

**Synthese funktionalisierter
Bisencolcarbonsäureester zur selektiven
Markierung von Esterasen und zur
Inhibierung von Oxidasen**

Dissertation

Zum Erlangen des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom Chemiker Phillipp Richter
geboren am 10.02.1986 in Weimar

Gutachter:

1. Prof. Dr. Georg Pohnert, Jena

2. Prof. Dr. Wolfgang Weigand, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.07.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
Teil I		
1.1	Carboxylesterhydrolasen	3
1.1.1	Esterasen	3
1.1.2	Lipasen	7
1.2	Esterasen- und Lipasenanalytik	8
1.2.1	Histologische Anfärbung biologischen Materials	8
1.2.2	Quantitative Detektion mittels Photospektrometrie	10
1.3	Activity Based Protein Profiling	10
1.3.1	Viergliedrige Lactone als ABP-Sonden für Serinhydrolasen	14
1.3.2	Phosphonsäurederivate als ABP-Sonden für Serinhydrolasen	16
1.3.3	Bisenolacetate als molekulare Sonden für Esterasen	19
1.3.3.1	Die chemischen Reaktionen im Wundverschluss von <i>Caulerpa</i> spp.	19
1.3.3.2	Entwicklung der ABP-Sonden nach dem Vorbild des Caulerpenins	23
Teil II		
1.4	Oxidoreduktasen	26
1.4.1	Lipoxygenasen	27
1.4.1.1	Vorkommen und Bedeutung	27
1.4.1.2	Inhibitoren	30
1.4.2	Xanthinoxidase	32
1.4.2.1	Vorkommen und Bedeutung	32
1.4.2.2	Inhibitoren	34
2	Motivation und Zielstellung	37

3 Ergebnisse und Diskussion 40

3.1	Syntheseplanung	40
3.1.1	Synthese halogenerter Bisenolester (34) und anschließend Kopplung . .	42
3.1.1.1	Halogensubstitution an 1,4-Diacetoxybutadien	42
3.1.1.2	Synthese halogenerter Bisenolestern (34) über Succinaldehyd	43
3.1.1.3	Synthese von 34 über monosilyliertes Butan-1,4-diol	44
3.1.2	Synthese mittels Carbomagnesierung	45
3.1.2.1	Carbomagnesierung von But-2-in-1,4-diol	45
3.1.2.2	Carbomagnesierung von monosilylierten But-2-in-1,4-diol	47
3.2	Synthesedurchführung	49
3.2.1	Aufbau halogenerter Bisenolcarbonsäureester	49
3.2.1.1	Syntheseroute A ₁	49
3.2.1.2	Syntheseroute A ₂	50
3.2.1.3	Syntheseroute A ₃	52
3.2.2	Synthese der Bisenolcarbonsäureester durch Carbomagnesierung	54
3.2.2.1	Syntheseroute B ₁	54
3.2.2.2	Syntheseroute B ₂	55
3.2.3	Kopplung der Bisenolester 55 , 68 und 69 mit fluoreszenten Aziden . . .	61
3.2.4	Synthese der alkylierten Bisenolacetate	67

Teil I

3.3	Reaktionen der Bisenolester mit lipolytischen Enzymen . . .	69
3.3.1	Markierungsexperimente der Bisenolacetate	69
3.3.1.1	Selektive Markierung von <i>Candida lipolytica</i> Esterase	69
3.3.1.2	Unterscheidung von Esterasen und Lipasen	78
3.3.2	Markierungsexperimente der Fettsäurebisenolester 82 und 83	80
3.3.3	Visualisierung der Esterasen im Proteom von <i>Yarrowia lipolytica</i>	85
3.3.4	Lokalisierung der Bindungsstellen der Bisenolester an Esterasen	86

Teil II

3.4	Inhibierungsexperimente der Oxidoreduktasen	93
3.4.1	Inhibierung Menschlicher Lipoxygenasen durch Bisenolester	93
3.4.2	Inhibierung der Xanthinoxidase aus Kuhmilch durch Bisenolester	98
4	Zusammenfassung und Ausblick	101
5	Abkürzungsverzeichnis	107
6	Experimentaltteil	110
6.1	Chemikalien	110
6.2	Chromatographie und Spektroskopie	110
6.2.1	Dünnschichtchromatographie	110
6.2.2	Kernresonanzspektroskopie	111
6.2.3	Gaschromatographie	111
6.2.4	Flüssigkeitschromatographie	112
6.2.5	Preparative Flüssigkeitschromatographie	112
6.3	Proteinanalytik	113
6.3.1	Vorbereitung der Proteine für die Gelelektrophorese	113
6.3.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	113
6.3.3	Visualisierung der Proteine	113
6.4	Markierungsassays	114
6.4.1	Natriumhydrogencarbonatpuffer	114
6.4.2	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)	114
6.4.3	Huisgen-Cycloaddition an <i>C. lipolytica</i> Esterase in Lösung	115
6.4.4	Inkubationen der Hydrolasen und Ovalbumin mit den Reagenzien der Huisgen-Cycloaddition	115
6.4.5	Stabilitätsprüfung von 81 bei Raumtemperatur und -25°C	115
6.4.6	Markierung von <i>C. lipolytica</i> Esterase mit fluoreszenten Bisenolestern 81, 82 und 80	116

6.4.7	Diskriminieren von Esterasen und Lipasen mit fluoreszenten Bisenolestern 81 , 82 und 83	116
6.4.8	Proteininkubationen für die In-Gel click Experimente	117
6.4.9	Bestimmung der Deacetylierungsprodukte der fluoreszenten Bisenolester 81 , 82 und 83	118
6.4.10	Enzyminkubationen mit dem fluoreszenten Bisenolstearat 83	118
6.4.11	Sequenzierung der modifizierten Schweineleberesterase	119
6.4.12	Kultivierung von <i>Yarrowica lipolytica</i> , Extraktion der Proteine und anschließender Markierung	124
6.5	Inhibierung von Xanthinoxidase aus Kuhmilch	125
6.5.1	Ermittlung der IC ₅₀ Werte	125
6.6	Inhibierung der menschlichen 5-Lipoxygenase	126
6.7	Synthesen	128
6.7.1	Versuche zur Halogensubstitution von 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien	128
6.7.2	4-((<i>Tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)butan-1-ol	129
6.7.3	4-((<i>Tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)butan-1-al	129
6.7.4	8-Trimethylsilyl-3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (39)	130
6.7.5	4-((<i>Tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)but-2-in-1-ol (41)	131
6.7.6	Vinylcapronat (44)	131
6.7.7	3-(Hydroxymethyl)-8-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-olcapronat (62a) und 3-(Caproyloxymethyl)-3-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (62b)	132
6.7.8	3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olcapronat (64a) und 3-(Caproyloxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (64a)	133
6.7.9	3-(Caproyloxymethinyl)-oct-7-in-1-en-1-olcapronat (68)	134
6.7.10	3-Amin-propylazid (74)	136
6.7.11	DY490-azid (71)	136
6.7.12	5(6)-Tetramethylrhodamin-propylazid (76)	137
6.7.13	<i>N</i> -(3-Azidopropyl)-7-nitrobenzoxadiazol-4-amin (79)	138
6.7.14	NBD-bisenolacetat (80)	138
6.7.15	5(6)-Tetramethylrhodamin-bisenolacetat (81)	139

6.7.16	5(6)-Tetramethylrhodamin-bisenolcapronat (82)	142
6.7.17	Stearinsäureanhydrid	143
6.7.18	Vinylstearat	144
6.7.19	3-(Hydroxymethyl)-8-(trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (63a) und 3-(Stearoyloxymethyl)-3-(trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (63b) . . .	144
6.7.20	3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (65a) und 3-(Stearoyloxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (65a)	146
6.7.21	3-(Stearoyloxymethinyl)-oct-7-in-1-en-1-olstearat (69)	147
6.7.22	5(6)-Tetramethylrhodamin-bisenolstearat (83)	149
6.7.23	3-(Hydroxymethyl)but-2-en-1-ol (84)	150
6.7.24	3-(Hydroxymethyl)but-1-enolacetat (87a) und 3-(Acetoxymethyl)but-1-en-1-ol (87b)	151
6.7.25	3-(Acetoxymethinyl)-but-1-en-1-olacetat (88)	152
6.7.26	3-(Hydroxymethyl)-oct-2-en-1-ol (85)	153
6.7.27	3-(Hydroxymethyl)-oct-2-en-1-olacetat (86a) und 3-(Acetoxymethyl)-oct-2-en-1-ol (86b)	154
6.7.28	3-(Acetoxymethin)oct-1-en-1-olacetat (89)	155

Literatur

1 Einleitung

Die Verwendung von Biokatalysatoren bzw. Enzymen ist stark verknüpft mit der Entwicklung des Menschen. Schon frühzeitig wurden Fermentationsprozesse genutzt, um Lebensmittel haltbar zu machen oder Genussmittel herzustellen. Die ältesten belegten Prozesse reichen bis 6.000 vor Christus. Schon zu dieser Zeit wurde durch alkoholische Gärung von Traubensaft oder verdünnten Honigsäften berauschende Getränke zubereitet. Darüber hinaus konnten somit Lebensmittel in ihrer Haltbarkeit deutlich erweitert werden und die Versorgung mit wichtigen Nährstoffen auch abseits der Erntezeiten gewährleistet werden. Des Weiteren benutzte man seit jeher auch für die Herstellung von Bier, Käse, Essig oder Brot und vielen weiteren Lebensmittel Biokatalysatoren. Das Wissen über diese und andere Biokatalysatoren hat sich dabei in den letzten Jahrhunderten rasch vermehrt. Der Physiker Antoni van Leeuwenhoek war einer der ersten Wissenschaftler, der 1676 Mikroorganismen in Lebensmitteln nachwies (Hefen in Bier), diese aber nicht mit den Prozessen der Fermentation in Zusammenhang brachte. Erst viel später, durch die Arbeiten der Biologen Theodor Schwann und Friedrich Traugott Kützing im 19. Jahrhundert, wurden Mikroorganismen mit diesen Prozessen in Verbindung gebracht. Schlussendlich war es jedoch Louis Pasteur der die Mikroorganismen direkt für die Fermentation verantwortlich machte, welche nicht nur Alkohol produzierten, sondern viele weitere Substanzen wie z. B. Milchsäure, Glycerin oder Kohlendioxid.^[1]

Heutzutage sind Produkte die durch oder mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt wurden aus der Wirtschaft und Wissenschaft nicht mehr wegzudenken und aus den Arbeiten der Wissenschaftler des 19. und 20. Jahrhunderts hat sich im Laufe der Zeit die Biotechnologie (BT) entwickelt, welche breite Anwendung in der Medizin (rote BT), Industrie (weiße BT) und Landwirtschaft (grüne BT) findet.

Die weiße BT ist dabei ein sehr interessantes Werkzeug für die Herstellung von Feinchemikalien. Dabei werden ganze Mikroorganismen oder Fragmente (z. B. Zellwände) dieser verwendet, aber auch extrahierte Enzyme werden eingesetzt. Das Verwenden von Biokatalysatoren hat dabei mehrere Vorteile. Zum einen können Reaktionen durchgeführt werden, die mittels normaler chemischer Synthese nicht oder nur sehr

schwer durchführbar wären, da Biokatalysatoren chemische Reaktionen unter deutlich milderen Bedingungen ermöglichen (pH-Wert, Temperatur, Druck oder Ausschluss organischer Lösungsmittel) und zum anderen besitzen viele der Biokatalysatoren die Fähigkeit stereo-, enantio- oder regioselektive Umsetzungen zu katalysieren. Durch die genannten Vorteile ist es möglich Ausbeuten zu erhöhen oder mehrstufige Synthesen zu verkürzen und letztendlich Produkte unter ökonomisch besseren Gesichtspunkten herzustellen und die Natur zu schonen.^[2,3]

Die grüne BT nutzt vor allem der Pflanzen und hat großen Einfluss auf die Landwirtschaft. So ist zum Beispiel die gezielte Zucht von ertragreicheren oder widerstandsfähigeren Nutzpflanzen ein Zweig dieser Biotechnologie. Auch dies wird schon seit Urzeiten von Menschen durchgeführt. So hat der Mensch zum Beispiel aus einfachen Gräsern durch gezielte Selektion der besten Sorten unsere heutigen Getreidesorten entwickelt. Eine Weiterentwicklung dieses Prozesses ist die gezielte Genmanipulation, welche jedoch stark auf Kritik durch Landwirtschaft und Bevölkerung stößt.

Neben dieser starken industriellen Bedeutung der Biokatalysatoren rückte auch die Diagnose von Enzymen bzw. deren Manipulation der Aktivität in den letzten Jahren in den Vordergrund, woraus sich die rote BT entwickelte. Zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten sind Enzyme immer mehr in den Fokus gerückt, da viele Krankheiten durch die falsche Regulation der enzymatischen Aktivität im Organismus ausgelöst werden. Diese allgemein als Stoffwechselstörung bezeichnete Fehlfunktion von Enzymen bedingen ein Ungleichgewicht verschiedener Substanzen im Organismus und somit zum Ausbrechen einer Krankheit. Darüber hinaus wären viele analytische Prozesse in der klinischen Diagnostik ohne isolierte Enzyme nicht möglich.

Aufgrund dieser mannigfaltigen Bedeutsamkeit der Enzyme wird auf diesem Gebiet intensive Forschung betrieben, wodurch das Wissen um die Funktionen, Bedeutungen und Anwendungen der Enzyme mittlerweile stark angestiegen ist, aber dennoch nicht vollkommen ausgeschöpft wurde. Darum ist es von Interesse weitere diagnostische und manipulative Werkzeuge für Enzyme zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wird dazu eine besondere Klasse von Verbindungen aus einer Grünalge vorgestellt und weiterentwickelt. Diese Substanz zeigte in Studien verschiedener Forschungsgruppen interessante Möglichkeiten mit Proteinen zu interagieren. So konnte gezeigt werden, dass

Oxidasen, wie Lipoxygenasen^[4-6] und Xanthinoxidasen^[7] in ihrer Wirkung gehemmt werden; aber auch Reaktionen mit Proteinen^[8,9] und Enzymen^[10] waren mit dieser Substanz möglich. Diese Erkenntnisse sollen in dieser Arbeit erweitert und vertieft werden. In den Kapiteln des ersten Teiles werden dazu die Gruppe der lipolytischen Enzyme vorgestellt und etablierte sowie neuartige Konzepte der Esterasenanalytik diskutiert, wohingegen im zweiten Teil Lipoxygenasen sowie deren Inhibitoren dargestellt werden.

Teil I

1.1 Carboxylesterhydrolasen

1.1.1 Esterasen

Esterasen (EC 3.1.1.1) sind hydrolytisch aktive Enzyme, welche die Spaltung von Estern in wässrigen Medien zum Alkohol und der Säure katalysieren, wobei auch Ester von mehrwertigen Alkoholen (z. B. Glycerin) als Substrat akzeptiert werden. Abbildung 1 zeigt die dabei ablaufende Umwandlung. Der Ester auf der linken Seite wird durch Insertion des Wassermoleküls gespalten und es entstehen die Reaktionsprodukte auf der rechten Seite. Da bei dieser enzymatischen Katalyse besonderes die Hydroxyfunktion der Aminosäure Serin im Enzym eine elementare Rolle einnimmt, werden diese auch den Serinhydrolasen zugeordnet.

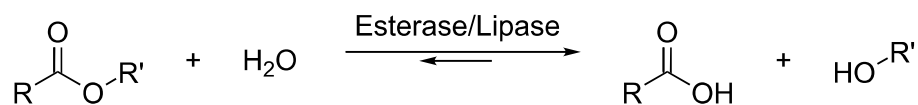


Abbildung 1: Allgemeine Darstellung der lipolytischen Aktivität von Esterasen bzw. Lipasen. Die Esterbindung wird hydrolysiert und es entstehen die entsprechende Säure und ein Alkohol. Die Rückreaktion ist dabei genauso möglich und kann durch die Abwesenheit von Wasser (z. B. in organischen Lösungsmitteln) bevorzugt werden.

Esterasen besitzt ein sehr breites Substratspektrum, wobei es sogar Überlappung der Reaktivität mit Amidasen und Thioesterasen gibt, da diese auf ähnlichen katalytischen Prinzipien beruhen. Esterasen findet man in tierischen Organismen vor allem im endoplasmatischen Reticulum bzw. im Cytosol sowie in der Leber.^[11] Besonders in der Leber wird ihnen dabei eine große Rolle bei der Detoxifizierung von Giften und

Xenobiotika zugesprochen, indem sie diese körperfremden Stoffe durch Hydrolyse stark in ihrer Wirkungsweise abschwächen.^[11] Darum sind diese Enzyme auch relativ substratunspezifisch, um ein möglichst großes Spektrum an unbekanntem Substanzen zu metabolisieren. Diese Substratunspezifität führt allerdings auch zum raschen Abbau von Medikamenten. Auf Grund dessen sind Esterasen, vor allem die leberassoziierten, im Fokus vieler Pharmazeutika, um deren Aktivität zu mindern, da es so möglich ist die Medikation zu verringern, ohne die Wirkung der Medikamente einzuschränken.^[12,13] Des Weiteren sind Über- oder Unterfunktionen von Esterasen mit einigen Krankheitsbildern wie Fettsucht und Insulinresistenz^[14], Leukämie^[15,16], dem Wolman-Syndrom^[17], sowie mit Entzündungsvorgängen^[18] verknüpft.

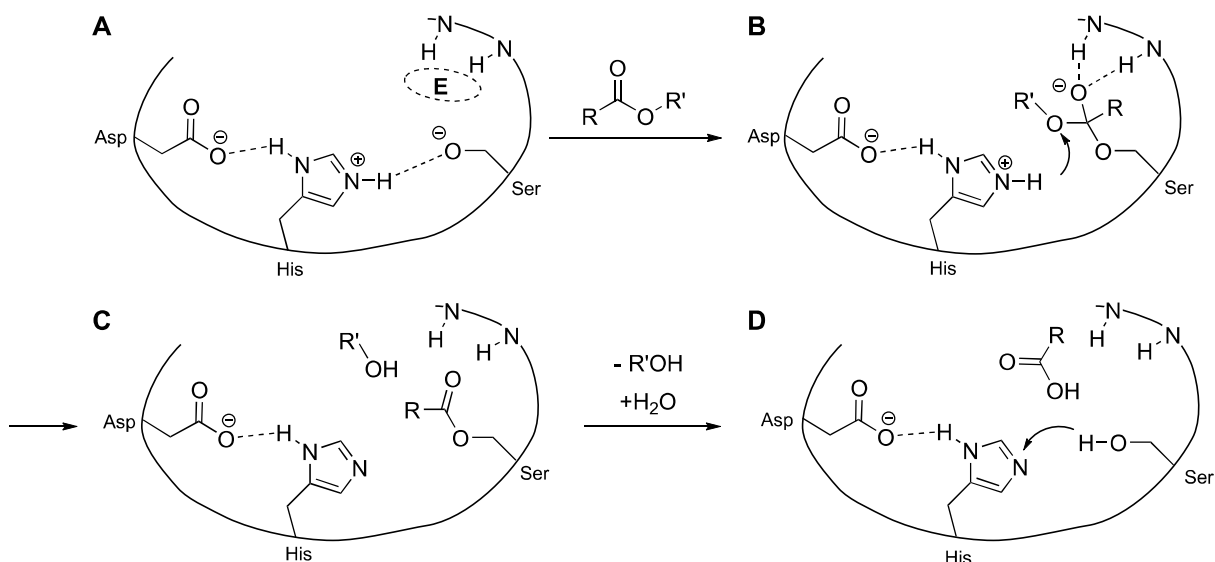


Abbildung 2: Schematisch vereinfachte Darstellung der aktiven Tasche mit katalytischer Triade der Serinhydrolasen. Durch die Anordnung der Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Histidin (His) und Serin (Ser) liegt die Alkoholfunktion des Serins formal deprotoniert vor (A). Zudem bilden zwei Amidstickstoffe aus dem Proteinrückgrad das Oxyanionenloch E. Gelangt ein Ester in die aktive Tasche greift das Alkoholat des Serins an dem Carbonylkohlenstoff des Esters an (B). Aus dem gebildeten tetraedrischen Intermediat kann der Alkohol die Bindung zum Ester lösen und die Tasche verlassen (C). Durch Hydrolyse des acylierten Enzyms wird anschließend ebenfalls die Säure freigesetzt und durch Protonenübertragung des Serins an den Imidazolring des Histidins (His) steht das Enzym für die nächste Hydrolyse zur Verfügung (D).

Die enzymatische Aktivität der Esterasen ist begründet durch eine katalytische Triade. Diese besteht aus den Aminosäuren Asparagin- oder Glutaminsäure, Histidin und Serin. Die Hydroxygruppe des Serins liegt formal deprotoniert vor, da der Imidazolring des räumlich benachbarten Histidins das Proton der Serins abstrahiert. Der Imidazolring

wiederum wird durch die Carboxylfunktion der Asparagin- oder Glutaminsäure deprotoniert (Siehe Abb. 2 A). Tritt nun ein Substratmolekül in die aktive Tasche ein, greift das Alkoholat des Serins am elektrophilen Carboxylkohlenstoff des Substrates an und bildet mit diesem einen intermediären Orthoester (Abb. 2 B). Dieses tetraedrische und zudem negativ geladene Zwischenprodukt wird durch zwei Amide des Proteinrückrades stabilisiert. In diesem Übergangszustand kann der Alkohol die chemische Bindung zur Carbonsäure lösen und die aktive Tasche verlassen (Abb. 2 C). Anschließend wird der am Serin gebundene Ester hydrolytisch abgespalten und das Enzym steht, nach Protonenübertragung von Serin zu Histidin, für den nächsten Katalysezyklus zur Verfügung.

Obwohl viele verschiedene Esterasen in vielen Organismen vom einfachen Einzeller bis hin zum Säugetier bekannt sind, ist die katalytische Triade bei fast allen wiederzufinden. Dennoch gibt es Abweichungen von dieser Schlüsselstruktur. Vor allem die Asparaginsäure ist variabel. So zeigt zum Beispiel eine Lipase aus *Pseudomonas glumae* nach Austausch des Asparaginsäure gegen Alanin immernoch hohe Aktivität^[19] und eine Esterase aus *Streptomyces scabies* weist nur eine katalytische Dyade auf^[20], in welcher ein Sauerstoffmolekül eines Thryptophans des Proteinrückrades die Aufgabe der sauren Aminosäure übernimmt. Trotz dieser Ausnahmen haben alle Esterasen eine ähnliche 3D-Struktur, aufgebaut aus α -Helices und β -Faltblättern. Dieses α/β -Hydrolasefaltungsmotiv ist in allen Serinhydrolasen wiederzufinden, bei dem beide Strukturelemente antiparallel in der Quartärstruktur ausgerichtet sind (siehe Abb. 3). Verknüpft werden diese durch *Random Coils*, auf denen sich die Aminosäuren der katalytischen Triade befinden. Interessanterweise sind die angrenzenden Aminosäuren des aktiven Serins dabei immer gleich. Dieses findet sich immer in einem Pentapeptid mit der Abfolge: Gly-X-Ser-X-Gly (Gly - Glycin; X - beliebige Aminosäure; Ser - aktives Serin).

Die Spezifität und Enantiomerenselektivität vieler Esterasen kommt dabei durch Unterschiede im Auftreten der antiparallel ausgerichteten Strukturelemente (zusätzliche Helices oder Faltblätter) zustande. Dadurch kommt es zu individueller Ausbildung der aktiven Taschen und des Oxyanionenloches^[22], die favorisierend für bestimmte Substrate geformt bzw. positioniert sind. Dieses Schlüssel-Schloss-Prinzip erlaubt es

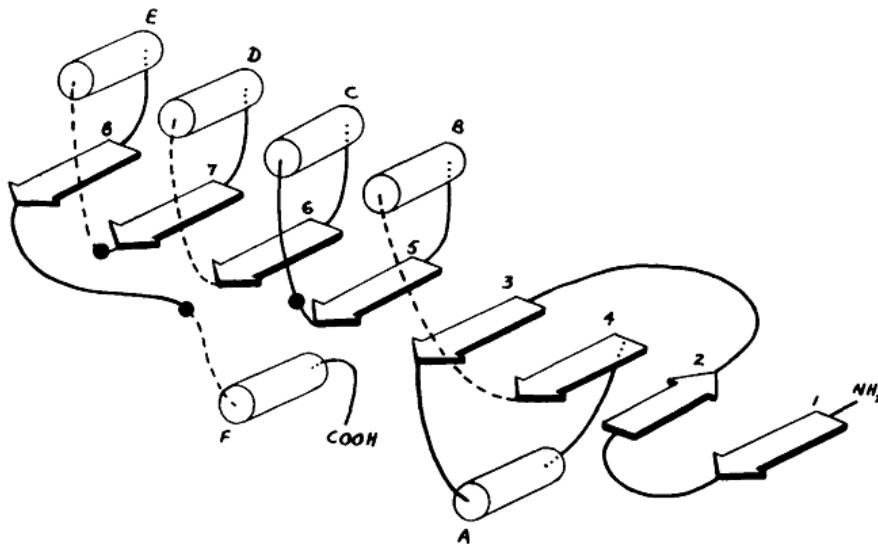


Abbildung 3: α/β -Hydrolasefaltungsmotiv der Serinhydrolasen Die Zylinder repräsentieren α -Helices und die Pfeile β -Faltblätter. Die schwarzen Punkte markieren die Position der Aminosäuren der katalytischen Triade Abbildung aus: D. L. Ollis *et al.*, Protein Engineering 1992, 5, 197-211. [21]

nur den passenden Substraten in der aktiven Tasche die richtige Ausrichtung für die Hydrolyse einzunehmen. Kazlauskas *et al.* haben hierfür Regeln aufgestellt, die eine Vorhersage für die Enantioselektivität geben. Dabei spielt die Größe der Substrate eine übergeordnete Rolle für die Enantioselektivität. Durch geschickten Austausch der Substituenten auf der Carbonsäure- oder Alkoholseite kann der Enantiomerenüberschuss so drastisch für eine bestimmte Reaktion erhöht werden. [23]

Diese bemerkenswerte Selektivität macht sich unter anderem die industrielle Biotechnologie (weiße Biotechnologie) zu nutze, um unter besten ökonomischen Gesichtspunkten Medikamente zu produzieren. Viele chemische Reaktionen scheitern zumeist daran, enantiomerenreine Wirkstoffe zu produzieren, wobei das unerwünschte Enantiomer keine oder auch toxische oder fatale Nebenwirkungen (z. B. Contergan) auf Organismen haben kann. Die Gruppe der Carboxylesterhydrolasen (darunter die Esterasen und auch Lipasen) ist dabei eine der am häufigsten genutzten Enzyme, da diese keinerlei Kofaktoren benötigen, die während der Reaktion recycelt werden oder kontinuierlich zugegeben werden müssten. Diese Prozesse sind dabei so effektiv (hinsichtlich Ausbeute und Selektivität), dass mit Hilfe dieser Enzymklasse jedes Jahr mehrere Tausend Tonnen an biotechnologisch hergestellten Produkten erzeugt werden. [24]

1.1.2 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) gehören wie die zuvor thematisierten Esterasen zu den hydrolytisch aktiven Enzymen und sind nur schwer von den Esterasen unterscheidbar. Den Esterasen gemeinsam sind Lipasen ebenfalls nach dem α/β -Hydrolasefaltungsmotiv aufgebaut und besitzen eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und einer sauren Aminosäure. Beide Enzymklassen lassen sich jedoch nach der Substratspezifität und der Aktivierung unterscheiden. Lipasen bevorzugen wasserunlösliche Substrate, wie Triacylglycerole von langkettigen Fettsäuren. Da diese Reaktivität allerdings auch von einigen Esterasen bekannt ist, reicht dieses Kriterium nicht für eine Unterscheidung aus. Ein weitaus besseres Unterscheidungsmerkmal ist das Auftreten eines Deckels bei Lipasen (siehe Abb. 4), der über der aktiven Tasche positioniert ist und den Zugang zur katalytischen Triade versperrt. Dieser Deckel ist ein amphiphiles Peptidstück, der bei Anlagerung der Lipase an eine Grenzfläche (z. B. zwischen Öl und Wasser) verschoben wird und den Zugang zum katalytischen Zentrum freigibt.^[25,26] Dadurch bedingt sich ebenfalls, dass die Aktivität einer Lipase nicht von der Substratkonzentration abhängig ist, sondern von der Oberfläche der Phasengrenze, an welcher der Deckel der Lipase geöffnet wird. Darüber hinaus benötigen Lipasen eine Mindestkonzentration des Substrates, um hydrolytische Aktivität zu zeigen.^[27]

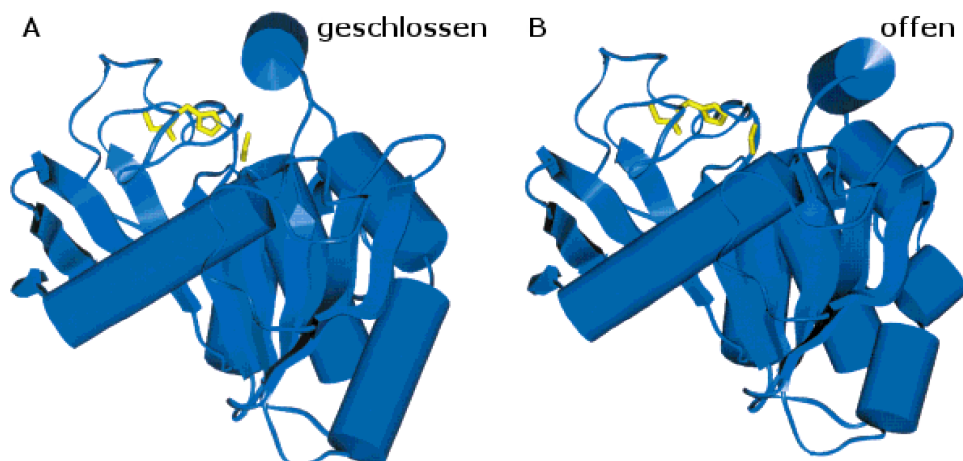


Abbildung 4: Deckelstrukturen der Lipase aus *Mucor miehei*. In der geschlossenen Form (A) ist der Weg zum Serin der katalytischen Triade (gelb, rechts) blockiert, lagert sich allerdings die Lipase an eine Grenzfläche an (B), wird die amphiphile α -Helix umgeklappt und die Substrate können das Serin erreichen. Abbildung nach Schmid und Verger aus *Angewandte Chemie* 1998, 110, 1694-1720.^[28]

Neue Studien zu Esterasen und Lipasen zeigten jedoch auf, dass auch die zuvor genannten Unterscheidungsmerkmale nur bedingt valide sind. So wurden Lipasen gefunden, welche keine Deckelstruktur^[29,30] oder Grenzflächenaktivierung^[31] aufweisen und Esterasen entdeckt, welche einen Deckel über der aktiven Tasche^[32] besitzen. Aufgrund dieser vielen Unregelmäßigkeiten werden beide Enzymklassen allgemein als lipolytische Enzyme zusammengefasst und eine oberflächliche Einteilung kann nach den bevorzugten Substraten vorgenommen werden. Demnach hydrolysieren Lipasen bevorzugend Glycerinester langkettiger Fettsäuren und Esterasen spalten vor allem Ester kurzer Carboxylsäuren.^[33]

Grundlage dieser tiefgehenden Erkenntnisse über die lipolytischen Enzyme sind vielfältige Analytikverfahren, welche sich von der einfachen Färbetechniken für die Mikroskopie bis hin zu hochspezifischen Sonden für Enzyme entwickelten. In den folgenden Kapiteln werden diese vorgestellt.

1.2 Esterasen- und Lipasenanalytik

1.2.1 Histologische Anfärbung biologischen Materials

Die Gewebelehre (Histologie) arbeitet mit der optischen Beurteilung von Gewebeproben in verschiedenen Zuständen. Dazu werden millimeterdünne Schnitte mittels verschiedener Chemikalien gefärbt und mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Die älteste Färbemethode der Histologie ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, bei der ein Polyphenol eingesetzt wird, womit eine Kompartimentierung in den Zellen sichtbar wird.^[34] Des Weiteren gibt es verschiedenste Farbstoffe, welche saure, basische und auch neutral geladene Bestandteile der Zellen einfärben.^[35]

Bei diesen Techniken werden nur grobe Kompartimentierungen der Zelle sichtbar und es kann keinerlei enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings wurden für viele Enzyme bereits verschiedene Ansätze zur Lokalisierung entwickelt. Erste Untersuchungen von hydrolytischer Aktivität in Gewebe wurden von Gomori *et al.* um das Jahr 1940 entwickelt. Hierbei wurden Phosphatasen^[36,37] und Phosphoamidasen^[38] über schwerlösliche Salze von gebildeten Phosphaten, welche anschließend in farbige Metallsulfide umgewandelt wurden, sichtbar gemacht. Dieses Prinzip wurde

ebenfalls von Gomori auf Cholinesterasen^[39] und Lipasen^[40] adaptiert, womit erstmals carbonsäureesterhydrolysierende Enzyme lokalisiert werden konnten. Auf diesen Arbeiten haben auch andere Forschungsgruppen diese Techniken angewendet, um zum Beispiel die Aktivität von Phosphatasen in Mäusedarm zu untersuchen.^[41] Eine weitere Methode, um hydrolytische Aktivität nachzuweisen, ist die Verwendung von Naphtholderivaten, welche mit verschiedenen Carbonsäuren verestert wurden (**1**). Hierbei wurde das freigesetzte Naphthol (**2**) *in situ* mit einem Diazoniumsalz (**3**) in einen farbigen Azofarbstoff (**4**) überführt (siehe Abb. 5 A).^[42] Allerdings beinhaltet diese Methode Schwierigkeiten, da die Azotierung weitere Chemikalien voraussetzte und zudem diffusionsabhängig ist.

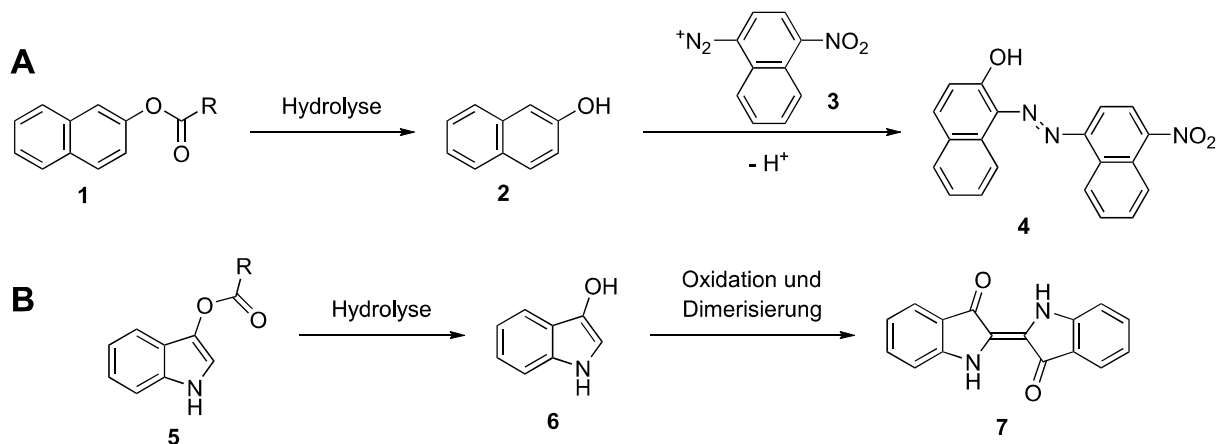


Abbildung 5: In der Histologie verwendete chromogene Substanzen zur Lokalisierung von lipolytischen Enzymen. Der Rest R in beiden Substanzen **1** und **5** ist flexibel und repräsentiert eine kurzkettige oder eine langkettige Carboxylsäure. Durch die Hydrolyse der Ester **1** bzw. **5** und die Folgereaktion entstehen die wasserunlöslichen und farbigen Substanzen **4** bzw. **7**, welche eine Lokalisierung der Hydrolyseaktivität erlauben.

Um eine neue, weniger komplizierte Methode der Lokalisierung lipolytischen Aktivität zu entwickeln, benutzte Holt im Jahre 1952 erstmals Indoxylderivate (**5**).^[43] Holt nutzte analog zu Gomori ein nicht farbiges Molekül **5**, das durch hydrolytische Aktivität in eine oxidations-labile Spezies **6** überführt wird (siehe Abb. 5 B). Durch die Sauerstoff-vermittelte Oxidation von **6** und anschließende Dimerisierung entsteht der tiefblaue Farbstoff Indigo (**7**), welcher im wässrigen Milieu der Zelle ausfällt und die Lokalisierung der Hydrolase zulässt.

1.2.2 Quantitative Detektion mittels Photospektrometrie

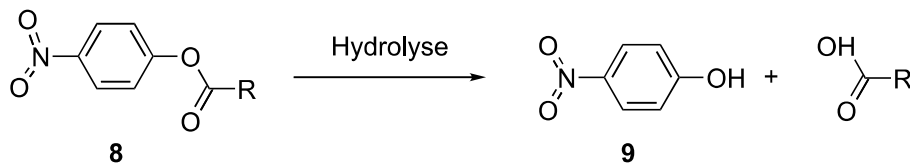


Abbildung 6: Photospektrometrische Detektion der lipolytischen Aktivität. Die farblosen Ester **8** werden in das gelb gefärbte **9** überführt.

Ein sehr weitverbreitetes und einfaches Verfahren ist der Einsatz von käuflich erwerb- baren *p*-Nitrophenylestern von Carboxylsäuren verschiedener Längen (**8**).^[44] Dabei entsteht aus dem farblosen Ester **8** durch Hydrolyse das gelbgefärbte *p*-Nitrophenol (**9**), dessen Absorption zeitlich aufgelöst gemessen wird. Durch den Einsatz von Micro- titerplatten kann dabei eine hohe Parallelisierung betrieben werden.^[45] Anschließend kann mittels mathematischer Auswertung die Hydrolyseaktivität quantitativ erfasst werden. Bei diesem Ansatz ist es sogar möglich zwischen Esterasen (z. B. R= Ace- tate und Butyrate Abb. 6) und Lipasen (z. B. R= Laurate und Stearate Abb. 6) zu unterscheiden, indem verschieden längkettige Ester des *p*-Nitrophenols (**8**) eingesetzt werden. Allerdings zeigen die kurzkettigen Ester, vor allem die Acetate, häufig Pseu- dohydrolaseaktivitäten an. So ist bekannt, dass diese kurzkettigen Ester auch durch nicht spezifische Hydrolasen^[46,47], als auch durch enzymatisch inaktive Proteine, wie Serumalbumine^[48-50] und Insulin^[47], gespalten werden können.

Des Weiteren werden Naphtholester (**1**), ähnlich der histologischen Anfärbung, zur quantitativen Bestimmung der Hydrolaseaktivität benutzt.^[51,52] Allerdings ist auch hier ein zusätzlicher Schritt in Form einer Diazotierung für die photospektrometrische Auswertung notwendig.

1.3 Activity Based Protein Profiling

Activity Based Protein Profiling (ABPP) beschreibt die Untersuchung des Proteoms von Organismen unter verschiedenen Einflüssen und Faktoren. Durch vergleichende Analytik, zum Beispiel von gesunden und kranken Zuständen, kann man Unterschiede aufzeigen und so eine diagnostische Einschätzung geben. Durch genaue Untersuchung der Unterschiede (z. B. LC-MS gestützte Proteinsequenzierung), der hoch- oder herun-

terregulierten Enzyme oder Proteine, kann die Ursache für eine Veränderung bestimmt werden. Als Standardanalytik hat sich dabei die eindimensionale und auch die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese etabliert, aber auch neuere Verfahren der Flüssigkeitschromatographie werden angewendet.^[53,54]

Die Grundlagen dieses Prinzips wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Arbeiten der Arbeitsgruppen um Walker^[55] und Powers^[56,57] erarbeitet und durch Cravatt^[54], Bogoy^[58,59] und Sieber^[60] zum heutigen ABPP weiterentwickelt.

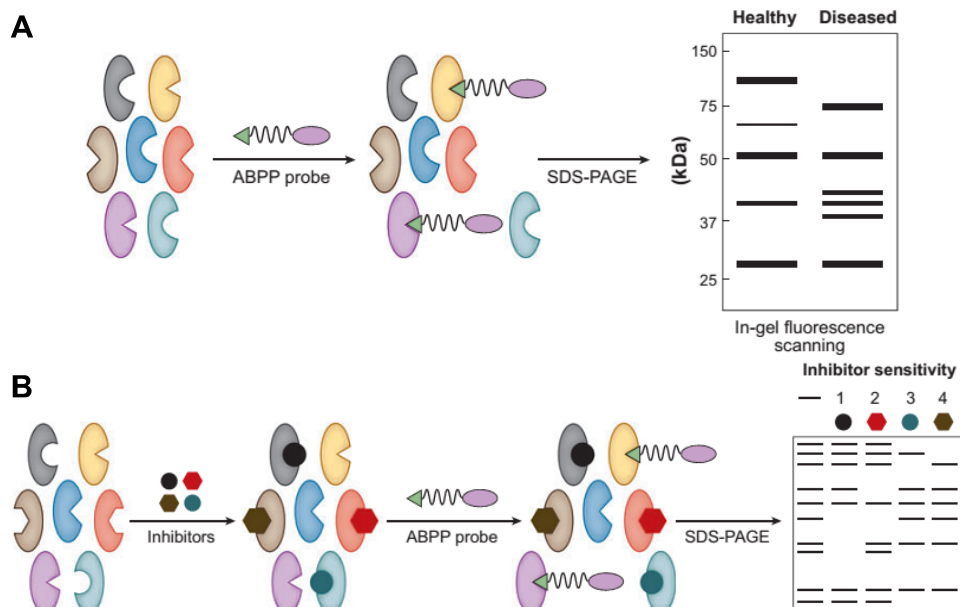


Abbildung 7: Zwei Prinzipien der ABPP-Strategie. **A:** Vergleichendes ABPP: Hierbei werden verschiedene Proteome mit einer ABP-Sonde inkubiert. Durch den Vergleich von verschiedenen Zuständen (z. B. krank - gesund) können Krankheiten diagnostiziert werden. **B:** Kompetitives ABPP: Die ABP-Sonde wird mit anderen Inhibitoren koinkubiert. Dadurch können neue Inhibitoren gefunden werden. Nach Cravatt *et al.* Abbildung aus: B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu Rev Biochem* 2008, 77, 383-414.

Das Verfahren des ABPP basiert grundlegend auf den Einsatz von spezifischen Inhibitoren, die eine kovalente (auch koordinative) Bindung mit dem Enzym eingehen. Erst durch das Verständnis des Mechanismus der einzelnen Enzyme konnten maßgeschneiderte Inhibitoren und damit Sonden für verschiedenste Enzymklassen erstellt werden.^[61] Viele der eingesetzten ABP-Sonden (Inhibitoren) sind Elektrophile, die mit den nukleophilen Resten der aktiven Tasche der Enzyme reagieren (siehe Abb. 7 A). Durch die Verbindung des ABPP Prinzips mit der hohen Parallelisierbarkeit der Gelelektrophorese können verschiedene Zustände eines Proteoms schnell und effizient verglichen werden. Dabei werden die Proteome von unterschiedlichen biologischen

Einflüssen, wie die Zugabe von exogenen Substanzen oder Krankheiten miteinander verglichen und die Aktivität der Enzyme detektiert. Daraus können die Ursachen oder die Auswirkung der Veränderung bzw. der Krankheit abgelesen bzw. analysiert werden. Durch anschließende Sequenzierung der markierten Enzyme mit modernen Sequenzierungstechniken können die verantwortlichen Enzyme identifiziert werden und Therapien entwickelt werden.

Dieser vergleichenden Methode steht die Kompetitive gegenüber (siehe Abb. 7 B). Hierbei werden bekannte ABP-Sonden (Inhibitoren) zusammen mit weiteren potentiellen Inhibitoren in einem Proteom inkubiert. Beide Sonden konkurrieren daraufhin, mit dem Enzym zu reagieren. Auf Grundlage der spezifischen Abschwächung der Markierung der Enzymbanden durch die ABP-Sonden können die neuen Inhibitoren auf ihre Stärke und Spezifität untersucht werden und unter Umständen neue ABP-Sonden entwickelt werden.

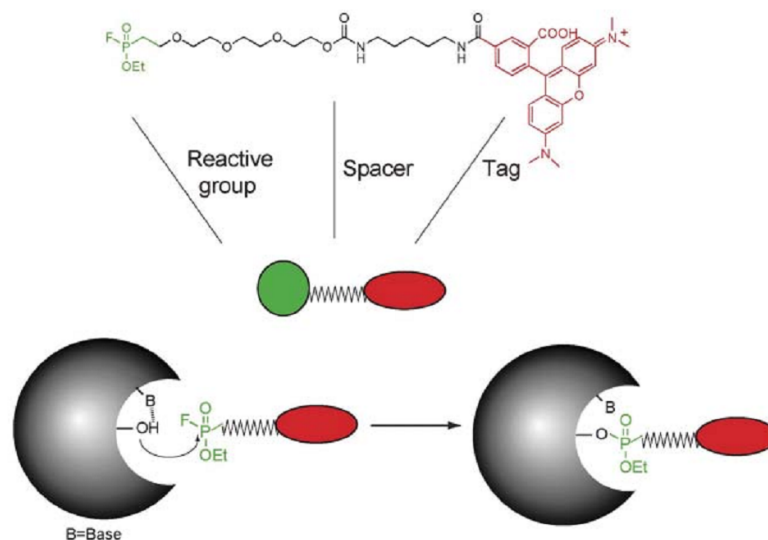


Abbildung 8: Prinzipieller Aufbau der ABPP-Sonden nach Cravatt, mit Unterteilung der drei elementaren Bausteine. Die untere Abbildung zeigt die Wirkungsweise der Serinhydrolase-sonden nach Cravatt. Abbildung aus: S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chem Commun* **2006**, 2311-2319.

ABP-Sonden bestehen im wesentlichen aus drei Teilstrukturen: einer reaktiven Gruppe (RG), einem verbindenden Spacer und einem Reporter für die Analyse. Die reaktive Gruppe ist die wichtigste und am wenigsten variable Komponente der ABP-Sonden. Die RG bestimmt im größten Maße die Enzymselektivität und ist verantwortlich

für die Bindung zum Enzym. Grundlegend gibt es zwei verschiedene Strategien eine Bindung zu mit dem Enzym aufzubauen, wobei immer die katalytische Aktivität des Enzyms ausgenutzt wird. In der Mechanismus-basierten Strategie wird das nukleophile Zentrum der Enzyme ausgenutzt, um eine Bindung herzustellen. Innerhalb einer Enzymfamilie ist dieses Zentrum stark konserviert und dient als Erkennungsmerkmal. Als RG werden meist Elektrophile eingesetzt, die eine gute Abgangsgruppe beherbergen oder durch das Enzym zu einem starken elektrophil umgewandelt werden.

Die zweite Strategie der Ausbildung einer Bindung mit dem Enzym zielt auf katalytische Zentren, welche keine kovalente Bindung mit ihrem Substrat ausbilden. So besitzen viele Enzyme als ein komplexiertes Metallion in der aktiven Tasche, an welchem die katalytische Umsetzung der Substrate erfolgt. Die eingesetzten RG dieser Gruppe bilden deswegen ebenfalls nur eine koordinative Bindung mit dem Enzym aus, die bei anschließenden Aufreinigungsschritten und Analysen gespalten wird. Um dennoch eine kovalente Bindung mit dem Enzym einzugehen, besitzen diese ABP-Sonden einen photoaktivierbaren Linker (PAL).^[62] Dieser bildet nach Aktivierung mit Licht meist ein Radikal aus, welches mit umliegenden Gruppen in der aktiven Tasche reagiert und so irreversibel RG und Enzym bindet.

Der Spacer ist das Bindeglied zwischen RG und Reporter-molekül. Durch dieses Teilstück kann die Hydrophilie bzw. Lipophilie der ABP-Sonden eingestellt werden. Darüber hinaus können sterische Hinderungen der Reporters minimiert werden, falls ein zu kurzer Spacer das Eindringen der RG in die aktive Tasche verhindert.

Der Reporter (Tag) ist der für die anschließende Analytik notwendige Baustein. Er ist sehr variabel und maßgeschneidert für die gewählte Messmethode, darf aber keinerlei Wechselwirkung mit dem Enzym eingehen. Als Reporter werden häufig Fluorophore, Reste mit einem leicht zuordenbaren Massenspektrum (z. B. Brom) oder nachträglich koppelbare Gruppen (Azid, terminale Dreifachbindung) verwendet.

Nach dem Prinzip des ABPP, einen spezifischen Enzyminhibitor über einen Spacer mit einem Reporter-molekül zu verbinden, wurden vielfältige Sonden entwickelt. So war zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit ein breites Spektrum an ABP-Sonden verfügbar, welche Serinhydrolasen^[63-66] (Lipasen, Esterasen, Proteasen), Cysteinproteasen^[67,68], Metalloproteasen^[69,70], Kinasen^[71-73], Glycosidasen^[74,75], Cyto-

chrom P450^[76,77], Phosphatasen^[78,79] und viele weitere^[80] adressieren. Auf all diese einzelnen Ansätze kann hier nicht eingegangen werden, jedoch sind vor allem die Strategien der, zu den Serinhydrolasen zugehörigen, Esterasen und Lipasen für diese Arbeit interessant.

Schon 1957 gab es erste Untersuchungen der lipolytischen Aktivität in Mäuselebern von Hunter und Markert nach einem ähnlichen Prinzip wie das moderne ABPP.^[81] Dabei wurden die histochemischen Methoden von Gomori^[82] mit dem chromatographischen Verfahren der Gelelektrophorese verknüpft, um ein *Zymogram*¹ des untersuchten Gewebes zu erhalten. So konnte in einem Stärkegel nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der nativen Proteine und Enzyme, mittels Naphtholester direkt Esterasen als einzelne farbige Banden sichtbar gemacht werden. Durch Zugabe von Lipasen und Esterase-spezifischen Inhibitoren konnten Hunter und Markert zudem die gefärbten Banden diesen Enzymklassen zuordnen, wodurch die erstmals nach dem kompetitiven ABPP-Prinzip arbeiteten.

1.3.1 Viergliedrige Lactone als ABP-Sonden für Serinhydrolasen

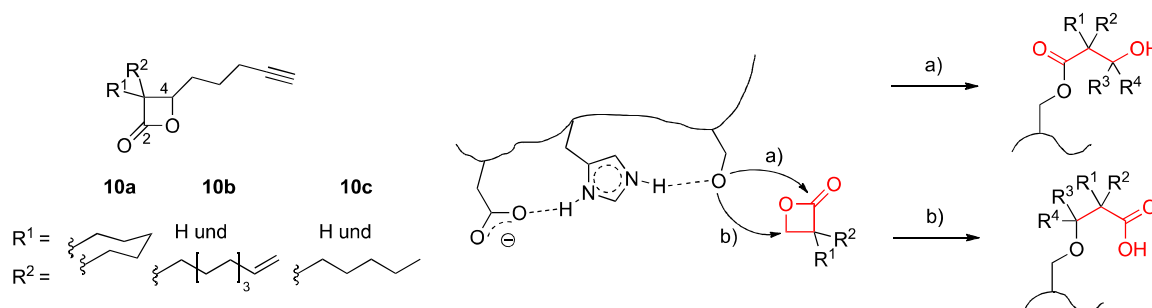


Abbildung 9: Inhibierungsreaktionen der Serinhydrolasen durch β -Lactone. Im oberen Fall (a) greift das Serin nukleophil am Carbonylkohlenstoff an. Der darauf folgende, aber nicht abgebildete, Hydrolyseschritt ist stark gehemmt. Im unteren Fall (b) findet der nukleophile Angriff am Alkoholkohlenstoff der zyklischen Lactons statt. Bei dieser Reaktion ist das Enzym irreversibel inhibiert. Nach Cravatt *et al.* Abbildung aus: T. Bottcher, S. A. Sieber, *Medchemcomm* 2012, 3, 408-417.

¹Eine Technik bei der eine elektrophoretische Auftrennung der nativen Enzyme durchgeführt wird. Sodass die Proteine und aktiven Enzyme örtlich von einander getrennt sind. Zur Anfärbung einzelner Enzymklassen wird das Gel mit den aus der Histochemie bekannten Färbemitteln inkubiert. Anschließend wird das Färbereagenz ausgewaschen und es werden die Banden sichtbar, an denen die Enzyme das Färbereagenz umgewandelt haben. Das so erhaltene Muster der farbigen Banden ist das Zymogram.

Alle ABP-Sonden der Serinhydrolasen sind der Gruppe des Mechanismus-basierenden ABPP zuzuordnen. Ziel dieser Sonden ist das formal gebildete Alkoholat des Serins der katalytischen Triade. Grundlegend wird bei allen Sonden der katalytische Zyklus unterbrochen, indem das Stadium des tetraedrischen Intermediates (Abb. 2 B) gehalten wird bzw. nicht gespalten werden kann. Böttcher und Sieber konnten im Jahre 2008 mit Hilfe von fluoreszenten β -Lactonen **10a-c** einige Esterasen mit der Strategie des ABPP markieren und indentifizieren.^[60,83] Abgeleitet waren diese von natürlich vorkommenden zyklischen viergliedrigen Estern oder Amiden, wie sie z. B. in Antibiotika wiederzufinden sind. Bei dieser Art ABP-Sonden liegt ein stark gespannter Ring zugrunde, welcher bei der Hydrolyse 95 kJ/mol bis 130 kJ/mol freisetzt und so die große Reaktivität gegenüber Serinhydrolasen bestimmt. Interessanterweise gibt es bei den verwendeten β -Lactonen zwei Wege der Inhibitorwirkung. Der häufiger zu beobachtende Reaktionsmechanismus am aktiven Serin ist in Abb. 9 Reaktion a) dargestellt, in dem das Lacton geöffnet wird und das Enzym im acylierten Stadium (vgl. Abb. 2 C) gehalten wird. Kristallographische und kinetische Untersuchungen verschiedener Autoren zeigten, dass unterschiedliche Faktoren die Hydrolyse in diesem Stadium unterbinden. So verdrängt der Inhibitor das hydrolytische Wassermolekül^[84,85], wodurch kein Angriff am Acylkohlenstoff stattfinden kann oder die ABP-Sonde geht starke Wechselwirkungen in der aktiven Tasche ein.^[86] Der Inhibitor kann auch Strukturelle Veränderungen der aktiven Tasche erzwingen^[87], welche eine Hydrolyse ebenfalls unterdrücken. Der zweite Mechanismus der Inhibierung von Serinhydrolasen durch β -Lactone ist in Abb. 9 Reaktion b) dargestellt. Die ABP-Sonde wird vom aktiven Serin nicht am Acylkohlenstoff angegriffen, sondern an der β -Position (Position 4). Dadurch kommt es zu einer Etherbildung die vom Katalysezyklus des Enzyms nicht gespalten werden kann. Dieser Mechanismus der Alkylierung des aktiven Serins wird häufig bei β -Lactonen mit kleinen Seitenketten beobachtet (Abb 9 R₁ bzw. R₂). Aufgrund dessen sind β -Lactone zum größten Teil reversible Inhibitoren für Serinhydrolasen, da die bevorzugte Bindung mit dem Enzym über die Acylierung erfolgt (Abb 9 Rkt. a). Dennoch reicht die Zerfallsrate von ca. 20 h^[88] β -Lactone als ABP-Sonden einzusetzen. Vor allem die Sonden mit elektronenschiebenden und sterisch anspruchsvolleren Resten R¹ und R² (Siehe Abb. 10) zeigen gute Spezifität gegenüber einigen Esterasen. Diese β -Lactone

markieren überdies hinaus eine sehr große Zahl an Serin- und Cysteinproteasen und andere Enzyme, sodass bei diesen ABP-Sonden die alleinige Markierung einer Proteinbande kein Kriterium für eine eindeutige Zuordnung ist und die markierten Proteine auf ihre metabolische Funktion eingehender untersucht werden müssen.

1.3.2 Phosphonsäurederivate als ABP-Sonden für Serinhydrolasen

Diese Gruppe der Serinhydrolaseinhibitoren ist von der Phosphonsäure H_3PO_3 abgeleitet. Zusätzlich wurden organische Reste durch Veresterung der zwei Hydroxyfunktionen und durch Alkylierung des Phosphors eingeführt. Webb hatte schon im Jahre 1948 entdeckt, dass ebenfalls alkylierte Fluorophosphonate (FP), bei denen eine Hydroxyfunktion gegen ein Fluor ausgetauscht war, Esterasen inhibieren.^[89]

Aus diesen Ergebnissen wurden fluoreszente ABP-Sonden für Serinhydrolasen entwickelt. Die Reportereinheit (Tag) dieser Sonden befindet sich dabei meist an der Alkylkette, welche direkt am Phosphor gebunden ist, da diese unter physiologischen Bedingungen nur schwer abspaltbar ist. Das Angriffsziel der FPs ist, genau wie bei den β -Lactonen, das Alkoholat des aktiven Serins. Die Bindung mit dem Enzym erfolgt durch einen S_N2 -Mechanismus, bei dem der Phosphor elektrophil an der Hydroxyfunktion des Serins angreift und die Abgangsgruppe (Fluor im Fall der FP bzw. ein organischer Rest bei den Phosphonsäureestern) das Enzym verlässt. Diese kovalente Phosphor-Sauerstoff-Bindung kann nicht mehr vom Enzym gespalten werden und das aktive Serin wird blockiert, wodurch das Enzym mit einem Tag verbunden wird.

Im Jahre 1999 wurden erstmals von Liu *et al.* fluoreszente FPs nach dem ABPP Prinzip eingesetzt.^[63] Nach Inkubationsexperimenten mit komplexen Proteomen und Fluoreszenzauswertung der Elektrophoresegele konnten mehrere Serinhydrolasen, darunter auch Proteasen, visualisiert werden. Ein mit Biotin verknüpftes FP konnte ebenfalls benutzt werden, um eine Anreicherung der Enzyme zu erreichen. Zusätzlich ist es gelungen das Protein einer Bande zu Sequenzieren und einer Acylpeptidhydrolase zuzuordnen. Zudem erlaubten diese FP eine direkte Quantifizierung der aktiven Hydrolasen. Da pro Enzym ausschließlich nur ein Inhibitormolekül gebunden wurde, kann durch zum Beispiel der Messung der Fluoreszenz einer Bande in einer Gelelektrophorese, die genaue Konzentration der aktiven Enzyme bestimmt werden. Dadurch

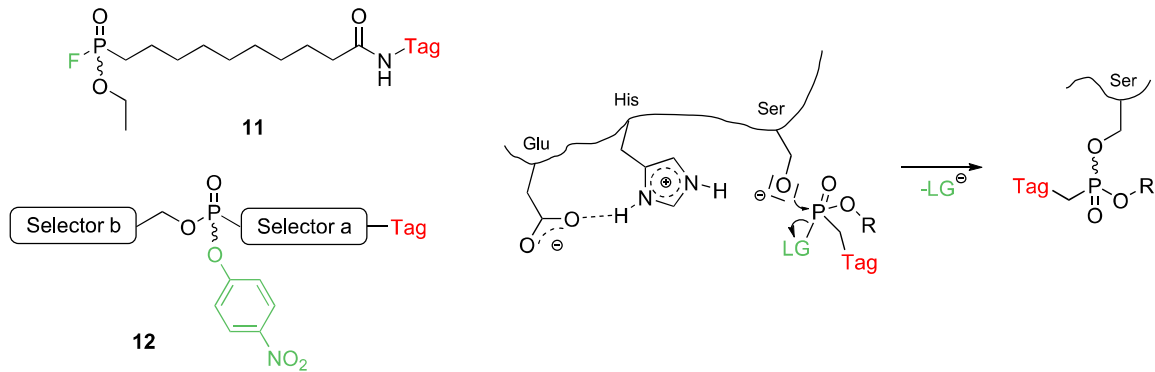


Abbildung 10: Alkylphosphonatderivate als ABP-Sonden für Serinhydrolasen. Abgebildet sind die von Liu *et al.* eingesetzten FPs (**11**) und die von Schmidinger *et al.* eingesetzten *para*-Nitrophenylphosphonate (**12**). Durch Variation der Selector a und b kann die Serinhydrolasenspezifität beeinflusst werden. In beiden Fällen wird durch eine S_N2 Reaktion am aktiven Serin die kovalente Bindung des Phosphors mit dem Enzym hergestellt.

kann die in der ABPP benötigte Qualifizierung und Quantifizierung in einem Schritt erfolgen.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob eine Polaritätsveränderung des Hexenylspacers die Enzymspezifität beeinflusste.^[64] Grundlage hierfür ist die Präferenz von Lipasen unpolare Substrate umzusetzen, wohingegen Esterasen in der wässrigen Phase agieren und polare Substrate bevorzugen. Ein mit einem Polyethylenglycolspacer versehenes Fluorophosphonat zeigte in der Tat ein verändertes Markierungsverhalten, jedoch wurden immer noch unspezifisch viele Serinhydrolasen markiert, sodass auch unspezifisch Proteasen inhibiert wurden. Interessanterweise konnte die *long chain Coenzyme A hydrolase 2* sehr spezifisch mit wasserlöslichen Fluorophosphonaten angefärbt werden, obwohl diese langkettige Substrate bevorzugt.

Eine Weiterentwicklung dieses Prinzipes sind die *para*-Nitro-phenylphosphonate (PNPP), in denen *para*-Nitro-phenol als Abgangsgruppe (LG) eingesetzt wird.^[90,91] Björkling *et al.* untersuchten dazu den Einfluss von Struktur, Hydrophobizität (Kettenlänge), Reaktivität (Abgangsgruppe) und der Stereochemie der Phosphonat-inhibitoren auf die Inhibitorstärke.^[92] Die potentesten Lipaseinhibitoren in dieser Studie waren *p*-Nitrophenyl substituierte Phosphonate mit langen und unpolaren Resten. Zudem war ein enantiomerenreines *p*-Nitrophenylhexylphosphonat 10 fach stärker in seiner Inhibierenden Wirkung als das entsprechende enantiomeres Gegenstück. Manesse *et al.* untermauerten zudem die, schon von Björkling beobachtete, äquimola-

re Inhibition, da die Freisetzung des *p*-Nitrophenols komplementär zur Inhibition der Lipase war.^[93] Infolgedessen wird beim nukleophilen Angriff am Serin exklusiv das *p*-Nitrophenol abgespalten und die zweite Esterbindung wird nicht gespalten. Diese Sonden zeigten jedoch, analog zu den verwandten FP, immer noch Komarkierung der Serinproteasen. Weiterführend wurden im Jahre 1999 von Scholze *et al.* Glycerolderivate der Phosphonate zur Markierung von Lipasen eingesetzt.^[94] Zwei der Hydroxyfunktionen des Glycerins wurden mit langkettigen Alkylresten verknüpft (eine von beiden trug ein Fluorophor) und die Dritte wurde mit der enzymreaktiven *p*-Nitrophenylhexylphosphonyl-Einheit ausgestattet. Diese Glycerinphosphonate wiesen sehr gute Spezifität gegenüber Lipasen auf. Durch vergleichendes ABPP mit einem fluoreszenten PNPP, welcher Esterasen und Lipasen markiert, konnte die der Lipase zugehörige Bande identifiziert werden. Auch mit dieser Sonde konnte, analog zu Liu^[63], über Fluoreszenzanalyse eine Quantifizierung der Hydrolasen erfolgen.

Aufbauend auf diesen Arbeiten der Entwicklung von PNPPs als Serinhydrolaseinhibitoren entwickelten Schmidinger *et al.* fluoreszente ABP-Sonden für die Diskriminierung von Esterasen und Lipasen.^[65] Durch Variation zweier Molekülabschnitte *Selector 1* und *Selector 2* dieser Sonden (Abb.10 Verbindung **12**), konnte die Selektivität auf einzelne oder Gruppen von Enzymen beobachtet werden. Analog zu den zuvor vorgestellten Inhibitoren zeigten die polaren Sonden (z. B. sekundäre Amine) erhöhte Selektivität gegenüber Esterasen und die langkettigen unpolaren oder Glycerin-verbundenen reagierten bevorzugt mit Lipasen. Herausstehend unter den getesteten Inhibitoren war ein Cholesterylphosphonat, welches exklusiv Cholesterylesterase markierte. Dennoch konnte kein eindeutiger Trend bei den vielfältig getesteten Phosphonaten in der Selektivität ausgemacht werden. Schmidinger *et al.* schlugen aus diesem Grund vor, dass eine vollständige Untersuchung eines Proteoms nur durch komparative ABPP mit mehreren PNPPs aus der vorgestellten Substanzbibliothek erreicht werden kann. Anwendung fand das Prinzip in der Identifizierung und Sequenzierung von Serinhydrolasen in Mäuseleber.^[95]

1.3.3 Bisenolacetate als molekulare Sonden für Esterasen

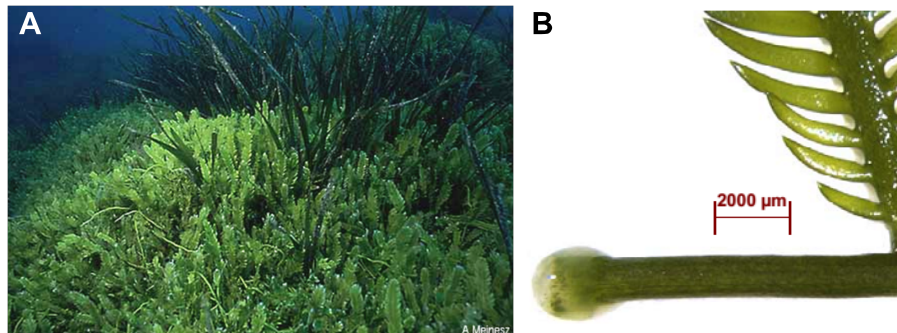


Abbildung 11: **A:** *Caulerpa taxifolia* überwuchert die einheimische Flora im Mittelmeer. Bild von Alexander Meinesz. **B:** Wundverschluss von *C. taxifolia*. Bild von Sven Adolph^[8]

Die bisher vorgestellten ABP-Sonden für Serinhydrolasen auf Grundlage von gespannten Lactonen und Phosphonsäurederivaten hatten das katalytisch aktive Zentrum der Enzyme als Ziel. Einen ganz anderen Weg der Markierung lipolytischer Enzyme wurde mit Hilfe der Bisenolacetate von Weißflog im Jahre 2010 entwickelt.^[10] Diese Strategie basiert nicht wie die bisher vorgestellten Serinhydrolasesonden auf den Einsatz von irreversiblen Inhibitoren als Enzym-reaktive Gruppe, sondern auf der enzymbasierten Aktivierung von Bisenolacetaten² (BEA).

1.3.3.1 Die chemischen Reaktionen im Wundverschluss von *Caulerpa* spp.

Bekannt wurde die Substanzklasse der Bisenolacetate in einem negativen Bild, als in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts die Grünalge *Caulerpa taxifolia* zunehmend das Mittelmeer invasiv besiedelte und zu einer ernststen Bedrohung der einheimischen marinen Flora wurde.^[96] Diese makroskopische, polynukleoside, aber dennoch einzellige Alge hat einen interessanten Wundverschlussmechanismus entwickelt. Dieser Mechanismus ist essentiell, da *Caulerpa* spp. keine Zwischenwände besitzen, die ein

²Anmerkung zur Nomenklatur dieser Substanzen: Der systematische Name laut IUPAC ist 1,4-diacetoxybuta-1,3-dien. Allerdings wird in der Literatur der umgangssprachliche Begriff Bisenolacetat verwendet, der jedoch einen Fehler beinhaltet. Die Enol-Einheit ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OH}$) enthält ein Sauerstoffatom über welches die Verknüpfung stattfindet. Dadurch, dass die Acetat-Einheit ihre Bindung ebenfalls über ein Sauerstoffatom aufbaut, würde aus der Verbindung beider Einheiten im „Bisenolacetat“ eine Peroxoverbindung entstehen. Besser wäre hier in Analogie zu Vinylacetat den Namen Bisvinylacetat zu verwenden. Da sich andererseits der Name Bisenolacetat durchgesetzt hat, und um vergleichbar mit der Literatur zu bleiben, wird dennoch in der vorliegenden Arbeit von Bisenolacetaten, im Sinne von Bisvinylacetaten, gesprochen.

Auslaufen des gesamten Cytosols verhindern würden, wenn die einzellige Alge verletzt wird.

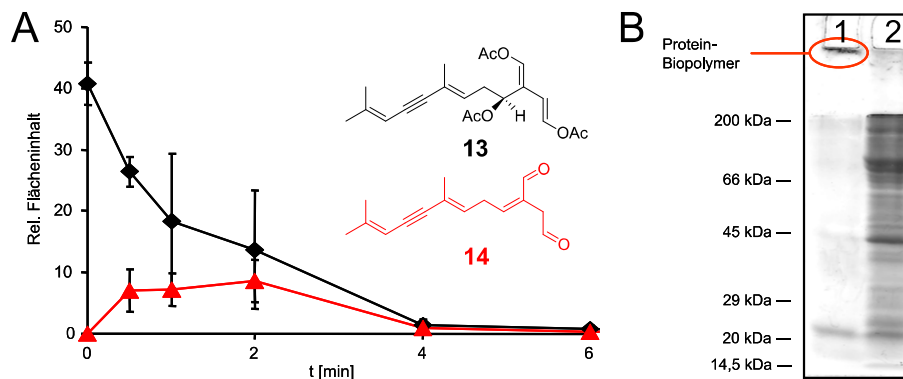


Abbildung 12: **A:** Konzentrationsverlauf der beim Wundverschluss diskutierten/beteiligten Substanzen Caulerpenin (schwarz) und dem daraus gebildeten Oxytoxin 2 (rot) bei *C. taxifolia* nach Mörsern. **B:** Proteinprofile von gemörserter *C. taxifolia* mit intakten Enzymen (Bahn 1) und hitzeinaktivierter Enzyme (Bahn 2). Abbildungen nach: **A:** Dissertation S. Adolph^[8]; **B:** Dissertation J. Weißflog^[10]

Bei Verwundung der Zelle von *Caulerpa* spp. wird innerhalb von Minuten das Bis-enolacetat Caulerpenin (**13**) zu dem strukturell ähnlichen Oxytoxin 2 (**14**) umgewandelt.^[8,9] Untersuchungen der Umsetzung von Caulerpenin in homogenisierter Alge durch Adolph *et al.* haben gezeigt, dass der Dialdehyd Oxytoxin 2 (**14**) aus **13** innerhalb von ca. 4 min Minuten fast vollständig umgewandelt wurde (siehe Abb. 12 A). Zugleich zeigten gelelektrophoretische Analysen, dass der Proteingehalt im künstlichen Wundverschluss (mörsern der Alge) drastisch sank und fast ausschließlich hochmolekulare Aggregate nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 12 B Bahn 1). Diese Polymerisierung der Cytosolproteine kann verhindert werden, in dem die Enzyme der intakten Alge vor dem Mörsern 5 min mit kochendem Wasser deaktiviert werden (Bahn 2).

Schlussfolgernd wurde die These aufgestellt, dass bei einer Verwundung der Alge das BEA **13** zu dem Dialdehyden **14** enzymatisch umgewandelt wird. Diese äußerst reaktive Spezies reagiert mit den Cytosolproteinen und vernetzt diese zu einem Proteinpolymer (**15**), welcher die Wunde provisorisch verschließt (Abb. 13).

Um diese These zu untermauern, wurden *in vitro* Experimente von Adolph *et al.* mit extrahiertem Caulerpenin (**13**) und einem Oligopeptide bzw. der Aminosäure Cystein durchgeführt.^[9] Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass unter diesen künstlichen Bedingungen **14** unter Ausbildung eines Pyrrolringes mit der terminalen Amino-

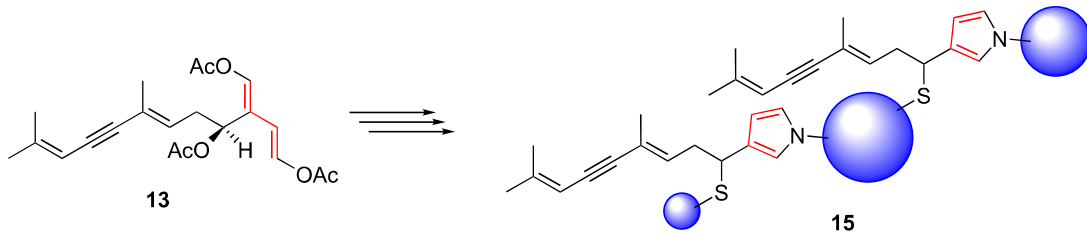


Abbildung 13: Postulierte Reaktion, die bei Verwundung von *Caulerpa taxifolia* eintritt. Dabei wird Caulerpenin (**13**) enzymatisch transformiert und es kommt zu einer Polymerisierung der Cytosolproteine (blaue Kugeln).

gruppe des Alanins aus dem Oligopeptid reagiert (Verbindung **16** in Abb. 14), ohne dass es zu Quervernetzungsprodukten des Oligopeptides oder einer weiteren Anlagerung an das Michael-Akzeptorsystem von **14** kommt. Wurde hingegen Cystein, welches zusätzlich zur Aminofunktionalität eine Thiolgruppe enthält, mit enzymatisch deacetyliertem **13** in Reaktion gebracht, konnte ein Produkt isoliert werden, welches mit zwei Molekülen Cystein reagiert hat (Verbindung **17** in Abb. 14). Das 1,4-Dialdehydsystem von **14** kondensierte mit dem Amin des Cystein zu einem Pyrrolring und die Thiolgruppe der Aminosäure addiert an das Michael-Akzeptorsystem.

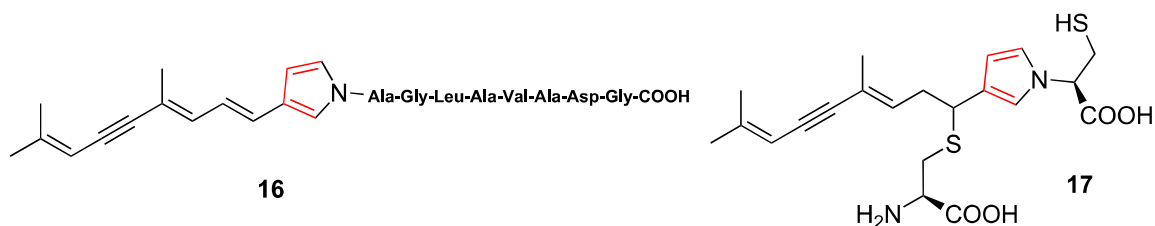


Abbildung 14: Hauptprodukte der Reaktion *in-vitro* von enzymatisch deacetyliertem Caulerpenin mit einem Oligopeptid (links) und Cystein (rechts) nach Adolph *et al.*^[9]

Daraus wurde geschlussfolgert, dass eine analoge Reaktion von Cystein mit **14** möglicherweise für die Polymerisation der Cytosolproteine im Wundverschluss von *C. taxifolia* verantwortlich ist. Wenn dagegen kein Reaktionspartner mit einer Thiofunktion zur Verfügung steht (wie im Oligopeptid) entstehen keine Reaktionsprodukte, die zu einem Polymer führen könnten.

Um diese Ergebnisse auch *in vivo* auf den Wundverschluss von *C. taxifolia* zu übertragen, wurde von Weißflog ein totalsynthetisches fluoreszentes Caulerpeninanalogen **18** hergestellt.^[10] Statt mit dem, in der Protein-Reaktivität unbeteiligten, Dienin-Terminus war dieses mit einem Fluoreszenten Reporter ausgerüstet (Abb. 15). Dadurch war es möglich, in Inkubationsexperimenten die Sonde zu lokalisieren bzw. Proteinbanden

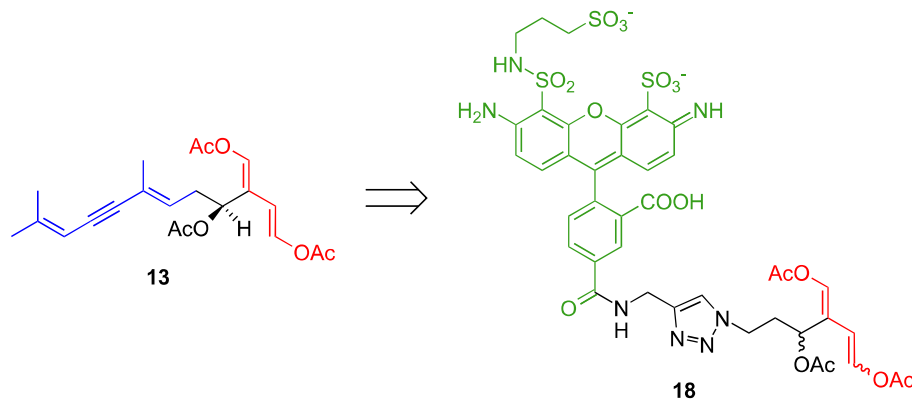


Abbildung 15: Vereinfachung des in *C. taxifolia* vorhandenen Sekundärmetaboliten Caulerpenin (**13**) zu dem fluoreszenten BEA **18**. Der nicht in der Proteinreaktivität beteiligte Dienin-Terminus (blau) wurde gegen ein fluoreszentes Rhodaminderivat (grün) ausgetauscht. Beide Verbindungen besitzen jedoch die enzymreaktive Bisenolacetateinheit (rot) inklusive sekundärer Acetatgruppe.

in Elektrophoresegelen zu zuordnen, die mit Deacetylierungsprodukten von **18** reagiert haben. Durch LC-MS Analysen konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass das fluoreszente BEA (**18**) genauso wie sein natürliches Vorbild **13** von den in der Alge enthaltenen Enzymen deacetyliert wird und der fluoreszente Rest keinerlei Auswirkungen auf die enzymatische Umsetzung ausübt.

Wird *C. taxifolia* in Gegenwart von **18** gemörsert und werden anschließend die Proteine gelelektrophoretisch analysiert, befindet sich **18** kovalent gebunden in den hochmolekularen Fraktionen (Abb. 16 Bahn 4). Wurden die Enzyme vor dem Mörsern deaktiviert (durch 5 min kochen der intakten Alge), waren auch hier, wie bei den Experimenten von Adolph *et al.*, keine fluoreszent markierten hochmolekularen Fraktionen zu erkennen (Abb. 16 Bahn 3).

Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenfalls, wenn **18** in das, die Alge umgebende, Medium gegeben wird und ein Wundverschluss durch das Zertrennen des Stolons erzeugt wird. Auch hier konnte die fluoreszente Sonde **18** im Wundverschluss von *C. taxifolia* nachgewiesen werden (Abb. 16 B). So wurde **18** ebenfalls von den in der Alge präsenten Enzymen deacetyliert und in eine Protein-reaktive Verbindung umgewandelt (analog zu **14**). Dieser Dialdehyd **19** reagiert, zusammen mit dem in der Alge entstehenden Oxytoxin 2 (**14**), mit den Proteinen der Alge und formt hochmolekulare Proteinpolymere, die einen Hauptbestandteil des provisorischen Wundverschlusses von *C. taxifolia* ausmachen.

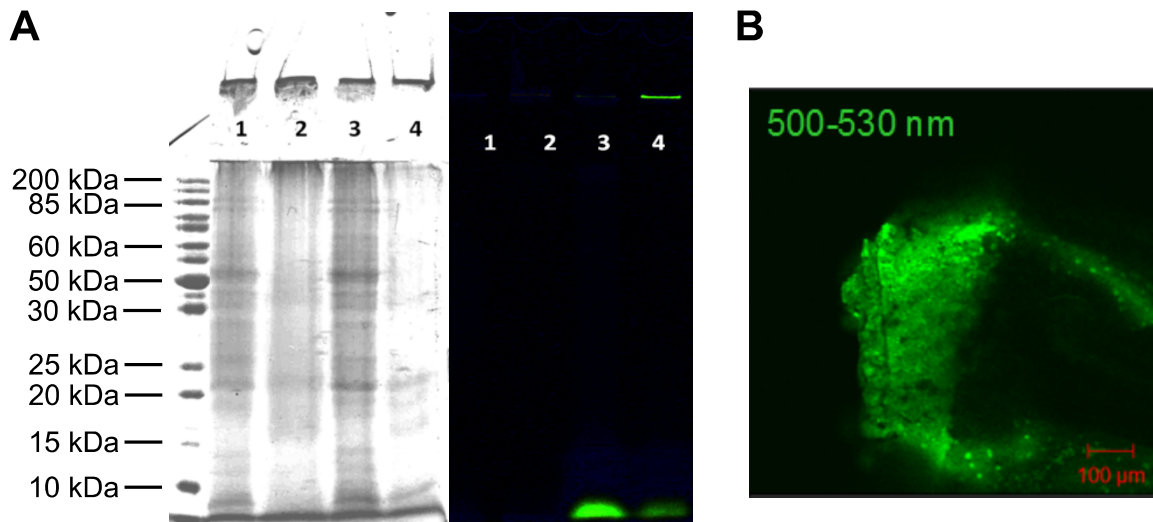


Abbildung 16: A: Gelelektrophorese der aus *C. taxifolia* extrahierten Proteine. Links: mit Rapid Stain™ angefärbtes Gel. Rechts: Fluoreszenzanregung mit 480 nm.
 1 - denaturiert durch Kochen und für 5 min verletzt;
 2 - für 5 min verletzt;
 3 - denaturiert durch Kochen und für 5 min verletzt in Gegenwart von **18**;
 4 - für 5 min verletzt in Gegenwart von **18**
B: Konfokale Laserscanningmikroskopieaufnahme des Wundverschlusses von *C. taxifolia*, welcher in Anwesenheit von **18** ausgelöst wurde (Fluoreszenzanregung 488 nm).
 Abbildung nach: J. Weißflog Dissertation^[10]

1.3.3.2 Entwicklung der ABP-Sonden nach dem Vorbild des Caulerpenins

Im vorangestellten Kapitel konnte demonstriert werden, dass das fluoreszente BEA (**18**) nach Deacetylierung eine Reaktivität gegenüber Proteinen aufweist. Dennoch ist durch die vorangegangenen Experimente nicht klar, in welcher Weise die Sonde **18** nach Deacetylierung mit Proteinen reagiert. Möglich wäre, dass **18** durch lipolytische Aktivität zu einem proteinreaktiven Dialdehyden **19** umgewandelt wird und unspezifisch mit Proteinen reagiert (Abb. 17 Reaktion c). Durch Reaktion mit Aminen und Thiolen der Proteine würde, analog wie Oxytoxin 2 (**14**), ein Proteinpolymer (**22**) gebildet, das aus der deacetylierenden Komponente (Esterase) und anderen Proteinen in einer zufälligen Anordnung besteht, welche durch das fluoreszente BEA verbunden sind.

Allerdings sind noch weitere Reaktionspfade möglich. So konnte Adolph *et al.* zeigen, dass Caulerpenin (**13**) unter speziellen Bedingungen mit Oligopeptiden reagieren und keinerlei Quervernetzung zu beobachten ist (vgl. Abb. 14 Verbindung **16**). Diese Beobachtung wird unterstützt durch Experimente und Messungen von Guerriero *et al.*^[97]

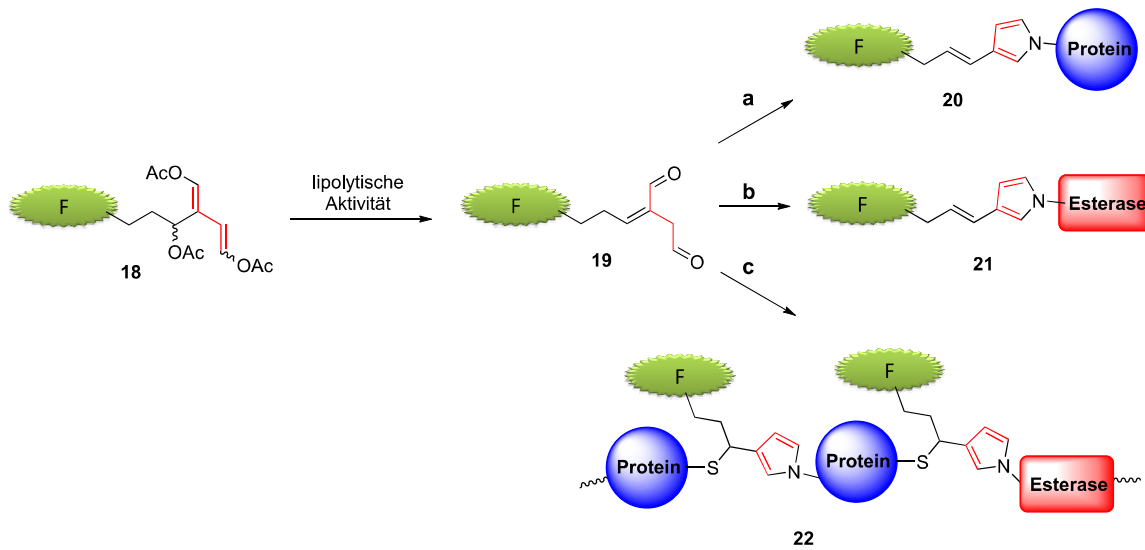


Abbildung 17: Durch lipolytische Enzyme wird das fluoreszente BEA **18** in den reaktiven Dialdehyden **19** überführt. Dieser kann weiter mit einzelnen Proteinen reagieren (Reaktion a und b) oder aber ein Proteinpolymer durch Quervernetzung erstellen (Reaktion c).

und Grosser *et al.*^[98,99] Grosser bewies durch Raman-spektroskopische Messungen des Wundverschlusses von *Caulerpa* spp., dass Caulerpenin (**13**) nach Deacetylierung im Wundverschluss nur über Pyrrolbildung an Proteinen bindet und keinerlei Addition von Amino- oder Thiofunktionen an das Michael-Akzeptorsystem stattfindet. Guerriero brachte **13** mit *n*-Butylamin zur Reaktion und konnte nach chromatographischer Separation ebenfalls als Produkt ein Pyrrolderivat isolieren, dass nicht mit einem zweiten *n*-Butylamin reagiert hat. Demzufolge wäre es ebenso möglich, dass das fluoreszente Analogon des Caulerpenins **18** nach Deacetylierung mit einzelnen Proteinen reagieren kann (Verbindungen **20** und **21**) und keinerlei Proteinpolymerisierung zu beobachten ist (Abb. 17 Reaktion a und b). Vor allem Reaktion b stellt einen sehr interessanten Reaktionspfad dar, da in dieser **18** als molekulare Sonde für Esterasen agiert und diese Enzyme selektiv markieren kann.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde von Weißflog das fluoreszente Caulerpeninanalogue **18** mit der Esterase aus *Candida lipolytica* (CLE) und dem enzymatisch inaktiven, fluoreszierenden Histon (basisches Protein aus dem Zellkern von Eukaryoten) in verschiedenen Experimenten koinkubiert (Abb. 18). Wird CLE einzeln mit **18** inkubiert, reagiert die Esterase mit dem BEA **18** und kann mittels Fluoreszenzanalyse lokalisiert werden (Abb. 18 Bahn 4). Bedingung für diese Markierung ist, dass die Esterase die Sonde **18** aktiv in den reaktiven Aldehyden **19** überführt. Wird CLE

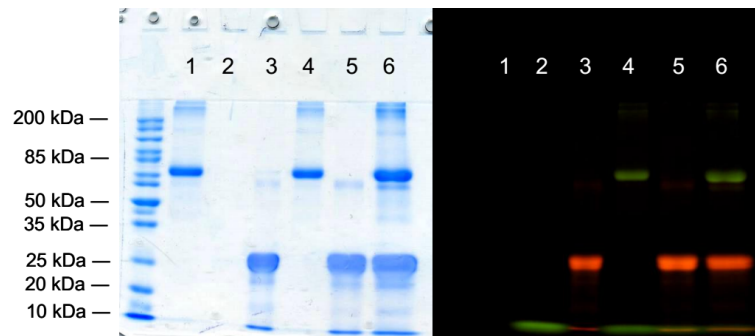


Abbildung 18: Gelelektrophorese der Reaktion von **18** (grüne Fluoreszenz) mit Schweineleberesterase (PLE) bzw. Histon (rote Fluoreszenz). Links: Färbung aller Proteine mit Rapid Stain™. Rechts: Anregung der Fluoreszenz mit 480 nm.

1 - CLE;

2 - fluoreszentes BEA (**18**);

3 - fluoreszentes Histon;

4 - CLE + fluoreszentes BEA (**18**);

5 - fluoreszentes Histon + fluoreszentes BEA (**18**);

6 - CLE + fluoreszentes Histon + fluoreszentes BEA (**18**).

Abbildung aus: J. Weißflog Dissertation^[10]

zuvor durch starke Hitze deaktiviert bleibt die Markierung aus (nicht abgebildet).^[10]

Diese Bedingung der aktiven Deacetylierung zeigt sich auch bei der Inkubation von **18** mit dem enzymatisch inaktiven Histon (Abb. 18 Bahn 5). Dessen rote Fluoreszenz wird nicht durch die Fluoreszenz des BEAs **18** überlagert. Aufgrund dessen wurde die Reaktion des fluoreszente BEA **18** mit dem katalytisch inaktiven Histon ausgeschlossen. Bedingung für einen Esterase-selektive Sonde ist jedoch zusätzlich, dass CLE in Gegenwart von anderen Proteinen keine Komarkierung aufzeigt. Durch Inkubation aller drei Komponenten konnte auch dies gezeigt werden (Abb. 18 Bahn 6). In diesem Experiment wurde ausschließlich die Esterase markiert, ohne dass das enzymatisch inaktive Histon komarkiert wurde. Somit können Reaktion a und auch c aus Abb. 17 weitestgehend ausgeschlossen werden und Reaktion b ist die dominierende.

Diese bemerkenswerten Ergebnisse sollten darüber hinaus auch auf weitere Esterasen und den sehr ähnlichen Lipasen erweitert werden. Wie schon erwähnt ist für eine Markierung des Enzyms die aktive Deacetylierung der Sonde **18** durch das Enzym notwendig. LC-MS basierende Experimente zeigen, dass alle der in Abbildung 19 verwendeten Esterasen und Lipasen **18** als Substrat akzeptieren und somit in einen Protein-reaktiven Dialdehyden umwandeln. Interessanterweise wurden jedoch einzig die Esterasen (Abb. 19 Bahn 1 bis 4) markiert. Lipasen wurden von **18** nicht kovalent

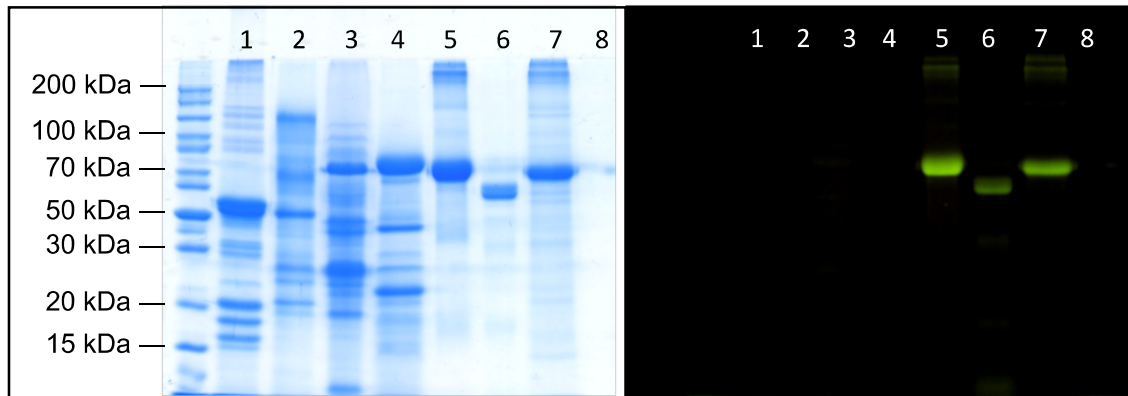


Abbildung 19: Inkubationsexperimente von **18** mit verschiedenen Lipasen aus Schweinepankreas, *Aspergillus niger*, *Rhizopus niveus* und *Candida antarctica*, im Vergleich mit den Esterasen aus *Candida lipolytica*, Scheineleber und *Thermoanaerobium Brockii*. Bahn 8 zeigt das Bisenolacetat ohne Enzym. Links: Färbung aller Proteine mit Rapid Stain™; Rechts: Anregung der Fluoreszenz mit 490 nm. Abbildung aus: J. Weißflog Dissertation^[10]

angegriffen, obwohl eine Deacetylierung von **18** zu **19** vorlag. Scheinbar muss die Bedingung der aktiven Deacetylierung von **18** für eine Markierung relativiert werden, sodass nur Esterasen markiert werden.

Zusammenfassend konnte durch synthetische Abwandlung des natürlich vorkommenden Caulerpenins eine molekulare ABP-Sonde für Esterasen erstellt werden, welche die sehr eng verwandten Lipasen nicht markiert. Allerdings bleibt der Reaktionsmechanismus weitgehend unbekannt, da alle lipolytischen Enzyme die molekulare Sonde in ihre enzymreaktive Form überführen, sodass auf diesem Gebiet weiterführende Experimente notwendig sind.

Teil II

1.4 Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen (EC 1.x.x.x) katalysieren Redoxreaktionen in Organismen, wobei die Elektronenübertragung von einem Elektronendonator (Reduktanten, R) zu einem Elektronenakzeptor (Oxidanten, O) stattfindet (Abb. 20).

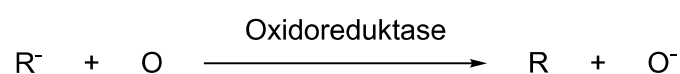


Abbildung 20: Durch Oxidoreduktasen katalysierte Redoxreaktion. Durch Oxidation des Reduktanten (R) wird der Oxidator (O) reduziert.

Als Kofaktoren wird von solchen Enzymen meist Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺ - elektronenakzeptierende Form, NADH - elektronendonierende Form), welches beide Rollen (R bzw. O) in der Katalyse einnehmen kann, benutzt. Dennoch können von diesen Enzymen auch andere Kofaktoren, wie zum Beispiel Sauerstoff (O₂), benutzt werden. Eine Gruppe dieser sauerstoffabhängigen Oxidoreduktasen sind die Lipoxygenasen (LO, Kapitel 1.4.1 auf Seite 27), welche genauer zu den Dioxygenasen gehören, da LO das gesamte Sauerstoffmolekül (O₂) in ihr Substrat, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, einbauen. LO sind in mannigfaltigen metabolischen Vorgängen involviert. Diese reichen von Signal- bis hin zu Verteidigungsmechanismen.

Eine weitere Untergruppe der Oxidoreduktasen sind die Xanthinoxidasen (Kapitel 1.4.2 auf Seite 32). Diese Form der Oxidoreduktasen benötigt den Kofaktor NAD⁺, welches bei der Redoxreaktion zu NADH reduziert wird. Xanthinoxidasen erfüllen vor allem die Entgiftung von heterozyklischen Xenobiotika durch Oxidation und oxidieren eine Vielzahl von Purinderivaten im Organismus.

1.4.1 Lipoxygenasen

1.4.1.1 Vorkommen und Bedeutung

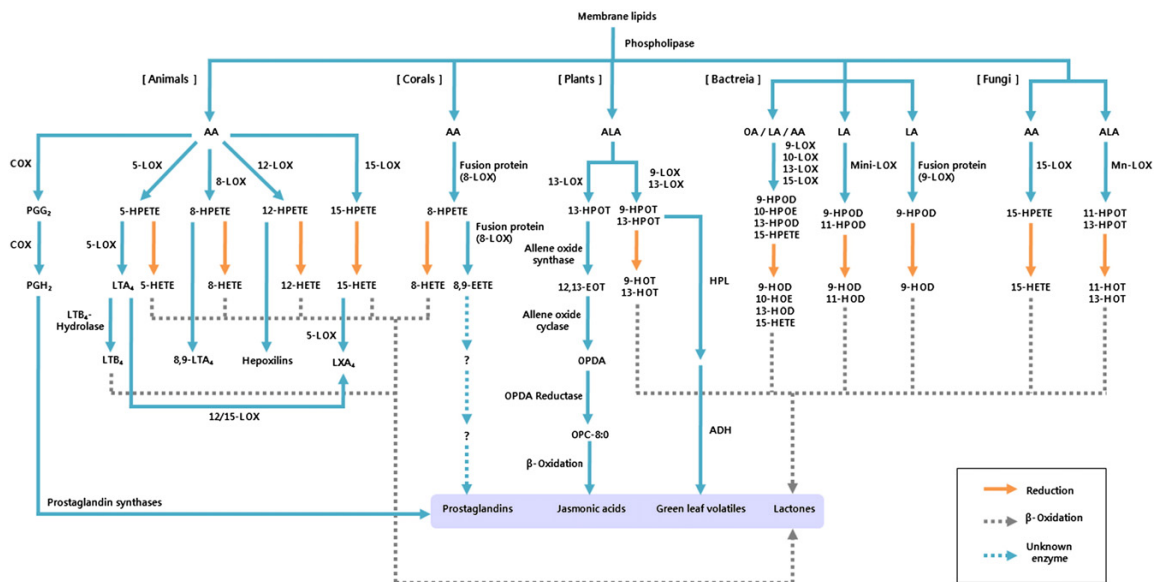


Abbildung 21: Syntheseroute der LO und nachfolgender enzymatischer Umwandlung zu mannigfaltigen und biologisch aktiven Substanzen.

Lipoxygenasen (EC 1.13.11.x) sind weit verbreitete Enzyme, kommen in Pflanzen^[100] und Tieren^[101] vor und besitzen eine sehr breite metabolische Aktivität (siehe Abb. 21). Des Weiteren wurden diese Enzyme auch in einigen Bakterien^[102] (Prokaryoten), Pilzen^[103] und Meeresorganismen^[104,105] nachgewiesen. Nur die Gruppe der Hefen stellt eine Ausnahme dar, in denen bisher keine LO Aktivität beobachtet wurde. LO katalysieren die Oxygenierung (d. h. den Einbau eines Sauerstoffmoleküls) einer Fettsäure mit mindestens zwei *cis*-konfigurierten Doppelbindungen. Je nachdem, an welcher Stelle (gezählt vom Carboxylende der Fettsäure) das Enzym die Oxidation katalysiert, kann eine Einteilung dieser vorgenommen werden, indem die Zahl der Position dem Namen voraus gestellt wird (n-LO). Darüber hinaus kann eine Klassifizierung nach dem präferierten Milieu vorgenommen werden. LO, welche bei niedrigen pH-Werten eine höhere Aktivität zeigen werden mit einer nachgestellten "1" versehen und LO, welche bei pH-Werten um 7 ihr Aktivitätsmaximum erreichten mit einer 2 (LO-n').

Ihr enzymatisches Zentrum enthält ein nicht-Häm Eisen, welches von vier Histidinen und dem Carboxylrest des C-terminalen Isoleucins, sowie einem Hydroxyd komplexiert ist (in Pflanzen ist ein Histidin gegen eine Asparaginsäure ausgetauscht). Der Katalysezyklus kann mit vier Teilschritten beschrieben werden (siehe Abb. 22), wobei vorgelagert eine oxidative Aktivierung der LO erfolgen muss.^[106] Im ersten Schritt wird ein allylständiger Wasserstoff von der Fettsäure abstrahiert, wobei das zentrale Eisen reduziert wird ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$). Im zweiten Schritt erfolgt eine Umlagerung des Radikals an der Fettsäure (Stellung [+2] oder [-2]). Hierbei wird aus noch ungeklärten Ursachen vom Enzym gesteuert, mit welcher allylständigen Doppelbindung diese Umlagerung erfolgt. Anschließend erfolgt im dritten Schritt die stereoselektive Insertion des Sauerstoffmoleküls, wobei auch dessen Einlagerung in das Enzym noch nicht vollständig geklärt ist.^[107] Im letzten Schritt wird das Hydroperoxidradikal reduziert, wodurch das entsprechende Anion entsteht, das durch Protonierung in das Produkt überführt wird. Gleichzeitig wird das Eisenzentrum oxidiert und steht dem Katalysezyklus erneut zur Verfügung.

LO waren seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts nur in Pflanzen bekannt und bis in die 70er Jahre wurden den LO ausschließlich destruktive Funktionen zugeordnet. Man ging davon aus, dass solche Mechanismen in höheren Tieren nur

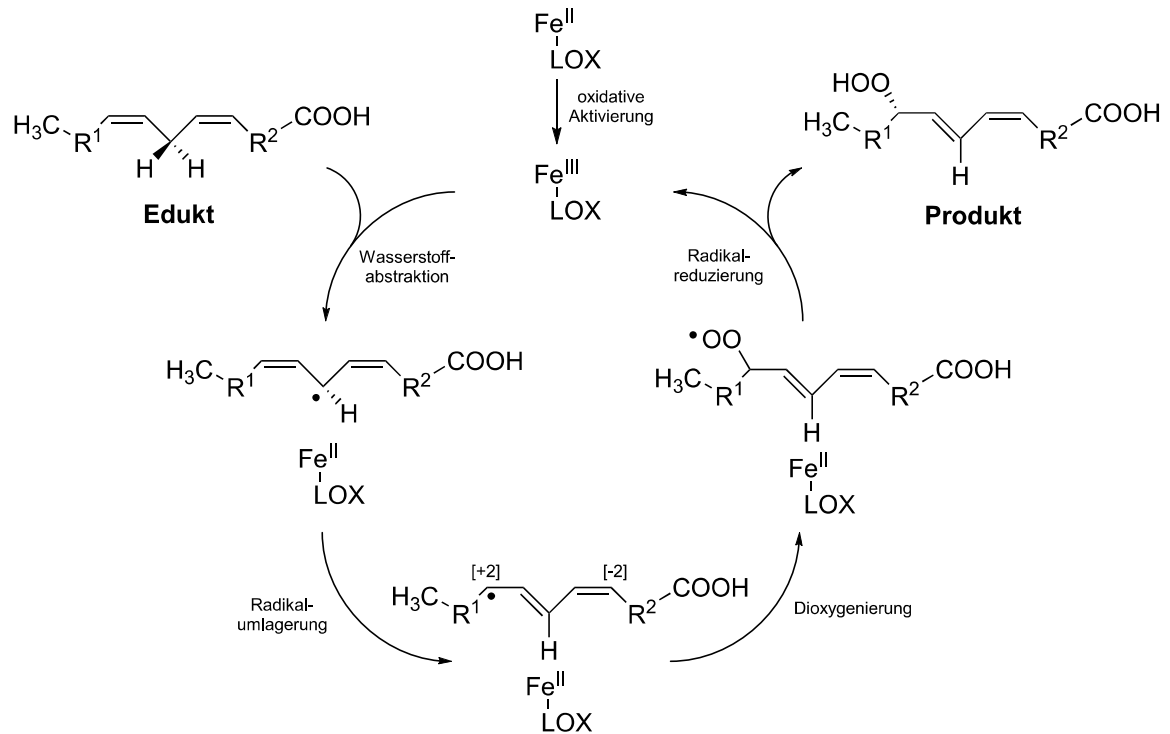


Abbildung 22: Enzymatischer Katalysezyklus der Lipoxygenasen.

Schaden verursachen würden und Lipidperoxidation ausschließlich nicht-enzymatisch ablaufen würden.^[108,109] 1974 und 1975 wurden LO jedoch auch in menschlichen Blutplättchen^[110,111] und auch in unreifen roten Blutkörperchen von Kaninchen^[112] entdeckt. Bei letztgenannten baut eine LO die Innenmembran der Mitochondrien in unreifen Blutkörperchen ab und das reife Blutkörperchen stellt sich komplett auf eine glykolytische Adenosintriphosphat-abhängige Energieversorgung um.

Pflanzen haben mit Hilfe von LO vielfältige Verteidigungsstrategien entwickelt. So bilden zum Beispiel Moose nach Verletzung der Zelle giftige Oxylipine, welche sie vor Fraßfeinden schützen^[113] oder Diatomeen bilden mehrfach ungesättigte Aldehyde, welche die Nachfolgenergeneration ihrer Fressfeinde^[114], die Copepoden, schädigen. In diesen Fällen wird durch die Zerstörung der Zellwände, eine LO mit den Zellwandlipiden in Verbindung gebracht und es kommt zu vielfältigen enzymatischen Umwandlungen. Des Weiteren sind weitere mannigfaltige LO-abhängige Verteidigungs- und auch Signalmechanismen bekannt und der interessierte Leser sei auf die angegebenen Literatur hingewiesen.^[115-118]

Im menschlichen Organismus sind verschiedene LO zu finden, welche Arachidonsäure (AA) an Position 5, 12 und 15 oxygenieren. Fehlregulation dieser Enzyme können

unter anderen Krankheiten wie Arteriosklerose^[119], Alzheimer^[120] und Asthma^[121] auslösen. Ebenfalls sind inflammatorische^[122], karzinogene^[123], allergische und sogar apoptotische^[124] Auswirkungen auf Organismen bzw. Zellen durch Veränderungen der LO-Aktivität bekannt.

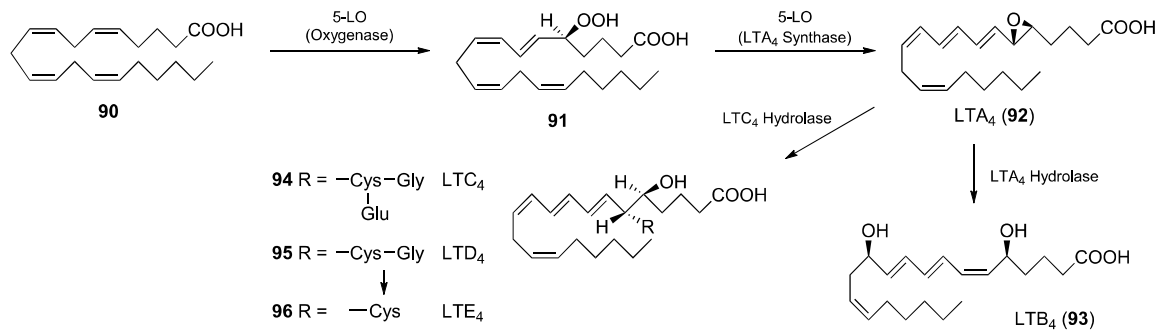


Abbildung 23: Enzymatische Bildung der Leukotriene **92 - 96**. Die Epoxydierung von **90** geschieht in zwei Teilschritten, wobei beide durch 5-LOX katalysiert werden. Durch weitere enzymatische Aktivität entstehen die daraus aufgebauten Leukotriene (**92 - 96**)

In direkten Zusammenhang mit vielen der genannten Krankheitsbildern wurden dabei die Leukotriene (LT) gebracht.^[125,126] Diese vielfach ungesättigten Metabolite entspringen der Oxygenierung von Arachidonsäure (**90**) mittels 5-LOX (siehe Abb. 23). Nach Einführung des Hydroperoxides (**91**) und nachfolgender Umwandlung zu einem Epoxid (**92**), ebenfalls katalysiert durch 5-LOX, entsteht Leukotrien-A₄ (LTA₄), welches durch anschließende enzymatische Umwandlungen in andere LTs überführt werden kann (**93 - 96**). Daher ist die 5-LOX stark in den Fokus der Wissenschaft gerückt und es wird intensiv nach möglichen Inhibitoren gesucht. So wurde eine fast unüberschaubare Zahl an 5-LOX Inhibitoren entwickelt, um Ansätze zu finden diese weit verbreiteten Krankheiten zu behandeln.^[127,128]

1.4.1.2 Inhibitoren der Lipoxygenase

Eine Einteilung der Inhibitoren kann nach ihren Wirkmechanismen, die Aktivität der LO einzuschränken, vorgenommen werden. Dabei sind bis jetzt vier verschiedene bekannt:

1. **Redoxaktive** Dies sind reduzierende und hydrophobe Verbindungen, welche häufig pflanzlichen Ursprungs sind. Sie unterdrücken die oxidative Aktivierung

des zentralen Eisenatoms, wobei das Eisen in der katalytisch inaktiven Oxidationsstufe +II verbleibt.

2. **Eisenchelatisierende** Diese Art der Inhibitoren entfernen das zentrale Eisenatom durch Bildung eines starken Chelatkomplexes. Die häufigsten Strukturmerkmale dieser Art sind Hydroxamate und Hydroxyharnstoffderivate.
3. **Nichtredoxaktive** Diese ahmen die Substrate der LO nach (z. B. AA oder deren Hydroperoxid **91** im Falle der 5-LO) und konkurrieren um die Bindung am Enzym. Allerdings ist nicht vollständig geklärt, ob durch diese Inhibitoren der Substrattunnel blockiert wird oder ob allosterische Gründe dafür verantwortlich sind.
4. **Andere** Dies sind LO-Inhibitoren, welche sich nicht in die zuvor genannten Kategorien eingliedern lassen. Meist besitzen diese Inhibitoren einen diffusen oder gemischten Inhibitionsmechanismus oder einen noch nicht bestimmten Mechanismus. Darunter fallen auch nicht direkte inhibitorische Effekte einiger Substanzen. So manipulieren einige zum Beispiel das 5-LO-aktivierende-Protein (FLAP).^[129]

Aus der Vielzahl an Inhibitoren für 5-LO wird jedoch zurzeit nur Zileuton (**97**) als Medikament eingesetzt. Andere Medikamente befinden sich dennoch schon in Phase II der klinischen Erprobung oder haben diese schon bestanden (Stand: 2014).^[128] Das eisenchelatisierende **97**, ein Hydroxyharnstoffderivat, welches schon erfolgreich gegen Asthma eingesetzt wird zeigt IC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich (ca. 500 nM). Orale Aufnahmen von 0,5 mg/kg Körpergewicht bei Hunden zeigten eine Verringerung der LT-Bildung im Blut.^[130] Dennoch zeigt **97** Nebenwirkungen wie Leberschädigungen durch irreversible Inhibierung der Glutathion S-Transferase^[131] und wird im Körper relativ rasch abgebaut, sodass eine häufige Medikation notwendig ist (Halbwertszeit ca. 12 h^[132]). Aufgrund der Notwendigkeit neuer und effektiver 5-LO Inhibitoren und der erst kürzlich aufgeklärten Struktur der 5-LO^[133] wurden computergestützte Berechnungen angestellt, um neue Inhibitoren zu ermitteln. Die dabei gefundenen Substanzen wurden auf synthetischem Wege hergestellt und zeigten in Inkubations-

Xanthinoxidase Hypoxanthin (**99**) in Xanthin (**100**) und schließlich in Harnsäure (**101**) in überführen.

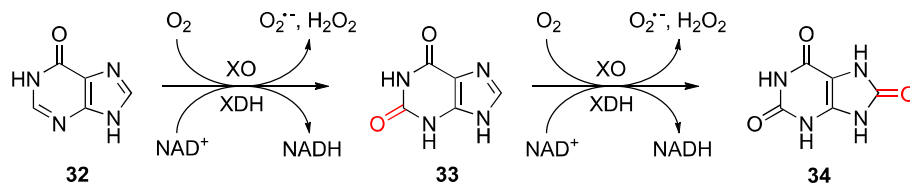


Abbildung 25: Enzymatische Oxidation von Hypoxanthin (**99**) zu Xanthin (**100**) und Harnsäure (**101**) durch Xanthinoxidase. Dabei unterscheiden sich Xanthinoxidoreduktase (XO) und Xanthindehydrogenase (XDH) im Oxidationsmittel. Rot markiert sind die bei der Oxidation eingeführten Sauerstoffatome.

Die nativ vorkommende Form der Xanthinoxidasen ist XDH, welche durch Oxidation der Thiolgruppen reversibel oder durch Erhitzen auf über 37 °C oder Proteolyse irreversibel in die sauerstoffabhängige XO überführt wird.^[144] XDH benötigt für die Oxidation von **99** bzw. **100** den Cofaktor NAD^+ und es entsteht das entsprechende Oxidationsprodukt (**100** oder **101**) und NADH ; wohingegen XO ein Mol Sauerstoff als Oxidationsmittel einsetzt, welches zu Superoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert wird. Der in **99** bzw. **100** eingeführte Sauerstoff kommt dabei nicht aus dem reduzierten O_2 -Molekül, da Oxidation des Substrates und Reduktion des O_2 bzw. NAD^+ Moleküles räumlich von einander getrennt stattfinden. Das eingeführte Sauerstoffatom stammt von einem am Molybdän koordinierten Hydroxysauerstoff, welches durch Koordination eines umgebenden Wassermolekül gebildet wurde (gleiches gilt auch für XDH).^[145]

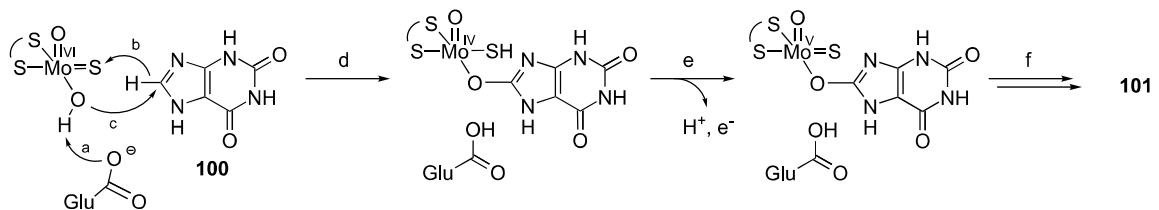


Abbildung 26: Katalytischer Mechanismus bei der Oxidation von Xanthin (**100**) zu Harnsäure (**101**). Durch Abstraktion eines Protons (a) und Hydridtransfer auf den Schwefel des Molybdänzentrums (b), kann der Hydroxysauerstoff an **100** angreifen (c) und es entsteht ein Komplex der Harnsäure mit dem Enzym (d). Nach Abgabe eines Protons und eines Elektrons (e) wird das Oxidationsprodukt in das Umgebende Medium abgegeben und dort protoniert (f), wobei das Oxidationsprodukt **101** entsteht. Durch weitere Abgabe eines Elektrons des Molybdän an das FAD steht das Enzym für die nächste Oxidation zur Verfügung (nicht abgebildet).

Xanthinoxidasen bestehen aus einem Homodimer mit einer Masse von ca 290 kDa. Jede Untereinheit besteht aus einer Molybdopterin-Domäne von ca. 85 kDa, die das Xanthin-umsetzende Zentrum darstellt, zwei Eisenschwefelclustern (2Fe-2S, ca. 20 kDa) zur Elektronenübertragung, sowie einer flavinhaltigen (gebunden als Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), ca. 40 kDa) Domäne, an welcher die Reduktion des NAD⁺ bzw. Sauerstoffmoleküls stattfindet. Durch intensive Untersuchungen der Kristallstruktur^[146-149] und durch Mutation der für den katalytischen Zyklus notwendigen Glutaminsäure (siehe Abb. 26) konnte der Reaktionsmechanismus der Xanthinoxidasen bestimmt werden.^[150] Durch die Abstraktion eines Protons von der Hydroxygruppe des Molybdäns durch Glutaminsäure, kann der Sauerstoff nukleophil am C-8 Kohlenstoff des Xanthins (**100**) angreifen (siehe Abb. 26 erster Schritt). Dabei kommt es zu einem Hydridtransfer auf die Mo=S Einheit, wobei es formal zu einer Reduktion des Molybdänzentrums kommt und eine Thiolgruppe gebildet wird. Daraufhin wird ein Proton freigegeben und ein Elektron an die FAD-Domäne weitergeleitet. Anschließend verlässt das Produkt die aktive Tasche als formales Alkoholat und nach Protonierung durch das umgebende Medium ergibt sich das Endprodukt **101**.

Eine Überfunktion der Xanthinoxidasen bedingt erhöhte Harnsäurekonzentrationen in allen Regionen des Organismus. Dadurch kristallisiert **101** als Mononatriumsalz aus, was zu Nierensteinen führen kann^[151], aber auch Gicht auslöst^[152]. Das Krankheitsbild der Gicht ist das Anschwellen mancher Gelenke und damit einhergehende Schmerzen und Einschränkung der Beweglichkeit betroffener Gelenke. Dies geschieht häufig in den äußeren Extremitäten, vor allem dem großen Zeh, da die dort kühleren Temperaturen die Kristallisation unterstützen. Des Weiteren kann das entstehende Natriumurat (Natriumsalz von **101**) Ischämien (Verengungen der Blutgefäße) auslösen und so zu Infarkten und Nekrosen führen. Weiter steht Hyperurikämie (Erhöhung des Harnsäurespiegels im Blut) im Verdacht Bluthochdruck, einige Arten von Krebs, Diabetes und Fettleibigkeit auszulösen.^[153]

1.4.2.2 Inhibitoren der Xanthinoxidasen

Der bekannteste Xanthinoxidaseinhibitor Oxipurinol (**103**) ahmt das Substrat **100** nach und bildet, durch den Austausch eines Azastickstoffs an Stelle des Kohlenstoffes

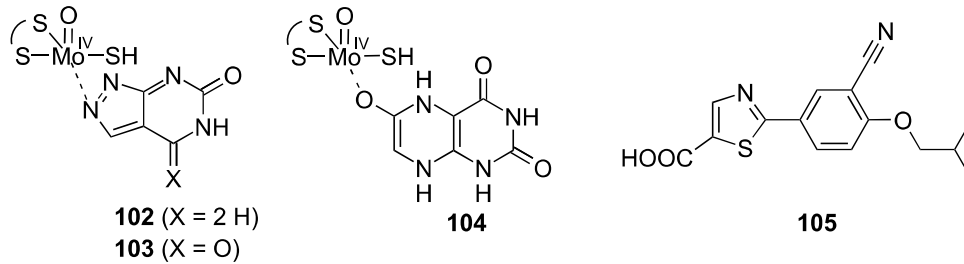


Abbildung 27: Prominenteste Inhibitoren für Xanthinoxidasen. Jeweils Oxipurinol (**103**), bzw dessen reduzierte Form Allopurinol (**102**) und Lumazin (**104**) ahmen das Substrat der XO **100** nach, bilden aber starke koordinative Bindungen mit Molybdän (gestrichelte Linien), die durch das Enzym schwer spaltbar sind. Der Inhibitionsmechanismus des Febuxostat (**105**) beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-waals-Wechselwirkungen mit Aminosäureresten in der aktiven Tasche (nicht abgebildet).

C-8, eine starke koordinative Bindung zum Molybdänzentrum aus.^[154,155] Sein IC_{50} -Wert liegt im Bereich von ca. $30 \mu\text{M}$ *in vitro*. Die medikamentöse Darreichungsform ist jedoch dessen reduzierte Form Allopurinol (**102**). Durch Oxidation von **102** zu **103** wird das Molybdän im aktiven Zentrum reduziert. Erst die reduzierte Form des Enzyms wird durch **103** koordinativ blockiert und somit inhibiert.^[149,156,157] Allerdings wurde von Spector und Johns gezeigt, dass durch die Zugabe von **100** zum durch **103** inhibierten Enzym die Aktivität wiederhergestellt werden kann^[158] und **103** in seiner Inhibierstärke abgeschwächt wird, wenn **100** anwesend ist.^[159] Ein ähnliches Wirkungsprinzip hat der Inhibitor Lumazin (**104**). Auch dieser wird als reduzierte Form eingesetzt und bildet im Kontrast zu **103** eine koordinative Bindung zum reduzierten Molybdän über einen Enolsauerstoff aus, wodurch ein Charge-Transfer-Komplex gebildet wird.^[156,160]

Ein weiterer Xanthinoxidaseinhibitor ist Febuxostat (**105**), welcher keinerlei Ähnlichkeiten mit **103** aufweist. Mechanistisch gesehen blockiert **105** dieser ebenfalls die aktive Tasche der Xanthinoxidasen. So zeigten Computersimulationen von Kikuchi *et al.*, dass im Kontrast zu **103** keine Wechselwirkung zum Molybdänzentrum besteht.^[161] Vielmehr wird **105** durch Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte mit Aminosäureresten in der aktiven Tasche gehalten. Durch diesen Umstand kann **105** durch Abwandlung der funktionellen Gruppen auf bestimmte Xanthinoxidasen eingestellt werden, ohne dabei als breiter Inhibitor, wie **103**, für alle Xanthinoxidasen zu wirken. Darüber hinaus ist der IC_{50} -Wert dieses Inhibitors mit ca. 20 nM um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als Allopurinol (**103**). Dadurch löst es **102** immer weiter als Medikament gegen Hyperurikämie (Überfunktion der XO) ab.^[162]

Des Weiteren wurden in den letzten Jahren weitere Substanzen als Inhibitoren für diese Enzymklasse identifiziert. Xanthinoxidasen wurden in verschiedenen Studien durch tryptophanhaltigen Dipeptide^[163], Tryptophan^[163], Cytokinine^[164], Flavinoide^[165,166] und vieler weitere Substanzen^[167-172] inhibiert. Ferner wurden auch Verbindungen identifiziert, welche die FAD-Domäne der Xanthinoxidasen modifizieren und so das Enzym inhibieren.^[173]

Neben all diesen zumeist heterozyklischen und auch antioxidativ wirkenden Substanzen^[169], wurde im Jahre 2012 von Cengiz *et al.* Caulerpenin (**13**) auf seine inhibitorischen Eigenschaften auf Xanthinoxidase untersucht.^[7] **13** stellte sich als durchaus potenter Inhibitor heraus und konnte die Aktivität von XO um 50 % bei 26,9 μM verringern. Dennoch war es verglichen mit dem etablierten Inhibitor und Medikament gegen Hyperurikämie, welches IC_{50} Werte im einstelligen Mikromolaren Bereich aufweist, schlechter. Unterschiede zeigten sich aber in der Art der Inhibierung. **13** inhibiert Xanthinoxidase nicht-kompetitiv und irreversibel, wohingegen Allopurinol aufgrund seiner koordinativen Bindungsart reversibel inhibiert.^[155] Somit scheint das BEA **13** sehr interessante Eigenschaften als strukturell neuartiger Inhibitor für Xanthinoxidase darzustellen und könnte durch weitere Abwandlungen zum sehr potenten Inhibitor für Xanthinoxidase entwickelt werden.

2 Motivation und Zielstellung

Teil I

Das Sesquiterpen Caulerpenin (**13**) ist ein BEA mit sekundärer Acetatgruppe und einem ungesättigten Dienin-Terminus. **13** ist ein Hauptsekundärmetabolit von *Caulerpa* spp., in denen es unter anderem die Ausbildung des Wundverschlusses mediiert.^[9] Bei Verletzung der Grünalge wird **13** durch Esterasenaktivität in einen proteinreaktiven 1,4-Dialdehyd mit Michael-Akzeptor-System, das Oxytoxin 2 (**14**), umgewandelt. **14** vernetzt die in der Grünalge enthaltenen Proteine und das resultierende Proteinpolymer verschließt provisorisch die Wunde. Aus diesen mechanistischen Betrachtungen heraus hat Weißflog durch Synthese eines fluoreszenten Caulerpeninanalogs, welches das proteinreaktive Bisenolacetatsystem beinhaltet, eine esterasesensitive Sonde (**18**) entwickelt.^[10] Mit Hilfe von **18** konnte er selektiv Esterasen fluoreszent markieren, ohne dass es zur Komarkierung anderer, nicht enzymatisch aktiver Proteine kam. Allerdings war es nicht möglich mit **18** Lipasen zu markieren, obwohl diese den Esterasen sehr ähnlich sind.

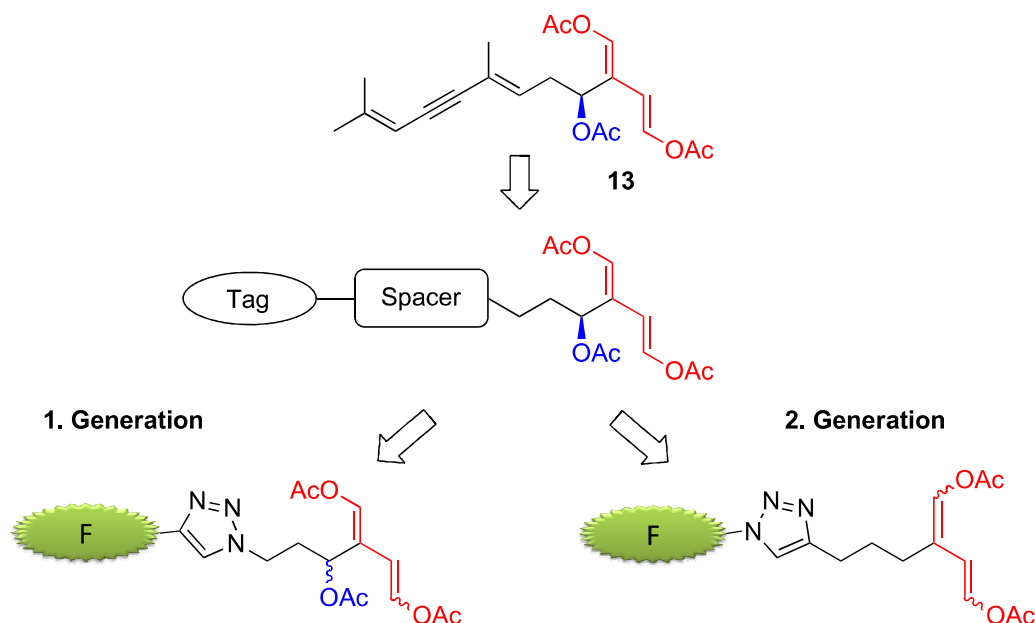


Abbildung 28: Formale Betrachtung zum Aufbau der koppelbaren BEAs nach dem ABP-Prinzip ausgehend von Caulerpenin (**13**). Die erste Generation der BEA nach Weißflog besitzt noch eine sekundäre Acetatgruppe. Zur Vereinfachung der Synthese und zur möglichen Unterbindung von Quervernetzungsreaktionen sollte diese in der zweiten Generation der BEAs nicht enthalten sein.

Diese interessanten Eigenschaften des fluoreszierenden BEA **18** sollen in dieser Arbeit erweitert werden, wobei folgende Punkte untersucht werden sollen:

- Weiterentwicklung der BEAs der ersten Generation durch Synthese eines BEAs ohne sekundäre Acetatgruppe. Das so erhaltene BEA der zweiten Generation soll ebenfalls wie **18** durch Huisgen dipolare Zykoaddition erweiterbar sein (Ankergruppe Abb. 28). Dadurch ist es möglich flexibel das BEA der zweiten Generation mit verschiedenen Tags (Markern) an die Aufgabenstellung (z. B. Fluoreszenz, Isotopenmarkierung für Massenspektrometrie) anzupassen.
- Erweiterung der Markierung auf Lipasen: Durch den Austausch der Acetatreste durch längerkettige Capronatreste und Stearatreste soll untersucht werden, ob statt Esterasen Lipasen markiert werden können.
- Robustheit der Methode: Die Bisenolester sollen in komplizierten biologischen Matrizen eingesetzt werden, um darin enthaltene Esterasen fluoreszent zu markieren
- Aufklärung des Markierungsmechanismus: Durch Proteinsequenzierungstechniken soll die Art der kovalenten Bindung der BEAs mit Esterasen aufgeschlüsselt werden.

Teil II

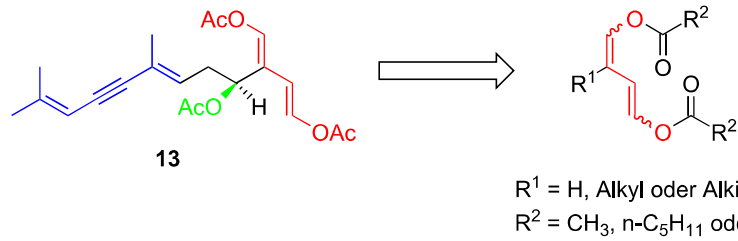


Abbildung 29: Vereinfachung des Caulerpenins (**13**) zu Bisenolestern. Dadurch kann das Pharmakophor von **13** weiter eingegrenzt werden und die Notwendigkeit der sekundären Acetatgruppe (grün) und des Dieninterminus (blau) überprüft werden

Ninomiya^[5,6] und Cengiz^[4,7] konnten zeigen, dass Caulerpenin hemmende Eigenschaften gegen Lipoxygenasen und Xanthinoxidasen aufweist. Um zu überprüfen, welcher Molekülteil von **13** für die Inhibition der Enzyme verantwortlich ist und um Struktur-Wirkmechanismen aufzustellen sowie das Pharmakophor weiter einzugrenzen, sollen verschiedene Bisenolester unterschiedlicher Seitenketten (R_1) und Kettenlänge (R_2) auf die Inhibitorischen Eigenschaften untersucht werden. Folgende Aspekte sollen dabei durchgeführt bzw. näher beleuchtet werden.

- Synthese von BEAs mit gesättigten Seitenketten verschiedener Länge (Methyl, *n*-Pentyl).
- Inhibitionsexperimente der in dieser Arbeit synthetisierten Bisenolester mit menschlichen Lipoxygenasen und Xanthinoxidase aus Kuhmilch im Vergleich zum bekannten Inhibitor **13**
- Ermittlung der Inhibitionskinetik

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Syntheseplanung

Jerrit Weißflog^[10] adaptierte für die Synthese von Bisenolacetaten (BEA) der ersten Generation die Totalsynthese des Caulerpenins nach Commeiras *et al.*^[174]. Als Synthone für das Bisenolacetat mit sekundärer Acetatgruppe wurden von Weißflog But-2-in-1,4-diol (**42**) und Acrolein gewählt. Hierbei wird die 2-Substitution des Butadiensystems durch die Kopplung des Acroleins mit einem lithiierten Vinylsystem, welches aus **23** hergestellt wurde, erreicht. Dabei wird stets ein sekundärer Alkohol gebildet, der später in die sekundäre Acetatgruppe überführt wird. Da diese Funktionalisierung in den für diese Studie gewünschten Bisenolestern nicht enthalten sein sollten, mussten neue Wege zu den gewünschten Bisenolestern der zweiten Generation gefunden werden.

Zur Synthese der an Position 2 alkylierten Bisenolester **36** sollen die fünf, in Abbildung 30 dargestellten, Strategien getestet werden. Alle abgebildeten Routen bauen das Gerüst der Bisenolester durch Kopplung einer Seitenkette (R) mit einem C₄-Baustein (rot) auf, wobei in Syntheseroute B diese Kopplung in der ersten Stufe und bei A in der letzten Stufe geschieht. Synthesestrategie A zielt auf die Synthese von zentralen halogenierten Bisenolestern **34** hin, welche in die alkylierten Bisenolester überführt werden können. Zum Aufbau der Verbindungen **34** sollen drei Strategien (Abb. 30 A₁ - A₃) eruiert werden. Synthesestrategie B stellt eine Adaption nach einer von mir vorgestellten Synthese eines BEA^[175] dar (Abb. 30 B₂), welche jedoch weiteres Potential zur Optimierung bietet (Abb. 30 B₁).

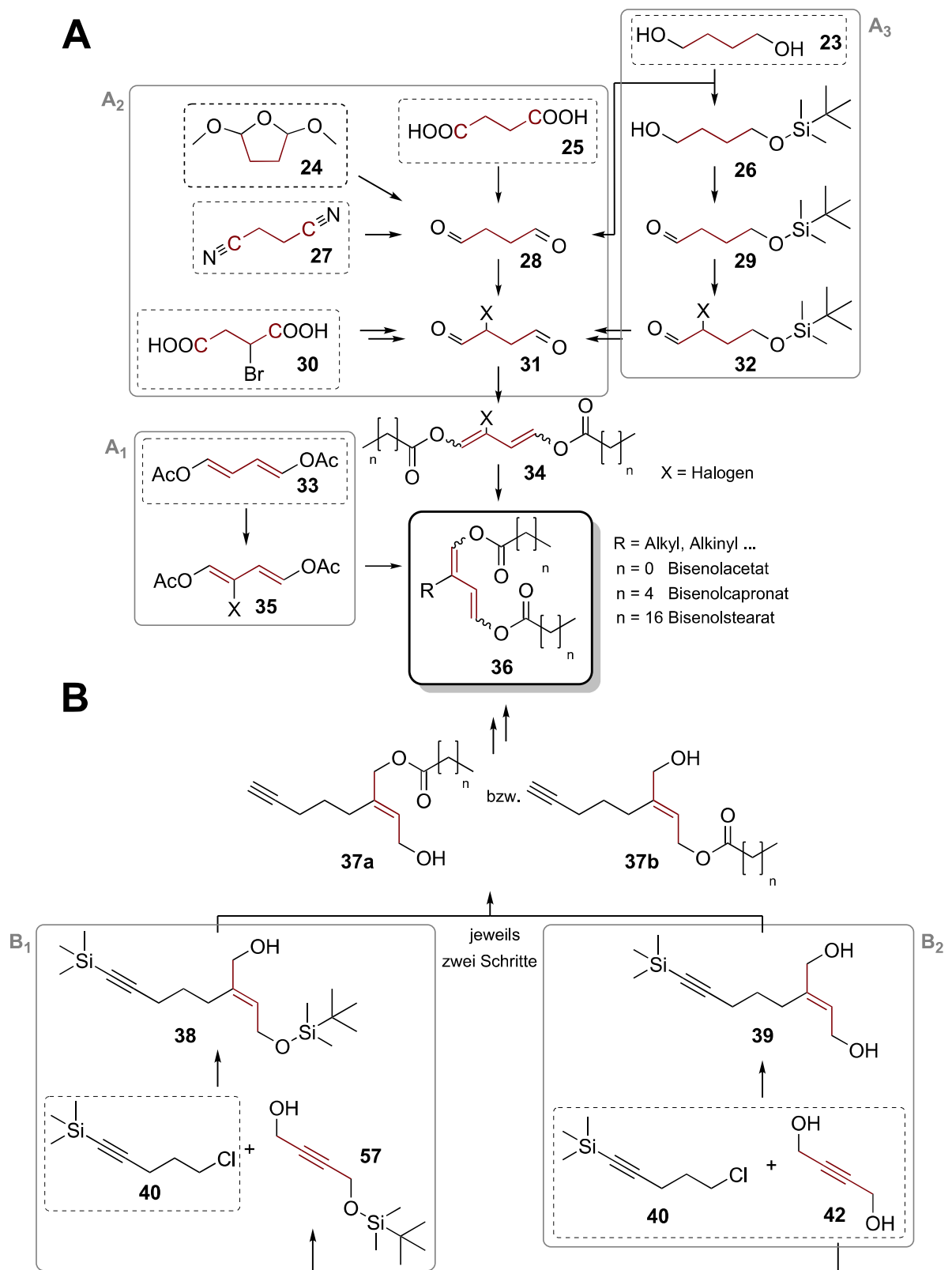


Abbildung 30: Übersichtsschema der in dieser Arbeit geplanten zwei Syntheserouten zur Darstellung von Bisolestern verschiedener Säurekettenlängen (n) und Alkylresten (R). Die gestrichelt eingerahmten Verbindungen sind im Chemikalienhandel verfügbar und können als Startpunkte für die Syntheserouten benutzt werden.

3.1.1 Synthese von halogenierten Bisenolestern (34) und anschließende Kopplung (Weg A)

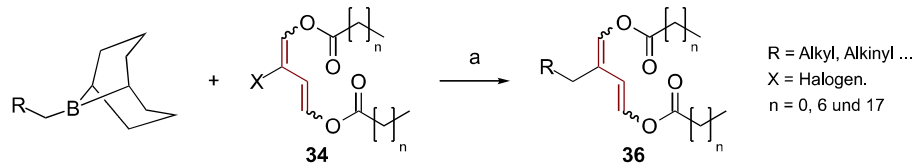


Abbildung 31: Synthese der mannigfaltigen Bisenolester **36** durch Kopplung (a) eines Organoboranes (z. B. 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan) mit dem halogenierten Bisenolestern **34**

Zentrales Element dieser Syntheseroute sind die halogenierten Bisenolester **34**. Durch Übergangsmetallkatalyse wäre es möglich verschiedenste Reste (R) in das Endprodukt **36** einzuführen (Abb. 31). Vorteil dieser Route ist zudem, dass weniger Stufen notwendig sind und die übergangsmetallkatalysierte Kopplung flexibel vielfältige Reste R in die Bisenolester einführen können. Vor allem für den Aufbau einer breiten Substanzbibliothek ist dies sehr interessant, um Struktur-Wirkungs-Mechanismen in Hinblick auf die Inhibierungsexperimente zu untersuchen. Eine von mir vorgestellte Synthese zu einem koppelbaren Bisenolacetat (BEA) führt den Rest R hingegen über eine Carbomagnesierung der Dreifachbindung von But-2-in-1,4-diol (**42**) ein. Das Verwenden von Organomagnesiumreagenzien in dieser Carbomagnesierung schränkt die Auswahl des Restes stark ein (z. B. keine Elektrophilen wie Ester Aldehyde, Ketone, keine Azide (N₃) oder Halogene, keine terminalen Dreifachbindungen uvm.). Zur Synthese der halogenierten Bisenolester sollten drei verschiedene Synthesestrategien (Abb. 30 A₁ - A₃) untersucht werden.

3.1.1.1 Halogensubstitution an 1,4-Diacetoxybutadien (A₁)

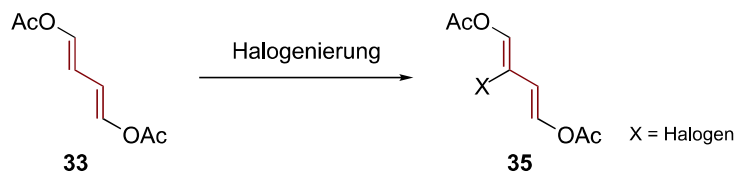


Abbildung 32: Halogenierung des *E,E*-1,4-Diacetoxybutadiens (**33**). Das Produkt **35** dieser Reaktion kann wie in Abbildung 31 gekoppelt werden.

Im Chemikalienhandel ist eine, den BEA sehr ähnliche und zudem Konfigurationsreine, Verbindung *E,E*-1,4-Diacetoxybutadien (**33**) verfügbar, die als Synthone eingesetzt

werden kann. Durch Halogensubstitution an diesem fertigen Bisenoacetat wäre ebenfalls eine Substanz vom Typ **34** zugänglich, die durch Übergangsmetallkatalysierte Koppelung (Abb. 31, $n = 0$) in ein 2-substituierten Bisenoester überführbar wäre. Aufgrund der Anwesenheit von Estergruppen in **33** können jedoch keine starken Lewis-Säuren wie zum Beispiel AlCl_3 eingesetzt werden, die eine elektrophile Halogensubstitution unterstützen würden.

3.1.1.2 Synthese von halogenierten Bisenoestern (**34**) über Succinaldehyd (**A₂**)

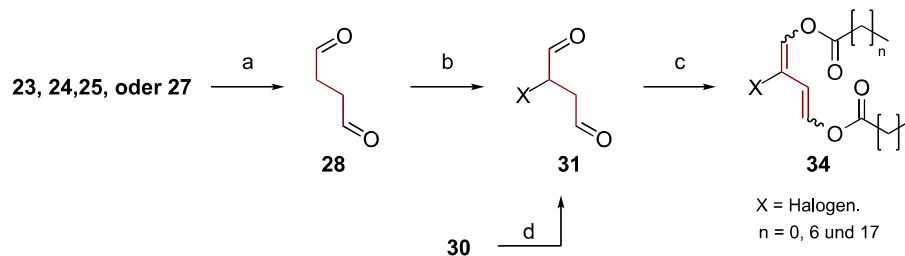


Abbildung 33: Synthese der halogenierten Bisenoester **34**. Durch Oxidation von **23**, Ringöffnung von **24** bzw. Reduktion von **25** oder **27** kann der Dialdehyd **28** dargestellt werden (a), welcher daraufhin halogeniert werden könnte (b). Anschließend kann dieser in das Zwischenprodukt **34** durch Enolacetylierung beider Aldehydgruppen (c) überführt werden. Reaktionsweg d beschreibt eine reduktive Überführung von Brombernsteinsäure (**30**) in den halogenierten Dialdehyd **31**.

Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, soll ausgehend von den Synthons Butan-1,4-diol (**23**), 1,4-Dimethoxytetrahydrofuran (**24**), Bernsteinsäure (**25**) bzw. Succinonitril (**27**) der Succinaldehyd (**28**) gebildet werden. **28** ist jedoch schwer zu handhaben^[176], leicht flüchtig und außerdem nicht käuflich erwerbbar, sodass die genannten Vorstufen als Ausgangsmaterial dienen sollen dieses *in situ* herzustellen. Da Aldehyde mit verschiedenen Halogenierungsreagenzien (z. B. *N*-Iodosuccinimid bzw. Iod in Kombination mit Quecksilberchlorid) halogeniert werden können, soll untersucht werden, ob eine einfache Halogenierung (Abb. 33 Rkt. b) von **28** durch stöchiometrischen Einsatz der Halogenierungssubstanz, erreicht werden kann. Der so erhaltene halogenhaltige Dialdehyd **31** könnte in ein halogeniertes Bisenoestersystem durch Enolacetylierung (Abb. 33 Rkt. c) umgewandelt werden.

Darüber hinaus gibt es eine weitere Vorstufe für das halogenierte Succinaldehyd **31**. Durch Reduktion (Abb. 33 Rkt. d) von Brombernsteinsäure (**30**) und anschließende

Enolacylierung (Abb. 33 Rkt. c) könnten ebenfalls halogenierte Bisenolester aufgebaut werden.

3.1.1.3 Synthese von **34** über monosilyliertes Butan-1,4-diol (**A₃**)

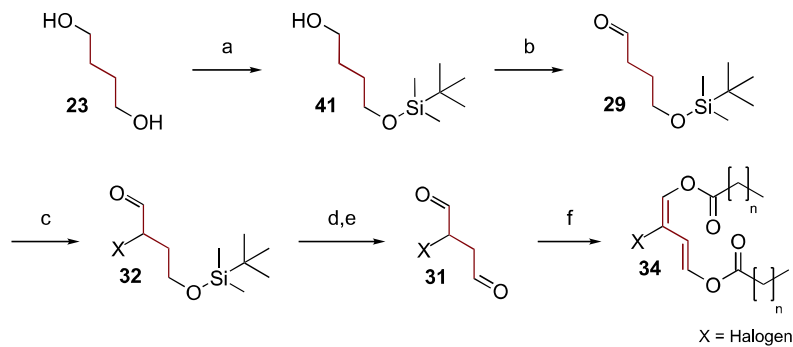


Abbildung 34: Durch selektive Monosilylierung (a) kann die Verbindung **23** in den einfach geschützten Dialkohol **41** überführt werden. Nach Oxidation (b) der verbleibenden Hydroxyfunktion kann der entstehende Aldehyd **29** in α -Stellung halogeniert (c) werden. Durch Silyletherspaltung (d) und abermalige Oxidation (e) könnte der Dialdehyd **31** dargestellt werden, welcher durch Enolacylierung (f) in **34** überführbar wäre.

Eine dritte Möglichkeit des Aufbaus halogenierter Bisenolester ist es, die beiden Hydroxydfunktionen von **23** in verschiedenen Synthesestufen zu oxidieren (Abb. 34). Vorteil dieser Route wäre unter anderem, dass kein Dialdehyd halogeniert wird und so grundlegend ein zweifacher Halogeneinbau unterbunden werden kann. Nachteil dieser Route ist aber die Erhöhung der Stufenanzahl. In dieser Syntheseroute wird ausgenutzt, dass kleine bifunktionelle Alkohole in guten Ausbeuten Monosilyliert werden können (Abb. 34 Rkt. a). Anschließend wird die verbleibende Alkoholgruppe an **41** oxidiert (Abb. 34 Rkt. b) und der erhaltene Monoaldehyd **29** kann mittels *N*-Iodosuccinimid oder anderen Reagenzien in α -Stellung halogeniert (Abb. 34 Rkt. c) werden. Vorteil des Iodierungsreagenzes ist es, dass Tertiärbutyldimethylsilylschutzgruppen durch dieses gespalten werden und somit während des Halogenierungsschrittes (Abb. 34 Rkt. c) die Entschützung (Abb. 34 Rkt. d) parallel laufen würde, wodurch es zur Einsparung eines Syntheseschrittes kommen würde. Danach könnte die entschützte Alkoholgruppe oxidiert werden (Abb. 37 Rkt. e) und ebenfalls ein 1,4-Dialdehyd erhalten werden, der durch Enolacylierung (Abb. 37 Rkt. f) in eine halogenierte Bisenolesterverbindung überführt werden kann.

3.1.2 Synthese mittels Carbomagnesierung (B)

3.1.2.1 Carbomagnesierung von But-2-in-1,4-diol (B₂)

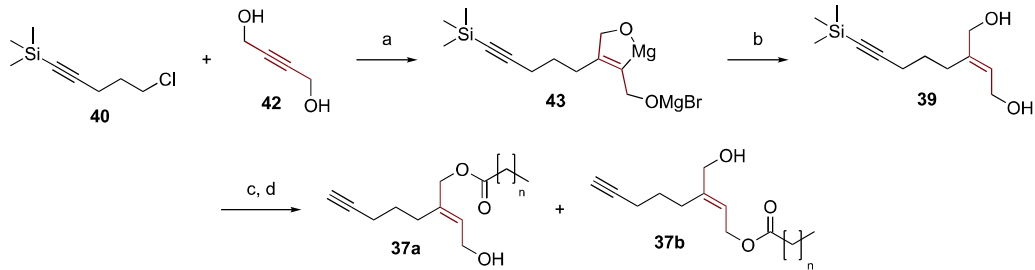


Abbildung 35: Synthese des Grundgerüsts der koppelbaren Bisenolester nach Kocienski *et al.*^[177]. Der intermediär gebildete Metallazyklus **43** bedingt die *Trans*-Konfiguration des Syntheseproduktes **39**. Anschließend soll lipasenmediert eine der Hydroxyfunktionen verestert werden (c) und die Trimethylsilylschutzgruppe abgespalten werden (d).

Ein weiterer, schon bekannter Ansatz, wäre die Synthese in Analogie zu einer von mir veröffentlichten Studie durchzuführen, wobei statt der verwendeten Acetylierungsreagenzien Vinylacetat und Essigsäureanhydrid in der fünfstufigen Synthese die entsprechenden Fettsäurederivate eingesetzt werden könnten.^[175] Zentraler Schritt bei dieser Syntheseroute ist die Carbomagnesierung von **42**. Durch Deprotonierung der Hydroxyfunktionen von **42** und anschließende Reaktion dieses Salzes mit der Grignardverbindung von **40** kann das Grundgerüst **39** aufgebaut werden (Abb. 35 Rkt. a und b). Die dabei eingesetzten Organomagnesiumreagenzien schränken die eingeführten Seitenketten stark ein. Die terminale Dreifachbindung in **40** muss dabei eine Trimethylsilylschutzgruppe (TMS) aufweisen, da das saure Proton mit der Grignardverbindung von **40** reagieren würde. Daneben kann nicht, wie bei der Synthese des BEAs **18** von Weißflog ein Azid eingesetzt werden, da Azide ebenfalls mit Organomagnesiumreagenzien zu Aminen reagieren.^[178]

Der Dialkohol **39** entsteht dabei ausschließlich in der *Trans*-Konfiguration, da während der Synthese ein Metallazyklus **43** gebildet wird (Abb. 35 Rkt. a). Erst nach wässriger Aufarbeitung (Abb. 35 Rkt. b) entsteht der Dialkohol **39**. Daran anschließend könnte lipasenmediert eine Alkoholfunktion von **39** in einen Ester einer Fettsäure überführt werden (Abb. 35 Rkt. c) und nach anschließender Entfernung der TMS-Schutzgruppe (Abb. 35 Rkt. d) könnten die Monoester **37a** und **37b** erhalten werden. Für Reaktionsschritt c in Abbildung 35 sind darüber hinaus Acylquellen für die lipasenkatalysierte

Monoveresterung notwendig. Da diese nicht alle kommerziell erhältlich sind, sollen diese nach einer Synthese nach Henry durch palladiumkatalysierte Transesterifizierung der benötigten Carboxylsäure (**45**) in Anwesenheit von Vinylacetat (**44**) hergestellt werden (Abb. 36).^[179] In dieser Gleichgewichtsreaktion kann durch Überschuss an Vinylacetat (**44**), z. B. durch Einsatz als Lösungsmittel, die Reaktion auf die Seite der Reaktionsprodukte **46** und **47** verschoben werden.

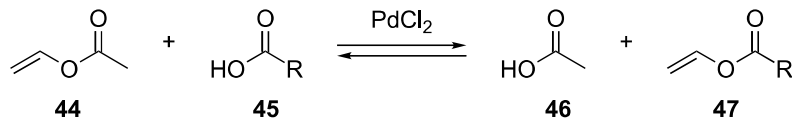


Abbildung 36: Herstellung von Vinylestern (**47**) durch palladiumkatalysierte Transesterifizierung von Vinylacetat (**44**) und einer beliebigen Carbonsäure (**45**).

Um eine erfolgreiche Synthese der Bisenolester durchzuführen, ist es wichtig, die Ester in unterschiedlichen Syntheseschritten einzuführen. Eine Abkürzung der Synthese zu der Substanz **50**, wie in Reaktionsschritt d (Abb. 37) dargestellt, würde zwar beide Ester beinhalten, allerdings ist es schwierig in **50** das Butadiensystem aufzubauen und **49** zu erhalten (Abb. 37 Rkt e). Rebrovic und Koser haben hierzu eine interessante Synthese vorgestellt, bei der eine Doppelbindung mittels Phenylidotosylaten zweifach tosyliert werden kann. Durch anschließende zweifache Eliminierung von Tosylsäure wäre es möglich das Butadiensystem aufzubauen. Allerdings werden dabei lediglich Ausbeuten von 2 bis 4 % erreicht und viele Nebenprodukte erhalten.^[180]

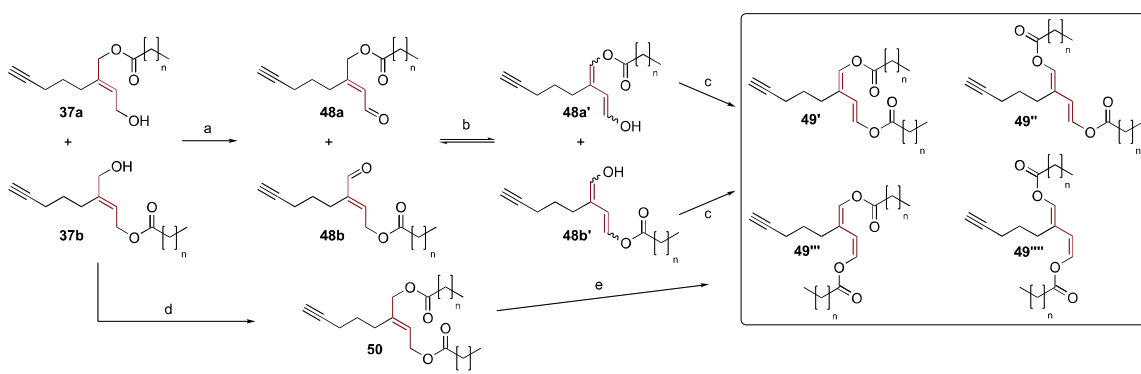


Abbildung 37: Die Alkohole **37a** und **37b** werden durch Dess-Martin-Oxidation^[181] in die Aldehyde **48a** und **48b** überführt (a), welche im tautomeren Gleichgewicht mit den Butadienolen **48a'** und **48b'** stehen (b). Durch Reaktion mit Säureanhydrid (c) können die Bisenolester **49** mit gewünschter Säurekettenlänge dargestellt werden. Wird eine zweite Veresterung (d) an den einfachen Alkoholen **37a** bzw. **37b** durchgeführt, ist die Synthese der Bisenolester **49** schwer durchführbar (e). Abgebildet sind alle möglichen Konfigurationsisomere von **49**.

Um schlussendlich aus den Monoestern **37a** bzw. **37b** koppelbare Bisenolester **49** (vergleiche **36** R = *n*-Pent-4-ynyl in Abb. 30) zu erhalten, müsste eine Enolacetylierung, wie sie in Abbildung 37 abgebildet ist, durchgeführt werden. Durch Dess-Martin-Oxidation^[181] (Abb. 37 Rkt. a) der jeweils verbliebenen Hydroxygruppen von **37a** und **37b** wären die einfach ungesättigten Aldehyde **48a** und **48b** zugänglich. Diese Aldehyde stehen im tautomeren Gleichgewicht mit dem Butadienolen **48a'** und **48b'** (Abb. 37 Gleichgewichtsschritt b), welche durch Säureanhydrid abgefangen werden könnten und in den koppelbaren Bisenolester **49** überführt werden würden (Abb. 37 Rkt. c). In diesem Schritt wird auch ersichtlich, dass es nicht von Bedeutung ist, welches Regioisomer der Ester **37a** bzw. **37b** in der Enolacetylierung eingesetzt wird, da beide Verbindungen bei der Synthese als Ausgangspunkt genutzt werden.

Darüber hinaus bedingt die Tautomerisierung (Abb. 37 Gleichgewicht b) ein Verschieben der Doppelbindungen, was den Molekülen **48a** und **48b** bzw. **48a'** und **48b'** die Möglichkeit gibt alle *E*- und *Z*-Isomere durch Rotation um ihre Einfachbindungen zu bilden (nicht abgebildet). Deshalb entstehen die Bisenolester **49** in allen vier möglichen Konfigurationsisomeren **49'** - **49''''** (Abb. 37).

3.1.2.2 Carbomagnesierung von monosilylierten But-2-in-1,4-diol (**B₁**)

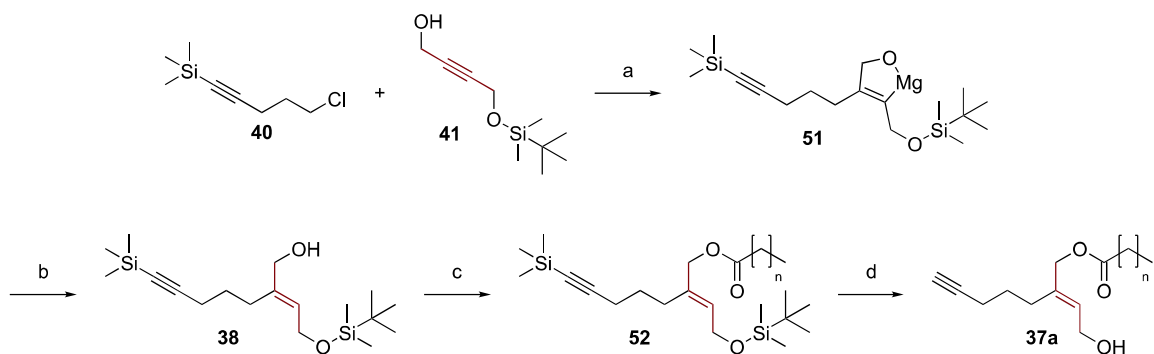


Abbildung 38: Alternative Syntheseroute zu dem Monoester **37a**. Durch das Einführen eines Silylethers vor der Carbomagnesierung (a) in **41** entsteht über das Zwischenprodukt **51** der monosilylethergeschützte Dialkohol **38** (b = wässrige Aufarbeitung). Die nachfolgende Veresterung (c) kann auf chemischen Wege ohne den Einsatz von einer Lipasen erfolgen, was rein theoretisch höhere Ausbeuten verspricht. Anschließend werden beide Silylschutzgruppen entfernt (d).

Des Weiteren bietet der Aufbau der Bisenolester nach der von mir vorgestellten Syntheseroute (Abb. 30 B₂) weitere Möglichkeiten zur Optimierung. Wie schon ge-

schildert ist es wichtig, beide Ester nacheinander einzuführen. Die erste Veresterung geschieht, aufgrund der zweifachen Hydroxyfunktionalität von **39**, katalysiert durch Lipasen in Anwesenheit eines Vinylesters. Dadurch bedingen sich mehrere Nachteile, wie kein vollständiger Umsatz bei moderaten Reaktionszeiten, geringe Ausbeuten, notwendige Optimierung der Reaktionsbedingungen (vor allem die Auswahl einer Lipase), Synthese der Vinylester und keine definierte Regioselektivität (Gemisch der Regioisomere). Aufgrund dessen soll eine angepasste Syntheseroute überprüft werden (Abb. 30 B₁). Bei der in Abbildung 35 dargestellten Carbomagnesierung von **42** ist nur eine Hydroxyfunktion im Intermediat **43** beteiligt, während die andere lediglich als Magnesiumbromidsalz vorliegt und offensichtlich keinen Einfluss auf die Reaktion ausübt (Abb. 35). So wäre es möglich diese unbeteiligte Alkoholfunktion schon vor der Carbomagnesierung in einen Silylether zu überführen, sodass der Monoalkohol **38** synthetisiert werden könnte. Dieser könnte ohne den Einsatz von Lipasen in einen Monoester transformiert werden **52** (Reaktionsschritt c), wobei nach Abspaltung der Schutzgruppen die Vorstufe der Bisenolester **37a** erhalten werden könnte.

3.2 Synthesedurchführung

3.2.1 Aufbau halogenerter Bisenolcarbonsäureester

3.2.1.1 Syntheseroute A₁

Syntheseroute A (Abb. 30) beschreibt den Aufbau von Bisenolestern, die eine Halogenierung an Position 2 des Butadiensystems aufweisen. Das käuflich erwerbbares 1,4-Diacetoxybutadien (**33**) ist den geforderten Bisenolacetaten sehr ähnlich. Darum soll mit Hilfe verschiedener Halogenierungsreagenzien ein Proton des Butadiensystems gegen ein Halogen (X) substituiert werden (siehe Reaktionsgleichung 39). Des Weiteren kann eine Reaktion, in Analogie zu von Djerassi und Lenk vorgestellten Halogenierungen ablaufen.^[182] Hierbei wurden Enolacetate in guten Ausbeuten mit Hilfe von *N*-Iodosuccinimid (NIS) in α -iodierte Aldehyden umgewandelt, sodass **53** (X=I) erhalten werden könnte.

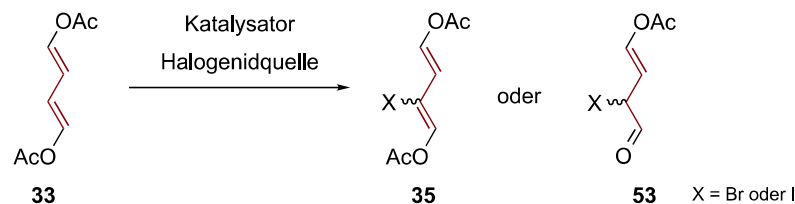


Abbildung 39: Halogenierung des 1,4-Diacetoxybutadien, bzw. Halogenierung eines Enolacetates, wobei eine Hydrolyse des Esters beobachtet wird und der entsprechende halogenierte Aldehyd entsteht.

Die Reaktion von **33** mit NIS in Dioxan ergab drei neue Peaks im Gaschromatogramm nach 24 h Reaktionszeit, welche ähnliche aber kleinere Retentionszeiten aufwiesen. Hinzukommend zeigten diese neuen Peaks die gleichen Massenspektren auf, sodass mit großer Wahrscheinlichkeit eine *Cis-Trans*-Isomerisierung beider Doppelbindungen des Ausgangsstoffes **33** beobachtet wurde. Auf diese Weise entstehen die drei anderen möglichen Konfigurationsisomere. Gleiche Beobachtungen wurden auch bei der Reaktion von **33** mit Iod in Dichlormethan in Anwesenheit von wässriger Natriumcarbonatlösung gemacht, wobei die postulierte Isomerisierung schon nach einer Stunde Reaktionszeit sehr weit vorangeschritten war. Unterstützt wurde diese These durch Auswertung des Protonenresonanzspektrums. In diesem war zu beobachten, dass die Methylgruppen der Acetatreste in vier Signale aufgeteilt wurden und die Protonen des Butadiensystems ein komplexes Kopplungsmuster aufwiesen. Des Weiteren war

das Verhältnis der Integrale der Butadienprotonen zu den Acetatprotonen das selbe wie im Ausgangsstoff **33**, sodass keine Substitution stattgefunden haben muss. Des Weiteren kann eine Reaktion, nach Djerassi und Lenk^[182] zu **53** durch das Fehlen eines Signales des Aldehydprotons ausgeschlossen werden.

In weiteren Versuchsreihen, die unter anderem Iod oder Kaliumbromat in THF, Iod in Anwesenheit von Quecksilberdichlorid oder Kupferdiacetat verwendeten (für detaillierte Informationen siehe Kapitel 6.7.1) konnte ebenfalls entweder Zersetzung oder keinerlei Reaktion des Ausgangsmaterials beobachtet werden.

3.2.1.2 Syntheseroute A₂

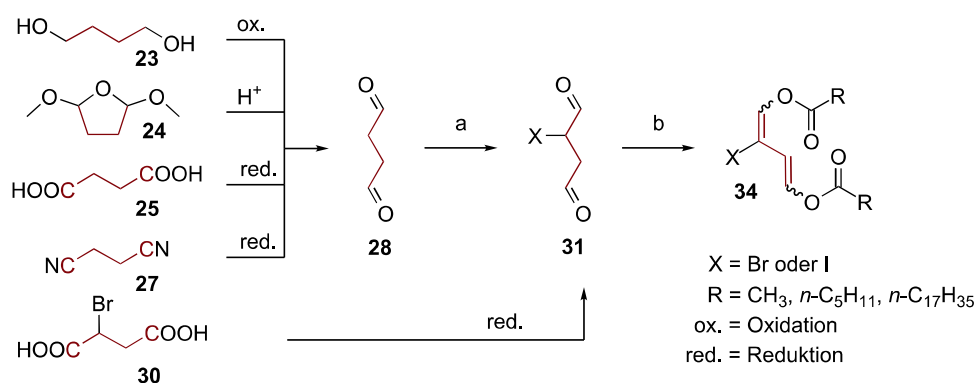


Abbildung 40: Synthese von halogenierten Bisenolestern **34**. Durch säurekatalysierte Ringöffnung von **24**, Reduktion von **25** bzw. **27** oder Oxidation von **23** ist der Dialdehyd **28** zugänglich. **28** kann daraufhin Halogeniert werden (a) und durch anschließende Enoacylierung (b) wäre **34** zugänglich. Darüber hinaus kann die direkte Reduktion von **30** ebenfalls als Quelle für einen bromhaltigen Dialdehyden (**31**, X = Br) dienen.

Da eine direkte Halogenierung eines Bisenolesters **33** nicht erfolgreich war, wurde untersucht, ob der Einbau des Halogens durch Halogenierung eines Aldehyds in α -Stellung erreichbar ist (Abb. 40 Reaktion a), bevor das Bisenolestersystem aufgebaut wurde (Reaktion b). Als Aldehyd wurde Succinaldehyd (**28**) benötigt, der jedoch relativ instabil ist, aber aus verschiedenen Vorstufen (**23**, **24**, **25** oder **27**) hergestellt werden kann. Trotz dieser vielfältigen Darstellungsmöglichkeiten von **28** war es sehr schwierig unter ökonomischen Aspekten **28** in zufriedenstellende Ausbeuten darzustellen. Dabei ist vor allem die Löslichkeit der Ausgangsstoffe **25** und **27** problematisch. Diese polaren Verbindungen, welche reaktiv in **28** überführt werden sollten, besitzen eine sehr schlechte Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln (z. B. CH_2Cl_2) und sehr gute Löslich-

keit in Polaren (z. B. Tetrahydrofuran (THF)). Diese Lösungseigenschaften behinderten die Reduktion, da bei Verwendung von polaren Lösungsmitteln der entsprechende, aber unerwünschte, Dialkohol entstehen würde, wobei bei der Verwendung eines apolaren Lösungsmittels, wie Dichlormethan der Dialdehyd dargestellt werden könnte. Aufgrund dessen wurden beide Carboxylreste von **25** methyliert, um die Löslichkeit in apolaren Lösungsmitteln zu erhöhen. Dennoch ergab die Reduktion in CH_2Cl_2 keinen Umsatz von **25** und **28** konnte nicht nachgewiesen werden. Da die Polarität den Dinitrils **27** nicht beeinflussbar ist, wurde die Reduktion in einem sehr großen Lösungsmittelvolumen durchgeführt (ca. 250 ml CH_2Cl_2 für 200 mg **27**). Bei dieser Umsetzung konnte ebenfalls kein Umsatz des Ausgangsstoffes **27** bzw. keine neue Produkte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) nachgewiesen werden. Aufgrund dessen wurde eine reduktive Herstellung von **28** nicht weiter verfolgt.

Als dritter Ausgangsstoff für die Darstellung von **28** sollte das zyklische Vollacetal **24** sauer umgesetzt werden. Allerdings konnte auch hier kein Dialdehyd nach einer Vorschrift von Cope und Keller^[183] erhalten werden und auch diese Route wurde verworfen.

Schlussendlich konnte der geforderte Dialdehyd **28** in kleinen Mengen durch Dess-Martin-Oxidation^[181] von Butan-1,4-diol (**23**) nachgewiesen werden. Mittels DC (Petrolether (PE): Diethylether (DE), 2:3) konnte ein partieller Umsatz des Ausgangsstoffes **23** und zwei neue Produktflecken detektiert werden. Im Vergleich mit dem nicht retardierenden Ausgangsstoff könnte dies auf eine einfache Oxidation ($R_f = 0,27$) bzw. auf den gewünschten Dialdehyd ($R_f = 0,5$) hindeuten.

Problematisch zeigte sich allerdings auch hier die Auswahl alternativer Lösungsmittel und zudem die benötigte Menge an Oxidationsreagenz. Der polare Dialkohol **23** ist schlecht löslich in CH_2Cl_2 und zeigt womöglich deswegen nur einen geringen Umsatz in diesem Lösungsmittel. Ein Durchführen der Dess-Martin-Oxidation in THF oder Acetonitril, in denen der Ausgangsstoff **23** gut löslich ist und welche laut Literatur^[181] bei der Oxidation verwendet werden können, ergab kein Oxidationsprodukt. Aufgrund dessen wurde ein präparativer Ansatz der Oxidation in einem erhöhtem Lösungsmittelvolumen CH_2Cl_2 und in Anwesenheit von drei Äquivalenten Dess-Martin-Periodinan pro Hydroxyfunktion durchgeführt und die Stoffe säulenchromatographisch voneinander

getrennt. GC-MS Messungen der Fraktionen der präparativen Säulenchromatographie brachten indes ähnliche Ergebnisse, wie die eingangs erwähnten Reaktionskontrollen. Das vermeintliche einfache Oxidationsprodukt ($R_f = 0,27$) zeigte, im Vergleich zum zweifachen Oxidationsprodukt ($R_f = 0,5$), eine höhere Retentionszeit im Gaschromatogramm, was im Einklang mit der relativen Flüchtigkeit beider Verbindungen einhergeht (Aldehyde sind flüchtiger als Alkohole). Darüber hinaus war die Massendifferenz bei der Substanzen von zwei detektierbar (Abstraktion von H_2 durch die Oxidation von Alkohol zu Aldehyd). Trotz dieser vielversprechenden Resultate, waren mittels NMR-spektroskopischen Analysen jedoch keine Aldehydprotonen detektierbar. Eventuell zersetzt sich der Aldehyd oder reagiert intermolekular durch Kondensationsreaktionen bei der Aufkonzentration der Fraktionen der Säulenchromatographie. Aufgrund dieser vielfältigen Probleme (Instabilität des Dialdehyden **28**, unvollständige Oxidation und Einsatz des teuren Oxidationsmittels im Überschuss) konnte die Syntheseroute nicht weiter verfolgt werden.

3.2.1.3 Syntheseroute A₃

Die dritte Syntheseroute des Aufbaus halogenerter Bisenolester ist der eben besprochenen angelehnt, in dieser wird jedoch anstatt eines Dialdehyden ein Monoaldehyd halogeniert (Abb. 41).

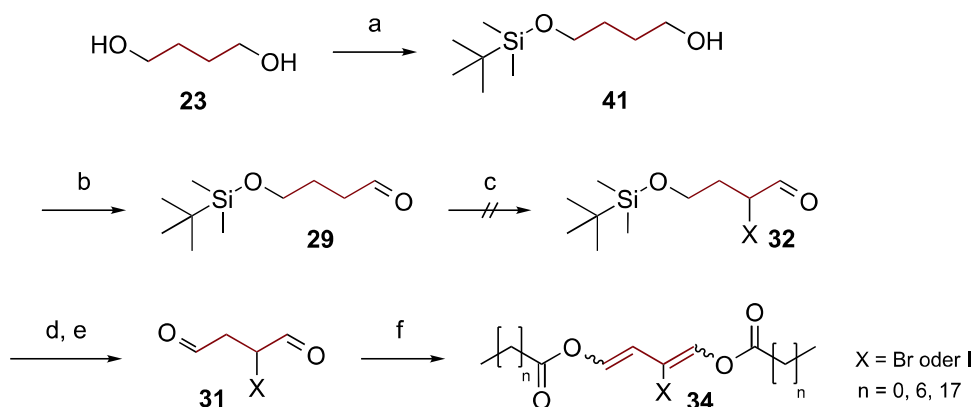


Abbildung 41: Durch selektive Monosilylierung (a) kann der Dialkohol **23** in den Monosilylether **41** überführt werden.^[184] Nach anschließender Oxidation (b) der verbleibenden Hydroxyd-funktion kann der Monoaldehyd in α -Stellung halogeniert werden (c). Nach Abspaltung der Silylschutzgruppe (d) und zweiter Oxidation (e) wird der entstehende Dialdehyd **31** durch Enolacylierung (f) in den halogenierten Bisenolester **34** umgewandelt werden.

Im ersten Schritt wird ausgenutzt, dass kleine bifunktionelle Alkohole durch geschickte Reaktionsführung Monosilyliert werden können (Reaktion a). Dazu wurde nach einer Vorschrift von McDougal *et al.*^[184] vorgegangen und der Silylether **41** erhalten. Bei dieser Synthese bildet **23** mit Natriumhydrid ein Monoalkoholat, das aufgrund seiner Schwerlöslichkeit keine weitere Deprotonierung erfährt. Dieses Monoalkoholat wird daraufhin mit einem Überschuss an Tertiärbutyldimethylsilylchlorid abgefangen und es entsteht annähernd quantitativ (bezogen auf das Silylchlorid) der Monoether **26**. Anschließend wurde **26** mit Hilfe von Dess-Martin-Periodinan^[181] in den Aldehyden **29** mit einer Ausbeute von 77 % überführt (Abb. 41 Rkt. b). Leider erbrachte die darauffolgende Iodierung mit NIS von **29** keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. 41 Rkt. c). Dünnschichtchromatographische Analysen des Reaktionsgemisches nach 24 h ergaben einen fast vollständigen Verbrauch des Ausgangsstoffes und neue Verbindungen. Dabei bildete sich ein Hauptprodukt, welches einen geringeren R_f-Wert als **29** aufwies. GC-MS Analysen dieses Produktes ergaben, dass es sich dabei um das Desilylierungsprodukt des Aldehyd **29** handelte. So haben auch Karimi *et al.* schon beschrieben, dass Tertiärbutyldimethylsilylether labil gegenüber NIS sind und als mildes und selektives Reagenz zur Abspaltung dieser Schutzgruppe eingesetzt werden kann.^[185] Diese Nebenreaktion ist allerdings keinesfalls störend, da die Schutzgruppe in der darauffolgenden Stufe gespalten werden müsste (Abb. 41 Rkt. d). Trotzdem konnte neben dieser Silyletherspaltung keine Iodierung von **29** beobachtet werden. Daher wurde ein weiteres Äquivalent NIS zur Reaktionsmischung gegeben und die Reaktion für weitere 24 h gerührt. Leider konnte auch dabei keine Iodierung beobachtet werden.

Schlussfolgernd war es mit Syntheseroute B nicht möglich einen halogenierten Bisenolester **34** für die Übergangsmetallkatalysierte Kopplung herzustellen. Es scheiterten die Versuche das Bisenolacetat **33** zu halogenieren (Abb. 30 B₁) und der Dialdehyd **28** konnte nicht dargestellt werden (Abb. 30 B₂). Darüber hinaus konnte in den Monoaldehyd **29** kein Iod eingeführt werden (Abb. 30 B₃).

3.2.2 Synthese der Bisenolcarbonsäureester durch Carbomagnesierung

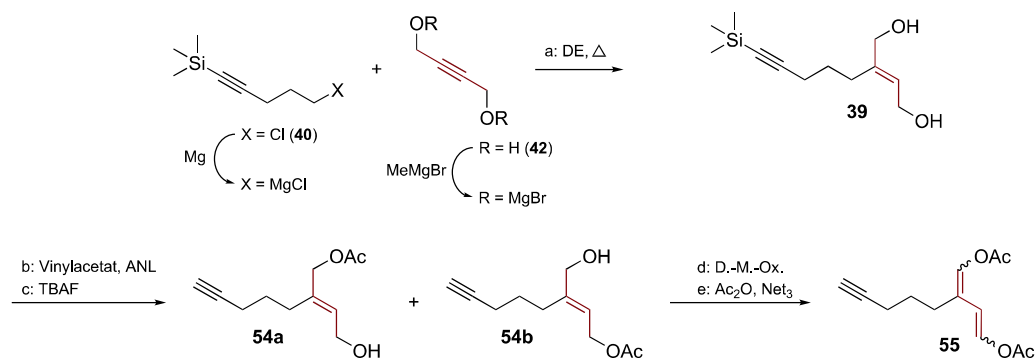


Abbildung 42: Synthese des koppelbaren Bisenolacetates der zweiten Generation (**55**) aus meiner Diplomarbeit.^[175] Durch Carbomagnesierung (a) konnte das Grundgerüst **39** aufgebaut werden. Nach enzymatischer Monoacetylierung mit *Aspergillus niger* Lipase (ANL) (b) und darauf folgender Trimethylsilylabbau (c) waren die Monoester **54a** und **54b** zugänglich. Durch Dess-Martin-Oxidation (d) der verbleibenden Hydroxyfunktion und anschließender Enolacetylierung (e) konnte das BEA **55** erhalten werden.

Aufgrund von vielfältigen Problemen der Syntheseroute A (Kapitel 3.2.1) wurde versucht die Bisenolester verschiedener Säurekettenlänge in Anlehnung der in meiner Diplomarbeit vorgestellten Synthese herzustellen. Abbildung 42 zeigt die Fünfstufensynthese zur Darstellung des Bisenolacetates (BEA (**55**)) ausgehend von But-2-in-1,4-diol (**42**) und dem chlorierten Alkin **40** mit einer Gesamtausbeute von ca 4 %, bezogen auf **40**. Diese Synthese könnte adaptiert werden, indem die Acetylierungsreagenzien in der zweiten und fünften Stufe (Abb. 42 Rkt. b und e) gegen entsprechende langkettige Acylierungsreagenzien ausgetauscht werden würden.

3.2.2.1 Syntheseroute B₁

Um im zweiten Schritt eine Monoacylierung mittels Lipasen und Vinylcarboxylaten bei der Synthese zu meiden (Abb. 42 Rkt. b), wurde zunächst der alternative Weg B₁ (Abb. 30) durch Carbomagnesierung von monosilylierten But-2-in-1,4-diol verfolgt. Zur Herstellung von **41** wurde nach Najdi^[186] vorgegangen (Abb. 43 Rkt. a), um **41** zu erhalten. Allerdings zeigte die Auswertung der GC-MS-Chromatogramme sowie der NMR-Spektren, dass zum Großteil das zweifach geschützte Produkt gebildet wurde. Darum wurde versucht, **41** in Analogie zu **26** nach McDougal *et al.*^[184] durch Deprotonierung mit Natriumhydrid herzustellen. Bei dieser Reaktion wurde jedoch auch nur ein Gemisch aus einfach und zweifach silyliertem **42** erhalten. Durch säulenchromato-

graphische Aufreinigung beider Ansätze konnte schlussendlich **41** in einer Ausbeute von 18 % dargestellt werden (bezogen auf das Silylchlorid).

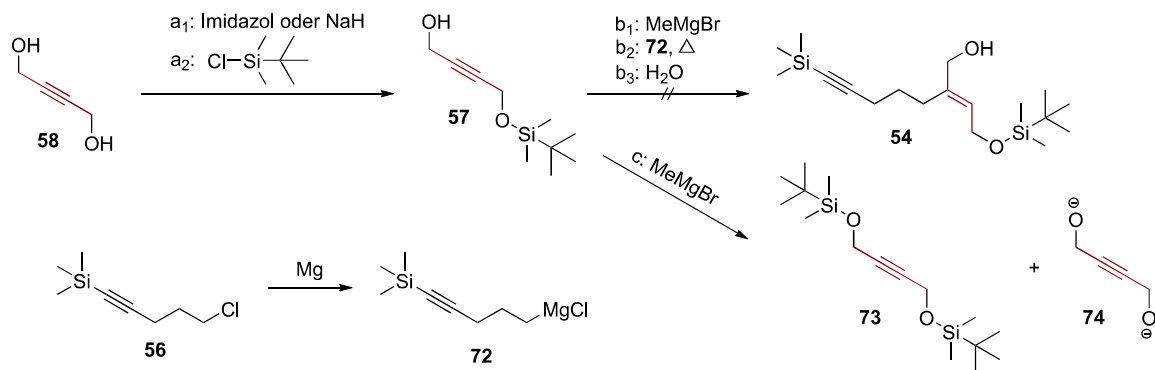


Abbildung 43: Synthese des monosilylierten Dialkohols **38**. Durch selektive Silylierung (a_1 und a_2) einer Alkoholgruppe von **42** konnte der Silylether **41** hergestellt werden. In der anschließenden Carbomagnesierung (b_1 bis b_3) der Dreifachbindung von **41** konnte kein Produkt **38** nachgewiesen werden, da **41** womöglich durch die Deprotonierung durch MeMgBr einem intermolekularen Silylgruppentransfer unterlag (c).

Die nun zugängliche Verbindung **41** wurde daraufhin der Carbomagnesierung unterzogen (Abb. 43 Rkt. b). Doch auch nach 24 h Reaktionszeit konnte mittels GC-MS nicht das Produkt **38** nachgewiesen werden. Dennoch war im Gaschromatogramm zu erkennen, dass ein Teil des Ausgangsmaterials **41** verbraucht war und eine Substanz detektiert werden konnte, welche die selbe Retentionszeit und Massenspektrum wie das ungewünschte Produkt der Monosilylierung (Abb. 43 Rkt. a) besaß. Darum ist davon auszugehen, dass durch die Deprotonierung von **38** intermolekular eine Übertragung der Tertiärbutyldimethylsilylgruppen stattfindet (Abb. 43 Rkt. c). Eventuell findet diese Reaktion auch während der Synthese von **41**, durch den Überschuss an eingesetzten Natriumhydrid statt und ist verantwortlich für die schlechte Ausbeute von **41**. Da auf die Deprotonierung der Hydroxyfunktion von **38** bei der Carbomagnesierung jedoch nicht verzichtet werden kann, konnte diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt werden und es wurde nach Syntheseroute B₂ vorgegangen.

3.2.2.2 Syntheseroute B₂

Für die Darstellung der Bisenolester langkettiger Carboxylsäuren in Analogie zur Synthese von BEA (**55**) ist es notwendig die Vinylester der entsprechenden Carboxylsäuren für die lipasenkatalysierte Monoacylierung herzustellen. Durch Transesterifizierung von Vinylacetat (**44**) mit Carboxylsäuren verschiedener Länge in Anwesenheit

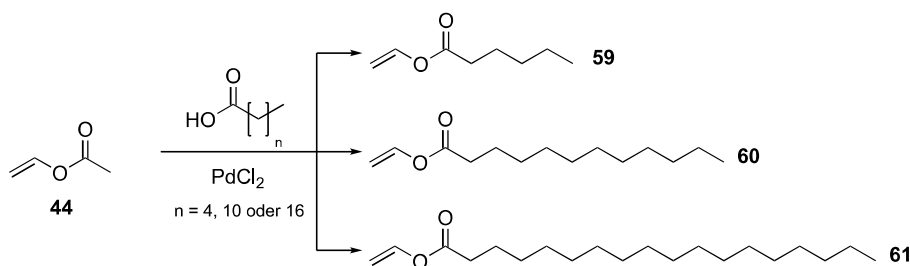


Abbildung 44: Synthese der Vinylcarboxylate verschiedener Säurekettenlänge **59**, **60** und **61** für die lipasenmedierte Umsetzung des Dialkohols **39** zur Monoacylierung.

von Palladiumdichlorid konnten Vinylcapronat (**59**), Vinyl Laurat (**60**) und Vinylstearat (**61**) in guten Ausbeuten hergestellt werden. Die Aufreinigung erfolgte dabei durch Destillation (**59**) bzw. Säulenchromatographie (**60** und **61**). Daran anschließend wurde der Dialkohol **39** mit diesen Vinylestern in parallelen analytischen Ansätzen mit verschiedenen Lipasen inkubiert (siehe Tabelle 1). Ziel war es, die ideale Lipase zu finden, welche **39** mit der größten Ausbeute monoacetyliert (Tabelle 1 eingebettete Abb.). Zur Vervollständigung des Trends des enzymatischen Veresterung wurde zusätzlich Vinyl Laurat eingesetzt. Eine Unterscheidung der Ausbeute von Produkt A bzw. A' wurde dabei nicht vorgenommen, da die Regioselektivität für die spätere Umsetzung zum Bisenolester keine Rolle spielt (siehe Abb. 37) und nur eine Diesterbildung durch die Lipasen vermieden werden sollte.

Tabelle 1: Experimente der Transesterifikation von **39** mit verschiedenen Lipasen, zur Herstellung der Monoester A bzw. A' (siehe Abb. in der Tabelle). Leeres Feld = nicht getestet; - = nicht beobachtet; + = schwach erkennbar; ++ = erkennbar; +++ = stark erkennbar (semiquantitative Einschätzung der Produktflecken der DC nach Anfärbung mit Seebachreagenz nach drei Tagen Reaktionszeit bei RT)

Lipase	Acylquelle		Vinylcapronat		Vinyl Laurat		Vinylstearat	
	Produkt		A bzw. A'	B	A bzw. A'	B	A bzw. A'	B
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	+	-	++	-
<i>Mucor Javanicus</i>	+	-	-	-	-	-	++	++
<i>Candida antarctica</i>	-	++	-	++	+	-	+++	+++
<i>Rhizopus arrhizus</i>	+	-	-	-	+++	-	+++	+
<i>Rhizopus niveus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida rugosa</i>	+++	+	+++	+	-	-	-	-

Wie sich in der Tabelle der enzymatischen Veresterungen erkennen lässt, kann nicht jede beliebige Lipase für die Darstellung der verschiedenen gewünschten Monoester eingesetzt werden. Die zur Herstellung der Acetate eingesetzte *A. niger* Lipase zeigte bei Einsatz der Capronate keinerlei Aktivität und nur eine sehr geringe bei den länger-kettigen Laureaten und Stearaten, jedoch mit Präferenz zur Monoesterbildung. Eine getestete Lipase aus *R. arrhizus* formte unter den gewählten Reaktionsbedingungen keinerlei Produkte und eine Lipase aus *C. antarctica* zeigte die höchste Reaktivität unter Verwendung von Vinylstearat als Acylquelle, formte aber große Mengen des unerwünschten Diesters. Als ideale Lipase zur Herstellung der Capronate kristallisierte sich die Lipase aus *C. rugosa* heraus und zur Herstellung der längerkettigen Lauryl-monoester bzw. Stearatmonoester eignete sich Lipase aus *R. arrhizus* am besten. Interessanterweise erbrachte die Umsetzung der Capronate mit Lipase aus *R. arrhizus* ebenfalls eine Monoveresterung von **39** ohne einen Diester von **39** zu bilden. Allerdings war diese Umsetzung nicht sehr weit vorangeschritten und im Vergleich zu *C. rugosa* bei gleicher Reaktionszeit (3 Tage) im Nachteil.

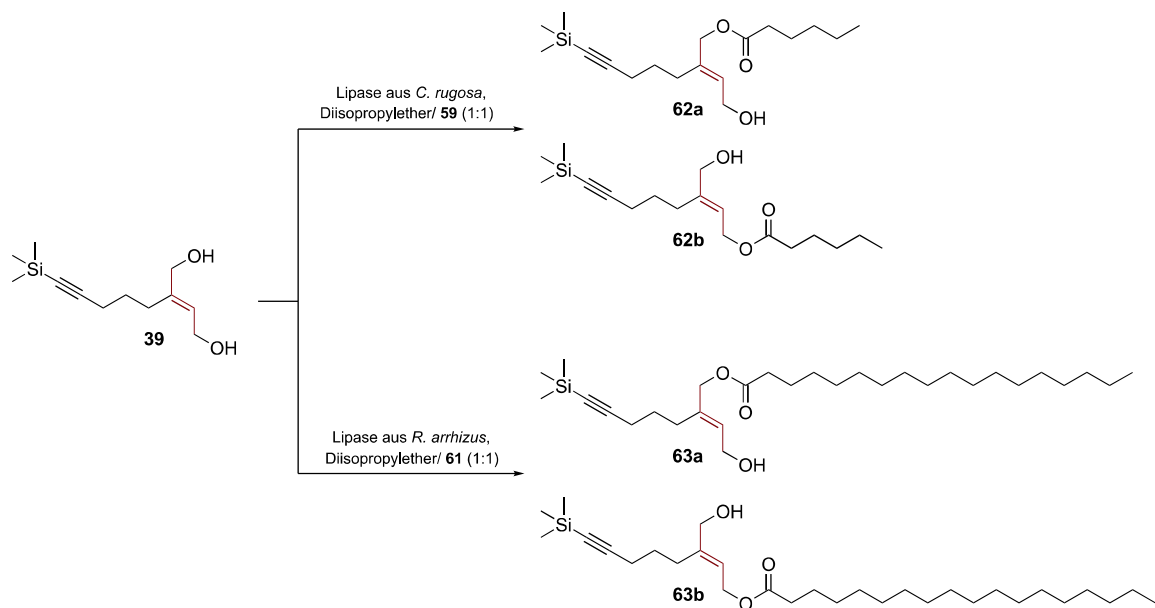


Abbildung 45: Monoacylierung des Dialkohols **39** in Anwesenheit von Vinylcapronat (**59**) bzw. Vinylstearat (**61**). In beiden Fällen wird ein Gemisch aus den Monoestern erhalten.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden präparative Ansätze dieser Monoacylierungen durchgeführt und die Monocapronate **62a** und **62b** mit einer Ausbeute von 39 % bzw. die Monostearate **63a** und **63b** mit einer Ausbeute von 75 % erhalten, wobei die

jeweiligen Monoester säulenchromatographisch nicht von einander getrennt wurden. Durch Integration der Methylenprotonen des 1,4-But-2-endiolsystems wurde deren Verhältnis untereinander bestimmt. So war zu beobachten, dass bei allen durchgeführten Monoacylierungen (inkl. der Acetate aus einer früheren Studie^[175]), bevorzugt der Ester an Position 1 des 1,4-But-2-endiolsystems gebildet wurde (Produkt A in der in Tabelle 1 eingebetteten Abb.). Ein Trend lässt sich indes erkennen, da bei einer längeren eingeführten Seitenkette das Verhältnis auf der Veresterung an Position 1 bei den präparativen Ansätzen liegt (bei den analytischen wurden dieses Verhältnis nicht bestimmt). Bei Verwendung der Acetate wurde Produkt A (**107a**) zu 54 % gebildet, wohingegen bei den Capronaten dies auf 61 % (**62a**) anstieg und bei den Stearaten mit 69 % (**63a**) am höchsten war.

Anschließend wurde in beiden Fällen die Trimethylsilylschutzgruppe mittels Standardreaktion durch Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten (Abb. 46 Rkt. a), um die entsprechenden Monoester **64a** und **64b** bzw. **65a** und **65b** mit terminaler Dreifachbindung quantitativ zu erhalten. Dieser Schritt muss zwingend vor dem Aufbau des Bisenolestersystems geschehen, da schon gezeigt werden konnte, dass Bisenolacetate labil gegenüber TBAF sind.^[175]

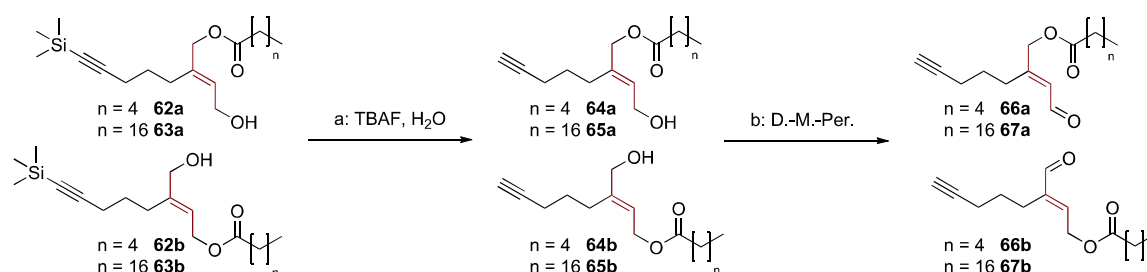


Abbildung 46: Zur späteren Kopplung der Bisenolester durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Zykoaddition (CuAAC) wurde die TMS-Schutzgruppe mittels TBAF entfernt (a). Daran anschließend wurden die verbleibende Hydroxyfunktion oxidiert, um die Vorstufe für die Bisenolester zu erhalten. (D.-M.-Per. = Dess-Martin-Periodinan^[181])

Um nun die gewünschten Bisenolfettsäureester der Capronate (BEC **68**) und Stearate (BES **69**) zu erhalten, wurden die Monoester **64a** und **64b** bzw. **65a** und **65b** mittels Dess-Martin Periodinane zu entsprechenden ungesättigten Aldehyden **66a** und **66b** bzw. **67a** und **67b** oxidiert (Abb. 46 Rkt. b). Um die Verluste nach der Synthese durch Dekomposition der ungesättigten Aldehyde zu minimieren wurden diese durch keine

Aufreinigungsschritte (z. B. Säulenchromatographie) isoliert und direkt für die darauf folgende Enolacetylierung (Abb. 47) eingesetzt.

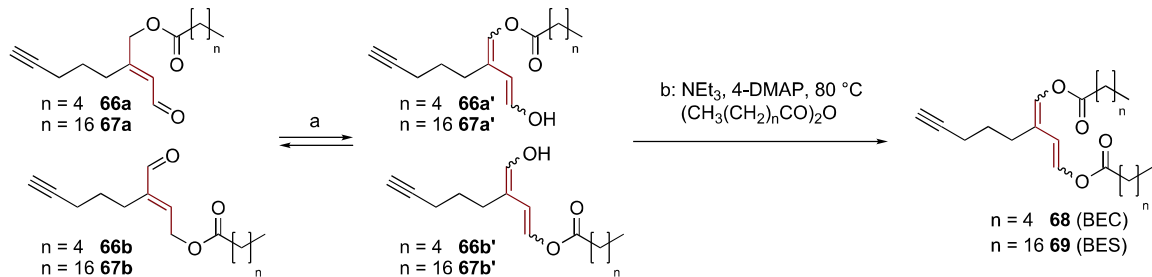


Abbildung 47: Enolacetylierung der ungesättigten Aldehyde **66a** und **66b** bzw. **67a** und **67b**. Durch Ausnutzung des tautomeren Gleichgewichtes (a) können die entsprechenden Butadienol **66a'** und **66b'** bzw. **67a'** und **67b'** mittels Enolacetylierung (b) in die Bisenolfettsäureester **68** bzw. **69** überführt werden.

Die aus dem Oxidationsschritt (Abb. 46 Rkt. b) erhaltenen ungesättigten Aldehyde stehen im tautomeren Gleichgewicht mit den Butadienolen **66a'** und **66b'** bzw. **67a'** und **67b'** (Abb. 47 Rkt. a). Diese Tautomerieprodukte werden durch die Anwesenheit von Carbonsäureanhydrid und 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) in Triethylamin (NEt_3) acyliert (Abb. 46 Rkt. b). Diese Tautomerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Enolacetylierung, welche aus diesen Gründen bei erhöhter Temperatur von $80\text{ }^\circ\text{C}$ und Anwesenheit der Base als Lösungsmittel durchgeführt wird.

Auffällig waren jedoch die deutlich zu hohen Integrale der Säureketten im NMR-Spektrum beider Fettsäurebisenolester im Vergleich zu den restlichen Protonen. Da beim Abbrechen der Synthese durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat das überschüssige Säureanhydrid hydrolysiert wurde, entstehen erhebliche Mengen an entsprechender Säure. Diese konnte nicht vollständig säulenchromatographisch abgetrennt werden, jedoch gelang dieses leicht durch lösen der Verbindungen **68** und **69** in Diethylether und anschließendes Ausschütteln mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung. Wichtig hierbei war es, die Fraktionen der Säulenchromatographie dieser Prozedur zu unterziehen, da beim Ausschütteln der Reaktionsmischung mit Kaliumcarbonatlösung ein breiiger Niederschlag ausfiel, der die Weiterarbeit stark einschränkte. Dabei kann es sich um Niederschläge der Kalisalze der Fettsäuren und/oder Triethylammoniumhydroxid handeln. **68** und **69** überstanden dabei diese Prozedur ohne eine Verseifung durch das alkalische Kaliumcarbonat zu erfahren, da keinerlei Aldehydprotonen im

Protonenresonanzspektrum nachweisbar waren. Somit ist die Basenstabilität (pH-Wert der basischen Lösung ca. 12) der Fettsäurebisenolester gezeigt.

Analog zu BEA **55** entstanden die Fettsäurebisenolester **68** und **69** in allen vier möglichen *E*- und *Z*-Konfigurationsisomeren des Butadiensystems (vgl. Abb. 37). Mit Hilfe der Auswertung des NMR-Spektrums war es allerdings möglich deren Verhältnis zueinander zu bestimmen. Das Signal des mittleren vinylicischen Protons an Position 3 (Abb. 48 eingekreist) ist für die einzelnen Konfigurationsisomere eines Bisenolesters unterschiedlich und zudem nicht von anderen Signalen überlagert.

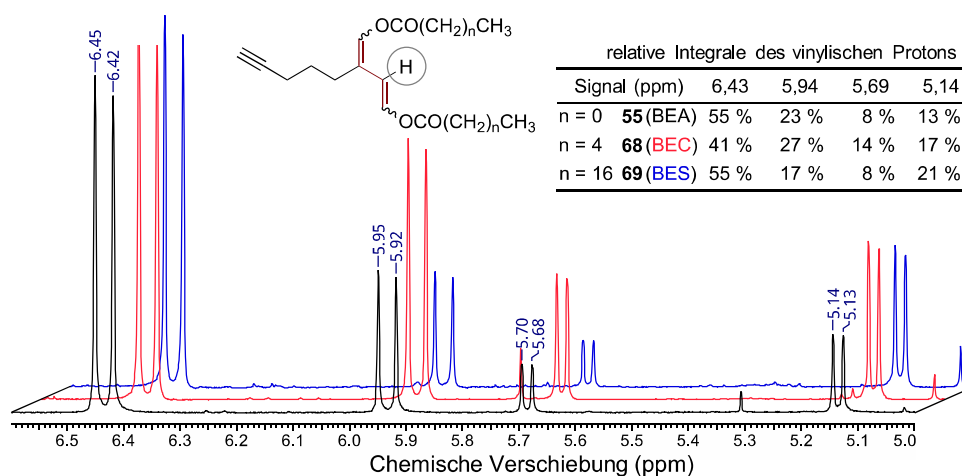


Abbildung 48: Signale im NMR-Spektrum des mittleren vinylicischen Butadienprotons an Position 3 (eingekreist) der Bisenolester **55**, **68** und **69**. Die chemische Verschiebung des markierten Protons ist für die vier Konfigurationsisomere innerhalb eines Bisenolesters unterschiedlich und erlaubt durch Integration die Bestimmung der relativen Verhältnisse der Konfigurationsisomere (siehe eingebettete Tabelle).

Dadurch konnte durch die Integration der vier Signale die relative Zusammensetzung der Konfigurationsisomere eines Bisenolesters erhalten werden. Wie in der eingebetteten Tabelle in Abbildung 48 zu erkennen ist, wird das Isomer mit dem tieffeldverschobenen Proton (Dublett bei ca. 6,43 ppm) bei allen Bisenolestern bevorzugt gebildet. Die Kopplungskonstante von ca. 12 Hz dieses Protons bei allen Bisenolestern lässt zudem auf eine *Trans*-ständige Doppelbindung schließen. Die selbe Kopplungskonstante konnte auch bei dem Signal bei 5,93 ppm ermittelt werden, wohingegen die beiden hochfeldverschobenen Signale bei 5,69 ppm und 5,14 ppm eine Kopplungskonstante von ca. 6 Hz zeigen und somit dem *Cis*-Isomer an dieser Doppelbindung zuzuordnen sind. Die *Trans*-Produkte werden bevorzugt gebildet, da die sterische Hinderung hierbei in jedem der Bisenolester am geringsten ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erfolgreich die gewünschten, über Huisgen-Cycloaddition koppelbaren, Bisenoleder der zweiten Generation der Capronate und Stearate synthetisiert werden konnten. Hierbei wurde die, aus einer früher veröffentlichten Studie, entwickelte fünfstufige Synthese eines Bisenoacetates (Gesamtausbeute 11 %) adaptiert (Syntheseroute B₂).^[175] Für das Bisenoicapronat (**68**) konnte eine Gesamtausbeute von 4,3 % erreicht werden und für das Bisenoistearat (**69**) 16,6 %. Eine äußerst vielversprechende Synthese eines halogenierten Bisenolederensystem, welches sehr flexibel mit funktionalen Seitenketten gekoppelt werden könnte, konnte nicht erreicht werden.

3.2.3 Kopplung der Bisenoleder 55, 68 und 69 mit fluoreszenten Aziden

In Analogie zu dem BEA der ersten Generation **18** von Weißflog^[10] wurde die Bisenoleder dieser Studie mit einem Fluorophor verbunden. Aufgrund der sehr guten Erfahrungen mit dem Fluorophor DY-490^[10] wurde dieses auch in der vorliegenden Studie benutzt. Vorteile des Fluorophors sind die gute Fluoreszenzquantenausbeute, sowie sehr gute Wasserlöslichkeit. Da die Enzymassays im wässrigen Medium und auch bei schwachen Markierungsgraden oder mit geringen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden sollen, eignet sich dieses Fluorophor somit sehr gut.

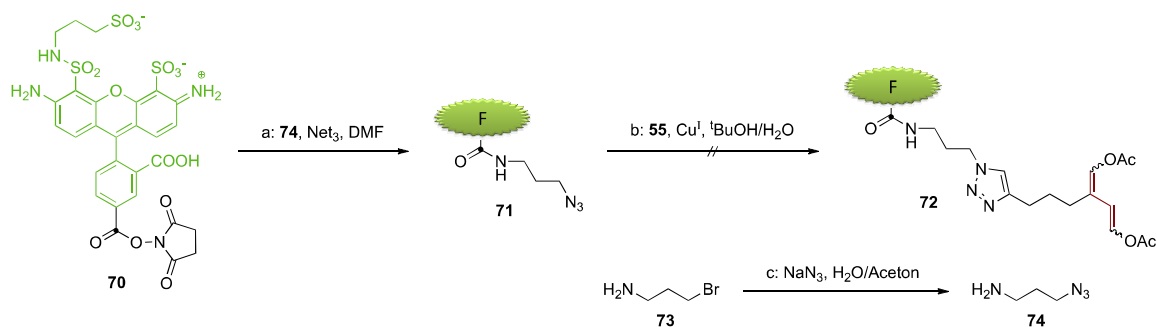


Abbildung 49: Ausgehend von dem Fluorophor **70**, das eine durch einen N-Hydroxysuccinimidester aktivierte Carbonsäure besitzt, wurde das fluoreszente Azid **71** hergestellt (a). Das dafür notwendige organische Azid **74** wurde aus 3-Aminopropylbromid (**73**) mit Natriumazid (NaN₃) unter Rückfluss in Acton hergestellt (c). Die Kopplung des Azides **71** mit dem Alkin **55** geschah unter CuAAC-Bedingungen (b), jedoch war **72** sehr instabil und konnte nicht aufgereinigt werden.

Das dafür benötigte Fluoreszente Azid **71** wurde aus der N-Hydroxysuccinimid-aktivierten (NHS-Ester) Carbonsäure **70** und 3-Azido-propylamin (**74**) hergestellt. Mittels präparativer HPLC konnte **71** mit hoher Reinheit und quantitativ erhalten wer-

den. Darauf folgend wurde das fluoreszente Azid unter Cu^{I} -Katalyse in Tertiärbutanol-Wasser-Gemisch mit BEA (**55**) zur Reaktion gebracht. Durch HPLC-MS gestützte Reaktionskontrollen konnte nach 8 h ein partieller Verbrauch von **71** und ein neuer Peak nachgewiesen werden. Dieser neue Peak hatte die gewünschte Masse von $m/z = 972$ (M^- von **72**, MS-ESI^{neg}) des Kopplungsproduktes **72**. Da nach weiteren zwei Stunden Reaktionszeit keine Erhöhung des Produktpeaks zu verzeichnen war, wurde das Reaktionsgemisch mittels präparativer HPLC-UV/Vis aufgereinigt. Die Auswertung des Protonenresonanzspektrums ergab jedoch keinerlei Hinweise auf das Bisenolacetatsystem und konnte zudem nicht eindeutig ausgewertet werden. Ebenfalls wurde bei flüssigchromatographischer Analyse dieser NMR-Probe keinerlei Produktpeak mehr detektiert, sodass davon ausgegangen wurde, dass **72** während der Aufkonzentration oder der Messung des Protonenresonanzspektrums zersetzt hat. Möglicherweise kommt es bei der Entfernung des Lösungsmittels zur säurekatalysierten Esterspaltung, da die bei der präparativen HPLC eingesetzten Eluenten 0,1 % Ameisensäure enthielten. Darum wurde in einem weiteren Syntheseansatz bei der Aufreinigung auf angesäuerte Eluenten verzichtet und die **72** enthaltenen Fraktionen mittels Festphasenextraktionskartusche (Umkehrphase) vor der Entfernung des Lösungsmittels gewaschen. Dennoch konnte auch hier nur die Zersetzung von **72** beobachtet werden. Darüber hinaus brachte auch ein Wechsel der Aufreinigung mittels Normaldrucksäulenchromatographie mit C18-modifiziertem Silicagel keine Verbesserung.

Des Weiteren wurde bei allen Syntheseversuchen von **72** ein nur unvollständiger Umsatz des Azids **71** nach mehreren Stunden festgestellt. Um die CuAAC-Katalyse zu verbessern und um die Reaktionszeiten zu verkürzen, wurde in einem weiteren Syntheseansatz Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) hinzugegeben. Dieser Ligand komplexiert das für die CuAAC notwendige Cu^{I} und bewahrt es vor der Oxidation zum katalytisch inaktiven Cu^{II} und unterstützt durch die Struktur des Komplexes mit Cu^{I} die Katalyse.^[187-189] Dennoch konnte auch hier kein vollständiger Umsatz beobachtet werden und das Produkt zersetzte sich abermals nach der Aufreinigung, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Verbindung **72** instabil ist.

Angesichts der Probleme mit dem Farbstoff DY-490 wurden alternative fluoreszente Farbstoffe auf ihre Verwendung als Fluorophor für die Bisenolester untersucht. In

der Literatur^[190] sind viele Fluorophore bekannt, welche erfolgreich für ABPP Anwendungen benutzt wurden, sodass hieraus ein Auswahl getroffen wurde. Ein Vergleich der Fluorophore mit dem Angebot einiger Chemikalienanbieter engte die Auswahl auf Tetramethylrhodamin (TAMRA) und Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) ein. Diese beiden Fluorophore wurden schon in verschiedenen Markierungsexperimenten mit Serinhydrolasen^[65,191] verwendet und sollten somit auch kompatibel mit den Zielenzymen der Bisenolester dieser Arbeit sein. Vorteil bei der Verwendung zweier strukturell unterschiedlicher Fluorophore ist zudem, dass der Einfluss des Fluorophors auf die Markierungseigenschaften untersucht werden kann.

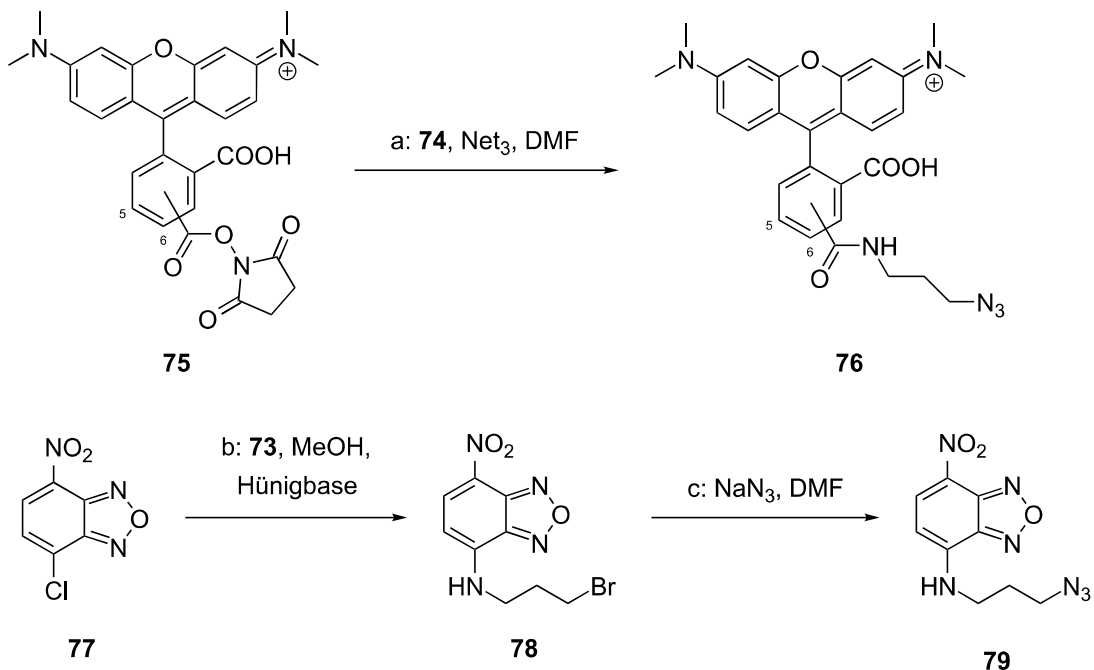


Abbildung 50: Synthese der alternativen koppelbaren Fluoreszenzfarbstoffe. Ausgehend vom N-Hydroxysuccinimidester **75** wurde ein fluoreszentes Azid **76** hergestellt. Ebenso wurde ausgehend von **77** über zwei nucleophile Substitutionsschritte das Azid **79** synthetisiert. (DMF: Dimethylformamid, Hünigbase: Diisopropylethylamin)

Da das TAMRA-Fluorophor ebenfalls als NHS-Ester zugänglich war, konnte analog zu **71** durch die Umsetzung mit **74** das gewünschte fluoreszente Azid **76** hergestellt werden (Abb. 50 Rkt. a). Zur Darstellung der anderen fluoreszenten Azids **79** wurde nach Key und Kairo vorgegangen.^[192] Der Chlorsubstituent in **77** konnte zunächst durch Reaktion mit einem primären Amin 3-Aminopropylbromid, (**73**) ausgetauscht werden, sodass in Anwesenheit von Hünigbase (Diisopropylethylamin, nicht nukleophiles Amin) ein entsprechendes Amin **78** entstand (Abb. 50 Rkt. b). Anschließend wurde

das Brom mit Natriumazid in Dimethylformamid (DMF) (Rkt. c) substituiert, sodass das gewünschte koppelbare NBD **79** dargestellt wurde.

Daran anschließend wurden die fluoreszenten Azide **76** bzw. **79** mit **55** unter Cu^{I} -Katalyse in Anwesenheit von TBTA gekoppelt. Beide fluoreszente Bisenolacetate **80** und **81** konnten quantitativ nach Reaktionszeiten von 2 h bzw. 16 h erhalten werden, wobei **80** durch Normalphasen-Säulenchromatographie aufgereinigt wurde und **81** mittels präparativer HPLC. Diese Stabilität beider BEAs der zweiten Generation, während der Synthese und Aufreinigung lässt somit den Schluss zu, dass das Bisenolacetatsystem in Kombination mit gewissen Fluoreszenten Resten instabil ist.

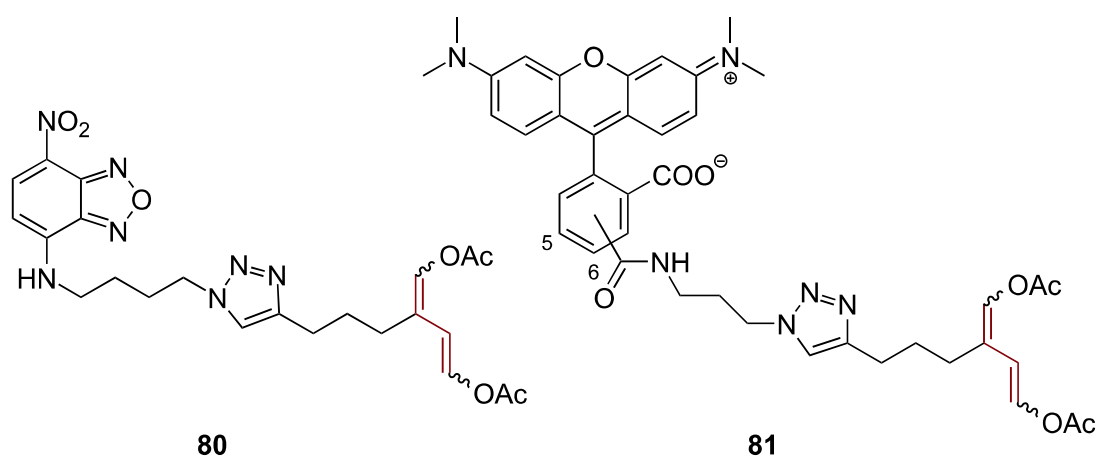


Abbildung 51: Strukturen der synthetisierten fluoreszenten Bisenolacetate.

Ferner ist das NMR-Spektrum des Kopplungsproduktes aus **55** mit dem Fluorophor **76** sehr komplex und es kommt zu einer starken Überlagerung von Signalen. Durch die vielen aromatischen Protonen und der zusätzlichen Stellungsisomerie am nicht anilierten Ring des TAMRAs kommt es zu einer Überlagerung mit dem schon komplexen Kopplungsmuster der Butadienprotonen (vgl. Abb. 48). Aufgrund dessen wurde die Auswertung der Protonenresonanzspektrum zur Strukturaufklärung von **81** indirekt und durch Vergleich mit den Protonenresonanzspektren der Ausgangsstoffe durchgeführt.

Insgesamt sind für **81** acht Isomere zu erwarten. Diese Komplexität zeigte sich vor allem im Bereich von 5,4 ppm bis 8,4 ppm, da hier kaum noch eine eindeutige Zuordnung möglich ist. Allerdings ließ sich durch das Integrale im Bereich von 5,25 ppm bis 8,5 ppm auf die Anwesenheit der notwendigen 13 Protonen schließen. Wie in Abb. 52 zu erkennen ist, überlagerten neun aromatische Protonen des TAMRA mit denen des

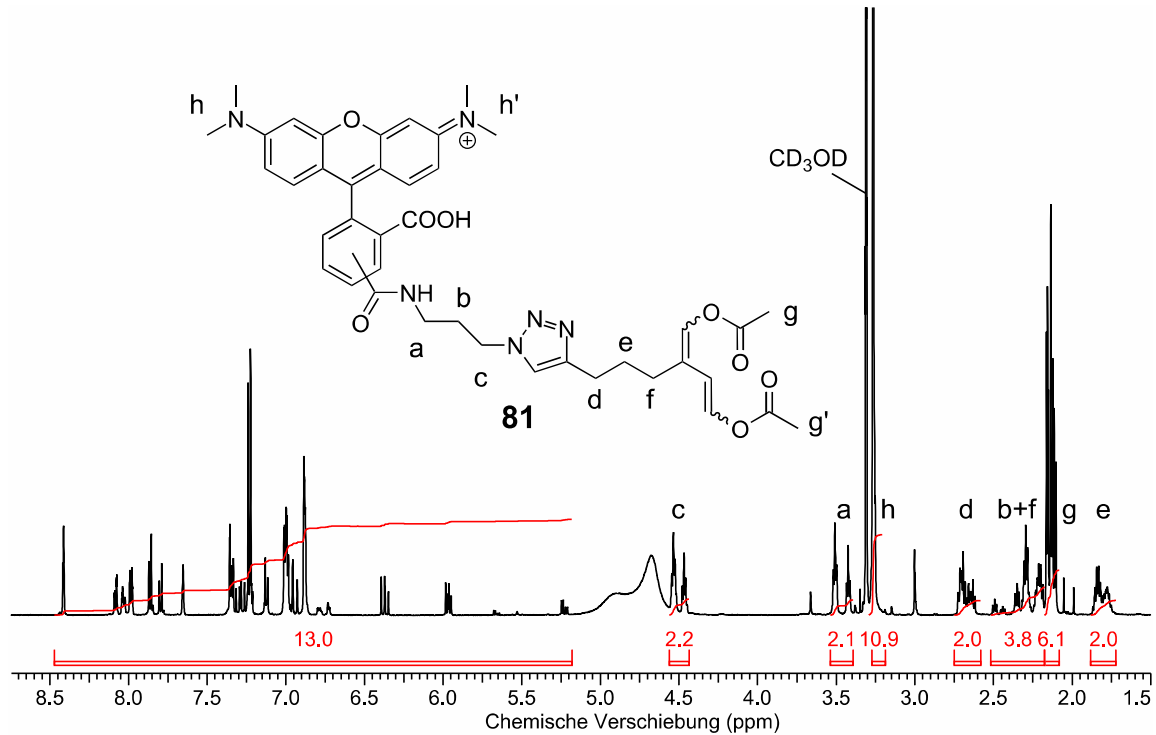


Abbildung 52: Protonenresonanzspektrum des TAMRA-BEA **81**. Da dieses aus acht Isomeren besteht kommt es zu komplexen Überlagerungen im Bereich der vinylichen und aromatischen Protonen. Die zuordenbaren Protonen sind mit Buchstaben markiert.

Triazolrings und den drei des Butadiensystems (mit vier Isomeren). Zusätzlich ließ sich erkennen, dass die Protonen **a** und **b** (Abb. 52) aufgrund der *para*- oder *meta*-Verknüpfung des nicht anilierten Rings jeweils zwei Signale erzeugen und auch die Methylenprotonen **f** durch die Konfigurationsisomerie des Butadiensystems vier Signale erzeugen. Trotzdem waren die restlichen Strukturelemente, wie die zwei aliphatischen Methylenketten durch H,H-COSY Experimente zuordenbar und auch die Präsenz der Acetatprotonen bei ca 2,25 ppm war gegeben, sodass die Richtigkeit der Struktur gesichert werden konnte.

Deutlich einfacher gestaltete sich die Auswertung des BEA **80** mit NBD-Fluorophor. Die beiden aromatischen Protonen erfahren keinerlei Überlagerung mit denen des Butadiensystemes. Durch Vergleich der Spektren der Ausgangsstoffe **79** und **55** mit dem Produkt **80** konnten alle relevanten Signale zugeordnet werden.

Mit diesem Wissen konnte anschließend die Synthese der weiteren fluoreszenten Fettsäurebisenolester vorgenommen werden. Das fluoreszente BEC **82** konnte quantitativ aus **76** und **68** unter der CuAAC Reaktion in Anwesenheit von TBTA erhalten

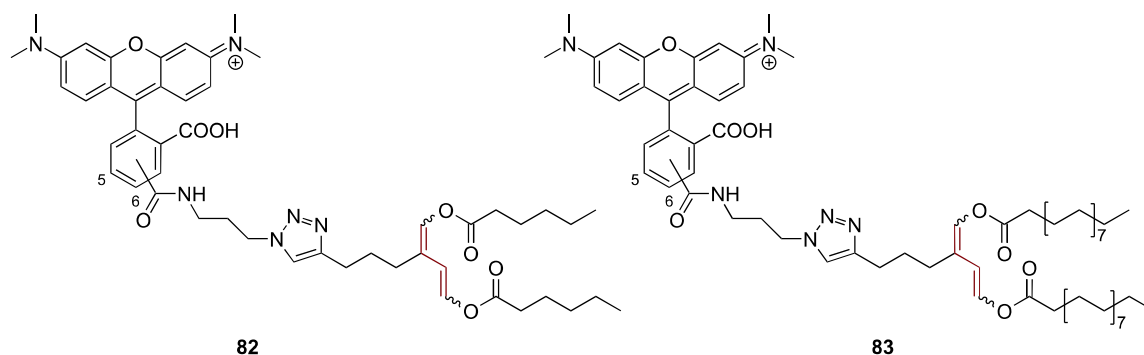


Abbildung 53: Fluoreszente Bisenolester der Capronsäure **82** und der Stearinsäure **83**.

werden. Durch die elektronenschiebenden Eigenschaften der Caproylreste kam, es im Vergleich zu **81**, zu keiner extremen Überlagerung der Signale im Protonenresonanzspektrum und die Struktur konnte bestätigt werden.

Es ergaben sich jedoch Schwierigkeiten bei der Synthese, Detektion und Aufarbeitung des Stearinsäurederivates **83**. Zur Herstellung von **83** wurden die selben Reaktionsbedingungen wie für **81**, **80** und **82** gewählt. Das Zykoadditions-Produkt von **76** und **69** adsorbiert dabei so stark an Normalphasen- und Umkehrphasensilicagel, sodass bei dieser Synthese Reaktionskontrollen über Direktinjektion in das Massenspektrum durchgeführt werden mussten. Nach 24 h Reaktionszeit wurde ein unvollständiger Verbrauch der Ausgangsstoffe **76** und **69** detektiert und zudem ein neuer Peak von $m/z = 1199$ (M^+ von **83**, MS-ESIpos) nachgewiesen. Die Reaktion wurde daraufhin abgebrochen und die Produkte aufgereinigt. Die chromatographische Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgte mittels Silicagelsäulenchromatographie, da das Reaktionsprodukt die präparative HPLC nicht passierte. Hierbei war durch die pinke Farbe von **83** zu beobachten, dass ein Großteil der Reaktionsgemisches auf dem Silicagel verblieb und nicht eluiert wurde. Mittels Direktinjektion der Fraktionen der Silicagelsäule konnte bestätigt werden, dass das vermeintliche Produkt mit $m/z = 1199$ von dem fluoreszenten Azid **76** getrennt werden konnte und 2 mg dieses Kandidaten von **83** erhalten werden konnten. Die Auswertung des Protonenresonanzspektrums ergab jedoch keine eindeutige Struktur und Verhältnisse der Integrale untereinander. So konnten Signale in vinylicischen Bereich (ca. 6 ppm bis 7,75 ppm) für das Butadiensystem gefunden werden, welche jedoch viele Signale nicht enthielten. Darüber hinaus stimmten die Integrale der intensivsten Signale der Methylgruppen des Tetramethylrhodamin-Gerüsts

und der zwei Säureketten nicht in ihren Verhältnissen zueinander. Deshalb konnte nicht bestätigt werden, dass bei der Synthese das fluoreszente BES **83** entstanden ist und isoliert wurde. Um dennoch ein Indiz auf **83** zu erhalten und Nebenprodukte auszuschließen, wurde die Synthese jeweils in Abwesenheit eines Ausgangsstoffes (**76** bzw. **69**) durchgeführt. In keinem der beiden Fälle konnte der vermeintliche Produkt-peak $m/z = 1199$ (M^+ von **83**, MS-ESIpos) detektiert werden. Darum könnte es sich bei der zuvor durchgeführten Synthese tatsächlich um das BES **83** handeln, jedoch ist dies nicht vollständig geklärt.

3.2.4 Synthese der alkylierten Bisenolacetate

Zur Synthese der nicht koppelbaren BEA mit gesättigter Seitenkette **88** und **89**, welche für Struktur-Wirkungsmechanismen der Enzyminhibition benötigt werden, wurde die Synthese von **55** adaptiert. Da die Organometallreagenzien Methylmagnesiumbromid bzw. *n*-Pentylmagnesiumbromid käuflich erhältlich waren, gestaltete sich die Synthese der Grundgerüste **84** und **85** als äußerst einfach (Abb. 54).

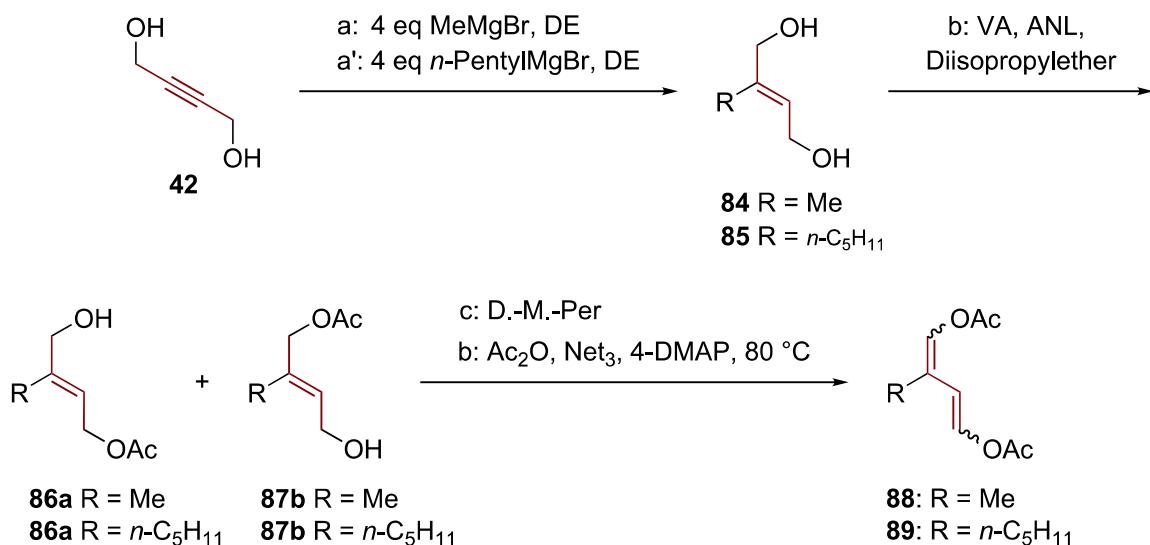


Abbildung 54: Synthese der BEA **88** und **89** mit gesättigter Seitenkette. Durch Carbomagnesierung (a) mit Methylmagnesiumbromid bzw. *n*-Pentylmagnesiumbromid von Butindiol (**42**) konnten die Grundgerüste **84** und **85** hergestellt werden, welche in Anwesenheit von Vinylacetat lipasenkatalysiert (*A. niger* Lipase, ANL) in die Monoacetate **86a** und **86b** bzw. **87a** und **87b** überführt wurde (b). Anschließend wurde die verbleibende Hydroxyfunktion mittels Dess-Martin-Periodinan oxidiert (c) und durch Enolacetylierung (d) die BEA **88** und **89** erhalten.

42 wurde in Diethylether gelöst und tropfenweise vier Äquivalente des, in Diethylether gelösten, Organometallreagenz zugegeben (Abb. 54 Rkt. a). Der Vergleich der Ausbeuten zeigte, dass sich für die Carbomagnesierung^[193] der Dreifachbindung von **42** langkettige Reste besonders eignen. So konnte **85** quantitativ erhalten werden und nicht chromatographischen von Nebenprodukten getrennt werden, da bei wässriger Aufarbeitung nur Pentan entsteht. **84** hingegen konnte nur mit 28%iger Ausbeute erhalten werden und musste daher aufgereinigt werden, um es von nicht umgesetzten **42** abzutrennen.

Als nächster Schritt wurden die Dialkohole der Transesterifizierung unterzogen (Abb. 54 Rkt. b), wobei Ausbeuten von 28 % (**87a** & **87b**) bzw. 41 % (**86a** & **86b**) erreicht wurden. Vergleicht man diese mit der Ausbeute von 75 % der Transesterifizierung des BEA mit verzweigter und sterisch anspruchsvollerer Seitenkette **107a** & **107b** wird deutlich, dass die Effektivität der Monoveresterung mit Kettenlänge der eingeführten Seitenkette steigt.

Die anschließende Enolacetylierung (Abb. 54 Rkt. c und d) wurde ebenfalls analog zu **55** durchgeführt und ergab dabei vergleichbare Ausbeuten von 45 % (**88**) und 41 % (**89**). Die Gesamtausbeuten, bezogen auf **42**, der BEA mit gesättigter Seitenkette **88** und **89** betragen 3 % bzw. 15 %.

Teil I

3.3 Reaktionen der Bisenolester mit lipolytischen Enzymen

3.3.1 Markierungsexperimente der Bisenolacetate

Um eine Vergleichbarkeit mit den Inkubationen von Weißflog^[10] zu wahren, wurden die Versuche mit den neuen Bisenolacetaten dieser Studie analog durchgeführt. Als Modellenzym wurde daher ebenfalls Esterase aus *Candida lipolytica* (CLE) und als nicht-enzymatisch aktives Kontrollprotein Ovalbumin (OVA) gewählt. Beide Proteine besitzen voneinander gut per Gelelektrophorese unterscheidbare Molekulargewichte, sowie ausreichende Reinheit und eignen sich daher gut für die Markierungsexperimente.

3.3.1.1 Selektive Markierung von *Candida lipolytica* Esterase

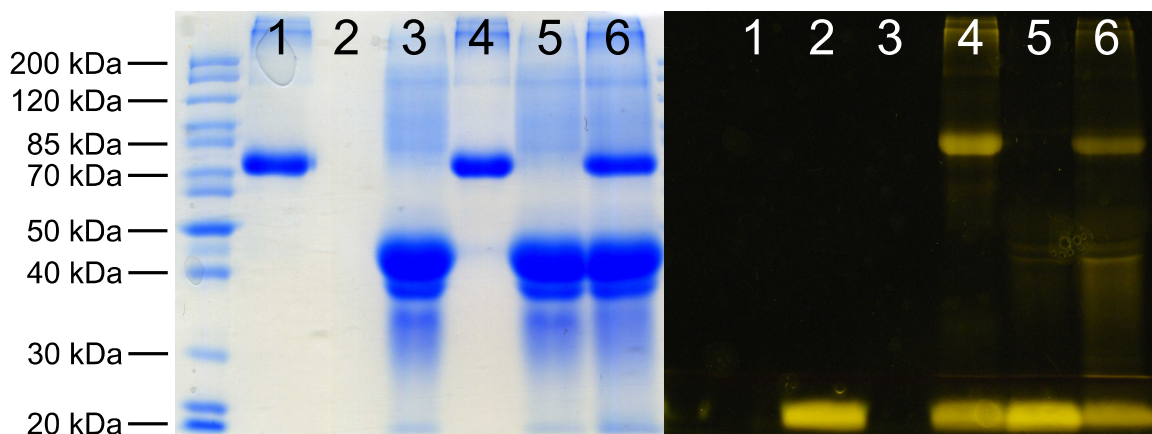


Abbildung 55: SDS-PAGE von CLE und OVA und Koinkubationen in Anwesenheit von **81**. Linkes Bild: Coomassie gefärbt; rechtes Bild: Fluoreszenzanregung bei 312 nm.

1 - CLE | 2 - **81** | 3 - OVA | 4 - CLE & **81** | 5 - OVA & **81** | 6 - CLE & OVA & **81**.

In Abbildung 55 sind die Einzelkomponenten CLE, **81** sowie OVA (Bahn 1 bis 3) und deren Kombinationen zur Bestimmung der Markierungseigenschaften von **81** abgebildet (Bahn 4 bis 6). CLE wurde in diesem Experiment bei Anwesenheit des fluoreszenten Bisenolacetates **81** markiert (Bahn 4). OVA hingegen, welches keine direkte hydrolytische Aktivität zeigt, wurde nicht in dem selben Maße angefärbt (Bahn 5).

Für die unselektive Markierung des Kontrollproteins könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein:

1. Pseudohydrolyseaktivität des OVA, welches durch das basischen Amin des Lysins hervorgerufen werden kann.
2. Sättigung der Reaktionsstellen an der Esterase. Dadurch würde die Esterase weiter **81** in den proteinreaktiven Aldehyd überführen. Dieser Aldehyd würde in das umgebende Medium entlassen und könnte mit dem OVA reagieren.
3. Die Reaktivität des durch aktive Transformation gebildeten Dialdehyden reicht nicht aus, um unverzüglich mit dem Enzym zu reagieren. Dadurch erreicht diese proteinreaktive Spezies das umgebende Medium und kann mit dem OVA reagieren.
4. Instabilität der Sonde, z. B. die spontane Hydrolyse der Enolacetateinheiten. Dadurch enthält eine Lösung von **81** schon grundsätzlich die proteinreaktive Spezies, wenn eine gewisse Lagerzeit überschritten werden würde.

Punkt 1 basiert auf den Beobachtungen von Lockridge *et al.*^[48], in denen menschliches Albumin Pseudohydrolyseaktivität gegenüber *p*-Nitrophenylacetat zeigte. Grund dieser Hydrolaseaktivität sind die basischen Aminogruppen der Aminosäure Lysin auf der Oberfläche der Proteine. Diese Aminogruppen greifen nukleophil an den Carbonylkohlenstoffen von **81** an und werden nach Spaltung des Esters selbst acyliert. Durch einen ähnlichen Mechanismus kann auch **81** pseudoenzymatisch zum Dialdehyd (der proteinreaktiven Spezies) durch Spaltung der Enolacetate, umgewandelt werden und eine unspezifische Markierung findet statt. Unterstützt wird dieser Effekt durch die, bei diesem Experiment eingesetzten, hohen Konzentrationen des Markers **81** und von OVA, da beide Konzentrationen diesen Prozess unterstützen. Diese hohen Mengen wurden jedoch eingesetzt, um mögliche Quervernetzungsprodukte der Proteine zu beobachten. Ähnlich wie im Wundverschluss von *C. taxifolia* (Kapitel 1.3.3.1) sollte CLE dabei als deacetylierende Komponente agieren, um **81** in ein Analogon von Oxytoxin 2 (**14**) zu überführen und OVA als Cytosolproteinanalogon in ein Proteinpolymer einzuschließen. Der hohe Überschuss von **81** ist deutlich an dem zum Großteil un-

reagiertem bzw. ungebundenen Rest erkennbar, der nach dem Experiment bis zur Front der Gelektrophorese wanderte (Abb. 55 Bahn 4 bis 6 im Vergleich mit Bahn 2). Trotz dieser hohen Konzentrationen von **81** und OVA konnte keinerlei Veränderung der Bandenposition des OVA beobachtet werden (Bahn 3 und 6 Abb.55). Das Verschieben der Bandenposition zu kleineren bzw. zu höheren Molekulargewichten wäre ein Indiz für intramolekulare bzw. intermolekulare Quervernetzung durch deacetyliertes **81**. Darum kann die Fähigkeit von **81**, nach Deacetylierung Quervernetzungsprodukte mit Proteinen zu bilden, in dem getesteten Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden. Die fluoreszente Markierung des OVA in Bahn 5 in Abbildung 55 spricht für einen Mechanismus, dass OVA Pseudohydrolyseaktivität besitzt, da keinerlei aktive Komponente in diesem Einzelexperiment enthalten war, die **81** in einen Dialdehyd hätte überführen können. In Bahn 6 ist die Koinkubation aller drei Komponenten abgebildet und zeigt eine bevorzugte Markierung der CLE. Dennoch ist in dieser Bahn zu erkennen, dass im Vergleich zu Bahn 5 das OVA eine höhere Fluoreszenz aufweist. Hierbei könnte sich ebenfalls die erhöhte Konzentration von **81** ausgewirkt haben, welche zum Nachweis von Quervernetzungsprodukten eingesetzt wurde. Das Enzym CLE wandelt **81** in einen proteinreaktive Dialdehyd um und erfährt daraufhin eine Sättigung der eigenen Reaktionsstellen für die Bindung mit deacetylierten **81**. Durch weitere Deacetylierung von **81** kommt es daraufhin zur Comarkierung des OVA und somit zu der erhöhten Fluoreszenz (vgl. Abb. 55 Bahn 5 und 6). Des Weiteren kann auch diskutiert werden, dass die Diffusion aus der aktiven Tasche nach enzymatischer Umwandlung weg von Enzym schneller erfolgt als die Reaktion mit Aminogruppen der CLE. Daraufhin kann enzymatisch umgewandeltes **81** in die Lösung gelangen und Comarkierung des OVA hervorgerufen werden, ohne dass die Reaktionsstellen des Enzyms gesättigt sind. Aufgrund dessen scheint bei der Betrachtung des in Abbildung 55 gezeigten Experimentes eine Kombination der Punkte 1 bis 3 aufzutreten.

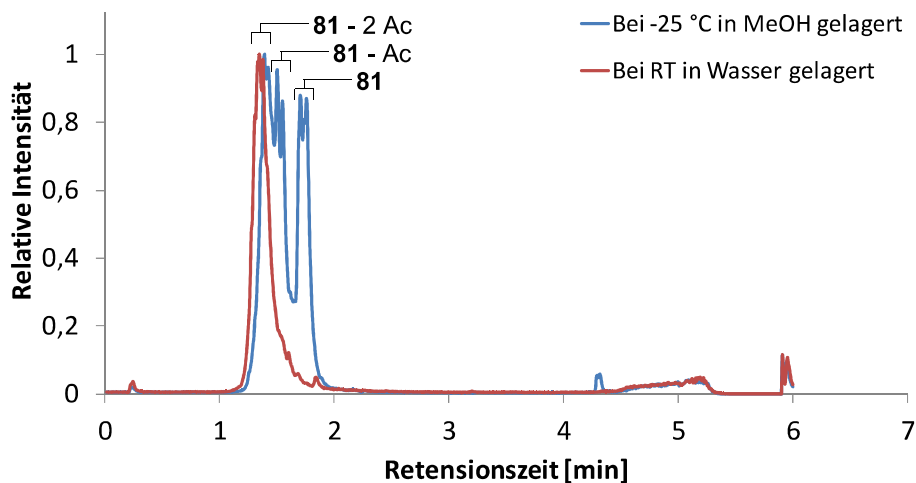


Abbildung 56: Stabilitätsprüfung von **81** nach Lagerung über Nacht unter verschiedenen Bedingungen ohne lipolytisch aktive Substanzen. Durch die Massenspuren konnten die Monoacetylierten [**81** - Ac] und auch die vollständig deacetylierten Produkte [**81** - 2 Ac] von **81** gefunden werden. (RT = Raumtemperatur)

Um Punkt 4 zu überprüfen, wurde **81** verdünnt mit Wasser über Nacht bei Raumtemperatur (RT) und verdünnt mit Methanol bei -25 °C gelagert und anschließend mittels LC-MS mögliche Abbauprodukte detektiert. Dabei konnte, in der mit Wasser verdünnten Probe, ausschließlich der Dialdehyd, welcher durch zweifache Hydrolyse der Ester von **81** entsteht, detektiert werden (Abb. 56 rote Kurve). Die methanolische, bei tiefen Temperaturen gelagerte Probe dagegen bestand aus einem Gemisch des Ausgangsstoffes und den Produkten der einfachen und zweifachen Esterhydrolyse (Abb. 56 blaue Kurve). Anscheinend sind die Estergruppen von **81** sehr labil und es entsteht nach wenigen Stunden bei Lagerung in Wasser oder Methanol der korrespondierende Dialdehyd von **81**, der für die unspezifische Markierung des OVA (Abb. 57 und 55 Bahn 5 & 6) verantwortlich ist.

Um diesen Fakt zu untermauern, dass die Autohydrolyse Grund der Comarkierung ist, wurden analoge Inkubationsexperimente mit einer frisch hergestellten Fraktion der präparativen HPLC durchgeführt. Durch diese vorgesezte Aufreinigung konnte die unerwünschte Comarkierung des OVA komplett vermieden werden, da in diesem kurzen Zeitabschnitt die Autohydrolyse keine hohen Mengen an korrespondierenden Aldehyd gebildet hat (Abb. 57 Bahn b und c). Zudem konnte Punkt 1 widerlegt werden, da die Inkubation des Kontrollproteins mit **81** ohne anwesende CLE keinerlei markierte Banden ergab (Abb. 57 Bahn b). Das in Abbildung 57 Bahn c gezeigte Experiment

zeigte ebenfalls auf, dass die Vermutungen von Punkt 2 bzw. 3 nicht bestätigt werden konnten, sofern die Konzentration der Sonde niedrig gehalten wird (in diesem Fall wurde eine fünffach geringere Menge an OVA eingesetzt und die Sonde wurde nur in einer verdünnten Lösung eingesetzt im Vergleich zum in Abb. 55 gezeigten Bild). In Bahn c ist auf der Fluoreszenzanregungsaufnahme ausschließlich die Esterase zu erkennen, das Kontrollprotein erfuhr keinerlei Markierung, obwohl die Sonde **81** durch die Esterase hydrolysiert wurde. Zusätzlich wurde ein weiteres BEA mit einem anderen Fluorophor (**80**) in analogen Inkubationen eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Instabilität durch Austausch der Fluorophors beeinflusst werden konnte. **80** zeigte dabei ein ähnliches Verhalten wie **81**, wenn es ebenfalls nicht frisch nach der präparativen HPLC eingesetzt wurde. In Abbildung 57 ist zu erkennen, dass OVA ebenfalls ohne Anwesenheit einer deacetylierenden Komponente fluoreszent markiert wird (Bahn 5). Ist jedoch auch die Esterase zugegen (Bahn 6) wird diese präferiert von der Sonde **80** fluoreszent markiert. Daher destabilisiert die Anbindung eines Fluorophors an die terminale Dreifachbindung von **55** die Enolesterbindungen. Da sehr strukturell unterschiedliche Fluorophore eingesetzt wurden, kann ausgeschlossen werden, dass eine bestimmte Eigenschaft die Destabilisierung auslöst.

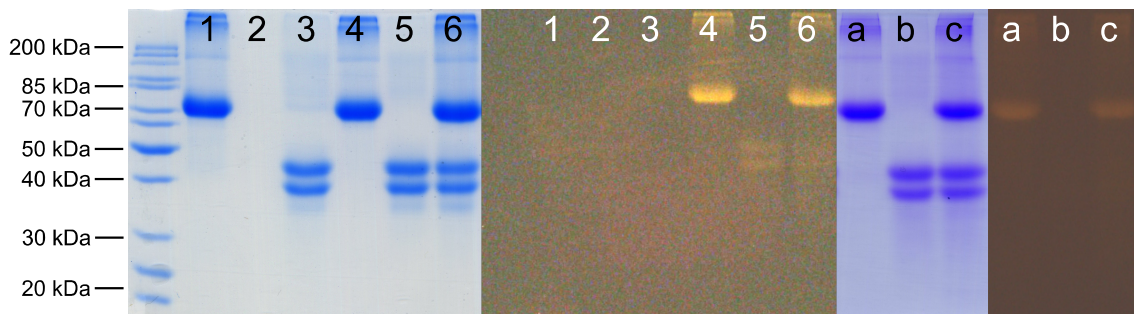


Abbildung 57: SDS-PAGE von CLE und OVA und Koinkubationen in Anwesenheit von **80** (Bahn 4 bis 6) bzw. **81** (Bahn a bis c). Jeweils helles Bild: Coomassie gefärbt; jeweils dunkles Bild: Fluoreszenzanregung mit 312 nm.

1 - CLE | 2 - **80** | 3 - OVA | 4 - CLE & **80** | 5 - OVA & **80** | 6 - CLE & OVA & **80** | a - CLE & **81*** | b - OVA & **81*** | c - CLE & OVA & **81*** (* = verdünnte Fraktion aus präparativer HPLC, welche unmittelbar nach der Chromatographie eingesetzt wurden)

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die fluoreszenten BEA **81** und **80** instabil sind und in Lösung in einen Proteinen-reaktiven Dialdehyd zerfallen, welcher dadurch eine unspezifische Markierungsreaktion eingeht.

Da diese Autohydrolyse bei dem nicht fluoreszenten BEA **55** nicht beobachtet werden konnte, wurde deren Eignung in den Inkubationsversuchen mit CLE und OVA untersucht. Da **55** keine Fluoreszenz aufweist und somit eine einfache Auswertung des Gelelektrophoresegels mittels Transilluminator nicht möglich ist, wurde das Fluorophor nachträglich in Lösung durch CuAAC verbunden, nachdem **55** mit der Esterase reagiert hatte.

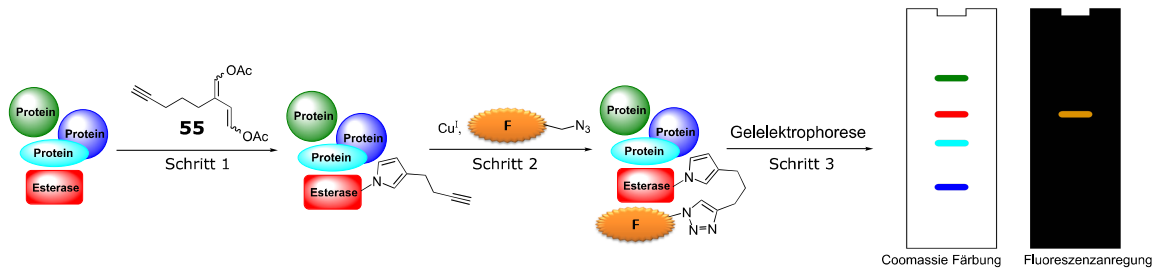


Abbildung 58: Inkubation eines Gemisches aus Proteinen und Esterasen mit dem nicht fluoreszierenden **55** (Schritt 1). Nach aktiver Deacetylierung von **55** durch die Esterase bindet **55** kovalent an die Esterase. Anschließend wird das Fluorophor mit der modifizierten Esterase durch CuAAC verbunden (Schritt 2) und kann nach einer Gelelektrophorese (Schritt 3) durch seine Fluoreszenz identifiziert werden.

Die Strategie des nachträglichen Verknüpfens des Fluorophors wird dabei im ABPP-Prinzip sehr häufig eingesetzt, da so der Einfluss sperriger Fluorophore bei der Reaktion mit Enzymen minimiert wird.^[53] Abbildung 58 zeigt die dabei durchgeführten Schritte für die Markierung von CLE. Die nicht fluoreszente Sonde **55** wurde mit CLE und OVA inkubiert, wodurch es von der Esterase deacetyliert wird und durch Pyrrolbildung an die Esterase bindet (erster Schritt). Die so mit einer Dreifachbindung ausgerüstete Esterase kann nun unter Cu^{I} -Katalyse in Anwesenheit eines fluoreszenten Azides (z. B. **76**) markiert werden (zweiter Schritt). Vor diesem Schritt kann zudem eine Denaturierung der Enzyme vorgenommen werden, um enzymatische Vorgänge zu stoppen oder die sterische Hinderung der Verknüpfung des Fluorophors zu vermeiden, wenn die Bindung von **55** und CLE an schwer zugänglichen Stellen der Esterase erfolgte. Daran anschließend wird das OVA-CLE-Gemisch einer Gelelektrophorese unterzogen und die Esterase kann identifiziert werden (dritter Schritt).

Abbildung 59 A zeigt die Inkubation von CLE und OVA mit dem nicht fluoreszenten **55**. Anschließend wurde die Inkubation in zwei Teilerperimente getrennt. Bahn a wurde ohne Weiterbehandlung für die Gelelektrophorese verwendet, wohingegen in Bahn b

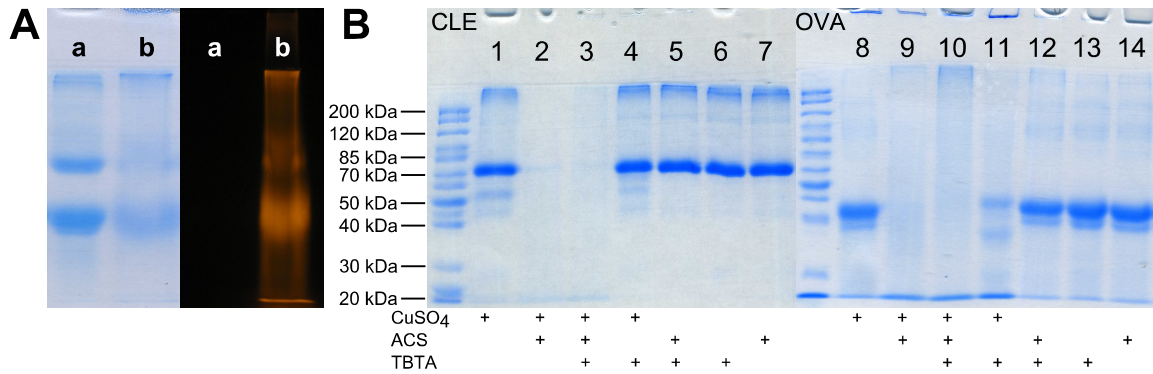


Abbildung 59: **A:** Inkubationen von CLE mit dem nicht fluoreszierendem **55** (Bahn a und b). Bahn b zeigt das Ergebnis der nachträglichen Verknüpfung des fluoreszenten Azids **76** vor der Gelelektrophorese. links: Coomassie Färbung, rechts: Fluoreszenzanregung bei 312 nm **B:** Inkubation von CLE (Bahn 1 bis 7) und OVA (Bahn 8 bis 14) mit den einzelnen Reagenzien der CuAAC. Die Tabelle unterhalb der Bilder gibt an, welche Kombination dieser Reagenzien mit dem jeweiligen Protein inkubiert wurden. Bahn 3 bzw. 10 wurden wie Bahn b behandelt. (ACS = Acetylsalicylsäure)

mittels CuAAC das Fluorophor **76** in Lösung an die abreagierten Proteine vor der Gelelektrophorese verknüpft wurde. Wie zu erkennen ist, wurden CLE und OVA durch die nachträgliche Reaktion stark verändert und/oder die elektrophoretische Separation durch die CuAAC Reaktion stark gestört. Darüber hinaus zeigte OVA eine stärkere Fluoreszenz als CLE, was im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen steht. Um zu überprüfen, welches, bei der CuAAC verwendete, Reagenz für diese Veränderung verantwortlich ist, wurden CLE und OVA mit den einzelnen Reagenzien (Abb. 59 B Bahn 1, 6 und 7 bzw. 8, 13 und 14) und deren Kombinationen (Abb. 59 B Bahn 2 bis 5 bzw. 9 bis 12) der CuAAC inkubiert. Das zur Reduktion des Kupfers eingesetzte Ascorbat (ACS) sowie das Kupfer-komplexierende TBTA oder deren Kombination haben keinerlei Einfluss auf beide Proteine (Abb. 59 B Bahn 5 bis 7 bzw. 12 bis 14). Sind jedoch Kupferionen anwesend (Bahn 1 bis 4 bzw. 8 bis 11) kommt es zu Veränderungen der Proteinbanden. Dabei scheint die Oxidationsstufe des Kupfers unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteinbanden zu haben. CLE wird durch Anwesenheit von Cu^{2+} in kleinere Fragmente (ca. 50 kDa bzw. 20 kDa) gespalten (Bahn 1 und 4). Durch Reduktion des Kupfers mit ACS wird eine vollständige Spaltung herbeigeführt und die native Bande von ca. 70 kDa ist nicht mehr nachweisbar und ausschließlich Spaltungsprodukte von ca. 20 kDa waren erkennbar (Bahn 2 und 3). Ähnlich verhält sich das OVA, wobei hier im starken Maße, zusätzlich zu niedermolekularen Fraktionen, auch hochmolekulare

Proteinfractionen generiert wurden, die nicht in das Gel eindringen (Bahn 8 und 11 Ladetaschen).

Solche Interaktionen zwischen den Reagenzien der CuAAC und Proteinen wurden intensiv von Hong im Jahre 2009 beleuchtet.^[194] Die Kupferionen können unter Anwesenheit von ACS Wasserstoffperoxid bilden,^[195] was zum Einen Seitenketten der Aminosäuren (z. B. Cystein, Methionin oder Histidin) oxidieren kann und zum Anderen auch eine oxidative Proteinspaltung bedingen kann. Dies könnte auch bei den hier getesteten Proteinen CLE und dem OVA eingetreten sein, da ebenfalls niedermolekulare Fragmente zu erkennen waren, welche in der Front der Gelelektrophorese mitgelaufen sind und ein kleines Molekulargewicht von ca. 20 kDa besaßen. Des Weiteren sind bei OVA Proteinfractionen zu erkennen, die so ein hohes Molekulargewicht besaßen, so dass diese nicht in das Gel eindringen (Abb. 59 B Ladetaschen von Bahn 8 bis 11). Des Weiteren wird ACS unter den Bedingungen der CuAAC in einen Dialdehyden überführt, welche als Proteinquervernetzer agieren und somit ebenfalls hochmolekularen Fraktionen ergeben können.^[196] Diese Quervernetzungs- und Spaltungsprobleme lassen sich auch im eingangs diskutierten Experiment finden (Abb. 59 A). Im Trenngel der Bahn b ist deutlich zu erkennen, dass sowohl hochmolekulare als auch niedermolekulare fluoreszente Proteinfractionen durch die Bedingungen der CuAAC entstanden sind. Ebenfalls sind sehr hochmolekulare fluoreszente Querverzungsprodukte entstanden, die nicht in das Sammelgel eindringen und in der Ladetasche verbleiben bzw. wenig in das Sammelgel migrierten. Aufgrund dessen scheinen die Bedingungen der CuAAC Reaktion mit den hier verwendeten Enzymen und Proteinen inkompatibel zu sein.

Um diesen Problemen zu begegnen, wurden die CuAAC Reaktion nach der Gelelektrophorese durchgeführt und die letzten der Abbildung 58 dargestellten Schritte vertauscht. Durch die vorangestellte Migration in das Gel wird eine teilweise Immobilisierung der Proteine erreicht und Bandenposition und -form wird nicht mehr durch Nebenreaktionen der CuAAC Reaktion beeinflusst. In Abbildung 60 ist dabei zu sehen, dass die Bandenposition und -form der beiden Proteine CLE und OVA sowie der Proteinleiter durch diese Prozedur nicht verändert wurde. Ferner ist auf der Fluoreszenzanregungsaufnahme in Abbildung 60 einzig die CLE zu erkennen (Bahn 4 und 6). Das enzymatisch inaktive OVA wurde nicht durch die Inkubation mit **55** (Bahn 5) mit einer

terminalen Dreifachbindung ausgerüstet und wird deshalb nicht mit dem Fluorophor verknüpft. Darüber hinaus konnte durch das Ausbleiben einer Markierung in Bahn 5 und der Proteinleiter nicht spezifische Bindungen ausgeschlossen werden, die zum Beispiel durch koordinative Bindung des Kupfers an Protein und fluoreszenten Azid erfolgen könnten. Ebenfalls wurde keinerlei Comarkierung des OVA nachgewiesen, wenn **55** aktiv durch CLE in die Protein-reaktive Form überführt wurde (Bahn 6), so dass die Deacetylierungsprodukte von **55** durch die räumliche Nähe zu Ihrem Ort des Entstehens (aktive Tasche der CLE) unverzüglich mit der Esterase reagieren. Ein Entlassen der Deacetylierungsprodukte von **55** in die umgebende Lösung, die mit dem Kontrollprotein reagieren könnten, scheint somit nicht zu erfolgen.

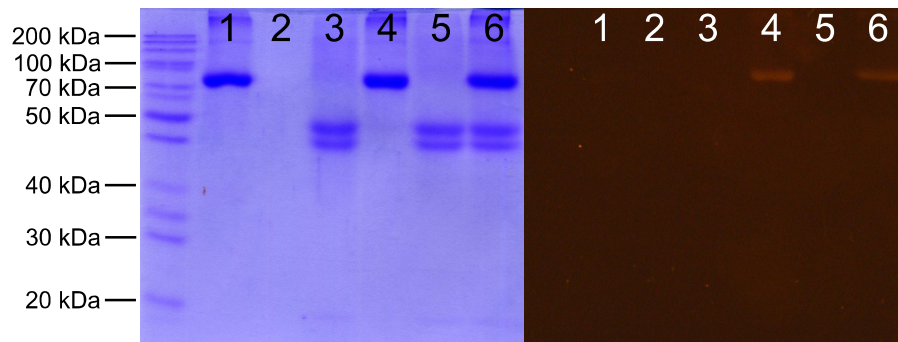


Abbildung 60: Inkubationen von CLE mit dem nicht fluoreszenten **55**. Nachträglich wurde das Fluoreszente Azid **76** nach der Elektrophorese im Gel verknüpft. Linkes Bild: Coomassie gefärbt; rechtes Bild: Fluoreszenzanregung bei 312 nm

1 - CLE | 2 - **55** | 3 - OVA | 4 - CLE & **55** | 5 - OVA & **55** | 6 - CLE & OVA & **55**

Da für die selektive Markierung von CLE in Anwesenheit von OVA mit **55** keinerlei vorangestellte Aufreinigungsschritte durchgeführt wurden, scheint aus der Kopplung des BEAs **55** mit den fluoreszenten Aziden **76** bzw. **79** labile Verbindungen zu entstehen. Die daraus resultierenden fluoreszenten BEA **80** bzw. **81** zerfallen dabei innerhalb weniger Stunden zu proteinreaktiven Dialdehyden und sorgen für die unspezifische Markierung des OVA. Dies ist sehr verwunderlich, da von Weißflog ein, dem in dieser Studie sehr ähnliches Fluorophor eingesetzt wurde. Dieses war über einen langen Zeitraum stabil, in dem es keine starke Autohydrolyse zeigte und somit keine enzymatisch inaktive Proteine markierte.^[10] Darüber hinaus zeigten beide, hier eingesetzt Fluorophore in anderen Studien^[65,191], dass diese zur Markierung von Serinhydrolasen geeignet sind, sodass diese Instabilität exklusiv für die hier vorgestellten fluoreszenten BEAs **80** und **81** gilt.

3.3.1.2 Unterscheidung von Esterasen und Lipasen

Weißflog konnte in seiner Studie zeigen, dass das fluoreszente BEA mit sekundärer Acetatgruppe **18** eine selektive Sonde für Esterasen darstellt, wohingegen Lipasen von **18** nicht markiert werden, obwohl LC-MS gestützte Analysen gezeigt haben, dass beide Enzymklassen **18** in einen proteinreaktiven Dialdehyd überführen.^[10] Um die Präferenz, Lipasen und/oder Esterasen zu markieren, auch für die neuen BEA zu untersuchen, wurden analog zu Weißflog drei Esterasen und vier Lipasen mit **81** inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert. Um auch hier die unselektive Markierung auszuschließen, welche durch Autohydrolyse des fluoreszenten BEA ausgelöst wird, wurde **81** für nachfolgenden Experimente stets unmittelbar aufgereinigt.

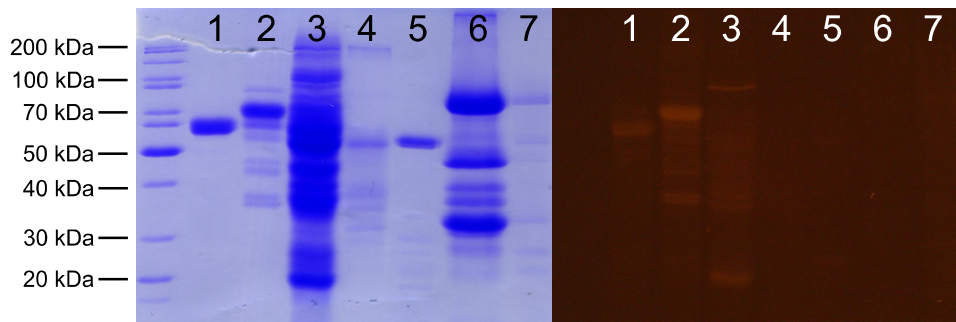


Abbildung 61: Vergleich der Inkubation von TAMRA-BEA (**81**) mit Esterasen (1-3) bzw. Lipasen (4-7) aus folgenden Organismen: 1 - Wildschweinleber | 2 - Schweineleber | 3 - Pferdeleber | 4 - *Rhizopus arrhizus* | 5 - *Rhizopus niveus* | 6 - Schweinepancreas | 7 - *Aspergillus niger* Linkes Bild: Coomassie gefärbt; rechtes Bild: Fluoreszenzanregung bei 312 nm

Wie in Abbildung 61 zu erkennen ist, konnten durch **81** nur Esterasen (Bahn 1 bis 3) fluoreszent markiert werden, wohingegen die Lipasen (Bah 4 bis 7) nicht auf der Fluoreszenzanregungsaufnahme zu erkennen sind. Dabei zeigt sich in den Bahnen 2 und 3 die Selektivität von **81**. In diesen beiden Bahnen sind eine Vielzahl an Proteinen zu erkennen (siehe CBB Färbung), die allerdings nicht alle fluoreszent markiert wurden. Ein Vergleich der ungefähren Molekulargewichte der Fluoreszenten Banden in Bahn 3 mit der NCBI Datenbank³ unter dem Stichwort horse esterase zeigte Übereinstimmung mit der in dieser Bahn markierten Banden. So könnte die Untere von ca. 20 kDa einer Esterase mit 189 Aminosäuren zu geordnet werden. Im Bereich

³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>, Zugriff am 22.11.2013

von 35 - 100 kDa sind sehr viele Esterasen sowohl in der Fluoreszenzaufnahme, als auch in der NCBI-Datenbank zu finden, wobei die obere sehr ausgeprägte Bande einer Esterase mit über 1000 Aminosäuren zugeordnet werden könnte. Eine Datenbanksuche nach Schwein-assoziierten Esterasen in der NCBI-Datenbank ergibt ebenfalls mögliche Treffer für die in Bahn 2 fluoreszent markierten Banden. All diese Vermutungen müssten allerdings durch weitere Experimente, wie z. B. 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Sequenzierung, untermauert werden. Jedoch unterstreicht die fehlende Markierung einiger Proteine in Bahn 2 und 3 die Selektivität der Sonde **81**. Weiterhin sind auch in den getesteten Lipasenpräparationen mehrere Proteine enthalten, wobei nur eine oder wenige Banden den Lipasen zuzuordnen wären. Vor allem in der in Bahn 6 aufgetragenen Lipasenpräparation, aus Schweinepankreas ist dies zu erkennen. Trotz dieser Vielzahl an Proteinen ist keine Comarkierung zu erkennen.

Da eine aktive Deacetylierung von **81** durch die Hydrolasen und Weiterreaktion nach dem postulierten Mechanismus der Pyrrolbildung notwendig für die Markierung der Enzyme ist, wurde mittels LC-MS überprüft, ob die unterschiedliche Substratspezifität der Lipasen und Esterasen für die in Abbildung 61 gezeigte Unterscheidung verantwortlich ist. Wie in Tabelle 2 ersichtlich, akzeptieren alle der hier getesteten Hydrolasen **81** als Substrat und setzten dieses zu monodeacetylierten ($[M-Ac]^+$) bzw. zum vollständig deacetylierten Produkt ($[M-2Ac]^+$) um. Bis auf die Esterase aus Schweineleber, die eine hohe Hydrolyseaktivität gegenüber **81** zeigt, hydrolysierten die getesteten Hydrolasen favorisierend eine Estergruppe. Da in der Kontrolle ohne Enzym nur extrem kleine Mengen an Deacetylierungsprodukten gefunden wurden, sind diese Spaltungsprodukte auf aktive Transformation durch die Hydrolasen zurückzuführen und nicht der zuvor diskutierten Autohydrolyse. Darüber hinaus wurde jeweils nur eine kleine Menge an Enzym relativ zur Sonde **81** eingesetzt, da vor allem die Esterasen den korrespondierenden Dialdehyden von **81** konsumieren würden, welcher somit nicht mittels LC-MS detektiert werden könnte.

Mittels LS-MS ist es jedoch nicht möglich zu unterscheiden, an welcher Position und von welchem Konfigurationsisomer die Acetatgruppe in **81** abgespalten wurde. Möglicherweise wird in diesem Experiment die Acetatgruppe hydrolysiert, welche in die aktive Tasche der einzelnen Enzyme am besten hineinpasst und somit am wenigsten

Tabelle 2: Deacetylierungsprodukte nach 10 min von **81** in Anwesenheit verschiedener Hydrolasen. Zur semiquantitativen Einschätzung wurde die Höhe der Peaks der Massenspuren der Deacetylierungsprodukte der LC-MS Messung verwendet.

Hydrolase	m/z = 749 [M] ⁺	m/z = 707 [M-Ac] ⁺	m/z = 665 [M-2Ac] ⁺
<i>C. lipolytica</i> Esterase	+	+++	+
Wildschweineleberesterase	+	+++	+
Schweineleberesterase	-	+	+++
Pferdeleberesterase	+	+++	+
<i>A. niger</i> Lipase	-	+++	+++
Schweinepancreas Lipase	-	+++	+
<i>R. niveaus</i> Lipase	+	+++	+
<i>R. arrhizus</i> Lipase	+	+++	+++

sterisch gehemmt ist. Aufgrund dessen ist es möglich, dass bei zeitlicher Weiterführung des Experimentes der Anteil an zweifacher Esterspaltung erhöht werden würde.

Das jedoch in allen Experimenten die Anwesenheit des vollständig deacetylierten Produktes nachgewiesen werden konnte überrascht, da dieses in der Lage wäre mit den Enzymen oder anderen Proteinen zu reagieren. Jedoch zeigen die Elektrophoresebilder (siehe Abb. 61), dass ausschließlich Esterasen fluoreszent markiert werden. Somit ist die aktive Esterspaltung von **81** durch eine Hydrolase keine zwingende Voraussetzung für die Markierung des Enzyms. Diese Transformation ist notwendig um die Bisenolester (z. B. **81**) in einen aktiven Dialdehyden zu überführen, welcher jedoch Reaktionsstellen am Enzym vorfinden muss. Dennoch kann keine Aussage getroffen werden, wie das vollständig Deacetylierte Produkt ([M-2Ac]⁺) in der Lösung abreagiert und keine Reaktion mit anderen Proteinen eingeht, da Folgeprodukte des korrespondierenden Dialdehyden von **81** nie detektiert wurden.

3.3.2 Markierungsexperimente der Fettsäurebisenolester **82** und **83**

Nach allgemeiner Definition hydolisieren Lipasen Ester von Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von über vier Kohlenstoffen bevorzugt. Durch den Austausch der kurzketigen Acetate (**81**) gegen die Fettsäuren Capronsäure und Stearinsäure in **82** bzw. **83** sollte die Möglichkeit der Verwendung dieser Bisenolfettsäureester als lipasenselektive Sonden untersucht werden.

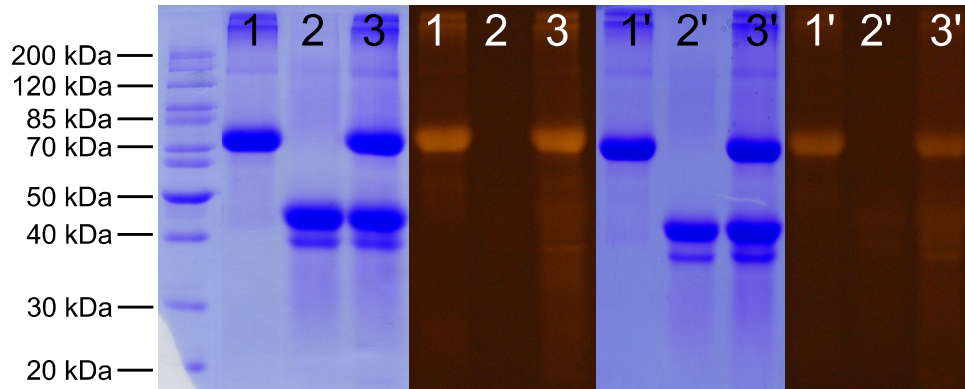


Abbildung 62: Vergleich der CLE-Markierung mit frisch HPLC aufgereinigten **82** (Bahn 1 bis 3) und einer drei Wochen alten Fraktion der HPLC Aufreinigung von **82** (Bahn 1' bis 3'). 1 - CLE & **82** | 2 - OVA & **82** | 3 - CLE & OVA & **82** | 1' - CLE & **82** | 2' - OVA & **82** | 3' - CLE & OVA & **82**. Jeweils das linke Bild zeigt die Anfärbung aller Proteine mit CBB, wohingegen das jeweils rechte Bild der Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 312 nm entspricht.

Interessanterweise zeigte das Bisenolcapronat (BEC) **82** ein mit dem BEA **81** vergleichbares Markierungsverhalten (vgl. Abb. 55 Bahn 4 bis 6 mit Abb. 62 Bahn 1 bis 3). So wurde ebenfalls selektiv CLE durch **82** markiert (Bahn 1 in Abb. 62), auch wenn das Kontrollprotein anwesend war (Bahn 3 in Abb. 62) und die unerwünschte Comarkierung des OVA blieb aus, wenn keine Esterase anwesend war (Bahn 2 in Abb. 62). Gleiches gilt ebenfalls für die in-gel Verknüpfung des fluoreszenten Farbstoffes nach einer Markierung von CLE mit **68**. Auch hier wird CLE analog zu den Experimenten, wie sie mit **55** durchgeführt wurden, selektiv markiert und das Kontrollprotein bleibt weitestgehend unmarkiert (Abb. 63).

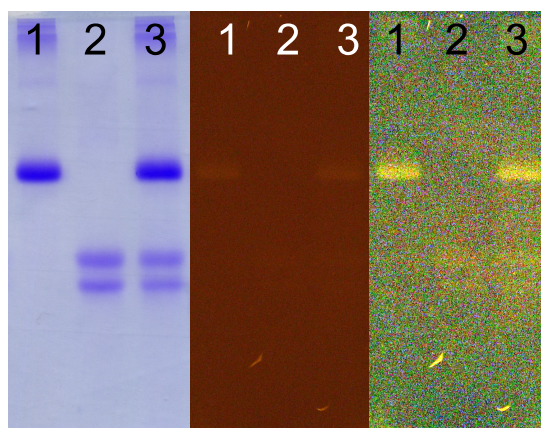


Abbildung 63: Inkubationen von CLE mit dem nicht fluoreszenten **68**. Nachträglich wurde das fluoreszente Azid **76** nach der Elektrophorese im Gel verknüpft. Linkes Bild: Coomassie gefärbt; mittleres Bild: Fluoreszenzanregung bei 312 nm; rechtes Bild: Nachbearbeitung des mittleren Bildes durch Kontrasterhöhung und Farbmanipulation.
1 - CLE & **68** | 2 - OVA & **68** | 3 - CLE & OVA & **68**.

Darüber hinaus wies das langkettigere **82** eine erhöhte Stabilität verglichen mit **81** in Lösung auf. Die langkettige Sonde **82** zeigte nach dreiwöchiger Lagerung bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methanol nur geringe Senkung der Selektivität gegenüber CLE (Abb. 62 Bahn 1'-3'). Nach dieser sehr langen Lagerung wurde OVA durch **82**, ohne Anwesenheit einer Esterase, in ein einem, nur sehr geringen Maße fluoreszent markiert (Abb. 62 Bahn 2). LC-MS Messungen der dafür verwendeten Lösung von **82** bestätigten dies, da nur sehr geringe Anteile von Monodecaproylierten und nah an der Nachweisgrenze detektierbaren Mengen des vollständig Decaproylierten Produkt (welches die postulierte Proteinreaktive Verbindung darstellt) gefunden wurden.

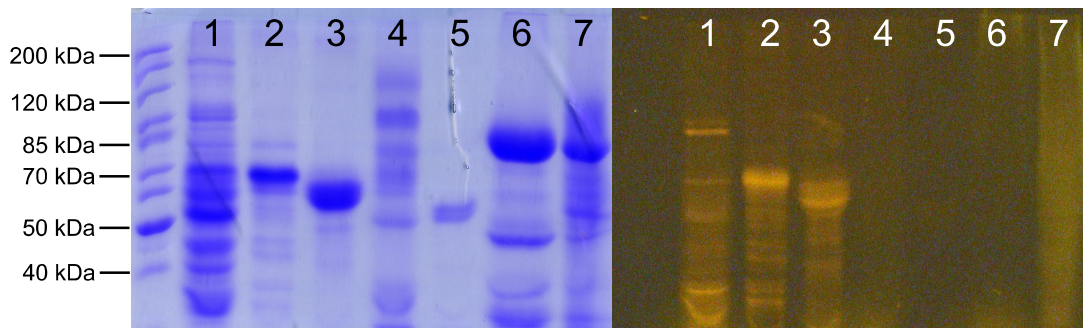


Abbildung 64: Vergleich der Inkubation von TAMRA-BEC (**81**) mit Esterasen (1-3) und Lipasen (4-7). 1 - Pferdeleber; 2 - Schweineleber; 3 - Wildschweinleber; 4 - *A. niger*; Bahn 6 - Schweinepancreas; 5 - *R. niveus*; 7 - *R. arrhizus*. Linkes Bild: Anfärbung aller Proteine mit CBB, rechtes Bild: Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 312 nm.

Ebenfalls konnten Unterschiede in der Diskriminierung von Esterasen und Lipasen erkannt werden (Abb. 64). So sind sehr viele Banden bei Verwendung des Capronates **82** zu erkennen, die aber deutlicher erkennbarer sind als beim korrespondierenden Acetat (**81**). Allerdings deckten sich die Beobachtungen beider Bisenolester **81** und **82** bei der Unterscheidung von Lipasen (Bahn 4 bis 7 in Abb. 64) und Esterasen (Bahn 1 bis 3 in Abb. 64). Eine Ausnahme bildete die Inkubation von *R. arrhizus* Lipase mit **82**, in der ein langgezogener fluoreszenter Schleier erkennbar ist, der jedoch keiner definierten Bande zugeordnet werden konnte. Zudem konnte dieser Schleier nur unvollständig durch CBB angefärbt werden, was den Schluss zulässt, dass es sich hierbei nicht um Proteine, sondern um andere Zellbestandteile handeln könnte oder Trennprobleme während der Gelelektrophorese auftraten.

Auch für die Caproylderivat **82** wurden LC-MS Messungen der Inkubation mit den verwendeten Hydrolasen vorgenommen, um Abbau- bzw. Decaproylierungsprodukte

zu untersuchen. Tabelle 3 zeigt dabei, dass alle getesteten Hydrolasen **82** als Substrat akzeptieren und zu mono- ($[M\text{-Cap}]^+$) und vollständig decaproylierten ($[M\text{-2Cap}]^+$) Produkten umsetzen. Auffällig ist auch hier, dass bevorzugt nur ein Ester von den Hydrolasen gespalten wird, aber im Vergleich mit dem BEA **81** (vgl. Tab. 2) ein anderes Spaltungsmuster aufweisen. Direkte Rückschlüsse können hier jedoch nicht gezogen werden, da auch bei **82** wie bei **81** nicht sicher ist, wie und ob das Produkt der vollständigen Esterspaltung ($m/z = 665$) in der Lösung abreagiert.

Tabelle 3: Decaproylierungsprodukte von **82** in Anwesenheit verschiedener Hydrolasen (Cap = Caproyl)

Hydrolase	$m/z = 861$ $[M]^+$	$m/z = 763$ $[M\text{-Cap}]^+$	$m/z = 665$ $[M\text{-2Cap}]^+$
Pferdeleberesterase	-	+++	+
Schweineleberesterase	-	-	++
Wildschweineleberesterase	-	+	++
<i>A. niger</i> Lipase	+	+++	++
Schweinepancreas Lipase	-	++	++
<i>R. niveaus</i> Lipase	+++	+++	+
<i>R. arrhizus</i> Lipase	+++	+++	+

Da eine Verlängerung der Säurereste von zwei (**55**) auf sechs (**68**) Kohlenstoffe keine Veränderung der Reaktivität erbrachte, wurde nun das Stearinsäurederivat **83** auf seine Markierungseigenschaften untersucht. Allerdings ergaben Inkubationen des Bisenolsteirates (BES) **83** mit CLE und Lipasen aus *Candida antarctica*, Schweinepancreas bzw. *R. niveaus* keinerlei signifikante Markierung der Hydrolasen und auch keine des Kontrollproteins OVA (siehe Abb. 65).

Dadurch, dass das Bisenolsteirat **83** nur per Direktinjektion untersucht werden konnte, war die Erstellung des Deacetylierungsmusters nur eingeschränkt möglich. Durch Schwankungen der Spritzenpumpe, welche zur Direktinjektion benutzt wurde, ist die quantitative Auswertung nicht möglich und konnte lediglich qualitativ vorgenommen werden. So wurde durch *C. lipolytica* Esterase und Schweinepancreaslipase keine komplette Destearoylisierung beobachtet, jedoch konnte ein einfach gespaltenes Produkt bei $m/z = 930,5$ detektiert werden. *R. niveaus* Lipase hingegen zeigte einen vollständigen Abbau des Ausgangsstoffes ($m/z = 1198 [M+H]^+$ bzw. $m/z = 1220 [M+Na]^+$). In diesem Experiment konnte nur noch das Signal mit $m/z = 665,3 [M+H]^+$ detektiert

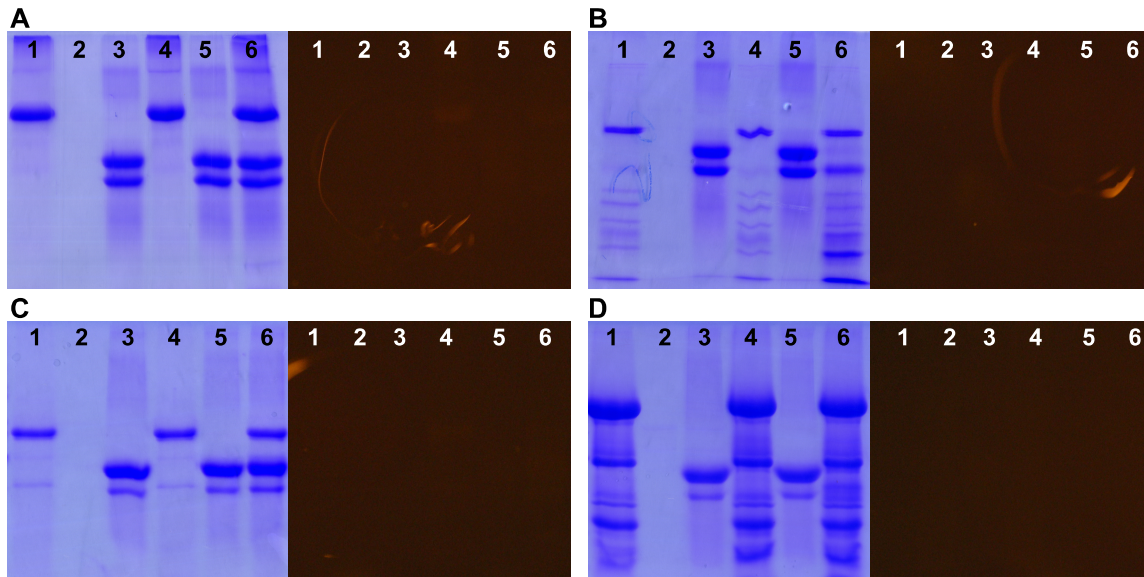


Abbildung 65: Inkubationsexperimente von vier verschiedenen lipolytischen Enzymen mit dem BES **83** in An- und Abwesenheit von OVA. **A:** *C. lipolytica* Esterase, **B:** Lipase aus Schweinepankreas; **C:** *C. antarctica* Lipase; **D:** *R. niveaus* Lipase. Die teilweise sichtbaren Artefakte auf den Fluoreszenzanregungsaufnahmen sind durch Reflexionen in der Linse der Kamera entstanden.

1 - Enzym | 2 - **83** | 3 - OVA | 4 - Enzym & **83** | 5 - OVA & **83** | 6 - Enzym & OVA & **83**.
Jeweils links: CBB Färbung aller Proteine; rechts: Fluoreszenzanregung bei 312 nm.

werden, welches auch bei den Deacetylierungen von **81** und **82** gefunden wurde und dem Dialdehyd entspricht. **83** wird daher ebenfalls wie seine kurzkettigeren Analogons **81** bzw. **82** durch die verwendeten Hydrolasen destearolysiert. *C. lipolytica* Esterase scheint einen sehr geringe Anteil an Dialdehyden zu bilden, um eine Markierung zu erreichen. Die untersuchten Lipasen hingegen bilden zwar einen höheren Anteil an Dialdehyden, der eine Markierung auslösen könnte, jedoch wird wie bei **81** und **82** dadurch die Lipase nicht markiert.

Es sei jedoch angemerkt, dass die Struktur des fluoreszenten Bisenolstearates (**83**) nicht restlos geklärt werden konnte und nur auf der indirekten Bestimmung der Masse mit HR-MS beruht, sodass es bei diesen Ergebnissen weiterer Aufklärung bedarf. Die Tatsache, dass **83** von lipolytischen Enzymen umgesetzt wird und einfache sowie zweifache Hydrolyseprodukte gebildet werden, unterstützt jedoch den Strukturvorschlag von **83**.

3.3.3 Visualisierung der Esterasen im Proteom von *Yarrowia lipolytica*

Alle bisher durchgeführten Markierungsexperimente wurden mit artifiziellen Proteinmischungen durchgeführt, die nicht ein normales Anwendungsfeld einer ABPP Sonde widerspiegelt. Um jedoch anwendungsorientierte Experimente durchzuführen und Einflüsse einer komplexen biologischen Matrix auf die Markierungseigenschaften der Bisenolester zu beleuchten, wurde die Experimente mit dem Proteom von *Y. lipolytica* (früher *Candida lipolytica*) durchgeführt. Dieser Hefepilz ist leicht zu kultivieren und die zellulären Proteine können einfach durch Ultraschallbehandlung der Zellen gewonnen werden. Darüber hinaus können Vergleiche mit der durch die Sonden **81** und **82** fluoreszent markierte Banden mit der käuflich erwerbbaaren *C. lipolytica* Esterase gezogen werden.

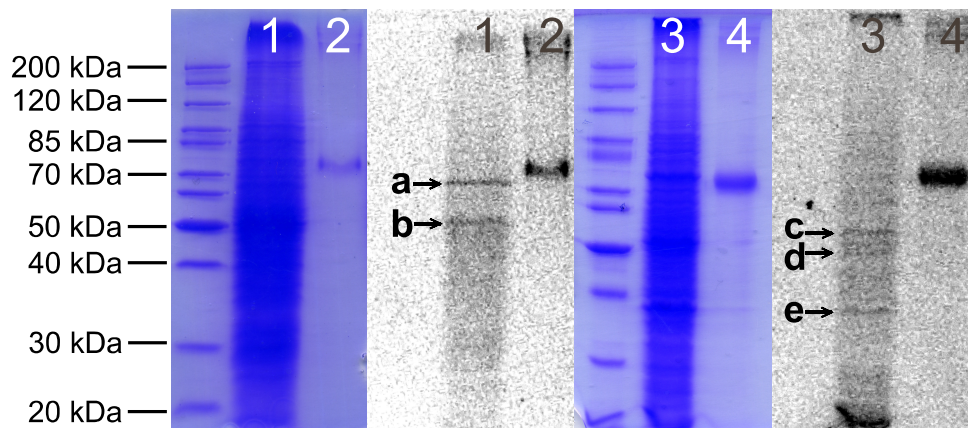


Abbildung 66: Inkubationen des Rohextrakts aus *Y. lipolytica* mit **81** (Bahn 1) und **82** (Bahn 3) im Vergleich mit der käuflich erwerbbaaren *C. lipolytica* Esterase, welche durch **81** (Bahn 2) und **82** (Bahn 4) fluoreszent markiert wurde. Die Konzentration von *C. lipolytica* Esterase wurde in diesem Experiment deutlich verkleinert, da diese Bande sonst die im Proteom von *Y. lipolytica* markierten Banden überstahl hätte. Die Pfeile zeigen auf, die im Proteom von *Y. lipolytica* markierten Esterasen.

1 - *Y. lipolytica* Extrakt & **81** | 2 - CLE & **81** | 3 - *Y. lipolytica* Extrakt & **82** | 4 - CLE & **82**.
Jeweils das linke Bild ist die Anfärbung aller Proteine mit CBB, wohingegen das jeweils rechte Bild der Fluoreszenzaufnahme mit Anregung bei 312 nm entspricht.

Wie in Abbildung 66 zu erkennen ist, beinhaltet der Rohextrakt aus dem Hefepilz eine enorme Anzahl an verschiedenen Proteinen (Bahn 1 und 3 in Abb. 66). Trotz dieser vielen Proteinen bzw. Enzymen konnte in der Fluoreszenzaufnahme nur zwei durch **81** (Bahn 1 Banden a und b) und drei Banden durch **82** (Bahn 3 Banden c bis e) markierte Banden detektiert werden. Ein Vergleich dieser, durch die Sonden markierten Banden mit der kommerziell erhältlichen *C. lipolytica* Esterase (Bahn 2 und 4) zeigte, dass beide

Sonden unterschiedliche Banden im Proteom von *Y. lipolytica* markierten oder es kam durch die starke Überladung des Gels in eines der Inkubationsexperimenten zu einer Bandenverschiebung. Ein Vergleich der fluoreszent Markierten Banden a und b mit der Datenbank NCBI⁴ förderte mehrere Treffer für Esterasen mit einem vergleichbaren Molekulargewicht zu Tage, die als Indizien für eine Markierung von Esterasen gewertet werden könnten. Dabei könnten den Banden a und b Esterasen von ca. 53 kDa und ca. 75 kDa mit 478 bzw. 679 Aminosäuren zugeordnet werden und die Banden c bis e, welche durch die Inkubation des Proteoms von *Y. lipolytica* mit dem länger-kettigen **82** entstanden, konnten so ebenfalls Esterasen mit einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa, ca. 51 kDa und ca. 39 kDa (478, 456 und 370 Aminosäuren) zugeordnet werden. Darüber hinaus sind auch noch weitere, aber sehr gering markierte Banden zu erahnen, was sich mit der großen Anzahl der in *Y. lipolytica* bekannten Hydrolasen deckt. Des Weiteren erbrachte der Vergleich der im Proteom von *Y. lipolytica* markierten Banden (Bahn 1 und 3) mit der käuflich erwerb-baren *C. lipolytica* Esterase (Bahn 2 und 4) keine Übereinstimmung. Die Esterasen im Proteom haben demnach keine oder nur sehr wenig Homologie mit der käuflich erwerb-baren *C. lipolytica* Esterase, oder die große Überladung des Gels durch die Vielzahl an Proteinen in *Y. lipolytica* haben eine Bandenverschiebung zur Folge. Diese Schätzungen können jedoch nur als Indiz gewertet werden und dennoch konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass eine gewisse Spezifität der beiden Sonden **81** und **82** zugesprochen werden kann, da viele der in *Y. lipolytica* enthaltenen Proteine nicht markiert wurden und beide Sonden (**81** und **82**) auch in komplexen biologischen Matrices angewendet werden können.

3.3.4 Lokalisierung der Bindungsstellen der Bisenolester an Esterasen

In den vorherigen Kapiteln wurde mittels fluoreszenter Markierung und Gelelektrophorese belegt, dass die BEA **55** und **81** sowie die BEC **68** und **82** selektive Sonden für Esterasen sind. LC-MS Analysen des Überstandes der Reaktion der fluoreszenten Bisenolester mit verschiedenen lipolytischen Enzyme zeigten darüber hinaus, dass sowohl Esterasen, als auch die nicht markierten Lipasen die Bisenolester in die postulierte proteinreaktive Spezies (Dialdehyd) überführen. Aufgrund dessen war es notwendig

⁴<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>, Zugriff am 22.11.2013

den Markierungsmechanismus detaillierter zu betrachten und somit einen direkten Hinweis auf die Reaktion der Esterasen mit den Sonden zu erlangen und Rückschlüsse zu erhalten, warum eine Reaktion mit Lipasen nicht stattfindet. Dafür wurde die Proteinsequenz einer durch **55** modifizierten, sowie unmodifizierten Esterase benötigt. Durch vergleichende Analytik lässt sich daraus die Reaktion der Bisenolester mit den Esterasen ableiten.

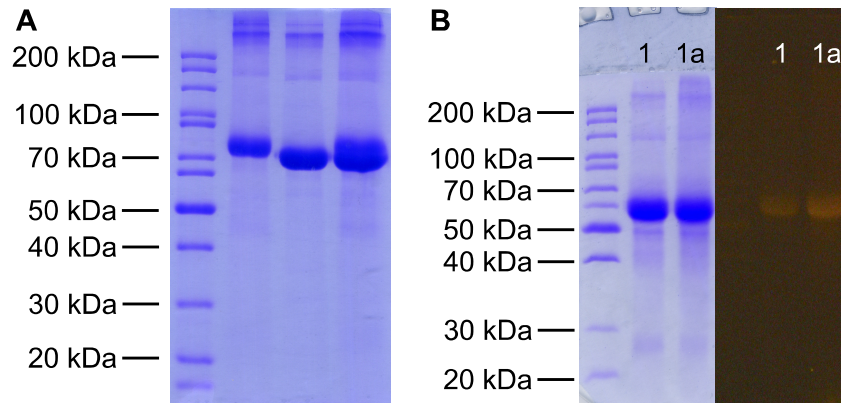


Abbildung 67: **A:** Gelelektrophorese von BSA (Bahn 1), CLE (Bahn 2) und deren Überlagerung (Bahn 3), **B:** Inkubationen von HLE mit **55** für die Sequenzierung und nachträgliche In-Gel-Verknüpfung des Fluorophors **76**. **1** - HLE & 0,2 μ M **55** | **1a** - HLE & 4,2 μ M **55**

Für die LC-MS basierende Sequenzierungstechnik sind reine Proteine von Vorteil. CLE zeigte in Vorversuchen, dass ein Großteil der Proteinpräparation Rinderserumalbumin (BSA) enthält, welches die Signale der Esterase dominierte und die Auswertung erschwerte (Abb. 67A). Aufgrund der sehr geringen Massendifferenz (ca. 4 kDa) der beiden Proteine war es zudem nicht möglich sie gelelektrophoretisch von einander zu trennen. Wie zu erkennen ist, sind beide Proteine (Bahn 1 und 2) fast auf der selben Höhe und eine Koelution (Bahn 3) ergibt eine nahezu einzelne Bande.

Angesichts dieser starken Verunreinigung der CLE mit BSA wurde daher mit Schweineleberesterase (HLE) gearbeitet, welche ebenfalls in den Elektrophoreseversuchen nur eine Bande aufwies und durch **55** und **81** markiert wurde. LC-MS Sequenzierung dieser Esterase, ohne vorherige gelelektrophoretische Reinigung, ergab eine ca. 80%ige Übereinstimmung mit der NCBI Datenbank⁵ und keinerlei störende Verunreinigung anderer Proteine, sodass diese Esterase geeignet für die nachfolgenden Experimente ist.

⁵Zugriff: 15.05.2013

Zur Bestimmung der Reaktionsstellen des BEA an HLE wurde das nicht fluoreszente BEA **55** mit der Esterase inkubiert. **55** besitzt im Vergleich mit seinem fluoreszenten Analogon **81** nach der Reaktion mit dem Protein keine eigene Ladung und ist schwerer fragmentierbar, wodurch die Auswertung erleichtert wird. Um trotzdem nachzuweisen, dass eine Reaktion stattgefunden hat, wurde ein Aliquot der modifizierten HLE gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Fluorophor **76** nachträglich im Gel durch CuAAC verknüpft. Abbildung 67 B zeigt, dass mit diesem Versuch HLE fluoreszent angefärbt werden konnte, was die Modifikation von HLE durch **55** beweist.

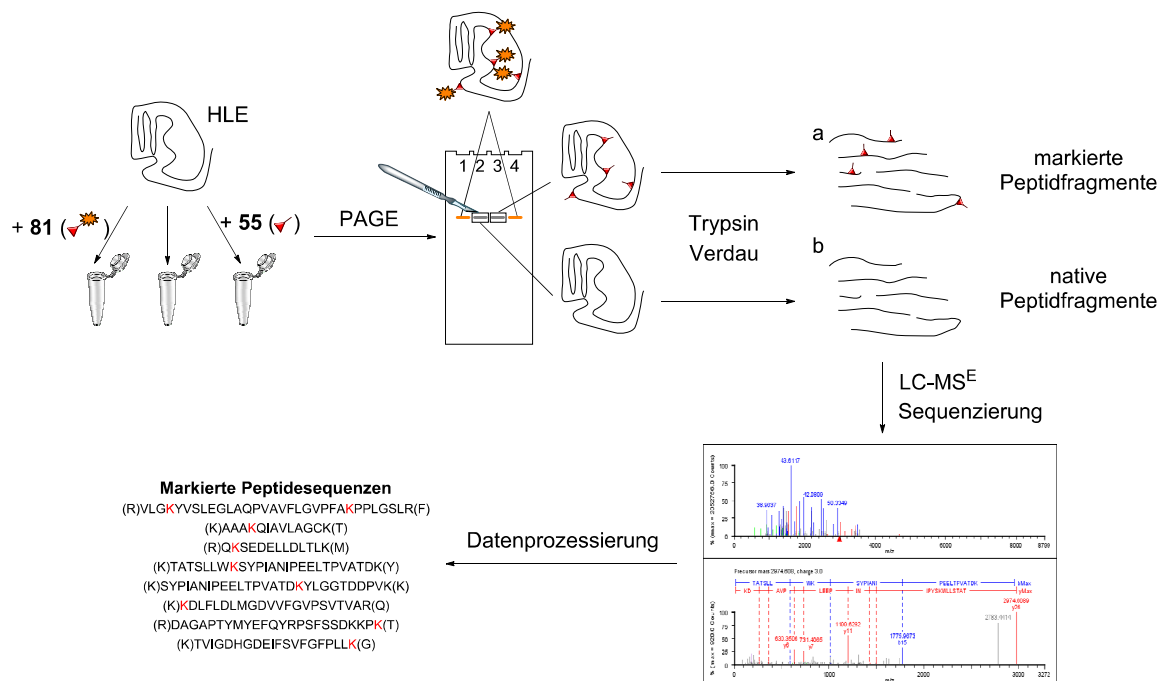


Abbildung 68: Experimentelle Beschreibung der Sequenzierung der mit **55** inkubierten HLE. Zuerst wird HLE in drei parallelen Inkubationen mit der fluoreszenten (**81**) und der unfluoreszenten (**55**) Sonde, sowie ohne Anwesenheit einer Sonde inkubiert. Anschließend wird eine Separation mittels Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Danach werden die zwischen den beiden fluoreszenten Banden in Bahn 2 und 3 befindlichen modifizierten (a) bzw. nativen (b) HLE durch Ausschneiden aus dem Gel extrahiert. Die Analyse der Reaktionsstellen erfolgt über einen tryptischen Verdau und LC-MS^E Analyse der erhaltenen Peptidfragmente und einer Datenprozessierung.

Abbildung 68 zeigt die, zur Sequenzierung und zum Vergleich der unbehandelten und der modifizierten HLE durchgeführten Schritte. Das Enzym wurde in drei verschiedenen Telexperimenten inkubiert (mit dem fluoreszenten BEA **81**, mit **55** und nativ). Diese wurden gemeinsam gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei die mit **81** markierte HLE in Bahn 1 und 4 aufgetragen wurde und lediglich als fluoreszenter

Standard benutzt wurde, da auf eine Anfärbung mit CBB verzichtet wurde und so eine weitere Fehlerquelle eliminiert werden konnte. Zwischen diesen beiden fluoreszenten Banden wurden die unbehandelte (Bahn 2) und die mit **55** modifizierte HLE aus dem Gel geschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Anschließend wurden diese Spaltungsprodukte mittels LC-MS^E gestützter Analyse sequenziert. Dazu werden die einzelnen Peptide des tryptischen Verdau zunächst mittels RP-HPLC von einander separiert und anschließend in einem Tandem Massenspektrometer sequenziert. Die Hydrolyse erfolgt dabei nur an definierten Stellen durch Trypsin. Durch die Bestimmung der hochaufgelösten Masse der Hydrolyseprodukte, sowie deren Fragmentierung im Massenspektrometer kann durch den Vergleich mit Bibliotheken das Peptid und seine Sequenz identifiziert werden.

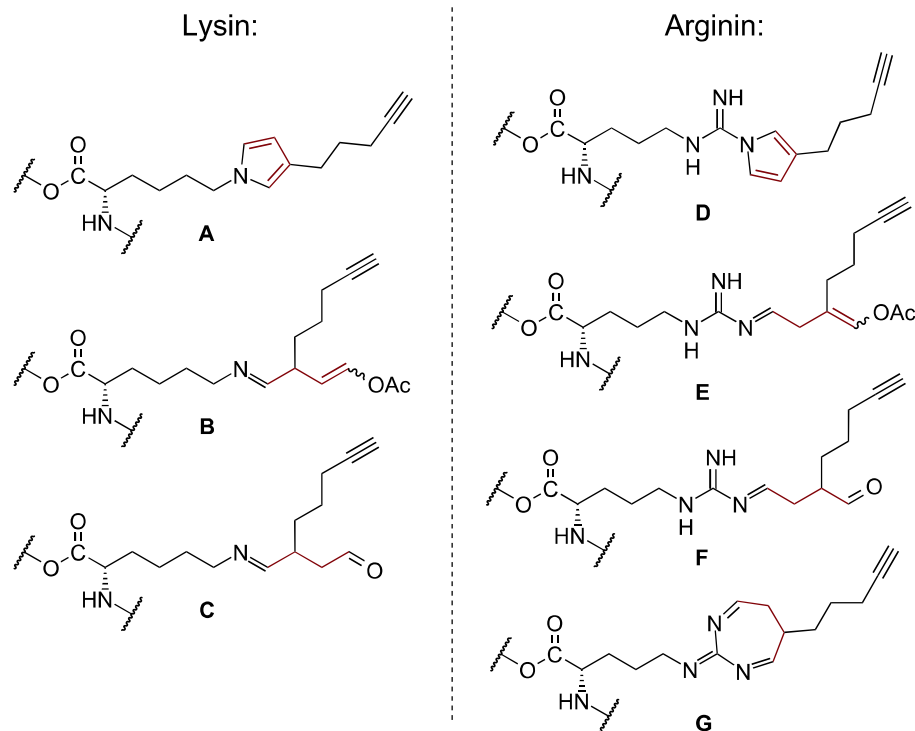


Abbildung 69: Mögliche Reaktionsprodukte der Aminosäuren Lysin (A-C) und Arginin (D-G) mit Deacetylierungsprodukten von **55**. Für die Modifikationen B, C, E und F kann jeweils auch das entsprechende Regioisomer entstehen, bei dem die Bindung am anderen Carbonylkohlenstoff erfolgte (für Verbindung B und E bedeutet dies eine Hydrolyse der anderen Enolacetateinheit), welche aus Übersichtsgründen nicht abgebildet wurden. Durch diese Isomere wird die Massenzunahme nicht beeinflusst und kann darüber hinaus von der hier verwendeten Sequenzierungsmethode nicht unterschieden werden.

Bei der Auswertung der tryptischen Spaltungsprodukte der, durch **55** modifizierten, HLE wurden die in Abbildung 69 dargestellten sieben Reaktionen des einfach deace-

tylierten **55** (B und E) und des zweifach deacetylierten **55** (A, C, D, F und G) mit den Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin durch Massenzunahme in Vergleich mit der Sequenz der nativen HLE berücksichtigt. Modifizierungen durch Deacetylierungsprodukte von **55** der Guanidingruppe des Arginins konnten dabei nicht gefunden werden (D bis G in Abb. 69). Zwei Peptide, welche nach B bzw. C modifiziert wurden, konnten detektiert werden. Diese wurden jedoch nach genauerer Betrachtung der Retentionszeiten verworfen. Durch die Modifikationen der Peptide mit unpolaren Resten sollte eine Verschiebung zu höheren Retentionszeiten im Vergleich zu ihren unmodifizierten Analogons zu erwarten sein, da mit einer RP-HPLC gearbeitet wurde. Die gefundenen Modifikationen wiesen jedoch kleinere Retentionszeiten auf, sodass diese einen anderen Ursprung haben müssen, als durch die Reaktion mit deacetylierten **55**.

Schlussendlich konnte nur eine Art der Modifikation der Aminogruppe des Lysins verifiziert werden. Acht Lysine an Position 36, 266, 300, 384, 402, 414, 462, und 482 in der Proteinsequenz wiesen eine Retentionszeitverschiebung zu höheren Werten sowie eine Massenzunahme von 116,06 Da (dies entspricht genau der Reaktion des Amins zu einem Pyrrol mit dem korrespondierenden Dialdehyden von **55**) auf und wurden demnach durch eine Reaktion, wie in Verbindung A in Abbildung 69 dargestellt, modifiziert.

Zur genauen Lokalisation der acht modifizierten Lysine wurde die dreidimensionale Struktur der HLE benötigt, welche jedoch zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit nicht gelöst wurde. Darum wurde die Kristallstruktur einer menschlichen Esterase aus der Leber (hCE) zu Hilfe genommen, ein Abbild der HLE zu projizieren, da beide Esterasen zu 75 % in der Proteinsequenz übereinstimmen.^[197] Dieses Verfahren wurde auch schon auf andere lipolytische Enzyme angewendet, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen nachzuweisen.^[198] Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine mittels NCBI `blast alignment`⁶ erbrachte eine 78%ige Übereinstimmung (88% bei Einbeziehung von chemisch ähnlichen Aminosäuren), sodass eine sehr gute Deckungsgleichheit beider Enzyme gewährleistet werden konnte (siehe Tabelle 13 im experimentellen Teil). Lediglich eines der acht in HLE modifizierten Lysine an Position 266 ist in der menschlichen Esterase durch Glutamat ersetzt, womit von einer guten

⁶<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Deckungsgleichheit der markierungsrelevanten Aminosäuren ausgegangen werden konnte (siehe Tabelle 13 im experimentellen Teil).

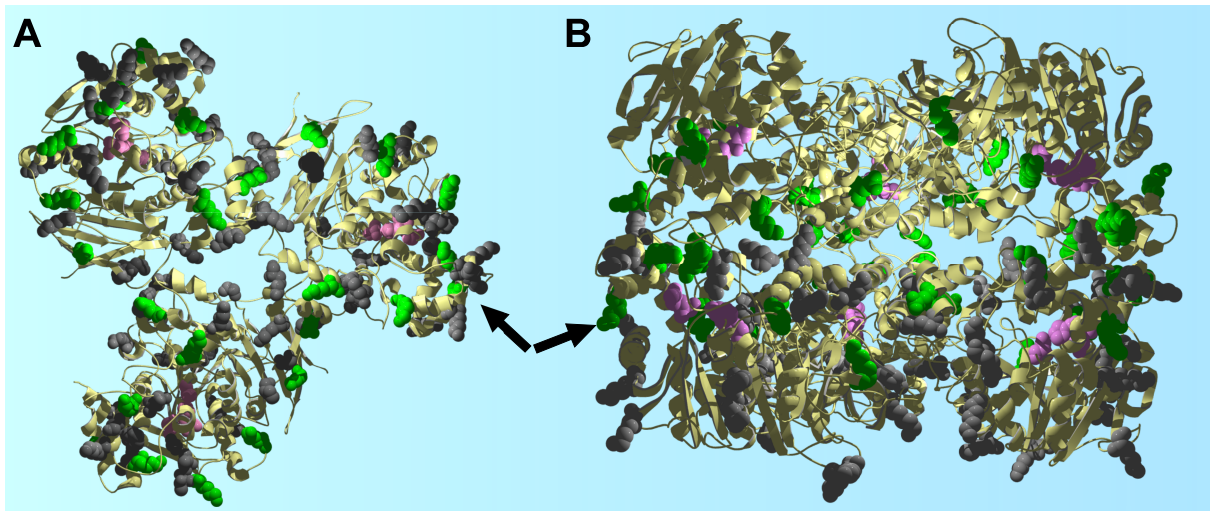


Abbildung 70: Projiziertes Bild der Schweineleberesterase nach dem Modell einer menschlichen Leberesterase. **A:** Blick auf das Trimer, entlang der C_3 -Achse. **B:** Blick auf die Seite des Hexamers im rechten Winkel zur C_3 -Achse. (grau: nicht modifizierte Lysine; grün: durch **55** modifizierte Lysine; pink: katalytische Triade; beige: Enzymrückgrat; die Pfeile zeigen auf das modifizierte Lysin, welches am Ende der »z-site« liegt)

Wie in Abbildung 70 zu sehen ist, gab es eine eindeutige Verteilung der modifizierten Lysine (grün) auf einer Seite in der dreidimensionalen Struktur. Im Trimer der projizierten HLE (A) sieht man, dass alle Lysine annähernd kreisförmig um die katalytische Triade (pink) angeordnet waren. Einzig ein Lysin war sehr weit entfernt und an der Außenseite des Enzymes. Jedoch liegt dieses am Ende des Substratkanals aus dem kleinere Substratmoleküle die Esterase nach Hydrolyse verlassen können. Dieser Bereich wurde von Redinbo als »z-site« bezeichnet.^[199] Das relativ kleine **55** könnte ebenfalls nach der Hydrolyse das Enzym durch diese Struktur verlassen haben und dort mit einer freien Aminogruppe eines Lysins reagiert haben.

Beim betrachten des Hexamers (B) ist die Verteilung der durch **55** modifizierten Lysine (grün) ebenfalls sehr deutlich. Nur an den Berührungsseiten der beiden Trimerereinheiten, auf denen sich die aktive Tasche befindet, wurden Aminogruppen von Lysin modifiziert. Dagegen befinden sich auf den Außenseiten der Esterase keinerlei modifizierte Lysine (grau). Dies lässt den Schluss zu, dass **55** durch HLE hydrolysiert wurde. Der daraus resultierende proteinreaktive Dialdehyd verlässt die aktive Tasche und reagiert unverzüglich mit freien Aminogruppen des Lysins, ohne das Innere des

Enzyms zu verlassen und bildet einen Pyrrolring aus. Durch das Nichtvorhandensein von Modifizierungen an der Außenseite der HLE kann darüber hinaus geschlossen werden, dass der aus **55** gebildete Dialdehyd nicht in die Lösung abgegeben wird, bzw. dieser falls er in das umgebende Medium diffundiert über einen unbekanntem Reaktionsmechanismus abreagiert.

Grundsätzlich konnte mit dieser Methode bewiesen werden, dass Bisenolacetate als selektive ABP-Sonde für Esterasen eingesetzt werden können. Die ungleichmäßige Verteilung der modifizierten Lysine spricht darüber hinaus für eine aktive Transformation von **55** durch die Esterase, welche durch Deacetylierungsprodukte von **55** markiert wird. Darüber hinaus wurden auch die Ergebnisse von Grosser^[98,200] und Guerriero^[97] bestätigt, dass Caulerpenin bevorzugt über die 1,4-Dialdehydeinheit mit einzelnen Aminen reagiert. Dabei wurde nur die Reaktion zu einem Pyrrolring beobachtet.

Teil II

3.4 Inhibierungsexperimente der Oxidoreduktasen

3.4.1 Inhibierung Menschlicher Lipoxygenasen durch Bisenolester

In Kollaboration mit Cengiz *et al.* wurden im Jahre 2011 Experimente durchgeführt, welche das Bisenolacetat (BEA) Caulerpenin (**13**) als nicht kompetitiven Inhibitor für Lipoxygenasen (LO) aus Sojabohnen identifizierten.^[4] Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon 1998 von Ninomiya erhoben. In dieser Studie wurde ein Oxidationsprodukt des Caulepenins (**98**, Struktur siehe Abb. 24, diese Verbindung entspringt aus der Chlorophyll-katalysierten Oxidation des DIeninterminus von **13**), als potenter Inhibitor für Lipoxygenasen.^[6] In beiden Studien konnte somit gezeigt werden, dass die Bisenolacetateinheit einen Einfluss auf die Aktivität von LOs nimmt, da die Seitenkette starke Unterschiede aufwies.

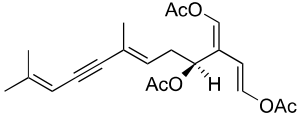
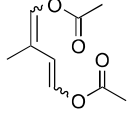
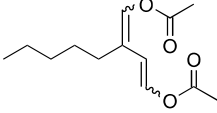
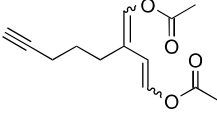
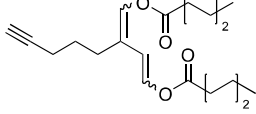
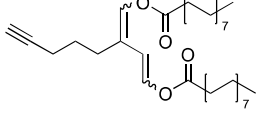
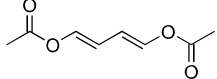
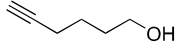
Um diese Ergebnisse der Forschungsgruppen weiter zu verfeinern und um weitere Struktur-Wirkungs-Hinweise zu erlangen, wurden die Bisenolester **55**, **68** und **69** ebenfalls auf ihre Lipoxygenasenhemmung untersucht. Um den Einfluss der Seitenkette auf die Inhibierungswirkung zu vertiefen wurden ebenfalls **88** und **89** (Methyl- bzw. *n*-Pentylseitenkette) in die Substanzbibliothek aufgenommen. Durch die Abwesenheit einer sekundären Acetatgruppe in all diesen Verbindungen sollte einerseits die überprüft werden, ob nur die Bisenolestereinheit für die Hemmung des Enzymes verantwortlich ist und zu anderen der Einfluss der Seitenkette (Länge, Sättigungsgrad) beleuchtet werden. Darüber hinaus kann auch der Einfluss der Polarität der Bisenolestereinheit (Länge der Carboxylsäureeinheiten) betrachtet werden.

Ebenfalls wurden die käuflich erwerbbaeren Substanzen **33** und **106** ebenfalls getestet. Dabei sollte mit Hilfe von **33** die Notwendigkeit der Alkylierung der BEAs überprüft werden und mit Hilfe des ungesättigten Alkohols **106** der Einfluss der Seitenkette von **55** überprüft werden, ob diese isoliert einen Einfluss auf die LO ausübt.

Mit dieser Substanzbibliothek (Tab. 4) wurden nun zellfreie und zellbasierende 5-LO Inhibierungsexperimente durchgeführt, um direkte und indirekte Einflüsse auf die LO Aktivität zu untersuchen. Für die letztgenannten wären zum Beispiel das Blockieren der

Substratversorgung, Beeinflussung des 5-LO aktivierenden Proteins (FLAP) oder Inaktivierung durch Phosphorylierung der LO in den Zellen Faktoren, die eine Inhibierung der LO ergeben könnten. Zellfreie Assays wurden dabei entweder mit aus polymorphonukleären Leukozyten (PNML) isolierter LO oder den Homogenisaten dieser Zellen durchgeführt. Um die Oxidationsreaktionen der zellbasierenden Experimente in den PNML zu starten, wurden diese mit dem Ca^{2+} -Ionophor (A23187) behandelt, welches darüber hinaus die Zellen permeabel für die Inhibitoren machte. Zur Auswertung der 5-LO Aktivität wurden die Oxidationsprodukte der Arachidonsäure (AA, **90**) Leukotrien B_4 (LTB_4 und seine *Trans*-Isomere) und 5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) mittels RP-HPLC detektiert.

Tabelle 4: IC_{50} -Werte der drei verschiedenen Inhibierungsexperimente. [a] isolierte 5-LO und zugesetzte AA (20 μM); [b] intakte PNML ohne zugesetzte AA; [c] intakte PNML mit zu gesetzter AA; [d] nicht lösbar $>30 \mu\text{M}$. n.b. = nicht bestimmt. Die Angaben beziehen sich auf die Konzentration, welche notwendig ist, um nur noch 50 % der Aktivität der LO in Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor zu beobachten.

Substanz	IC_{50}			
	isolierte 5-LO ^[a]	PNML-AA ^[b]	PNML+AA ^[c]	
	13	4,2 μM	5,9 μM	21,0 μM
	88	39,1 μM	18,4 μM	n.b.
	89	$>30 \mu\text{M}$ ^[d]	2,1 μM	n.b.
	55	11,8 μM	5,1 μM	18,8 μM
	68	48,6 μM	1,0 μM	n.b.
	69	21,0 μM	$>100 \mu\text{M}$	n.b.
	33	$>100 \mu\text{M}$	$>100 \mu\text{M}$	n.b.
	106	$>100 \mu\text{M}$	$>100 \mu\text{M}$	n.b.

Beim Betrachten aller drei Teilerperimente in Tabelle 4 ist zu erkennen, dass Caulerpenin (**13**) der potenteste Inhibitor unter den getesteten Substanzen ist. In zellbasierenden Tests ohne zusätzliche AA konnte **13** eine Verringerung der 5-LO Aktivität um 50 % bei 5,9 μM erreichen. Diese Fähigkeit blieb auch bei Verwendung der Zellhomogenisate und aus *E. coli* isolierter menschlicher rekombinanter 5-LO bestehen, in der diese Verbindung IC_{50} -Werte von 9,5 μM bzw. 4,2 μM erzielte (siehe Graphen in Abb. 71). **89** und **68** zeigten eine bessere Hemmung der Lipoxygenaseaktivität in intakten PMNL als **13** (2,1 μM bzw. 1,0 μM), aber dennoch eine höhere IC_{50} -Werte bei Verwendung von isolierter 5-LO. Scheinbar beeinflussen **68** und **89** regulatorische Prozesse in den Zellen (z. B. blockieren der Substratversorgung, Beeinflussung des FLAPs) oder lösen unspezifische Effekte (akute Toxizität) aus.

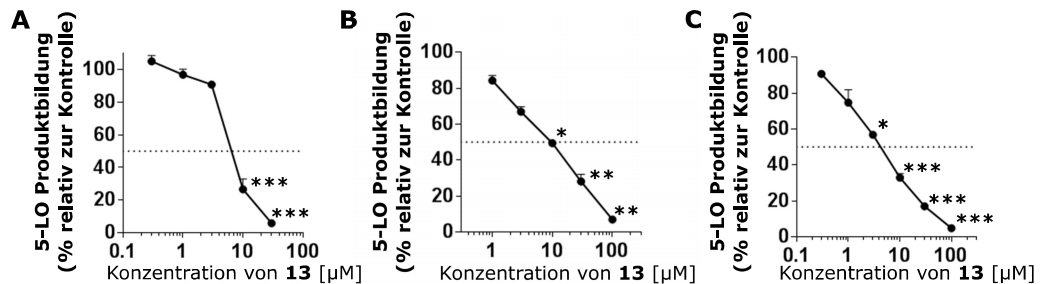


Abbildung 71: Hemmung der 5-LO Aktivität durch die Anwesenheit von Caulerpenin (**13**) in intakten menschlichen PMNL Zellen (A), in PMNL Homogenisaten (B) und von rekombinanter 5-LO (isoliert aus *E. coli*). Angegeben ist der Durchschnittswert aus drei Messungen + Standardfehler, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abbildung nach Richter *et al.* [201]

Das etablierte Asthma Medikament Zileuton zeigte in ähnlichen Versuchen einen besseren, aber vergleichbaren IC_{50} von ca. 0,6 μM (nicht abgebildet). Darüber hinaus zeigten alle der getesteten Bisenolester, mit Ausnahme des Stearates (**69**), gute bis sehr gute IC_{50} Werte in den Inhibierungsexperimente mit intakten Zellen mit hinzugefügter AA.

Um die Struktur der Inhibitoren weiter zu vereinfachen, wurden das Bisenolacetat **55** in zwei Elemente unterteilt. Dabei beeinflussten beide isolierten Strukturen (Bisenolacetat **33** und Alkylkette mit Dreifachbindung **106**) das Enzym 5-LO in keiner Weise, so dass eine Alkylierung an Position 2 der Bisenolester für eine Hemmende Wirkung erforderlich ist. Vergleicht man jedoch die BEAs **88** und **89**, wird klar, dass eine Alkylierung alleine nicht ausreicht. Im zellbasierenden Assay ohne zusätzliche AA zeigte

88 eine etwa neunfach schwächere Aktivität als **89**. Verlängert man die Kettenlänge der Säurereste (**69**), so sinkt die inhibitorische Aktivität gegenüber der 5-LO drastisch und eine Wirkung kann nur noch bei isolierter 5-LO nachgewiesen werden (21,0 μM). Das spricht für eine verringerte Permeabilität des Stearates **69**, das nicht in die Zelle eindringen kann. Möglicherweise wirkt sich auch die verringerte Wasserlöslichkeit von **69** auf die schlechte Hemmung der 5-LO Aktivität aus.

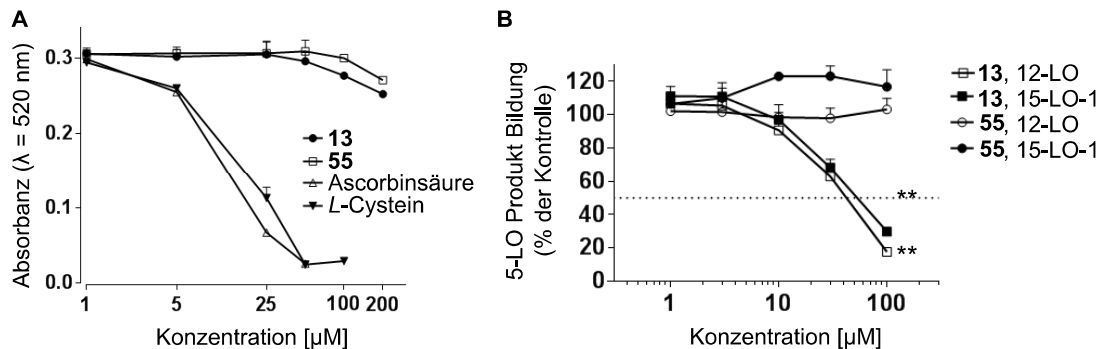


Abbildung 72: **A:** Radikalfangaktivität der Substanzen **13** und **55** im Vergleich zu den redoxaktiven Verbindungen Ascorbinsäure und L-Cystein. **B:** Konzentrationsabhängige Inhibierung der 12-LO und 15-LO-1 mit den Substanzen **13** und **55**. Angaben relativ zu Kontrolle (nativen Enzym) als Durchschnittswert ($n=3$) + Standardfehler, ** $p < 0.01$. Abbildung nach Richter *et al.*^[201]

Auffallend in allen Kategorien, vor allem in den zellbasierenden Assays, war das BEA **55**, das ähnliche Eigenschaften wie der aus *C. taxifolia* isolierte Naturstoff **13** auf die Lipoxygenasenaktivität zeigte. Darum wurden diese zwei Inhibitoren gewählt und weiterführenden Studien unterzogen. Um eine antioxidative Wirkung der Substanzen **55** und **13** zu überprüfen, wurden diese einem antioxidativen Assay in Anwesenheit von 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) unterzogen.^[202] DPPH, welches ein stabiles freies Radikal enthält, reagiert dabei mit anderen redox-aktiven Substanzen und verändert sein Absorptionsspektrum. Keines der getesteten BEA (**13** und **55**) zeigte bei Konzentrationen bis 200 μM Radikalfängereigenschaften, wohingegen Testsubstanzen, wie L-Cystein und Ascorbinsäure, die Bildung eines DPPH-Radikals unterdrückten (siehe Abbildung 72 A). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Hemmung der 5-LO durch **13** und **55** nicht auf eine Redoxaktivität zurückzuführen ist und direkte Beeinflussung des Enzymes stattfindet.

Trotz dieser vielen Gemeinsamkeiten brachte die differenzierte Betrachtungsweise der beiden Substanzen **13** und **55** Unterschiede hervor. Wie in Abbildung 72 B

dargestellt, war der isolierte Naturstoff **13** nicht nur Inhibitor für die menschliche 5-LO, sondern verringerte auch 12-LO und 15-LO-1 in der Aktivität mit IC_{50} Werten von $36 \mu\text{M}$ bzw. $42 \mu\text{M}$. Eine Inkubation von **55** mit 5-LO ergab in dem gemessenen Konzentrationsbereich keinerlei Auswirkungen auf die anderen LO.

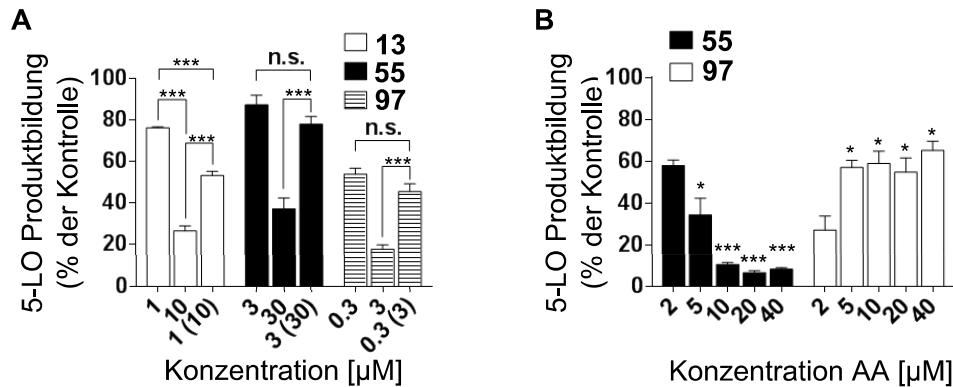


Abbildung 73: **A:** Reversibilitätsmessungen der 5-LO Inhibition mit den Substanzen **13**, **55** und dem etablierten LO-Hemmer Zileuton (**97**) in jeweils zwei Konzentrationen. Zusätzlich wurde ein Aliquot der höheren Konzentration durch zehnfaches Verdünnen auf die Konzentration der Niedrigeren gebracht ($\times (10-x)$), um Rückschlüsse über die Reversibilität ziehen zu können. **B:** 5-LO Inhibition mit den Substanzen **13** und **55** (jeweils $10 \mu\text{M}$) bei verschiedenen Konzentrationen des Substrates AA. Angaben relativ zu Kontrolle (nativen Enzym) als Durchschnittswert ($n=4$) + Standardfehler, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Abbildung nach Richter *et al.*^[201]

Des Weiteren sollte der Inhibierungsmodus von 5-LO durch diese zwei potenten Substanzen untersucht werden. Dafür wurde in Verdünnungsexperimenten isolierte 5-LO mit jeweils zwei Konzentrationen der Inhibitoren **13** und **55** inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot der höheren Inhibitorkonzentration soweit verdünnt, dass die Endkonzentration der kleineren erreicht wurde. Wird nun durch diesen Verdünnungsprozess die ursprüngliche Aktivität der Kleineren erreicht, spricht man von einer reversiblen Inhibition. Caulerpenin (**13**) zeigte eine Inhibition der 5-LO von ca. 25 % bei $1 \mu\text{M}$ und 75 % bei $10 \mu\text{M}$. Verdünnte man die höhere Konzentration um den Faktor 10, so wurde eine Restaktivität von 50 % gemessen (siehe Abbildung 73 A), sodass **13** menschliche 5-LO in einem unvollständig irreversiblen Inhibierungsmodus hemmt.

Im Kontrast dazu förderte das Experiment mit **55** als Inhibitor einen reversiblen Modus zu Tage. Hier konnten durch zehnfache Verdünnung der Inhibitorkonzentration von $30 \mu\text{M}$ auf $3 \mu\text{M}$ die selbe Aktivität wie in der Lösung mit der Inhibitorkonzentration von $3 \mu\text{M}$ detektiert werden. Der ebenfalls zur Kontrolle untersuchte 5-LO-Inhibitor

Zileuton (**97**) zeigte einen reversiblen Inhibierungsmodus, was in Einklang mit seinem Eisen-komplexierenden Inhibierungsmechanismus steht.^[128]

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, wie sich eine erhöhte Substratkonzentration (AA) auf die Inhibition von 5-LO durch **13** und **55** auswirkt und ob eine kompetitive Inhibierung vorliegt. Wie in Abbildung 73 B zu erkennen ist, verbleiben ca. 60 % der Enzymaktivität bei Anwesenheit von 2 μM **13**, welche durch Verzehnfachung der AA Konzentration auf 10 % fällt. Diese Daten sprechen für einen unkompetitiver Inhibierungsmechanismus der 5-LO für **13**, was deckungsgleich mit den durch Cengiz *et al.*^[4] beobachteten Inhibitionskinetiken einer 13-LO aus Sojabohnen ist. Erhöht man jedoch bei Einsatz von **55** als Inhibitor die Substratkonzentration (AA), vergrößert sich die Enzymaktivität, was auf einen kompetitiven Mechanismus schließen lässt.

Zusammengefasst lassen sich sowohl Caulerpenin (**13**) als auch das hier vorgestellte Bisenolacetat der zweiten Generation **55** als LOX-Inhibitoren beschreiben. Jedoch sind diese in ihren Inhibitoreigenschaften verschieden. So ist **13** ein Inhibitor für 5-LO, 12-LO und auch 15-LO, wobei er die potenteste Auswirkung auf die erstgenannte aufweist und diese irreversibel und unkompetitativ (bezogen auf AA) hemmt. Im Kontrast dazu hemmt **55** nur spezifisch 5-LO, weist jedoch nur einen reversiblen und kompetitiven Inhibitionsmodus auf. Dennoch sind diese Ergebnisse schwer definierbar und der Mechanismus beider Inhibitoren völlig divergent und bedarf tiefer gehender Studien.

3.4.2 Inhibierung der Xanthinoxidase aus Kuhmilch durch Bisenolester

Cengiz *et al.* zeigten 2012, dass die natürlich vorkommende Substanz **13** das Enzym Xanthinoxidase (XO) in einem irreversiblen Mechanismus inhibiert. Um diese Ergebnisse zu erweitern und tiefer gehende Struktur-Wirkungs-Mechanismen der Hemmung von XO durch Bisenolester zu untersuchen, wurden die strukturellen Motive von Caulerpenin (**13**), in Analogie zur Substanzbibliothek der LO-Inhibitionsexperimente (siehe voriges Kapitel), einzeln beleuchtet. Zum einen sollte **55** aufzeigen, ob die sekundäre Acetatgruppe für die Hemmung der XO notwendig ist und zum anderen sollte der Einfluss der Seitenkette (Länge, Sättigungsgrad) untersucht werden. Darüber hinaus, und um das Pharmakophor weiter einzugrenzen, wurden **55** in seine Strukturelemente

aufgeteilt. Die käuflich erwerbbaaren Substanzen 1,4-Diacetoxybutadien (**33**, Bisenolacetateinheit) und Hex-5-in-1-ol (**106**, terminale Dreifachbindung) stellten die dafür notwendigen Strukturen bereit. Um die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit denen von Cengiz *et al.*^[7] zu vergleichen, wurde zusätzlich auch noch Caulerpenin (**13**) verwendet, da nicht die selbe XO in dieser Studie zur Verfügung stand.

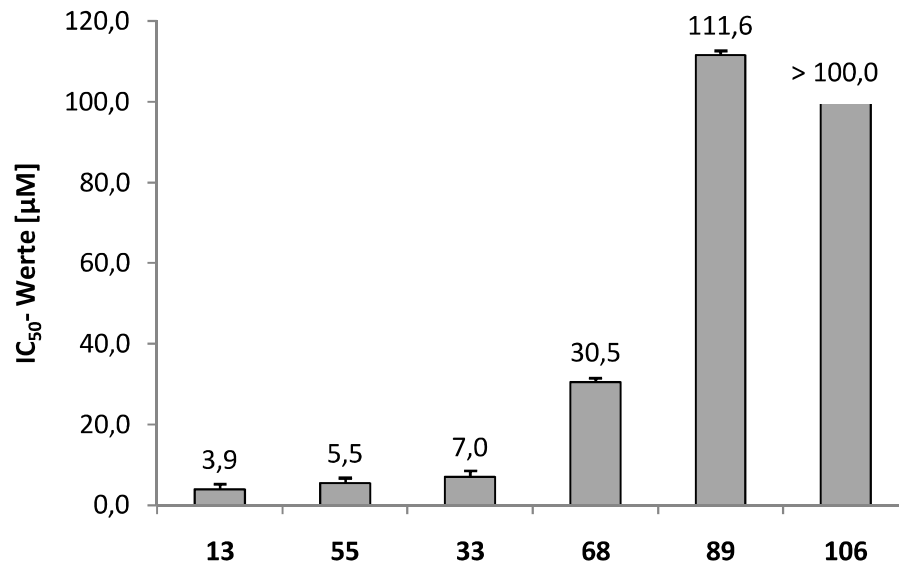


Abbildung 74: Vergleich der IC₅₀-Werte der getesteten Inhibitoren der Xanthinoxidase. Angaben relativ zur Kontrolle (natives Enzym) als Durchschnittswert (n = 3) inklusive der relativen Standardabweichung.

Um die Inhibition der XO durch die Bisenolacetate der zweiten Generation zu testen, wurden diese mit dem Enzym für 30 min inkubiert und anschließend die Bildung von Harnsäure aus Xanthin bei 290 nm detektiert. Wie aus Abbildung 74 ersichtlich, ist **13** der potenteste Inhibitor für XO unter den getesteten Verbindungen. Dennoch war die hier verwendete XO deutlich stärker gehemmt durch **13** als die von Cengiz *et al.* verwendete XO (3,9 µM zu 26,9 µM). Darüber hinaus zeigten alle neuen Bisenolacetate ohne sekundäre Acetatgruppe interessante Ergebnisse bei den Inhibierungsexperimenten. So war der, gegenüber **13**, stark vereinfachte Inhibitor **55** ähnlich aktiv wie **13** (3,9 µM und 5,5 µM). Wurde die Substanz **106** eingesetzt, welche keine Bisenolester-einheit enthielt und lediglich eine Dreifachbindung sowie eine Hydroxyfunktion besaß, konnte keinerlei Hemmung der XO beobachtet werden. Darum kann davon ausgegangen werden, dass die hemmende Wirkung durch die Bisenolestereinheit bestimmt wird. Verringerte Inhibition der XO wurde durch die Verlängerung der Säureketten

(vgl. **55** mit **68**) erreicht. Hierbei wird eine ca. 5,5-fach erhöhte Konzentration benötigt, um einen 50%igen Abfall der Enzymaktivität zu detektieren. Setzt man das BEA mit gesättigter Seitenkette (**89**) ein, wurde dieser Faktor noch höher und eine 50%ige Inhibition erst bei 111,5 μM erreicht. Konträr dazu war das Bisenolacetat ohne Seitenkette **33**. Obwohl es keinerlei Alkylrest am Butadiensystem trug, erreichte es mit 7 μM fast die Inhibitorstärke von **13** bzw. **55**. Sodass das Pharmakophor dieser Substanzen die Bisenolacetateinheit darstellt, dessen Wirkung jedoch durch Alkylierung mit einem ungesättigten Rest verstärkt wird. Diese Fakten zusammengenommen basiert die Hemmende Wirkung der Bisenolacetate auf XO grundlegend auf dem Strukturelement des Bisenolesters, wobei eine Alkylierung mit einem ungesättigten Rest die inhibitorische Stärke unterstützt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Teil I

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach dem Vorbild von Caulerpenin und den Arbeiten von Weißflog^[10] mehrere Bisenolester **68** und **69** mit terminaler Dreifachbindung, zur Kopplung von Markermolekülen, hergestellt. Die Synthese dieser Moleküle wurde nach einer von mir vorgestellte Vorschrift zur Herstellung eines Bisenolacetates **55** vorgegangen^[175] und die entsprechenden langkettigen Säurederivate eingesetzt. Das Bisenolcapronat (**68**) bzw. Bisenolstearat (**69**) konnte jeweils in einer fünfstufigen Synthese mit Totalausbeuten von 5 % (**68**) und 18 % (**69**) dargestellt werden. Anschließend wurde mit Hilfe der „Click“-Reaktion verschiedenen Fluorophoren mit den Molekülen **55**, **68** und **69** verbunden und mit vielfältigen lipolytisch aktiven Enzymen inkubiert.

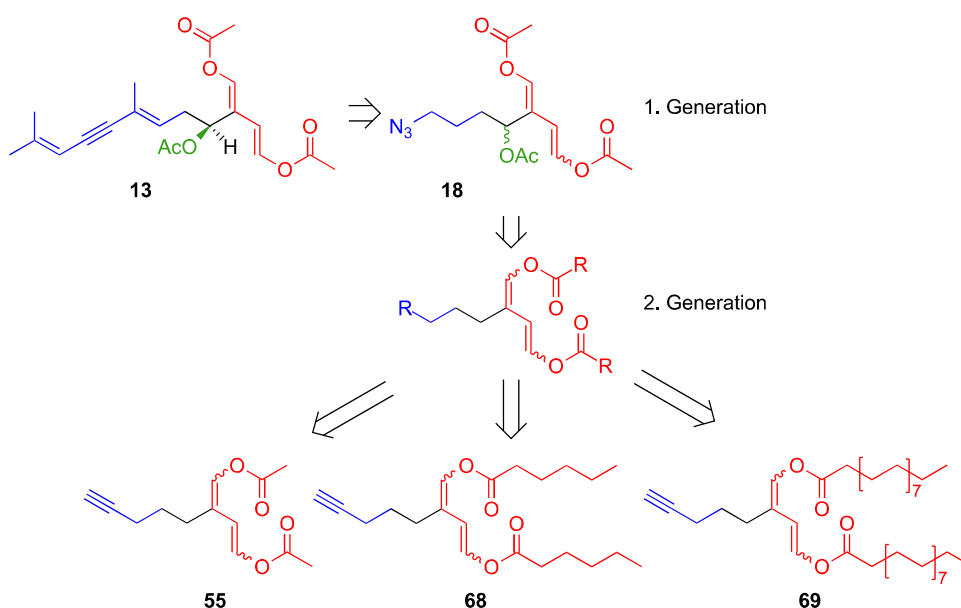


Abbildung 75: Vereinfachungen des Naturstoffes Caulerpenin (**13**) in zwei verschiedenen Generationen von Bisenolestern. In der ersten Generation wurde der Dieninterminus (blau) durch einen koppelbares Azid ersetzt, woraus Verbindung **18** resultierte. In dieser Arbeit wurde nun zusätzlich die sekundäre Acetatgruppe nicht in die Zielmoleküle **55**, **68** und **69** aufgenommen.

- Die fluoreszenten Bisenolacetate **80** und **81** sowie das Bisenolcapronat **82** zeigten in Inkubationsexperimenten mit *Candida lipolytica* Esterase und Albumin aus Hühnereiweiß als Kontrollprotein, dass selektiv die Esterase markiert wurde. Die Verbindung **81** zeigte jedoch starke Autohydrolyse der Bisenolacetateinheit,

sodass schon nach wenigen Stunden eine hohe Konzentration an proteinreaktiven Dialdehyden nachgewiesen wurde. Dies führte zu unerwünschter und unselektiver Markierung des nicht enzymatisch aktiven Kontrollproteins. Wird **81** jedoch vor der Inkubation chromatographisch aufgereinigt, lässt sich dieser Effekt komplett unterdrücken.

- Durch die Inkubation von **81** und **82** mit unterschiedlichen Esterasen und Lipasen konnte gezeigt werden, dass nur Esterasen durch die beiden Sonden fluoreszent markiert wurden. Ein Selektivitätsunterschied durch die veränderte Kettenlänge der Säuregruppen konnte bei den getesteten Hydrolasen nicht festgestellt werden.
- **81** und **82** wurden durch alle getesteten lipolytischen Enzyme in proteinreaktive Dialdehyde überführt. Auch von den Enzymen, die durch die beiden Verbindungen nicht markiert wurden. Daher ist die aktive Deacylierung der Sonden für eine Markierung notwendig, aber nicht alleiniges Kriterium.
- Eine drastische Verlängerung der Säurekettenlänge in **69** bzw. **83** führte zu keiner Umkehrung der Markierungseigenschaften, sodass Lipasen markiert werden konnten. Zusätzlich wurde die Synthese und Aufreinigung von **83** im Vergleich zu **81** bzw. **82** erschwert und die Identität von **83** konnte nur indirekt bestätigt werden
- Auch die nicht fluoreszenten Sonden **55** und **68** können für die Esterasenmarkierung eingesetzt werden. Es ist jedoch wichtig, die Verknüpfung des Fluorophors durch „Click“-Reaktion nach der Gelelektrophorese direkt im Gel an der immobilisierten Esterase durchzuführen. Durch das, für die Verknüpfung notwendige, Cu^+ kommt es zu Spaltungs- und Polymerisierungsprodukten der verwendeten Proteine, welche die Auswertung nach der anschließenden Gelelektrophorese unmöglich machen.
- Durch Sequenzierung einer mit **55** inkubierten Schweineleberesterase konnte die Bindungsart und Reaktionsstellen der deacylierten Bisenolester aufgedeckt werden. Insgesamt wurden in diesem Experiment acht der 35 im Enzym enthal-

tenen Lysine durch Pyrrolringbildung des Amins mit dem zweifachen Deacetylierungsprodukt von **55** modifiziert. Die Modellierung der räumlichen Struktur der Schweineleberesterase zeigte, dass sich sieben der modifizierten Lysine in der Nähe der katalytisch aktiven Tasche befinden und nicht auf der, dem umgebenden Medium zugewandten, Außenseite. Ebenfalls wurde ein Lysin am Ende eines Substratkanals, aus dem kleine Substratmoleküle das Enzym verlassen können, markiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass **55** vom aktiven Zentrum des Enzyms hydrolysiert wird und anschließend mit der Aminofunktion der Lysine reagiert, ohne dabei in das umgebende Medium entlassen zu werden.

Zusammenfassend sind Bisenolester kurzkettiger Carboxylsäuren selektive ABP-Sonden für Esterasen, wobei die Kettenlänge der Säure die Selektivität der Markierung wenig beeinflusst. Sie ergänzen die etablierten β -Lactone und Phosphonsäurederivate um ein weiteres Werkzeug Esterasen zu visualisieren. Darüber hinaus besitzen die Bisenolester allerdings den Vorteil keine Inhibitoren für Esterasen darzustellen, da sie nicht das aktive Zentrum blockieren. Des Weiteren könnten die hier vorgestellten Sonden auch für Esterasen benutzt werden, welche ein Zink als aktives Zentrum beinhalten, die von den Phosphonsäure und β -Lactonderivaten nicht markiert werden können. Weitere Studien lipolytischer Enzyme und komplexer Proteome mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender Sequenzanalysen, müssten jedoch die Eignung weiter untermauern.

Durch die terminale Dreifachbindung können an die hier vorgestellten Bisenolester mannigfaltige Reste verknüpft werden, sodass die Anwendungen ähnlich vielfältig wären. So wäre zum Beispiel durch eine Immobilisierung der Bisenolester an Polymeren eine selektive Anreicherung von Esterasen möglich, die durch Einführung eines selektiv spaltbaren Spacers zudem wieder mobilisiert werden könnten.

Weiterführend wäre es möglich die hier vorgestellte Strategie auf andere Hydrolasen, wie Peptidasen oder Glycosidasen auszuweiten, indem die Säurereste z. B. gegen entsprechende Aminosäuren oder Zucker ausgetauscht werden.

Teil II

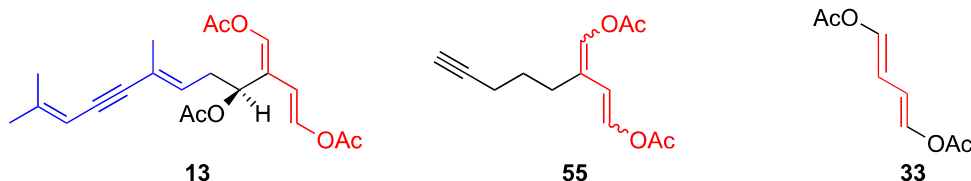


Abbildung 76: Caulerpenin (**13**) und das hier vorgestellte Bisenolacetat (**55**) sind Inhibitoren menschlicher Lipoxygenasen. Zusätzlich zeigen diese hemmende Wirkung gegenüber Xanthinoxidase aus Kuhmilch, welche aber auch von dem Bisenolacetat ohne Alkylrest **33** inhibiert wird.

Der Naturstoff Caulerpenin (**13**) und ein davon abgeleitetes Oxidationsprodukt **98** wurde von Ninomiya *et al.*^[6] bzw. Cengiz *et al.*^[4,7] als Inhibitor von Lipoxygenasen bzw. Xanthinoxidase identifiziert. Da trotz der unterschiedlichen Seitenketten die hemmenden Eigenschaften weitestgehend erhalten blieben, wurden die hier vorgestellten Bisenolester ebenfalls auf ihre Auswirkungen auf beide Oxidoreduktasen untersucht. Durch erfolgreiche Synthese weiterer Bisenolacetate mit Methyl- und *n*-Pentylseitenkette (**88** bzw. **89**) konnte weiterführend das Pharmakophor eingegrenzt und folgende Ergebnisse für die einzelnen Enzyme erzielt werden:

Inhibierung der Lipoxygenasen

- Der Naturstoff **13** ist ein Inhibitor für menschliche 5-, 12- und 15-Lipoxygenase, wohingegen das hier vorgestellte Bisenolacetat **55** selektiv nur die 5-Lipoxygenase hemmt. Unterschiede ergaben sich ebenfalls bei dem Inhibitionsmodus beider Substanzen gegenüber 5-Lipoxygenase. Während **13** dieses Enzym unvollständig reversibel und unkompetitiv (bezogen auf Arachidonsäure) hemmt, inhibierte **55** reversibel und kompetitiv (bezogen auf Arachidonsäure). Die Inhibition basiert dabei nicht auf Grundlage einer redoxaktiven Aktivität.
- Das Caulerpeninanalogen **55** ohne sekundäre Acetatgruppe benötigt nur eine ca. dreifach erhöhte Konzentration in Vergleich mit dem Naturstoff **13** für eine 50%ige Aktivitätserniedrigung von isolierter 5-Lipoxygenase (4,2 μM zu 11,8 μM). Dagegen inhibieren **13** und **55** die Oxidation von Arachidonsäure in intakten po-

lymorphonukleären Leukozyten (Träger von 5-Lipoxygenase) mit sehr ähnlichen IC_{50} -Werten.

- Eine Absättigung und/oder Verkürzung der Seitenkette, sowie die Verlängerung der Säureketten in **55** erniedrigt die Potenz der Inhibition. Dennoch gab es hierbei Ausnahmen in intakten polymorphonukleären Leukozyten. Das im Vergleich zu **55** abgesättigte **89** und das Bisenolcapronat zeigten sehr gute Inhibitionseigenschaften, welche jedoch mit akut toxischen Auswirkungen auf die Leukozyten erklärt werden können, da sie die isolierte 5-Lipoxygenase schlechter als **55** hemmten.
- Die isolierten Strukturmerkmale (Bisenolacetateinheit in **33** und terminale Dreifachbindung in **106**) von **55** haben keine Auswirkung auf die 5-Lipoxygenase.

Durch die Vereinfachung des, in einer Grünalge enthaltenen, Bisenolacetates **13** zu der enzymwechselwirkenden Sonde **55** konnte ein neuer Inhibitor für menschliche Lipoxygenasen erstellt werden. Durch die starke Vereinfachung gegenüber **13** wurde jedoch der Inhibitionsmechanismus stark verändert. Interessant macht **55** besonders die spezifische Inhibition von menschlicher 5-Lipoxygenase. Eine Veränderung dieser Lipoxygenaseaktivität im Organismus erhöht das Risiko für viele Krankheiten, sodass mit **55** ein Strukturmotiv für neuartige Lipoxygenasehemmer gefunden wurde, um diese Krankheiten zu behandeln.

Inhibierung der Xanthinoxidase

- Das BEA mit ungesättigter Seitenkette hemmt mit einem IC_{50} von $5,5 \mu\text{M}$ fast genauso stark Xanthinoxidase wie der Naturstoff **13** ($5,5 \mu\text{M}$).
- Eine Absättigung der Seitenkette in BEA führt zu einem starken Verlust der inhibierenden Wirkung, sodass eine 20 fache Konzentration von **89** im Vergleich zu **55** benötigt wird, um nur noch 50 % Aktivität des Enzyms zu detektieren. Eine Verlängerung der Acetate in **55** zu Capronaten erhöht ebenfalls den IC_{50} -Wert ($30,5 \mu\text{M}$ für **68**)

- Das isolierte Bisenolacetatsystem in **33**, welches keinerlei Seitenkette enthält, weist IC_{50} -Werte, vergleichbar mit **13** und **55** auf ($7,0 \mu M$). Aufgrund dessen scheint das Pharmakophor für die Xanthinoxidasehemmung das Bisenolacetatmotiv zu sein, welches durch Alkylierung in seinen hemmenden Eigenschaften gering verstärkt wird.

Das Pharmakophor der Bisenolacetate gegenüber Xanthinoxidasen ist demnach das Bisenolacetatsystem, welches durch Alkylierung mit ungesättigten Resten am Butadiensystem in seiner Potenz gesteigert wird. Weiterführende Experimente könnten weitere Analogons der Verbindung **13** bzw. **55** darstellen, welche verschiedene Sättigungsgrade und Kettenlängen enthält. Dadurch könnten neuartige Medikamente für die Krankheitsbilder der Xanthinoxidaseüberfunktion (z. B. Gicht) gefunden werden.

5 Abkürzungsverzeichnis

- 5-LO** 5-Lipoxygenase
- AA** Arachidonsäure
- Abb** Abbildung
- ABP** Activity based protein
- ABPP** Activity based protein profiling
- Ac** Acetyl (-COCH₃)
- ACS** Ascorbat
- Asp** Asparaginsäure
- BEA** Bisenolacetat
- BEC** Bisenolcapronat
- BES** Bisenolstearat
- bs** breites Singulett
- BSA** Rinderserumalbumin
- BT** Biotechnologie
- CuAAC** Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Zykladdition
- CBB** Coomassie-Brillant-Blau
- CLE** *Candida lipolytica* Esterase
- COSY** Korrelationspektroskopie
- d** Dublett
- DC** Dünnschichtchromatographie
- DE** Diethylether
- 4-DMAP** 4-(Dimethylamino)-pyridin
- DPPH** Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
- EE** Ethylelessigsäureester
- ESI_{neg}** Elektronensprayionisation im negativen Modus
- ESI_{pos}** Elektronensprayionisation im positiven Modus
- EXAFS** Erweiterte Röntgenfeinstrukturabsorptionsspektroskopie
- FAD** Flavin-Adenin-Dinukleotid
- FP** Fluorophosphonate
- GC** Gaschromatographie
- Glu** Glutaminsäure

-
- hCE** Menschliche Leberesterase
His Histidin
HLE Wildschweinleberesterase
HPETE 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
HETE 5-Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC₅₀ Mittlere inhibitorische Konzentration
LC Flüssigkeitschromatographie
LO Lipoxygenasen
m Multipllett
Me Methyl
MeOH Methanol
MeMgBr Methylmagnesiumbromid
MS Massenspektrometrie
MS-ESI-tof Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisation und Zeitfluganalysator
NAD⁺ Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NBD Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NEt₃ Triethylamin
NHS *N*-Hydroxysuccinimid
NIS *N*-Iodosuccinimid
NMR Kernresonanzspektroskopie
NPP *para*-Nitro-phenylphosphonate
OVA Ovalbumin
PBS Phosphatgepufferte Salzlösungen
PE Petrolether
PLE Schweineleberesterase
PMNL polymorphonukleare Leukozyten
PNPP *para*-Nitro-phenylphosphonate
q Quartett
qi Quintett
RT Raumtemperatur
RG Reaktive Gruppe

-
- Rkt** Reaktion
- RP-HPLC** Umkehrphasenhochdruckflüssigkeitschromatographie
- s** Singulett
- Ser** Serin
- t** Triplett
- TAMRA** Tetramethylrhodamin
- TBAF** Tetrabutylammoniumfluorid
- TBDMSCI** Tertiärbutyl-dimethyl-silylchlorid
- TBTA** Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
- THF** Tetrahydrofuran
- TMS** Trimethylsilyl
- UV** Ultraviolett
- Vis** Sichtbar
- vgl** vergleiche
- XDH** Xanthindehydrogenase
- XO** Xanthinoxidoreduktase
- YPD** Kultivierungsmedium für Hefen (*Yeast peptone dextrose*)

6 Experimentalteil

6.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von bekannten Anbietern (z. B. Sigma Aldrich, Alfa Aesar und Fluka) bezogen und ohne weitere Vorbehandlung benutzt, wenn nicht anderes angegeben. Für die Normalphasen Säulenchromatographie wurde Silicagel 60 mit einer Porengröße von 40 μm bis 63 μm der Firma Merck verwendet. Die dafür verwendeten Lösungsmittel Ethylacetat, Methanol, Diethylether und Petrolether wurden ebenfalls ohne Vorreinigung verwendet. Die bei der präparativen Säulenchromatographie benötigten Eluentengemische wurden in den jeweils angegebenen Volumenverhältnissen gemischt.

6.2 Chromatographie und Spektroskopie

6.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Aluminiumplatten der Firma Merck, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Anregungswellenlänge 254 nm) imprägniert waren. Zur Visualisierung der Stoffe nach erfolgter dünnschichtchromatographischer Trennung wurden die Platten zuerst mit ultravioletten Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm bestrahlt und danach mit Hilfe eines der nachfolgenden Färbepäcker behandelt.

- **Färbung nach Seebach:** 2,5 g Molybdätdiphosphorsäure und 1 g Cer(IV)sulfat wurden in 65 ml entionisiertem Wasser gelöst. Danach wurden langsam 6 ml Schwefelsäure hinzugegeben. Die DC Platte wurde darin bis zur vollständigen Benetzung eingetaucht und anschließend wurde überschüssige Färbelösung mit einem Zellstofftuch entfernt. Sichtbar wurden die Produktflecken erst durch Erhitzen mit einem Heißluftfön als blaue Flecken auf gelben Grund.
- **Färbung mittels Kaliumpermanganat:** 3 g Kaliumpermanganat und 20 g Kaliumcarbonat wurden in 300 ml entionisiertem Wasser gelöst und mit 5 ml 5 % Natronlauge versetzt. Sichtbar wurden die Produktflecken auf der DC-Platte nach

längerer Wartezeit oder durch Erhitzen mit einem Heißluftfön als gelbe Flecken auf violetten Grund.

6.2.2 Kernresonanzspektroskopie

NMR-Spektren wurden mittels verschiedener Spektrometern (200 MHz, 400 MHz bzw. 600 MHz) der Firma Bruker gemessen. Die Kalibrierung der erhaltenen Protonenresonanzspektren erfolgte hierbei auf das Signal des nicht vollständig Deuterierten Lösungsmittels. Die Kalibrierung der Kohlenstoffresonanzspektren erfolgte ebenfalls über das Signal des Lösungsmittels. Folgend sind die Daten der Kalibrierungen angegeben:

Lösungsmittel	Protonensignal	Kohlenstoffsignal
Chloroform	7,25 ppm	77 ppm
d ⁴ -Methanol	3,35 ppm	49,3 ppm
D ₂ O	4,66 ppm	-

6.2.3 Gaschromatographie

Gaschromatographische Analysen wurden an einem GC-MS System der Firma Finnigan aufgenommen. Dieses bestand aus einem Varian-Gaschromatographen 3400 mit einer Varian Kapillarsäule CP-Volamine (15 m, Ø 0,32 mm, #CP7446), als massenselektiver Detektor wurde ein Finnigan MAT ITS40 Ion-Trap (Elektronenstoßionisation) benutzt. Dabei wurden folgende Parameter eingestellt.

Parameter	Wert	Temperaturprogramm:	
		Zeit [min]	Säulentemperatur [°C]
Injektortemperatur	250 °C	0	50
Transferlinientemperatur	270 °C	5	50
Trärgas	Helium	19,66	270
Ionisierungsspannung	70 eV	22,66	270

6.2.4 Flüssigkeitschromatographie

Flüssigkeitschromatographische Analysen wurden an einem Acquity™ ultraperformance LC (Waters, Milford, MA, USA) Flüssigkeitschromatographen, gekoppelt mit einem Q-ToF Micro Massenspektrometer (Waters, Micromass, Manchester, UK) durchgeführt. Die Trennung der Analyten erfolgte auf Umkehrphasensäulenmaterial (C18, endcapped). Die verwendeten Eluenten Wasser und Acetonitril waren HPLC-Qualität und zusätzlich mit 0,1 % Ameisensäure, um eine bessere Ionisation zu gewährleisten, versetzt. Für die Massenspektrometrie bzw. Flüssigkeitschromatographie wurden folgende Parameter verwendet.

		Eluentengradient:	
Parameter	Wert	Zeit [min]	Anteil Acetonitril
Kapillarspannung	3000 V	0	0 %
Probenkonus	25 V	3,5	50 %
Quelltemperatur	120 °C	5	100 %
Desolvatisierungstemperatur	300 °C	5,8	100 %
Konus Gasfluss	35 l/h	5,9	0 %
Desolvatisierungsgasfluss	700 l/h	6,6	0 %
Kollisionsenergie	10 eV		

6.2.5 Preparative Flüssigkeitschromatographie

Preparative Flüssigkeitschromatographie wurde an einem Shimadzu LC-8A präparativen Flüssigkeitschromatographen mit SPD-10AV UV-VIS spectrophotometrischen Detektor durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte an einer Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART® 250-10 HPLC Säule. Als Eluenten wurden Wasser mit 2 % Methanol und Methanol bei einem Fluss von 4 ml/min eingesetzt.

6.3 Proteinanalytik

6.3.1 Vorbereitung der Proteine für die Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proteinproben (Denaturierung der Proteine) für die Gelelektrophorese wurden die Proteinlösungen mit Ladepuffer^[203] (50 % des Volumens der Proteinlösung) und 2 M 2,3-Dithiothreitollösung (15 % des Volumens der Proteinlösung) versetzt und für 3 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 20 µl dieser vorbereiteten Proteinlösung in die Ladetasche der Polyacrylamidgele überführt.

6.3.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli^[203] hergestellt. Als Stammlösung diente eine Acrylamidlösung der Firma Roth[®] mit 40 % Massenanteil Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1. Die so hergestellten Gele wurden, umwickelt mit feuchten Zellstofftüchern, in einer Plastiktüte maximal 2 Wochen gelagert. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Bio-Rad[®] Tetra Mini-Protean Kammer. Als Stromversorger wurde ein Consort E385 Transformator benutzt. Zur Auftrennung der Proteine wurden zuerst 80 V für 30 min und danach 180 V für 65 min angelegt.

6.3.3 Visualisierung der Proteine

- **Fluoreszenz:**

Zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurden die Gele auf einem Transilluminator UVStar der Firma Biometra plziert und mit 312 nm bestrahlt. Die Aufnahme erfolgte mit einer Canon Powershot A640 und der Software BioDocAnalyse v2.1 von Biometra. Als Parameter wurden stets 8 sec Belichtungszeit und 2 als Blendenzahl gewählt. Zur Bearbeitung des Kontrastes und der Helligkeit wurde GIMP v2.6 benutzt.

- **Lichtbildaufnahmen:**

Die Anfärbung der Gele wurde nach Laemmli^[203] durchgeführt, wobei alle Schritte bei erhöhter Temperatur erfolgten, um das Anfärben zu beschleunigen. Hierbei ist es wichtig das Gel nicht länger als 5 min in der erhitzten Coomassielösung

zu inkubieren, da sonst der Hintergrund stark eingefärbt wird. Zur Aufnahme der Lichtbilder wurden die Gele feucht in Plastikhüllen überführt. Nachdem die Aussenseite trocken war, wurden die Bilder mit einem Epson Perfection 3590 Photo gescannt. Zur Bearbeitung des Kontrastes und der Helligkeit wurde ebenfalls GIMP v2.6 benutzt.

- **In-Gel-Huisgen-Cycloaddition:**

Direkt nach der Elektrophorese wurden die Gele dreimal für jeweils 15 min mit 100 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Danach wurden diese in eine Plastikbox überführt, welche nicht sehr viel größer war als die Gele selbst. Nach dem Abschütten des überschüssigen Wassers wurden 6 ml eines Tertiärbutanol/Wasser Gemisches (3:1, v/v), 5 μ l TAMRA-Azid Lösung (**76**, 1 mg/ml, MeOH), 50 μ l CuSO₄ Lösung (50 mM, H₂O), 65 μ l TBTA^[187] Lösung (50 mM, THF) und 300 μ l frisch hergestellte Natriumascorbatlösung (1 M, H₂O) zugegeben. Nach Schütteln des Geles über Nacht bei RT, wurde die Reaktionsmischung durch dreimaliges Waschen mit einer Mischung aus Wasser/Methanol/Essigsäure (50:35:15, v/v/v) entfernt. Zur Aufnahme der Fluoreszenzaufnahmen wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

6.4 Markierungsassays

6.4.1 Natriumhydrogencarbonatpuffer

2,1 g Natriumhydrogencarbonat und 100 mg Natriumazid wurden in 400 ml entionisiertem Wasser gelöst und auf pH = 7 durch tropfenweise Zugabe von Salzsäure (37 %) eingestellt. Kurz vor Verwendung dieses Puffers wurde der pH Wert erneut überprüft und gegebenenfalls eingestellt.

6.4.2 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)

8 g Natriumchlorid, 200 mg Kaliumchlorid, 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat und 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat wurden in 1000 ml entionisiertem Wasser gelöst und auf pH = 7,5 durch tropfenweise Zugabe von Salzsäure (37 %) eingestellt.

6.4.3 Huisgen-Cycloaddition an *C. lipolytica* Esterase in Lösung

Für Bahn b in Abbildung 59 in wurden 20 μl *C. lipolytica* Esterase (2 mg/ml, Fluka, 0,0983 U/mg), 20 μl Ovalbumin (2 mg/ml) und 10 μl BEA (**55**, 2 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1, v/v) gemischt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe wie in Kapitel 6.3.1 für die Gelelektrophorese vorbereitet. Zur Verknüpfung des TAMRA-Azides **76** wurden 5 μl TAMRA-Azid (1 mg/ml in MeOH), 1 μl CuSO_4 Lösung (300 mM), 1,5 μl TBTA Lösung (50 mM in THF) und 10 μl Natriumascorbatlösung (1 M) zugegeben und 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese (siehe Kapitel 6.3.1 bis 6.3.3).

6.4.4 Inkubationen der Hydrolasen und Ovalbumin mit den Reagenzien der Huisgen-Cycloaddition

Dies ist die experimentelle Beschreibung der in Abbildung 59 Bahn 1 bis 14 dargestellten Experimente.

Zu 50 μl Proteinlösung (CLE: 0,8 mg/ml, Fluka, 0,0983 U/mg; OVA: 0,8 mg/ml, Sigma Aldrich) wurden in sieben parallelen Inkubationen folgende Kombinationen der Reagenzien der Huisgen-Cycloaddition zugegeben (siehe Tabelle 5). Anschließend folgte eine Gelelektrophorese nach Kapitel 6.3.2, sowie die Auswertung nach Kapitel 6.3.3.

Tabelle 5: Zugesezte Volumina der Präkatalysatoren

Bahn	1	2	3	4	5	6	7
CuSO_4 (50 mM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl			
TBTA (50 mM)			1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	
Na Ascorbat (1 M)		3 μl	3 μl		3 μl		3 μl

6.4.5 Stabilitätsprüfung von **81** bei Raumtemperatur und -25°C

Von einer frischen Fraktion der präparativen HPLC-Aufreinigung von **81** wurden zwei Aliquote von 100 μl genommen. Eines wurde mit 900 μl entionisiertem Wasser verdünnt und bei RT gelagert und das andere mit 900 μl Methanol und bei -25°C . Am darauffolgenden Tag wurden beide mittels HPLC-MS vermessen und die in Abbildung 56 gezeigten Chromatogramme erhalten. Anhand der Massenspektren konnte eine eindeutige Zuordnung der Monohydrolyse- (**81-Ac**) bzw. der Dihydrolyseprodukte (**81-2Ac**)

gemacht werden. Das Auftreten eines Doppelpicks ist auf die Verknüpfungsisomerie des TAMRA-Fluorophors zurückzuführen.

6.4.6 Markierung von *C. lipolytica* Esterase mit fluoreszenten Bisenolestern **81, 82 und 80**

Dies ist die Beschreibung der in Abbildung 62 und 57 dargestellten Experimente. Für Abbildung 55 wurde entsprechend eine höhere konzentrierte Ovalbuminlösung von 10 mg/ml eingesetzt. Die Konzentration des fluoreszenten BEA in Abbildung 57 war 0,1 mg/ml.

CLE (2 mg/ml, Fluka, 0,0983 U/mg) und OVA wurden frisch in NaHCO₃ Puffer (Kapitel 6.4.1) mit einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und die in Tabelle 6 angegebenen Volumina jeweils in 1,5 ml Eppendorf Vials überführt. Dabei ist zu beachten, dass die Enzymlösung als letztes zugegeben wird und die Lösungen des fluoreszenten Bisenolesters und der Hydrogencarbonatpuffer (bzw. die Ovalbuminlösung im Fall von Bahn 6) vorher gut homogenisiert werden. Im Falle des Acetatanalogs **81** wurden die Fraktionen der präparativen HPLC direkt verwendet, welche am selben Tag hergestellt wurden. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die methanolischen Stammlösungen von **82** und **83** bzw. die Fraktionen von **81** mit entionisiertem Wasser verdünnt, bis diese eine Absorbanz von 0,14 bei 575 nm aufwiesen. Nach Inkubation für eine Stunde bei leichtem Schütteln und RT wurde nach nach Kapitel 6.3.2 bis 6.3.3 vorgegangen.

Tabelle 6: Eingesetzte Volumina bei der Markierung von CLE

Bahn	1	2	3	4	5	6
Puffer (NaHCO₃)	30 µl	40 µl	30 µl	20 µl	20 µl	
Ovalbumin (2 mg/ml)			20 µl		20 µl	20 µl
Bisenolester		10 µl		10 µl	10 µl	10 µl
CLE (2 mg/ml)	20 µl			20 µl		20 µl

6.4.7 Diskriminieren von Esterasen und Lipasen mit fluoreszenten Bisenolestern **81, 82 und 83**

Dies ist die Beschreibung der in Abbildung 61 und 64 dargestellten Experimente.

Die Inkubation der Lipasen bzw. der Esterasen für die Diskriminierungsversuche wurde analog zu den Versuchen, wie in Kapitel 6.4.6 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden 20 µl Natriumhydrogencarbonatpuffer mit 10 µl der fluoreszenten Biseno-lacetatlösung vermischt. Nachdem 20 µl der in der Tabelle angegebenen Hydrolasen zugegeben wurde, wurden die Lösungen 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Auswertung der Markierung wurde nach Kapitel 6.3.2 bis 6.3.3 vorgegangen.

Tabelle 7: Eingesetzte Hydrolasen der Diskriminierung

Hydrolase	Konzentration	Hersteller, Aktivität
<i>A. niger</i> Lipase	50 mg/ml	Sigma Aldrich, 236 U/g
Schweine Pankreas Lipase	50 mg/ml	Sigma-Aldrich, 22,7 U/mg
<i>Rhizopus niveus</i> Lipase	120 mg/ml	Fluka, 2,8 U/mg
<i>R. arrhizus</i> Lipase	50 mg/ml	Sigma Aldrich, 10,5 U/mg
Esterase aus Pferdeleber	25 mg/ml	Sigma Aldrich, 0,51 U/mg
Esterase aus Schweineleber	2 mg/ml	Sigma Aldrich, 17 U/mg
Esterase aus Wildschweineleber	2 mg/ml	Sigma Aldrich, 165 U/mg

6.4.8 Proteininkubationen für die In-Gel click Experimente

Für das in Abbildung 60 und 63 dargestellte Experiment wurden die in Tabelle 8 angegebenen Volumina in 1,5 ml Eppendorf Vials vermischt und für 1 h bei RT leicht geschüttelt, wobei jeweils die Esterase zuletzt hinzugegeben wurde. Es wurde eine methanolische Lösung von 0,1 mg/ml (0,42 µM) der Bisenolester **55** bzw. **68** eingesetzt.

Tabelle 8: Eingesetzte Volumina bei der Markierung von CLE mit den nicht fluoreszenten Sonden **55** (Abb. 60) und **68** (Abb. ??)

Bahn	Inkubation von CLE mit 55						Ink. von CLE mit 68		
	1	2	3	4	5	6	1	2	3
Puffer (NaHCO₃)	30 µl	40 µl	30 µl	20 µl	20 µl		20 µl	20 µl	
Ovalbumin (2 mg/ml)			20 µl		20 µl	20 µl		20 µl	20 µl
Bisenolester		10 µl		10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
CLE (2 mg/ml)	20 µl			20 µl		20 µl	20 µl		20 µl

Für das in Abb. 67 dargestellte Experiment wurde in zwei parallelen Experimenten 80 µl und 20 µl einer methanolischen Lösung von **55** (Bahn 1: 0,2 µM, Bahn 1a: 4,2 µM) vermischt und für 1 h bei RT leicht geschüttelt. Zur Sequenzierung der Esterase wurde das Experiment benutzt, in welchem eine Konzentration von 4,2 µM von **55** eingesetzt wurde.

Anschließend wurden die Proteinproben denaturiert (Kapitel 6.3.1) und die Proteine gelelektrophoretisch (Kapitel 6.3.2) aufgetrennt. Zur Verknüpfung des fluoreszenten Farbstoffes wurde wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben vorgegangen.

6.4.9 Bestimmung der Deacetylierungsprodukte der fluoreszenten

Bisenolester **81**, **82** und **83**

Dies ist die Beschreibung der in Tabelle 2 und 3 dargestellten Experimente.

Die in Tabelle 7 angegebenen Hydrolasen wurden in Natriumhydrogencarbonatpuffer mit einer Konzentration von 6 mg/ml gelöst. 150 μ l der Bisenolacetatlösung (**81** (frische Fraktion der präparativen HPLC) bzw. **82**, 0,075 mg/ml in MeOH/H₂O, 1/20) wurden mit 6 μ l der Enzymlösung gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 3 min bei 10 000 min⁻¹ zentrifugiert und 10 μ l des Überstandes mittels UPLC-MS analysiert.

Im Falle von **83** wurde 150 μ l einer methanolische Lösung von **83** (0,05 mg/ml) mit 6 μ l der Enzymlösung (*C. lipolytica* Esterase, *R. niveaus* Lipase, Lipase aus Schweinepankreas mit jeweils 6 mg/ml) gemischt und für 10 min leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung für 3 min bei 10 000 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand mittels Direkinjektions MS-ESI-tof analysiert.

6.4.10 Enzyminkubationen mit dem fluoreszenten Bisenolstearat **83**

Die in Tabelle 9 angegebenen Volumina wurden in 1,5 ml Eppendorfvials vermischt. Dabei ist zu beachten, dass die Enzymlösung als letztes zugegeben wird und die Lösungen des fluoreszenten Bisenolesters und der Hydrogencarbonatpuffer (bzw. die Ovalbuminlösung im Fall von Bahn 6) vorher gut homogenisiert werden. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit von **83** in Methanol konnte nur eine Konzentration von 0,01 mg/ml eingesetzt werden. Als Enzyme wurden *C. lipolytica* Esterase (2 mg/ml, Fluka, 0,09 U/mg), Lipase aus Schweinepankreas (4 mg/ml, Sigma-Aldrich, 22,7 U/mg), *C. antarctica* Lipase (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, 1,16 U/mg) und *R. niveaus* Lipase (120 mg/ml, Fluka, 2,8 U/mg) verwendet.

Anschließend wurden die Proteinproben denaturiert (Kapitel 6.3.1) und die Proteine gelelektrophoretisch (Kapitel 6.3.2) aufgetrennt, wobei 20 μ l der Proteinproben

Tabelle 9: Eingesetzte Volumina bei den Enzymmarkierungsversuchen mit **83**

Bahn	1	2	3	4	5	6
Puffer (NaHCO₃)	30 µl	40 µl	30 µl	20 µl	20 µl	
Ovalbumin (2 mg/ml)			20 µl		20 µl	20 µl
Bisenolstearat (83, 0,01 mg/ml)		10 µl		10 µl	10 µl	10 µl
Enzym (2 mg/ml)	20 µl			20 µl		20 µl

in die Ladetasche des Elektrophoresegeles gegeben wurden. Zur Verknüpfung des fluoreszenten Farbstoffes wurde darauf wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben vorgegangen.

6.4.11 Sequenzierung der modifizierten Schweineleberesterase

80 µl Schweineleberesterase (PLE, 20 mg/ml, Sigma Aldrich) wurden mit 20 µl einer methanolischen Lösung von **55** (4,2 µM) inkubiert und für 1 h bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Proteinmischung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Referenz und Visualisierung der nicht fluoreszenten mit **55** markierten PLE wurde eine mit **82** markierte PLE in einer benachbarten Bahn mit aufgetrennt. Die zu sequenzierende PLE wurde auf der selben Höhe der fluoreszenten Esterase ausgeschnitten (siehe Abb. 68 auf Seite 88). Die so erhaltene BEA-markierte PLE wurde im Gel tryptisch verdaut, extrahiert und im einer Vacuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 10 µl 0,1 % Ameisensäure aufgenommen. 1 µl dieses Peptidmixes wurde in ein nanoAcquity nanoUPLC system von Waters, welches mit einem Q-ToF HDMS mass spectrometer von Waters gekoppelt war, injiziert. Die Probe wurde zuerst mit einer Symmetry C18 trap-column (20 mm x 0,18 mm, 5 µm Partikelgröße) bei einem Fluss vom 15 µl/min (0,1 % Ameisensäure) aufkonzentriert und entsalzt. Danach wurden die Peptide mit dem in Tabelle 10 angegebenen Eluentengradienten auf eine nanoAcquity C18 analytischen Chromatographiesäule (200 mm x 0,18 mm Innendurchmesser, BEH 130 Material, 1,7 µm Partikelgröße) bei einem Fluss von 350 nl/min aufgetrennt. Dabei wurden Wasser mit 2 % Acetonitril und Acetonitril verwendet, welche beide 0,1 % Ameisensäure für eine bessere Ionisation enthielten.

Die so aufgetrennten Peptide wurden mittels NanoLockSpray Ionenquelle in ein Synapt HDMS Tandem Massenspektrometer transferiert (V-Modus, mit einem Auflösungsvermögen von mindestens 10 000 der Breite auf halber Höhe des Peaks). Dabei

Tabelle 10: Eluentengradient

Zeit [min]	Anteil Acetonitril
0	0 %
13	30 %
18	50 %
23	95 %
27	95 %
28	1 %

wurden die in Tabelle 11 angegebenen Parameter verwendet. Als Standard wurde alle 30 sec ein menschliches Glu-Fibrinopeptid injiziert, um Veränderungen der MS und MS^E Spektren zu kompensieren.

Tabelle 11: Massenspektroskopische Parameter

Quellentemperatur	80 °C
Konusgasfluss	20 l/h
Nanoelektrospray Spannung	3200 V
Menschliches Glu-Fibrinopeptid B	650 fmol/μl, 0,5 μl/min
niedrige Kollisionsenergie (MS)	6 eV
hohe Kollisionsenergie (MS ^E)	15 eV → 40 eV
Massenfenster	$m/z = 50 - 1700$

Zur Datenprozessierung wurde die Software ProteinLynx Global Server Browser v2.5 von Waters benutzt, wobei der von Li *et al.*^[204] beschriebene Algorithmus eingesetzt wurde. Die gefundenen Peptidfragmente wurden gegen die Swissprot Datenbank verglichen (heruntergeladen am 27.07.2011 von www.uniprot.org/). Dabei wurden nur Fragmente berücksichtigt, welche durch tryptischen Abbau und durch Carbamidomethylmodifikation der Cysteine hervorgerufen werden konnten. Für den Nachweis einer Modifikation der Lysine durch **55** wurden die Fragmente zusätzlich auf eine Massenzunahme des Lysins von 116,08 Da bzw. 176,08 Da untersucht, was einer Pyrrolbindung (A Abb. 69) durch das zweifache Deacetylierungsprodukt von **55** bzw. einer Iminbindung (B & C Abb. 69) des einfachen Deacetylierungsprodukt mit jeweils der Aminogruppe des Lysins entspricht. Ebenfalls wurde die Modifikation durch Hemithioacetalbindung der Aminosäure Cystein mit Deacetylierungsprodukten von **55** berücksichtigt und nach Peptidfragmenten mit einer Massenzunahme von 195,10 Da (D Abb. 69) und 153,09 Da (E Abb. 69) gesucht.

Zur statistischen Auswertung wurden die Zahl der minimalen Produktionentreffer der einzelnen Peptide auf drei, die Zahl der minimalen Produktionentreffer der einzelnen Proteine auf fünf, die Zahl der minimalen Übereinstimmung der Peptide auf eins und die Zahl der nicht tryptisch gespaltenen Stellen auf zwei beschränkt. Die maximale Schwelle für eine falsche Zuordnung wurde auf 4 % begrenzt.

Tabelle 12: Peptidsequenzen der PLE im Einbuchstabencode, welche durch Reaktion mit **55** durch Pyrrolringausbildung (Abb. 69 Rkt. A) modifiziert wurden. [a] unterstrichene Aminosäuren repräsentieren ausgelassene Hydrolysen durch Trypsin; [b] Modifikationsart und Position der Markierung in Klammern; [c] Trefferbewertung der PLGS Software mit unter 4 % FDR; [d] Retentionszeit der durch **55** modifizierten Peptide; [e] Retentionszeit der nicht durch **55** modifizierten Peptide; [f] Durchschnittswert der Retentionszeit der unmarkierten Peptide und deren Reststandardabweichung (RSD) [g]

Peptidsequenz ^a	Modification ^b	Precursor [MH] ⁺ (Da)	Peptide [MH] ⁺ (Da)	[MH] ⁺ Error (Da)	[MH] ⁺ Error (ppm)	Score ^c
(R)VILG <u>K</u> WVSEGLAQPVAVFLGVPFAK(PPLGSLR(F)	BEA (4)	3439,0188	3439,009	0,0099	2,8832	8,0551
(K)AAA <u>K</u> QIAYLAGCK(T)	BEA (4), Carbamidomethyl C (12)	1416,8153	1416,8153	-0,0053	-3,7428	7,7997
(R)QKSEDELLDLTK(M)	BEA (13)	1647,9008	1647,9014	-0,0007	-0,4339	7,3822
(K)TATSLW <u>K</u> SYPIANIPEELTPVATDK(Y)	BEA (8)	2974,608	2974,5986	0,0093	3,1373	8,2872
(K)SYPIANIPEELTPVATD <u>K</u> YLGGTDDDPVK(K)	BEA (18)	3119,6035	3119,5996	0,0038	1,2271	7,7343
(K) <u>K</u> DLFLDLMGDVFVGVPSVTVAR(Q)	BEA (1)	2494,3633	2494,359	0,0043	1,7373	8,0351
(R)DAGAPTYMVEFQYRPFSSDKK(K(T)	BEA (24)	2929,4143	2929,4038	0,0102	3,4986	7,6742
(K)TVIGDHGDEIFSVFGFPLL(K(G)	BEA (20)	2307,234	2307,2234	0,0105	4,5499	7,1588

Peptidsequenz ^a	Retentionszeit (min) ^d	Retentionszeit der nicht durch 71 modifizierten Peptide (min) ^e	Ø (min) ^f	RSA ^g					
(R)VILG <u>K</u> WVSEGLAQPVAVFLGVPFAK(PPLGSLR(F)	55,2098	49,2459	49,2212	49,0509	49,2812	49,3117	49,1913	49,22	0,091861
(K)AAA <u>K</u> QIAYLAGCK(T)	47,5137	31,3079	n.i.	29,732	n.i.	30,0879	n.i.	30,38	0,826491
(R)QKSEDELLDLTK(M)	48,5887	41,6875	41,2524	41,1855	41,3346	41,2876	41,4838	41,37	0,1842
(K)TATSLW <u>K</u> SYPIANIPEELTPVATDK(Y)	52,2606	45,7138	n.i.	45,4143	n.i.	45,5457	n.i.	45,56	0,150124
(K)SYPIANIPEELTPVATD <u>K</u> YLGGTDDDPVK(K)	50,0422	43,5688	43,8701	43,8089	43,9732	43,9145	43,9984	43,86	0,15642
(K) <u>K</u> DLFLDLMGDVFVGVPSVTVAR(Q)	56,0982	50,2631	50,3661	50,1335	50,408	n.i.	50,2403	50,28	0,108509
(R)DAGAPTYMVEFQYRPFSSDKK(K(T)	45,4004	39,7484	39,4231	39,3526	39,4462	39,3587	39,702	39,51	0,174841
(K)TVIGDHGDEIFSVFGFPLL(K(G)	60,3877	49,1394	49,0441	48,9472	49,1263	49,0828	49,0801	49,07	0,069286

Tabelle 13: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Schweineleberesterase (PLE) und der menschlichen Leberesterase (hCE) im Einbuchstabencode der Aminosäuren. Rot markiert sind die durch **55** modifizierten Lysine. Anmerkung zur Zeile zwischen den Sequenzen der PLE und hCE: Ist ein Buchstabe abgebildet, sind die Aminosäuren identisch, wohingegen ein „+“ chemische ähnliche Aminosäuren markiert. Leerzeichen in dieser Zeile stehen für unterschiedliche Aminosäuren in der Sequenz. Ein „-“ steht für eine Lücke in der Sequenz.

PLE 1	MWLLPLVLTSLASSATWGQPASPPVVDTAQGRVLGKYVSLEGLAQPVAVFLGVPFAKPPPL 60
	MWL +L +L++SA WG P+SPPVVDT G+VLGK+VSLEG AQPVA+FLG+PFAKPPPL
hCE 1	MWLRAFILATLSASAAWGHPSPPVVDTVHGKVLGKFSLEGFAQPVAIFLGIPFAKPPPL 60
PLE 61	GSLRFAPPQPAEPWSFVKNNTSYPPMCCQDPVAGQMTSDLFTNGKERLIPEFSEDCLYLN 120
	G LRF PPQPAEPWSFVKN TSYPPMC QDP AGQ+ S+LFTN KE + + SEDCLYLN
hCE 61	GPLRFTPPQPAEPWSFVKNATSYPPMCTQDPKAGQLLSELFTRKENIPLKLSLSEDCLYLN 120
PLE 121	IYTPADLTRGRPLPVMVWIHGGLVVGASTYDGLALAAHENVVVVAIQYRLGIWGFST 180
	IYTPADLT++ RLPVMVWIHGGL+VG ASTYDGLALAAHENVVVV IQYRLGIWGFST
hCE 121	MWLRAFILATLSASAAWGHPSPPVVDTVHGKVLGKFSLEGFAQPVAIFLGIPFAKPPPL 180
PLE 181	GDEHSRGNWGHLDQVAALHWQENIANFGGDTGSVTIFGESAGGESVSVLVLSP LAKNLF 240
	GDEHSRGNWGHLDQVAAL WVQ+NIA+FGG+ GSVTIFGESAGGESVSVLVLSP LAKNLF
hCE 181	GDEHSRGNWGHLDQVAALRWQDNIA SFGGNPGSVTIFGESAGGESVSVLVLSP LAKNLF 240
PLE 241	HRAISESGVALTAGLVRK -DMKAAAKQIAVLGCKTTTSAVFVHCLRQKSEDELLDLTLK 299
	HRAISESGVALT+ LV+K D+K A+QIA+ AGCKTTTSAV VHCLRQK+E+ELL+ TLK
hCE 241	HRAISESGVALTSVLVKKGDVKPLAEQIAITAGCKTTTSAVMVHCLRQKTEEELETLK 300
PLE 300	MKFLTLDLHGDPRESHPFLPTVVDGVL LPKMPEEILAEKDFNTVPYIVGINKQEFGWLLP 359
	MKFL+LDL GDPRES P L TV+DG+LL K PEE+ AE++F+TVPY+VGINKQEFGWL+P
hCE 301	MKFLSLDLQGDPRESQPLLGTVIDGMLLLKTPEELQAERNFHTVPYVMGINKQEFGWLIP 360
PLE 360	T-MMGFPLSEGKLDQKTATSL LKWSFPITNIPEELTPVATDKYLG GTDDPVKKDLFLDL 418
	+M +PLSEG+LDQKTA SLLWKS+P+ I +EL P AT+KYLGGTDD VKKKDLFLDL
hCE 361	MQLMSYPLSEGQLDQKTAMSL LKWSYPLVCI AKELIPEATEKYLG GTDDTVKKDLFLDL 420
PLE 419	MGDVVFGVPSVTVARQHRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSDKPKTVIGDHGDEIFSVFGFPL 478
	+ DV+FGVPSV VAR HRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSD KPKTVIGDHGDE+FSVFG P
hCE 421	IADVDFGVPSVIVARNHRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSDMKPKTVIGDHGDELFSVFGAPF 480
PLE 479	LKGDAPEEEVSLSKTVMKFWANFARSGNPNGEGLPHWPMYDQEEGYLQIGVNTQAAKRLK 538
	LK A EEE+ LSK VMKFWANFAR+GNPNGEGLPHW Y+Q+EGYLQIG NTQAA++LK
hCE 481	LKEGASEEEIRLSKMVMKFWANFARNGNPNGEGLPHWPEYNQKEGYLQIGANTQAAQKLK 540
PLE 539	GEEVAFWNDLLSKEAAKPPKIKHAEL 565
	+EVAFW +L +K+A +KPP+ +H EL
hCE 541	DKEVAFWTNLF AKKAVEKPPQTEHIEL 567

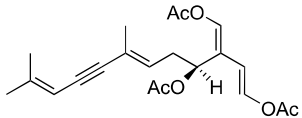
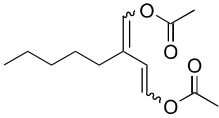
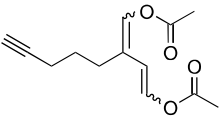
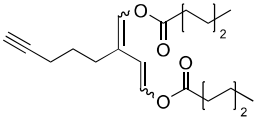
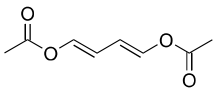
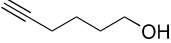
6.4.12 Kultivierung von *Yarrowica lipolytica*, Extraktion der Proteine und anschließender Markierung

Y. lipolytica (früher *Candida lipolytica*, DSM No. 70561) wurde in YPD-Medium kultiviert (1 Gew. % Hefeextrakt, 2 Gew. % bakterielles Pepton und 2 Gew. % Glukose), wobei 10 ml des Mediums mit 500 µl einer alten Stammkultur angeimpft wurde. Zur Gewinnung des Proteoms wurde eine drei Tage alte Kultur zentrifugiert und drei mal mit PBS-Puffer (siehe Kapitel 6.4.2) gewaschen. Das so erhaltene nasse Pellet wurde gewogen und ein definiertes Volumen an PBS-Puffer zugegeben, um eine Konzentration von 600 mg feuchter Hefe pro 1 ml einzustellen. Zur Gewinnung der Proteine aus den Hefezellen wurde anschließend das Pellet resuspendiert und 2 min bei 0 °C mit einem Ultraschallfinger behandelt. Zur Markierung der Esterasen in diesem trüben Rohextrakt wurden 20 µl dieser Suspension zu einem Gemisch aus 20 µl Natriumhydrogencarbonatpuffer und 10 µl der **81** Lösung gegeben (0,05 mg/ml in Methanol/ Wasser, frische HPLC Fraktion) bzw. **82** (in Methanol 0,05 mg/ml). Nachdem diese Suspensionen eine Stunde bei RT geschüttelt wurden, erfolgte die Proteinseparation nach Kapitel 6.3.2 und die Analyse der Markierung nach Kapitel 6.3.3.

6.5 Inhibierung von Xanthinoxidase aus Kuhmilch

6.5.1 Ermittlung der IC₅₀ Werte

Tabelle 14: Verwendete Inhibitor Endkonzentrationen. Die in dieser Tabelle angegebenen Konzentrationen wurden doppelkonzentriert hergestellt, da sie mit dem selben Volumen Xanthinoxidaselösung vermischt wurden.

Inhibitor	Eingesetzte Endkonzentrationen [μM]
 13	15; 25; 50; 100
 89	25; 50; 100; 250
 55	0,5; 2,5; 5; 10
 68	15; 25; 50; 100
 33	0; 0,5; 2,5; 5; 10
 106	10; 50; 100; 150; 200

Aus einer methanolischen 5 mM Inhibitorlösung wurden durch Verdünnen mit Kaliumhydrogenphosphatpuffer (50 mM K₂HPO₄, pH = 7,8) die notwendigen Inhibitorlösungen hergestellt doppelt so hoch die in Tabelle 14 angegebenen. 10 μl der Xanthinoxidase (Xanthine oxidase from bovine milk, Grade I, Sigma Aldrich 9 U/ml) wurde mit 4,5 ml Kaliumhydrogenphosphatpuffer verdünnt. Anschließend wurden jeweils 600 μl der Enzymlösung und 600 μl der Inhibitorlösung vermischt (für schnellere Vermischung der Lösungen wurden hier keine spitzen Eppendorfvials benutzt), wobei jeweils drei technische Replikate pro Kombination angefertigt wurden. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei RT wurden 300 μl dieser Lösung in eine 96-Mikrotiterquarzglasplatte überführt und mit Hilfe einer Multipipette 20 μl Xanthinlösung (3,43 mM in Kaliumhydrogenphosphatpuffer) zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte umgehend

mit einem TECAS infinite 200pro Titer bei 290 nm alle 30 sec über einen Zeitraum von 6 min.

Die Berechnung der IC50-Werte erfolgte durch die quadratische Ausgleichsgerade der Durchschnittswerte der drei technischen Replikate in Relation zur nicht inhibierten Oxidase.

6.6 Inhibierung der menschlichen 5-Lipoxygenase

Biologische Assays

Menschliche polymorphonukleare Leukozyten (PMNL) wurden frisch aus Blut gesunder Spender isoliert wie angegeben^[205](Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena, Deutschland). Zur Leukozytenanreicherung wurde dieses venöse Blut unverzüglich zentrifugiert (4000 g, 20 min, 20 °C). Daraufhin wurden die PMNL durch Dextran-Sedimentation und Zentrifugation mittels NycoPrep isoliert. Das so erhaltene Pellet wurde resuspendiert und die enthaltenen Erythrozyten unter hypotonischen Bedingungen lysiert. Nach abermaliger Zentrifugation wurden reine PMNL erhalten (Reinheit >96 %).

Analyse der 5-LO Aktivität in intakten Zellen

PMNL (10^7 /ml) wurden mit den Testsubstanzen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 μ M Ca^{2+} -Ionophor A23187 mit oder ohne Arachidonsäure (20 μ M) wurden die Oxidationprozesse gestartet. Nach 10 min Inkubationszeit wurden die Oxidationsprodukte (LTB_4 und seine Transisomere, sowie 5-H(P)ETE) extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert.^[205]

Analyse der LO Aktivität in zellfreien Assays

Um rekombinante 5-LO zu gewinnen, wurde das Gen der menschlichen 5-LO mittels pT3-5LO Plasmid in *E. coli* transformiert. Nach Expremierung dieses Genabschnittes wurde die rekombinante 5-LO mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Alternativ wurden PMNL durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und als Quelle für 12-LO oder 15-LO genutzt. Diese Homogenisate bzw. die extrahierte 5-LO wurden für 10 min

bei 4 °C mit den Inhibitoren inkubiert und für 30 sec bei 37 °C vorgewärmt. Durch Zugabe von 2 mM CaCl₂ und 20 µM Arachidonsäure wurden die Oxidationprozesse gestartet. Nach 10 min bei 37 °C wurden die Oxidationsprodukte der 5-LO (LTB₄ und seine Transisomere, sowie 5-H(P)ETE), sowie 12-H(P)ETE and 15-H(P)ETE extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert.^[205]

Bestimmung der Radikaleinfangeigenschaften

Die Testsubstanzen wurden in Ethanol gelöst und mit dem gleichen Volumen Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium (100 mM in Ethanol, Endvolumen 200 µl) gemischt. Nach Inkubation für 30 min wurde die Absorbanz bei 520 nm bestimmt.^[205]

6.7 Synthesen

6.7.1 Versuche zur Halogensubstitution von 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien

Ansatz 1 88 mg (0,51 mmol) 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien wurden in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und 79 μ l (0,78 mmol, 1,5 eq) Triethylamin zugegeben. Als Halogenquelle wurden 131 mg festes Iod (0,51 mmol, 1 eq) zugeben. Nach ca. 24 h zeigte sich bei RT kein Umsatz und die Reaktionsmischung wurde auf 80 °C erhitzt. Allerdings ergab sich auch dabei keine Halogensubstitution.

Ansatz 2 88 mg (0,51 mmol) 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien wurden in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und 109 mg *N*-Bromo-succinimid (0,62 mmol, 1,2 eq) und anschließend 5 μ l Tertiärbutylhydroperoxid (5,5 M) zugegeben. Nach 24 h rühren bei RT war der gesamte Ausgangsstoff konsumiert, jedoch wurde kein gewünschtes Produkt mittels GC-MS detektiert.

Ansatz 3 28 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,16 mmol) wurden in 823 μ l Tetrahydrofuran gelöst und eine Lösung von 12 mg Kaliumbromat (0,07 mmol, 1,33 eq) in 823 μ l Wasser zugegeben. Nach rühren über Nacht konnte ausschließlich der Ausgangsstoff detektiert werden.

Ansatz 4 22 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,13 mmol) wurden in 1000 μ l trockenem Dichlormethan gelöst und 0,1 ml Brom (1,7 mmol, 13,33 eq) langsam dazugetropt. Obwohl es bei der Zugabe des ersten Tropfens zu einer Entfärbung kam, konnte nach 2 h per GC nur der Ausgangsstoff detektiert werden.

Ansatz 5 201 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien wurden (1,18 mmol) in 9 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 301 mg Iod (1,19 mmol, 1 eq) zugegeben. Anschließend wurden 201 mg Natriumcarbonat, gelöst in 9 ml Wasser, hinzugegeben und die Suspension unter starkem Rühren bei 35 °C erwärmt. Nach rühren über Nacht konnte ausschließlich Ausgangsstoff detektiert werden.

Ansatz 6 34 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,2 mmol) wurden in 1,25 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 49,5 mg Iod (0,2 mmol, 1 eq), sowie 28,5 mg Queck-

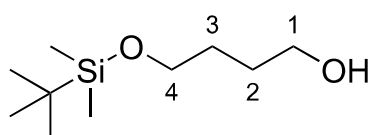
silberdichlorid (0,1 mmol, 0,5 eq) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT konnte kein Umsatz beobachtet werden.

Ansatz 7 23 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,13 mmol) wurden in 3,3 ml Eisessig gelöst und 35 mg Iod (0,13 mmol, 1 eq), sowie 27 mg Kupfer(II)acetat Monohydrat (0,13 mmol, 1 eq) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT konnte kein Umsatz beobachtet werden.

Ansatz 8 18 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,11 mmol) wurden in 2,6 ml Tetrahydrofuran gelöst und 22 mg Iod (0,09 mmol, 0,82 eq), sowie 21 mg Kupfer(II)acetat Monohydrat (0,11 mmol, 1 eq) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT konnte kein Umsatz beobachtet werden.

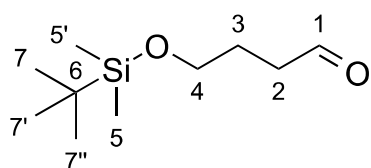
Ansatz 9 85 mg 1,4-Diacetoxy-1,3-butadien (0,5 mmol) wurden in 1 ml 1,4-Dioxan gelöst und 119 mg *N*-Iodosuccinimid (0,53 mmol, 1,05 eq) zugegeben. Nach 4 h Rühren konnte eine neue Verbindung mittels Gaschromatographie nachgewiesen werden, welche allerdings das selbe Molekulargewicht des Ausgangsstoffes hatte. Nach weiteren 20 h Rühren konnte keine weitere Veränderung beobachtet werden.

6.7.2 4-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)butan-1-ol



Diese Synthese wurde nach McDougal *et al.* [184] durchgeführt. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.

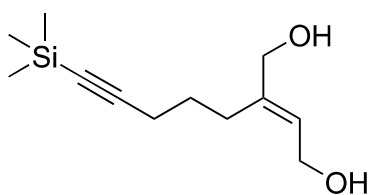
6.7.3 4-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)butan-1-al



206 mg des Alkohols **26** wurden in 20 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 519 mg Dess-Martin-Periodinan wurde die Suspension für 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend die Kühlung entfernt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC verfolgt und die Reaktion durch Zugabe von 5 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung und 5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung abgebrochen als kein Ausgangsstoff mehr nachgewiesen werden konnte (ca. 1 h). Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 3:2; $R_f=0,38$ in PE/ DE 3:2), um ein gelbes Öl zu erhalten.

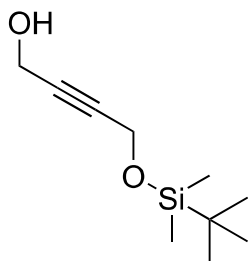
- **Ausbeute:** 137 mg (77 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,02 (6H, s, (H-5)); 0,87 (9H, s, (H-7)); 1,84 (2H, q, $^3J=7$ Hz, (H-3)); 2,49 (2H, td, $^3J_1=7,1$ Hz, $^3J_2=1,8$ Hz, (H-2)); 3,63 (2H, t, $^3J=6$ Hz, (H-4)); 9,77 (1H, t, $^3J=1,7$ Hz, (H-1))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 5,5 (C-5); 18,3 (C-6); 25,5 (C-3); 25,9 (C-7), 40,8 (C-2); 62,0 (C-4); 202,6 (C-1)

6.7.4 8-Trimethylsilyl-3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (39)



Diese Synthese wurde nach einer, in meiner Diplomarbeit^[175] vorgestellten, Vorschrift durchgeführt, welche ihren Ursprung in einer Veröffentlichung von Kocienski *et al.*^[177] hatte. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.

6.7.5 4-((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)but-2-in-1-ol (41)

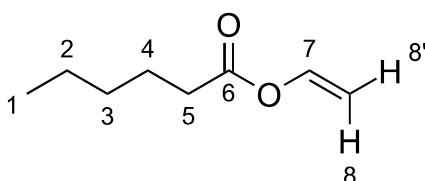


Ansatz a Die Synthese wurde nach Najdi *et al.*^[186] durchgeführt, wobei ein Gemisch aus einfach und zweifach silylierten Produkten erhalten wurde.

Ansatz b Die Synthese wurde angepasst nach McDougal *et al.*^[184] durchgeführt. 2,4 g But-2-in-1,4-diol (27,9 mmol) wurden in 35 ml trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 1,5 g festem Natriumhydrid wurde die Suspension für 90 min bei RT gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurden 2,4 g Tertiärbutyldimethylsilylchlorid zugegeben und die Suspension für weitere 2,5 h bei 0 °C gerührt. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 30 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

Beide Ansätze wurden daraufhin vereint und säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 2:1), um das monosilylierte Produkt mit einer Ausbeute von 18 % zu erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.^[186]

6.7.6 Vinylcapronat (44)

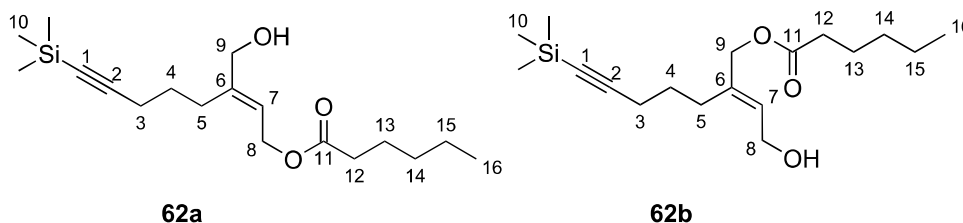


Diese Synthese wurde nach Henry *et al.*^[179] durchgeführt.

5,1 g Capronsäure wurden in 100 ml Vinylacetat gelöst. Nach der Zugabe von 13 mg Palladiumdiacetat und 67 mg Lithiumchlorid wurde die Reaktionsmischung 24 h bei 42 °C gerührt. Anschließend wurde das Vinylacetat unter wenig reduziertem Druck entfernt, sodass nur geringe Mengen des Vinylcapronats evaporierten (dies kann am Ananasgeruch des Vinylcapronates nachverfolgt werden). Der flüssige Rückstand wurde anschließend destillativ fraktioniert (27 °C bei 170 mbar).

- **Ausbeute:** 3,26 g (54 %)
- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,86 (3H, t, ³J = 6,5 Hz, (H-1)); 1,32 (4H, m, (H-2&3)); 1,65 (2H, m, (H-4)); 2,35 (2H, q, ³J = 7,2 Hz, (H-5)); 4,56 (0,5H, dd, ³J₁ = 6,4 Hz, ³J₂ = 1,5 Hz, (H-8')); 4,87 (0,5H, dd, ³J₁ = 14,1 Hz, ³J₂ = 1,5 Hz, (H-8)); 7,29 (1H, dd, ³J₁ = 14,1 Hz, ³J₂ = 6,2 Hz, (H-7))
- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 13,9 (C-1); 22,3 (C-2); 24,3 (C-4); 31,2 (C-3); 34,0 (C-5); 97,4 (C-8); 141,2 (C-7); 180,4 (C-6)

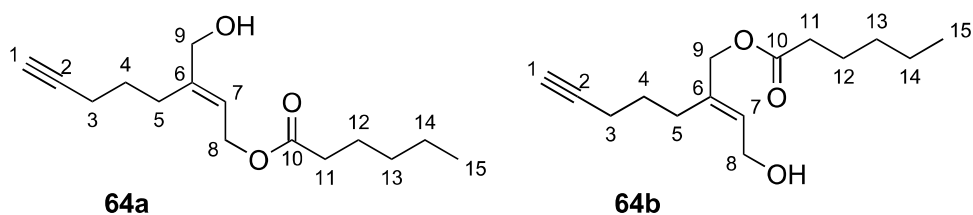
6.7.7 3-(Hydroxymethyl)-8-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-olcapronat (**62a**) und 3-(Caproyloxymethyl)-3-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (**62b**)



300 mg des Diols **39** und 1100 mg Vinylcapronat (**59**) wurden in 30 ml Diisopropylether gelöst. Nach Zugabe von 75 mg Lipase aus *Candida rugosa* (Sigma Aldrich, 807 U/g) wurde die Reaktionsmischung 72 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde ca. 5 g Kieselgel gegeben und das Methanol unter reduziertem Druck entfernt. Der feste Rückstand wurde anschließend auf die Kieselgelsäule gegeben und säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 2:3; R_f=0,6 (**62b**), R_f=0,54 (**62a**) in PE/ DE, 2:3).

- **Ausbeute:** 146 mg (39 %)
- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,12 & 0,13 (9H; s; (10a&10b)); 0,87 (3H; t, ³J=7,0 Hz; (16a&16b)); 1,29 (4H; m; (14a&14b&15a&15b)); 1,62 (4H; m; (13a&13b&4)); 2,19 - 2,32 (6H; m; (12a&12b&3&5)); 4,08 (2H; m;(8a)); 4,22 (2H; m; (9b)); 4,49 (2H; s; (9a)); 4,65 (2H, d; , ³J=7,0 Hz; (8b)); 5,62 (1H; t; , ³J=7,6 Hz; (7a)); 5,71 (1H; t; , ³J=6,7 Hz; (7b))
- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,1 (C-10); 13,9 (C-16); 19,6 (C-3); 22,3 (C-15); 24,6 (C-13); 27,1 (C-5); 27,5 (C-4); 31,3 (C-14); 34,3 (C-12); 58,6 (C-8b); 60,4 (C-9a); 66,0 (C-8a); 67,0 (C-9b); 85,3 (C-1); 106,6 (C-2); 120,2 (C-7a); 128,6 (C-7b); 136,4 (C-6b); 143,8 (C-6a); 173,7 (C-12)

6.7.8 3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olcapronat (**64a**) und 3-(Caproyloxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (**64b**)



136 mg der Monoester **62a** und **62b** (0,42 mmol) wurden in 10 ml trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 0,55 ml TBAF Lösung (1 M in THF) wurde die Reaktionsmischung noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend das Kältebad entfernt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC verfolgt und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen als kein Ausgangsstoff mehr nachgewiesen werden konnte. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 2:3; R_f=0,32 (**64a**), R_f=0,38 (**64b**) in PE/ DE 2:3), um ein gelbes Öl zu erhalten.

- **Ausbeute:** 83 mg (80 %)

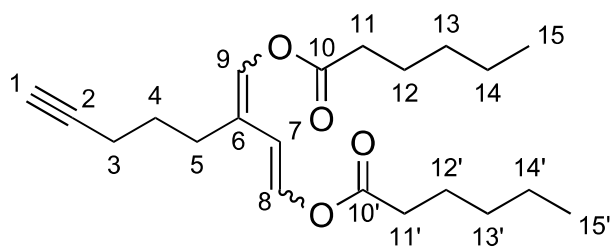
3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olcapronat (64a)

- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,90 (3H, t, ³J = 6,8 Hz, (H-15)); 1,31 (4H, m, (H-13&14)); 1,63 (4H, m, (H-4&12)); 1,99 (1H, 2x t, ⁴J = 2,44 Hz, (H-1)); 2,21 (2H, td, ³J = 6,8 Hz; , ⁴J = 2,5 Hz, (H-3)) 2,26 - 2,33 (6H, m, (H-5&11)); 4,10 (2H, s, (H-9)); 4,67 (2H, d, ³J = 7,1 Hz, (H-8)); 5,66 (1H, t, ³J = 7,1 Hz, (H-7));
- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 13,9 (C-15); 22,3 (C-13); 24,6 (C-12); 27,1 (C-11); 27,4 (C-4); 31,3 (C-14); 34,3 (C-5); 60,4 (C-8); 66,0 (C-9); 83,7 (C-2); 120,3 (C-7); 143,8 (C-6); 173,8 (C-10)

3-(Caproyl-oxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (64b)

- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,86 (3H, t, ³J = 6,8 Hz, (H-15)); 1,28 (4H, m, (H-13&14)); 1,61 (4H, qi, ³J = 7,6 Hz, (H-4&12)); 1,96 (1H, m, (H-1)); 2,17 (2H, td, ³J = 6,8 Hz; , ⁴J = 2,8 Hz, (H-3)); 2,22 (2H, t, ³J = 8,1 Hz, (H-5)); 2,31 (2H, t, ³J = 7,6 Hz, (H-11)); 4,25 (2H, d, ³J = 6,8 Hz, (H-8)); 4,5 (2H, s, (H-9)); 5,72 (1H, t, ³J = 6,6 Hz, (H-7))
- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 13,8 (C-15); 17,9 (C-3); 22,2 (C-13); 24,5 (C-4); 26,8 (C-12); 27,0 (C-5); 31,2 (C-14); 34,2 (C-11); 58,6 (C-8); 67,1 (C-9); 68,9 (C-1); 83,7 (C-2); 128,4 (C-7); 173,8 (C-10)

6.7.9 3-(Caproyloxymethinyl)-oct-7-in-1-en-1-olcapronat (68)



Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Weißflog^[10] durchgeführt.

83 mg der Monoester **64a,b** (0,33 mmol) wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und 185 mg Dess-Martin-Periodinan (0,44 mmol) zugegeben. Nach ca. 30 min Rühren bei 0 °C zeigte sich vollständiger Umsatz. Danach wurde die leicht

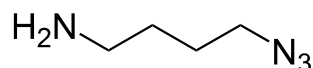
rosafarbene Suspension in einen Scheidetrichter mit 5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 5 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung bis zum Ausbleiben einer Gasentwicklung geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Synthese weiterverwendet.

Das Oxidationsprodukt wurde in einem Schlenkgefäß in 10 ml Triethylamin gelöst und 10 mg 4-DMAP sowie 2 ml Capronsäureanhydrid zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei 80 °C gerührt wurde, wurde auf RT abgekühlt und 100 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch Aufgereinigt (PE/ DE, 25:1; $R_f=0.89$ in PE/ DE 2:1). Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden zusammen viermal mit kleinen Mengen gesättigter Kaliumcarbonatlösung ausgeschüttelt, um die enthaltene Capronsäure zu entfernen. Das so erhaltene farblose Öl war eine Mischung aus den vier möglichen *E* und *Z* Isomeren mit einem Verhältnis von 1 : 0,65 : 0,41 : 0,34 (A:B:C:D). Die Isomere A und B besitzen eine *trans*-Konfiguration zwischen den Kohlenstoffen 7 und 8, wohingegen C und D eine *cis* konfigurierte Bindung an dieser Stelle aufweisen.

- **Ausbeute:** 73 mg (39 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,91 (6H, m, (H-15&15')); 1,34 (8H, m, (H-13&14&13'&14')); 1,69 (6H, m, (H-4&12&12')); 1,95 (0,28H, 2xt, $^3J=2,5$ Hz, (H-1C&1D)); 2,00 (0,62H, 2xt, $^3J=2,5$ Hz, (H-1A&1B)); 2,21 (2H, m, (H-3)); 2,29 (2H, t, $^3J=7,3$ Hz, (H-5A)); 2,42 (4,8H, m, (H-5B&5C&11&11')); 2,53 (0,37H, t, $^3J=7,7$ Hz, (H-5D)); 5,12 (0,16H, d, $^3J=7,7$ Hz, (H-7C)); 5,68 (0,13H, d, $^3J=7,3$ Hz, (H-7D)); 5,93 (0,26H, d, $^3J=12,4$ Hz, (H-7B)); 6,41 (0,40H, d, $^3J=12,8$ Hz, (H-7A)); 7,03 (0,13H, s, (H-9D)); 7,08 - 7,10 (0,71H, m, (H-8C&8D&9A)); 7,23 (0,26H, s, (H-9B)); 7,46 - 7,52 (0,84H, m, (H-8A&8B&9C))

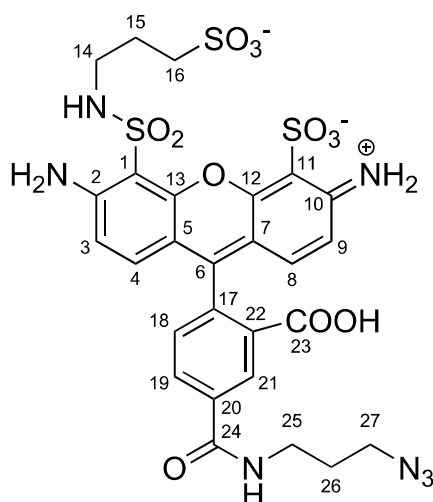
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,9; 17,8; 17,9; 18,0; 18,1; 22,3; 23,9; 24,3; 24,4; 26,7; 26,9; 27,0; 27,4; 27,7; 27,8; 29,7; 30,1; 31,2; 33,9; 34,0; 34,1; 68,3; 68,6; 68,7; 69,0; 83,7; 84,1; 104,7; 108,8; 109,1; 113,0; 117,8; 118,5; 120,1; 120,4; 132,7; 133,1; 133,3; 133,4; 134,7; 135,7; 136,5; 136,6; 170,2; 170,2; 170,3; 170,4; 170,7

6.7.10 3-Amin-propylazid (74)



Diese Synthese wurde nach Park *et al.*^[206] durchgeführt. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.

6.7.11 DY490-azid (71)

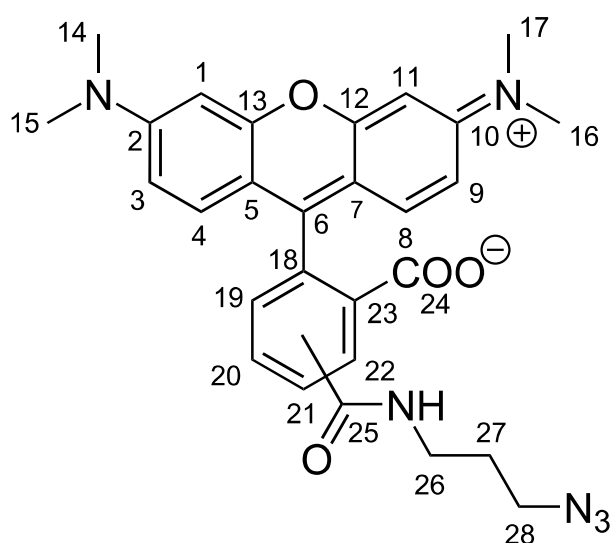


5 mg des DY-490-NHS-Esters (4 μmol) wurden in 500 μl trockenem DMF gelöst und 1,2 μl Triethylamin zugegeben. Nach der Zugabe von 1,5 μl 3-Amin-propylazid (**74**, 13 μmol) wurde die Reaktionsmischung für 2 h leicht geschüttelt. Nachdem LC-MS Messungen vollständigen Umsatz des Ausgangsstoffes ergaben, wurde die Reaktionsmischung mit 10 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt (siehe Kapitel 6.2.5). Die Produkt enthaltenen Fraktionen wurden gemeinsam mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

- **Ausbeute:** ca. 4 mg (quantitativ)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, d^4 -Methanol) [ppm] 1,92 (4H, m, (H-15&16)); 2,91 (2H, $t^3J=7,5$ Hz, (H-16)); 3,11 (2H, m, (H-14)); 3,46 (2H, $t^3J=6,8$ Hz, (H-27)); 3,52 (2H, $t^3J=6,4$ Hz, (H-25)); 6,96 (2H, $2x d^3J_1=8,3$ Hz, $^3J_2=9,0$ Hz, (H-4&8)); 7,23 (2H, $2x d^3J_1=9,4$ Hz, $^3J_2=9,40$ Hz, (H-3&9)); 7,37 (1H, $d^3J=7,5$ Hz, (H-18)); 7,95 (1H, $d^3J=7,5$ Hz, (H-19)); 8,26 (1H, s, (H-21))
- **LC-MS (ESI negativ):** $m/z = 736$ $[\text{M-H}]^-$, 656 $[\text{M-SO}_3\text{-H}]^-$

6.7.12 5(6)-Tetramethylrhodamin-propylazid (76)



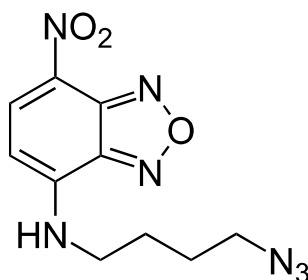
50 mg des Tetramethylrhodamin-NHS-Esters (5- und 6-Isomer) wurden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und 26 μl Triethylamin und 45 μl 3-Amino-propylbromid zugegeben. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels UPLC-MS detektiert und nach vollständigem Umsatz des NHS-Esters (ca. 2 h) die Reaktionsmischung mit 10 ml entionisiertem Wasser verdünnt. Danach würde das Reaktionsgemisch mittels präparativer HPLC aufgetrennt (siehe Kapitel 6.2.5) und die Produkt enthaltenen Fraktionen gemeinsam im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

- **Ausbeute:** 43 mg (88 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, d^4 -Methanol) [ppm] 1,81 - 1,95 (2H, qi, $^3J=6,6$ Hz, (H-27)); 3,28 (12H, s, (H-14&15&16&17)); 3,37 - 3,54 (4H, t + m, $^3J=6,6$ Hz, (H-26&28)); 6,91

(2H, 2x s, (H-1&11)); 7,02 (2H, 2x t, $^3J = 2,9$ Hz, (H-3&9)); 7,25 (2H, 2x d, $^3J = 4$ Hz, (H-4&8)); 7,38 - 8,56 (3H, m, (H-19&20&21&22))

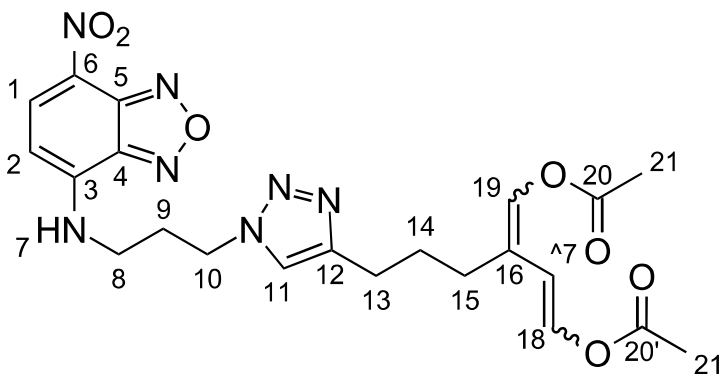
- **LC-MS (ESI positiv):** $m/z = 513$ [M+H]⁺, 535 [M+Na]⁺

6.7.13 *N*-(3-Azidopropyl)-7-nitrobenzoxadiazol-4-amin (**79**)



Diese Synthese wurde nach Key und Cairo^[192] durchgeführt. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.

6.7.14 NBD-bisenolacetat (**80**)

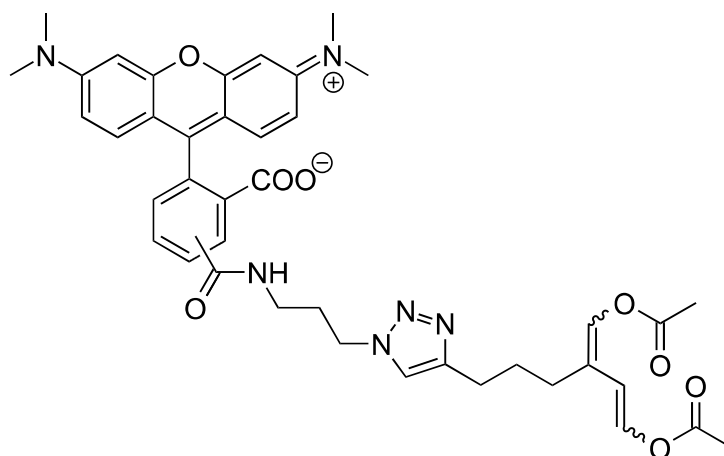


13 mg des fluoreszenten Azides **79** (47 μ mol) und 11 mg des BEA **55** (49 μ mol) wurden in 10 ml eines Tertiärbutanol-Wasser-Gemischs (1:1, v/v) gelöst. Danach wurden 10 μ l TBTA^[187] (0,05 M in THF), 20 μ l Natriumascorbatlösung (1 M in H₂O) und 10 μ l CuSO₄ (0,05 M in H₂O) zugegeben und der Reaktionsfortschritt mittels DC verfolgt. Nachdem das fluoreszenten Azid **79** komplett konsumiert wurde (ca. 3 h), wurde die Reaktionsmischung dreifach mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels unter reduziertem Druck,

wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ EE, 1:1; $R_f=0,51$ in PE/ EE, 1:1).

- **Ausbeute:** 20 mg (85 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3) [ppm] 1,85 (2H, m, (H-14)); 2,17 (6H, s, (H-21&21')); 2,31 - 2,52 (4H, m, (H-15&9)); 2,74 (2H, m, (H-13)); 3,2 - 3,55 (4H, m, (H-8)); 4,54 (2H, m, (H-10)); 5,12 (0,2H, $d^3J=7,3$ Hz, (H-17C)); 5,66 (0,1H, $s^3J=7,6$ Hz, (H-17D)); 5,93 (0,3H, $d^3J=12,5$ Hz, (H-17B)); 6,17 (1H, $d^3J=8,6$ Hz, (H-1)); 6,43 (0,4H, $d^3J=12,8$ Hz, (H-17A)); 6,89 - 7,43 (2H, m, (H-7, 11, 18A-D, 19A-D)); 8,45 (1H, $d^3J=8,6$ Hz, (H-2))
- **LC-MS (ESI positiv):** $m/z = 440$ $[\text{M-OAc}]^+$, 458 $[\text{M-Ac}]^+$, 500 $[\text{M+H}]^+$, 522 $[\text{M+Na}]^+$

6.7.15 5(6)-Tetramethylrhodamin-bisenolacetat (81)



5 mg 5(6)-Tetramethylrhodamin-azid **76** und 3,6 mg **55** wurden in 1 ml eines Tertiärbutanol-Wasser-Gemischs (1:1, v/v) gelöst. Danach wurden 0,1 mg TBTA^[187], 20 μl Natriumascorbatlösung (1 M in H_2O) und 20 μl CuSO_4 (0,3 M in H_2O) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung mit 10 ml entionisiertem Wasser verdünnt und per preparativer HPLC aufgetrennt (siehe Kapitel 6.2.5) und die Produkt enthaltenen Fraktionen gemeinsam im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

Da das so erhaltene fluoreszente Bisenolacetat aus insgesamt acht Isomeren besteht (vier *E* und *Z* Isomere des Butadiensystems und zwei verschiedene Verküpfungen

am Rhodamin), konnte keine direkte Strukturaufklärung durchgeführt werden. Die Struktur wurde jedoch durch Kombination der gewonnenen LC-MS und NMR Daten weitestgehend bestätigt. Durch die LC-MS Spektren konnte nachgewiesen werden, dass das fluoreszente Azid **76** vollständig aufgebraucht wurde (Ionenspur 513 Abb. 77, entspricht $[M+H]^+$ des Azides **76**) und dass ein neuer intensiver Peak, welcher eine höhere Retentionszeit aufwies, im Chromatogramm auftauchte (Ionenspur 749 Abb. 77, entspricht $[M+H]^+$ des Kopplungsproduktes **81**). Dieser neue Peak besitzt eine starke Absorptionsbande bei 555 nm (TAMRA-Chromophor) und zudem das gewünschte Masse zu Ladungsverhältnis von 749.

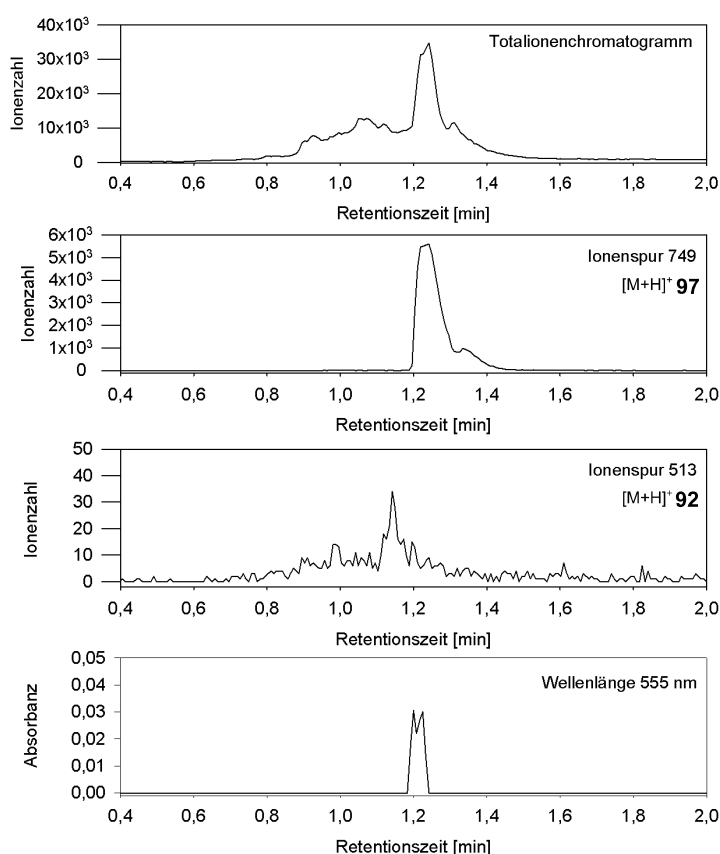


Abbildung 77: Reaktionskontrolle der Synthese des fluoreszenten BEA nach 4 h mittels LC-ESI/MS. Das fluoreszente Azid **76** wurde fast vollständig konsumiert (Ionenspur 513) und ein neuer Peak, mit der gewünschten Masse des Kopplungsproduktes von **76** und **55**, wurde detektiert (Ionenspur 749). Dieser neue Peak hatte darüber hinaus eine hohe Absorbanz bei 555 nm, was auf Anwesenheit des TAMRA-Chromophors schließen lässt.

Aufschluss über eine genauere Struktur des Reaktionsproduktes mit $m/z = 749$ ergab die Auswertung des aufgenommenen NMR-Spektrums. Hier zeigte sich das die

Komplexität der Mischung. So ergab eine Kalibration der Signale des aromatischen Bereiches auf 13 Protonen (9 Protonen des Rhodamins, 3 Protonen des Butadiensystems und 1 Proton der Triazolbrücke) die erforderliche Anzahl an Protonen der Acetatreste, der Methylgruppen des Rhodamins sowie allen notwendigen aliphatischen Protonen (Siehe Abb. 78). Durch Korrelationsspektroskopie konnten zudem die aliphatischen Protonen der zwei Propylengruppen nachgewiesen werden (Abb. 78 Signale a bis f), die aufgrund ihrer verschiedenen magnetischen Umgebung unterscheidbar waren. Zusätzlich konnten die Protonensignale der Methylgruppen des TAMRA-Gerüsts und der Acetate des BEA-Restes zugeordnet werden (Abb. 78 Signale g und h).

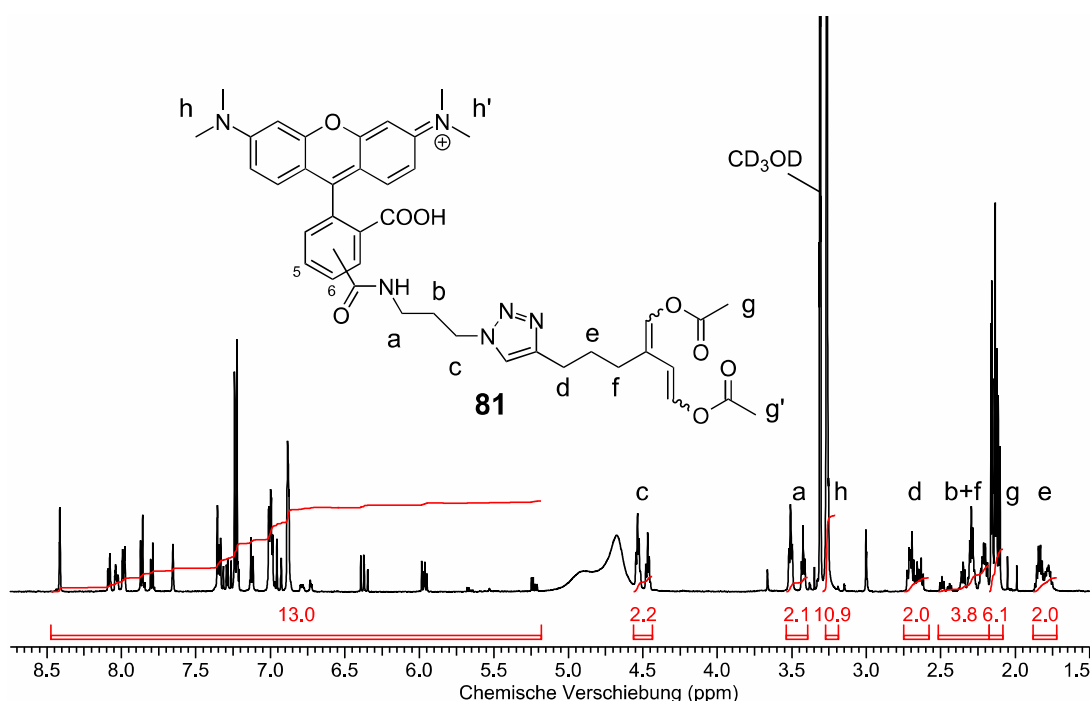
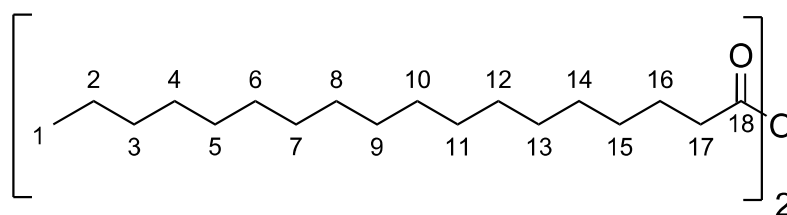


Abbildung 78: NMR Spektrum von **81**. Im vinylichen und aromatischen Bereich (ca. > 5 ppm) kommt es zur komplexen Überlagerung der Signale durch die Stellungs- und Konfigurationsisomerie von **81**. Dennoch konnten einige Signale eindeutig zugeordnet werden (Signale a bis g).

7,04 (0,47H, s, (H-37A)); 7,07 - 7,09 (0,21H, m, (H-36C&36D)) 7,24 (2H, d, $^3J = 9,4$ Hz, (H-4&8&37B)); 7,08 - 7,10 (0,71H, m, (H-8C&8D&9A)); 7,34 (1,1H, m, (H-36B)) 7,36&7,87&8,03 (3H, m, (H-19&20&21&22)) 7,23 (0,26H, s, (H-9B)); 7,43 (0,43H, d, $^3J = 13,2$ Hz, (H-36A)) 7,48 (0,09H, s, (H-37C)); 8,53 (1H, s, (H-29))

- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 14,40; 23,52; 25,58; 25,59; 25,64; 25,68; 25,94; 29,46; 29,51; 31,23; 32,48; 34,74; 34,79; 38,52; 40,97; 97,51; 109,99; 114,37; 114,92; 115,13; 119,91; 123,70; 123,82; 129,70; 130,95; 132,71; 134,05; 134,38; 134,60; 136,02; 137,07; 137,14; 137,33; 138,27; 158,84; 159,16; 161,67; 169,35; 171,86; 172,37
- **LC-MS (ESI positiv):** $m/z = 861$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 883 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 763 $[\text{M}-\text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]^+$

6.7.17 Stearinsäureanhydrid

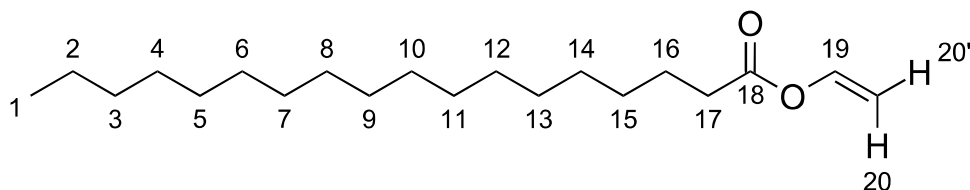


Diese Synthese wurde nach Selinger *et al.*^[207] durchgeführt.

2,8 g Stearinsäure wurden in 75 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und langsam eine Lösung von 1 g Dicyclocarbodiimid in 25 ml Tetrachlorkohlenstoff hinzugetropft. Nach ca. 5 min zeigte sich eine starke Trübung und die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung durch eine Fritte (G3) filtriert und das Filtrat im Rotationverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte weiterverwendet.

- **Ausbeute:** nicht bestimmt

6.7.18 Vinylstearat

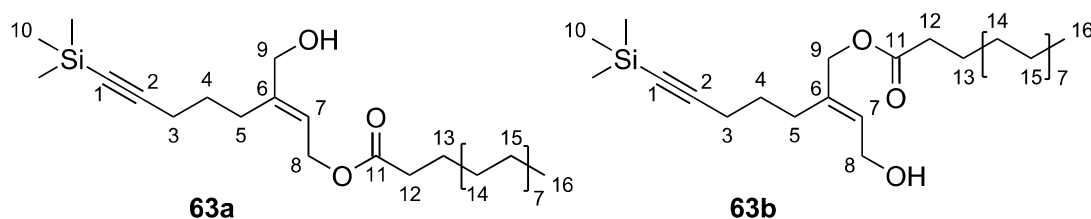


Diese Synthese wurde nach Henry *et al.*^[179] durchgeführt.

5 g Stearinsäure wurden in 250 ml Vinylacetat gelöst. Nach der Zugabe von 30 mg Palladiumdiacetat und 20 mg Lithiumchlorid wurde die Reaktionsmischung 24 h bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 30:1).

- **Ausbeute:** 4,35 g (80 %)
- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm] 0,84 (3H, t, ³J=6,0 Hz, (H-1)); 1,23 (26H, m, (H-2–15)); 1,63 (2H, m, (H-16)); 2,23 (2H, q, ³J=7,5 Hz, (H-17)); 4,53 (0,5H, dd, ³J₁=6,2 Hz, ³J₂=1,5 Hz, (H-20')); 4,85 (0,5H, dd, ³J₁=14,1 Hz, ³J₂=1,7 Hz, (H-20)); 7,27 (1H, dd, ³J₁=14,1 Hz, ³J₂=6,2 Hz, (H-19))
- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 14,1 (C-1); 22,7 (C-2); 24,6 (C-3); 29,1 - 29,7 (C4–15); 31,9 (C-3); 34,0 (C-17); 97,4 (C-20); 141,2 (C-19); 170,9 (C-18)

6.7.19 3-(Hydroxymethyl)-8-(trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (63a) und 3-(Stearoyloxymethyl)-3-(trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (63b)



300 mg des Dialkohols **39** (1,33 mmol) und 2 g Vinylstearat **61** wurden in 30 ml Diisopropylether gelöst. Nach Zugabe von 50 mg *Rhizopus arrhizus* lipase (Sigma Aldrich, 10,5 U/mg) wurde die Reaktionsmischung 48 h bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde

das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in ca. 50 ml THF mit Hilfe von Ultraschall gelöst. Nach Zugabe von ca. 8 g Kieselgel wurde das THF ebenfalls unter reduziertem Druck entfernt. Der feste Rückstand wurde anschließend auf die Kieselgelsäule gegeben und fraktioniert (PE/ DE, 1:1; $R_f=0,63$ (a), $R_f=0,57$ (b) in PE/ DE, 3:2).

- **Ausbeute:** 450 mg (75 %)

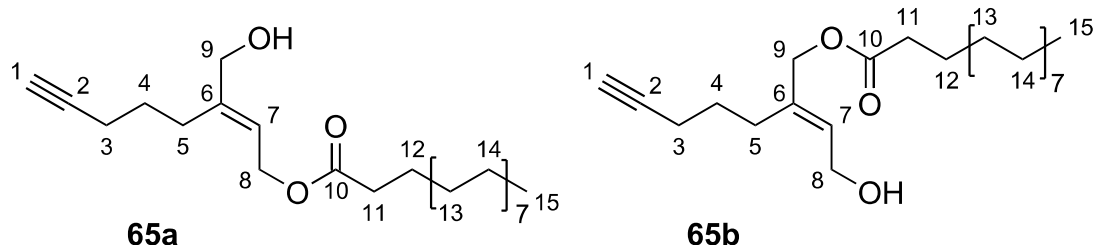
3-(Hydroxymethyl)-8-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (63a)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,01 (9H, s, (H-10)); 0,72 (3H, t, $^3J=6,8$ Hz, (H-16)); 1,09 (28H, m, (H-14&15)); 1,47 (4H, m, (H-4&13)); 2,05 - 2,12 (4H, m, (H-3&5)); 2,13 - 2,19 (2H, m, (H-12)); 3,94 (2H, s, (H-9)); 4,52 (2H, d, $^3J=7,0$ Hz, (H-8)); 5,48 (1H, t, $^3J=6,9$ Hz, (H-7))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,1 (C-10); 14,1 (C-16); 19,2 (C-3); 22,7 (C-14/15); 24,9 (C-13); 26,8 (C-5); 26,9 (C-4); 29,2 - 29,7 (C-14/15); 31,9 (C-14/15); 34,3 (C-12); 60,4 (C-9); 66,0 (C-8); 85,3 (C-1); 106,6 (C-2); 120,3 (C-7); 143,8 (C-6); 173,7 (C-11)

3-(Stearoyloxymethyl)-3-(Trimethylsilyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (63b)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,01 (9H, s, (H-10)); 0,72 (3H, t, $^3J=6,8$ Hz, (H-16)); 1,09 (28H, m, (H-14&15)); 1,47 (4H, m, (H-4&13)); 2,05 - 2,12 (4H, m, (H-3&5)); 2,13 - 2,19 (2H, m, (H-12)); 4,08 (2H, d, $^3J=6,9$ Hz, (H-8)); 4,36 (2H, s, (H-9)); 5,58 (1H, t, $^3J=6,9$ Hz, (H-7))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,1 (C-10); 14,1 (C-16); 19,2 (C-3); 22,7 (C-14&15); 24,9 (C-13); 26,8 (C-5); 26,9 (C-4); 29,2 - 29,7 (C-14&15); 31,9 (C-14&15); 34,3 (C-13); 60,4 (C-9); 66,0 (C-8); 85,3 (C-1); 106,6 (C-2); 120,3 (C-7); 143,8 (C-6); 173,7 (C-11)

6.7.20 3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (65a) und 3-(Stearoyloxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (65b)



390 mg der Monoester **63a,b** (0,97 mmol) wurden in 20 ml trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 0,97 ml TBAF Lösung (1 M in THF) wurde die Kühlung entfernt. Nach ca. 1 h konnte per DC kein Ausgangsstoff mehr nachgewiesen werden und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung abgebrochen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit THF extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 1:1; $R_f=0,59$ (**65a**), $R_f=0,49$ (**65b**) in PE/ DE, 2:3).

- **Ausbeute:** 318 mg (96 %)

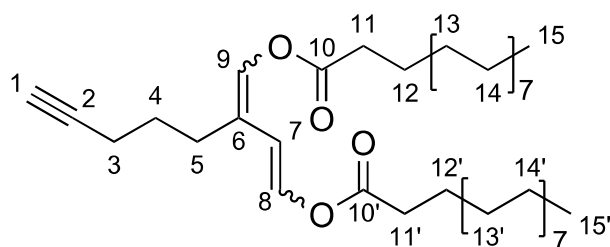
3-(Hydroxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-olstearat (65a)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,87 (3H, t, $^3J=7,2$ Hz, (H-15)); 1,25 - 1,33 (28H, m, (H-13&14)); 1,58 - 1,67 (4H, m, (H-4&12)); 1,98 (1H, t, $^3J=2,2$ Hz, (H-1)); 2,20 (2H, td, $^3J=7,2$ Hz; $^4J=2,8$ Hz, (H-3)); 2,25 - 2,31 (4H, m, (H-5&11)); 4,09 (2H, s, (H-9)); 4,67 (2H, d, $^3J=6,6$ Hz, (H-8)); 5,65 (1H, t, $^3J=7,2$ Hz, (H-7))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 14,1 (C-15); 18,1 (C-3); 22,6 (C-13/14); 24,9 (C-12); 27,1 (C-5); 27,3 (C-4); 29,1 - 29,6 (C-13/14); 31,9 (C-13/14); 34,3 (C-11); 60,4 (C-8); 65,9 (C-9); 68,9 (C-1); 83,7 (C-2); 120,2 (C-7); 143,7 (C-6); 173,8 (C-10)

3-(Stearoyloxymethyl)-oct-7-in-2-en-1-ol (65a)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0.88 (3H, t, $^3J=6,6$ Hz, (H-15)); 1.25 - 1.32 (28H, m, (H-13&14)); 1.63 (4H, m, (H-4&12)); 1.99 (1H, m, (H-1)); 2.20 (2H, td, $^3J=6,6$ Hz, $^4J=2.8$ Hz, (H-3)); 2.24 - 2.34 (4H, m, (H-11)); 4.25 (2H, d, $^3J=6.6$ Hz, (H-8)); 4.53 (2H, s, (H-9)); 5.74 (1H, t, $^3J=6.6$ Hz, (H-7))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 14,1 (C-15); 17,9 (C-3); 22,7 (C-13/14); 24,9 (C-12); 26,8 (C-5); 27,1 (C-4); 29.1 - 29.7 (C-13/14); 31,9 (C-13/14); 34,3 (C-11); 58,6 (C-8); 67,0 (C-9); 69 (C-1); 83,7 (C-2); 128,5 (C-7); 136,4 (C-6); 173,6 (C-10)

6.7.21 3-(Stearoyloxymethinyl)-oct-7-in-1-en-1-olstearat (69)



Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Weißflog^[10] durchgeführt.

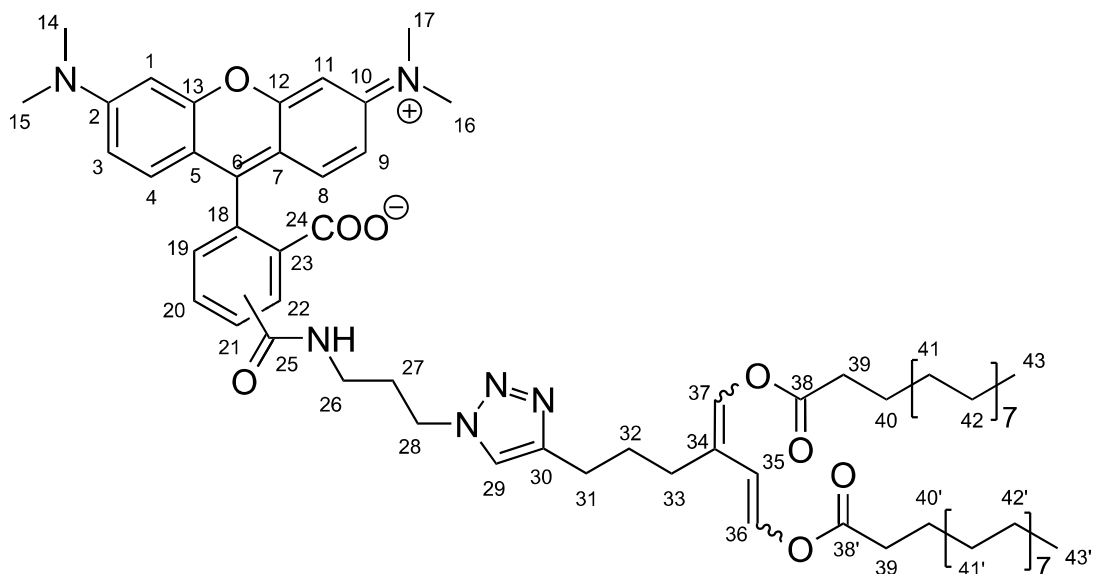
80 mg der Monoester **65a,b** (0,19 mmol) wurden in 20 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 97 mg Dess-Martin-Periodinan (0,23 mmol) wurde die Kühlung entfernt. Nach etwa 3 h konnte per DC kein Ausgangsstoff mehr detektiert werden und die Reaktionslösung wurde in einen Scheidetrichter mit 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 10 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung ca. 3 min geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Synthese weiterverwendet.

Das Oxidationsprodukt wurde in einem Schlenkgefäß in 10 ml Triethylamin gelöst und 3 mg 4-DMAP sowie 523 mg Stearinsäureanhydrid zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch drei Tage bei 80 °C gerührt wurde, wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und 20 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extra-

hiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 25:1; $R_f=0,89$ in PE/ DE 2:1). Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden zusammen viermal mit kleinen Mengen gesättigter Kaliumcarbonatlösung ausgeschüttelt, um die enthaltene Stearinsäure zu entfernen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat der organischen Phase und Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck, wurde das Produkt als Feststoff erhalten, welches aus einer Mischung der vier möglichen *E* und *Z* Isomeren mit einem Verhältnis von 1 : 0,41 : 0,31 : 0,13 (A:B:C:D) bestand. Die Isomere A und B besitzen eine *trans*-Konfiguration zwischen den Kohlenstoffen 7 und 8, wohingegen C und D eine *cis* konfigurierte Bindung an dieser Stelle aufweisen.

- **Ausbeute:** 73 mg (64 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,89 (6H, t, $^3J=6,6$ Hz, (H-15&15')); 1,25 - 1,32 (56H, m, (H-13&14&13'&14')); 1,65 - 1,77 (4H, m, (H-4&12&12')); 1,95 (0,27H, t, $^3J=2,5$ Hz, (H-1A&1CD)); 2,00 (0,63H, t, $^3J=2,5$ Hz, (H-1B&1D)); 2,21 (2H, m, (H-3)); 2,29 (1,36H, t, $^3J=7,7$ Hz, (H-5)); 2,43 (4,2H, m, (H-5+11+11')); 2,53 (0,43H, t, $^3J=7,7$ Hz, (H-5)); 5,13 (0,2H, d, $^3J=7,7$ Hz, (H-7B)); 5,68 (0,07H, d, $^3J=7,3$ Hz, (H-7D)); 5,94 (0,15H, d, $^3J=12,4$ Hz, (H-7C)); 6,42 (0,5H, d; $^3J=12,8$, (H-7A)); 7,03 (0,07H, s, (H-9D)); 7,09 - 7,10 (0,77H, m, (H-8B&8D&9A)); 7,23 (0,17H, s, (H-9C)); 7,46- 7,53 (0,85H, m, (H-8A&8C&9B))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 14,1; 14,2; 14,3; 15,2; 17,9; 17,9; 18,0; 18,2; 18,7; 19,4; 20,4; 20,7; 22,1; 22,5; 22,6; 22,6; 22,7; 22,8; 22,8; 24,0; 24,6; 24,7; 24,7; 25,0; 25,3; 26,7; 26,9; 27,0; 27,4; 27,7; 27,7; 27,9; 28,0; 29,1; 29,2; 29,2; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 29,7; 29,7; 30,2; 30,3; 31,6; 31,8; 31,9; 33,7; 34,0; 34,0; 34,1; 34,1; 34,2; 34,4; 34,5; 34,7; 36,1; 41,3; 43,9; 60,1; 65,8; 68,3; 68,6; 68,7; 69,0; 83,7; 84,0; 84,1; 84,3; 104,8; 108,9; 109,1; 113,0; 117,9; 118,5; 120,1; 120,4; 132,7; 133,1; 133,3; 133,4; 134,7; 135,7; 136,5; 136,7; 170,1; 170,2; 170,2; 170,3; 170,3; 170,4; 170,7; 173,9

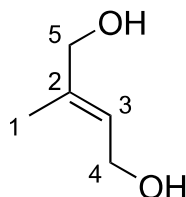
6.7.22 5(6)-Tetramethylrhodamin-bisenolstearat (83)



6,7 mg 5(6)-Tetramethylrhodamin-azid **76** (13 mmol) und 11 mg des BES **69** (16,8 mmol) wurden in 6 ml eines Tertiärbutanol-Wasser-Gemisches (2:1, v/v) gelöst und 25 μl TBTA^[187] (50 mM in THF), 25 μl CuSO₄ (50 mM) und 75 μl Natriumascorbatlösung (1 M) zugegeben und anschließend 48 h bei 40 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit THF wieder gelöst. Nach Zugabe von ca. 2 g Kieselgel wurde das THF ebenfalls mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das so adsorbierte Rohprodukt wurde auf eine Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/ Methanol, 4:1).

- **Ausbeute:** ca. 2 mg (0,01 %)
- **MS (Direktinjektion, Esi pos.):** $m/z = 1219 [M+Na]^+$, $1191 [M+Na-2(CH_3)]^+$

Die Auswertung des Protonenresonanzspektrums des fluoreszenten Bis-enolstearates erbrachte leider keinen kompletten Nachweis der Struktur, da bei der geringen Ausbeute und dem hohen molekularen Gewicht nur sehr kleine Signalintensitäten vorhanden waren. Allerdings zeigt das LC-MS Spektrum ein neues Signal mit der errechneten Masse des Produktes von 1219 amu ($[M+H]^+$).

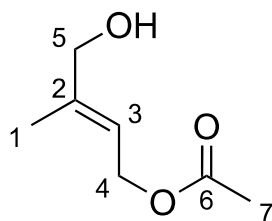
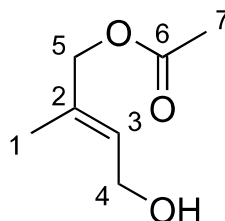
6.7.23 3-(Hydroxymethyl)but-2-en-1-ol (84)

Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Ishino *et al.*^[193] durchgeführt.

590 mg 2-Butin-1,4-diol (6,85 mmol) wurden in 60 ml Diethylether bei 30 °C gelöst. Nach vollständiger Lösung wurden langsam 27 ml Methylmagnesiumbromidlösung (1 M in Diethylether) hinzugetropft und die Suspension über Nacht bei Rückfluss gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Suspension in 100 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung geschüttet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (100 % DE → Ethylacetat/ Methanol, 99:1; $R_f=0,13$ in DE).

- **Ausbeute:** 195 mg (28 %)
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 1,70 (3H, s, (H-1)); 4,03 (2H, s, (H-5)); 4,21 (2H, d, $^3J=6,6$ Hz, (H-4)); 5,66 (1H, tq, $^3J_1=6,6$ Hz, $^3J_2=1,7$ Hz, (H-3))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,7 (C-1); 58,9 (C-4); 67,7 (C-5); 123,6 (C-3); 138,3 (C-2)

6.7.24 3-(Hydroxymethyl)but-1-enolacetat (87a) und 3-(Acetoxymethyl)but-1-en-1-ol (87b)

**87a****87b**

44 mg **84** wurden in 2,25 ml Vinylacetat und 2,25 ml Diisopropylether gelöst. Nach Zugabe von 30 mg *A. niger* lipase wurde die Suspension 22 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE 2:3; $R_f=0,34$ (a), $R_f=0,25$ (b) in PE/ DE 3:2).

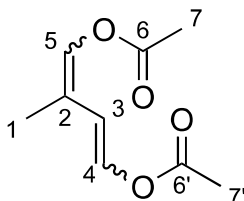
- **Ausbeute:** 15 mg (24 %)

3-(Hydroxymethyl)but-1-enolacetat (87a)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 1,73 (3H, s, (H-1)); 2,06 (3H, s, (H-7)) 4,05 (2H, s, (H-5)); 4,65 (2H, d, $^3J=7,2$ Hz, (H-4)); 5,62 (1H, tq, $^3J_1=7,2$ Hz, $^3J_2=1,1$ Hz, (H-3))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,8 (C-1); 20,9 (C-7) 60,3 (C-4); 67,6 (C-5); 118,5 (C-3); 140,8 (C-2); 171,1 (C-6)

3-(Acetoxymethyl)but-1-en-1-ol (87b)

- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 1,70 (3H, s, (H-1)); 2,08 (3H, s, (H-7)) 4,21 (2H, d, $^3J=6,6$ Hz, (H-4)); 4,48 (2H, s, (H-5)); 5,66 (1H, tq, $^3J_1=6,6$ Hz, $^3J_2=1,1$ Hz, (H-3))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 14 (C-1); 20,9 (C-7); 58,9 (C-4); 69 (C-5); 127,0 (C-3); 133,1 (C-2); 170,8 (C-6)

6.7.25 3-(Acetoxymethinyl)-but-1-en-1-olacetat (88)

Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Weißflog^[10] durchgeführt.

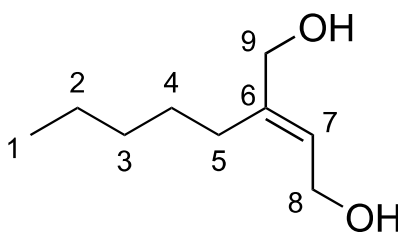
15 mg der Monoester **87a** & **87b** wurden in 2,5 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 53 mg Dess-Martin-Periodinan wurde die Kühlung entfernt. Nach etwa 3 h konnte per DC kein Ausgangsstoff mehr detektiert werden und die Reaktionslösung wurde mit 10 ml Dichlormethan verdünnt und in einen Scheidetrichter mit 5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 5 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung ca. 3 min geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Synthese weiterverwendet.

Das Oxidationsprodukt wurde in einem Schlenkgefäß in 5 ml Triethylamin gelöst und 1 mg 4-DMAP sowie 0,75 ml Essigsäureanhydrid zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei 80 °C gerührt wurde, wurde es auf RT abgekühlt und 10 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch Aufgereinigt (PE/ DE, 25:1; $R_f=0,89$ in PE/ DE 2:1), um ein gelbes Öl der vier möglichen *E* und *Z* Isomere mit einem Verhältnis von 1 : 0,44 : 0,29 : 0,07 (A:B:C:D) zu erhalten. Die Isomere A und B besitzen eine *trans*-Konfiguration zwischen den Kohlenstoffen 3 und 4, wohingegen C und D eine *cis* konfigurierte Bindung an dieser Stelle aufweisen.

- **Ausbeute:** 28 mg (45 %)

- **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3) [ppm] 1,77 (0,75H, s, (H-1B)); 1,82 (1,58H, s, (H-1A)); 1,98 (0,13H, s, (H-1D)); 1,99 (0,44H, s, (H-1C)); 2,16 - 2,19 (6H, m, (H-7&7')); 5,20 (0,15H, d, $^3J = 7,3$ Hz, (H-3C)); 5,77 (0,04H, d, $^3J = 7,3$ Hz, (H-3D)); 6,04 (0,52H, d, $J = 12,44$ Hz, (H-3A)); 6,56 (0,23H, d, $^3J = 12,8$ Hz, (H-3B)); 7,00 (0,23H, s, (H-5A&5B)); 7,05 (0,23H, d, $^3J = 7,7$ Hz, (H-4C&4D)); 7,2 (0,51H, s, (H-5A)); 7,36 - 7,4 (0,9H, m, (H-4A&4B&5C))
- **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,6; 14,4; 20,7; 20,8; 29,7; 30,3; 110,3; 110,7; 114,6; 114,9; 118; 132,4; 133,6; 134,6; 135,7; 135,9; 136,6; 167,4; 167,6; 167,9; 167,9

6.7.26 3-(Hydroxymethyl)-oct-2-en-1-ol (85)



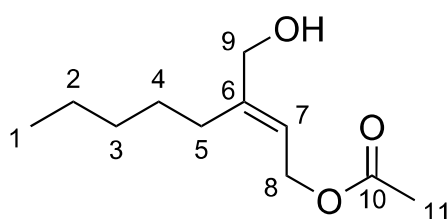
Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Ishino *et al.*^[193] durchgeführt.

1,97 g 1,4-Butindiol (22,9 mmol) wurden in 200 ml Diethylether bei 20 °C und unter Rühren gelöst. Nach tropfenweiser Zugabe von 46 ml Pentylmagnesiumbromidlösung (2 M in DE) wurde die Suspension über Nacht bei Rückfluss gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung in 200 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung geschüttet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung benutzt ($R_f = 0,25$ in DE).

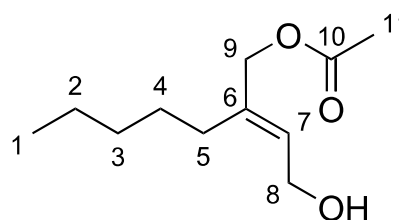
- **Ausbeute:** quantitativ
- **$^1\text{H-NMR}$** (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,86 (3H, t, $^3J = 6,6$ Hz, (H-1)); 1,21 - 1,35 (6H, m, (H-2&3&4)); 2,03 (2H, t, $^3J = 7,7$ Hz, (H-5)); 3,77 (2H, bs, (2x OH)); 3,98 (2H, s, (H-9)); 4,13 (2H, , $^3J = 6,6$ Hz, (H-8)); 5,58 (1H, t, $^3J = 6,6$ Hz, (H-7))

- $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,9 (C-1); 22,4&28,5&31,8 (C-2&3&4); 28,1 (C-5); 58,4 (C-8); 65,5 (C-9); 123,6 (C-7); 142,1 (C-6)

6.7.27 3-(Hydroxymethyl)-oct-2-en-1-olacetat (86a) und 3-(Acetoxymethyl)-oct-2-en-1-ol (86b)



86a



86b

700 mg des Dialkohols **85** wurden in 20 ml Diisopropylether und 15 ml Vinylacetat gelöst. Nach Zugabe von 150 mg *A. niger* lipase (236 U/mg, Sigma Aldrich) wurde die Suspension 69 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und das Lösungsmittelgemisch unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE 3:2; $R_f=0,29$ (a), $R_f=0,21$ (b) in PE/ DE 2:3)

- **Ausbeute:** 367 mg (41 %)

3-(Hydroxymethyl)-oct-2-en-1-olacetat (86a)

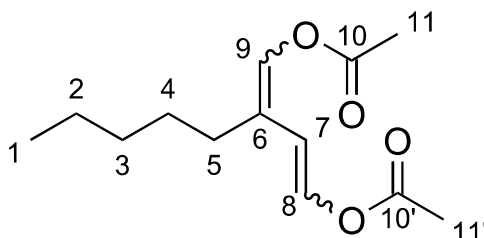
- $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) [ppm] 0,86 (3H, t, $^3J=7,2$ Hz, (H-1)); 1,27 (4H, m, (H-2&3)); 1,37 (2H, m, (H-4)); 2,03 (3H, s, (H-11)); 2,09 (2H, t, $^3J=8$ Hz, (H-5)); 4,06 (2H, s, (H-9)); 4,62 (2H, d, $^3J=6,6$ Hz, (H-8)); 5,59 (1H, t, $^3J=7,2$ Hz, (H-7))
- $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,9 (C-1); 20,9 (C-11); 22,4&31,7 (C-2&3); 28,2 (C-5); 28,4 (C-4); 60,7 (C-8); 65,8 (C-9); 118,5 (C-7); 145,3 (C-6)

3-(Acetoxymethyl)-oct-2-en-1-ol (86b)

- $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) [ppm] pmr0,873t, $^3J=7,2$ Hz1; 1,27 (4H, m, (H-2&3)); 1,38 (2H, m, (H-4)); 2,06 - 2,08 (3H, s+t, (H-5&11)); 4,19 (2H, d, $^3J=6,6$ Hz, (H-8)); 4,50 (2H, s, (H-9)); 5,65 (1H, t, $^3J=7,2$ Hz, (H-7))

- **$^{13}\text{C-NMR}$** (150 MHz, CDCl_3) [ppm] 13,9 (C-1); 20,9 (C-11); 22,4&31,7 (C-2&3); 28,2 (C-4); 28,4 (C-5); 58,7 (C-9); 67,4 (C-8); 127,4 (C-7); 137,4 (C-6)

6.7.28 3-(Acetoxymethin)oct-1-en-1-olacetat (89)



Die Synthese wurde in abgewandelter Weise nach Weißflog^[10] durchgeführt.

140 mg der Monoester **86a** und **86b** (0,7 mmol) wurden in 30 ml Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und 356 mg Dess-Martin-Periodinan (0,84 mmol) zugegeben. Nachdem per Dünnschichtchromatographie kein Ausgangsstoff mehr nachgewiesen werden konnte (2 h), wurde die Reaktionslösung in einen Scheidetrichter mit 15 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 15 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung ca. 3 min geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Synthese weiterverwendet.

Das Oxidationsprodukt wurde in einem Schlenkgefäß in 35 ml Triethylamin gelöst und 4 mg 4-DMAP sowie 3,5 ml Essigsäureanhydrid zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch über Nacht bei 80 °C gerührt wurde, wurde es auf RT abgekühlt und 35 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/ DE, 6:1; $R_f=0,53$ in PE/ DE 4:1), um ein gelbes Öl der vier möglichen *E* und *Z* Isomere mit einem Verhältnis von 1 : 0,28 : 0,16 : 0,11 (A:B:C:D) zu erhalten. Die Isomere A und B besitzen eine *trans*-Konfiguration zwischen den

Kohlenstoffen 7 und 8, wohingegen C und D eine *cis* konfigurierte Bindung an dieser Stelle aufweisen.

- **Ausbeute:** 35 %

- **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) [ppm]

0,87 (3H, t, ³J = 6,6 Hz, (H-1)); 1,29 (4H, m, (H-2&3)); 1,39 - 1,51 (2H, m, (H-4)); 2,10 - 2,39 (8H, m, (H-5&11&11')); 5,10 (0,09H, d, ³J = 7,2 Hz, (H-7C)); 5,65 (0,06H, d, ³J = 7,2 Hz, (H-7D)); 5,90 (0,16H, d, ³J = 12,7 Hz, (H-7B)); 6,42 (0,57H, d, ³J = 13,2 Hz, (H-7A)); 6,96 (0,07H, s, (H-8C)); 7,01 - 7,04 (0,74H, m8A&9C&9D, (H-;)) 7,15 (0,16H, s, (H-8B)); 7,37 - 7,44 (0,79H, m, (H-8D&9A&9B))

- **¹³C-NMR** (150 MHz, CDCl₃) [ppm] 13,9; 14,9; 14; 20,6; 20,7; 22,3; 22,3; 22,4; 22,5; 24,9; 27,5; 27,6; 27,9; 28,1; 28,86; 29; 31,2; 31,5; 31,5; 31,5; 31,6; 105,3; 109,2; 109,6; 113,3; 119; 119,7; 121,3; 121,6; 132,2; 132,5; 133,1; 133,2; 134,1; 135,5; 135,9; 136,5; 167,2; 167,3; 167,4; 167,6; 167,8

Literatur

- [1] R. Ulber, K. Soyez, *Chemie in unserer Zeit* **2004**, *38*, 172–180.
- [2] T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations, Second Edition*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [3] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697.
- [4] S. Cengiz, L. Cavas, K. Yurdakoc, G. Pohnert, *Marine Biotechnology* **2011**, *13*, 321–326.
- [5] N. Bitou, M. Ninomiya, T. Tsujita, H. Okuda, *Lipids* **1999**, *34*, 441–445.
- [6] M. Ninomiya, J. Onishi, T. Kusumi, *Fisheries Science* **1998**, *64*, 346–347.
- [7] S. Cengiz, L. Cavas, K. Yurdakoc, S. Aksu, *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi* **2012**, *37*, 445–451.
- [8] S. Adolph, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2008**, Digitale Bibliothek Thuringen [<http://www.db-thueringen.de/servlets/OAIDDataProvider>] (Germany) ER <http://www.db-thueringen.de/servlets/DocumentServlet?id=10072>.
- [9] S. Adolph, V. Jung, J. Rattke, G. Pohnert, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 2806–2808.
- [10] J. Weißflog, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2010**.
- [11] T. Satoh, M. Hosokawa, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **1998**, *38*, 257–288.
- [12] F. M. Williams, *Clinical Pharmacokinetics* **1985**, *10*, 392–403.
- [13] P. Li, P. S. Callery, L. S. Gan, S. K. Balani, *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 1203–1208.
- [14] A. D. Quiroga, L. N. Li, M. Trotsmuller, R. Nelson, S. D. Proctor, H. Kofeler, R. Lehner, *Hepatology* **2012**, *56*, 2188–2198.
- [15] C. C. Uphoff, H. G. Drexler, *Leukemia & Lymphoma* **2000**, *39*, 257–270.
- [16] M. Tavassoli, M. Shaklai, W. H. Crosby, *American Journal of Clinical Pathology* **1979**, *72*, 59–62.
- [17] M. Wolman, V. V. Sterk, S. Gatt, M. Frenkel, *Pediatrics* **1961**, *28*, 742–57.
- [18] C. Caliezi, W. A. Wuillemin, S. Zeerleder, M. Redondo, B. Eisele, C. E. Hack, *Pharmacological Reviews* **2000**, *52*, 91–112.
- [19] L. G. J. Frenken, M. R. Egmond, A. M. Batenburg, J. W. Bos, C. Visser, C. T. Verrips, *Applied and Environmental Microbiology* **1992**, *58*, 3787–3791.

- [20] Y. Y. Wei, J. L. Schottel, U. Derewenda, L. Swenson, S. Patkar, Z. S. Derewenda, *Nature Structural Biology* **1995**, *2*, 218–223.
- [21] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. Verschueren, A. Goldman, *Protein Engineering* **1992**, *5*, 197–211.
- [22] Z. S. Derewenda, Y. Y. Wei, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 2104–2105.
- [23] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2656–2665.
- [24] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [25] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hujesjensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature* **1991**, *351*, 491–494.
- [26] Z. S. Derewenda, A. M. Sharp, *Trends in Biochemical Sciences* **1993**, *18*, 20–25.
- [27] L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1958**, *30*, 513–521.
- [28] R. D. Schmid, R. Verger, *Angewandte Chemie* **1998**, *110*, 1694–1720.
- [29] G. van Pouderoyen, T. Eggert, K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, *Journal of Molecular Biology* **2001**, *309*, 215–226.
- [30] Y. Ben Ali, H. Chahinian, S. Petry, G. Muller, F. Carriere, R. Verger, A. Abousalham, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9298–9306.
- [31] E. Lesuisse, K. Schanck, C. Colson, *European Journal of Biochemistry* **1993**, *216*, 155–160.
- [32] A. Jansson, J. Niemi, P. Mantsala, G. Schneider, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 39006–39013.
- [33] U. T. Bornscheuer, *Fems Microbiology Reviews* **2002**, *26*, 73–81.
- [34] G. Avwioro, *Journal of Research and Reviews in Applied Sciences* **2011**, *1*, 24–34.
- [35] M. P. Michael H. Ross, Wojciech, *Histology: A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology, Vol. 5*, Lippincott Williams and Wilkins, **2006**.
- [36] G. Gomori, *Archives of Pathology* **1941**, *32*, 189–191.
- [37] G. Gomori, *Experimental Biology and Medicine* **1939**, *42*, 23–26.
- [38] G. Gomori, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1948**, *69*, 407–409.
- [39] G. Gomori, *Archives of Pathology* **1946**, *41*, 121–129.

-
- [40] G. Gomori, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1948**, *68*, 354–358.
- [41] E. W. Dempsey, H. W. Deane, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1946**, *27*, 159–179.
- [42] M. L. Menten, J. Junge, M. H. Green, *Journal of Biological Chemistry* **1944**, *153*, 471–477.
- [43] S. J. Holt, *Nature* **1952**, *169*, 271–273.
- [44] M. Kordel, B. Hofmann, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Journal of Bacteriology* **1991**, *173*, 4836–4841.
- [45] K. E. Jäger, M. T. Reetz, *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 68–73.
- [46] J. D. De Caro, P. Rouimi, M. Rovey, *European Journal of Biochemistry* **1986**, *158*, 601–607.
- [47] B. S. Hartley, B. A. Kilby, *Biochemical Journal* **1954**, *56*, 288–297.
- [48] O. Lockridge, W. H. Xue, A. Gaydess, H. Grigoryan, S. J. Ding, L. M. Schopfer, S. H. Hinrichs, P. Masson, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 22582–22590.
- [49] G. E. Means, M. L. Bender, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4989–4994.
- [50] J. T. Tildon, J. W. Ogilvie, *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247*, 1265–1271.
- [51] J. F. Whitaker, *Clinica Chimica Acta* **1973**, *44*, 133–138.
- [52] R. Gandolfi, F. Marinelli, A. Lazzarini, F. Molinari, *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *89*, 870–875.
- [53] S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chemical Communications* **2006**, 2311–2319.
- [54] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annual Review of Biochemistry* **2008**, *77*, 383–414.
- [55] B. M. Cullen, I. M. Halliday, G. Kay, J. Nelson, B. Walker, *Biochemical Journal* **1992**, *283*, 461–465.
- [56] C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 560–567.
- [57] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjugate Chemistry* **1994**, *5*, 400–405.
- [58] S. H. L. Verhelst, M. Bogyo, *Biotechniques* **2005**, *38*, 175–177.
- [59] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 87–95.
- [60] T. Bottcher, S. A. Sieber, *Medchemcomm* **2012**, *3*, 408–417.

- [61] G. E. Means, R. E. Feeney, *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 2–12.
- [62] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 64–77.
- [63] Y. S. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [64] D. Kidd, Y. S. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005–4015.
- [65] H. Schmidinger, R. Birner-Gruenberger, G. Riesenhuber, R. Saf, H. Susani-Etzerodt, A. Hermetter, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1776–1781.
- [66] L. Chen, J. Li, L. Du, M. Li, *Medicinal Research Reviews* **2014**, 1–25.
- [67] M. Fonovic, M. Bogoy, *Current Pharmaceutical Design* **2007**, *13*, 253–261.
- [68] D. Greenbaum, K. F. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogoy, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 569–581.
- [69] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nature Chemical Biology* **2006**, *2*, 274–281.
- [70] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 10000–10005.
- [71] R. F. Colman, *Letters in Drug Design & Discovery* **2006**, *3*, 462–480.
- [72] M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Nomanbhoy, M. Wu, H. Weisig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 350–358.
- [73] M. P. Wymann, G. BulgarelliLeva, M. J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, G. Panayotou, *Molecular and Cellular Biology* **1996**, *16*, 1722–1733.
- [74] C. S. Tsai, Y. K. Li, L. C. Lo, *Organic Letters* **2002**, *4*, 3607–3610.
- [75] D. J. Vocadlo, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 5338–5342.
- [76] A. T. Wright, B. F. Cravatt, *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 1043–1051.
- [77] U. M. Kent, M. I. Jushchyshyn, P. F. Hollenberg, *Current Drug Metabolism* **2001**, *2*, 215–243.
- [78] K. R. Shreder, Y. S. Liu, T. Nomanhboy, S. R. Fuller, M. S. Wong, W. Z. Gai, J. Y. Wu, P. S. Leventhal, J. R. Lill, S. Corral, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 790–798.
- [79] K. A. Kalesh, L. P. Tan, K. Lu, L. Q. Gao, J. G. Wang, S. Q. Yao, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 589–591.
- [80] M. Uttamchandani, J. Li, H. Sun, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 667–675.
- [81] R. L. Hunter, C. L. Markert, *Science* **1957**, *125*, 1294–1295.

-
- [82] G. Gomori, *International Review of Cytology – a Survey of Cell Biology* **1952**, *1*, 323–335.
- [83] T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 4600–4603.
- [84] M. Groll, E. P. Balskus, E. N. Jacobsen, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 14981–14983.
- [85] L. Maveyraud, I. Massova, C. Birck, K. Miyashita, J.-P. Samama, S. Mobashery, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7435–7440.
- [86] D. H. Kim, J. I. Park, S. J. Chung, J. D. Park, N. K. Park, J. H. Han, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 2553–2560.
- [87] B. M. Beadle, B. K. Shoichet, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 3978–3980.
- [88] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 739–758.
- [89] E. C. Webb, *Biochemical Journal* **1948**, *42*, 96–98.
- [90] I. M. Kovach, M. Larson, R. L. Schowen, *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 5490–5495.
- [91] P. A. Bartlett, L. A. Lamden, *Bioorganic Chemistry* **1986**, *14*, 356–377.
- [92] F. Björkling, A. Dahl, S. Patkar, M. Zundel, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1994**, *2*, 697–705.
- [93] M. L. M. Mannesse, J. W. P. Boots, R. Dijkman, A. J. Slotboom, H. T. W. V. Vanderhijden, M. R. Egmond, H. M. Verheij, G. H. Dehaas, *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* **1995**, *1259*, 56–64.
- [94] H. Scholze, H. Stutz, F. Paltauf, A. Hermetter, *Analytical Biochemistry* **1999**, *276*, 72–80.
- [95] R. Birner-Gruenberger, H. Susan-Etzerodt, M. Kollroser, G. N. Rechberger, A. Hermetter, *Proteomics* **2008**, *8*, 3645–3656.
- [96] D. BellanSantini, P. M. Arnaud, G. Bellan, M. Verlaque, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **1996**, *76*, 235–237.
- [97] A. Guerriero, D. Depentori, M. Dambrosio, F. Pietra, *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 1755–1762.
- [98] K. Grosser, I. Weissflog, B. Dietzek, J. Popp, G. Pohnert, *Botanica Marina* **2014**, *57*, 1–7.
- [99] I. A. Weissflog, K. Grosser, M. Brautigam, B. Dietzek, G. Pohnert, J. Popp, *Chem-BioChem* **2013**, *14*, 727–732.

- [100] D. u. K. W. H. Andre, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1932**, 645–647.
- [101] A. R. Brash, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 23679–23682.
- [102] H. Porta, M. Rocha-Sosa, *Microbiology-Society for General Biology* **2001**, 147, 3199–3200.
- [103] E. H. Oliw, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **2002**, 68-9, 313–323.
- [104] G. L. Bundy, *Advances in Prostaglandin Thromboxane and Leukotriene Research* **1985**, 14, 229–262.
- [105] D. J. Hawkins, A. R. Brash, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262, 7629–7634.
- [106] S. Yamamoto, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1992**, 1128, 117–131.
- [107] C. Schneider, D. A. Pratt, N. A. Porter, A. R. Brash, *Chemistry & Biology* **2007**, 14, 473–488.
- [108] A. Mellors, A. L. Tappel, *Lipids* **1966**, 1, 282–284.
- [109] A. L. Tappel, *American Journal of Clinical Nutrition* **1970**, 23, 1137–1140.
- [110] M. Hamberg, B. Samuelss, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1974**, 71, 3400–3404.
- [111] D. H. Nugteren, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1975**, 380, 299–307.
- [112] T. Schewe, W. Halangk, C. Hiebsch, S. M. Rapoport, *Febs Letters* **1975**, 60, 149–152.
- [113] M. Rempt, G. Pohnert, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, 4755–4758.
- [114] G. Pohnert, *ChemBioChem* **2005**, 6, 946–959.
- [115] G. Pohnert, W. Boland, *Natural Product Reports* **2002**, 19, 108–122.
- [116] I. Feussner, C. Wasternack, *Annual Review of Plant Biology* **2002**, 53, 275–297.
- [117] M. A. Noordermeer, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *ChemBioChem* **2001**, 2, 494–504.
- [118] W. H. Gerwick, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1994**, 1211, 243–255.
- [119] S. J. Feinmark, J. A. Cornicelli, *Biochemical Pharmacology* **1997**, 54, 953–959.
- [120] H. Manev, R. Manev, *Medical Hypotheses* **2006**, 66, 501–503.
- [121] S. T. Holgate, P. Bradding, A. P. Sampson, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1996**, 98, 1–13.

-
- [122] D. Steinhilber, *Current Medicinal Chemistry* **1999**, *6*, 71–85.
- [123] G. P. Pidgeon, J. Lysaght, S. Krishnamoorthy, J. V. Reynolds, K. O'Byrne, D. Nie, K. V. Honn, *Cancer Metastasis Rev* **2007**, *26*, 503–24.
- [124] D. G. Tang, E. H. La, J. Kern, J. P. Kehrer, *Biological Chemistry* **2002**, *383*, 425–442.
- [125] B. Samuelsson, S. E. Dahlen, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, C. N. Serhan, *Science* **1987**, *237*, 1171–1176.
- [126] B. Samuelsson, *Science* **1983**, *220*, 568–575.
- [127] C. Pergola, O. Werz, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2010**, *20*, 355–375.
- [128] D. Steinhilber, B. Hofmann, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2014**, *114*, 70–77.
- [129] J. F. Evans, A. D. Ferguson, R. T. Mosley, J. H. Hutchinson, *Trends in Pharmacological Sciences* **2008**, *29*, 72–78.
- [130] G. W. Carter, P. R. Young, D. H. Albert, J. Bouska, R. Dyer, R. L. Bell, J. B. Summers, D. W. Brooks, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1991**, *256*, 929–937.
- [131] W. Berger, M. T. M. De Chandt, C. B. Cairns, *International Journal of Clinical Practice* **2007**, *61*, 663–676.
- [132] R. A. Braeckman, G. R. Granneman, C. S. Locke, J. M. Machinist, J. H. Cavannaugh, W. M. Awni, *Clinical Pharmacokinetics* **1995**, *29 Suppl 2*, 42–48.
- [133] N. C. Gilbert, S. G. Bartlett, M. T. Waight, D. B. Neau, W. E. Boeglin, A. R. Brash, M. E. Newcomer, *Science* **2011**, *331*, 217–219.
- [134] Y. Wu, C. He, Y. Gao, S. He, Y. Liu, L. Lai, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 2597–2605.
- [135] D. A. Parks, D. N. Granger, *Acta Physiol Scand Suppl* **1986**, *548*, 87–99.
- [136] A. Atlante, D. Valenti, S. Gagliardi, S. Passarella, *Brain Research Protocols* **2000**, *6*, 1–5.
- [137] F. F. Morpeth, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1983**, *744*, 328–334.
- [138] F. F. Morpeth, G. N. George, R. C. Bray, *Biochemical Journal* **1984**, *220*, 235–242.
- [139] N. Cantu-Medellin, E. E. Kelley, *Nitric Oxide* **2013**, *34*, 19–26.
- [140] B. L. J. Godber, J. J. Doel, G. P. Sapkota, D. R. Blake, C. R. Stevens, R. Eisenthal, R. Harrison, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 7757–7763.
- [141] L. B. Maia, J. J. G. Moura, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, *16*, 443–460.

- [142] K. Viles, C. Mathai, F. L. Jourd'heuil, D. Jourd'heuil, *Nitric Oxide* **2013**, *28*, 57–64.
- [143] M. Trujillo, M. N. Alvarez, G. Peluffo, B. A. Freeman, R. Radi, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 7828–7834.
- [144] R. Hille, T. Nishino, *The FASEB Journal* **1995**, *9*, 995–1003.
- [145] K. N. Murray, J. G. Watson, S. Chaykin, *Journal of Biological Chemistry* **1966**, *241*, 4798–4801.
- [146] B. T. Eger, K. Okamoto, C. Enroth, M. Sato, T. Nishino, E. F. Pai, T. Nishino, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2000**, *56*, 1656–1658.
- [147] C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E. F. Pai, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 10723–10728.
- [148] K. Okamoto, K. Matsumoto, R. Hille, B. T. Eger, E. F. Pai, T. Nishino, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 7931–7936.
- [149] J. J. Truglio, K. Theis, S. Leimkühler, R. Rappa, K. V. Rajagopalan, C. Kisker, *Structure* **2002**, *10*, 115–125.
- [150] S. Leimkühler, A. L. Stockert, K. Igarashi, T. Nishino, R. Hille, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 40437–40444.
- [151] H. M. Kramer, G. Curhan, *American Journal of Kidney Diseases* **2002**, *40*, 37–42.
- [152] A. K. Tausche, S. Unger, K. Richter, C. Wunderlich, J. Grässler, B. Roch, H. E. Schröder, *Der Internist* **2006**, *47*, 509–522.
- [153] K. C. Lin, H. Y. Lin, P. Chou, *Journal of Rheumatology* **2000**, *27*, 1501–1505.
- [154] G. B. Elion, S. Callahan, H. Nathan, S. Bieber, R. W. Rundles, G. H. Hitchings, *Biochemical Pharmacology* **1963**, *12*, 85–93.
- [155] T. Spector, W. W. Hall, T. A. Krenitsky, *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35*, 3109–3114.
- [156] R. Hille, G. N. George, M. K. Eidsness, S. P. Cramer, *Inorganic Chemistry* **1989**, *28*, 4018–4022.
- [157] U. Dietzel, J. Kuper, J. A. Doebbler, A. Schulte, J. J. Truglio, S. Leimkühler, C. Kisker, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 8768–8776.
- [158] T. Spector, D. G. Johns, *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245*, 5079–5085.
- [159] T. A. Krenitsky, T. Spector, W. W. Hall, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1986**, *247*, 108–119.
- [160] M. D. Davis, J. S. Olson, G. Palmer, *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 14730–14737.

-
- [161] H. Kikuchi, H. Fujisaki, T. Furuta, K. Okamoto, S. Leimkühler, T. Nishino, *Scientific Reports* **2012**, *2*.
- [162] N. L. Edwards, *Rheumatology* **2009**, *48*, 15–19.
- [163] A. B. Nongonierma, C. Mooney, D. C. Shields, R. J. FitzGerald, *Food Chemistry* **2013**, *141*, 644–653.
- [164] S. Y. Sheu, Y. C. Lin, H. C. Chiang, *Anticancer Research* **1996**, *16*, 3571–3576.
- [165] T. Hatano, T. Yasuhara, R. Yoshihara, Y. Ikegami, M. Matsuda, K. Yazaki, I. Agata, S. Nishibe, T. Noro, M. Yoshizaki, T. Okuda, *Planta Medica* **1991**, *57*, 83–84.
- [166] W. S. Chang, Y. J. Lee, F. J. Lu, H. C. Chiang, *Anticancer Research* **1993**, *13*, 2165–2170.
- [167] M. P. Silva, L. Mira, J. Lima, C. F. Manso, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1996**, *1*, 279–284.
- [168] W. S. Chang, P. C. Wen, H. C. Chiang, *Anticancer Research* **1995**, *15*, 703–707.
- [169] W. S. Chang, H. C. Chiang, *Anticancer Research* **1995**, *15*, 1969–1973.
- [170] X. Y. Liu, R. H. Chen, Y. J. Shang, B. H. Jiao, C. G. Huang, *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *176*, 137–142.
- [171] T. Unno, A. Sugimoto, T. Kakuda, *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *93*, 391–395.
- [172] K. M. Khan, M. Khan, A. Karim, M. Taha, N. Ambreen, A. Gojayev, S. Perveen, M. I. Choudhary, *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **2013**, *35*, 495–498.
- [173] E. B. Skibo, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4189–4194.
- [174] L. Commeiras, M. Santelli, J. L. Parrain, *Organic Letters* **2001**, *3*, 1713–1715.
- [175] P. Richter, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2010**.
- [176] P. M. Hardy, A. C. Nicholls, H. N. Rydon, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1972**, 2270–2278.
- [177] P. J. Kocienski, C. J. Love, R. J. Whitby, G. Costello, D. A. Roberts, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3839–3848.
- [178] H. M. S. Kumar, B. V. S. Reddy, S. Anjaneyulu, J. S. Yadav, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 8305–8306.
- [179] P. M. Henry, *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 3853–3859.
- [180] L. Rebrovic, G. F. Koser, *Journal of Organic Chemistry* **1984**, *49*, 2462–2472.
- [181] D. B. Dess, J. C. Martin, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 7277–7287.

- [182] C. Djerassi, C. T. Lenk, *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75*, 3493–3495.
- [183] A. C. Cope, R. T. Keller, *Journal of Organic Chemistry* **1956**, *21*, 141–141.
- [184] P. G. McDougal, J. G. Rico, Y. I. Oh, B. D. Condon, *Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 3388–3390.
- [185] B. Karimi, A. Zamani, D. Zareyee, *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 9139–9141.
- [186] S. D. Najdi, M. M. Olmstead, N. E. Schore, *Journal of Organometallic Chemistry* **1992**, *431*, 335–358.
- [187] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [188] G.-C. Kuang, H. A. Michaels, J. T. Simmons, R. J. Clark, L. Zhu, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6540–6548.
- [189] H. A. Michaels, L. Zhu, *Chemistry - An Asian Journal* **2011**, *6*, 2825–2834.
- [190] A. M. Sadaghiani, S. H. L. Verhelst, M. Bogyo, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 20–28.
- [191] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067–1071.
- [192] J. A. Key, C. W. Cairo, *Dyes and Pigments* **2011**, *88*, 95–102.
- [193] Y. Ishino, K. Wakamoto, T. Hirashima, *Chemistry Letters* **1984**, *13*, 765–768.
- [194] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 9879–9883.
- [195] W. L. Baker, J. Goode, L. Cooper, *Mikrochimica Acta* **1992**, *106*, 143–152.
- [196] M. R. Levengood, C. C. Kerwood, C. Chatterjee, W. A. van der Donk, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 911–919.
- [197] D. Hasenpusch, U. T. Bornscheuer, W. Langel, *Journal of Molecular Modeling* **2011**, *17*, 1493–1506.
- [198] O. Misset, G. Gerritse, K. E. Jaeger, U. Winkler, C. Colson, K. Schanck, E. Lesuisse, V. Dartois, M. Blaauw, S. Ransac, B. W. Dijkstra, *Protein Engineering* **1994**, *7*, 523–529.
- [199] M. R. Redinbo, S. Bencharit, P. M. Potter, *Biochemical Society Transactions* **2003**, *31*, 620–624.
- [200] K. Grosser, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2013**.
- [201] P. Richter, G. Schubert, A. M. Schaible, L. Cavas, O. Werz, G. Pohnert, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1655–1659.

- [202] M. S. Blois, *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
- [203] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [204] G. Z. Li, J. P. C. Vissers, J. C. Silva, D. Golick, M. V. Gorenstein, S. J. Geromanos, *Proteomics* **2009**, *9*, 1696–1719.
- [205] A. M. Schaible, H. Traber, V. Temml, S. M. Noha, R. Filosa, A. Peduto, C. Weinigel, D. Barz, D. Schuster, O. Werz, *Biochemical Pharmacology* **2013**, *86*, 476–486.
- [206] K. D. Park, P. Morieux, C. Salome, S. W. Cotten, O. Reamtong, C. Eysers, S. J. Gaskell, J. P. Stables, R. H. Liu, H. Kohn, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6897–6911.
- [207] Z. Selinger, Y. Lapidot, *Journal of Lipid Research* **1966**, *7*, 174–175.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Georg Pohnert für das äußerst interessante Thema, welches meine Leidenschaft für die organische Synthese und auch der Bioanalytik unter einen Hut gebracht hat. Ich bedanke mich bei Ihm besonders für seine Geduld, Freundlichkeit sowie die interessanten und konstruktiven Diskussionen. Im gleichen Zug Danke ich auch Susanne Schmidt, welche glücklicherweise von diesem Thema abgesprungen ist, wodurch ich das Thema ergattern konnte. Besonderen Dank richte ich auch an Oliver Werz und Gregor Schubert für die tolle Zusammenarbeit und bei der Interpretation der Lipoxygenaseexperimente. Vielen Dank auch an die VolkswagenStiftung für die finanzielle Unterstützung.

Weiter danke ich:

Meiner liebsten Freundin, Marie-Luise Mährländer für die Unterstützung während der Zeit in Augsburg und dass sie mich immer aufgemuntert hat, wenn es auf Arbeit mal wieder drunter und drüber ging.

Meiner Familie, Ellen Richter, Volkmar Richter, Thomas Kupfer, Ilona Mielke und Karl Mielke für die ständige Nachfrage nach dem Abgabetermin, wodurch ich meine Dissertation schneller fertiggestellt habe.

Jerrit Weißflog für die Hilfe bei meinen vielen Problemen in der organischen Synthese, für die allgemein sehr freundschaftliche Betreuung und für die Belehrung, dass man „Orschwärnochbleedehior“ in einem Wort schreibt.

Hannes Richter für immer wieder glänzende Kolben, schnelle Bestellungen von Chemikalien und den Mettwoch, welcher an allen Werktagen gefeiert werden kann.

Björn Gebser, Carsten Paul, Johannes Frenkel, Ralf Kessler und Tino Jaschinski für die lustigen und spannenden Doppelkopfrunden und sowieso für die sehr angenehme Stimmung im Labor und Pausenraum, sowie auch außerhalb der Uni.

Stefanie Wolfram für die Hilfe bei der Enzymanalytik, Proteinsequenzauswertung, beim Gele gießen und das Warten der zickigen UPLC.

Natalie Wielsch für die Sequenzierung der markierten Schweineleberesterase.

Katharina Grosser für die freundschaftliche und nette Laboratmosphäre und das sie mich bei meinen vielen schlechten Wortwitzen nicht aus dem Labor geschmissen hat.

Allgemein der gesamten Arbeitsgruppe Bioanalytik von Prof. Georg Pohnert für die gute Stimmung und eine sehr schöne Zeit. Anne, aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schubert, die mir bei der Benutzung des 96-Wellplateraders zur Bestimmung der Xanthinoxidasekinetiken geholfen hat.

Johannes Frenkel, Christine Lembke, Dominique Jacquemoud für die gute Atmosphäre im Bürozimmer und das keiner Passierschein A38 ausgehändigt hat.

Madlen Kühn für die Übernahme der bürokratischen Unannehmlichkeiten.

Prof. Dr. Levent Çavaş für den sehr netten Aufenthalt in Izmir, vor allem für die kulinarischen Genüsse. Zudem für das Sammeln von *Caulerpa racemosa* zur Gewinnung von Caulerpenin und die Unterstützung beim Verfassen der Veröffentlichung zur Lipoxygenaseninhibition.

Lebenslauf

- 1992 – 1996 Staatliche Grundschule Schöndorf - Weimar
Aug Juli
- 1996 – 2004 Friedrich-Schiller-Gymnasium Weimar, Abitur
Aug Mai
(Abschlussnote: 2,6)
- 2004 – 2005 Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt Weimar
Aug Mai
- 2005 – 2010 Studium der Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Okt Okt
(Abschlussnote: 1,7)
- 2010 – Heute Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Institut für
Nov
Anorganische und Analytische Chemie

.....

Ort, Datum

Unterschrift

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- P. Richter, J. Weißflog, N. Wielsch, A. Svatoš, G. Pohnert: »Functionalized Bis-enol acetates as Specific molecular probes for esterases«, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2435–2438.
- P. Richter, G. Schubert, A. M. Schaible, O. Werz and G. Pohnert, »Caulerpenyne and its bis-enol esters are novel-type inhibitors of human 5-lipoxygenase«: *ChemBioChem* **2014**, *9*, 1655–1659

Weitere Veröffentlichungen:

- T. Jaschinski, K. Thume, M. Klein, P. Richter, J. Popp, G. Pohnert: »Enhanced signal intensity in matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI MS) by chemical modification of bionanostructures from diatom cell walls«, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, *28*, 1521–1529
- S. Wolfram, H. Würfel, S. Habenicht, C. Lembke, P. Richter, N. Wielsch, Y. Hupfer, E. Birckner, A. Svatoš, R. Beckert and G. Pohnert: »Small azide modified thiazole based reporter molecule for fluorescence and mass spectrometric detection«, *Beilstein Journal of organic Chemistry* **2014**, *10*, 2470–2479

Konferenzen

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Konferenzen vorgestellt:

- **23. Irseer Naturstofftage (23 - 25 Februar 2011)**

Schwerpunkte:

- Antiinfektiva
- Wirkmechanismen
- Von der Entwicklung zum Produkt
- Biologische und chemische Naturstoffsynthese
- Nachwuchswissenschaftler stellen sich vor

- **7th Central And Eastern European Proteomics Conference in Jena (13 - 16 Oktober 2013)**

Schwerpunkte:

- Klinische Proteomics und Interactomics
- Neue Technologien für den Hochdurchsatz von klinischen Proteomics
- Proteomische analyse von Pflanzen, Insekten und Bakterien
- Quantitative Proteomics
- Spatial-aufgelöste Proteomics mit Hilfe von Biomarkern

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

.....

Ort, Datum

Unterschrift

