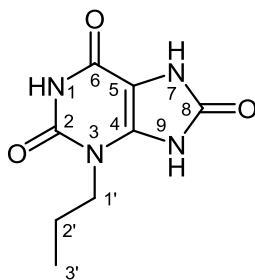
Charakterisierung:

Gelber Feststoff.

R_f -Wert = 0-0.29 (Schmierung) (CH_2Cl_2 :Methanol = 20:1).

Schmelzpunkt: $370\text{ }^\circ\text{C}$ (Zersetzung).

HR-ESI-MS: $m/z = 211.0822$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (gef.), 211.0826 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (ber.).













$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 11.8 (s, 1H, NH-9), 11.0 (s, 1H, NH-1), 10.7 (s, 1H, NH-7), 3.68 (t, 2H, H-1'), 1.56 (sext, 2H, H-2'), 0.86 (t, 3H, H-3').

$^3J_{\text{H}1', \text{H}2'} = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 7.5 \text{ Hz}$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 149.5 (C-2), 137.7 (C-4), 97.4 (C-5), 44.4 (C-1'), 21.0 (C-2'), 10.5 (C-3').





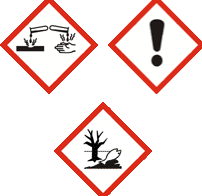




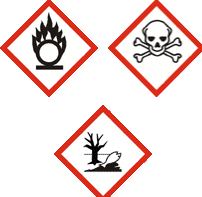

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225-319-336 EUH: 066	210-240- 305+351+338- 403+233
Acetonitril		225-332-302-312- 319	210-240-302+352- 305+351+338- 403+233
Ameisensäure		226-302-314-331 EUH: 071	210-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338- 403+233
Ammoniak, wässrige Lösung		290-314-335-400	260-273-280- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
Ammoniumcer(IV)-nitrat (Cer(IV)-ammoniumnitrat, CAN)		272-302-214	221-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
Ammoniumchlorid		302-319	305+351+338
Ammoniumformiat		315-319-335	261-305+351+338
BisTris- <i>d</i> ₁₉		315-319-335	261-305+351+338
Bortrifluoriddiethyletherat		226-314-332-372	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
Bromsuccinimid, <i>N</i> -Bromsuccinimid		302-314	280-305+351+338- 310

























7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Bromwasserstoff in Essigsäure 33%		314-335	260-303+361+353-305+351+338-301+330+331-405-501
Camphersulfonsäure		314	280-305+351+338-310
Chloroform, CDCl_3		302-331-315-319-351-361d-336-372	261-281-305+351+338-311
Dichlormethan		315-319-335-336-351-373	261-281-305+351+338
Diethylether		224-302-336 EUH: 019-066	210-240-403+235
1,4-Dioxan		225-319-335-351 EUH: 019-066	210-261-281-305+351+338
DIPEA		225-302-331-318-335	210-261-280-305+351+338-311
Diphosgen		330-314	280-303+361+353-304+340-305+351+338-310
DTT- d_{10}		302-315-319-335	261-305+351+338
Essigsäure 99.8%		226-290-314	210-280-301+330+331-305+351+338-308+310
Essigsäureanhydrid		226-302-331-314-335	210-260-280-303+361+353-305+351+338-312
Ethanol		225-319	210-240-305+351+338-403+233

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Ethylacetat		225-319-336 EUH: 066	210-233-240- 305+351+338- 403+235
Hydroxylammoniumchlorid		302+312-351-315- 319-317-373-400- 290	273-281-302+352- 305+351+338- 308+313
1-Iodpropan		226-331	210-304+340- 309+310
Kaliumcarbonat		315-319-335	302+352- 305+351+338
Kupfer(II)-sulfat		302-315-318-410	273-280-301+312- 305+351+338-330
Methanol		225-331-311-301- 370	210-233-280- 302+352-304+340- 308+310-403+235
Natrium		260-314 EUH: 014	223-231+232-280- 305+351+338- 370+378-422
Natriumazid		300-310-373-410 EUH: 032	273-280- 301+310+330- 302+352-310-391- 501
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
Natriumnitrit		272-301-319-400	220-273-301+310- 305+351+338
Palladium auf Aktivkohle		228	210-370+378

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
4-Penten-1-ol		226	210
Petrolether	   	225-304-315-336- 361f-373-411	201-210-301+310- 331-370+378-501
2-Propanol	 	225-319-336	210-233-240- 305+351+338- 403+235
Pyridin	 	225-332-302-312- 319-315	210-280- 305+351+338
Salpetersäure rauchend	  	272-290-331-314 EUH: 071	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
Salzsäure 37%	 	290-314-335	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Schwefelsäure, konz.		290-314	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
Tetrahydrofuran	  	225-302-319-335- 351 EUH: 019	210-280- 301+312+330- 305+351+338- 370+378-403+235
Toluol	  	225-361d-304- 373-315-336	210-240- 301+310+330- 302+352-308+313- 314-403+233
Trichloracetonitril	 	301-311-331-411	261-280-301+310- 320-361-405-501
2,4,6-Trichlorpyrimidin		315-319-335	302+352-304+340- 305+351+338

7 Toxikologische Daten

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat		226-314 EUH:014	280-305+351+338-310
Tritylchlorid		314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
UDP-dinatriumsalz		315-319-335	261-305+351+338
Wasserstoff		220-280	210-377-381-403
Zinkbromid		302-314-317-411	273-280-305+351+338-310
Zinkpulver		250-260-410	222-210-231+232-280-370+378-273

8 Verwendete KMR-Substanzen

Anlage III: Verwendete KMR-Substanzen

 Universität Hamburg <small>DER FORSCHUNG DER LEHRE DER BILDUNG</small>	Fachbereich Chemie 
 Zur Prüfungsakte verfügen!	

Verwendete KMR-Substanzen

Nachname:	Liao	Matrikelnr.:	5415261
Vorname:	Wei-Nien	Studiengang:	Chemie
Praktikum / Arbeitsbereich:	Promotion im AK Bernd Meyer		
Zeitraum / Datum:	Oktober 2011 bis April 2019		

Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. GHS 1A und 1B*:

CAS-RN	Stoffname (IUPAC) und Cat.	Verfahren und eingesetzte Menge	Anzahl der Experimente
67-66-3	Trichlormethan, 1B	Lösungsmittel, 500 mL	12
865-49-6	Trichlormethan-d, 1B	Lösungsmittel für NMR, 10 mL	16
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-

*(= GefStV Kat. I und II)

Datum

Unterschrift Studierende/r bzw. Beschäftigte/r

Datum

Unterschrift Praktikumsleitung bzw. Vorgesetzte/r

9 Literaturverzeichnis

- [1] A. Varki, M. J. Chrispeels, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1999**.
- [2] D. L. Nelson, A. L. Lehninger, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, **2008**.
- [3] M. N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J. L. Abrahams, N. H. Packer, *PROTEOMICS* **2014**, *14*(4-5), 525-546.
- [4] Y. J. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate Journal* **1997**, *14*(5), 569-576.
- [5] S. F. Hansen, E. Bettler, A. Rinnan, S. B. Engelsen, C. Breton, *Molecular BioSystems* **2010**, *6*(10), 1773-1781.
- [6] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annual Review of Biochemistry* **2008**, *77*(1), 521-555.
- [7] K. J. Colley, *Glycobiology* **1997**, *7*(1), 1-13.
- [8] L. Tu, D. K. Banfield, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2010**, *67*(1), 29-41.
- [9] J. A. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone, B. Henrissat, *Biochemical Journal* **1997**, *326*(Pt 3), 929-939.
- [10] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*(2), 307-317.
- [11] C. Breton, L. Šnajdrová, C. Jeanneau, J. Koča, A. Imberty, *Glycobiology* **2006**, *16*(2), 29R-37R.
- [12] <http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>, Website zuletzt aufgerufen am: 16.04.2019.
- [13] J. E. Pak, P. Arnoux, S. Zhou, P. Sivarajah, M. Satkunarajah, X. Xing, J. M. Rini, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*(36), 26693-26701.
- [14] L. Jing, M. Arcady, *Protein Science* **2003**, *12*(7), 1418-1431.
- [15] S. S. Lee, S. Y. Hong, J. C. Errey, A. Izumi, G. J. Davies, B. G. Davis, *Nat Chem Biol* **2011**, *7*(9), 631-638.
- [16] http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Red_Cell_Terminology_and_Immunogenetics/Table_of_blood_group_systems_v6_180621.pdf, zuletzt aufgerufen am: 16.04.2019.
- [17] E. A. Hod, P. F. Spitalnik, S. L. Spitalnik, in *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*, Wiley-Blackwell, **2009**, pp. 89-108.
- [18] K. Landsteiner, *Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **1900**, *27*, 357-362.
- [19] J. Milland, M. S. Sandrin, *Tissue Antigens* **2006**, *68*(6), 459-466.
- [20] A. Blume, J. Angulo, T. Biet, H. Peters, A. J. Benie, M. Palcic, T. Peters, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*(43), 32728-32740.
- [21] F. Yamamoto, *Immunohematology* **2004**, *20*(1), 3-22.
- [22] S.-i. Hakomori, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1473*(1), 247-266.
- [23] K. Stellner, S.-i. Hakomori, G. A. Warner, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1973**, *55*(2), 439-445.
- [24] H. Masamune, H. Kawasaki, S.-i. Abe, K. Oyama, Y. Yamaguchi, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **1958**, *68*(1), 81-91.
- [25] T. F. Orntoft, P. Greenwell, H. Clausen, W. M. Watkins, *Gut* **1991**, *32*(3), 287-293.

- [26] S. I. Patenaude, N. O. L. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic, S. V. Evans, *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9*(9), 685-690.
- [27] N. Soya, G. K. Shoemaker, M. M. Palcic, J. S. Klassen, *Glycobiology* **2009**, *19*(11), 1224-1234.
- [28] N. L. Rose, M. M. Palcic, S. V. Evans, *Journal of Chemical Education* **2005**, *82*(12), 1846-null.
- [29] <https://www.rcsb.org/3d-view/1LZI/1>, Website zuletzt aufgerufen am: 04.10.2018.
- [30] 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, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*(15), 10097-10108.
- [31] J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*(41), 13529-13538.
- [32] N. Sindhuwinata, E. Munoz, F. J. Munoz, M. M. Palcic, H. Peters, T. Peters, *Glycobiology* **2010**, *20*(6), 718-723.
- [33] G. K. Shoemaker, N. Soya, M. M. Palcic, J. S. Klassen, *Glycobiology* **2008**, *18*(8), 587-592.
- [34] 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, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*(6), 3625-3632.
- [35] T. Kajimoto, M. Node, *Synthesis* **2009**, *2009*(19), 3179-3210.
- [36] C. H. Wong, *Carbohydrate-based Drug Discovery*, Wiley, **2006**.
- [37] I. Masayuki, Y. Hideya, H. Hironobu, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2009**, *9*(1), 87-105.
- [38] T. Pesnot, R. Jørgensen, M. M. Palcic, G. K. Wagner, *Nat Chem Biol* **2010**, *6*(5), 321-323.
- [39] K. Schaefer, J. Albers, N. Sindhuwinata, T. Peters, B. Meyer, *ChemBioChem* **2012**, *13*(3), 443-450.
- [40] K. Schaefer, N. Sindhuwinata, T. Hackl, M. P. Kötzler, F. C. Niemeyer, M. M. Palcic, T. Peters, B. Meyer, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*(5), 2150-2154.
- [41] M. M. Palcic, L. D. Heerze, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*(29), 17174-17181.
- [42] W. Bernhard, S. Markus, N. Wolfgang, K. Willy, S. R. R., *Angewandte Chemie* **2001**, *113*(21), 4120-4124.
- [43] I. D. Kuntz, *Science* **1992**, *257*(5073), 1078-1082.
- [44] G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.
- [45] J. Albers, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2007**.
- [46] S. Angyal, D. Greeves, J. Mills, *Australian Journal of Chemistry* **1974**, *27*(7), 1447-1456.
- [47] D. Horton, J. D. Wander, *Carbohydrate Research* **1969**, *10*(2), 279-288.
- [48] F. C. Niemeyer, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2011**.
- [49] G. Grundler, R. R. Schmidt, *Liebigs Annalen der Chemie* **1984**, *1984*(11), 1826-1847.
- [50] D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press, **2005**.
- [51] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Canadian Journal of Chemistry* **1979**, *57*(10), 1244-1251.
- [52] B. Iselin, T. Reichstein, *Helvetica Chimica Acta* **1944**, *27*(1), 1146-1149.
- [53] J. Zhao, S. Wei, X. Ma, H. Shao, *Carbohydrate Research* **2010**, *345*(1), 168-171.
- [54] M. C. Chapeau, L. J. Marnett, *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*(25), 7258-7262.

- [55] M. Goličnik, L. F. Olguin, G. Feng, N. J. Baxter, J. P. Waltho, N. H. Williams, F. Hollfelder, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*(4), 1575-1588.
- [56] D. Cabaret, M. Wakselman, *Canadian Journal of Chemistry* **1990**, *68*(12), 2253-2257.
- [57] W. Lin, X. Zhang, Z. He, Y. Jin, L. Gong, A. Mi, *Synthetic Communications* **2002**, *32*(21), 3279-3284.
- [58] T. Rodríguez-Pérez, I. Lavandera, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, V. Gotor, *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *2007*(17), 2769-2778.
- [59] B. Fraser-Reid, U. E. Udodong, Z. Wu, H. Ottosson, J. R. Merritt, C. S. Rao, C. Roberts, R. Madsen, *Synlett* **1992**, *1992*(12), 927,942.
- [60] G. Zemplén, E. Pacsu, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, *62*(6), 1613-1614.
- [61] J. O. Deferrari, B. N. Zuazo, M. E. Gelpi, *Carbohydrate Research* **1973**, *30*(2), 313-318.
- [62] R. M. Cresswell, H. C. S. Wood, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1960**, 4768-4775.
- [63] S. S. Al-Hassan, R. J. Kulick, D. B. Livingstone, C. J. Suckling, H. C. S. Wood, R. Wrigglesworth, R. Ferone, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1980**(0), 2645-2656.
- [64] N. Alouane, A. Boutier, C. Baron, E. Vrancken, P. Mangeney, *Synthesis* **2006**, *2006*(05), 885-889.
- [65] M. Cushman, D. Yang, K. Kis, A. Bacher, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*(25), 8320-8327.
- [66] V. Kohli, H. Blöcker, H. Köster, *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*(28), 2683-2686.
- [67] L. Simeone, L. De Napoli, D. Montesarchio, *Chemistry & Biodiversity* **2012**, *9*(3), 589-597.
- [68] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochemische Zeitschrift* **1913**, *49*, 333-369.
- [69] G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, *Biochemical Journal* **1925**, *19*(2), 338-339.
- [70] S. Schnell, C. Mendoza, *Journal of Theoretical Biology* **1997**, *187*(2), 207-212.
- [71] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry, Fifth Edition*, W.H. Freeman, **2002**.
- [72] C. T. Goudar, J. R. Sonnad, R. G. Duggleby, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, *1429*(2), 377-383.
- [73] C. T. Goudar, S. K. Harris, M. J. McInerney, J. M. Suflita, *Journal of Microbiological Methods* **2004**, *59*(3), 317-326.
- [74] F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824*(3), 443-449.
- [75] S. Youssef, W. Pfeleiderer, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1998**, *35*(4), 949-954.
- [76] X. Xu, J. Wang, Q. Yao, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*(2), 241-244.
- [77] P. Bitterli, H. Erlenmeyer, *Helvetica Chimica Acta* **1951**, *34*(3), 835-840.

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank an:

- meinen Eltern für die jahrelange finanzielle und seelische Unterstützung während der Studiumzeiten.
- alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder des AK Meyer für die schöne Arbeitsatmosphäre und gemeinsame Zeiten.
- Ilona und Insa für die Unterstützung bei der Synthese.
- Thomas Hackl und Moritz für die Hilfe und Unterstützung bei den NMR-Messungen und die Auswertung der Progresskurve.
- Katrin für die Einführung in die Thematik.
- Alex und Karsten für die gemeinsame Diskussionen und Unterhaltungen im Raum 20.
- Vera und anderen Mitarbeiter der NMR-Abteilung für die Messung von unzähligen Proben und für die Bereitstellung des 600er-NMR-Spektrometers für den NMR-basierter Inhibitionsassay.
- der Massen-Abteilung für die Messung diverser Proben.
- AK Prof. T. Peters an der Uni Lübeck, besonders an Friedemann, für die Bereitsstellung von GTA, GTB und dem Akzeptorsubstrat.
- Meinen Praktikanten Lukas und Simone.
- Moritz, Mirco, Claas, Melissa, Alex, Max für das Korrekturlesen der Arbeit.

11 Eidesstattliche Versicherung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Hamburg, den 25.4.2019

Wei-Nien Liao