

Immobilisierungsstrategien zur Herstellung von Peptid- und Wirkstoff- Arrays und deren Anwendung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von Diplom-Chemikerin

Maja Köhn

aus Flintbek (Schleswig-Holstein)

Dekan: Prof. Dr. N. Krause

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Breinbauer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2005

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund in der Zeit von Januar 2002 bis März 2005 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Allgemeiner Teil	3
2.1 Mikroarrays	3
2.1.1 Mikroarrays kleiner organischer Moleküle	4
2.1.2 Oberflächen	5
2.1.3 Immobilisierung der Sondensubstanzen	6
2.1.3.1 Unselektive Immobilisierung	6
2.1.3.2 Selektive Immobilisierung	8
2.1.3.4 Spotten	10
2.1.4 Synthese auf Oberflächen.....	11
2.2 Mikrostrukturierte Oberflächen	12
2.2.1 Photolackverfahren	12
2.2.2 Photochemische Verfahren.....	13
2.2.3 Self-assembled Monolayers (SAMs).....	15
2.3 Chemoselektive Reaktionen zur Herstellung von Mikroarrays und mikrostrukturierten Oberflächen	15
2.3.1 Staudinger-Ligation	15
2.3.2 Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen	17
2.4 Protein-Phosphatasen	18
2.4.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs).....	19
2.4.1.1 PTP1B.....	19
2.4.1.2 PTP μ	20
2.4.1.3 MPTPA	20
2.4.1.4 PRL-3	21
2.4.1.5 PTP-SL.....	22
2.4.2 Assays zum Nachweis von Phosphatase-Substratspezifitäten	22
3 Ziele der Arbeit	24
4 Spezieller Teil	26
4.1 Herstellung von Mikroarrays mittels Staudinger-Ligation	26
4.1.1 Die Kupplungsstrategie	26
4.1.2 Ermittlung eines geeigneten Phosphins	28
4.1.3 Immobilisierung von Haptenen mittels spurloser Staudinger-Ligation.....	34

4.1.4 Selektivitäts- und Blockierungs-Experimente zur Kupplungsreaktion.....	41
4.2 Entwicklung eines Mikroarrays zur Bestimmung der Substratspezifität von Protein Tyrosin Phosphatasen	46
4.2.1 Das Konzept	46
4.2.2 Optimierung der Selektivität und der Effektivität der Staudinger-Ligation zur Immobilisierung von Peptiden auf Glasoberflächen	47
4.2.3 Validierung des Substrat-Mikroarray-Konzepts für PTPs.....	56
4.2.4 Anwendung des Substrat-Mikroarrays: Ermittlung der Substratspezifitäten von Phosphatasen und Überprüfung der Ergebnisse in Lösung.....	61
4.2.4.1 PTP1B.....	63
4.2.4.2 PTP μ	66
4.2.4.3 MPTPA	69
4.2.4.4 PRL-3	71
4.2.4.5 PTP-SL.....	73
4.2.4.6 Abschließende Bemerkungen	77
4.3 Herstellung strukturierter Oberflächen mittels Licht-induzierter Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen	80
4.3.1 Evaluierung der Reaktion und Selektivitätstests am polymeren Träger	80
4.3.2 Immobilisierung von Haptenen mittels Licht-induzierter Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen.....	85
4.3.3 Anwendung der Licht-induzierten Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen zur Strukturierung von Oberflächen durch Photolithographie.....	92
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	103
6 Experimenteller Teil	112
6.1 Allgemeines, Messgeräte und Hilfsmittel	112
6.2 Versuche zu Kapitel 4.1	115
6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2.....	115
6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3.....	124
6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4.....	133
6.3 Versuche zu Kapitel 4.2	136
6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.2.....	136
6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.3 und 4.2.4	142
6.4 Versuche zu Kapitel 4.3	179
6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1.....	179
6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2.....	185

6.4.3 Versuche zu Kapitel 4.3.....	194
7 Literaturverzeichnis.....	196
8 Abkürzungsverzeichnis	206

1 Einleitung

In der naturwissenschaftlichen Forschung hat sich die Vorgehensweise in den letzten Jahrzehnten durch die mit zunehmenden Wissen komplexer gewordenen Fragestellungen grundlegend gewandelt: An Stelle einer strikten Trennung der Wissenschaften Biologie, Chemie, Physik und Medizin ist die Forschung in diesem Bereich nun von einer interdisziplinären Herangehensweise geprägt. So werden z.B. zur Untersuchung von zellbiologischen Vorgängen Proteine chemisch modifiziert und mittels Laser-Raster-Mikroskopie sichtbar gemacht.^[1] Viele biologische Prozesse können mittlerweile daher nicht nur durch phänomenologische Ansätze erforscht, sondern in molekularer Auflösung verstanden werden.

Das molekulare Verständnis biologischer Vorgänge ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch im Hinblick auf diagnostische und therapeutische Anwendungen von sehr großem Interesse. Die diese Vorgänge regulierenden Signal-Netzwerke sind äußerst komplex. So muss beispielsweise ein externes Signal über interzelluläre Kommunikation zur Zielzelle geleitet werden, wo das Signal intrazellulär weiterverarbeitet wird und eine biochemische Antwort wie die Änderung einer Enzymaktivität oder Genexpression auslöst. Zwei der wichtigsten regulierenden Prozesse sind die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von Threonin-, Serin- und Tyrosinseitenketten in Proteinen, wobei erstere von Kinasen und letztere von Phosphatasen katalysiert wird. Phosphatasen sind wichtige Regulatoren von Signaltransduktionsprozessen, welche essenziell für Zellwachstum, Zell-Kommunikation und –Differenzierung sowie die Immunantwort sind.^[2] Ein fehlerhafter Ablauf dieser Prozesse führt zu anormal phosphorylierten Proteinen, was wiederum in der Entwicklung von Krankheiten wie Krebs oder Diabetes, die in den entwickelten Ländern mittlerweile zu den Haupttodesursachen gehören,^[3] münden kann.^[4] In diesem Fall kann die Kenntnis der molekularen Vorgänge zu der gezielten Entwicklung von diagnostischen Verfahren führen, welche die anormale Aktivität der Phosphatase erkennen, sowie von Inhibitoren, die sie kontrollieren können.

Die Untersuchungen spezifischer Wechselwirkungen zur Kenntnis biologischer Vorgänge werden durch die Entwicklung von Hochdurchsatz-Techniken bedeutend vorangetrieben. Hochdurchsatz-Techniken ermöglichen eine schnelle, automatisierte und parallele Auslesung von Daten. Neben den standardmäßig zum Hochdurchsatz-Screening eingesetzten Mikrotiterplatten sind chemisch modifizierte Oberflächen von Glas- oder Siliciumobjektträgern eine neu entwickelte Plattform. Auf diesen Oberflächen können erheblich mehr Proben auf wesentlich kleinerem Raum untergebracht und vermessen werden. Eine solche Technik sind Mikroarrays,

auf welchen viele verschiedene Substanzen wie DNA, Peptide oder Wirkstoffe orts aufgelöst immobilisiert sind. Durch einfache Behandlung mit der interessierenden Probe können Wechselwirkungen wie beispielsweise zwischen Peptiden und Proteinen, DNA und DNA und auch Proteinen und Wirkstoffen untersucht werden.^[5] Mikroarrays können in vielen verschiedenen Bereichen eingesetzt werden, z.B. der Diagnostik, der Erstellung von Substratspezifitätsprofilen von Enzymen oder der Wirkstoffsuche. Eine weitere Technik, die sich die Eigenschaften modifizierter Oberflächen von Glas- bzw. Siliciumobjektträgern zu Nutze macht, sind strukturierte Oberflächen. Sie werden unter anderem genutzt, um Zell-Inseln für phänotypische Assays im Mikromaßstab zu konstruieren oder anhand immobilisierter Proteine spezifische Antikörper zu entdecken.^[6]

Die Intention der vorliegenden Arbeit ist es, chemoselektive und bioorthogonale Immobilisierungsstrategien zur Herstellung von Mikroarrays und strukturierten Oberflächen zu entwickeln. Ein weiteres Ziel ist es, einen Mikroarray-basierten Assay zur Untersuchung von Substratspezifitäten von biologisch und therapeutisch interessanten Protein-Tyrosin-Phosphatasen zu konstruieren und etablieren. Die daraus entstehenden Kenntnisse über Substratspezifitäten von Phosphatasen können bei der Entwicklung neuer Medikamente oder spezifischer Nachweistests für Phosphatasen verwendet werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Mikroarrays

Mittels Mikroarrays können Sondenmoleküle, d.h. DNA/RNA, Proteine, Oligosaccharide oder kleine organische Moleküle wie Wirkstoffkandidaten und Peptide, auf verschiedenste Eigenschaften und Zielsetzungen hin im Hochdurchsatz untersucht werden. Allen dieser Mikroarrays sind drei Schritte gemein (Abbildung 1):

- Die Herstellung planarer, definiert lokalisierter Anordnungen von Sondenmolekülen durch Spotten (s. Kapitel 2.1.3) oder Synthese auf der Oberfläche (s. Kapitel 2.1.4);
- Inkubation des Arrays mit einer Lösung eines oder mehrerer Analyt-Substrate und dem Entfernen von nicht gebundenen Substraten;
- Zweidimensionales Detektieren der gebundenen Substrate anhand von Markierungen, wie beispielsweise Fluoreszenz- oder radioaktive Marker, und die Analyse der Daten.

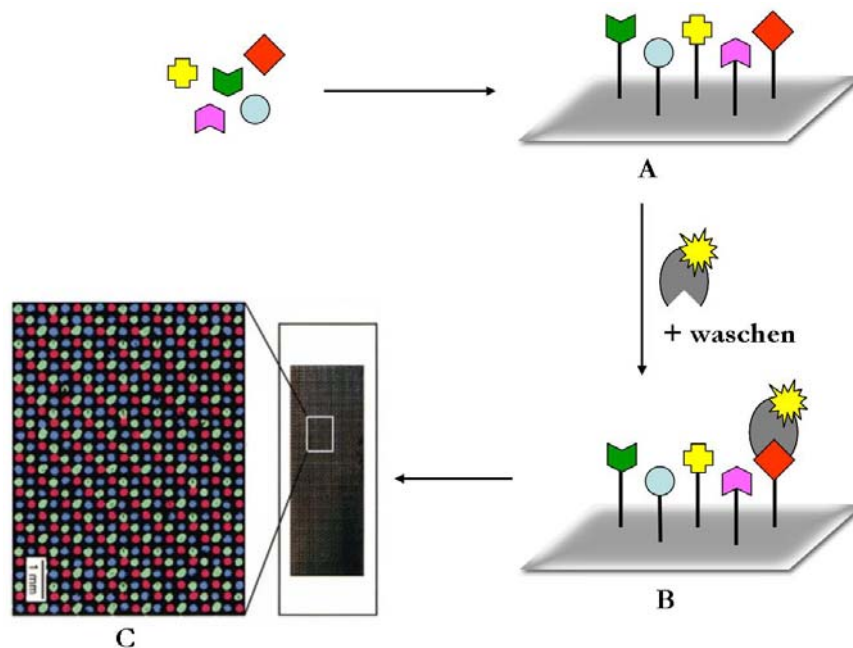


Abbildung 1: Herstellung eines Mikroarrays, Inkubation mit dem Analyten und Auslesen (Bild C nach [7]).

DNA-Mikroarrays werden vielfältig verwendet, wie z.B. zur Bestimmung des Expressionsmusters von Genen in verschiedenen Geweben und zur Identifizierung von Sequenzen beispielweise für Mutationsuntersuchungen.^[8,9] Protein-Mikroarrays können eingesetzt werden, um z.B. Protein-Protein-, Protein-Lipid-, Enzym-Substrat- und Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[10] Da aber durch die dreidimensionale Struktur der Proteine die Stabilität dieser

Mikroarrays wesentlich geringer und die Herstellung von Proteinen im Hochdurchsatz schwierig ist, werden Protein-Mikroarrays im Gegensatz zu DNA-Mikroarrays noch nicht standardmäßig in der Forschung eingesetzt.^[11]

Wechselwirkungen zwischen Oligosacchariden mit hohem Molekulargewicht und Proteinen können auch mit Hilfe von Mikroarrays erforscht werden.^[12] So wurden von Wong et al. 200 synthetische und natürliche Glycan-Sequenzen, welche häufig vorkommende Strukturen von Glycoproteinen und Glycolipiden repräsentieren, auf einem Mikroarray gespottet und damit verschiedene Glycan-bindende Proteine untersucht.^[13]

Diese Arbeit beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit den Mikroarrays kleiner Moleküle, die im folgenden Kapitel detaillierter erläutert werden. Daher wird auf die bereits erwähnten Typen von Mikroarrays nicht weiter eingegangen.

2.1.1 Mikroarrays kleiner organischer Moleküle

In der pharmazeutischen Industrie werden heutzutage Mikrotiterplatten eingesetzt, um nach Molekülen zu screenen, die die Wirkungsweise von biologisch interessanten Proteinen (Targets) verändern bzw. inhibieren. Man versucht so, Mitglieder von Substanz-Bibliotheken auf ihre Eigenschaft als Wirkstoffkandidaten zu untersuchen. Diese Bibliotheken sind Sammlungen von Substanzen, die nach dem gleichen Bauprinzip aus ähnlichen Bausteinen aufgebaut sind. Die Möglichkeit, große Substanz-Bibliotheken mit Hilfe der Festphasensynthese und der Kombinatorischen Chemie schnell herzustellen,^[14] sowie die Entdeckung neuer Targets erfordern bessere Hochdurchsatztechniken als die bisher eingesetzten Mikrotiterplatten.^[15] Als eine solche Technik könnten sich Mikroarrays kleiner Moleküle etablieren, die 1999 von Schreiber et al. eingeführt worden sind.^[7]

Mittlerweile sind Mikroarrays kleiner Moleküle dokumentiert, mit denen unter anderem neue Liganden verschiedener Proteine entdeckt,^[16-18] Aktivitätsprofile von Proteinen in Zelllysaten aufgestellt worden sind^[19] und sogar der Effekt kleiner Moleküle auf Säugetierzellen durch Phänotyp-basiertes Auslesen beobachtet werden konnte.^[20] So wurde von Schreiber et al. durch das Screenen von drei Mikroarrays mit je einer Bibliothek von 12396 Substanzen, die mit Hilfe Diversitäts-orientierter Synthese (DOS) aufgebaut worden waren, ein Inhibitor für den Transkriptionsfaktor Hap3p gefunden.^[18] Ebenfalls von Schreiber et al. wurde mittels eines Mikroarrays, der eine Bibliothek von 3780 strukturell komplexen 1,3-Dioxanen enthielt, ein Ligand des Hefe-Proteins Ure2p entdeckt, dessen Spezifität durch gezielte Variation der Substituenten weiter erhöht werden konnte. Mit Hilfe der Erstellung eines Genom-Transkriptions-Profiles in Wildtyp-Zellen durch Gen-„knock-out“ und Modulieren der Proteinfunktion mit dem Liganden konnte die Rolle von Ure2p im Glucose-sensitiven Signalweg

aufgeklärt werden.^[21] Bei dieser Art Mikroarrays ist es Standard, mit Fluoreszenz-markierten Proteinen den Nachweis durchzuführen.

Zu der Klasse kleiner organischer Moleküle, die auf Mikroarrays gebunden werden, gehören auch Peptide und Kohlenhydrate. Mit Kohlenhydrat-Mikroarrays werden Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen studiert. Bisher gibt es nur wenige Beispiele, die über den Beweis des Prinzips hinausgehen.^[22] Seeberger et al. stellten Aminoglycosid-Mikroarrays her, um Interaktionen von Antibiotika mit therapeutischen Targets sowie mit Enzymen, die Antibiotika-Resistenz aufweisen, zu untersuchen.^[23] Mrksich et al. und Shin et al. konnten mit Kohlenhydrat-Mikroarrays Enzymaktivitäten, wie beispielsweise von verschiedenen Glycosyltransferasen, beobachten.^[24,25] Wie vorher beschrieben, werden auch hier entsprechende Fluoreszenz-markierte Proteine, z.B. Lektine, zur Detektion benutzt.

Ein Hauptanwendungsgebiet von Peptid-Mikroarrays ist das Screenen nach Substratspezifitäten von Proteinen.^[26] So wurden zum Erkennen der Substratspezifitäten von Kinasen, also Enzymen, die die posttranslationale Phosphorylierung von Proteinen katalysieren, Mikroarrays mit bis zu 6912 Peptiden hergestellt, welche zum Teil von Abschnitten aus humanen Phosphorylierungsstellen abgeleitet waren. Diese Mikroarrays wurden mit der Kinase PKA (Protein Kinase abhängig von zyklischem Adenosin Monophosphat) sowie mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (^{32}P -markiertem Adenosintriphosphat) inkubiert und die bei der Phosphorylierung entstehenden radioaktiven Signale ausgelesen.^[27] Bei Kinase-Spezifität-Arrays ist der Nachweis darüber hinaus noch mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern möglich, weil für Phosphotyrosin, -serin und -threonin entsprechende Antikörper bekannt sind.^[28,29] Auch können Phosphat-erkennende Chelatkomplexierer, wie der Pro-Q Diamond Phosphosensor Farbstoff (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) angewendet werden.^[26]

2.1.2 Oberflächen

Am häufigsten wird Glas als Trägermaterial verwendet, daneben noch Quarz- und Siliciumwafer. Die Träger werden im Allgemeinen vor dem Beschichten durch Detergenzien, Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$), Ultraschall, Säure oder Base gereinigt. Die Siliciumoxidträger müssen dann mit den gewünschten Organosilanverbindungen umgesetzt werden.^[30] Diese Organosilanverbindungen tragen eine funktionelle Gruppe, die entweder für die Kupplung mit dem Fängermolekül benötigt oder für die Umsetzung mit bifunktionellen Linkern verwendet wird. Niemeyer et al. setzten einen bifunktionellen Linker ein, um PAMAM-(Polyamidoamid-) Dendrimere auf der Oberfläche zu immobilisieren, und konnten so die Spotqualität bezüglich der Homogenität, Bindungskapazität und Intensität deutlich verbessern (Abbildung 2).^[31]

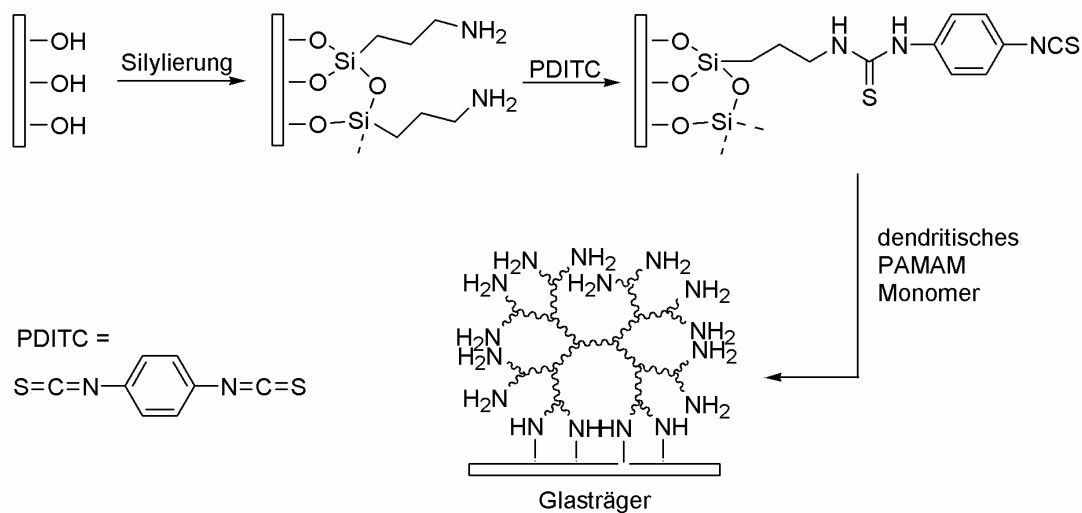


Abbildung 2: Herstellung einer Dendrimer-beschichteten Oberfläche nach [31].

Eine andere Art der Oberflächenmodifikation zur Herstellung von Mikroarrays sind „selbst-organisierte monomolekulare Schichten“ („self-assembled monolayers“, SAMs). Dazu werden Thiol- bzw. Silan-modifizierte bifunktionale Linker aus Polyethylenglycol oder Alkanketten, die eine andere funktionelle Gruppe am anderen Ende tragen, auf Gold- bzw. Glasoberflächen immobilisiert. Diese Ketten ordnen sich selbstorganisierend als definierte monomolekulare Schichten an. Die funktionelle Gruppe kann dann eine Kupplungsreaktion mit dem Fängermolekül eingehen.^[24,32] Weitere Trägermaterialien sind Polypropylen-, (Nitro-)Cellulose sowie Nickel- oder Platin-überzogene Oberflächen.^[10b,12a,33]

2.1.3 Immobilisierung der Sondensubstanzen

Die Fängersubstanzen können im Allgemeinen kovalent oder nicht-kovalent, d.h. durch ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen, auf der Oberfläche immobilisiert werden. Die Anbindung durch kovalente Kupplung ist stabiler, trotzdem wird auch die nicht-kovalente Variante verwendet. Weiterhin wird zwischen der unselektiven und der selektiven Anbindung an die Oberfläche unterschieden. Die Immobilisierungsreaktion sollte optimalerweise unter milden Bedingungen, bei Raumtemperatur und ohne Zusatz von anderen Reagenzien spontan ablaufen.^[5]

2.1.3.1 Unselektive Immobilisierung

Unselektive Immobilisierungsreaktionen werden öfter bei DNA- und Protein-Mikroarrays eingesetzt als bei Mikroarrays kleiner Moleküle. Trotz der Gefahr, dass die unspezifische Anbindung die biologischen Funktionen der Moleküle beeinträchtigen kann, werden sie verwendet, da sie den Vorteil haben, dass man das zu immobilisierende Molekül nicht mit einer

speziellen funktionellen Gruppe modifizieren muss. Dies vereinfacht besonders bei Proteinen die Herstellung von Mikroarrays. Tabelle 1 zeigt häufig eingesetzte unselektive Kupplungsmethoden.

Kupplungsreaktionen	Literatur
$\text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} + \text{H}_2\text{N---R} \xrightarrow{\text{Base}} \text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{---CH}_2\text{---} \\ \\ \text{N---R} \end{array}$	[34,35]
$\text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{OH} \end{array} + \text{H}_2\text{N---R} \xrightarrow[\text{oder Adsorption}]{\text{Kupplungsreagenz}} \text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{HN---R} \end{array}$	[35-37]
$\text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H} \end{array} + \text{H}_2\text{N---R} \longrightarrow \text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{---N---R} \\ \\ \text{H} \end{array} \xrightarrow{\text{NaBH}_4} \text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---N---R} \end{array}$	[10a,10b, 35,36a,37, 38]
$\text{---Si---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{O---N---} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} + \text{Nukleophil---R} \longrightarrow \text{---Si---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{Nukleophil---R} \end{array}$	[10a,13,16, 31,35,39]
$\text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---NH}_2 + \ominus\text{O---P(=O)(O}^\ominus\text{)---DNA} \xrightarrow[\text{oder Adsorption}]{\text{Kupplungsreagenz}} \text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---N---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{P---DNA} \\ \\ \text{O}^\ominus \end{array}$	[34d,36a]
$\text{---Si---(CH}_2\text{)}_n\text{---} \begin{array}{c} \text{---} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{---N---} \\ \\ \text{---N---} \\ \\ \text{F}_3\text{C} \end{array} \xrightarrow{h\nu} \text{C-H-Insertion des Carbens}$	[40]
Poly-L-Lysin Oberflächen; Adsorption von Antikörper-Antigen-Paar oder PCR-Produkten	[41]
(Nitro-) Cellulose; Adsorption von Proteinen	[42]

Tabelle 1: Unselektive Immobilisierungsreaktionen (schematisch).

Nicht-kovalente Bindungsmethoden nutzen die unspezifischen Wechselwirkungen großer Moleküle wie DNA/RNA-Fragmente oder Proteine mit geladenen und polaren Oberflächen, wie Poly-L-Lysin- und (Nitro-)Cellulose-überzogene Oberflächen oder Membranen.^[41,42]

Für eine kovalente Anbringung werden sehr oft Aminofunktionen herangezogen, die entweder durch Lysin-Seitenketten und am N-Terminus in Proteinen schon vorhanden sind oder durch einfache Modifikation an einem Ende eines Oligonukleotids erhalten werden. Aminofunktionen können mit Epoxiden, Carbonsäuren, Aldehyden sowie Aktivestern umgesetzt werden.^[10a,10b,13,16,31,34,36a,36b,37-39] Diese funktionellen Gruppen können durch entsprechende Silane auf die Oberflächen angebracht werden. Genutzt wird auch die umgekehrte Variante, bei der Aktivester, Aldehyde und Carbonsäuren sowie Phosphate auf eine Amino-funktionalisierte Oberfläche gekuppelt werden.^[31,34d,36a,36c-e,37] Anstelle der Aminofunktion wurde an Oligonukleotiden auch eine Hydrazidfunktion angebracht, welche ebenfalls mit den gleichen Oberflächen reagiert.^[35]

Eine neue kovalente Variante für die Herstellung von Mikroarrays kleiner Moleküle ist die Insertion von Carbenen in die Moleküle. Die Substanzen werden auf eine Aryldiazirin-modifizierte Oberfläche gespottet und dann wird durch UV-Strahlung hochreaktives Carben freigesetzt, welches unspezifisch in C-H-Bindungen des Moleküls insertiert. Der Schwachpunkt dieser Methode ist, dass sie sich auf die statistische Möglichkeit beruft, dass ein Molekül durch eine oder mehrere C-H-Insertionen nicht zerstört wird oder seine biologische Funktion verliert, was aber eben dieses auch nicht ausschließt.^[40]

2.1.3.2 Selektive Immobilisierung

Selektive Immobilisierungsreaktionen sind essenziell für die Erhaltung der biologischen Aktivität der Fängermoleküle. Sie sind regioselektiv, d.h. die Substrate werden an einer definierten Stelle im Molekül an der Oberfläche angebracht, und chemoselektiv, d.h. die an der Reaktion beteiligten funktionellen Gruppen gehen weitestgehend keine anderen Reaktionen mit im Substrat befindlichen Gruppen ein. Letzteres ist bereits ein schwer zu erfüllendes Kriterium, aber weitaus schwieriger ist es, funktionelle Gruppen für die Kupplungsreaktion zu finden, die keine Träger biologischer Aktivität, also bioorthogonal sind. Tabelle 2 zeigt Reaktionen, die die Kriterien der Chemoselektivität weitestgehend erfüllen, aber bei denen die verwendeten funktionellen Gruppen und Einheiten häufig auch Träger biologischer Aktivität sein können, wie Thiole, Alkohole und Cysteine.

Für eine selektive, nicht-kovalente Anknüpfung der Moleküle werden oft Systeme aus der Natur herangezogen, die den Vorteil haben, als Konjugat nicht essenziell für biologische Aktivität des interessierenden Substrats zu sein. Die selektive, sehr starke Wechselwirkung zwischen Biotin und (Strept-)Avidin ist ein solches Beispiel ebenso wie die Ausnutzung von Watson-Crick-Baasenpaarungen in DNA- bzw. PNA-Systemen,^[19,43,44] wobei PNA ein nicht-natürliches Analogon der DNA mit einem Peptid-Rückgrat ist. Winssinger et al. nutzten diese Wechselwirkungen zur Codierung von Bibliotheken kleiner Moleküle mit PNA-Oligonukleotiden. In einer orthogonalen kombinatorischen Synthese wurden Cystein-Protease-Inhibitoren mit PNA-Marker als Code hergestellt, die dann mit Fluoreszenz-markiertem Cathepsin umgesetzt wurden. Nach einer Größen-Ausschluß-Chromatographie wurden die ungebundenen und daher kleineren PNA-codierten Inhibitoren abgetrennt, die Molekül-Protein-Komplexe isoliert und auf einem DNA-Chip immobilisiert. Durch die ortsbekanntenen DNA-Sequenzen konnten die chemischen Strukturen der Inhibitoren anhand der komplementären PNA-Codierung erkannt werden.^[44a] Es konnten keine signifikanten Störungen der biologischen Wechselwirkung von Inhibitor zu Cathepsin durch die PNA festgestellt werden, aber dennoch birgt diese Methode das Problem der möglichen Kreuzhybridisierung von DNA/DNA- und PNA/DNA- Strängen.^[45]

Kupplungsreaktionen	Literatur
$\begin{array}{c} -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH} \\ (\text{Au-S}) \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N-R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{S} \\ (\text{Au-S}) \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N-R} \end{array}$	[7,13,38,46]
$ -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{Cl} + \text{HO-R} \longrightarrow -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{O-R}$	[18,47]
$\begin{array}{c} -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{N-R} \\ \\ \text{HS} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{N-R} \\ \\ \text{S} \end{array}$	[48]
$ (\text{Strept})\text{Avidin} + \text{biotinyliertes Substrat} \longrightarrow (\text{Strept})\text{Avidin-Biotin Bindung}$	[43]
$\text{Au} \text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-S-R} + \text{HS-R}' \longrightarrow \text{Au} \text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{S-S-R}'$	[46d,49]
$ -\text{Si-Dien} + \text{Dienophil} \longrightarrow \text{Diels-Alder-Verknüpfung}$ (Au-S)	[24,50]
$ -\text{Si-Oligonukleotid} + \boxed{\text{PNA/DNA}}-\text{R} \longrightarrow \text{Hybridisierung}$	[19,44]
$ \text{Ni}(\text{Nitrilessigsäure})_n + \boxed{\text{HisX6}}-\text{R} \longrightarrow \text{Koordinations-Bindung}$	[10b,51]
$ -\text{Si}-\text{C}_{16} + \boxed{\text{Pam}_3\text{Cys/PHC}}-\text{R} \longrightarrow \text{Hydrophobe Wechselwirkungen}$	[52]
$\begin{array}{c} -\text{Si}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{N-R} \\ \\ \text{HS} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -\text{Si}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{N-R} \\ \\ \text{SH} \end{array}$	[27,53]
$ -\text{Si}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{C}\equiv\text{C} + \text{N}_3-\text{R} \xrightarrow{\text{Cu}^{1+}} -\text{Si}-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{C} \begin{array}{c} \text{R} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \diagup \\ \text{N} \end{array}$	[54]

Tabelle 2: Selektive Immobilisierungsreaktionen (schematisch).

Weitere nicht-kovalente Methoden sind die Koordination von His-Tags an Nickel-Nitrilessigsäure-Komplexen und die Ausnutzung hydrophober Wechselwirkungen durch Lipidketten, die als Konjugat an dem Substrat und auch an der Oberfläche angebracht sind.^[10b,51,52] Die Voraussetzung zur Verwendung dieser Methoden ist, dass die Substrate nicht selbst an die Oberfläche koordinieren, also z.B. keine hydrophoben Eigenschaften haben.

Die am häufigsten genutzte kovalente Kupplungsmethode ist die Michael-Addition von Thiolen an Maleinsäureimide.^[7,13,38,46] Wie bereits erwähnt, können Thiole aber auch Träger biologischer Funktion sein, was besonders zu beachten ist, wenn das Substrat das Thiol trägt. Außerdem können Thiole andere unspezifische Reaktionen eingehen, wie Disulfidbildung oder nukleophile Substitution, ebenso wie Maleimide, die bei basischem pH-Wert durch Amine angegriffen werden.

Ebenfalls durch Amine angegriffen werden können die Chloride auf der Oberfläche bei der von Schreiber et al. verwendeten nukleophilen Substitution durch Alkohole.^[18,47] Obwohl Thioester auch einer Aminolyse unterliegen können, wird gute Chemoselektivität mit der nativen chemischen Ligation (NCL) erreicht. Dies kann an der Kinetik der NCL liegen, bei der der Schwefel des *N*-terminalen Cysteins den auf der Oberfläche befindlichen Thioester angreift und somit zuerst eine Umesterung stattfindet, die vermutlich schneller verläuft als eine Aminolyse. Der letzte Schritt ist ein *S*-*N*-Acylshift, welcher zu einer stabilen Amidbindung führt.^[27,53] Ebenfalls auf die Anwesenheit eines terminalen Cysteins angewiesen ist man bei der Reaktion zur Ausbildung eines Thiazolidinringes mit einer auf der Oberfläche angeordneten Glyoxylylgruppe, bei der auch gute Chemoselektivität erzielt wird.^[48] Eine sehr gute Chemoselektivität erhält man durch Cu^{1+} -vermittelte [2+3]-Cycloaddition eines Acetylens mit einem Azid.^[54,55] Diese beiden Gruppen sind kaum in der Natur vorzufinden und daher in den seltensten Fällen Träger der biologischen Aktivität eines Substrats. Unter den milden Bedingungen der Immobilisierung gehen sie so gut wie keine Nebenreaktionen ein; nur das Kupfer ist hier eine Quelle, die eine Beeinträchtigung der Biokompatibilität verursacht. Das Kupfer kann mit Sulfiden Komplexe bilden. Diese Komplexbildung kann bei Proteinen zu dem Verlust der biologischen Funktion führen.^[56]

Trotz des Repertoires an Immobilisierungsreaktionen ist es also noch nicht gelungen, die Kriterien der Selektivität vollständig zu erfüllen und es gibt wenige Alternativen unter den besten chemoselektiven Reaktionen.

2.1.3.4 Spotten

Für die Immobilisierung der Substanzen im Nanolitermaßstab durch kleine Tröpfchen, „Spotten“, ist die Verwendung von Pipettierrobotern notwendig. Es wird zwischen dem Kontakt- und dem Nicht-Kontakt-Verfahren unterschieden. Das Kontakt-Verfahren bedient sich Stahlnadeln („pins“), welche in die zu pipettierende Lösung eintauchen und die Tröpfchen auf der Glasoberfläche absetzen (z.B. Firma Perkin-Elmer). Das Nicht-Kontakt-Verfahren benutzt eine Piezotechnik ähnlich der des herkömmlichen Tintenstrahldruckers, wobei eine Piezokeramik auf Glaskapillaren angebracht ist (z.B. Firma GeSiM, Dresden). Durch Anlegen einer Spannung zieht sich diese Keramik zusammen und ermöglicht so die Abgabe kleinster, definierter Flüssigkeitsmengen. Da bei diesem Verfahren die Oberfläche nicht berührt und somit nicht beschädigt wird, erhält man eine höhere Spotqualität als im Kontaktverfahren. Durch die simultane Nutzung einer großen Anzahl von Nadeln kann mit Hilfe des Kontakt-Verfahrens Hochdurchsatz erzielt werden. Dies ist mit dem Nicht-Kontakt-Verfahren eingeschränkt, da hier nur wesentlich weniger Kapillaren gleichzeitig eingesetzt werden können.^[57]

2.1.4 Synthese auf Oberflächen

Die Synthese auf Oberflächen ist bisher weitestgehend nur für Peptide und Oligonukleotide dokumentiert, da diese Moleküle aus definierten Bausteinen linear aufgebaut werden können. Dies vereinfacht die parallele Synthese enorm.^[58,59] Es gibt generell zwei verschiedene Ansätze. Die von Fodor et al. entwickelte UV-Licht-gerichtete Synthese bedient sich photolabiler Schutzgruppen^[60-62] bzw. UV-Licht-generierter Säuren zur Spaltung von Dimethoxytrityl-Schutzgruppen^[63] sowie der Photolithografie und wurde zunächst für die Peptidsynthese angewendet.^[64] Später wurde sie für die Synthese von DNA-Chips von Affymetrix, Inc. (Santa Clara, Kalifornien, USA) kommerzialisiert.^[65]

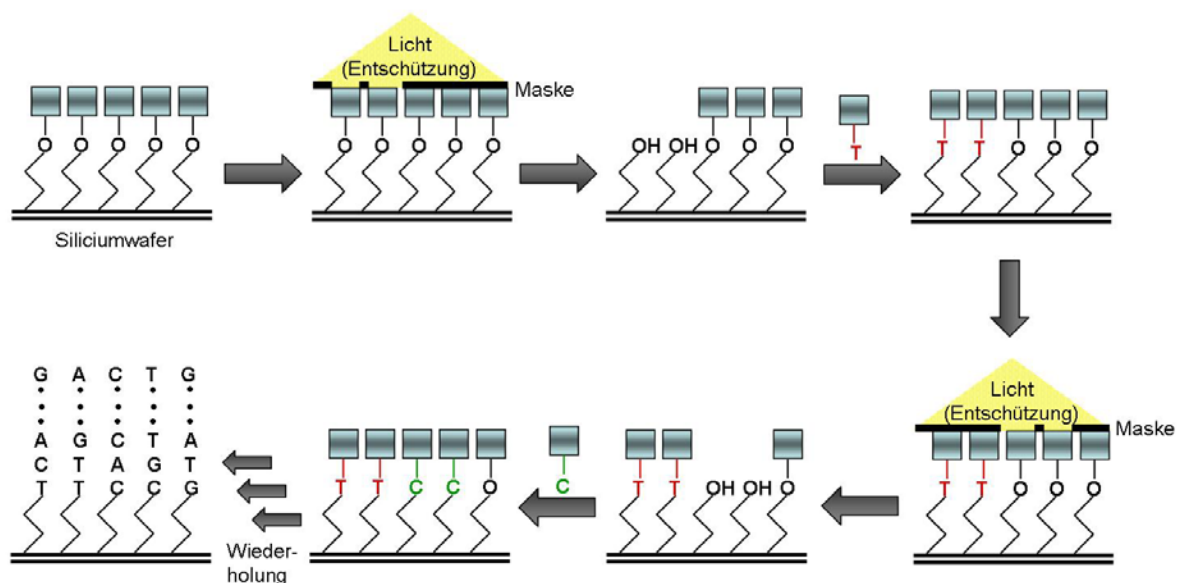


Abbildung 3: Synthese von DNA-Chips durch Photolithografie nach [65].

Die DNA-Synthese auf dem Chip beginnt mit einer Schicht mit photolablen Gruppen geschützter Hydroxy-Funktionen welche ortsaufgelöst mit UV-Licht bestrahlt wird, um bestimmte Gebiete selektiv zu entschützen. Dann wird der Chip mit einem eine Phosphoramidit-Gruppe tragenden Nucleotid behandelt, was zur Kupplung dieses Monomers an ungeschützte Hydroxy-Funktionen führt. Danach wird der Chip gewaschen und der Vorgang bis zum Erhalt des gewünschten Mikroarrays wiederholt (Abbildung 3).

Alternativ zu dieser auf Masken angewiesenen Technik werden mittlerweile auch solche ohne Maske angewandt, bei denen durch Aluminiumspiegel oder durch Mikrokanäle computergesteuert das gewünschte UV-Muster erzeugt wird.^[66]

Der zweite Ansatz ist die so genannte Spot-Synthese entwickelt von Frank.^[67] Hierbei werden Linker auf einer Cellulosemembran angebracht, an denen dann Aminosäuren in einer klassischen

Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie zu Peptiden gekuppelt werden. So können durch adressierte Synthese parallel tausende Peptide auf einem Mikroarray hergestellt werden, wobei die Reinheit und Qualität dieser Peptide bei bis zu 15meren mit Peptiden vergleichbar ist, die durch konventionelle Festphasensynthese präpariert wurden. Über diese Methode sind mehrere Übersichtsartikel erschienen^[68-70] und sie ist vielfältig angewendet worden.^[26,28,29,33,71]

2.2 Mikrostrukturierte Oberflächen

Neben dem Gebrauch von Trägermaterialien für das Hochdurchsatz-Screening finden auch mikrostrukturierte Oberflächen breite Anwendung. Ursprünglich wurden mit Proteinen strukturierte Oberflächen entwickelt, um biologische Moleküle in miniaturisierte biologisch-elektronische Geräte zu integrieren.^[72-74] Sie finden auch Anwendung in der Entwicklung von Biosensoren mit multiplen Sensor-Regionen, welche beispielsweise zur Ermittlung von Selektivität und Sensitivität von Antikörpern herangezogen werden können. Weiterhin werden sie zur Vermittlung von strukturiertem Zellwachstum genutzt, womit man beispielsweise Zell-Mikroarrays herstellen kann und wovon man sich erhofft, dass mit ihrer Hilfe künstliche Gewebe sowie Organ-Transplantate erzeugt werden könnten.^[6] Strukturierte Oberflächen können durch Photolackverfahren (s. Kapitel 2.2.1), Photochemische Techniken (s. Kapitel 2.2.2) und mit Hilfe von SAMs (s. Kapitel 2.2.3) hergestellt werden. Die Muster können durch UV-Lampen in Kombination mit Masken oder Fokussierung erstellt werden.^[75] Weiterhin können Oberflächen durch lithografische Techniken strukturiert werden, welche ohne Belichtung auskommen. Man unterscheidet zwischen Lithografie, bei der starre anorganische Materialien beispielsweise durch Laser –Abtragung oder –induzierte Abscheidung behandelt werden, und Softlithografie, bei welcher die Strukturen in selbstorganisierten Schichten durch Stempel oder Gussformen aus Elastomer auf Substrate übertragen und flexible organische Moleküle und Materialien verwendet werden. Im Allgemeinen, von der Halbleiterindustrie bis zur biologischen Oberflächenstrukturierung, wird Photolithografie aber weitaus häufiger standardmäßig angewendet.^[76]

2.2.1 Photolackverfahren

Konventionelle Photolackverfahren, die in der Elektronikindustrie zur Herstellung von Mikroschaltkreisen verwendet werden, wurden zur Erzeugung von Protein-Strukturen adaptiert. Ein Substrat wird mit einem Photolack überzogen, dann wird durch eine Maske belichtet und der so zerstörte Photolack gewaschen. Die Strukturen auf der Oberfläche werden dann mit

Silanen, die auf einer Seite gewünschte funktionelle Gruppen tragen, umgesetzt. Diese funktionellen Gruppen können z.B. Amine sein, die dann mit den zu immobilisierenden Substanzen ionisch wechselwirken, oder auch Aldehyde, an die die Substanzen kovalent binden. Vor der Substanzzugabe wird der restliche Photolack durch die Behandlung mit Aceton im Ultraschallbad entfernt und die freigelegte Oberfläche mit einem hydrophoben oder Adhäsions-resistenten Silan inkubiert. Erst dann wird die gewünschte Substanz immobilisiert. Diese Technik wird häufig zum kontrollierten Zellwachstum genutzt.^[6]

2.2.2 Photochemische Verfahren

Photochemische Substanz-Mikrostrukturierungstechniken nutzen chemisch labile funktionelle Gruppen, welche durch UV-Belichtung aktiviert werden können, um Zielmoleküle zu binden.^[6] Umgekehrt kann kurzwellige UV-Strahlung zum Deaktivieren von chemischen Spezies verwendet werden, wie z.B. bei der Umsetzung von Thiolen zu Sulfonaten.^[77] Abbildung 4 zeigt verschiedene Strategien zur Herstellung mikrostrukturierter Oberflächen durch photochemische Techniken.

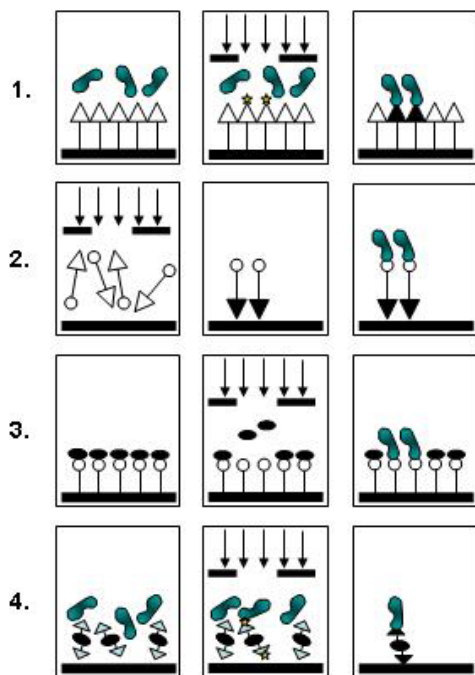


Abbildung 4: Verschiedene Strategien zur Herstellung mikrostrukturierter Oberflächen durch photochemische Techniken nach [6].

Die erste Strategie nutzt eine mit einer photochemisch aktivierbaren Gruppe funktionalisierte Oberfläche. Diese wird mit einer Substanzlösung inkubiert und durch Masken belichtet, wobei die Oberfläche ortsspezifisch aktiviert wird. Diese aktivierten Regionen binden das Substrat in Lösung.^[78] Bei der zweiten Strategie wird das Substrat mit einer photochemisch aktivierbaren Spezies inkubiert und dann belichtet. Die dadurch aktivierte Gruppe bindet in den belichteten

Regionen auf die Oberfläche und liefert eine Einheit, die in einem zweiten Schritt mit der zu immobilisierenden Substanz wechselwirken kann. Dabei werden meist hetero-bifunktionelle Linker benutzt;^[79] es wurden aber auch schon Ligandenpaare mit hoher Affinität wie Biotin-Streptavidin verwendet, wobei das Biotin mit der photochemisch aktivierbaren Spezies verbunden war.^[80] Strategie Nummer drei verwendet das Prinzip der photolabilen Schutzgruppen, welches in Kapitel 2.1.2.5 bereits besprochen worden ist.^[60-66,81] Bei der letzten Strategie wird ein Substrat mit einem Polymer, das verzweigt vernetzt werden kann, photochemisch aktivierbaren Reagenzien und der zu immobilisierenden Substanz inkubiert. Das mit der Lösung überdeckte Substrat wird belichtet, wobei das Polymer an den belichteten Stellen durch die photochemischen Reagenzien vernetzt wird und gleichzeitig an die Substanz sowie das Substrat bindet.^[82,83]

Die am meisten verwendeten Methoden für die photochemische Immobilisierung nutzen Arylazid-, Nitrobenzyl-(Schutzgruppen) und Diazirin-Gruppen (Abbildung 5).^[6] Auch werden Benzophenone verwendet,^[84] und kürzlich wurde über die Adaption des Photobleichens von Fluorophoren berichtet.^[82]

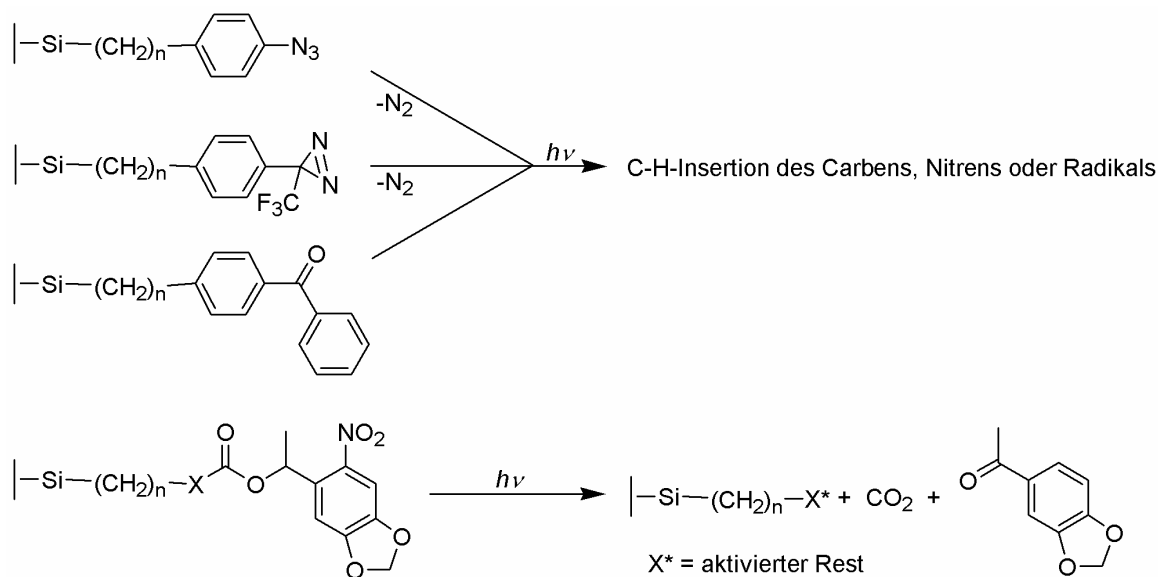


Abbildung 5: Reaktionen zur photochemischen Immobilisierung nach [6].

Alle diese Techniken haben gemein, dass es sich um eine C-H-Insertion einer hochreaktiven Spezies in die zu immobilisierende Substanz handelt. Wie bereits erwähnt, können dabei biologische Aktivitäten eingeschränkt oder zerstört werden. Weitere Probleme der photolithographischen Mikrostrukturierung liegen in der Immobilisierung von vielen verschiedenen Substanzen und, gerade bei Proteinen, dem unspezifischen Binden auf nicht-aktivierten Regionen der Oberfläche.^[6]

2.2.3 Self-assembled Monolayers (SAMs)

SAMs, die bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben worden sind, werden häufig in Kombination mit photochemischen Methoden verwendet.^[75,85,86] Von Whitesides et al. wurden Goldoberflächen ausgerichteter SAMs mit verschiedenen Funktionalitäten hergestellt, indem Regionen unbelichtet belassen und eine photolabile Schutzgruppe sowie ein photolabiler Linker verwendet wurden. Die Schutzgruppe wurde bei 365 nm abgespalten, der Linker bei 220 nm, wobei das Thiol zum Sulfonat oxidiert und so von der Goldoberfläche abgelöst wurde.^[86] Mrksich et al. nutzten SAMs zusammen mit photolabilen Schutzgruppen, um chemoselektiv durch eine Diels-Alder-Reaktion Liganden zu immobilisieren. Die Nitrobenzylgruppe, die zum Schutz eines Hydrochinons eingesetzt worden war, wurde ortsspezifisch durch Belichtung bei 365 nm abgespalten. Das freigesetzte Hydrochinon wurde dann zum Chinon oxidiert und mit einem Liganden, der ein Cyclopentadien trug, umgesetzt.^[75] Dies ist neben der Verwendung von Ligandenpaaren mit hoher Affinität wie Biotin-Streptavidin das einzige Beispiel für eine chemoselektive Mikrostrukturierung, die aber viele chemische Schritte benötigt.

2.3 Chemoselektive Reaktionen zur Herstellung von Mikroarrays und mikrostrukturierten Oberflächen

Für die Herstellung von Mikroarrays mittels Spotten stehen nicht viele Alternativen an chemoselektiven Reaktionen zur Auswahl, bei denen die funktionellen Gruppen nicht möglicherweise wichtig für die biologische Aktivität sind. Zur Mikrostrukturierung von Oberflächen durch Photolithographie existiert keine milde, direkte Kupplungsmethode, bei der nicht unselektiv in eine C-H-Bindung des Substrats inseriert wird. Im Folgenden werden zwei Reaktionen vorgestellt, die vielversprechende Kandidaten zur Lösung dieser Probleme darstellen.

2.3.1 Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Ligation wurde 2000 von Bertozzi et al. zuerst beschrieben.^[87] Sie wurde mit dem Ziel entwickelt, eine milde Reaktion mit zwei tatsächlich bioorthogonalen Funktionen für Ligationen von Biomolekülen zu finden, da die von dieser Gruppe zuvor genutzte Hydrazonligationsmethode^[88] für die Arbeiten zur gezielten metabolischen Veränderung von Zelloberflächen nicht chemoselektiv genug war. Wie in Abbildung 6 dargestellt nutzt die Staudinger-Ligation die glatte Reaktion von Aziden mit Phosphanen (**D**) zu Phospha-Aza-Yliden (**F**). Diese können durch Acylgruppen abgefangen werden, wobei stabile Amidbindungen (**J**) entstehen.^[87] Die Azidgruppe zeichnet sich durch einige Vorteile aus. Azide verursachen sehr

geringe strukturelle Veränderungen bei ihrer Einführung in Substrate, da sie sehr klein sind und einen unpolaren Charakter haben.^[89] Sie gehen selektive Reaktionen mit einer sehr begrenzten Anzahl an Reaktionspartnern ein und sind in keinem bekannten von der Natur geschaffenen Produkt vorhanden. Letztere Punkte treffen ebenfalls auf Phosphane zu, so dass die Staudinger Ligation eine chemoselektive, bioorthogonale Ligationsmethode darstellt.^[90]

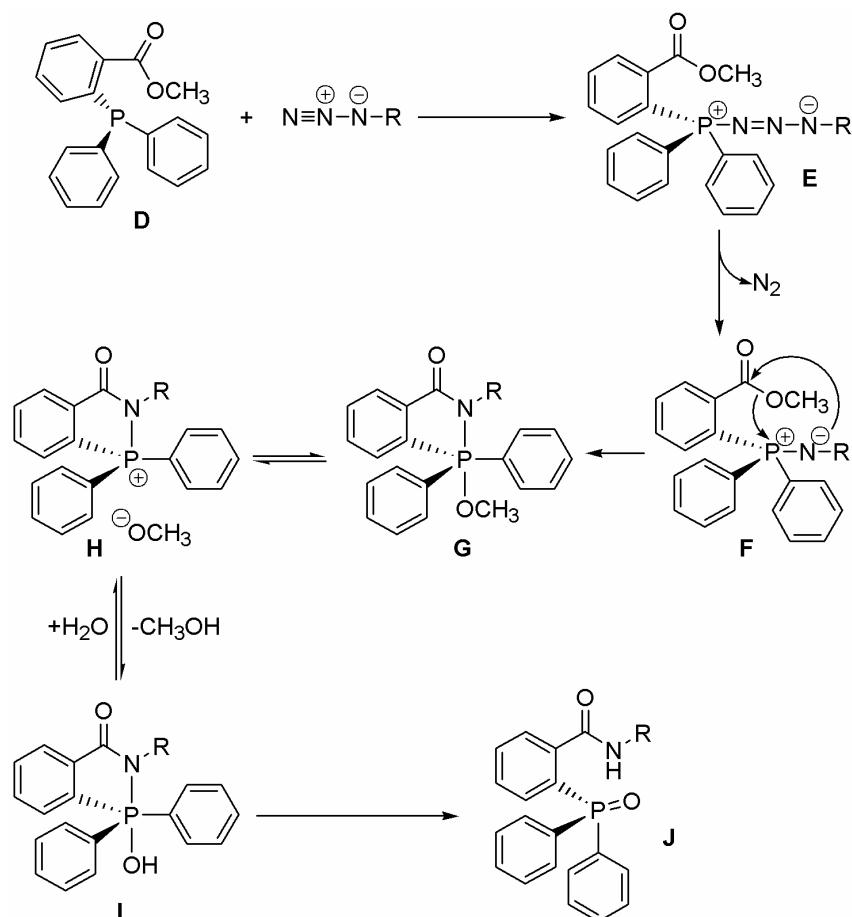


Abbildung 6: Nicht-spurlose Staudinger-Ligation und ihr Mechanismus nach [91].

Phosphan **D** wurde von Bertozzi et al. so konstruiert, dass die Acylgruppe als elektrophile Falle im Phosphan geeignet positioniert ist, um das Aza-Ylid **F** abzufangen, bevor dieses zu Amin und Phosphinoxid hydrolysiert wird (Abbildung 6). Neue Studien zum Mechanismus gaben Aufschluss darüber, dass es sich bei der Zwischenstufe, die nach der Bildung des Aza-Ylids **F** folgt, entgegen früherer Annahmen um die pentavalente Phosphor-Verbindung **G** handelt, die einen fünfgliedrigen Ring enthält. Diese steht in einem Gleichgewicht mit Verbindung **H**, welche unter wässrigen Bedingungen hydrolysiert wird und zum stabilen Endprodukt **J** tautomerisiert. Durch Zugabe von schwerem Wasser konnte gezeigt werden, dass das Sauerstoffatom am Phosphor von dem Wasser stammt. Eine Überprüfung von Lösungsmittelleffekten zeigte, dass

die Staudinger Ligation am besten in polaren, protischen Lösungsmitteln abläuft, was vermutlich mit einer Stabilisierung der geladenen Intermediate zusammenhängt.^[91]

Abbildung 6 beschreibt die nicht-spurlose Staudinger-Ligation, da der Phosphinoxidrest am Molekül verbleibt. Von Raines et al. und auch von Bertozzi et al. wurden zeitgleich Varianten einer spurlosen Staudinger Ligation vorgestellt, die sich nur durch die Strukturen der Phosphane unterscheiden und bei denen die Phosphinoxideinheit im Hydrolyseschritt abgespalten wird (Abbildung 7).^[92,93] Hierbei wird das Phosphin zunächst acyliert und dann mit dem Azid umgesetzt. Im Hydrolyseschritt fungiert die Phosphinverbindung jetzt, anstelle der Methoxygruppe aus der nicht-spurlosen Ligation, als Abgangsgruppe.

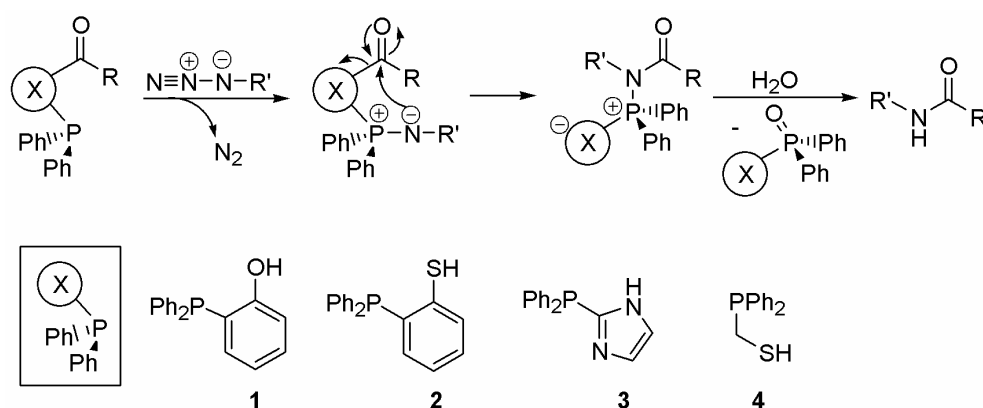


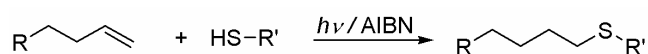
Abbildung 7: Spurlose Staudinger-Ligation nach [90]

Dass die Staudinger-Ligation eine chemoselektive, bioorthogonale Ligationmethode darstellt, konnte schon durch vielerlei Anwendungen gezeigt werden. So wurden mit ihrer Hilfe Zelloberflächen *in vitro* und *in vivo* modifiziert,^[87,94,95] Proteine in Zellen detektiert,^[96] funktionalisiert^[89,97] und aus Bausteinen zusammengesetzt,^[98] Nucleinsäuren spezifisch markiert,^[99] sowie Aktivitäten von Glycosyltransferasen detektiert.^[100] Außerdem fand sie Anwendung in der chemischen Synthese von makrocyclischen Peptiden,^[101] von bidentalen chiralen Liganden,^[102] und in der stereoselektiven Synthese von α -Glycosylamiden.^[103]

2.3.2 Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen

Der erste Bericht über diese Reaktion erschien bereits 1905, als Posner beobachtete, dass Mercaptane an Doppelbindungen addieren. Die Addition verläuft nach anti-Markownikoff an das C-Atom der Doppelbindung mit der höheren Anzahl an Wasserstoffatomen (Abbildung 8).^[104] Rust et al. berichteten, dass Schwefelwasserstoff eine kontinuierliche Absorption bei 280 nm zeigt und dabei photochemisch in ein Wasserstoff- und ein HS-Radikal zerfällt.^[105] Diese Radikale

sind dann in der Lage, an endständige Doppelbindungen zu addieren und so Mercaptane oder Sulfide zu bilden.



R = COOH, Ester, Amide, CN, Cl, OH,
Oxycarbonyl, *N*-Carbonyl, Alkyl, Cycloalkyl,
Aryl, *O*-Silyl, *N*-Silyl, sekundäre Amine [109]

R' = Alkyl (primär, sekundär oder tertiär), Aryl, Alkyl-OH,
Alkyl-SH, Alkyl-COOH, Alkylester, Alkylether,
Alkylthioether, Ketone, F, Cl, Amine [111]

Lösungsmittel: Methanol, DMF, Hexan, Toluol, H₂O, CHCl₃

Abbildung 8: Radikalische anti-Markownikoff-Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen.

Diese Reaktion wurde mittlerweile für die Polymer-^[106] und die Kohlenhydratforschung,^[107,108] die Synthese von natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren,^[109,110] zu Reaktionen an Vinylpolystyrol,^[111] zu topotaktischen Reaktionen in Netzwerken,^[112] und auch zur Immobilisierung von Katalysatoren auf Oberflächen genutzt.^[113] Dabei wurde beschrieben, dass sie kompatibel mit diversen funktionellen Gruppen ist, wie Carbonsäuren, Estern, Amiden, Nitrilen, Hydroxy, *O*- und *N*-Carbonyl, Alkyl, Aryl, (Thio)Ethern, Aminen und auch Halogenen, wobei Bromide durch ionische Anteile in der Reaktionslösung selbst durch Schwefel substituiert werden und Nebenprodukte entstehen können.^[109,111] Sie läuft in verschiedensten Lösungsmitteln, z.B. in Wasser, Alkoholen, DMF, Hexan, Chloroform sowie Toluol, oder auch in der Gasphase ab und kann durch UV-Licht oder Radikalstarter wie AIBN initiiert werden.^[106-113]

Flammersheim et al. berichteten in ihren Untersuchungen zum Mechanismus der Thiol-En-Photoadditionspolymerisation, dass keine Disulfidprodukte gefunden werden konnten. Auch wurden keine C-C-Knüpfungen und keine H-Abstraktion am α -C, wie sie bei Alkoholen typisch ist, beobachtet. Es wurde festgestellt, dass eine Dunkelreaktion nach der Belichtung, die bei einer Kettenreaktion normalerweise abläuft, bei der Photoadditionspolymerisation nicht stattfindet. Die Autoren schlossen daraufhin, dass diese Reaktion stufenweise erfolgt, d.h. keine Kettenreaktion ist, und jeder Additionsschritt photoaktiviert ist.^[114]

Diese Erkenntnisse zeigen, dass die photoinduzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen eine sehr milde, chemoselektive Reaktion ist, die die Substrat-regioselektive Mikrostrukturierung von Oberflächen ermöglichen sollte.

2.4 Protein-Phosphatasen

Phosphatasen dephosphorylieren posttranslational Proteine und stellen somit die biologischen Gegenspieler der bereits erwähnten Kinasen dar. Protein-Phosphatasen werden nach ihrer Substratspezifität in drei verschiedene Klassen eingeteilt:^[115]

1. Protein-Serin-/Threonin-Phosphatasen, welche den Phosphorsäuremonoester an Serin /Threonin-Seitenketten hydrolysieren;
2. „Klassische“ Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), welche Tyrosin-Reste dephosphorylieren, und
3. Dual Spezifische Phosphatasen (DSPs), die die Phosphorylgruppen aller dieser drei Aminosäuren hydrolysieren.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf den Protein-Tyrosin-Phosphatasen, auf die nachfolgend näher eingegangen wird.

2.4.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs)

Obwohl Protein-Phosphorylierung in eukaryotischen Zellen hauptsächlich an Serin- oder Threoninresten beobachtet wird und nur ein sehr geringer Anteil zwischen 0.01-0.05% bei Tyrosinresten,^[116] besteht ein Interesse an PTPs, da sie eine große Anzahl an biologischen Substraten dephosphorylieren und dabei wichtige Komponenten von Signaltransduktionsprozessen darstellen.^[2]

Obwohl viele PTPs aus mehr als 400 Aminosäuren aufgebaut sind, umfasst die katalytische Domäne in der Regel um die 250 Aminosäuren. Das katalytische Zentrum zeigt auch als einziges Strukturelement aller bekannten PTPs vom Bakterium bis zum Menschen eine hochkonservierte Sequenz.^[117] Diese Sequenz lautet $(H/V)C(X)_5R(S/T)$, und wird auch das PTP-Signatur-Motiv genannt.^[4] PTPs werden in rezeptorähnliche und intrazelluläre Phosphatasen eingeteilt. Rezeptorähnliche PTPs wie beispielsweise PTP μ besitzen im Allgemeinen eine extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und eine oder zwei zytoplasmatische Phosphatase-Domänen.^[118,119] Die intrazellulären Phosphatasen, zu denen auch PTP1B gehört,^[120] besitzen eine einzige katalytische Domäne und eine Reihe weiterer Strukturelemente, die wahrscheinlich regulierende Funktion besitzen. Das PTP-Signatur-Motiv findet man auch in den dual spezifischen Phosphatasen.^[121] Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten PTPs vorgestellt.

2.4.1.1 PTP1B

PTP1B besteht aus 435 Aminosäuren, von denen die Aminosäuren 30-278 die katalytische Domäne bilden.^[122] Sie wird in Insulin-sensitiven Geweben exprimiert^[123] und ist an der Insulin-Signal-Kaskade beteiligt, indem sie durch Dephosphorylierung des Phosphotyrosins am Insulin-Kinase-Aktivierungssegment den Insulin-Signalweg negativ reguliert.^[124,125] Aufgrund ihrer biologischen Funktion wird PTP1B mit Typ2 Diabetes Mellitus (T2DM, Insulin-Resistenz) und Fettleibigkeit in Verbindung gebracht, was durch mehrere Studien belegt werden konnte.^[126-128] Daher besteht ein großes Interesse an PTP1B als Target für Wirkstoffe in Zusammenhang mit Diabetes und Fettleibigkeit,^[126,129] und es sind viele Studien über Struktur, Substratspezifität und Inhibitoren angefertigt worden.^[71,126,130-132] Bezüglich der Substratspezifität ist festgestellt worden, dass Peptide bevorzugte Substrate darstellen, welche innerhalb von fünf Aminosäuren zwischen dem *N*-Terminus und dem Phosphotyrosin saure Seitenketten tragen, während an gleicher Stelle positioniertes Arginin die Bindungsaffinität herabsetzt. Zwei Peptide mit hoher Affinität sind LpYEDAD mit $K_m=3.2\mu\text{M}$ und LpYED-Ac mit $K_m\sim 20\mu\text{M}$.^[130a]

2.4.1.2 PTP μ

PTP μ ist eine rezeptorähnliche PTP (daher auch RPTP μ genannt) und vermittelt Zell-Zell-Adhäsion durch homophile, Ca^{2+} -unabhängige Wechselwirkungen ihrer extrazellulären Domäne.^[119] Außer der homophilen Bindung zweier PTP μ ist kein weiterer biologischer Ligand für PTP μ bekannt. PTP μ vermittelt unterschiedliche Zell-Antworten in Axonen der retinalen Ganglienzellen.^[133] Dies sind Nervenzellen in der Netzhaut, die Signale von Neuronen, also anderen Nervenzellen, in der Retina empfangen und Signale an das Hirn senden^[134]. Der genaue Signalweg, der als Antwort zu der homophilen PTP μ -Bindung abläuft, ist nicht bekannt. Ausserdem assoziiert PTP μ spezifisch mit dem Catenin/Cadherin-Komplex und reguliert *N*-Cadherin-vermitteltes Neuritenwachstum.^[133] Neuriten sind Fortsätze der Nervenzelle zur Reizweiterleitung an andere Nervenzellen und sie werden auch als Axone oder Dendriten bezeichnet.^[134]

PTP μ enthält drei intrazelluläre Domänen, die Phosphatase-Domänen D1 und D2 sowie die Juxtamembran JM. Die Phosphatase-Aktivität der Domäne D1 wird von den Domänen D2 und JM moduliert. Dies wurde mit Hilfe von *para*-Nitrophenolphosphat (pNPP), welches ein nicht so gutes Substrat ist, und den Peptiden DGDFFEEIPEEpYLQ (Aminosäuren 53-65 von Hirudin) und EGPWLEEEEEApYGMDF (Aminosäuren 1-17 von Gastrin), welche gute Substrate sind, gezeigt.^[119] Weitere Peptid-Substratspezifitätstests wurden noch nicht durchgeführt.

2.4.1.3 MPTPA

MPTPA ist eine niedermolekulare Tyrosin-Phosphatase, welche aus dem Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* isoliert wurde. PTPs kommen in Prokaryoten generell nur selten vor, wurden aber mittlerweile in einigen Bakterienstämmen entdeckt.^[135,136] *Mycobacterium tuberculosis* ist der häufigste Verursacher von Todesfällen durch infektiöse Krankheiten mit über drei Millionen Toten pro Jahr weltweit.^[135] Obwohl die globale Situation mittlerweile unter anderem durch variable Wirksamkeit des Impfstoffes BCG (Bacillus Calmette-Guerin), Wirkstoffresistenzen, späte Diagnose und die Verbindung zu HIV prekär ist, sind in den letzten 30 Jahren keine neuen Medikamente entwickelt worden.^[137] Es wird angenommen, dass Phosphatasen aus pathogenen Mikroorganismen eine wichtige Rolle bei der Störung der Phosphotyrosin-vermittelten Signalleitung des körpereigenen Abwehrsystems des Wirts spielen.^[135] Die Entdeckung der Phosphatase MPTPA eröffnet daher die Möglichkeit, sie als Wirkstofftarget im Kampf gegen Tuberkulose einzusetzen.^[137]

MPTPA besitzt eine Masse von 17.5 kDa und zeigt wie alle PTPs das PTP-Signatur-Motiv. Sie ist in der Lage, das artifizielle Substrat pNPP, freies Phosphotyrosin ($K_m=0.402\text{mM}$) sowie Phosphotyrosin-enthaltende Substrate zu dephosphorylieren, während Phosphothreonin und –Serin-enthaltende Substrate nicht umgesetzt werden. Getestete Phosphotyrosin-haltige Substrate sind RRLIEDAEpYAARG ($K_m=0.131\text{mM}$) und MBP (Myelin Basic Protein, $K_m=0.026\text{mM}$).^[136] Weitere Substratspezifitätstests sind noch nicht beschrieben.

2.4.1.4 PRL-3

PRL (phosphatase of regenerating liver) -1, -2 und -3 gehören zu einer neuen Klasse von C-terminal prenylierten Phosphatasen, die nah mit den intrazellulären Phosphatasen verwandt ist. Alle drei Proteine haben eine Masse von ungefähr 20 kDa und teilen mindestens 75% Aminosäuresequenz-Homologie. PRL-3 wird hauptsächlich in Herz- und Skelettmuskulatur gefunden. Der Struktur der Phosphatase Domäne nach, die in Lösung durch NMR bestimmt worden ist, sind PRL Phosphatasen eher in die Klasse der dual spezifischen Phosphatasen einzureihen als in die der „klassischen“ PTPs. So zeigen sie die höchste Homologie in der Struktur zu PTEN (16.9%) und Cdc14 (20.3%).^[138,139] Derzeit ist die zelluläre Rolle von PRL-3 immer noch ungeklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie Zell-Migration und -Invasion fördert und häufig an Plasmamembranstrukturen lokalisiert ist, die in Zellbewegungen involviert sind.^[140] Interessant wird PRL-3 durch ihr einzigartiges Expressionsmuster in Metastasen: PRL-3 wird spezifisch in Darmkrebs-Metastasen in allen Organen exprimiert, aber nicht in Metastasen anderer Krebserkrankungen in gleichen Organen oder in nicht-metastasiertem Darmkrebs.^[141,142] Aus diesem Grunde ist PRL-3 ein sehr interessantes Wirkstofftarget und man verspricht sich, PRL-3 als Biomarker zur Früherkennung von Metastasen bei Darmkrebspatienten anwenden zu können.^[143] Natürliche Substrate von PRL-3 sind nicht bekannt. Peptid-Substratspezifitätstests

sind durchgeführt worden und ließen auf eine geringe Aktivität der Phosphatase mit den verwendeten peptidischen Substraten schließen. Sie lieferten aber keine Hinweise auf die Aminosäuresequenzselektivität von PRL-3.^[139] Über die Substratspezifität von PRL-3 ist weitergehend noch nichts bekannt.

2.4.1.5 PTP-SL

PTP-SL ist eine rezeptorähnliche PTP und gehört zur Familie der KIM (kinase interaction motif bestehend aus 16 hochkonservierten Aminosäuren) -enthaltenden Phosphatasen. Sie ist eine zytosolische und Membran-assoziierte PTP, welche an perinuklearen vesikulären Strukturen lokalisiert ist. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Aktivität und Translokation von MAP Kinasen (mitogen activated protein).^[144,145] MAP Kinasen werden in allen Eukaryoten gefunden und in fast allen Säugetierzellen exprimiert. Sie regulieren eine große Anzahl an unterschiedlichen zellulären Antworten und können in einer Zelle verschiedene Funktionen haben. Die Wechselwirkungen zwischen den MAP Kinasen und PTP-SL sind abhängig von dem KIM.^[144]

PTP-SL hat, für eine RPTP ungewöhnlich, nur eine cytoplasmatische Domäne. Es wurden kinetische Studien mit den gleichen Peptiden wie bei PTP μ vorgenommen.^[144] Dabei zeigte PTP-SL mit beiden Peptiden eine langsamere Reaktion als PTP μ . Weitere Peptid-Substratspezifitätstests sind nicht beschrieben.

2.4.2 Assays zum Nachweis von Phosphatase-Substratspezifitäten

Aufgrund der genannten Eigenschaften der vorstehend erwähnten Phosphatasen sind sie bei Fehlfunktionen in der Ausbildung verschiedener Krankheiten involviert. *MPTPA* ist eine Ausnahme, da sie schon in ihrer eigentlichen Funktion für die Ausbildung von Tuberkulose mitverantwortlich ist. Es ist interessant, die Substrate der entsprechenden PTPs zu kennen, um die Rolle der PTPs in biologischen Prozessen zu verstehen und die Substrate als mögliche Angriffspunkte von Medikamenten zu nutzen.

Bei der Untersuchung von Substratspezifitäten von Phosphatasen in Mikrotiterplatten wird meistens die Freisetzung von Phosphat gemessen. Eine Möglichkeit dazu ist die Verwendung der Phosphomolybdat-Kolorimetrie, bei der nach der Enzymreaktion eine Malachitgrün-Lösung zum Reaktionsvolumen gegeben wird, wodurch die Enzymreaktion gestoppt wird. Das Malachitgrün komplexiert freies Phosphat und mittels der dadurch entstehenden Farbänderung wird der Phosphatgehalt bestimmt.^[146] Andere Methoden sind die Verwendung von radioaktiv markierten Phosphopeptiden, der Nachweis durch monoklonale anti-Phosphotyrosin Antikörper, HPLC^[147] oder die Messung der durch Phosphathydrolyse erhöhten Tyrosin-Fluoreszenz.^[131a] Für das

Hochdurchsatz-Screening mittels Mikroarrays ist der Nachweis erschwert, da man das freigesetzte Phosphat nach der Enzymreaktion gemeinsam mit dem Enzym von der Oberfläche wäscht und dabei nicht zwischen dem Phosphat einzelner Substrate unterscheiden kann. Bisher sind drei verschiedene Techniken beschrieben, die alle aus der industriellen Forschung hervorgegangen sind. Allgemein wird die Dephosphorylierung der auf einem Mikroarray immobilisierten phosphorylierten Peptide beobachtet. Zuerst wurde von Huijsduijnen et al. über die Verwendung von verstärkter Chemolumineszenz (ECLTM) zum Nachweis berichtet.^[71,131d] Dabei wurde nach der Behandlung mit einer Phosphatase ein anti-Phosphotyrosin-Antikörper-Mix verwendet, der an die nicht hydrolysierten Phosphotyrosine band. Nach Inkubation mit diesem Mix wurden mittels eines mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundär-Antikörpers, welcher den Primär-Antikörper erkannte, durch eine von dem Enzym katalysierten Farbreaktion die nicht dephosphorylierten Peptide detektiert, d.h. diejenigen, welche keine Substrate der verwendeten Phosphatase waren. So konnte in einem Vergleich der Signalintensitäten vor und nach der Inkubation mit der Phosphatase die Dephosphorylierung der Substrate beobachtet werden. Ebenfalls von Huijsduijnen et al. wurden Phosphopeptide verwendet, deren Phosphat ³²P-markiert war. Dieser Nachweis folgt dem gleichen Prinzip wie der oben geschilderte, da man durch das Auslesen der Radiosignale bei einem Rückgang des Signals auf Substrate schließen kann.^[131c,148] Diese Technik ist schneller und unkomplizierter, aber durch die Radioaktivität schwerer handhabbar. Eine weitere Technik wird von JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, verwendet. Hier wird das Phosphopeptid Fluoreszenz-markiert. Bei einer Dephosphorylierung erkennt ein Antikörper das Peptid nicht und man erhält ein Signal. Falls der Phosphatrest nicht hydrolysiert wird, bindet der Fluoreszenz-markierte Antikörper an das Phosphopeptid und dadurch wird das Signal gequencht. Dieses ist also ein Signal-positiver Nachweis von Substraten.^[149] Durch die Quenchtechnik besteht aber die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen und die doppelte Fluoreszenzmarkierung erschwert und verteuert die Synthese.

3 Ziele der Arbeit

Wie bereits in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben, gibt es für die Herstellung von Mikroarrays nur wenige Alternativen bei der Wahl einer chemoselektiven Reaktion, bei der die funktionellen Gruppen nicht möglicherweise bedeutend für die biologische Aktivität sind. Echte Chemoselektivität und Bioorthogonalität der Immobilisierungsreaktion sind aber sehr wichtig für die Erforschung biologischer Wechselwirkungen, da diese nur so unverfälscht beobachtet werden können. Daher sollte im ersten Teil der Arbeit eine Kupplungsmethode entwickelt werden, die

- 1) bioorthogonale Gruppen zur Anknüpfung nutzt,
- 2) orthogonal zu anderen funktionellen Gruppen chemoselektiv an die Oberfläche bindet,
- 3) Funktionalitäten besitzt, die bei einer Mehrstufensynthese an der festen Phase entweder mit möglichst vielen Reaktionsbedingungen kompatibel sind oder sich bei Abspaltung vom Harz einführen lassen und
- 4) ohne Zugabe weiterer Reagenzien zur Ankupplung führt.

Als die dazu benötigte selektive Reaktion sollte die in Kapitel 2.3.1 beschriebene Staudinger-Ligation verwendet werden (Abbildung 9).

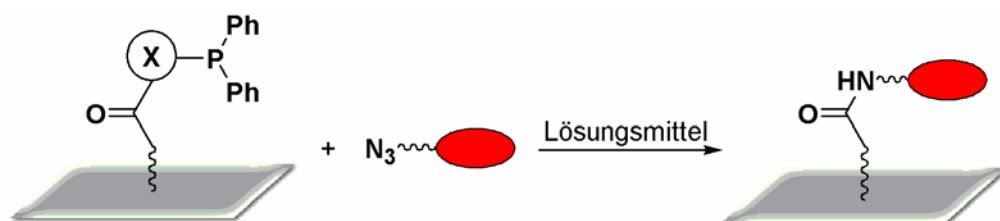


Abbildung 9: Staudinger-Ligation zur Herstellung von Mikroarrays.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Peptid-Mikroarrays, die zur Untersuchung von Substratspezifitäten von Phosphatasen herangezogen werden. In Kapitel 2.4 wurde die große Bedeutung von Phosphatasen in Signaltransduktionswegen erläutert. Es ist von großem Interesse, die Substrate von PTPs zu kennen, um die Rolle der PTPs in biologischen Prozessen zu verstehen und die Substrate als mögliche Angriffspunkte von Medikamenten nutzen zu können. Zum Nachweis von Phosphatasespezifitäten auf Oberflächen existieren derzeit entweder relativ komplizierte oder durch Verwendung radioaktiver Materialien schwer handhabbare Techniken (Kapitel 2.4.7). Aus diesem Grund sollte ein Testsystem entwickelt werden, welches einen selektiven, unkomplizierten Nachweis ermöglicht und sich der Vorteile der entwickelten Kupplungsmethode bedient. Der Nachweis sollte mit Fluoreszenz-markierten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern nach dem „Vorher-Nachher“-Prinzip erfolgen, das, wie in Kapitel

2.4.7 beschrieben, durch einen Signlrückgang nach der Inkubation mit dem Enzym im Vergleich zu der Signalintensität vor der Inkubation, zur Erkennung eines Substrats führt (Abbildung 10).

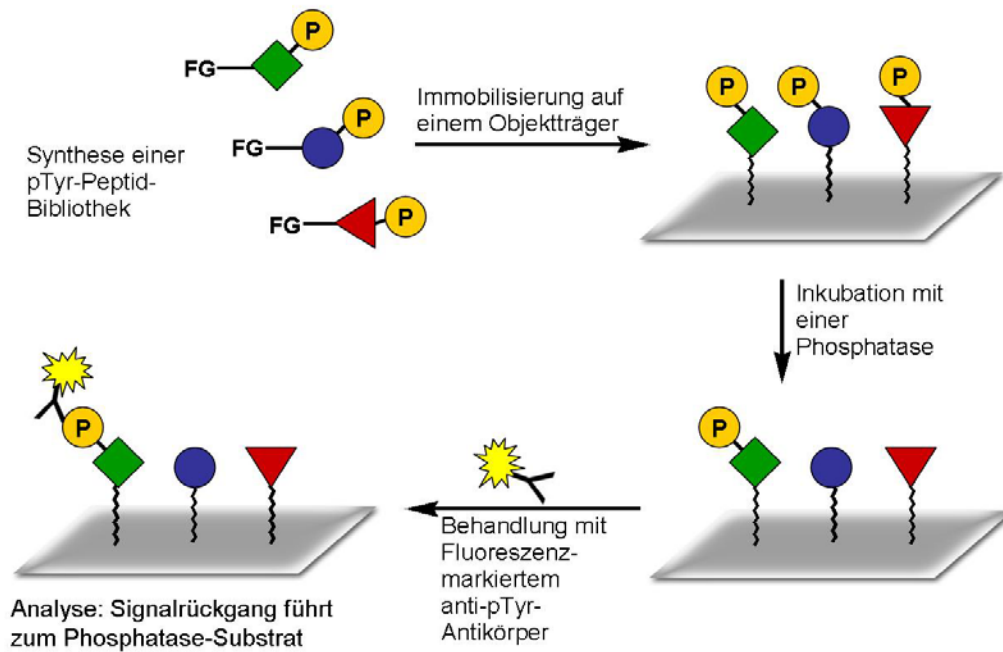


Abbildung 10: Konzept zur Herstellung von einem Peptid-Mikroarray zur Untersuchung von Substratspezifitäten von Phosphatasen.

Im dritten Teil der Arbeit stehen mikrostrukturierte Oberflächen im Mittelpunkt. Im Kapitel 2.2 wurden die über Mikroarrays hinausgehenden vielfältigen Möglichkeiten zur Anwendung dieser Oberflächen beschrieben. Bestehende Techniken zur photochemischen Oberflächenstrukturierung nutzen aber drastische Reaktionsbedingungen, die Biomoleküle zerstören können, und funktionelle Gruppen, die unspezifisch reagieren (Kapitel 2.2.2). Daher sollte eine milde, selektive Methode zur photochemischen Mikrostrukturierung mit Hilfe der Licht-induzierten Addition von Mercaptanen an Doppelbindungen entwickelt werden (Abbildung 11).

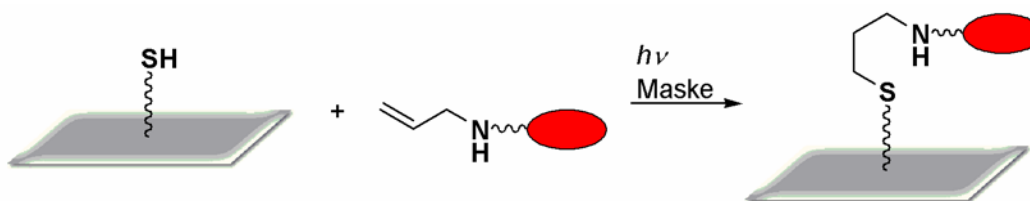


Abbildung 11: Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an Doppelbindungen zur Oberflächenstrukturierung.

4 Spezieller Teil

4.1 Herstellung von Mikroarrays mittels Staudinger-Ligation

4.1.1 Die Kupplungsstrategie

Substanzbibliotheken zum Einsatz im Hochdurchsatz-Screening werden generell mittels kombinatorischer Chemie an polymeren Trägern synthetisiert. Die so hergestellten Substanzen müssen anschließend vom Harz abgespalten werden, um auf Mikroarrays immobilisiert werden zu können. Um eine schnelle und einfache Prozedur zu gewährleisten, wurde eine Strategie entwickelt, bei der die Substanzen in aktivierter Form von dem Harz abgespalten werden, so dass diese nach der Abspaltung nicht weiter für die Kupplungsreaktion funktionalisiert werden müssen (Abbildung 12). Im direkt darauf folgenden Schritt werden die Substanzen immobilisiert und sind direkt für den gewünschten Assay zugänglich. Diese Strategie wurde als Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie benannt (SPOS: solid phase organic synthesis; organische Fetsphasensynthese).^[150]

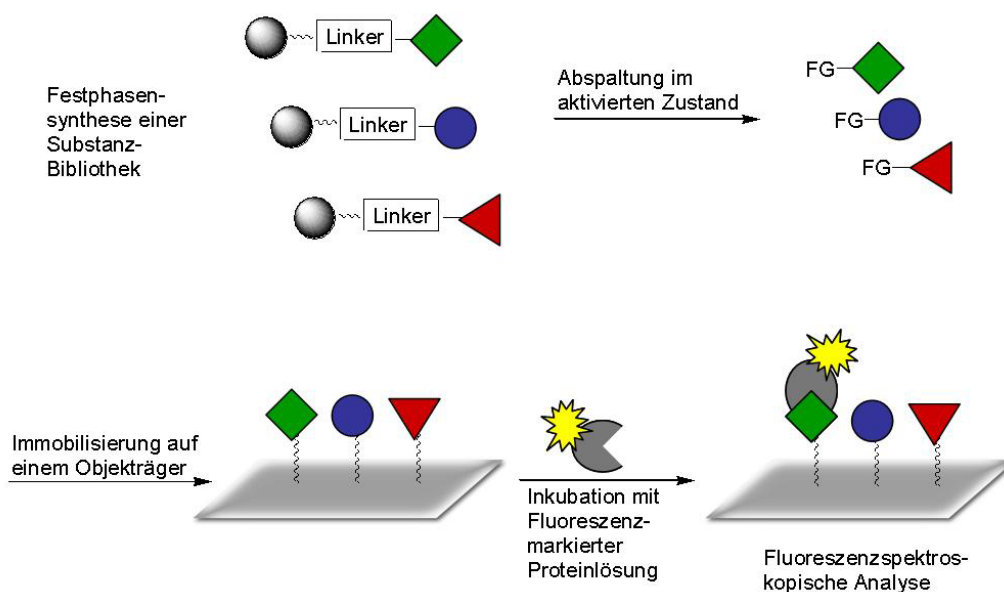
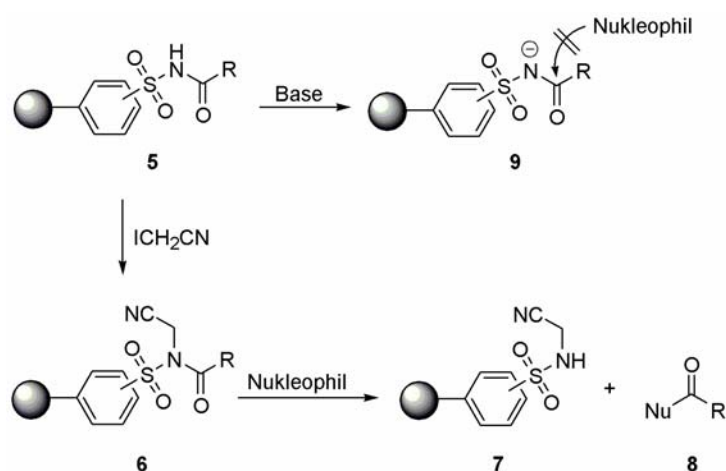


Abbildung 12: Kupplungsstrategie zur Herstellung von Mikroarrays; FG = funktionelle Gruppe.

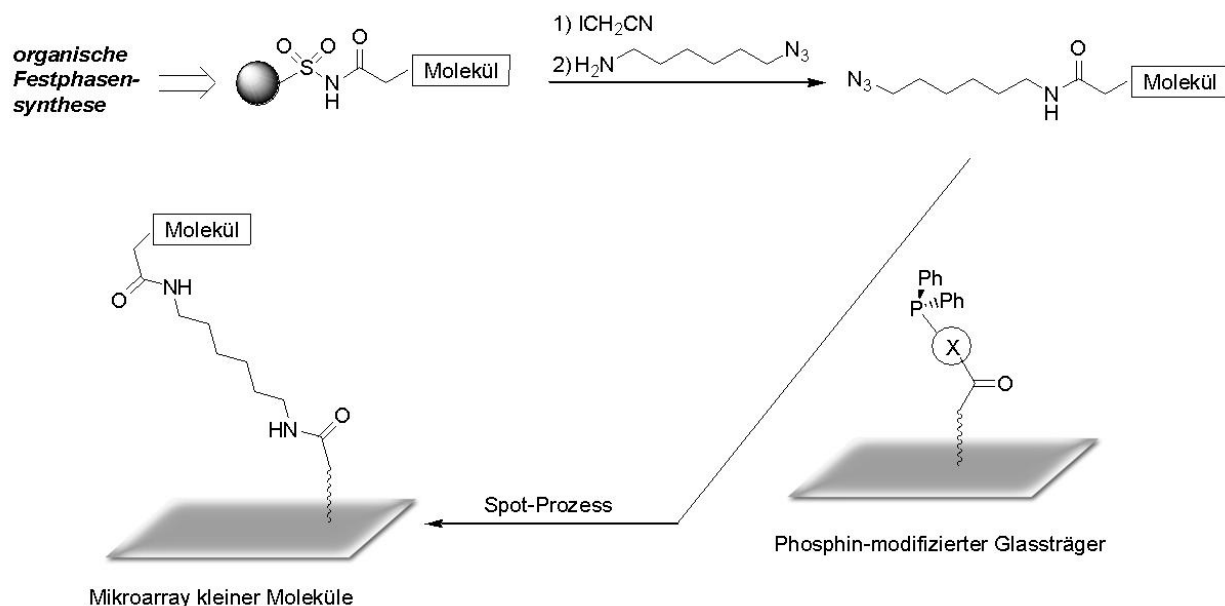
Eine Möglichkeit zur Abspaltung in aktivierter Form ist durch die Verwendung des Sulfonsäureamid-safety-catch-Linkers („Kenner-Linker“) bei der kombinatorischen Festphasensynthese gegeben. Ein safety-catch-Linker muss zunächst aktiviert werden, damit er im folgenden Schritt vom polymeren Träger abgespalten werden kann. Der von Kenner eingeführte^[151] und von Ellman weiterentwickelte^[152] Sulfonsäureamid-safety-catch-Linker

gestattet die Einführung einer funktionellen Gruppe im Abspaltungsschritt (Schema 1). Er zeichnet sich dadurch aus, dass er gegenüber einer großen Anzahl an Reaktionsbedingungen inert und daher vielfältig in Peptid- und Naturstoff-Festphasensynthesen eingesetzt worden ist.^[153] Zur Stabilität des *N*-Acylsulfonamids **5** gegenüber Nucleophilen, Säuren und Basen trägt die Ionisierbarkeit des Stickstoffs bei (Schema 1).^[153] Die *N*-Acylsulfonamid-Gruppe **5** ist so lange gegenüber nukleophilen Angriffen stabil, bis durch *N*-Alkylierung mit Iodacetonitril oder Diazomethan der Aufbau abstoßender negativer Ladung durch Deprotonierung des Stickstoffs verhindert wird und die Bindung zwischen Stickstoff und Carbonyl-Kohlenstoff des *N*-Alkyl-*N*-acylsulfonamids **6** durch nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom gespalten werden kann. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte der Kenner-Linker in der SPOS-Aktivierungsstrategie verwendet werden.



Schema 1: Der Sulfamylbutyryl-Linker **5** kann mit Iodacetonitril aktiviert und durch Nucleophile abgespalten werden. Ohne Aktivierung ist er gegenüber nukleophilen Angriffen sowie im sauren und basischen Medium stabil.

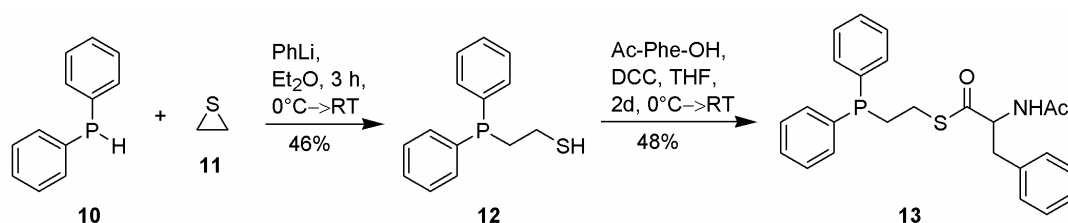
Für die Kupplung mittels Staudinger-Ligation werden ein Phosphin und ein Azid benötigt. Während beabsichtigt wurde, die Oberfläche mit dem Phosphin zu modifizieren, sollte das Azid während des Abschaltungsschritts von dem polymeren Träger eingeführt werden (Schema 2). Dies wurde aus der Überlegung heraus entschieden, dass das Phosphin als oxidationslabile Komponente in so wenigen Schritten wie möglich eingesetzt werden sollte. Ein weiterer Vorteil der Strategie, das Azid am Ende der Festphasensynthese einzuführen, ist, dass es während der Synthese am Harz keine störenden Nebenreaktionen wie beispielsweise eine Reduktion eingehen kann, wobei ein reaktives Amin entstünde. Die Azid-funktionalisierten Moleküle sollten dann direkt auf die Phosphin-modifizierte Oberfläche gespottet werden, wo sie durch die Staudinger-Ligation eine stabile Amidbindung eingehen (Schema 2).



Schema 2: Herstellung eines Mikroarrays mittels Staudinger-Ligation.

4.1.2 Ermittlung eines geeigneten Phosphins

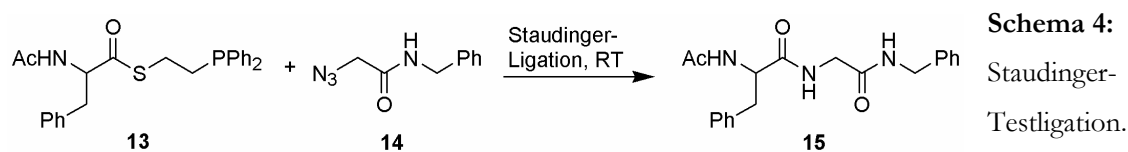
Raines et al. berichteten über das in Kapitel 2.3.1 vorgestellte Diphenylphosphinmethanthiol **4**, dass es im Vergleich zu dem Diphenylphosphinothiophenol **2** weitaus bessere Reaktivität zeigte (Abbildung 7). Dies war durch gute Ausbeuten für das Staudinger-Ligationsprodukt gekennzeichnet.^[92b] Die hohe Reaktivität wurde zum einen mit dem fünfgliedrigen Übergangszustand erklärt und zum anderen durch eine höhere Hydrolyse-Stabilität des aliphatischen Thioesters verglichen mit dem aromatischen Thioester in dem für die Staudinger-Ligation benötigten wässrigem Medium (s. Kapitel 2.3.1). Außerdem reagierte Phosphin **4** gegenüber dem von Bertozzi et al. beschriebenen Diphenylphosphinophenol **1** in einer um die Hälfte verkürzten Reaktionszeit in vergleichbaren Ausbeuten.^[93] Daher wurde bereits von Dr. C. Peters in Vorexperimenten versucht, Phosphin **4** zu synthetisieren.^[154] Da die Synthese sich aber als nicht erfolgreich erwies, wurde statt dessen das Diphenylphosphinoethanthiol **12** synthetisiert, da somit zumindest der Vorteil der erhöhten Stabilität des Thioesters gewahrt werden konnte (Schema 3).



Schema 3: Synthese von Diphenylphosphinoethanthiol und dessen Umsetzung zum Thioester.

Dazu wurde Diphenylphosphin zunächst mit Phenyllithium deprotoniert und anschließend mit Ethylensulfid in einer Ausbeute von 46% umgesetzt. Die Schwierigkeit bei der Umsetzung von Diphenylphosphin ist die hohe Oxidationslabilität, so dass unter absolutem Luft- und Feuchtigkeitsausschluß gearbeitet werden musste. Da Raines et al. in ihren Testreaktionen zur Staudinger-Ligation den Acetylphenylalanindiphenylphosphino-methylthioester verwendeten,^[92b] wurde der entsprechende Ethylthioester **13** für diesen Zweck in einer Ausbeute von 48% hergestellt (Schema 3).

Für die Staudinger-Ligations-Testreaktionen wurde wie in der Literatur beschrieben Azidoessigsäurebenzylamid **14**, das von Dr. C. Peters synthetisiert wurde,^[154] als Reaktionspartner für das Phosphin benutzt (Schema 4). Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, die in Tabelle 1 aufgezeigt sind. Ein geringer Azid-Überschuß wurde verwendet, da auf der Oberfläche das gespottete Azid ebenfalls im Überschuß vorliegen würde. Die Produktkontrolle wurde qualitativ mittels HPLC-ESI durchgeführt.



Äquivalente Phosphin 13	Äquivalente Azid 14	Lösungsmittel	Argon	Reaktionszeit	H ₂ O-Zugabe	Produkt 15 (HPLC-)
1	1.5	THF/H ₂ O=3:1 entgast, Argon ges.	+	16 h	-	-
1	1.2	THF/H ₂ O=3:1	-	16 h	-	-
1	1.2	THF	-	16 h	-	-
1	1.3	abs. THF	+	16 h	Nach 15 h	+
1	1.3	abs. DMF	+	16 h	Nach 15 h	-
1	1.3	abs. Dioxan	+	17 h	Nach 16 h	+

Tabelle 1: Staudinger-Testligationen mit Phosphinthioester **13**.

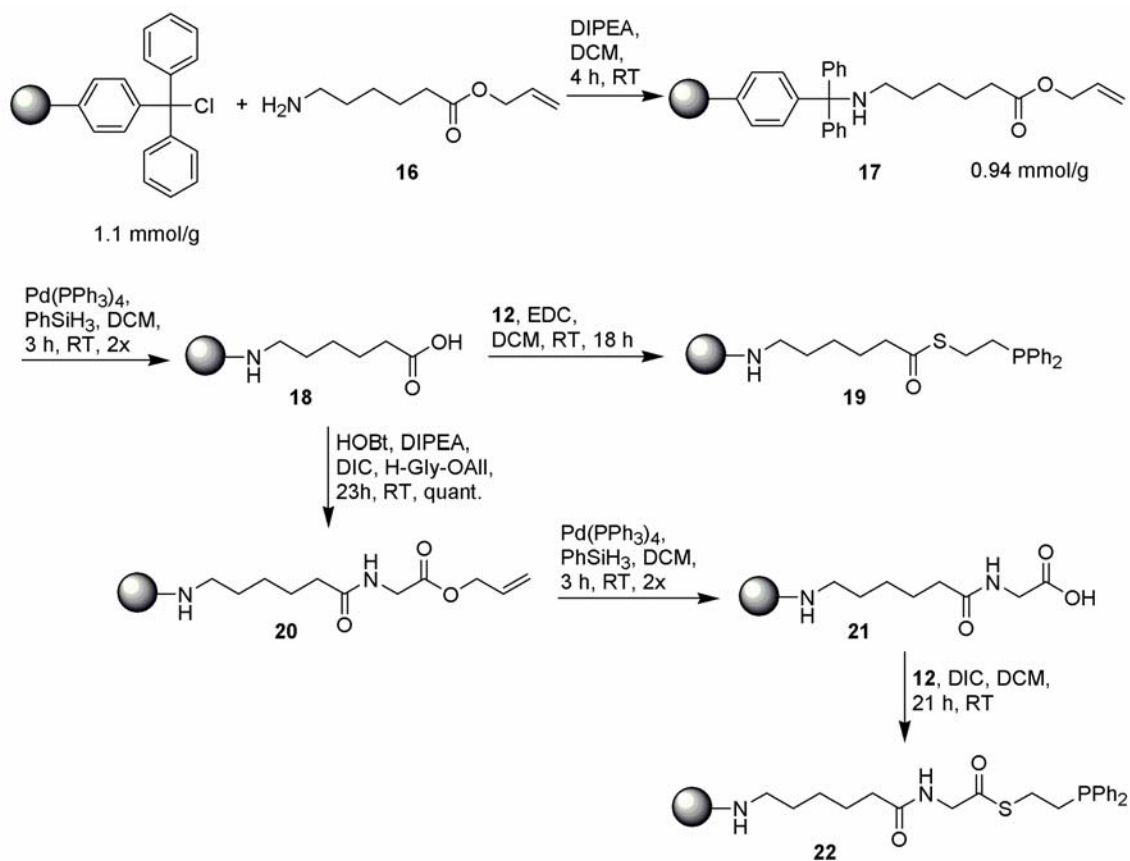
Bertozzi et al. und Raines et al. hatten berichtet, dass die Staudinger-Ligation in THF/H₂O (3:1) oder nassem THF abläuft.^[92b,93] Daher wurden die ersten Testreaktion in diesen Lösungsmitteln durchgeführt, wobei aber keine Umsetzung beobachtet werden konnte. Erst als mit absolutem THF unter Argon gearbeitet und nach einigen Stunden Wasser zugegeben wurde, konnte das

Produkt detektiert werden. Anschließend wurden hochsiedende Lösungsmittel getestet, um bei der Reaktion auf der Oberfläche die Eintrocknung von Spots herauszögern zu können. Die Ligation lief nur in absolutem Dioxan und nicht in absolutem DMF ab. Daraus lässt sich folgern, dass etherische Lösungsmittel, absolut trockene Bedingungen sowie Argonatmosphäre und anschließende Wasserzugabe essenziell für die Ligation mit dem Phosphinoethanthiol **12** sind. Eine prozentuale Abschätzung des Umsatzes war nicht möglich, da das Produkt und der oxidierte Phosphinothioester sich UV-spektroskopisch und in ihren Ionisierungseigenschaften zu stark unterscheiden. Es war aber ein bei weitem größerer Peak des oxidierten Edukts als des Produkts im HPLC-Spektrum zu sehen. Da hier aber die Bewertung der Eignung der Ligationemethode mit dem entsprechenden Phosphin für die Reaktion auf Oberflächen der interessante Punkt war, wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass sich das verwendete Phosphinoethanthiol **12** nur bedingt für die Staudinger Ligation auf Oberflächen eignet, da die Ausbeuten bereits in Lösung nicht gut waren und die benötigten Bedingungen beim Spotten auf Oberflächen nur sehr schwer zu erfüllen sind. Unter einer Argonatmosphäre wäre das Spotten mit einem Roboter äußerst aufwendig, unpraktikabel und teuer. Trotzdem wurden anschließend weitere Testreaktionen am polymeren Träger, der als Modell für die Glasoberfläche diente, durchgeführt.

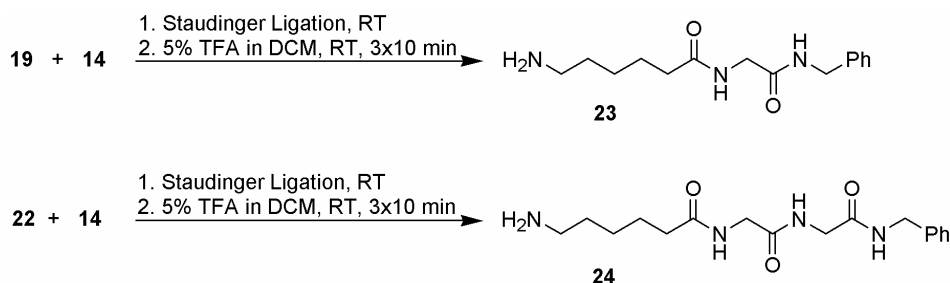
Dazu wurden zwei verschiedene Thioester an fester Phase synthetisiert (Schema 5). Chlorotriptyl-Harz wurde mit 6-Aminocapronsäureallylester **16** mit einer Ausbeute von 85% beladen und der Allylester anschließend hydrolytisch gespalten. Die Carbonsäure **18** wurde direkt mit Phosphin **12** umgesetzt. Trotz inerte Bedingungen wurde aber nach Abspaltung zur Produktkontrolle im ESI-MS nur noch die oxidierte Form von Produkt **19** detektiert. Die Oxidation des Phosphins könnte aber nicht nur während der Reaktion am Harz, sondern auch bei der Abspaltung vom Harz oder im ESI-Probengefäß stattgefunden haben, so dass diese Verbindung dennoch zur Testligation eingesetzt wurde. Das Ergebnis dieser Synthese ließ wiederum auf eine starke Oxidationslabilität des Phosphins **12** schließen.

Da nicht bekannt war, ob die Staudinger-Ligation von der dem Phosphinothioester benachbarten Aminosäurestruktur abhängt, wurde Carbonsäure **18** mit Glycinallylester zum Produkt **20** in quantitativer Ausbeute verknüpft. Der Allylester **20** wurde dann weiter zum Phosphinothioester **22** umgesetzt, wobei diesmal auf eine Produktkontrolle aufgrund der mehrfach belegten Oxidationslabilität des Phosphins verzichtet wurde.



Schema 5: Festphasensynthese der Phosphinothioester **19** und **22** zur Testligation am Harz.

Die Staudinger-Testligationen an fester Phase wurden wiederum mit dem Azidoessigsäurebenzylamid **14** durchgeführt, wobei zur Berechnung der Äquivalente die theoretische Beladung des Harzes bei 100% Umsatz ausgehend von Verbindung **17** verwendet wurde (Schema 6). Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nach der Ligation wurde das Produkt mit einer 5%TFA-Lösung in DCM vom Harz abgespalten.



Schema 6: Staudinger-Testligationen am Harz.

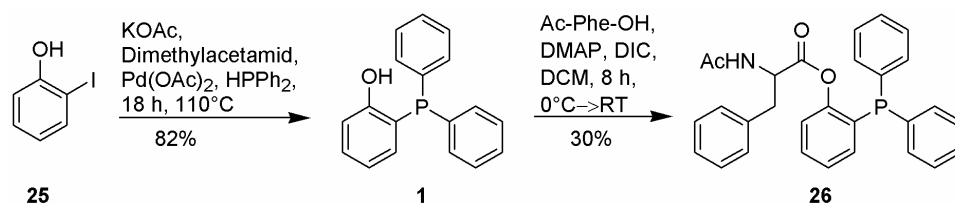
1 Äquivalent Phosphin	Äquivalente Azid 14	Lösungsmittel	Argon	Reaktionszeit	H ₂ O-Zugabe	Produkt (HPLC-ESI)
19	10	abs. THF	+	21 h	Nach 20 h	-
22	10	abs. THF	+	17 h	Nach 16 h	-

Tabelle 2: Staudinger-Testligationen mit Phosphinothioester **19** und **22** am Harz.

Keine der Testligationen verlief erfolgreich. Es wurde keines der Produkte **23** und **24** mittels HPLC-ESI sondern nur das abgespaltene oxidierte Edukt detektiert. Es konnte aber nicht nachgewiesen werden, ob das Phosphin schon vor der Ligationsreaktion oxidiert war oder erst bei der Wasserzugabe nach der Ligation oxidierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, dass Phosphin **12** nicht für die Modifizierung von und Ligation auf Oberflächen geeignet ist.

Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit von Thioestern und der größeren Stabilität von Triphenylphosphinen gegenüber Oxidation im Vergleich zu Alkyldiphenylphosphinen wurde das in Kapitel 2.3.1 vorgestellte Phenolphosphin **1** als nächste Möglichkeit gewählt. Bertozzi et al. berichteten, dass das acetylierte Phosphin **1** in der Staudinger Ligation mit einem Azid-modifizierten Nukleosid eine Ausbeute von über 95% erzielte.^[93]

Die Herstellung des Phenolphosphins **1** wurde entsprechend der einstufigen Synthese von Stelzer et al. vollzogen.^[155] Unter strikt trockenen Bedingungen wurde 2-Iodphenol durch Palladium(II)-vermittelte Kupplung mit Diphenylphosphin mit einer guten Ausbeute von 82% verknüpft (Schema 7).

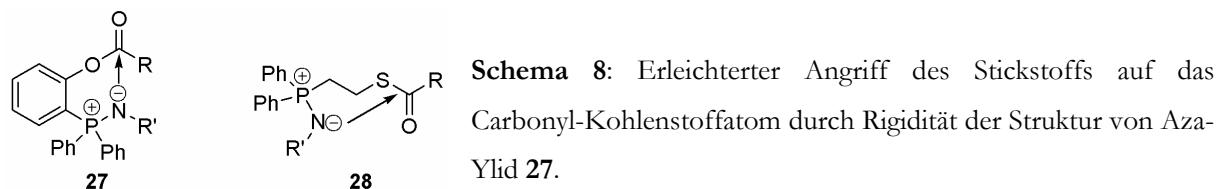


Schema 7: Herstellung und Veresterung des Phenolphosphins **1**.

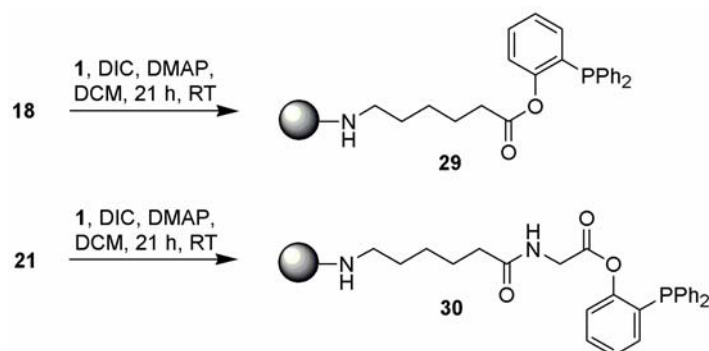
Um mit dem Phosphinothioester in der Staudinger-Ligation vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, folgte die Veresterung des Phenols **1** mit *N*-Acetylphenylalanin mittels DMAP und DIC mit einer mäßigen Ausbeute von 30%.

Die Staudinger-Ligation wurde analog der vorherigen Testligationen durchgeführt, wobei zunächst nur die Ligation unter Argon mit nassem THF vorgenommen wurde. Das Produkt **15** konnte in diesem Versuch detektiert werden, so dass auf weitere Testexperimente in Lösung

verzichtet wurde. Dieses Ergebnis zeigte bereits, dass das Phosphinophenol **1** stabiler gegenüber Oxidation als das Phosphinothiol **12** war und sogar laut HPLC-Spektrum bessere Ausbeuten erzielte. Grund dafür ist möglicherweise die Rigidität des Arylesters **27** im Gegensatz zu dem flexiblen Alkylthioester **28**, die durch die räumliche Nähe und starre Struktur den Angriff des Aza-Ylid-Stickstoffs auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom erleichtert (Schema 8).^[93]



Für die Staudinger-Testligationen am polymeren Träger wurden entsprechend der Versuche mit dem Phosphinoethanthiol **12** die Phenylester **29** und **30** mittels DMAP und DIC synthetisiert (Schema 9). Beide Phenylester konnten nach Abspaltung im ESI-MS detektiert werden. Zur Berechnung der Äquivalente für die Staudinger-Testligation wurde wiederum die theoretische Beladung bei 100% Umsatz ausgehend von Verbindung **17** verwendet. Anschließend wurden die Ligationen mit Azidoessigsäurebenzylester **14** analog zu den Versuchen durchgeführt, die in Schema 6 und Tabelle 2 beschrieben wurden, mit dem Unterschied dass nasses THF benutzt wurde. In beiden Fällen konnte Produkt detektiert werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Staudinger Ligation nicht von der dem Phosphin benachbarten Aminosäurestruktur abhängt.



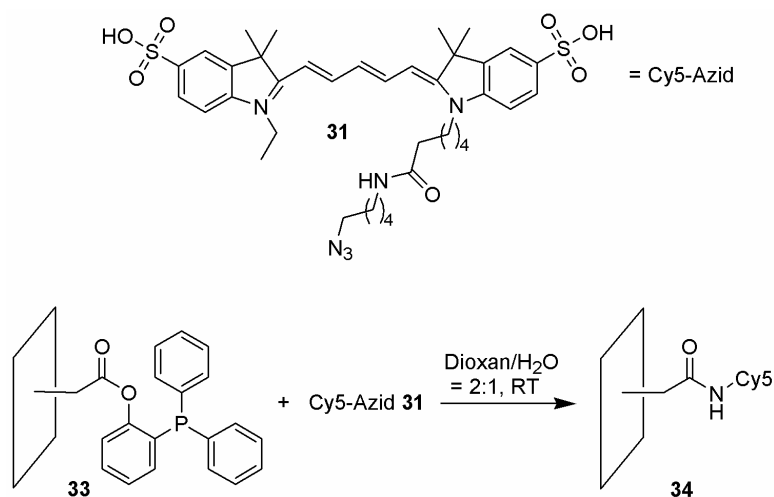
Schema 9: Synthese der Phosphinophenylester **29** und **30** für die Staudinger Ligation am Harz.

Die Abschätzung der Ausbeute war aus besprochenen Gründen sehr schwierig, allerdings konnte hier sogar ein wesentlich höherer Produktanteil als bei der Testligation in Lösung bestimmt werden. Das Produkt **24** des Phenylesters **30** mit dem Azid **14** wurde versucht durch präparative HPLC aufzureinigen, aber es wurde laut ¹H-NMR eine 1:1 Mischung aus nicht hydrolysiertem N-(6-Aminocapronsäureamido)glycinalylester **20** und Produkt **24** erhalten, die nicht trennbar war.

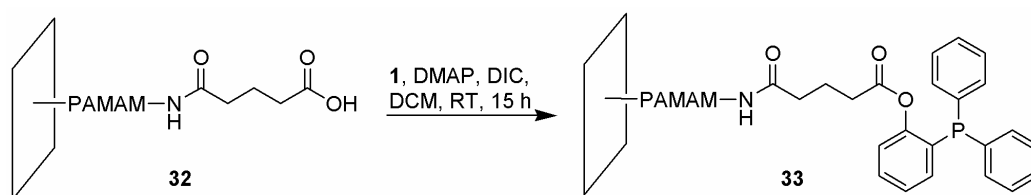
Die Staudinger-Testligationen des Diphenylphosphinophenols **1** lieferten also vielversprechende Ergebnisse für die Modifikation von und Ligation auf Glsträgern.

4.1.3 Immobilisierung von Haptenen mittels spurloser Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Ligation auf Glsträgern sollte zunächst anhand der Immobilisierung von Cy5-Azid **31**, welches von Dr. C. Peters hergestellt worden war,^[154] getestet werden (Schema 10). Die Phosphin-modifizierten Oberflächen wurden durch Veresterung von Carbonsäure-funktionalisierten Polyamidoamin-Dendrimer-überzogenen Glsträgern der Firma Chimera Biotec GmbH, Dortmund, mit Phenolphosphin **1** mittels DIC und DMAP hergestellt (Schema 11).



Schema 10: Immobilisierung von Cy5-Azid **31** auf Phosphin-funktionalisierten Glsträgern.



Schema 11: Funktionalisierung von Glsträgern mit Phenolphosphin **1**.

Ein Konzentrationsgradient von Cy5-Azid in absolutem Dioxan/H₂O (2:1) wurde auf einen Glsträger **33** mit einer Eppendorfpipette gespottet. Der Träger wurde über Nacht in einem mit wenig Wasser zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit gefüllten Becherglas inkubiert. Trotz der erhöhten Luftfeuchtigkeit und des hochsiedenden Dioxans waren die Spots innerhalb einer halben Stunde sichtbar eingetrocknet. In dem Becherglas befand sich zu Beginn Argon. Da es aber nicht geschlossen war, stand die Argonatmosphäre im Austausch mit der umgebenden Luft.

Nach anschließendem Waschen mit Wasser konnten die Ergebnisse direkt fluoreszenzspektroskopisch ausgelesen werden (Abbildung 13).

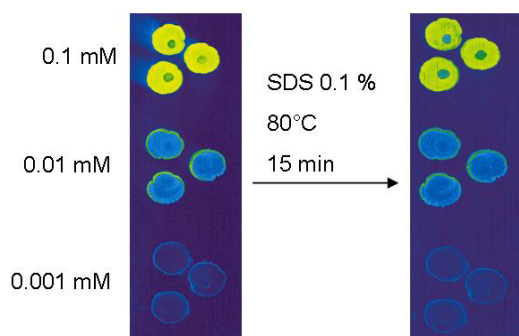
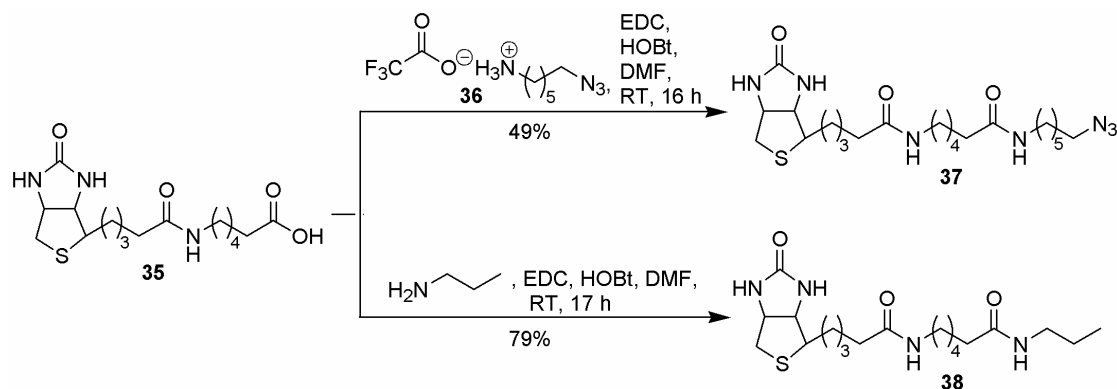


Abbildung 13: Immobilisierung von Cy5 und Test zur Stärke der Anbindung durch stringentes Waschen bei 80°C.

Die Auslesung zeigte einen deutlichen Konzentrationsgradienten, der dem gespotteten entsprach. Um zu zeigen, dass das Cy5 nicht nur durch ionische Wechselwirkungen an die Oberfläche gebunden war, wurde der Glsträger 15 min bei 80°C in 0.1%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung gewaschen und anschließend die Fluoreszenzintensität detektiert. Es zeigte sich nur eine sehr geringe Abnahme, die aber auch mit der Zerstörung des Cy5 unter diesen Bedingungen zusammenhängen kann.^[156] Dieses Ergebnis lässt den Schluss einer starken, kovalenten Bindung an die Oberfläche zu.

Nun sollte, als Modell für einen realen Assay, mit Hilfe der Wechselwirkungen zwischen Biotin und einem gegen Biotin spezifischen Antikörper (abIgG) die Anbindung an die Oberfläche gezeigt werden. Dabei wurde das Biotin als kleines Molekül auf der Oberfläche immobilisiert und Cy5-markierter abIgG (abIgG-Cy5) zum Nachweis verwendet. Die Synthese des Azid-funktionalisierten Biotins **37** ging von Biotin-6-amidocaprinsäure **35** (Biotin-aca) aus, welches von Dr. M. Völkert synthetisiert worden war.^[157] Dieses wurde mit 6-Azidohexylamin-trifluoracetat **36** in einer Amidbindung verknüpft (Schema 12). Das 6- Azidohexylamin-hydrotrifluoracetat war nach einer von C. Peters ausgearbeiteten Vorschrift hergestellt worden.^[154]



Schema 12: Synthese der Biotin-Haptene.

Die Anbindung an die Oberfläche durch das Azid und nicht über andere Wechselwirkungen, sollte anhand des Biotin-6-aminocaprönsäurepropylesters **38**, dessen Struktur homolog der des Azid-funktionalisierten Biotins ist, gezeigt werden. Würde Verbindung **38** nicht an die Oberfläche anbinden, wäre dies ein eindeutiger Hinweis, dass die Immobilisierung durch eine Reaktion des Azids stattfindet. Daher wird der Biotinpropylester **38** und entsprechende weitere Verbindungen nachfolgend als Negativkontrolle bezeichnet. Er wurde analog dem Azid-funktionalisierten Biotin synthetisiert (Schema 12).

Das Spotting wurde mit einem Roboter bei der Firma Chimera Biotec GmbH durchgeführt, welcher viermal 250 μ l auf einen Spot pipettierte. Die Spots, die einen Durchmesser von ca. 400 μ m hatten, trockneten sofort sichtbar ein. Die Glasröhrer wurden über Nacht unter Stickstoff in einem Schlenk-Gefäß inkubiert und anschließend mit Wasser und TETBS-Puffer gewaschen. Dann wurden sie zur Vermeidung unspezifischen Bindens des abIgG-Cy5 an die Oberfläche 30 min mit MESTBS blockiert und anschließend 60 min mit einer 100 nM Lösung des abIgG-Cy5 inkubiert. Die Blockierung, die Inkubation des abIgG-Cy5 und das Auslesen der Daten wurde von R. Wacker, Chimera Biotec GmbH, durchgeführt.^[158]

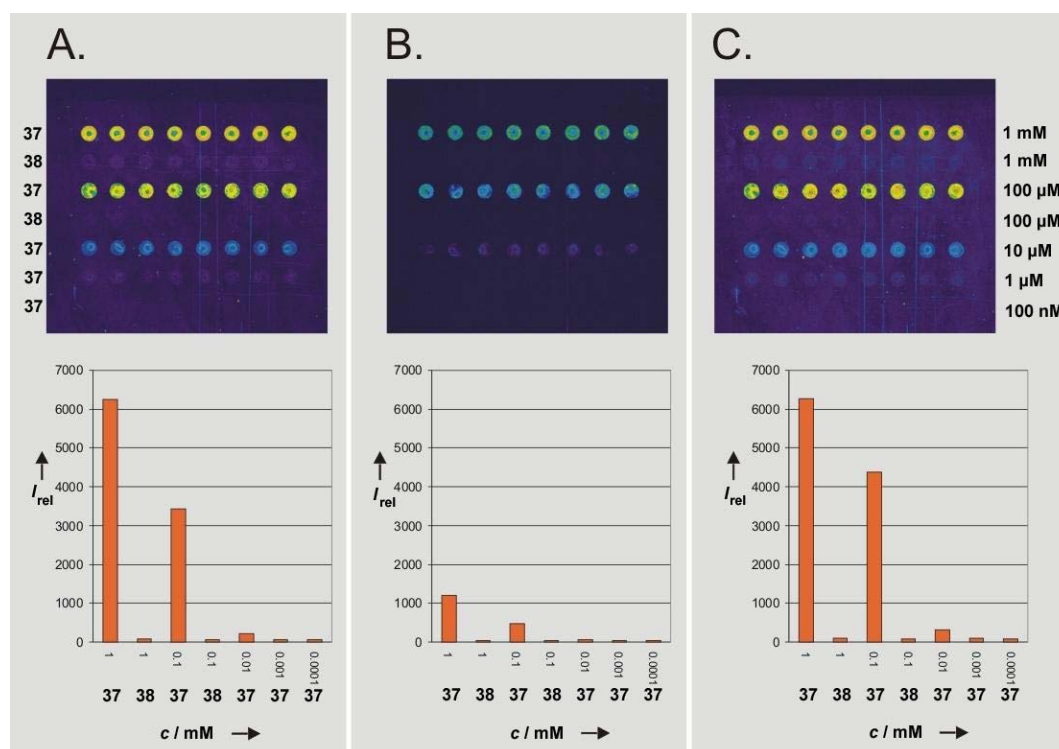
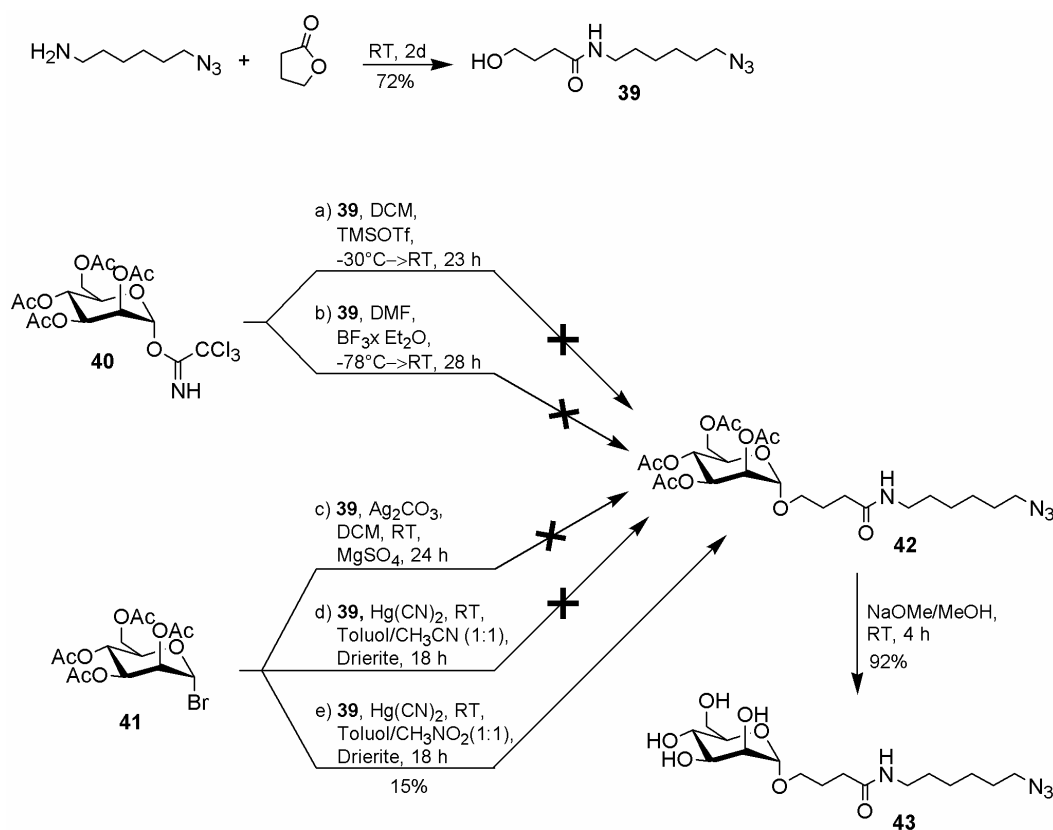


Abbildung 14: Bindung von Cy5-markiertem abIgG-Antikörper an die durch Staudinger-Ligation auf eine Glasoberfläche immobilisierten Verbindungen **37** und **38** (A). Die Histogramme repräsentieren die Signalintensitäten, die durch Quantifizierung der Cy5-Fluoreszenz erhalten wurden. Die Oberflächen können regeneriert werden (B und C).

Verbindung **37** und **38** wurden in absolutem Dioxan/H₂O (2:1) in Konzentrationen 1 mM und 100 μ M untereinander und Verbindung **37** zusätzlich in den Konzentrationen 10 μ M, 1 μ M und 100 nM gespottet (Abbildung 14). Für das Azid-funktionalisierte Biotin **37** wurden Fluoreszenzsignale entsprechend des Konzentrationsgradienten beobachtet, wobei die Nachweisgrenze bei 10 μ M lag. Die Negativkontrolle **38** konnte in keinem Fall nachgewiesen werden; also musste die Anbindung über das Azid stattfinden (Abbildung 15 A). Die Objektträger wurden anschließend mit einer 0.1%igen Natriumdodecylsulfat-Lösung 15 min bei 60°C behandelt, was zu einem sechsfachen Signlrückgang führte (Abbildung 15 B). Erneute Inkubation mit dem abIgG-Cy5 lieferte den Nachweis, dass das Biotin fortwährend auf der Oberfläche anwesend war (Abbildung 15 C). Dabei wurden Fluoreszenzsignale im Bereich der ursprünglichen Intensität erhalten. Bei der Regenerierung der Objektträger wurde also nur die schwächere Biotin-abIgG-Bindung gelöst, während das Biotin durch eine stabile Amidbindung an der Oberfläche gebunden blieb. Dies zeigt prinzipiell, dass durch Staudinger-Ligation hergestellte Mikroarrays für mehrfachen Gebrauch geeignet sein sollten.

Um zu belegen, dass die Immobilisierung durch Staudinger-Ligation nicht nur auf biotinylierte Verbindungen beschränkt ist, wurde das von der Mannose abgeleitete Azid **43** synthetisiert (Schema 13).



Schema 13: Synthese der Azid-funktionalisierten Mannose **43**.

Dazu wurde zunächst 6-Azidohexylamin mit Butyrolacton zum 4-Hydroxybuttersäure(6-azidohexyl)amid **39** umgesetzt. Die Glycosylierung dieses Bausteins an den Mannosebaustein gestaltete sich problematisch. Zunächst wurde sie durch Lewissäure-vermittelte Kupplung an das Acetyl-geschützte Trichloracetimidat der Mannose **40** versucht.^[159,160] Dies führte allerdings nur zu der Hydrolyse des Imidats und lediglich Spuren an Produkt. Die klassische Königs-Knorr-Typ Glycosylierung von Acetobromomannose **41** mittels Silbersalz^[161] lieferte den entsprechenden Orthoester wie auch die Reaktion mit Quecksilbercyanid in Toluol/Acetonitril (1:1). Erst als nach Lee et al. das Lösungsmittel von Acetonitril zu Nitromethan verändert wurde,^[162] konnte das Acetyl-geschützte Mannose-Azid **42** in 15% Ausbeute erhalten werden. Anschließend Entschützung nach Zemplén ergab das gewünschte Mannose-Azid **43** mit 92% Ausbeute.^[163]

Dieses wurde anschließend auf Phosphin-modifizierten Objektträgern wie bereits beschrieben immobilisiert. Unsubstituierte Mannose **44** wurde als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 15). Die der Inkubation über Nacht und dem Waschen mit Wasser und TETBS-Puffer folgende Behandlung mit Alexa-Fluor-647-markiertem Concanavalin A^[164,165] (19.2 μ M) zeigte, dass die Anknüpfung des Mannose-Azids **43** durch Staudinger-Ligation selektiv erfolgte, da die immobilisierte Mannose **43** von dem Concanavalin A erkannt wurde. Bei der Verwendung der nativen Mannose wurden keine Signale beobachtet (Abbildung 16). Die Signalintensität war geringer als bei der zuvor untersuchten Wechselwirkung von Biotin und abIgG, was durch die geringe Bindungsaffinität von dem Lektin zur Mannose begründet ist. Die Nachweisgrenze lag bei 0.5 mM.

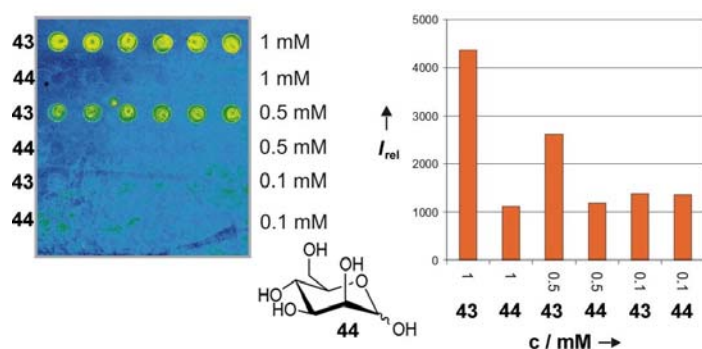
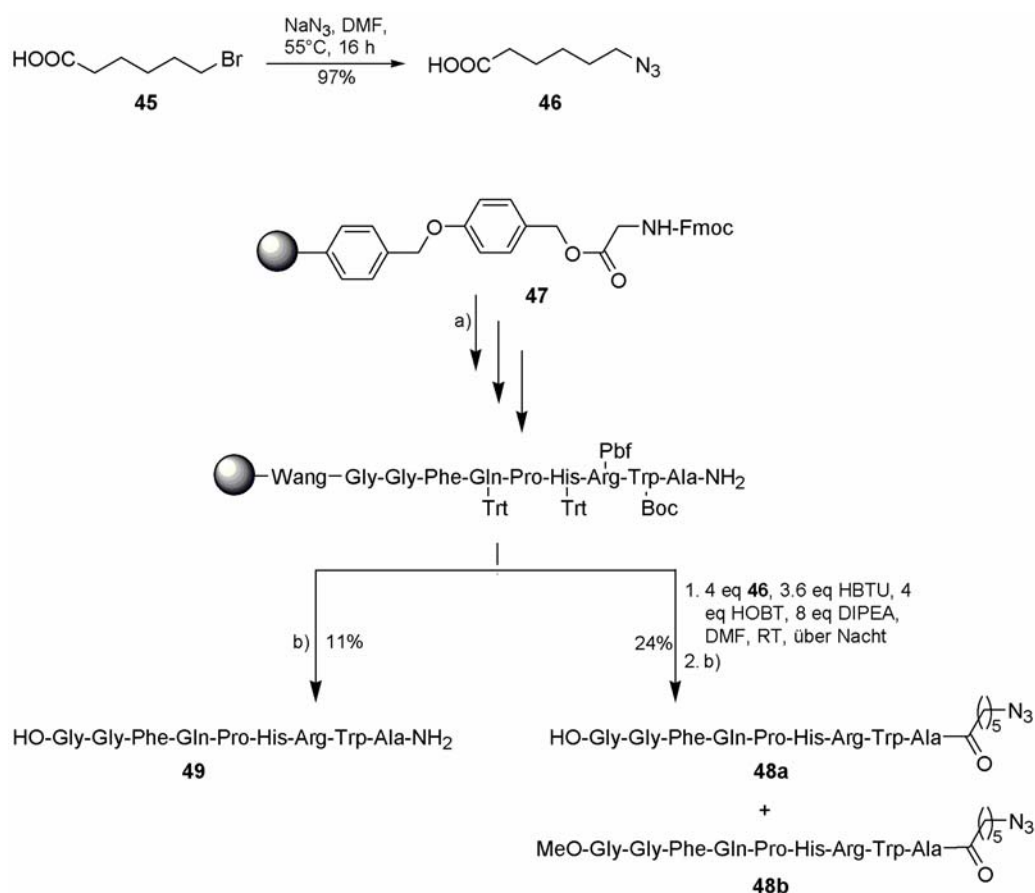


Abbildung 15: Bindung von Alexa-Fluor-markiertem Concanavalin A an die immobilisierten Verbindungen **43** und **44**.

Als einen weiteren Beleg für die Selektivität und Effizienz der Staudinger-Ligation als Kupplungsmethode sollte Strep Tag I, ein Nonapeptid,^[166-168] auf dem Phosphin-modifizierten Glasträger angebunden und mittels STV-Cy5 nachgewiesen werden. Dazu sollten Strep Tag I-Azid **48a** (Schema 14) und Strep Tag I **49** als Negativkontrolle synthetisiert werden. Ausgehend von Glycin-vorbeladenem Wang-Harz **47** wurden die entsprechenden Fmoc-Aminosäuren nach Standard-Fmoc-Kupplungsschemie an das Harz zu dem Nonapeptid geknüpft. Im Falle der

Negativkontrolle **49** wurde danach sauer vom Harz abgespalten, wobei alle Seitenketten-Schutzgruppen ebenfalls entfernt wurden. Das Azid **48a** wurde durch Kupplung der 6-Azidocaprönsäure **46**, welche durch Substitution des Bromids der 6-Bromocaprönsäure **45** mit Natriumazid hergestellt worden war, an das N-terminale Alanin und anschließender saurer Abspaltung vom Harz erhalten. Bei der Aufreinigung wurde das Harz allerdings mit MeOH gewaschen, so dass das Produkt zum Großteil als Methylester **48b** vorlag. Dieser konnte durch präparative HPLC nicht von dem Hauptprodukt getrennt werden.

Die Immobilisierung wurde wie zuvor und die Detektion der Anbindung mit 100 nM STV-Cy5-Lösung durchgeführt. Das Biotin-Azid **37** wurde als Positivkontrolle mit gespottet.



Schema 14: Synthese von Strep Tag I **49** und Strep Tag I-Azid **48a+b**.

- a) Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese (Entschützung, Kupplung, Capping);
 b) TFA, RT, 3.5 h.

Im Gegensatz zu dem Biotin **37** konnten aber weder die Negativkontrolle **49** noch das Strep Tag I-Azid **48a+b** nachgewiesen werden (Abbildung 16). Dies könnte darin begründet sein, dass die Wechselwirkung mit Streptavidin stark von dem freien C-Terminus abhängt^[168] und der Methylester sich somit als Störung erwies. Der Anteil an freier Säure könnte zu gering für eine nachweisliche Bindung des Streptavidin gewesen sein. Eine weitere Ursache könnten die Struktur

und die polaren sowie ionischen Eigenschaften des Nonapeptids sein. Die basischen Seitenketten könnten mit noch vorhandenen freien Carbonsäuren, die für die Funktionalisierung der Oberfläche benötigt wurden (Schema 11), wechselwirken und das Peptid so unzugänglich für das Streptavidin machen.

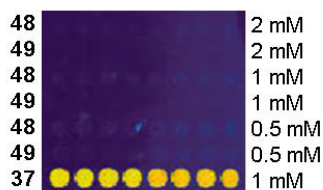
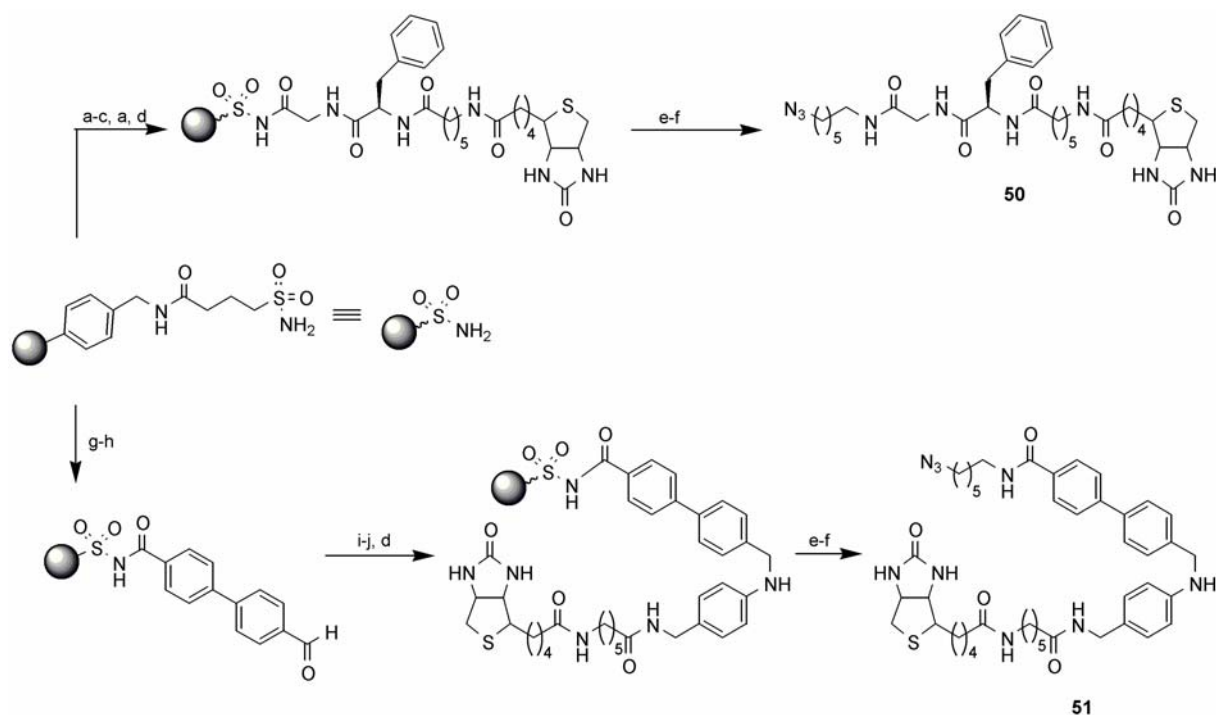


Abbildung 16: Nachweis von Strep Tag I-Azid **48a+b**, Negativkontrolle **49** und Positivkontrolle **37** mit STV-Cy5.

Im nächsten Schritt sollte anhand der Synthese und Immobilisierung zweier Wirkstoff-Modell-Substanzen die Effizienz der Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie illustriert werden. Dazu wurden von C. Peters das biotinylierte Peptidfragment **50** und ein Analogon eines Biphenyl-Antibiotikums^[8] **51** hergestellt (Schema 15).^[154]



Schema 15: Tandem-SPOS der Haptene **50** und **51**. a) Fmoc-Gly-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, 16 h, RT; b) Piperidin/DMF (1:4), 2x10 min, RT; c) Fmoc-Phe-OH, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 1 h, RT; d) Biotin-aca, HBTU, HOBt, DIPEA, 1 h, RT; e) TMS-CHN₂, Hexan/CH₂Cl₂ (1:1), 3 h, RT; f) 6-Azidohexylamin, DMF, 40 °C, DMF, 18 h; g) 4-Iodobenzoesäure, PyBOP, DIPEA, DMF, 16 h, RT; h) 4-Formylphenylboronsäure, Pd(OAc)₂, K₂CO₃, DIPEA, 16 h, 90 °C; i) 4-(N-Boc-Aminomethyl)anilin, NaBH(OAc)₃, Na₂SO₄, AcOH, CH₂Cl₂, 12 h, Ultraschall; j) TFA/CH₂Cl₂ (1:1), RT, 2x10 min. Durchgeführt von C. Peters.^[154]

Diese Verbindungen sind Beispiele für Wirkstoffmoleküle, wie sie für die Festphasensynthese in der Pharmaforschung und in der Chemischen Biologie typisch sind. Die beiden Synthesen umfassten eine Reihe von Reaktionstypen, darunter eine Pd-katalysierte Kreuzkupplung, reduktive Aminierung und Amidbildungen. Die Immobilisierung und das Auslesen der Ergebnisse wurden wie beim Biotin beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zum abIgG-Cy5 wurde mit einer 100 nM Lösung von Cy5-markiertem Streptavidin (STV-Cy5) inkubiert. Neben den Substanzen **50** und **51** wurden das Azid-modifizierte Biotin **37** als Positivkontrolle und, zur Überprüfung der spezifischen Erkennung der immobilisierten Biotin-tragenden Substanzen durch abIgG-Cy5 und STV-Cy5, die Azid-funktionalisierte Mannose **43** gespottet. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 1 mM pipettiert.

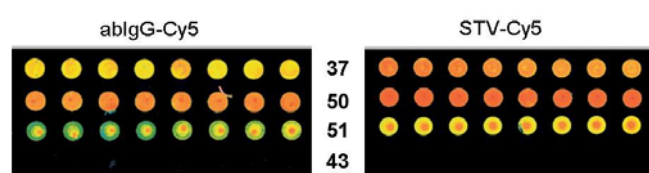


Abbildung 17: Wirkstoff-Arrays mit den Haptenen **50** und **51** (**37** als Positivkontrolle, **43** als Negativkontrolle). Visualisierung mit abIgG-Cy5 und STV-Cy5.

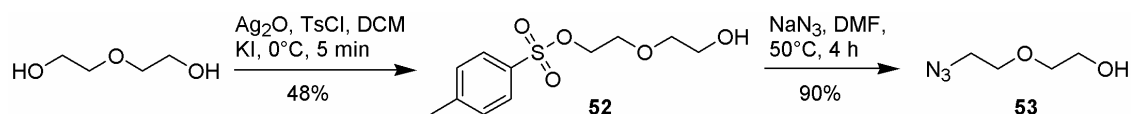
Abbildung 17 zeigt die erhaltenen Fluoreszenzsignale, die eindeutig die spezifische Anknüpfung und die ungestörten Funktionalitäten der Haptenverbindungen belegen. So wurde kein Signal an Stellen erhalten, an welchen die Mannose **43** gespottet worden war, sondern nur dort, wo sich die biotinylierten Verbindungen befanden. Dabei ist zu bemerken, dass die höchste Signalintensität bei dem immobilisierten Peptidfragment **50** erhalten wurde, was möglicherweise mit der besseren Zugänglichkeit des Biotins für das Protein durch die lange Peptidkette zusammenhängen könnte.

Es wurde gezeigt, dass die Staudinger-Ligation unter der Verwendung von 2-Diphenylphosphinophenol-modifizierten Glasträgern eine chemoselektive und effiziente Methode für die Herstellung von Mikroarrays darstellt. Die Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie verbindet die synthetische Effizienz der kombinatorischen Festphasensynthese mit den analytischen Vorteilen der Mikroarrays und eröffnet einen schnellen Zugang zu den zu immobilisierenden Molekülen. Zur Immobilisierung von Peptiden mit polar-protischen Seitenketten sind allerdings weitere Studien notwendig.

4.1.4 Selektivitäts- und Blockierungs-Experimente zur Kupplungsreaktion

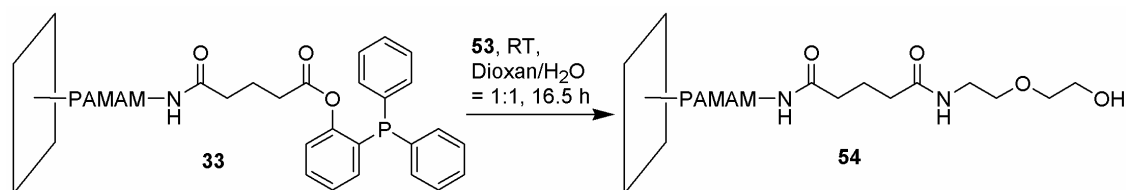
Als weiteren Test zur Anbindung über Staudinger-Ligation sollten die Phosphin-modifizierten Mikroarrays (**33**) mittels eben dieser Reaktion geblockt werden und anschließend mit Biotin-Azid **37** gespottet werden. Dies sollte als zusätzlicher Hinweis zeigen, dass die Moleküle über die

Staudinger-Ligation und nicht durch andere Wechselwirkungen an der Oberfläche angebracht sind. Dazu wurde das Azidoethoxyethanol **53** ausgehend von Diethylenglycol in zwei Stufen synthetisiert (Schema 16).



Schema 16: Synthese des Azidoethoxyethanols **53**.

Verbindung **53** wurde dann mit den Phosphin-funktionalisierten Glaträgern umgesetzt, gewaschen, getrocknet und bis zum Spotten unter Argon aufbewahrt (Schema 17). Die so blockierten Objektträger **54** wurden wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben mit Biotin-Azid **37**, der Negativkontrolle **38**, Biotin und Aminobiotin (von Chimera Biotec) bespottet, mit Wasser und TETBS-Puffer gewaschen, mit abIgG-Cy5 inkubiert und die Ergebnisse fluoreszenzspektroskopisch ausgelesen (Abbildung 18A).



Schema 17: Blockierung der Phosphin-modifizierten Objektträger **33** mit Azidoethoxyethanol **53**.

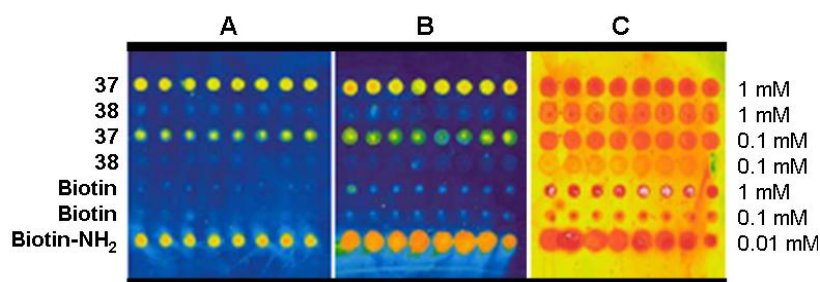


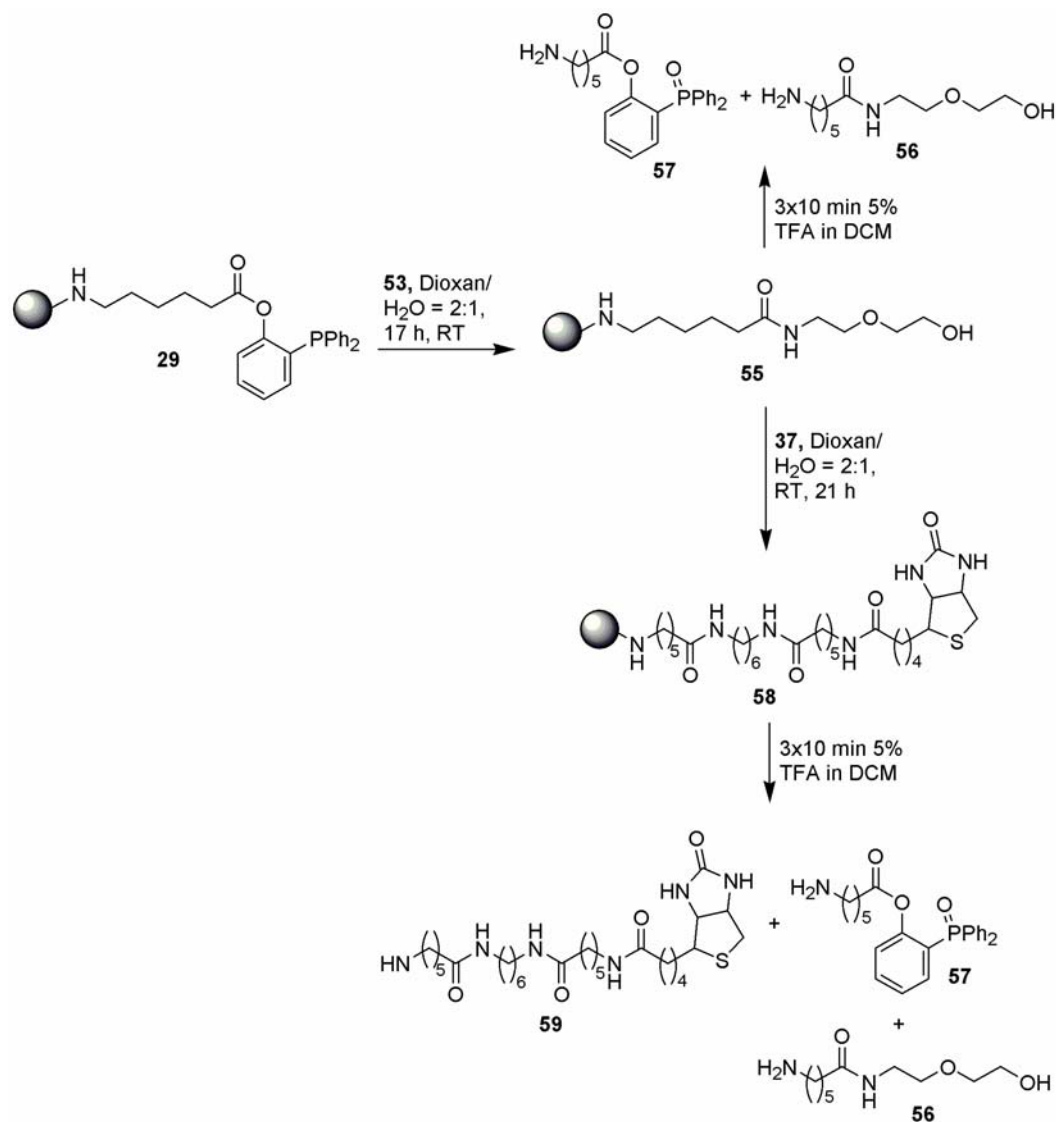
Abbildung 18: Nachweis von Biotin-Azid **37**, Negativkontrolle **38**, Biotin und Aminobiotin mit abIgG-Cy5 auf verschiedenen Oberflächen. A: Oberfläche **54**; B: Oberfläche **33**; C: Dendrimer-beschichtete Epoxid-modifizierte Oberfläche (Chimera Biotec).

Trotz der Blockierung der Oberfläche wurde ein Signal als Nachweis für das Biotin-Azid **37** detektiert. Es war aber festzustellen, dass dieses Signal wesentlich geringer als dasjenige der unblockierten Oberfläche ist (Abbildung 18B), so dass eine unvollständige Blockierung wahrscheinlich erscheint. Biotin konnte in keiner Konzentration detektiert werden, was wiederum für die Selektivität der Kupplungsreaktion spricht. Das Aminobiotin jedoch erzielte in

einer 10fach geringeren Konzentration auf beiden Oberflächen (**33** und **54**) ein höheres Signal als das Biotin-Azid **37**, so dass anzunehmen ist, dass der Phosphinester als Aktivester mit primären Aminen reagiert. Das Fluoreszenzsignal war im Fall der blockierten Oberfläche (**54**) wie zuvor beim Biotin-Azid geringer, was wiederum für eine unvollständige Blockierung der Oberfläche spricht, da durch die Staudinger-Ligation der Aktivester durch eine stabile Amidbindung ersetzt wurde.

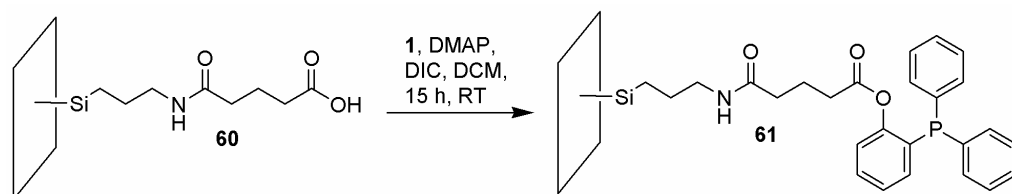
Weiterhin wurden Epoxid-funktionalisierte Dendrimer-überzogene Oberflächen der Firma Chimera Biotec zu einem Selektivitätsvergleich herangezogen (Abbildung 18C). Beim Auslesen der Signale fällt auf, dass alle Substanzen an die Oberfläche binden und somit eine unselektive Form der Kupplung vorliegt. Allerdings sind die Fluoreszenzsignale höher ($I_{\text{rel}} = \sim 38000$ bei 1mM Biotinazid **37**, gemittelt über den ganzen Spot) als bei dem entsprechenden Phosphin-funktionalisierten Träger (Abbildung 19B; $I_{\text{rel}} = \sim 7000$ bei 1 mM Biotinazid **37**, gemittelt über den ganzen Spot), was auf eine höhere Bindungseffizienz schließen lässt. Durch die hohe Reaktivität der Epoxide entsteht aber ein wesentlich höherer Hintergrund, der das Signal-zu-Hintergrundverhältnis wieder herabsetzt (Abbildung 19C: $\sim 6:1$ bei 1 mM, im Vergleich zu Abbildung 19B: $\sim 47:1$ bei 1 mM). Somit kann durch die höhere Bindungseffizienz kein Vorteil erzielt werden.

Die Vermutung der unvollständigen Blockierung sollte anhand der Ligation an der Festphase bestätigt werden. Es wurde der Festphasen-gebundene Phosphinoester **29** (Kapitel 4.1.2) mit dem Azidoethoxyethanol **53** wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben einer Staudinger-Ligation unterzogen. In einer anschließenden Testabspaltung wurde das Produkt **56** in geringem Maße im HPLC-ESI detektiert. Der Hauptbestandteil der Fraktion bestand allerdings aus dem oxidierten Phosphinoester **57** (Schema 18). Das restliche Harz **55**, welches unter Argon verwahrt worden war, wurde wiederum einer Staudinger-Ligation mit dem Biotin-Azid **37** unterworfen (Schema 18). Nach der Abspaltung vom Harz konnte das Produkt **59** dieser Ligation detektiert werden, wobei das Produkt **56** aus der vorherigen Reaktion und das biotinylierte **59** laut Massendetektor in einem Verhältnis von ca. 2:1 vorlagen und der Hauptbestandteil wieder der oxidierte Phosphinoester **57** war. Somit konnte die Vermutung der unvollständigen Blockierung bestätigt werden.



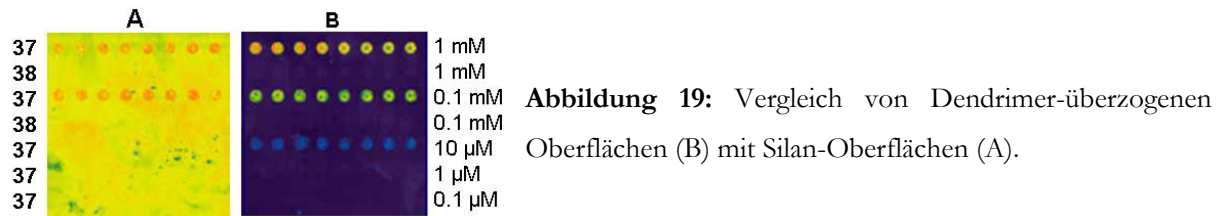
Schema 18: Blockierungsexperiment an fester Phase.

Es sollte weiterhin die Notwendigkeit der Anwesenheit der Dendrimere auf der Oberfläche überprüft werden. Dazu wurde ein Glasträger, der mit Aminosilan und darauf folgend mit Glutarsäureanhydrid modifiziert worden war (Chimera Biotec), mit Phenolphosphin **1** wie zuvor für Oberfläche **33** beschrieben funktionalisiert (Schema 19).



Schema 19: Funktionalisierung von Carbonsäure-modifizierten Silan-Oberflächen mit Phenolphosphin **1**.

Biotin-Azid **37** und die Negativkontrolle **38** wurden darauf in einem Konzentrationsgradient gespottet. Die Glaträger wurden über Nacht inkubiert, mit TETBS-Puffer und Wasser gewaschen und die Anwesenheit von **37** und **38** mit 100 nM abIgG-Cy5 detektiert.



Wie in Abbildung 19 deutlich erkennbar ist, wurde nach der Inkubation der Silan-Oberfläche (19A) ein wesentlich höherer Hintergrund als mit den Dendrimer-Oberflächen (19B) erhalten. Auch sind die Signale unregelmäßig und unscharf. Ein Unterschied in der Signalintensität der ersten beiden Konzentrationen des Biotin-Azids **37** ist nicht ersichtlich und die dritte Konzentration von 10 μ M konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Dies zeigt eindeutig, dass Dendrimer-überzogene Oberflächen eine höhere Qualität bezüglich der Schärfe und Intensität der Spots sowie des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses ermöglichen.

4.2 Entwicklung eines Mikroarrays zur Bestimmung der Substratspezifität von Protein Tyrosin Phosphatasen

4.2.1 Das Konzept

Das Konzept zur Herstellung eines Mikroarrays zum Erkennen der Substratspezifitäten von PTPs sollte auf einem möglichst schnellen Zugang zu den Substraten in Verbindung mit der Herstellung des Arrays beruhen. Außerdem sollte eine simple Prozedur zur Detektion bevorzugter Substrate entwickelt werden.

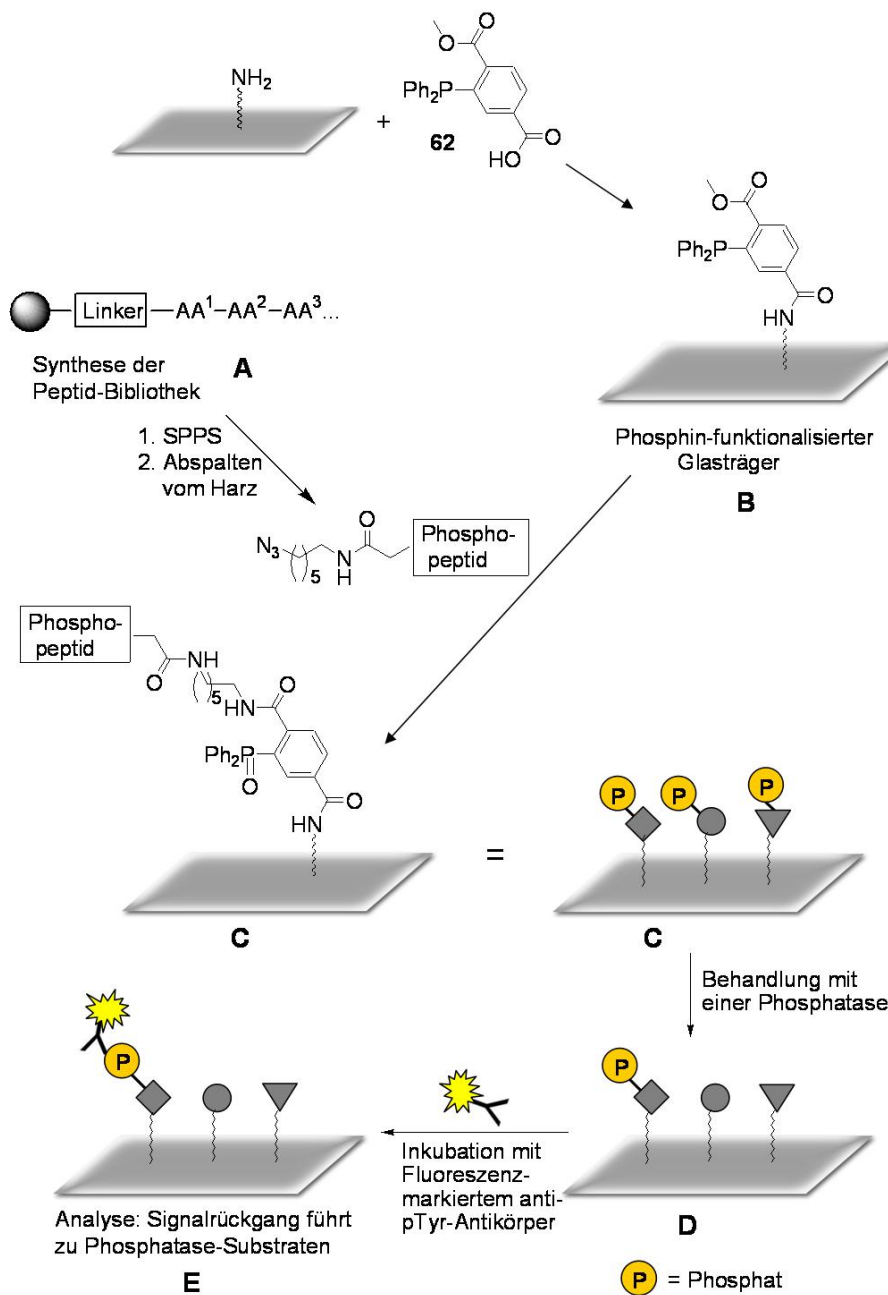


Abbildung 20: Konzept zur Herstellung und Methodik eines Mikroarrays zum Erkennen der Substratspezifitäten von PTPs.

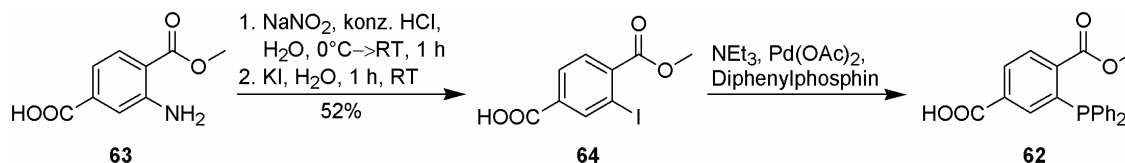
Das entwickelte Konzept geht von der erfolgreich durchgeführten Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie (Kapitel 4.1.1 und 4.1.3) aus. Wie in Abbildung 20 zu sehen, wird zunächst eine Phosphopeptid-Bibliothek an fester Phase synthetisiert (20A). Nach dem Abspalten vom Harz und anschließender Aufreinigung werden die Peptide ohne weitere Aktivierung ortsaufgelöst auf einem Phosphin-funktionalisierten Objektträger (20B) immobilisiert. So wird ein schneller Zugang zu dem Mikroarray (20C) realisiert. Der Substrat-Mikroarray wird anschließend mit der interessierenden Phosphatase inkubiert (20D), gewaschen, mit einem Fluoreszenz-markiertem anti-pTyr-Antikörper behandelt und wieder gewaschen (20E). Gleichzeitig wird ein Kontroll-Array an Stelle der Phosphatase nur mit einer Puffer-Lösung inkubiert, gewaschen, ebenfalls mit dem Fluoreszenz-markierten anti-pTyr-Antikörper behandelt und wieder gewaschen. Bevorzugte Substrate werden im Vergleich mit dem Kontroll-Mikroarray durch kein oder ein niedrigeres Signal angezeigt, während Peptide, die keine Substrate sind, keine Veränderung in der Signalintensität zeigen. So ist ein simples Verfahren zur Detektion gewährleistet.

In den Kapiteln 4.1.3 und 4.1.4 waren Probleme bei der Selektivität der Staudinger-Ligation mit dem Phosphin **1** bezüglich Aminogruppen und auch bei dem Nachweis von Peptid **48** auf den verwendeten Oberflächen aufgetreten. Außerdem war von Liskamp et al. berichtet worden, dass Aminogruppen von Lysin-Seitenketten bei der Staudinger-Ligation mit Phosphin **1** in einer Nebenreaktion zu einer Amidbindung reagieren.^[169] Daher sollte hier das von Bertozzi et al.^[87] eingeführte Phosphin **62** (Abbildung 20) verwendet werden, welches schon bei der Staudinger-Ligation an Zelloberflächen^[87] und *in vivo*^[95] gute Chemoselektivität bewiesen hatte. Das Phosphin **62** wurde deswegen zunächst mittels Test-Ligationen untersucht (Kapitel 4.2.2).

4.2.2 Optimierung der Selektivität und der Effektivität der Staudinger-Ligation zur Immobilisierung von Peptiden auf Glasoberflächen

Die Synthese des Phosphins **62** ging von 2-Aminomonomethylterephthalat **63** aus (Schema 20). Die Nitrosierung des primärenamins im stark sauren Medium führt zur Bildung des entsprechenden Aryl-Diazonium-Ions. Dieses reagierte anschließend bei der Zugabe von Kaliumiodid zum 2-Iodomonomethylterephthalat **64**, welches mit Palladiumacetat, Triethylamin und Diphenylphosphin unter streng inerten Bedingungen weiter umgesetzt wurde. Allerdings gestaltete sich diese Reaktion problematisch, da die in der Literatur beschriebenen Bedingungen^[87] nur zu unvollständiger oder gar keiner Umsetzung führten (Tabelle 3, Eintrag 1 und 2). Es wurden Palladium-Katalysatoren verschiedener Firmen eingesetzt, mit denen aber kein Produkt erhalten wurde. Die Erhöhung der Temperatur auf 80°C und die Änderung des Lösungsmittels zu Acetonitril lieferte kein Produkt (Tabelle 3, Eintrag 3). Erst bei 120°C und in

DMF wurde das Phosphin **62** reproduzierbar mit mindestens 60% Ausbeute erhalten (Tabelle 3, Eintrag 4).



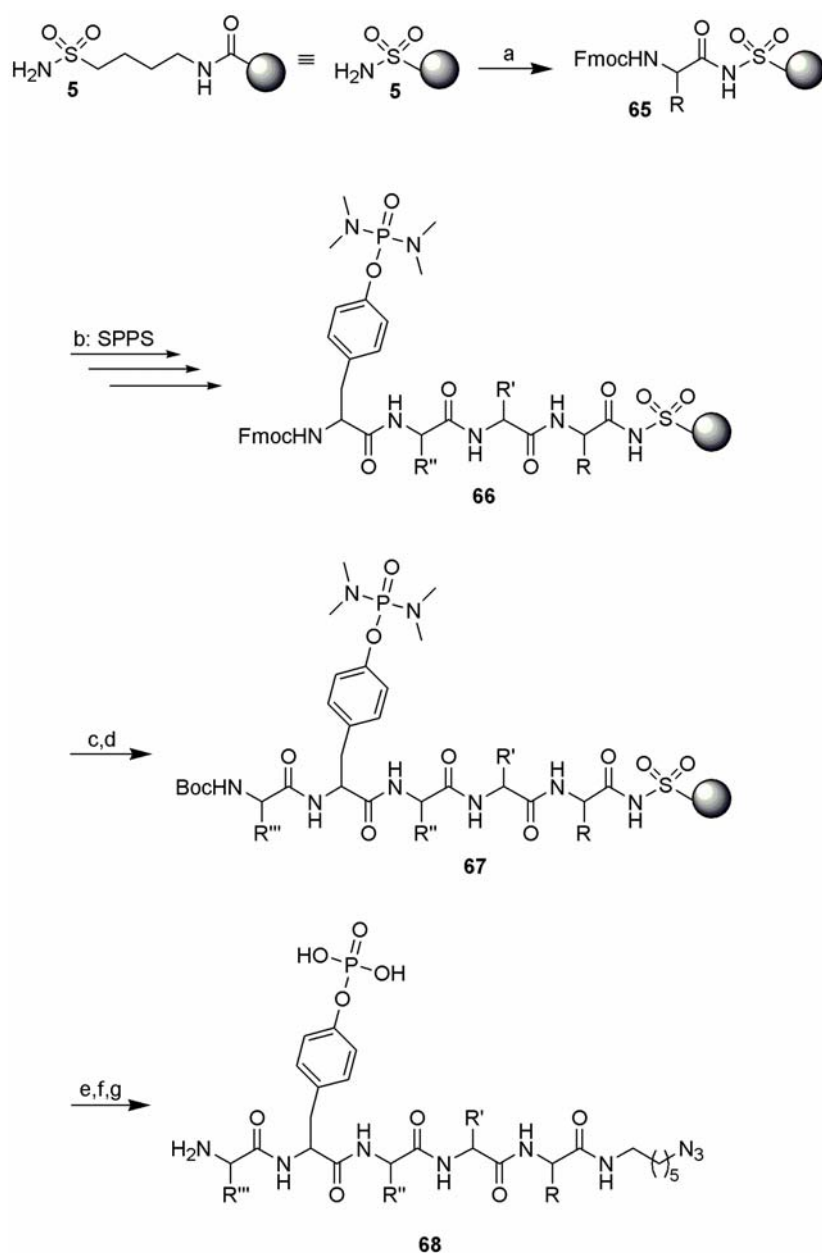
Schema 20: Synthese des Phosphins **62**.

Eintrag	Lösungsmittel	Temperatur	Ausbeute
1	abs. MeOH	65°C	19% Umsatz (¹ H-NMR), nicht trennbar
2	abs. MeOH	65°C	60%, teils oxidiert, nicht rein
3	abs. CH ₃ CN	80°C	0%
4	abs. DMF	120°C	64%

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Palladium-vermittelten Kupplung von Diphenylphosphin an **64**.

Für die Staudinger-Testligationen in Lösung sollte zum einen Azidoessigsäurebenzylester **14** verwendet und zum anderen ein Phosphopeptid, wie es für den Mikroarray eingesetzt werden würde, synthetisiert werden. Das Syntheschema für die Herstellung der Phosphopeptide mittels Festphasensynthese ist in Schema 21 dargestellt. Der Sulfamylbutyryl-Linker **5** wurde nach Ellman et al.^[170] bei -20°C mittels PyBOP und einer entsprechenden Aminosäure **65** innerhalb von 8 h beladen. Es wurde an dieser Stelle auch versucht, die Beladung mittels DIC und *N*-Methylimidazol in DMF/DCM (1:1) bei RT durchzuführen.^[171] Nach der Kupplung von weiteren drei Aminosäuren und der Abspaltung des Tetrapeptids vom Harz wurde aber mittels HPLC racemisiertes Produkt detektiert. Dies war bei einem Peptid mit gleicher Aminosäuresequenz, welches mittels der vorigen Beladungsbedingungen synthetisiert worden war, nicht der Fall. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Beladung bei Raumtemperatur mit *N*-Methylimidazol zur Racemisierung der Aminosäure **65** führte. So wurde das Sulfamylbutyryl-Harz im Folgenden immer mittels den von Ellman et al.^[170] beschriebenen Bedingungen beladen. Die Peptid-Festphasensynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis) wurde mit Fmoc-Aminosäuren, HBTU, HOBt und DIPEA in DMF durchgeführt (Schema 22).^[172] Nur zur Anknüpfung von Fmoc-pTyr **69** wurde an Stelle von HBTU PyBOP verwendet,^[173] da die Anbindung mit HBTU kein gutes Ergebnis lieferte. Als letzte N-terminale Aminosäure in der Synthese wurde eine Boc-Aminosäure unter den gleichen Bedingungen wie die Fmoc-Aminosäuren angekuppelt. Grund dafür war die nach der Abspaltung folgende Entschützung der Seitenketten, die wegen der Fmoc-Strategie alle säurelabil geschützt waren. Bei Verwendung der

Boc-Schutzgruppe im letzten Schritt vor der Abspaltung konnte die Entfernung aller Schutzgruppen in einem Schritt geschehen.

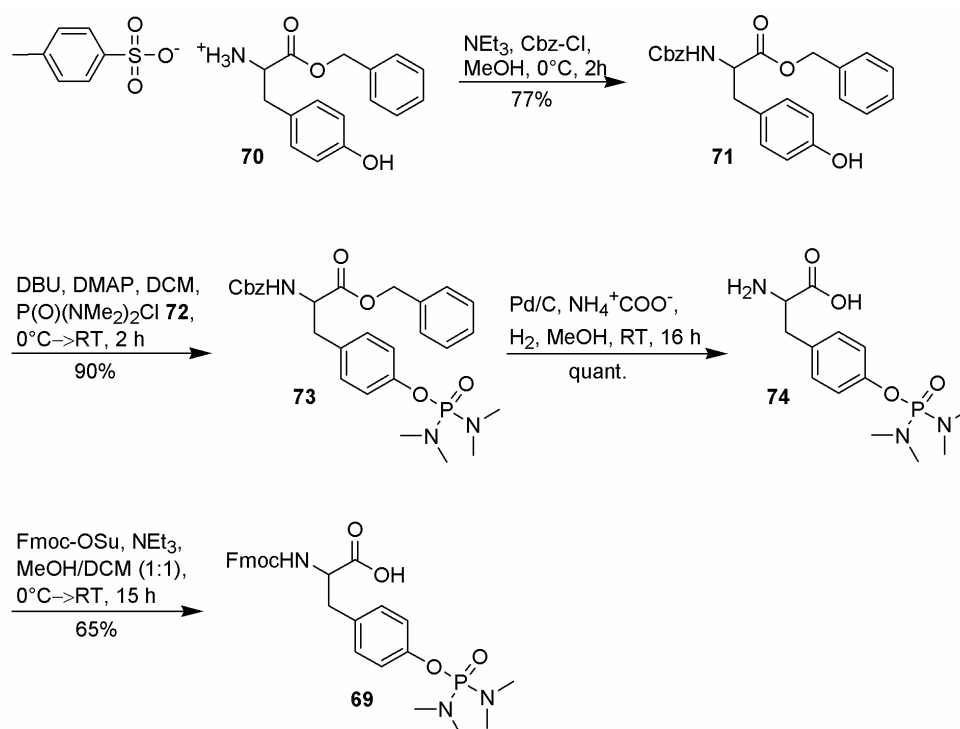


Schema 21: Syntheschema zur Phosphopeptid-Bibliothek-Herstellung. a: 3 Äq Fmoc-Aminosäure, 5 Äq DIPEA, 3 Äq PyBOP, CHCl₃, -20°C, 8 h; b: Fmoc-SPPS: 4 Äq Fmoc-Aminosäure, 4 Äq HOBT, 3.6 Äq HBTU, 8 Äq DIPEA, DMF, 3 h oder 3.5 Äq Fmoc-pTyr **69**, 3.5 Äq HOBT, 3.5 Äq PyBOP, 7 Äq DIPEA, DMF, 4 h und Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF, 2x20 min; c: 20% Piperidin in DMF, 2x20 min; d: 4 Äq Boc-Aminosäure, 4 Äq HOBT, 3.6 Äq HBTU, 8 Äq DIPEA, DMF, 3 h; e: 30 Äq ICH₂CN, 5 Äq DIPEA, NMP, 24 h; f: 7.5 Äq 6-Azidohexylamin (**36**), THF, 18 h; g: TFA/DCM/TES (95:2.5:2.5), 3 h, dann Wasser (1:1, v/v), 21 h, 5-52% über alle Stufen.

Zur Abspaltung wurde der Kenner-Linker zunächst mit Iodacetonitril im Dunkeln aktiviert, und das Peptid dann mit 6-Azidohexylamin (**36**) vom Harz abgespalten (s. auch Kapitel 4.1.1).

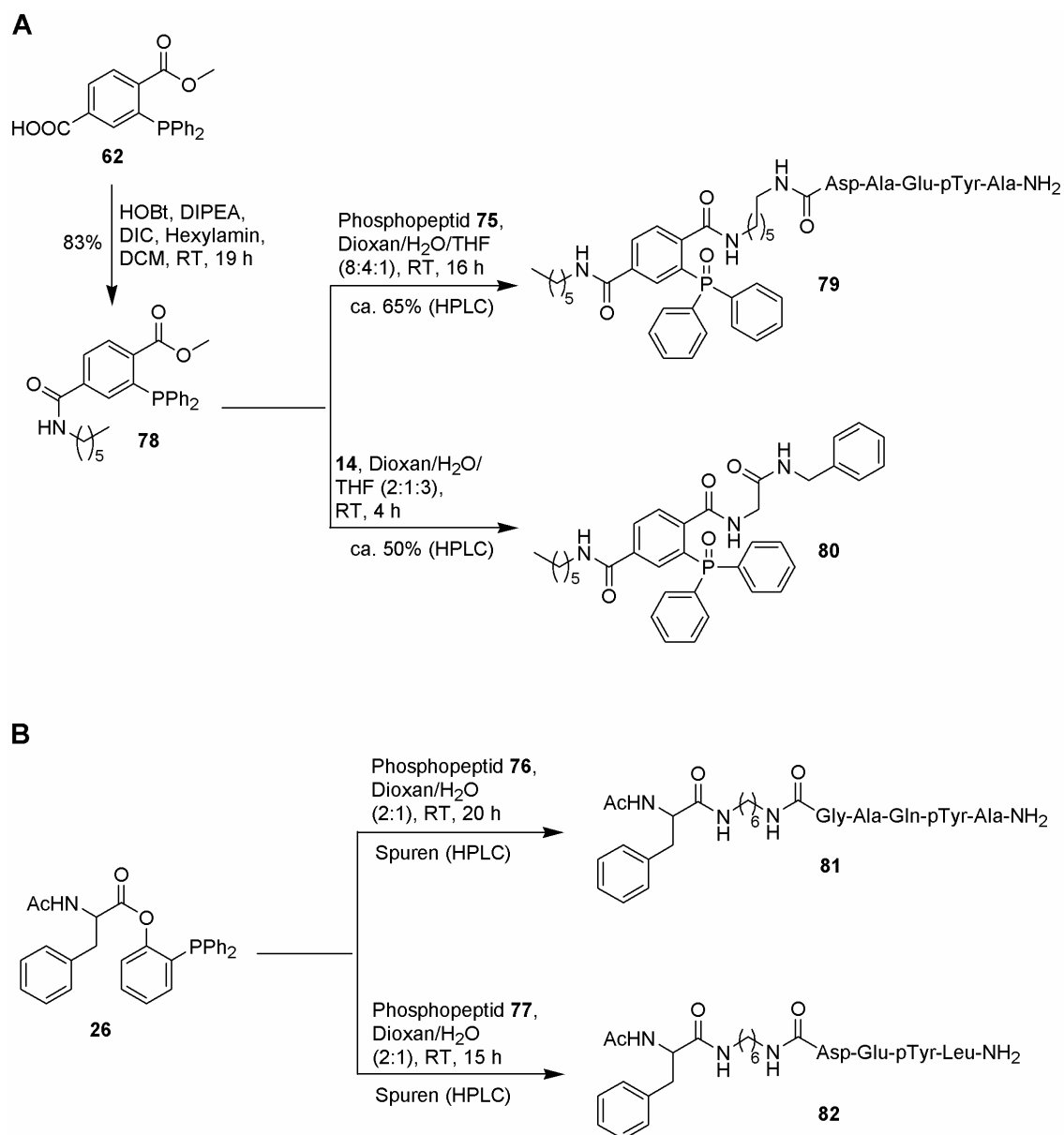
Das pTyr wurde wie oben erwähnt mittels des Bausteins **69** in das Peptid eingeführt (Schema 22). Dieser war zuvor ausgehend von dem Benzyl-geschützten Tyrosin **70** synthetisiert worden.^[174] Das Amin des Tyrosins **70** wurde mit der Benzyloxycarbonyl-Gruppe geschützt^[175] und anschließend wurde die freie Hydroxyfunktion mit Phosphorsäurebisdimethylamidochlorid **72** unter basischen Bedingungen zum Phosphorsäureester **73** umgesetzt. Wegen der basischen Bedingungen war es nicht möglich, direkt vom Fmoc-geschützten Tyrosin auszugehen. Darauf

folgte die Abspaltung beider Schutzgruppen mittels Pd/C unter Wasserstoffatmosphäre. Die Abspaltung geschah aber wenn überhaupt nur unvollständig und es wurde eine Mischung aus Edukt **73** und dem Amino-entschützten Tyrosin erhalten. Auch durch die Verwendung eines Autoklaven und verschiedener Chargen Pd/C sowie Pt/C konnte dieses Resultat nicht verbessert werden. Erst der Zusatz von Ammoniumformiat zur Pd/C katalysierten Hydrierung unter Wasserstoffatmosphäre lieferte das entschützte Tyrosin **74**. Dieses wurde anschließend mit Fmoc-OSu zum Baustein **69** umgesetzt. Die Aufreinigung über eine Silicagel-Säule gestaltete sich aufgrund der Polarität des Bausteins **69** schwierig, so dass die Ausbeute von 65% nicht verbessert werden konnte. Eine versuchte Kristallisation erbrachte nur nicht umgesetztes Fmoc-OSu.



Schema 22: Synthese des Fmoc-pTyr-Bausteins **69**.

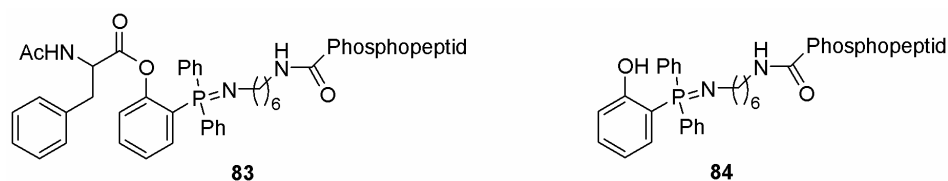
Die so synthetisierten, für die Staudinger-Testligationen verwendeten Phosphopeptide waren H₂N-Ala-pTyr-Glu-Ala-Asp-Azidohexylamid (**75**), H₂N-Ala-pTyr-Gln-Ala-Gly-Azidohexylamid (**76**) und H₂N-Leu-pTyr-Glu-Asp-Azidohexylamid (**77**) (Schema 23). Für die Testligationen in Lösung wurde das Phosphin **62** zur Nachahmung des Linkers, der bei der Bindung an die Glasoberfläche verwendet werden würde, mit Hexylamin umgesetzt. Schema 23A zeigt die Ergebnisse der Staudinger-Ligationen mit der Phosphin-Verbindung **78**. Alle Ligationen wurden unter Argon und mit Argon-gesättigten Lösungsmitteln durchgeführt. Zu dem vorher etablierten Lösungsmittelgemisch Dioxan/H₂O (2:1) (Kapitel 4.1) musste aufgrund der Schwerlöslichkeit des Phosphins **78** noch abs. THF hinzugefügt werden.



Schema 23: A: Staudinger-Testligationen mit dem nicht-spurlosen Phosphin **62**; B: Staudinger-Testligationen mit dem in Kapitel 4.1 etablierten Phosphin **1** als Verbindung **26** zum Vergleich.

Im Falle der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation war eine Abschätzung der Ausbeute mittels HPLC-ESI möglich, da Edukt und Produkt in ihren spektroskopischen Eigenschaften bei 280 nm, durch die Anwesenheit der Phenylgruppen, ausreichende Ähnlichkeit aufwiesen. Die Testligation des Phosphins **78** mit der Verbindung **14** lieferte schon nach 4 h eine Ausbeute von ca. 50%. Dieses Ergebnis ließ eine deutlich bessere Effektivität der Reaktion im Vergleich zu der in Kapitel 4.1.2 durchgeführten mit Phosphin **1** erkennen. Die Reaktion der Phosphin-Verbindung **78** mit dem Phosphopeptid **75** verlief in einer guten Ausbeute von ca. 65% nach 16 h. Da keine Nebenprodukte detektiert wurden, konnte von einer guten Chemoselektivität der Staudinger-Ligation mit Phosphin **62** ausgegangen werden. Um auch hier einen Vergleich zum

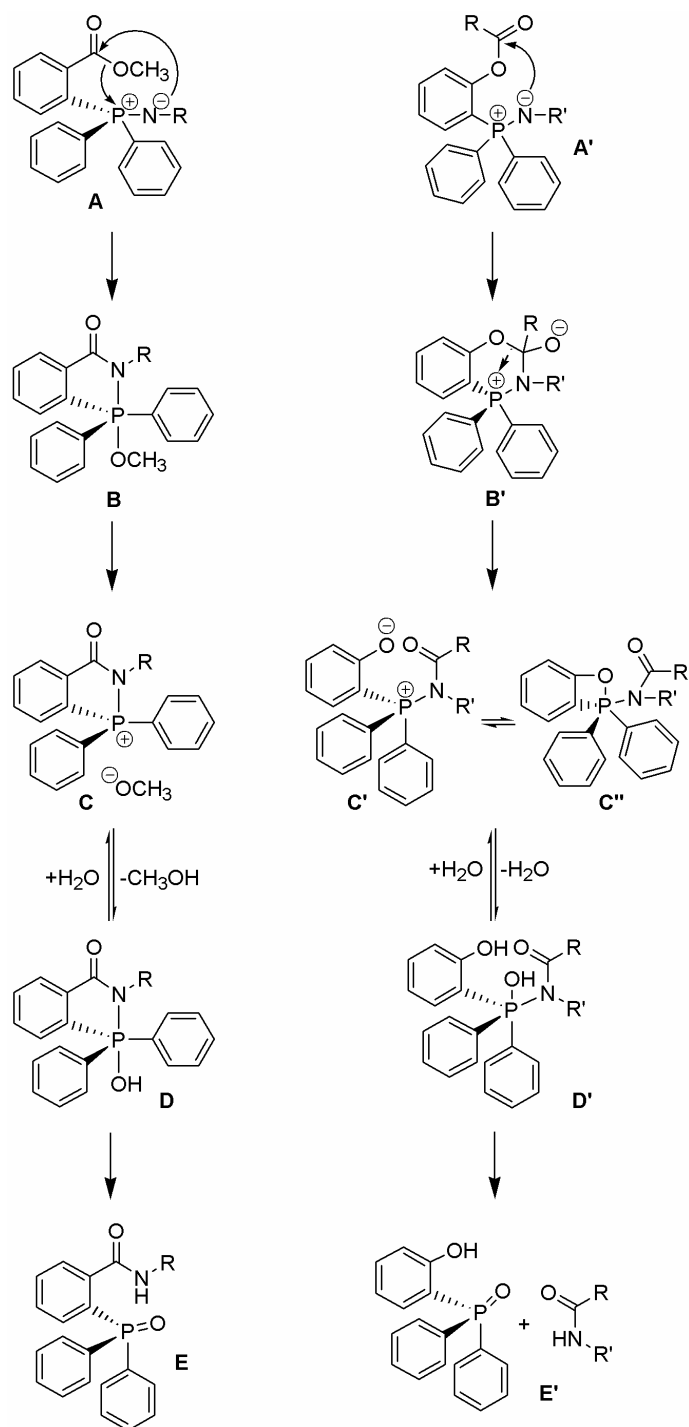
vorher verwendeten spurlosen Phosphin **1** zu erlangen, wurde die Verbindung **26**, welche schon in Kapitel 4.1.2 zu Testligationen verwendet worden war, mit den Phosphopeptiden **76** und **77** umgesetzt. Es wurden hier andere Phosphopeptide als bei der Reaktion mit der Verbindung **78** eingesetzt, da nur wenig Substanz vorhanden war und weitere Versuche mit ihnen durchgeführt werden sollten. Allerdings waren die Eigenschaften der Peptide durch sehr ähnliche Aminosäuresequenzen analog und daher der Vergleich zulässig. Bei beiden Testligationen, die in Schema 23B gezeigt sind, konnten nur Spuren der erwarteten Produkte **81** und **82** mittels HPLC-ESI nachgewiesen werden. Weiterhin wurde zum Teil oxidiertes Phosphin **1** detektiert, was auf die Hydrolyse des Phenylesters **26** schließen ließ. Außerdem wurden die Massen des Iminophosphorans **83** und des hydrolysierten Iminophosphorans **84** gefunden (Schema 24). Das deutet darauf hin, dass die Reaktion zum Aza-Ylid, der ersten Stufe der Staudinger-Ligation (s. Kapitel 2.3.1), im geringen Maße abläuft. In der Literatur wurde beschrieben,^[91] dass die Weiterreaktion des Aza-Ylids zum Staudinger-Ligationsprodukt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist, wofür auch diese Beobachtungen sprechen.



Schema 24: Nebenprodukte, deren Massen bei der spurlosen Staudinger-Ligation mit Phosphin **1** detektiert worden sind.

Die Hauptbestandteile der Produktmischungen waren die Phosphopeptide **76** und **77**, welche nicht regiert hatten. Die entsprechenden Nebenprodukte durch Aminolyse des Phenylesters durch den freien N-Terminus konnten nicht detektiert werden. Diese Resultate lassen den Schluß zu, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Hydrolyse des Phosphin-haltigen Phenylesters **26** schneller als die Staudinger-Ligation, und diese wiederum schneller als die Aminolyse abläuft.

Grund für die langsame Reaktion vom Aza-Ylid zum spurlosen Staudinger-Ligationsprodukt könnte die Rigidität des Rückgrats sein. Das bedeutet, dass bei der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation die Struktur des fünfgliedrigen Übergangszustands bezüglich der Winkel schon vorgebildet ist (Schema 25, A und B), während die Phenylester-Bindung frei drehbar ist und so die Winkel variieren (s. Schema 24 verglichen mit Schema 25, A' und B'). Außerdem könnte der angenommene sechsgliedrige Übergangszustand (Schema 25, B') einen negativen Einfluss bezüglich der Reaktionskinetik haben, dessen Platz bei der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation eine fünfgliedrige isolierbare Zwischenstufe einnimmt (Schema 25, B).^[91]

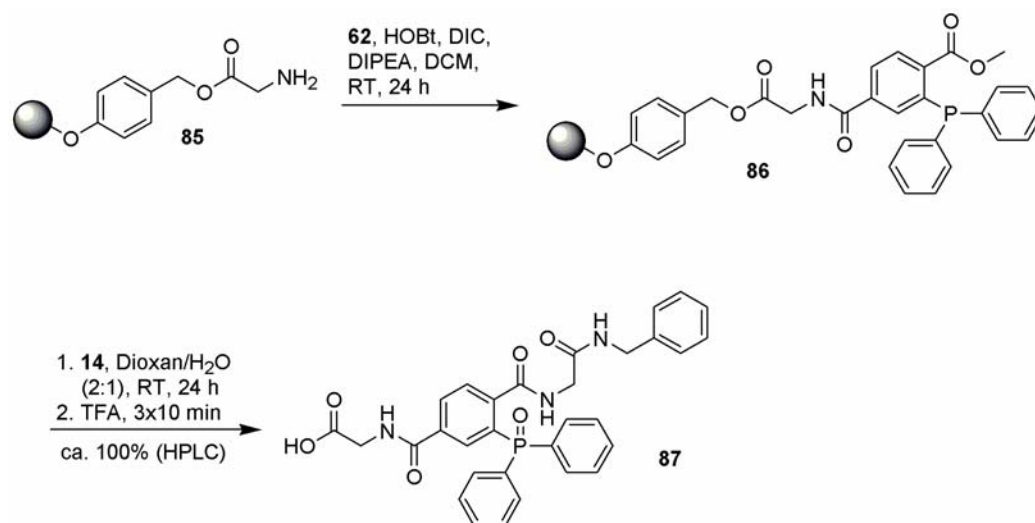


Schema 25: Mechanismus der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation im Vergleich zu dem angenommenen Mechanismus der spurlosen Staudinger-Ligation.

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Bindungseffizienzen der beiden Phosphine bei der Staudinger-Ligation liefert die genauere Betrachtung des Mechanismus. Beim Angriff des Aza-Ylid-Stickstoffs bei der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation (Schema 25, A und B) wird die Methoxygruppe des Esters auf das oxophile Phosphonium-Ion übertragen^[91] und liefert somit eine Triebkraft zur Weiterreaktion. Der entsprechende Schritt wäre bei der spurlosen Staudinger-Ligation durch die Spannung des entstehenden, zum Benzolring annelierten viergliedrigen Ringes stark erschwert (Schema 25, B' und C''). Wenn die Übertragung von

Alkoholat auf das Phosphonium-Ion aus dem genannten Grunde nicht stattfindet (Schema 25, C'), dann fehlt auch die entsprechende Triebkraft zur Weiterreaktion. So würde durch die fehlende Triebkraft der ohnehin geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion noch verlangsamt werden.

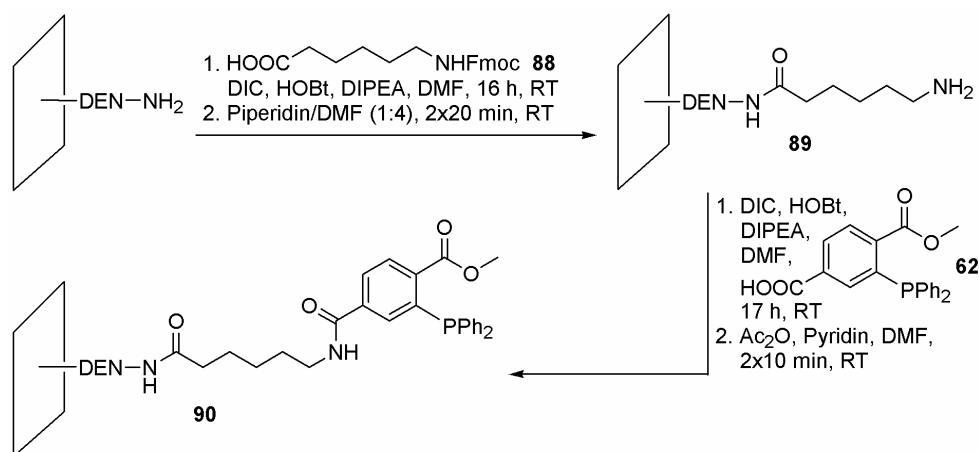
Somit ergaben die Testligationen in Lösung in erklärbarer Weise eine wesentlich bessere Kupplungseffizienz für das Phosphin **62** verglichen mit dem Phosphin **1**, gepaart mit einer guten Chemoselektivität. Um sicher zu gehen, dass die gute Kupplungseffizienz auch an fester Phase erreicht wird, wurde das Phosphin **62** an mit Glycin-vorbeladenes Wang-Harz **85** gekuppelt und einer Staudinger-Ligation mit Azidoessigsäurebenzylester **14** unterzogen (Schema 26). Nach der Kupplung an das Harz wurde in einer Testabspaltung die Anwesenheit des Glycinamido-Phosphins **86** mittels HPLC-ESI nachgewiesen. Die Staudinger-Ligation gelang nahezu quantitativ, beruhend darauf, dass die Masse des Glycinamido-Phosphins **86** im HPLC-ESI nicht mehr, dafür aber das Produkt **87** nachgewiesen werden konnte. Auch abgespaltenes oxidiertes Edukt **86** wurde nicht detektiert.



Schema 26: Nicht-spurlose Staudinger-Ligation an fester Phase.

Durch die Verwendung des Phosphins **62** konnte die Staudinger-Ligation in Lösung und am polymeren Träger wesentlich optimiert werden, so dass zur Immobilisierung von Peptiden an Glasoberflächen nun gute Voraussetzungen bestanden. Zusätzlich sollte aber anhand der Immobilisierung eines Proteins die Selektivität der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation überprüft werden. Aufgrund der zahlreichen vorhandenen funktionellen Gruppen am Protein würde so die überragende Chemoselektivität und Bioorthogonalität eindeutig demonstriert werden.

Die Herstellung der dazu benötigten Phosphin-funktionalisierten Glasträger **90** ist in Schema 27 dargestellt. Um Abstand zwischen den Dendrimer-Schichten und dem Phosphin zu erlangen, wurde der Linker **88** an die Aminofunktionen der Dendrimere gekuppelt. Anschließend wurde die Fmoc-Gruppe mit Piperidin/DMF (1:4) abgespalten und das Phosphin **62** unter inerten Bedingungen an die freien Amine angeknüpft. Um keine störenden polaren bzw. ionischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu erhalten, wurden nach der Kupplung des Phosphins die freien Aminofunktionen, die möglicherweise nicht mit dem Phosphin reagiert hatten, mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zu Acetylamiden umgesetzt.



Schema 27: Funktionalisierung der Dendrimer-überzogenen Glasträger **89** mit dem Phosphin **62**; DEN = Dendrimer.

Zur Protein-Immobilisierung stand das von A. Watzke durch Semisyntese hergestellte Azid-modifizierte $^{1-181}\text{N-Ras}$ -Protein **91** zur Verfügung (Abbildung 21A).^[176] Als Negativkontrolle (NK) zur selektiven Immobilisierung diente nicht-modifiziertes N-Ras. Zum Nachweis wurde Cy5-markierter anti-Ras-Antikörper verwendet. Dieses Experiment wurde von Dr. A. Watzke durchgeführt.^[176]

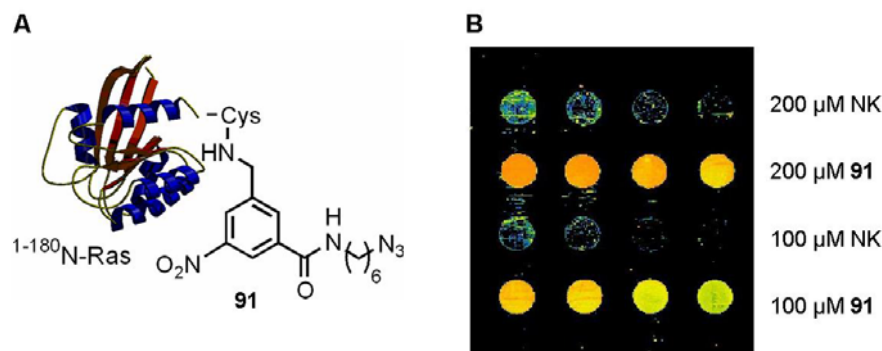


Abbildung 21: A: Azid-funktionalisiertes N-Ras **91**; B: Nachweis von immobilisiertem N-Ras mit Cy5-markiertem anti-Ras-Antikörper.

Abbildung 21B zeigt die erfolgreiche Immobilisierung des Proteins **91**. Zwischen dem Azid-funktionalisierten Protein **91** und der NK ist ein deutlicher Unterschied in der Signalintensität zu beobachten und es ist eine Abnahme der Fluoreszenz mit abnehmender Konzentration der Proteinlösungen zu sehen. Somit konnte anhand der selektiven Immobilisierung des Ras-Proteins **91** die überragende Chemoselektivität und Bioorthogonalität der nicht-spurlosen Staudinger-Ligation demonstriert werden.

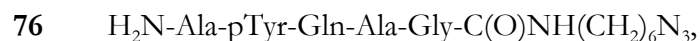
4.2.3 Validierung des Substrat-Mikroarray-Konzepts für PTPs

Zur Validierung des Konzepts eines Mikroarrays zum Nachweis von Phosphatase-Substratspezifitäten sollte die Phosphatase PTP1B herangezogen werden. Über die Substratspezifität von PTP1B sind bereits zahlreiche Studien angefertigt worden (s. Kapitel 2.4.1.1).^[131] Peptide, welche innerhalb von fünf Aminosäuren zwischen dem *N*-Terminus und dem Phosphotyrosin saure Seitenketten tragen, stellen bevorzugte Substrate dar. Zwei Peptide mit hoher Affinität sind LpYEDAD mit $K_m=3.2\mu\text{M}$ und LpYED-Ac mit $K_m\sim 20\mu\text{M}$.^[130a] Aus diesem Grunde wurden folgende Peptide nach Schema 21, Kapitel 4.2.2, synthetisiert, wobei die Peptide **75**, **76** und **77** bereits im vorigen Kapitel beschrieben worden waren.

Analoge der bekannten Substrate von PTP1B:



Weitere Substrate:



Die Peptide **92** und **77** sind Analoga der bekannten Substrate von PTP1B. Das Peptid **75** ist ein weiteres mit rot gekennzeichneten sauren Seitenketten, das Peptid **93** trägt eine basische Gruppe (blau markiert) und das Peptid **76** enthält neutrale Funktionen. Mit Hilfe dieser Peptide sollte der Substrat-Mikroarray validiert werden, indem PTP1B bei der Dephosphorylierung auf der Oberfläche die bevorzugten Substrate schneller als die anderen Peptide dephosphorylieren würde.

Zunächst sollte aber überprüft werden, ob die in der Literatur beschriebenen Peptide tatsächlich bevorzugte Substrate sind. Es wurden Experimente in Lösung und der Nachweis der

Dephosphorylierung mittels HPLC-ESI durchgeführt wozu die Parameter der Phosphatase- und der Substratkonzentration ermittelt werden mussten. Dies geschah durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen, der Inkubation von Substratlösung mit PTP1B für 1 h bei 37°C und anschließendem Abbruch der Reaktion mittels 10%iger Essigsäure. Es wurden die benötigten Konzentrationen für PTP1B mit 13 nM und für die Substrate mit 50 µM ermittelt. Mit diesen Parametern wurde eine zeitabhängige Messung der Dephosphorylierung durchgeführt. Dazu wurden die Substrate mit PTP1B bei 37°C inkubiert und nach 10, 30 und 60 min wurden Proben entnommen. Diese Proben wurden zu 10%iger Essigsäure zum Beenden der Reaktion gegeben und die Menge an dephosphoryliertem Peptid mittels HPLC-ESI ermittelt. Als Negativkontrollen wurden die Substrate unter gleichen Bedingungen mit Pufferlösung inkubiert. Die Produkt-Bildung ist in Abbildung 22 dargestellt.

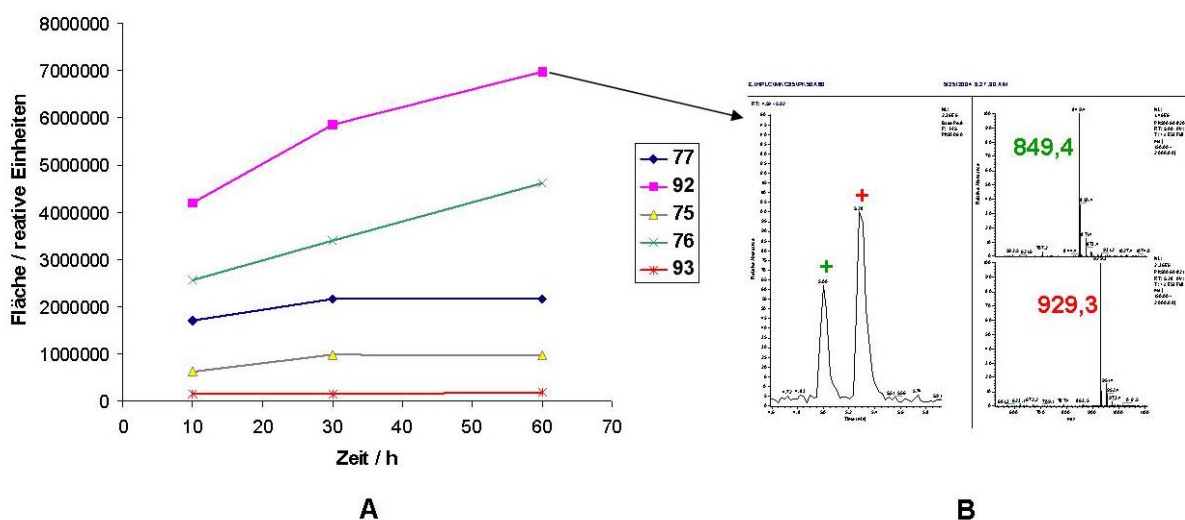


Abbildung 22: A: Die Produkt-Bildung nach der Inkubation der Phosphopeptide; B: HPLC-ESI-Spur der Inkubation des Peptids **92** mit PTP1B nach 60 min. Die Masse und der Peak des dephosphorylierten Peptids sind grün gekennzeichnet, die des phosphorylierten Peptids rot.

In Abbildung 22A ist zu sehen, dass das bekannte Substrat **92** von PTP1B innerhalb der ersten 30 min am schnellsten und stärksten dephosphoryliert wird, da der Produkt-Peak zwischen 10 und 30 min die größte Steigung aufweist. Somit stellte sich das Phosphopeptid **92** wie erwartet als bevorzugtes Substrat heraus. Es war allerdings überraschend, dass das Phosphopeptid **76**, welches weder ein in der Literatur bekanntes Substrat von PTP1B ist noch saure Seitenketten trägt, als das zweitbeste Substrat detektiert wurde. Womit das begründet ist, ob mit der Azid-Funktion, den Reaktionsbedingungen oder anderem, könnte hier nur gemutmaßt werden. Die Peptide **77** und **75**, die theoretisch bevorzugte Substrate hätten sein müssen, wurden nur im gleichen Maße sehr wenig dephosphoryliert, so dass die zahlreich in der Literatur beschriebene

Substratspezifität von PTP1B^[130a] nicht durchweg nachvollzogen werden konnte. Das Peptid **93** wurde wiederum wie erwartet als schlechtestes Substrat nachgewiesen, denn es war gar nicht dephosphoryliert worden.

Mit den Phosphopeptiden **92** und **93** wurden daraufhin quantitative Studien durchgeführt. Dazu wurde für jedes Peptid eine Kalibrierungsreihe aufgenommen und der obige Versuch über 120 min mit größeren Mengen wiederholt, um den Pipettierfehler möglichst gering zu halten. In Abbildung 23 ist die Abnahme der Substratmenge über die Inkubationszeit aufgetragen. Es sind die Positivkontrollen (PK) beider Peptide, also die mit PTP1B inkubierten Proben, sowie die Negativkontrollen (NK), d.h. die mit Puffer inkubierten Proben, gezeigt.

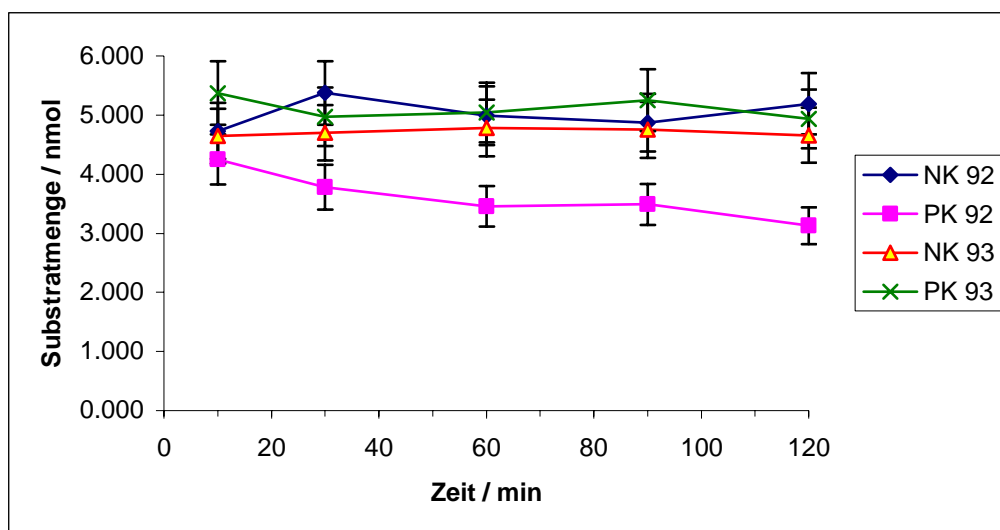


Abbildung 23: Darstellung der Abnahme der phosphorylierten Substrate **92** und **93** über die Inkubationszeit. PK **92**: Positivkontrolle von Peptid **92**; NK **92**: Negativkontrolle von Peptid **92**; PK **93**: Positivkontrolle von Peptid **93**; NK **93**: Negativkontrolle von Peptid **93**. Der Fehler ist mit 10% eingezeichnet.

Der eingezeichnete Fehler der Messung von 10% ergibt sich aus dem Fehler der Abweichungen der NKs bei den verschiedenen Zeiten (5%) und aus einem geschätzten Pipettierfehler (5%). Die Werte der beiden NKs und der PK **93** liegen alle, innerhalb der Fehlerbreite, in einem Bereich um 5 nmol Substratmenge über den gesamten Zeitraum. Also wurde das Peptid **93** auch nach 2 h nicht dephosphoryliert. Das Peptid **92** war hingegen nach 1 h um ca. 30% und nach 2 h um ca. 40% dephosphoryliert worden. Dieser Unterschied in der Erkennung und Dephosphorylierung beider Peptide durch PTP1B sollte für eine Validierung des Konzepts für den Mikroarray zur Erkennung von PTP-Substratspezifitäten ausreichen.

Zu Beginn sollte überprüft werden, ob Phosphopeptide auf der Oberfläche mit einem anti-pTyr-Antikörper detektiert werden können. Die Peptide **92** und **93** wurden in einem Konzentrationsgradienten von 0.01 mM bis 2 mM auf die Phosphin-funktionalisierten Oberflächen **90** gespottet (250 pl/Spot). Zusätzlich wurde Strep Tag I **48** in dem gleichen Gradienten gespottet. Dies diente dazu herauszufinden, ob der anti-pTyr-Antikörper selektiv gegen die phosphorylierten Peptide **92** und **93** binden würde.

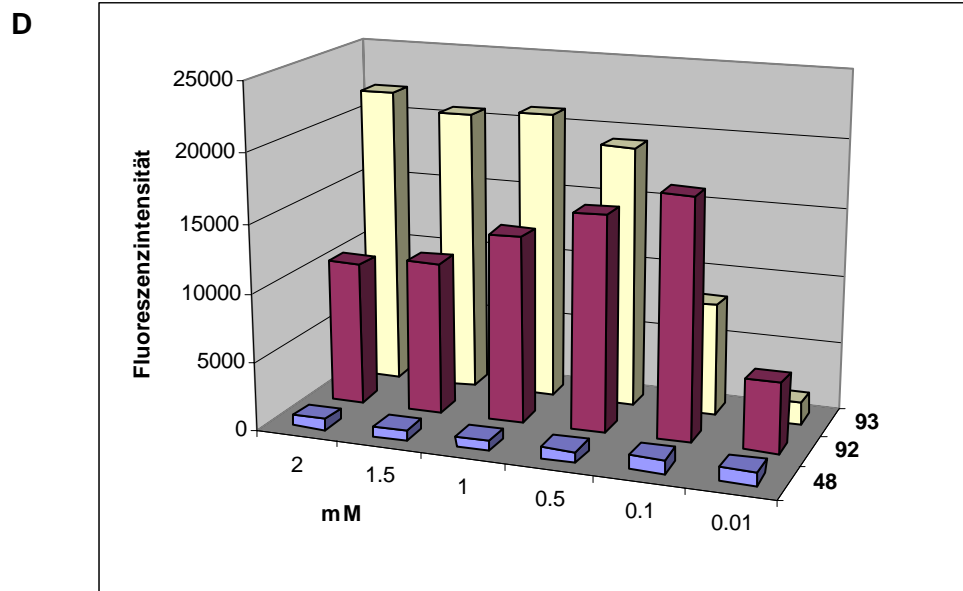
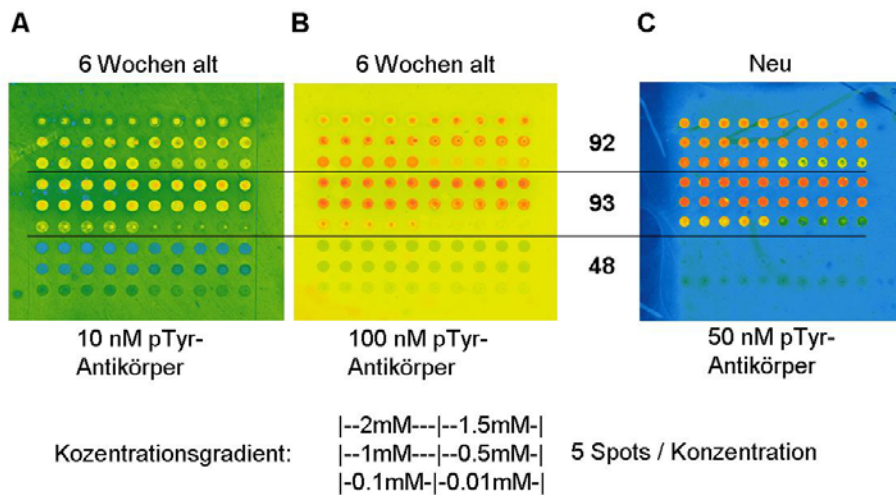


Abbildung 24: Nachweis der immobilisierten Phosphopeptide **92** und **93** sowie der Negativkontrolle **48** mit anti-pTyr-Antikörper-Biotin-STV-Cy5-Konjugat. A: Glasträger, der 6 Wochen vor dem Spotten mit Phosphin **62** funktionalisiert worden war und Nachweis mit einer 10 nM Lösung des Antikörpers; B: 6 Wochen alter Glasträger und Nachweis mit einer 100 nM Lösung des Antikörpers; C: Glasträger, der am Tag vor dem Spotten mit Phosphin **62** funktionalisiert worden war und Nachweis mit einer 50 nM Lösung des Antikörpers; D: Histogramm der Signalintensitäten aus Abbildung C.

In Abbildung 24A, B und C sind Glasträger abgebildet, auf denen die Peptide immobilisiert wurden. Die Objektträger in Abbildung 24A und B wurden 6 Wochen vor dem Bespotten mit dem Phosphin **62** funktionalisiert. Der Nachweis mit anti-pTyr-Antikörper-Biotin-STV-Cy5-Konjugat (100 nM und 10 nM) zeigt deutlich, dass die Phosphopeptide **92** und **93** auf der Oberfläche erkannt wurden, während das Strep Tag I **48** nicht nachgewiesen wurde. Dies ist auch in Abbildung 24C der Fall, wo der Nachweis mit einer 50 nM Lösung des Antikörper-Konjugats geführt und der Objektträger am Tag vor dem Spotten mit dem Phosphin funktionalisiert worden war. Die „älteren“ Glasträger zeigen einen sehr hohen Hintergrund, der auch bei einem Nachweis mit 10 nM Antikörperlösung noch höher war als bei dem frisch hergestellten Glasträger. Daher wurde im Folgenden immer mit kurz vor dem Spotten funktionalisierten Objektträgern gearbeitet. Im Histogramm 24D wird deutlich, dass die maximale Signalintensität bei dem Peptid **92** nicht bei der maximalen gespotteten Konzentration von 2 mM, sondern bei den Konzentrationen 0.1 mM detektiert wurde. Möglicherweise wechselwirken die immobilisierten Phosphopeptide in hohen Konzentrationen in einer Weise miteinander, die sie für die Phosphatase unzugänglich machen.

Im nächsten Schritt wurden die Phosphopeptide **92** und **93** (je 1 mM) auf der Phosphin-funktionalisierten Oberfläche immobilisiert und mit verschiedenen Konzentrationen von PTP1B in Hepes-Puffer bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen zum Entfernen der Phosphatase wurde der Nachweis der Dephosphorylierung mit dem anti-pTyr-Antikörper-Konjugat (50 nM) durchgeführt (Abbildung 25A). Das Histogramm in 25B zeigt die Auftragung des prozentualen Phosphorylierungsgrades, also der Signalintensitäten nach der Behandlung mit verschiedenen PTP1B-Konzentrationen, verglichen mit dem Array, der mit der geringsten PTP1B-Konzentration inkubiert worden war (6 nM, entspricht 100% Signalintensität).

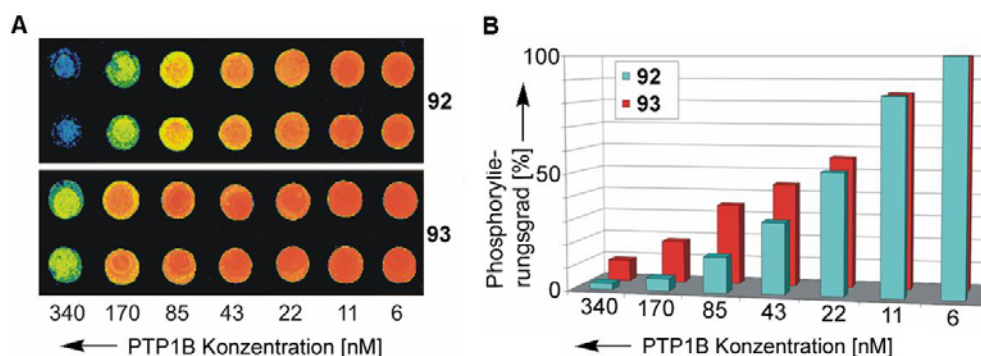


Abbildung 25: A: Nachweis der immobilisierten Phosphopeptide **92** und **93** mit anti-pTyr-Antikörper (50 nM) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PTP1B; B: Auftragung des prozentualen Phosphorylierungsgrades der Peptide verglichen mit dem Array, der mit der geringsten PTP1B-Konzentration inkubiert worden war (6 nM, entspricht 100% Signalintensität).

Es ist deutlich an dem Rückgang der Signalintensitäten zu sehen, dass beide Peptide von PTP1B in Abhängigkeit von der Phosphatase-Konzentration dephosphoryliert werden. Je höher die eingesetzte Phosphatase-Konzentration war, desto niedriger war die erhaltene Signalintensität. Innerhalb derselben Konzentration jedoch wurde für Phosphopeptid **92** ein stärkerer Signalarückgang als für Peptid **93** detektiert. Das bedeutet, dass Phosphopeptid **92** schneller als Peptid **93** dephosphoryliert wurde. Somit wurde mittels des Substrat-Mikroarrays das gleiche Ergebnis erzielt wie in Lösung.

Die Validierung des Konzepts für einen Mikroarray zum Nachweis von Phosphatase-Substratspezifitäten verlief demgemäß erfolgreich. So konnte nachfolgend diese neue Technik mit verschiedenen Phosphatasen angewendet werden.

4.2.4 Anwendung des Substrat-Mikroarrays: Ermittlung der Substratspezifitäten von Phosphatasen und Überprüfung der Ergebnisse in Lösung

Zur Untersuchung der Substratspezifitäten der Phosphatasen PTP μ , MPTPA, PRL-3 und PTP-SL wurden weitere 43 Phosphopentapeptide nach dem beschriebenen Syntheseweg hergestellt (Kapitel 4.2.2, Schema 21). Die Aminosäuresequenzen sind im Experimentellen Teil angegeben. PTP1B wurde als eine Kontrolle nochmals mit untersucht. Alle 48 Phosphopeptide wurden auf eine mit Phosphin **62** funktionalisierte Oberfläche in einer Konzentration von 1 mM bzw. die Peptide **94**, **108**, **111**, **112**, **113**, **117**, **118**, **123**, **125**, **126**, **127**, **128**, **134** und **136** als gesättigte Lösungen aufgrund von Löslichkeitsproblemen in Dioxan/H₂O (2:1) gespottet. Sie wurden in einem solchen Muster angeordnet, dass jedes Peptid einmal in einem Block von 5x10 Spots vertreten war. In der letzten Reihe folgte auf das Peptid Nr. 48 Cy5-Azid **31** (s. Schema 10, Kapitel 4.1.3), das als Standardisierungs-Faktor mitgespottet wurde. Je zwei Blocks wurden untereinander platziert, so dass pro Array jedes Peptid doppelt bestimmt werden konnte. In Abbildung 26A ist die Anordnung dargestellt. Von diesen Doppel-Blocks waren fünf auf einem Objektträger lokalisiert und daher konnten mit Hilfe von Hybridisierungskammern fünf Arrays auf einem Objektträger gleichzeitig inkubiert werden. Vier Arrays wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen (50, 5, 0.5 und 0.05 $\mu\text{g/ml}$) der jeweiligen Phosphatasen und einer mit Puffer-Lösung bei 37 °C für 1 h inkubiert und die Ergebnisse mit dem anti-pTyr-Antikörper-Konjugat (50 nM) detektiert (Abbildung 26B). Durch die einheitlichen Konzentrationen für alle Phosphatasen war ein Vergleich der Phosphatase-Aktivitäten möglich. Es wurden zwei Objektträger pro Phosphatase verwendet, so dass vier Datenpunkte pro Phosphopeptid und Phosphatase-Konzentration bzw. Puffer-Lösung für die Auswertung zur Verfügung standen.

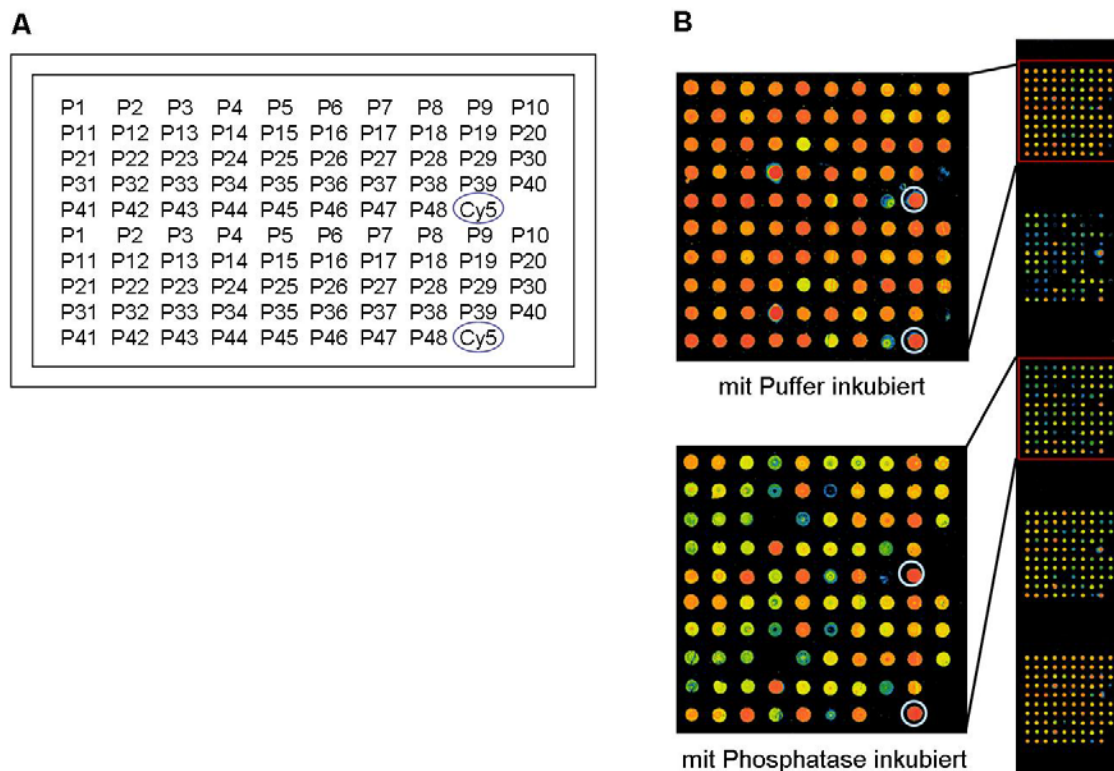


Abbildung 26: A: Spot-Schema der 48 Phosphopeptide. Cy5-Azid **31** wurde als Standardisierungsfaktor mitgespottet. Fünf solcher Blocks befanden sich auf einem Objektträger. B: Detektion des Phosphorylierungsgrades nach Inkubation mit einer Phosphatase (untere vier Arrays) bzw. mit einem Puffer (oben) am Beispiel PTP μ . Cy5 ist in beiden Abbildungen blau gekennzeichnet.

Die erhaltenen Resultate der Substratspezifitäten und Aktivitäten der einzelnen Phosphatasen wurden mittels Malachitgrün-Assay in Lösung überprüft. Die gemessenen Extinktionen wurden mit Hilfe einer Kalibrierungskurve in dem jeweiligen Puffer quantifiziert.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zu den einzelnen Phosphatasen dargestellt. Die Einteilung der Peptide in „bevorzugte Substrate“, „Substrate“ und „keine Substrate“ wurde bei den Mikroarrays anhand des prozentualen Dephosphorylierungsgrades vorgenommen und ist bei jeder Phosphatase gleich. Der Dephosphorylierungsgrad wurde durch den Vergleich der Signalintensitäten zu derjenigen des Assays ermittelt, der mit Puffer-Lösung inkubiert worden war (außer bei PTP1B und MPTPA, s. Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.4.3). Zuvor wurden alle Signalintensitäten auf den Wert des Cy5 normiert. Die Angabe des Fehlers beim Mikroarray ergibt sich aus der Mittelung der Standardabweichung der Vierfach-Bestimmung. Hohe Fehler entstanden durch die Mittelung über zwei Mikroarrays. Die Standardabweichungen der Datenpunkte eines Mikroarrays waren grundsätzlich geringer. Bei dem Assay in Lösung wurde mit Einfach-Bestimmungen gearbeitet (außer bei PTP μ , s. Kapitel 4.2.4.2), so dass der Fehler vom Pipettieren stammt und mit 10% abgeschätzt wird.

4.2.4.1 PTP1B

Da über die Substratspezifität von PTP1B im Gegensatz zu den anderen untersuchten Phosphatasen schon Einiges berichtet wurde,^[131] sollte PTP1B lediglich als Modell für die Technik mituntersucht werden.

Bei der Auswertung wurden die erhaltenen Signale nicht wie ursprünglich geplant mit dem Puffer-inkubierten Array verglichen, sondern mit dem höchsten Signal der zu dem entsprechenden Peptid gehörenden Daten. Dies geschah, da der mit Pufferlösung inkubierte Array wesentlich geringere Signale als die mit PTP1B-behandelten ergab. Diese Beobachtung ist zuvor auch von JPT Peptide Technologies, Berlin, gemacht worden^[177] und wurde im Folgenden bei MPTPA, PRL-3 und PTP-SL-KIM ebenfalls gefunden. Bei MPTPA und PTP1B wurde mit HEPES-Puffer, bei PRL-3 und PTP-SL-KIM mit TETBS-Puffer gearbeitet. Letzterer Puffer wurde auch bei den Experimenten mit PTP μ und PTP-SL-EX verwendet, bei denen diese Beobachtung nicht gemacht wurde. Daher kann dieses Phänomen nicht von dem verwendeten Puffer abhängig sein. Bei PRL-3 und PTP-SL-KIM hatte es aber keine signifikanten Auswirkungen auf die Resultate und Fehler, weshalb die Signalintensitäten der Phosphatase-behandelten Arrays trotzdem mit der des Puffer-inkubierten Arrays verglichen wurden. Die Veränderung des Ergebnisses bei MPTPA wird in Kapitel 4.2.4.3 diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, eine Erklärung für diese Beobachtung zu finden.

Wie in der Literatur berichtet,^[130a] ist auch hier anhand des Mikroarrays zu erkennen, dass PTP1B eine sehr aktive Phosphatase ist und viele Substrate dephosphoryliert. Tatsächlich ist ein Unterschied zwischen der Güte verschiedener Substrate mit dem Mikroarray nur schwer festzustellen, da innerhalb einer Konzentration die erhaltenen Signalintensitäten bezüglich der Substrate nur wenig voneinander abweichen (Tabelle 4). So werden Peptide **92**, **93**, **75**, **76** und **77** im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.3 alle im gleichen Maße dephosphoryliert.

Um eine bessere Unterscheidung der Substratgüte durch den Mikroarray zu erhalten, wäre eine Variation der Reaktionszeit und der Phosphatase-Konzentration sinnvoll, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität:	Substrat:	Ausbeute Phosphat:	Substrat:
0-30% = ++	bevorzugtes Substrat	>10000 = ++	bevorzugtes Substrat
30-60% = +	Substrat	50-10000 = +	Substrat
60-100% = 0	kein Substrat	0-50 = 0	kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 31% (min. 0%, max. 92%) beim Mikroarray		Konzentration PTP1B: 0.5 μ g/ml	
~10% beim Assay in Lösung		Konzentration Substrate: 100 μ M	

Peptid	Mikroarray Phosphatase-Konzentration				Assay in Lösung (freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)	
	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml		
93	++	++	0	0	+	2967
76	++	++	0	0	+	7087
94	++	++	0	0	++	11197
95	++	++	0	0	++	12285
96	++	++	0	0	+	8869
97	++	++	0	0	+	8849
98	++	++	0	0	+	6635
99	++	++	0	0	+	5540
100	++	++	0	0	+	4560
101	++	++	0	0	++	10111
102	++	++	0	0	+	9750
103	++	++	0	0	++	11296
104	++	++	0	0	++	11659
105	++	++	0	0	++	13021
106	++	++	0	0	+	3884
107	++	++	0	0	++	12624
108	++	++	0	0	++	17126
92	++	++	0	0	+	6582
77	++	++	0	0	+	8124
75	++	++	0	0	+	2932
109	++	++	0	0	++	11107
110	++	++	0	0	+	3248
111	++	+	0	0	++	18740
112	++	++	0	0	++	12965
113	++	++	0	0	+	5438
114	++	++	0	0	+	267
115	++	++	0	0	+	6329
116	++	+	0	0	++	11497
117	++	+	0	0	++	13528
118	++	+	0	0	+	8468
119	++	++	0	0	++	10701
120	++	++	0	0	+	5776
121	++	++	0	0	++	12836
122	+	0	0	0	++	13979
123	++	++	0	0	++	10698
124	++	++	0	0	+	8810
125	++	0	0	0	+	8082
126	++	++	0	0	++	16316
127	++	+	0	0	++	12142
128	++	+	+	0	+	1261
129	++	++	0	0	+	9358
130	++	++	0	0	++	10317
131	++	++	0	0	++	11580
132	++	++	0	0	++	15361
133	++	++	0	0	+	2954
134	++	+	0	0	+	8904
135	++	++	0	0	+	3156
136	++	+	0	0	+	2740

Tabelle 4: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit PTP1B. Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 6 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert.

Auch im Lösungsassay wird aufgrund der sehr hohen Ausbeuten an Phosphat im Vergleich zu allen anderen untersuchten Phosphatasen verdeutlicht, dass PTP1B eine sehr aktive Phosphatase ist. Die Überprüfung der Mikroarray-Ergebnisse in Lösung lieferte diesbezüglich also eine gute Übereinstimmung.

Im Lösungsassay ist eine Unterscheidung der Substratspezifität durch die Quantifizierung durchführbar, die auf dem Mikroarray mangels Kalibrierung nicht möglich ist. Mittels Quantifizierung ist festzustellen, dass Peptid **93** weniger dephosphoryliert wird als Peptid **92**, was dem Ergebnis der Validierung (Kapitel 4.2.3) entspricht. Ein interessanter Punkt ist, dass die Literatur-bekanntes Substrate **92** und **77**^[130a] als nicht besonders bevorzugte Substrate identifiziert wurden. Das Peptid **109** ist ebenfalls ein in der Literatur beschriebenes Substrat^[131a] und wurde auch hier als bevorzugtes erkannt. Die Aminosäuresequenzen der besten Substrate aus dem Lösungs-Assay sind folgende:

94 LpYASG	109 EFpYMD	122 ADpYFA
95 LSpYRG	111 AWpYGT	123 MpYGDA
101 GSpYAG	112 PlpYAT	126 PYpYYV
103 LApYED	116 LCpYKA	127 FpYSSV
104 FpYRAD	117 GpYCSA	130 EGpYGQ
105 AEpYGD	119 FKpYSA	131 EpYDDQ
107 FKpYGD	121 ARpYFA	132 LYpYKQ
108 FQpYQD		

Von den 22 Peptiden tragen nur 6 das Phosphotyrosin an Position 2 ausgehend vom N-Terminus. Daher wurde bei der Statistik über die Häufigkeit der Aminosäuren an den einzelnen Positionen die Position +3 bezüglich des pTyr nicht berücksichtigt (Abbildung 27).

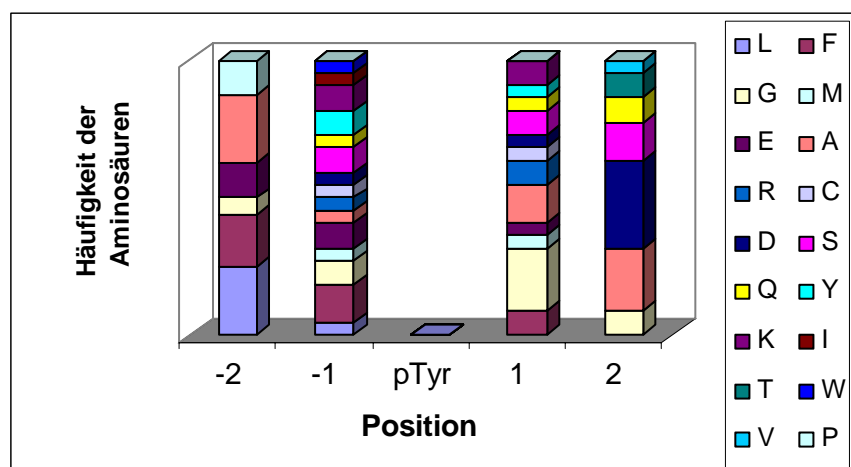


Abbildung 27: Histogramm der Anzahl an Aminosäuren an den einzelnen Positionen ausgehend vom pTyr.

An Position -2 ausgehend vom pTyr treten Ala und Leu am häufigsten auf. Phe kommt in Position -1 am häufigsten vor. An dieser Position ergibt sich aber ein gemischtes Bild, da nach

dem Phe Lys, Glu, Gly, Ser und Tyr gleich häufig vorkommen, wobei polare Aminosäuren überwiegen. An Position +1 tritt Gly und an Position +2 Asp am häufigsten auf. Aus diesen Daten ergibt sich folgende Substratspezifität von PTP1B: unpolar (A/L) – polar – pTyr – unpolar (G) – sauer (D). Dies stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Substratspezifität von PTP1B überein, nach der PTP1B saure Sequenzen den basischen vorzieht.^[130a]

4.2.4.2 PTP μ

Tabelle 5 zeigt die Resultate der Substratspezifitätsexperimente mit PTP μ . Die Untersuchungen wurden mit PTP μ -D1, der katalytischen Domäne von PTP μ (s. Kapitel 2.4.2.1), durchgeführt. Sieben bevorzugte Substrate wurden mittels des Mikroarrays bei der höchsten Phosphatase-Konzentration (50 μ g/ml) detektiert. Die beiden niedrigen Konzentrationen ließen gar keine und die zweithöchste nur eine geringe Unterscheidung der Spezifität gegenüber den Substraten zu.

Mit dem Malachitgrün-Assay wurden drei bevorzugte Substrate detektiert. Die Einteilung erfolgte aufgrund der viel größeren Ausbeute an Phosphat bei der Dephosphorylierung der Peptide **105**, **109** und **111**. Diese drei wurden auch von dem Mikroarray als bevorzugte Substrate erkannt. Die Detektion mehrerer bevorzugter Substrate durch den Mikroarray kann durch die längere Inkubationszeit begründet sein. Wichtig ist, dass keine falsch-negativen Resultate mittels Mikroarray erhalten wurden. Das bedeutet, dass alle Peptide, die Substrate sind, als solche erkannt wurden. Generell stimmen die Ergebnisse, die mit dem Mikroarray erhalten wurden, gut mit denen des Lösungsassays überein.

Die Aminosäuresequenzen der drei bevorzugten Substrate waren folgende:

105 Ala-Glu-pTyr-Gly-Asp,

109 Ala-Trp-pTyr-Gly-Thr,

111 Glu-Phe-pTyr-Met-Asp.

Alle drei Peptide tragen das pTyr in Position 3. Dies lässt darauf schließen, dass die N-terminalen Aminosäuren neben dem pTyr eine wichtige Funktion bei der Erkennung und Bindung von PTP μ haben. Keines dieser Peptide hat basische Eigenschaften. Dies ist auch bei den Literatur-bekanntesten Substraten DGDFFEEIPEEpYLQ und EGPWLEEEEEApYGMDF der Fall.^[119] Daher scheint es, dass PTP μ saure und neutrale Aminosäuresequenzen den basischen vorzieht. Die sich aus diesen Daten ergebende bevorzugte Aminosäuresequenz lautet: unpolar (A) – unpolar (W/F) – pTyr – unpolar (G) – sauer (D).

Peptid	Mikroarray Phosphatase-Konzentration				Assay in Lösung (freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)	
	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml		
93	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	1
94	0	0	0	0	0	0
95	+	+	0	0	+	119
96	+	0	0	0	+	54
97	+	+	0	0	+	154
98	+	+	0	0	+	97
99	0	0	0	0	0	9
100	0	0	0	0	0	27
101	+	0	0	0	0	42
102	+	0	0	0	0	15
103	+	0	0	0	+	95
104	+	+	0	0	0	35
105	++	+	0	0	++	428
106	0	0	0	0	0	25
107	++	+	0	0	+	141
108	+	0	0	0	0	49
92	0	0	0	0	0	15
77	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	6
109	++	+	0	0	++	379
110	+	+	0	0	0	0
111	++	+	0	0	++	415
112	++	+	0	0	+	148
113	+	+	0	0	0	0
114	+	+	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0
116	+	0	0	0	+	191
117	0	0	0	0	0	0
118	+	+	0	0	+	165
119	+	+	0	0	0	0
120	+	+	0	0	0	30
121	+	0	0	0	+	146
122	+	0	0	0	+	172
123	+	0	0	0	0	0
124	+	0	0	0	+	79
125	+	+	0	0	0	0
126	++	+	0	0	+	158
127	+	0	0	0	0	29
128	++	+	0	0	0	14
129	+	0	0	0	0	47
130	+	0	0	0	+	83
131	0	0	0	0	0	17
132	+	+	0	0	+	169
133	0	0	0	0	0	0
134	+	+	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0	0
136	+	+	0	0	0	0

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität: 0-30% = ++ 30-60% = + 60-100% = 0	Substrat: bevorzugtes Substrat Substrat kein Substrat	Ausbeute Phosphat: >200 = ++ 50-200 = + 0-50 = 0	Substrat: bevorzugtes Substrat Substrat kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 12% (min. 0%, max. 59%) beim Mikroarray Max. 20% beim Assay in Lösung		Konzentration PTP μ : 10.8 μ g/ml Konzentration Substrate: 100 μ M	

Tabelle 5: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit PTP μ . Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 10 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert. Der Fehler des Assays in Lösung berechnet sich hier aus den Standardabweichungen der Vierfach-Bestimmungen, da diese Messungen mit dem Pipettierroboter durchgeführt wurden.

Mit den besten drei Peptiden wurde zusätzlich die Bestimmung von K_m und k_{cat} durchgeführt. Wie in Tabelle 6 zu sehen sind die Peptide **105** und **111** weniger gute Substrate als das Peptid **109**. Die Spezifitätskonstante für **109** ist höher als der in der Literatur beschriebene Wert für pNPP ($k_{cat}/K_m = 300.67 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$), aber wesentlich geringer als diejenigen für die bereits erwähnten Peptide ($k_{cat}/K_m = 0.18 \times 10^6$ und $0.21 \times 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, S.66).^[119] Diese Werte wurden allerdings mit dem Konstrukt aus Juxtamembran und katalytischer Domäne D1 erhalten und nicht wie hier nur mit der Domäne D1, so dass die Werte nur mit Vorsicht zu vergleichen sind.

Peptid	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
105	> 500 μ M	-	-
109	$53.08 \pm 7.79 \mu$ M	$0.60 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$	$11396 \pm 1673 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$
111	> 500 μ M	-	-

Tabelle 6: Für die Peptide **105**, **109** und **111** bestimmte Michaelis-Menten-Werte.

Von der Jerini AG, Berlin, wurden weitere 360 Phosphopeptide mit einer Länge von 13 Aminosäuren mittels Biomolgreen-Assays auf die Substratspezifität von PTP μ getestet. In Abbildung 28 ist ein Histogramm der 20 besten Substrate nach der Häufigkeit der Aminosäuren an den Positionen -2, -1, +1 und +2 ausgehend vom pTyr dargestellt.

Aus diesen Daten ergibt sich folgende Substratspezifität von PTP μ : polar/sauer (Cys/Glu) – unpolar (Leu/Ile) – pTyr – unpolar (Leu/Ile) – polar (Asn). Dieses Ergebnis stimmt mit den Schlussfolgerungen aus denen des Mikroarrays und des Lösungsassays überein, wonach PTP μ saure und neutrale Aminosäuresequenzen den basischen vorzieht. Die Positionen -1 und +1 werden in beiden Fällen von unpolaren Aminosäuren eingenommen. Es wird aber deutlich, dass die Bestimmung der bevorzugten Substrat-Aminosäuresequenz aus 48 Peptiden nur als Stichprobe gelten kann, die auf die wirkliche Substratspezifität hindeutet, da die Aminosäuren aus den Daten des Mikroarrays und der Jerini AG in Position -1 und +1 nicht dieselben sind und ab den Positionen -2 und +2 die Übereinstimmung der Eigenschaften der Aminosäuren abnimmt.

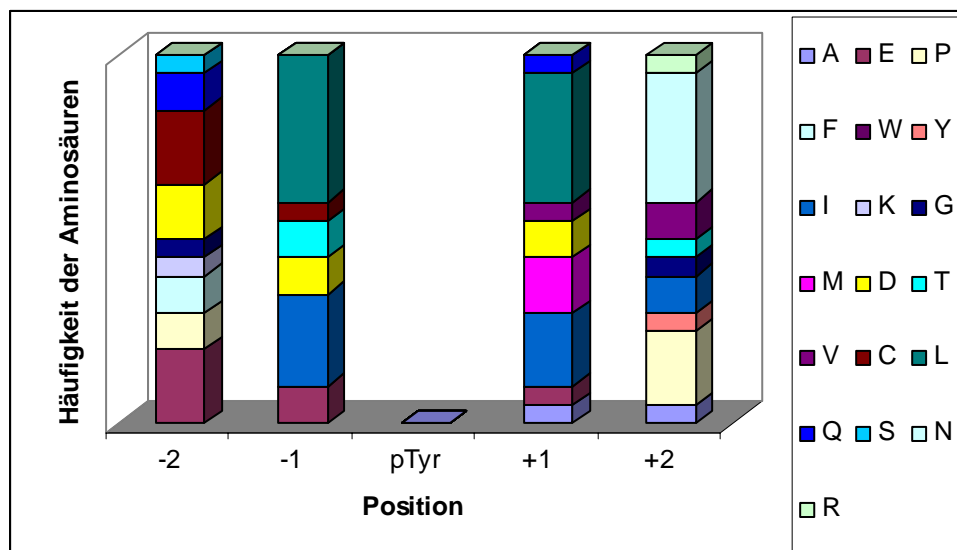


Abbildung 28: Histogramm der besten 20 Substrate von PTP μ , die bei einem Test von der Jerini AG, Berlin, detektiert wurden. Gezeigt ist die Anzahl der Aminosäuren an den einzelnen Positionen ausgehend vom pTyr.

4.2.4.3 MPTPA

Tabelle 7 zeigt die Resultate der Substratspezifitätsexperimente mit MPTPA. Wie bereits in Kapitel 4.2.4.2 erwähnt, wurden bei der Auswertung die erhaltenen Signale nicht mit dem Pufferinkubierten Array verglichen, sondern mit dem höchsten Signal der zu dem entsprechenden Peptid gehörenden Daten. Ohne diese Maßnahme wären nur die Peptide **123**, **129** und **130** als Substrate bei der Phosphatase-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erkannt worden. Außerdem belief sich die mittlere Abweichung auf 30% im Gegensatz zu den nun erhaltenen 10%.

Die Ergebnisse der Experimente mittels Mikroarray, die in Tabelle 7 aufgelistet sind, weisen MPTPA als eine Phosphatase aus, die nur langsam die hier zu Verfügung stehenden Substrate dephosphoryliert. In Lösung zeichnet sich dieses Ergebnis ebenfalls ab. Die Einteilung in „Substrate“ und „keine Substrate“ beim Lösungsassay kann hier als willkürlich bezeichnet werden, da die Ausbeute an Phosphat nur sehr wenig variiert. Die Resultate des Lösungsassays und des Mikroarrays stimmen also überein. Aufgrund dieser geringen Aktivität kann aber keine Aussage über eine bevorzugte Substrat-Aminosäuresequenz von MPTPA getroffen werden. Aus den Ergebnissen des Mikroarrays ergibt sich jedoch eine allgemeine Präferenz für saure (D, E) und unpolare (A, G, M) Aminosäuren. Möglicherweise reagiert MPTPA generell mit peptidischen Substraten nur langsam und benötigt zur Erkennung von Substraten Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Peptid	Mikroarray Phosphatase-Konzentration				Assay in Lösung (freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)	
	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml		
93	0	0	0	0	0	4
76	0	0	0	0	0	6
94	0	0	0	0	0	6
95	+	0	0	0	0	8
96	0	0	0	0	0	6
97	+	0	0	0	0	10
98	0	0	0	0	0	4
99	0	0	0	0	0	5
100	+	0	0	0	0	8
101	+	0	0	0	0	8
102	0	0	0	0	0	6
103	+	0	0	0	+	12
104	0	0	0	0	0	6
105	+	0	0	0	+	12
106	0	0	0	0	0	8
107	+	0	0	0	0	10
108	0	0	0	0	+	13
92	0	0	0	0	0	7
77	0	0	0	0	0	8
75	0	0	0	0	0	6
109	+	0	0	0	+	18
110	0	0	0	0	0	3
111	0	0	0	0	+	22
112	0	0	0	0	0	6
113	0	0	0	0	0	10
114	0	0	0	0	0	7
115	0	0	0	0	0	7
116	0	0	0	0	0	9
117	0	0	0	0	+	12
118	0	0	0	0	0	5
119	0	0	0	0	0	4
120	0	0	0	0	0	3
121	0	0	0	0	0	6
122	0	0	0	0	0	9
123	+	0	0	0	+	22
124	0	0	0	0	0	6
125	0	0	0	0	0	10
126	0	0	0	0	0	7
127	0	0	0	0	0	9
128	+	0	0	0	0	2
129	+	0	0	0	+	13
130	+	0	0	0	+	19
131	0	0	0	0	0	10
132	0	0	0	0	0	6
133	0	0	0	0	0	5
134	0	0	0	0	0	5
135	0	0	0	0	0	6
136	0	0	0	0	0	4

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität:	Substrat:	Ausbeute Phosphat:	Substrat:
0-30% = ++	bevorzugtes Substrat	>50 = ++	bevorzugtes Substrat
30-60% = +	Substrat	10-50 = +	Substrat
60-100% = 0	kein Substrat	0-10 = 0	kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 10% (min. 0%, max. 51%) beim Mikroarray ~ 10% beim Assay in Lösung		Konzentration PTP μ : 40 μ g/ml Konzentration Substrate: 100 μ M	

Tabelle 7: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit MPTPA. Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 10 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert.

4.2.4.4 PRL-3

Tabelle 8 zeigt die Resultate der Substratspezifitätsexperimente mit PRL-3. Mittels Mikroarray wurde keine Dephosphorylierung detektiert. Dies wurde zunächst darauf zurückgeführt, dass der verwendete TETBS-Puffer, wie bei allen Experimenten mit diesem Puffer, eine nur 1 mM Konzentration an DTT enthielt. Es wurde berichtet, dass PRL-3 eine höhere Konzentration von mindestens 6 mM zur Aktivität benötigt.^[178] Daher wurde für den Assay in Lösung eine 6 mM Konzentration an DTT im Puffer verwendet. Aus den Ergebnissen in Tabelle 8 wird aber deutlich, dass dies nicht der Grund für die mit dem Mikroarray erzielten Ergebnisse sein kann. Im Lösungsassay werden alle Peptide im gleichen geringen Maße dephosphoryliert. Das bestätigt die Resultate der Mikroarray-Experimente und auch die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass PRL-3 sehr langsam mit peptidischen Substraten reagiert.^[139] Eine mögliche Erklärung ist, dass die Erkennung von Substraten über Protein-Protein-Wechselwirkungen abläuft. Es wurde aber auch berichtet, dass PRL-3 eine große strukturelle Ähnlichkeit mit PTEN aufweist.^[138,139] PTEN katalysiert die Dephosphorylierung von Inositolphospholipiden,^[179] und daher sollten weitere Substratklassen neben den pTyr-Proteinen in Erwägung gezogen werden.

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität:	Substrat:	Ausbeute Phosphat:	Substrat:
0-30% = ++	bevorzugtes Substrat		bevorzugtes Substrat
30-60% = +	Substrat	> 20 = +	Substrat
60-100% = 0	kein Substrat	0-20 = 0	kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 11% (min. 0%, max. 30%) beim Mikroarray ~ 10% beim Assay in Lösung		Konzentration PTP μ : 91.5 μ g/ml Konzentration Substrate: 100 μ M	

Peptid	Mikroarray				Assay in Lösung	
	Phosphatase-Konzentration				(freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)	
	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml		
93	0	0	0	0	0	9
76	0	0	0	0	0	11
94	0	0	0	0	0	9
95	0	0	0	0	0	12
96	0	0	0	0	0	12
97	0	0	0	0	0	13
98	0	0	0	0	0	13
99	0	0	0	0	0	13
100	0	0	0	0	0	14
101	0	0	0	0	0	11
102	0	0	0	0	0	13
103	0	0	0	0	0	14
104	0	0	0	0	0	13
105	0	0	0	0	0	13
106	0	0	0	0	0	14
107	0	0	0	0	0	9
108	0	0	0	0	0	9
92	0	0	0	0	0	12
77	0	0	0	0	0	12
75	0	0	0	0	0	12
109	0	0	0	0	0	12
110	0	0	0	0	0	14
111	0	0	0	0	0	9
112	0	0	0	0	0	10
113	0	0	0	0	0	9
114	0	0	0	0	0	16
115	0	0	0	0	0	9
116	0	0	0	0	0	12
117	0	0	0	0	0	9
118	0	0	0	0	0	8
119	0	0	0	0	0	12
120	0	0	0	0	0	12
121	0	0	0	0	0	13
122	0	0	0	0	0	9
123	0	0	0	0	0	12
124	0	0	0	0	0	12
125	0	0	0	0	0	8
126	0	0	0	0	0	9
127	0	0	0	0	0	8
128	0	0	0	0	0	6
129	0	0	0	0	0	13
130	0	0	0	0	0	10
131	0	0	0	0	0	14
132	0	0	0	0	0	10
133	0	0	0	0	0	10
134	0	0	0	0	0	7
135	0	0	0	0	0	12
136	0	0	0	0	0	7

Tabelle 8: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit PRL-3. Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 10 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert.

4.2.4.5 PTP-SL

PTP-SL lag für die Untersuchung in zwei verschiedenen Versionen vor. Die erste Version, PTP-SL-EX, bestand aus der ganzen cytoplasmatischen Region von PTP-SL. Die zweite war eine kürzere Version von PTP-SL-EX, welche am N-Terminus der katalytischen Domäne die kleine Region KIM enthielt (s. Kapitel 2.4.1.5). So konnte neben der Substratspezifität der Phosphatase auch ihre Aktivität in Abhängigkeit der Struktur untersucht werden.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Dephosphorylierungsexperimente mit PTP-SL-EX aufgelistet. Die „lange“ Version der Phosphatase zeigt eine sehr hohe Aktivität auf dem Mikroarray. In den beiden höchsten Phosphatase-Konzentrationen wurden nahezu alle Peptide zu über 70% dephosphoryliert. Eine Unterscheidung der Substrate erfolgte erst in den niedrigeren Konzentrationen, und betrachtet man sie im Zusammenhang, stellen sich 18 Peptide als die besten Substrate heraus (++ bei 0.5 und + bei 0.05 µg/ml).

Von diesen bevorzugten Substraten werden nur zwei, **97** und **123**, in Lösung bestätigt. Im Gegensatz zu PTP1B, wo die hohe Aktivität der Phosphatase mit beiden Techniken detektiert worden war, wurde hier keine Übereinstimmung der Ergebnisse gefunden. PTP-SL-EX zeigt in Lösung keine besonders hohe Aktivität verglichen mit den anderen untersuchten Phosphatasen. Außerdem wurde in Lösung das beste Substrat mit Peptid **131** detektiert, das mittels Mikroarray nicht als eines der besten Substrate erkannt wurde. Ein weiteres gutes Substrat in Lösung, Peptid **122**, wurde mittels Mikroarray als kein Substrat eingestuft. Da der mittlere Fehler der Vierfachbestimmung für dieses Peptid über alle Konzentrationen mit 9% relativ gering ist (min. 0%, max. 31%) kann nicht von einem Fehler auf dem Mikroarray ausgegangen werden. Daher muss der Schluss gezogen werden, dass die Ergebnisse der Mikroarrayexperimente nicht gut mit denen in Lösung überein stimmen.

Für die unterschiedliche Aktivität von PTP-SL-EX in Lösung und auf dem Mikroarray können Wechselwirkungen der Phosphatase mit der Oberfläche verantwortlich sein. Mit 45.6 kDa ist sie die größte der untersuchten Phosphatasen und über die Struktur ihrer cytoplasmatischen Region ist berichtet worden, dass sie relativ rigide und stabil ist.^[144] Diese Eigenschaft wird als Grund für die langsamere Reaktion von PTP-SL als von PTP μ -D1 mit Substraten in Lösung genannt^[144] und könnte möglicherweise auch für Wechselwirkungen mit der Oberfläche mit verantwortlich sein.

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität:	Substrat:	Ausbeute Phosphat:	Substrat:
0-30% = ++	bevorzugtes Substrat	>150 = ++	bevorzugtes Substrat
30-60% = +	Substrat	50-150 = +	Substrat
60-100% = 0	kein Substrat	0-50 = 0	kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 22% (min. 0%, max. 58%) beim Mikroarray ~ 10% beim Assay in Lösung		Konzentration PTP-SL-EX: 19.1 µg/ml Konzentration Substrate: 100 µM	

PTP-SL-EX	Mikroarray Phosphatase-Konzentration				Assay in Lösung (freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)	
	Peptid	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml	
93	++	++	+	0	0	15
76	++	++	+	0	0	14
94	++	++	++	+	0	29
95	++	++	++	0	0	50
96	++	+	+	0	0	16
97	++	++	++	+	++	172
98	++	+	+	0	0	19
99	++	++	++	+	0	14
100	++	++	+	0	0	43
101	++	++	+	0	0	29
102	++	++	+	0	0	20
103	++	++	+	0	+	76
104	++	++	++	+	0	49
105	++	++	+	0	++	152
106	++	++	+	0	0	39
107	++	++	++	+	+	52
108	++	++	+	0	+	134
92	++	++	+	0	0	39
77	++	++	++	+	+	57
75	++	++	++	+	0	28
109	++	++	++	0	+	144
110	++	++	++	0	0	5
111	++	++	+	0	+	112
112	++	++	++	+	0	21
113	++	++	++	+	+	56
114	++	++	++	+	0	12
115	++	++	+	+	0	17
116	++	++	+	+	+	51
117	++	++	+	+	+	87
118	++	++	++	+	0	18
119	++	++	++	0	0	30
120	++	++	++	+	0	28
121	++	++	+	0	+	87
122	0	0	0	0	++	155
123	++	++	++	+	++	182
124	++	++	+	0	0	28
125	++	++	+	+	0	32
126	++	++	++	+	+	76
127	++	++	++	+	+	63
128	++	++	++	+	0	1
129	++	+	+	0	0	50
130	++	++	+	0	0	46
131	++	++	+	0	++	216
132	++	++	++	0	0	32
133	+	+	+	0	0	5
134	++	++	++	+	0	28
135	++	++	+	0	0	28
136	++	++	++	+	0	13

Tabelle 9: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit PTP-SL-EX. Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 10 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert.

Die Aminosäuresequenzen der besten Substrate auf dem Mikroarray wurden nicht weiter betrachtet, da sie nicht mit denen in Lösung übereinstimmen. Diejenigen der fünf besten Substrate von PTP-SL-EX, in Lösung gemessen, sind folgende:

- 97** Phe-Ser-pTyr-Asp-Gly,
- 105** Ala-Glu-pTyr-Gly-Asp,
- 122** Ala-Asp-pTyr-Tyr-Ala,
- 123** Met-pTyr-Gly-Asp-Ala,
- 131** Glu-pTyr-Asp-Asp-Gln.

Jedes dieser Peptide trägt Aminosäuren mit sauren Seitenketten, die sich in vier von fünf Fällen direkt neben dem pTyr befinden. Das beste Substrat enthält drei saure Aminosäuren und die beiden in der Literatur bekannten Substrate DGDFEEIPEEpYLQ und EGPWLEEEEEApYGWMDF^[144] tragen ebenfalls viele saure Gruppen. Daher ist anzunehmen, dass diese eine wichtige Rolle in der Erkennung von Substraten durch PTP-SL-EX spielen. Außerdem sind mit Ala, Gly, Phe und Met unpolare Aminosäuren häufig in diesen Substraten vertreten. Die Substratspezifität, die sich hieraus ergibt, ist folgende: sauer (Glu) – pTyr – sauer/unpolar (Asp/Gly) – sauer (Asp). Dabei wurden die Positionen -2 und +3 ausgehend vom pTyr nicht betrachtet, da sie statistisch gesehen nicht häufig vorkommen, weil von den 5 Peptiden 2 das Phosphotyrosin an Position 2 und 3 das Phosphotyrosin an Position 3 ausgehend vom N-Terminus tragen.

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Ergebnisse der Mikroarray-Experimente von PTP-SL-KIM zeigen eine deutlich geringere Aktivität der kürzeren Version (38.2 kDa) dieser Phosphatase. Bei 0.5 und 0.05 µg/ml Phosphatase-Konzentration wurde keines der Peptide über 40% dephosphoryliert. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die hohe Aktivität von PTP-SL-EX auf dem Mikroarray tatsächlich mit der Beschaffenheit der cytoplasmatischen Region zusammenhängt. Es wurde nur das Peptid **103** detektiert, welches von der höchsten Konzentration von PTP-SL-KIM zu über 70% dephosphoryliert wurde. Der Großteil wurde bei dieser Konzentration zwischen 70 und 40% dephosphoryliert, wodurch eine Aussage über die Substratspezifität erschwert wird. Bei der Betrachtung der Konzentration von 5 µg/ml zeichnen sich vier Substrate ab, welche stärker als die anderen dephosphoryliert werden.

PTP-SL-KIM	Mikroarray				Assay in Lösung	
	Peptid	Phosphatase-Konzentration				(freigesetztes Phosphat in nmol/min/mg Enzym)
50 µg/ml		5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml		
93	+	0	0	0	0	11
76	+	0	0	0	0	11
94	+	0	0	0	0	20
95	+	0	0	0	0	19
96	+	0	0	0	0	11
97	+	+	0	0	0	22
98	+	0	0	0	0	14
99	+	0	0	0	0	12
100	+	0	0	0	0	21
101	+	0	0	0	0	18
102	+	0	0	0	0	13
103	++	0	0	0	+	30
104	+	0	0	0	0	24
105	+	0	0	0	0	24
106	+	0	0	0	0	23
107	+	+	0	0	0	23
108	+	0	0	0	0	24
92	+	0	0	0	0	15
77	+	0	0	0	0	24
75	+	0	0	0	0	13
109	+	0	0	0	0	21
110	+	0	0	0	0	5
111	0	0	0	0	+	28
112	+	0	0	0	0	15
113	+	+	0	0	0	15
114	+	+	0	0	0	10
115	0	0	0	0	0	12
116	0	0	0	0	0	20
117	0	0	0	0	+	30
118	0	0	0	0	0	10
119	+	0	0	0	0	16
120	+	0	0	0	0	19
121	+	0	0	0	+	27
122	0	0	0	0	0	20
123	+	0	0	0	+	28
124	+	0	0	0	0	15
125	0	0	0	0	0	13
126	0	0	0	0	0	23
127	0	0	0	0	0	25
128	0	0	0	0	0	2
129	+	0	0	0	0	22
130	+	0	0	0	0	18
131	+	0	0	0	0	24
132	0	0	0	0	0	17
133	0	0	0	0	0	4
134	0	0	0	0	0	12
135	+	0	0	0	0	8
136	0	0	0	0	0	4

Mikroarray		Assay in Lösung	
Signal Intensität: 0-30% = ++ 30-60% = + 60-100% = 0	Substrat: bevorzugtes Substrat Substrat kein Substrat	Ausbeute Phosphat: >50 = ++ 25-50 = + 0-25 = 0	Substrat: bevorzugtes Substrat Substrat kein Substrat
Fehler: mittlere Abweichung 17% (min. 0%, max. 58%) beim Mikroarray ~ 10% beim Assay in Lösung		Konzentration PTP μ : 271 μ g/ml Konzentration Substrate: 100 μ M	

Tabelle 10: Daten der Dephosphorylierungs-Experimente der 48 Substrate mit PTP-SL-KIM. Der Mikroarray wurde 1 h bei 37°C und die Substrate in Lösung 10 min bei 25°C mit der Phosphatase inkubiert.

Der Lösungsassay bestätigt die geringe Aktivität von PTP-SL-KIM. Verglichen mit MPTPA und PRL-3, welche beide auch geringe Aktivität zeigten, liegt die von PTP-SL-KIM etwas höher. Dies ist deutlich an den Resultaten sowohl der Mikroarray-Experimente und auch des Lösungsassays zu erkennen. Da auch hier die Ausbeuten an Phosphat sehr wenig variieren, ist es schwierig, eine Einteilung in „bevorzugte“ und „normale“ Substrate vorzunehmen. Das Peptid **103**, welches auf dem Mikroarray am stärksten dephosphoryliert wird, ergibt auch in Lösung die höchste Ausbeute an Phosphat. Allerdings wird das Peptid **117**, welches in Lösung die gleiche Ausbeute erzielt wie Peptid **103**, auf dem Mikroarray nicht als Substrat erkannt. So kann die Übereinstimmung der Ergebnisse bezüglich der Aktivität als gut bezeichnet werden, die Erkennung der Substrate betreffend jedoch nur mäßig. Dies hängt aber wahrscheinlich mit der geringen Aktivität der Phosphatase zusammen.

Die besten Substrate, die im Lösungsassay und mittels Mikroarray erhalten wurden, sind

- 103** Leu-Ala-pTyr-Glu-Asp,
- 121** Ala-Arg-pTyr-Phe-Ala,
- 123** Met-pTyr-Gly-Asp-Ala.

Das Peptid **123** wurde ebenfalls von PTP-SL-EX als bevorzugtes erkannt. Die Sequenzen der Peptide sind wie bei PTP-SL-EX von unpolaren und sauren Aminosäuren geprägt. Nur das Arginin in Peptid **121** bildet eine auffällige Ausnahme. Wie aber bereits festgestellt, ist es aufgrund der geringen Aktivität von PTP-SL-KIM erschwert, eine Aussage über die bevorzugte Substrat-Aminosäuresequenz dieser Version von PTP-SL zu treffen.

4.2.4.6 Abschließende Bemerkungen

Die Untersuchung von Substratspezifitäten von Phosphatasen mit 48 Peptiden kann aufgrund der 320000 (2x20⁴) Permutationsmöglichkeiten von Aminosäuren in Pentapeptiden, deren Sequenzabfolgen den hier verwendeten entsprechen, nur als eine Stichprobe angesehen werden.

Daher stellen diese Untersuchungen nur einleitende Studien über die Substratspezifitäten der Phosphatasen dar. Anhand der Resultate konnte aber die Effizienz und die Validität der neuen Mikroarray-Technik demonstriert werden. Bezüglich der Aktivitäten der Phosphatasen konnten alle Ergebnisse, mit Ausnahme von PTP-SL-EX, in Lösung bestätigt werden. Bei der Erkennung der bevorzugten Substrate wurde grundsätzlich eine gute Übereinstimmung und nur bei sehr hoher oder niedriger Aktivität der Phosphatase eine mäßige erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Faktoren Zeit und Temperatur bei der Mikroarray-Technik näher zu untersuchen. Dies muss Gegenstand zukünftiger Optimierung sein, weil so die Phosphatasen mit sehr hoher oder niedriger Aktivität besser erfasst werden könnten. Außerdem sollte der Einfluss der Struktur der Proteine auf die Ergebnisse und auf Wechselwirkungen mit der Oberfläche untersucht werden, da unspezifische Wechselwirkungen möglicherweise verantwortlich für die abweichenden Ergebnisse bei PTP-SL-EX sind. Die Variation der Oberflächeneigenschaften durch die Verwendung polarer (Polyethylenglycole) oder unpolarer (Alkanketten) langer Spacer könnte dazu führen, dass diese unspezifischen Wechselwirkungen unterbunden werden.

In Tabelle 11 sind die Parameter von vergleichbaren Experimenten auf der Mikroarray- und Mikrotiter-Plattform basierend auf den hier durchgeführten Experimenten gegenübergestellt.

Mikroarray	Mikrotiterplatte
- 2*48 Peptide, 2*Cy5 (NK auf Kontroll-Assay)	- 4*48 Peptide, kein Cy5 nötig
- Zweifach-Bestimmungen/Assay (max. 288 Spots/Assay, 1440/Glasträger)	- Zweifach-Bestimmungen/Assay (PK + NK) (max. 384 Bestimmungen/Platte)
- Substrate 1 mM: 0.25 fmol/Spot	- Substrate 100 µM: 0.8 nmol/well
- 50 µl Phosphatase-Lösung/Assay	- 384 µl Phosphatase-Lösung/Assay
- 4 Assays mit Phosphatase/Glasträger	- 2 Assays mit Phosphatase/Platte
- 50 µl anti-pTyr-Antikörper (50 nM)/Assay	- 921.6 µl Malachitgrün-Lösung/Assay
- Assay durchführbar in max. 3 h/Glasträger (aber 8 Glasträger parallel möglich = 32 Assays + 8 Kontroll-Assays)	- Assay durchführbar in ca. 1 h/Platte (2 Assays pro Platte, PK und NK, hoher Zeitaufwand durch Pipettieren/Platte)
- Quantifizierung nicht möglich	- Quantifizierung möglich

Tabelle 11: Gegenüberstellung von Parametern eines vergleichbaren Experiments mit Mikroarray und Mikrotiterplatte.

Bei dem Mikroarray kann ein Kontroll-Assay neben vier Assays mit verschiedenen Phosphatase-Konzentrationen durchgeführt werden, wobei pro Phosphatase-Assay 50 µl Phosphatase-Lösung verbraucht werden. Mittels Mikrotiterplatte muss zur PK auch immer zur Bestimmung von nicht-enzymatisch freigesetztem Phosphat als Hintergrund eine NK mitgeführt werden. In diesem Beispiel sind bei 48 Peptiden mit zweifacher Bestimmung von NK und PK also 192 wells bei

einem Assay besetzt und es können zwei Assays pro 384-well-Platte durchgeführt werden. Dabei wird für einen Assay 384 μl (4 μl /well, 192 wells) Phosphatase-Lösung verbraucht, weil bei der NK Pufferlösung zum Substrat gegeben wird.

Es wird mittels Mikroarray somit wesentlich weniger Substanz bezüglich der Substrate und der Phosphatase benötigt. Außerdem können in diesem Beispiel auf dem Glasträger gleichzeitig doppelt so viele Assays wie auf der Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Geht man nun von einer höheren Anzahl an Substraten aus, so ist es möglich, mittels Mikroarray pro Assay 144 Peptide in Doppelbestimmung zu untersuchen und dabei immer noch vier Assays pro Glasträger mit der gleichen Menge an Phosphatase-Lösung durchzuführen. Erhöht man die Substratanzahl in der Mikrotiterplatte, so kann pro Platte nur noch ein Assay durchgeführt werden. Dies vergrößert den Zeitaufwand und den Verbrauch an Phosphatase-Lösung.

Die angegebene Dauer der Experimente für den Mikroarray von 3 h ist aufgrund der durchgeführten Experimente genannt. Da der Faktor Zeit hier nicht weiter untersucht werden konnte, ist eine schnellere Durchführung durchaus möglich. Vergleicht man jedoch diesen Zeitaufwand mit dem bei den Mikrotiterplatten-Assays, so wird deutlich, dass sogar bei einer Dauer von 3 h durch die Möglichkeit, acht Glasträger parallel zu behandeln, ein erheblicher Vorteil mit dem Mikroarray entsteht.

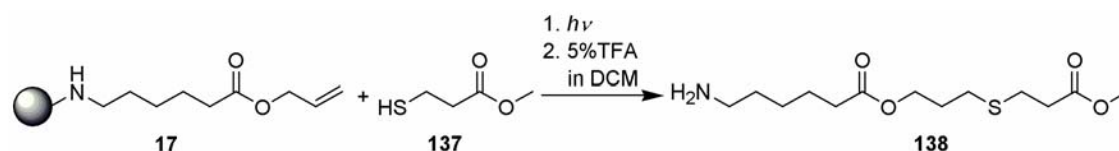
Ein Nachteil, der sich auch bei der Auswertung von wenig bzw. hoch aktiven Phosphatasen bemerkbar gemacht hat, ist die nicht durchführbare Quantifizierung auf dem Mikroarray. Wie aber bereits beschrieben, sollte die Untersuchung der Parameter Zeit und Temperatur zu einer besseren Auflösung der Unterschiede der Substratgüte führen.

Somit wird deutlich, dass der Mikroarray aufgrund der geringen Mengen an Analyten, dem niedrigen Zeitaufwand und der Parallelisierung der Untersuchung von zahlreichen Substraten eine Hochdurchsatz-Technik darstellt. Die Möglichkeiten des Mikrotiterplatten-Assays sind bezüglich dieser Eigenschaften begrenzt. Daher ist es sinnvoll, einleitende Untersuchungen zu Substratspezifitäten von PTPs mit Mikroarrays durchzuführen, um ein rasches Ergebnis mit möglichst wenig Analyt-Verbrauch zu erzielen. Weiterführende Studien können dann mittels Mikrotiterplatten stattfinden, die den Vorteil der möglichen Quantifizierung von Phosphatase-Aktivität und -Substratspezifität mit sich bringen.

4.3 Herstellung strukturierter Oberflächen mittels Licht-induzierter Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen

4.3.1 Evaluierung der Reaktion und Selektivitätstests am polymeren Träger

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 sollte auch im Falle der Licht-induzierten Addition von Mercaptanen an Doppelbindungen Modellstudien am polymeren Träger durchgeführt werden, um die Eignung der Reaktion zur Strukturierung von Glasoberflächen zu bewerten. Dazu wurde zunächst der bereits zur Evaluierung der Phosphine verwendete (Kapitel 4.1.2), Harz-gebundene Aminocapronsäureallylester **17** mit 3-Mercaptopropionsäuremethylester **137** unter verschiedenen Bedingungen umgesetzt (Schema 28, Tabelle 12). Dabei wurden jeweils ein Äquivalent Harz und 21 Äquivalente des Mercaptans eingesetzt.



Schema 28: Licht-induzierte Addition des Mercaptans **137** an den Harz-gebundenen Allylester **17**.

Lösungsmittel	Belichtungsdauer	Additiv	Umsatz (¹ H-NMR)
abs. MeOH	3 h	-	44%
abs. DMF	1 h	-	56%
abs. DMF	2 h	-	91%
abs. DMF	3 h	-	100%
abs. DMF	2 h	Ethylendiamin	12%
abs. DMF	3 h	5-Bromvaleriansäure	90%

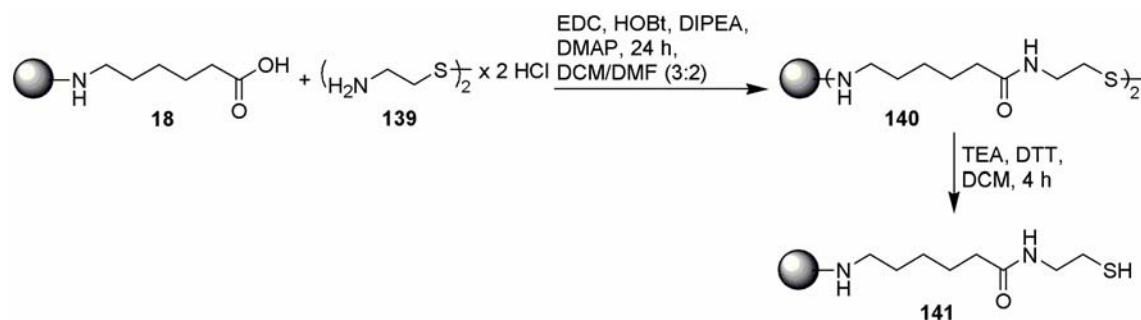
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen zur Licht-induzierten Addition von Mercaptan **137** an Doppelbindung **17**.

Wie in der Literatur beschrieben^[108] wurde zunächst absolutes Methanol als Lösungsmittel und eine Belichtungszeit von 3 h verwendet, was aber nach Abspaltung zu einem Umsatz von nur 44% führte, wobei aber kein Nebenprodukt gefunden wurde. Die Ausbeute könnte mit den Eigenschaften des Merrifield-Harzes in Verbindung stehen, welches in Methanol kaum quillt. Dadurch werden die reaktiven Gruppen, die sich im Inneren des polymeren Trägers befinden, für den in Lösung befindlichen Reaktionspartner unzugänglich. Aus diesem Grunde und auch weil für die Reaktion auf der Oberfläche ein hochsiedendes Lösungsmittel vorteilhaft ist um die Austrocknung zu verlangsamen, wurde absolutes DMF für weitere Testreaktionen verwendet.

Nach dreistündiger Belichtung wurde nach Abspaltung vom Harz reines Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten. Dieses Ergebnis lieferte bereits eine sehr gute Voraussetzung für die Immobilisierungsreaktion an der Glasoberfläche. Es wurden daraufhin weitere Versuche mit verkürzter Belichtungszeit durchgeführt, um die Belichtung an der Oberfläche so kurz wie möglich zu gestalten. Die Belichtungszeiten von 1 und 2 h führten aber wiederum zu unvollständigem Umsatz.

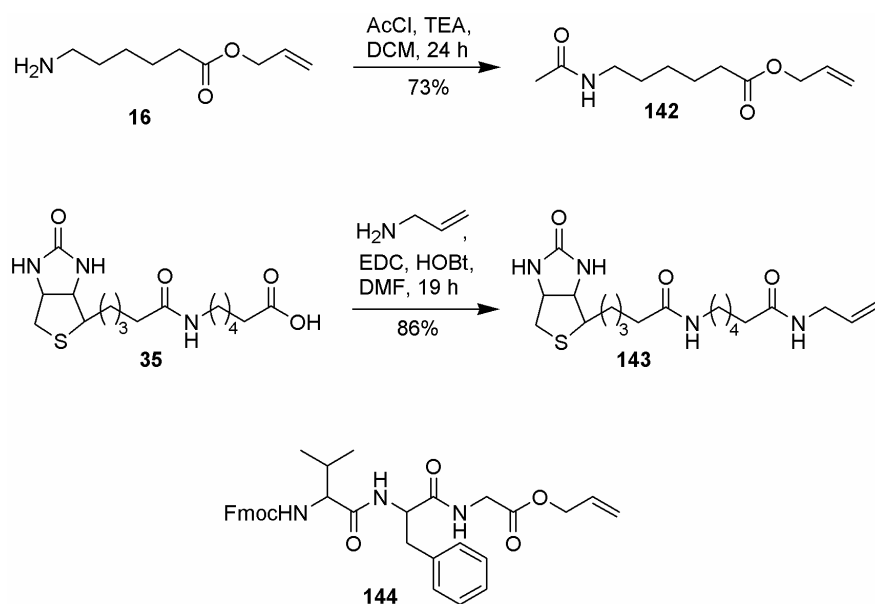
Zur Überprüfung der Selektivität der Immobilisierungsreaktion wurden mit diesem Modellsystem zwei Experimente durchgeführt, in denen zum einen 21 Äquivalente Ethylendiamin und zum anderen ebenfalls 21 Äquivalente Bromvaleriansäure zur Konkurrenzreaktion hinzugegeben wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die Anwesenheit des Ethylendiamins den Umsatz des Edukts **17** zum Produkt **138** in vergleichbarer Belichtungszeit um 79% herabsetzte, aber gleichzeitig wiederum nur das abgespaltene Edukt **17** und Produkt **138** und kein Nebenprodukt im $^1\text{H-NMR}$ nachgewiesen werden konnten. Das kann möglicherweise mit der Änderung des pH-Wertes durch die Amine zusammenhängen, wodurch die Thiole deprotoniert werden und somit die homolytische Spaltung zwischen Schwefel und Wasserstoff nicht mehr stattfinden kann. Eine Herabsetzung der Ausbeute wurde ebenfalls bei Zusatz von Bromvaleriansäure zur Reaktionsmischung beobachtet, allerdings geschah dies nur im geringen Maße von 9%. Die Nebenreaktion von Thiolen mit Bromiden, wobei Bromide durch ionische Anteile in der Reaktionslösung selber durch Schwefel substituiert werden, ist in der Literatur bekannt,¹¹¹ spielt aber hier nur eine unbedeutende Rolle. Dies kommt in der geringen Herabsetzung der Ausbeute zum Ausdruck. Die Tatsache, dass in dieser Konkurrenzreaktion keine Nebenprodukte seitens der Doppelbindung gebildet werden, wie z.B. durch die radikalische Addition des Broms an das Alken, verdeutlicht die Selektivität dieser Reaktion. So wird das Radikal bemerkenswerter Weise nicht von dem Schwefel auf das Brom übertragen. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die endständige Doppelbindung unter diesen Bedingungen selektiv mit dem Thiol **137** reagiert.

Die Einführung einer Doppelbindung nach der SPOS-Aktivierungsstrategie ist bereits von Peters et al. beschrieben worden.^[180] Ein Mercaptan müsste meist in geschützter Form eingebracht werden, da es als Nukleophil oder als Reduktionsmittel Nebenreaktionen eingehen kann. Somit ist die Einführung einer terminalen Doppelbindung gegenüber derjenigen einer Mercaptogruppe erleichtert. Daher wurde entschieden, die Oberflächen mit Thiolen zu funktionalisieren. Dazu sollten weitere Testreaktionen am polymeren Träger gemacht werden, wobei das Thiol am Harz angeknüpft war.



Schema 29: Synthese des Thiol-funktionalisierten Harzes **141** für Testreaktionen.

Zur Synthese des Thiol-funktionalisierten Harzes wurde die vorher zur Evaluierung der Phosphine synthetisierte Festphasen-gebundene Carbonsäure **18** mit Cystamindihydrochlorid **139** umgesetzt und anschließend das Disulfid zum Thiol reduziert (Schema 29). Für die Testreaktionen wurde von einer Beladung ausgegangen, die auf dem vollständigen Umsatz der Funktionalisierungsreaktionen des Harzes basiert. Als Reaktionspartner wurde der 6-Acetylamidocapronsäureallylester **142** aus dem Aminocapronsäureallylester **16** durch Schützung der Aminogruppe hergestellt. Außerdem wurde Biotincapronsäureallylamid **143** analog den in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Biotinverbindungen synthetisiert. Als weitere Testsubstanzen wurden der von C. Peters synthetisierte Peptidoallylester **144** sowie Allylalkohol eingesetzt (Schema 30).^[154]

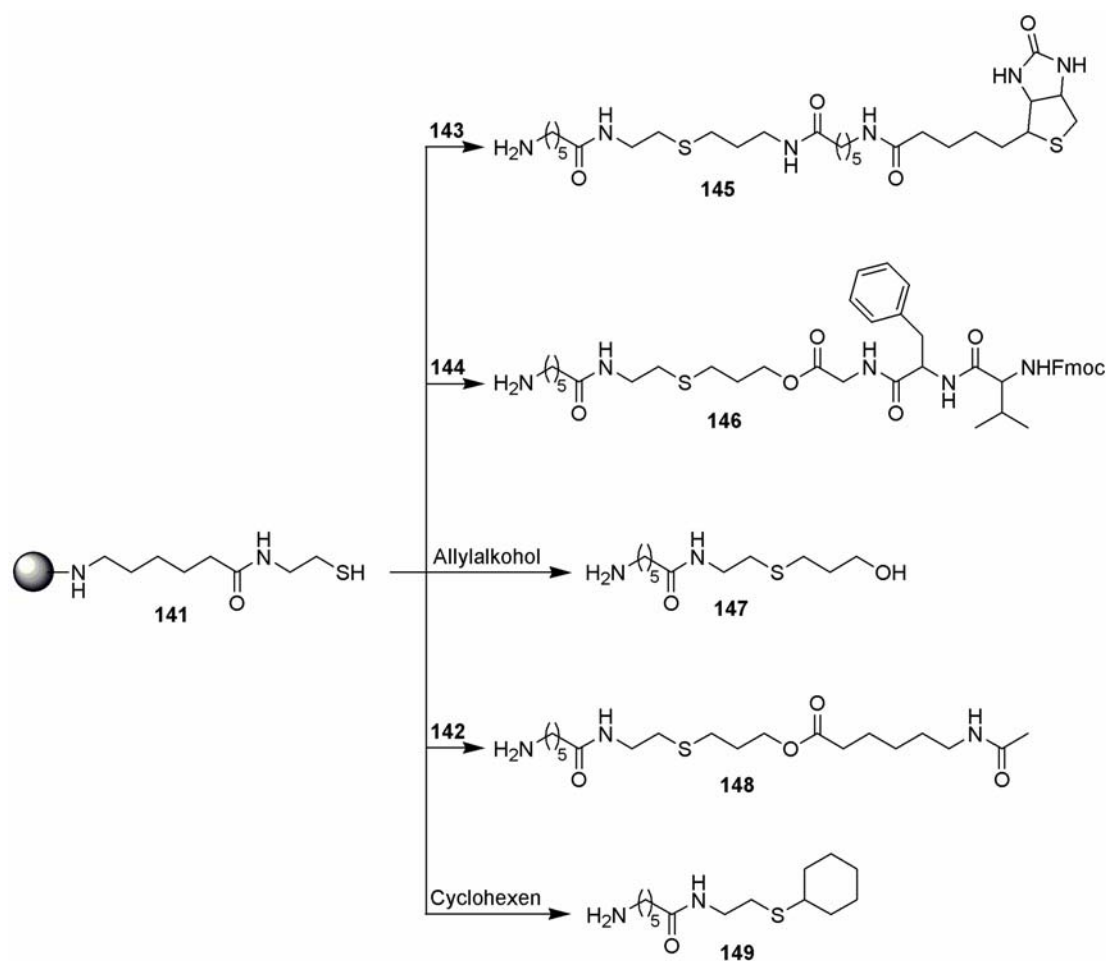


Schema 30: Synthese der zur Testreaktion benötigten Verbindungen **142** und **143**; Struktur des Peptidoallylesters **144**.

Da die Reaktionsbedingungen für einen 100%igen Umsatz bereits zuvor bestimmt worden waren, wurden die folgenden Testreaktionen zur Addition des Festphasen-gebundenen Thiols **141** an die terminalen Doppelbindungen in einem kleinen Maßstab durchgeführt und die

Entstehung des Produkts lediglich durch Massenspektrometrie sowie HPLC detektiert. Es wurde jeweils ein Äquivalent Thiol-funktionalisiertes Harz mit 10 Äquivalenten der Alken-enthaltenden Verbindung sowie gegebenenfalls mit 10 Äquivalenten des Additivs zur Konkurrenzreaktion in absolutem DMF umgesetzt. Schema 31 und Tabelle 13 zeigen die Reaktionen und die Bedingungen.

Alle Produkte wurden nach der Reaktion als Hauptbestandteile der abgespaltenen Mischungen erhalten. Im Falle der Reaktion mit Biotincapronsäureallylamid **143** und dem Peptidallylester **144** konnte das abgespaltene Thiol noch in geringen Mengen nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass die Umsetzung zwar nicht vollständig war, aber dennoch in guten Ausbeuten ablief. Dies lässt sich auch an dem Produkt **148** der Reaktion mit dem Acetamidocapronsäureallylester **142** belegen, der in einer Ausbeute von 77% nach einer nur zweistündigen Belichtungsdauer ohne weitere Aufreinigung fast rein isoliert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Variante, bei der das Thiol an der Oberfläche gebunden ist, ebenfalls vielversprechend für die Nutzung dieser Reaktion für Oberflächenstrukturierungen ist.



Schema 31: Testreaktionen mit dem Harz-gebundenem Thiol **141**.

Belichtungs- dauer	Alken-enthaltende Verbindung	Additiv	Produkt (Detektion)	Hauptprodukt : Nebenprodukt 149
2 h	6-Acetylamido- capronsäureallylester 142	-	148 ; Ausbeute 77% (isoliertes Produkt)	-
2 h	6-Acetylamido- capronsäureallylester 142	Cyclohexen	148 ; Hauptbestandteil (HPLC-ESI)	2 : 1
3 h	Biotincapronsäure-allylamid 143	-	145 ; Hauptbestandteil (HPLC-ESI)	-
3 h	Peptidoallylester 144	-	146 ; Hauptbestandteil (FAB-HR; ESI)	-
2 h	Allylkohol	Cyclohexen	147 ; Hauptbestandteil (HPLC-ESI)	Spuren von 149

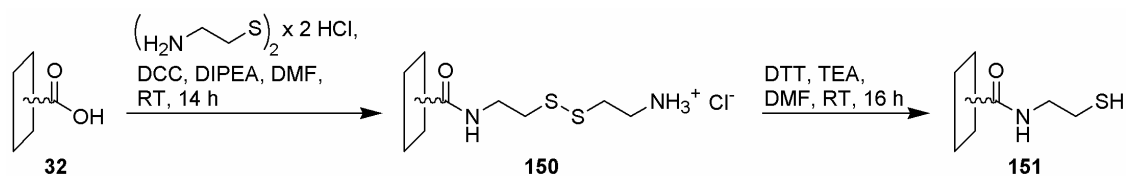
Tabelle 13: Bedingungen der Testreaktionen aus Schema 31.

Die Zugabe von Cyclohexen, welches generell als Radikalfänger eingesetzt wird, sollte zeigen, ob die Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an endständige Doppelbindungen selektiv bezüglich des Thiols abläuft. Während in der Testreaktion, in der das Cyclohexen kompetitiv mit dem Allylkohol reagiert, nur Spuren des Nebenproduktes **149** entstanden, lag es in der zweiten Testreaktion als Konkurrent zum 6-Acetylamidocapronsäureallylester **142** mit dem Hauptprodukt **148** in einem Verhältnis von 1:2 (**149** : **148**) vor. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass hier der sterische Faktor eine Rolle spielt, da der Allylkohol sowie das Cyclohexen kleiner als 6-Acetylamidocapronsäureallylester **142** sind und daher schneller durch die inneren Zwischenräume des polymeren Trägers diffundieren können. Dadurch, dass sich eine mit dem terminalen Alken konkurrierende Doppelbindung in einem gespannten Ring bei der Oberflächenstrukturierung am gleichen Molekül befinden würde, entfällt aber der Faktor der schnelleren Diffusion. Betrachtet man also das Ergebnis der Konkurrenzreaktion mit dem Allylkohol, wurde mit der Licht-induzierten Addition an die terminale Doppelbindung eine erstaunlich hohe Chemoselektivität erzielt.

Somit konnten durch die Evaluierung sowie die Selektivitätstests zur Licht-induzierten Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen am polymeren Träger sehr gute Voraussetzungen für eine Reaktion zur chemoselektiven Oberflächenstrukturierung festgestellt werden.

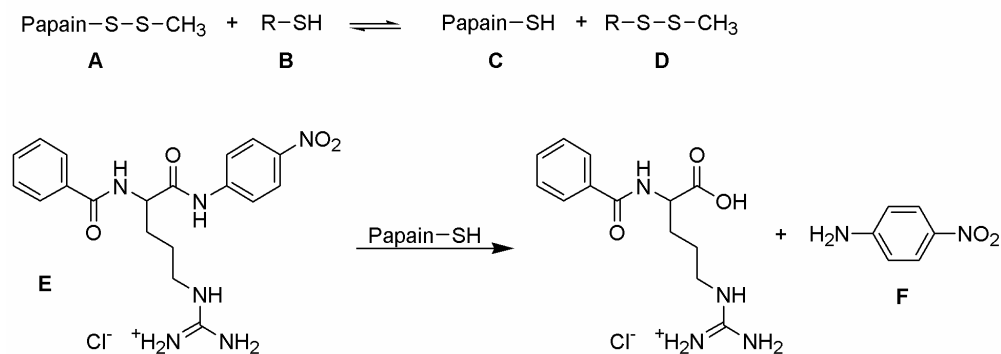
4.3.2 Immobilisierung von Haptenen mittels Licht-induzierter Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen

Die Immobilisierungsreaktion sollte mit Hilfe des Biotinallylamids **143**, welches schon vorher in Testreaktionen am polymeren Träger eingesetzt worden war (Kapitel 4.3.1, Schema 30), mit Streptavidin-Cy5 als Nachweis evaluiert werden. Die benötigten Thiol-funktionalisierten Glasträger wurden wie in Schema 32 gezeigt synthetisiert. Dendrimer-überzogene Carbonsäure-funktionalisierte Objektträger der Firma Chimera Biotec wurden mit DCC und Cystamindihydrochlorid umgesetzt und anschließend wurde Disulfid **150** mit DTT zum Thiol reduziert. Die Funktionalisierung im ersten Schritt war ebenfalls mit EDC an Stelle von DCC versucht worden, ergab aber bei Testimmobilisierungen mit Biotin (s.u.) schlechtere Ergebnisse und wurde daher nicht mehr angewendet.



Schema 32: Funktionalisierung der Glasträger mit Thiolen.

Die Anwesenheit der Thiole auf der Oberfläche wurde mit dem Thiol Quantification Kit (Molecular Probes) überprüft. Der Test basiert auf einem Thiolaustausch eines *S*-Papain-*S*-methylsulfids **A** mit dem zu detektierenden Thiolen **B** (Schema 33). Das Methylthiol wird auf das zu bestimmende Thiol **B** übertragen während das freie, Papain-haltige Thiol **C** entsteht. Dieses reagiert dann mit dem Substrat *L*-BAPNA (*N*-Benzoyl-*L*-arginin-*p*-nitroanilid) **E**, wobei der *p*-Nitroanilin-Chromophor **F** abgespalten wird. Die Menge Chromophor kann mittels UV-Spektroskopie bestimmt werden und entspricht der Menge an zu bestimmenden Thiol. Cystein dient hierbei als Standard für die Kalibrierung.



Schema 33: Prinzip des Thiol Quantification Kit (Molecular Probes).

Dazu wurde ein Stück vom Glasträger abgeschnitten und mit dem Papain-haltigen Reagenz inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mit *L-BAPNA* behandelt und die Extinktion im UV-Spektrometer gemessen. Zur Bestimmung der gemessenen Fläche wurde das Glasstück sowie bereits zuvor der gesamte Glasträger gewogen und das Gewichtsverhältnis auf das Flächenverhältnis umgerechnet. In Bezug auf eine Kalibrierungsreihe mit Cystein wurde ein Wert von 160 pmol/mm^2 Thiol auf der Oberfläche erhalten. Da aber die abgeschnittenen Kanten sowie das Abwiegen den Wert verfälschen könnten, wurden zwei weitere Thiol-funktionalisierte Glasträger gemessen, indem eine 1 cm^2 große Hybridisierungskammer auf den Trägern angebracht wurde und so eine definierte Fläche inkubiert werden konnte. Die daraus ermittelten Werte von 87 pmol/mm^2 und 103 pmol/mm^2 liegen in der gleichen Größenordnung des zuvor bestimmten Wertes. Allerdings ist für diesen Test angegeben, dass er nur für einen Bereich von 0.2 nmol bis 1.5 nmol verwertbar sei. Daher konnte mit diesem Experiment zwar die Anwesenheit der Thiole auf der Oberfläche nachgewiesen werden, aber die Angabe der absoluten Menge sollte mit Vorsicht betrachtet werden.

Im ersten Immobilisierungsexperiment wurden Biotinallylamid **143** und Biotinpropylamid **38** in den Lösungsmitteln abs. DMF, abs. DMF/Toluol (3:1) sowie abs. NMP in einer Konzentration von 0.1 mM auf die Oberfläche **151** mit einer Eppendorfpipette gespottet. DMF hatte sich zuvor am polymeren Träger als Lösungsmittel bewährt und NMP sollte als höher siedendes Lösungsmittel erprobt werden. Das mit Toluol versetzte DMF wurde getestet, da das Polystyrol in den Vorversuchen möglicherweise zur Energieübertragung beigetragen haben könnte und somit die guten Ausbeuten ermöglichte. Nach dem Spotten wurden die Glasträger 3 h belichtet und mit DMF und Wasser intensiv gewaschen. Der Nachweis wurde durch Inkubation mit einer 100 nM Lösung von Streptavidin-Cy5 von R. Wacker ausgeführt (Abbildung 29).

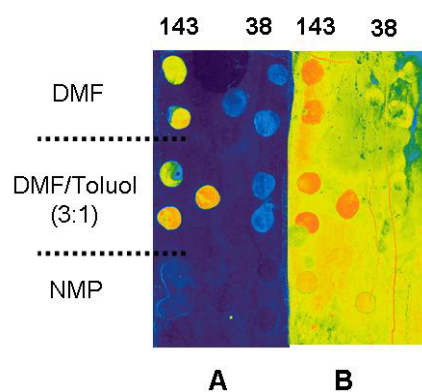


Abbildung 29: Nachweis der Immobilisierung von Biotinallylamid **143** und Biotinpropylamid **38** auf Thiol-funktionalisierten Oberflächen mit STV-Cy5; Testung verschiedener Lösungsmittel. A: Dendrimer- Glasträger; B: Silan- Glasträger

Abbildung 29A zeigt das Ergebnis der Dendrimer-überzogenen Thiol-funktionalisierten Glasträger. Das Experiment ergab eindeutig, dass die Anbindung über die Doppelbindung

verlief, da die Negativkontrolle **38** nicht detektiert werden konnte. Bezüglich der Lösungsmittel lief die Reaktion tatsächlich in DMF/Toluol (3:1) am besten ab, während sie in NMP überraschenderweise gar nicht stattfand. Daher wurden die Immobilisierungen nachfolgend immer in DMF/Toluol (3:1) durchgeführt.

Wie schon in Kapitel 4.1.4 wurden hier ebenfalls die Auswirkungen der Anwesenheit der Dendrimere auf der Oberfläche untersucht. Es wurde ein Glasträger, der mit Aminosilan und darauf folgend mit Glutarsäureanhydrid modifiziert worden war (Chimera Biotec), wie zuvor in Schema 32 beschrieben mit Thiolen funktionalisiert, wie bereits beschrieben bespottet und belichtet. Die in Abbildung 29B dargestellten Resultate sind mit denen der Dendrimerüberzogenen Glasträger vergleichbar, nur dass ein starkes unselektives Binden des Streptavidins einen hohen Hintergrund verursacht. Somit sind die Wechselwirkungen, aufgrund derer das Biotinylamid **143** an der Oberfläche gebunden ist, nicht auf die Dendrimere zurückzuführen. Zugleich verhelfen die Dendrimer-beschichteten Oberflächen zu einem scharfen Signal und niedrigem Hintergrund. In den nachfolgenden Experimenten wurden daher immer Dendrimerbeschichtete Glasträger verwendet.

Die Stabilität der Bindung zur Oberfläche wurde in einem Regenerierungsexperiment untersucht. Biotinylamid **143** wurde in den Konzentrationen von 0.1 mM und 0.01 mM auf einem Thiol-funktionalisierten Glasträger immobilisiert. Nach dem Nachweis mit einer 100 nM Lösung von Streptavidin-Cy5 (Abbildung 30A) musste der Glasträger aufgrund der starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin mehrmals stringent mit 0.1%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung bei 80°C gewaschen werden (Abbildung 30B und C). Anschließend wurde wieder mit Streptavidin-Cy5 inkubiert (Abbildung 30D, durchgeführt von R. Wacker).

Die erneute Inkubation mit Streptavidin-Cy5 lieferte den Nachweis, dass das Biotin fortwährend auf der Oberfläche anwesend war. Die Fluoreszenzsignale zeigten eine Intensität, die in dem Bereich der ursprünglichen lag. Die Hintergrundsignalintensität war jedoch erhöht, so dass anzunehmen ist, dass der stringente Waschvorgang die Oberfläche generell beschädigt hat. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Anbindung des Biotins an die Oberfläche auf einer stabilen, kovalenten Bindung beruht.

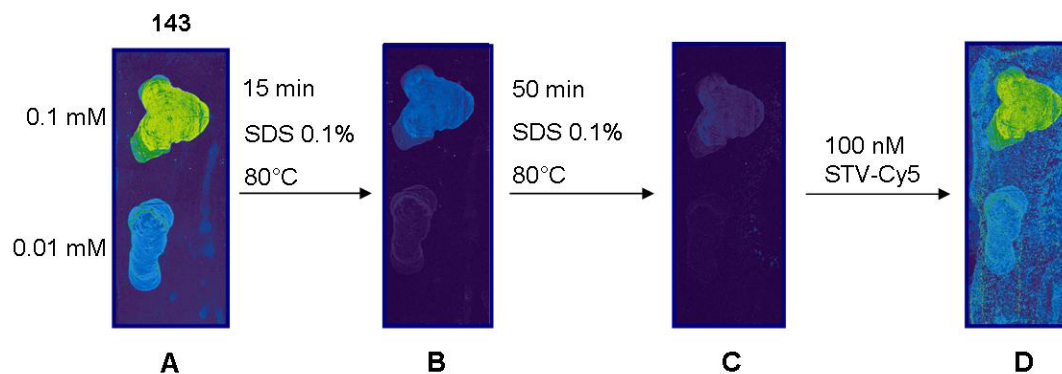


Abbildung 30: Experiment zur Regenerierung der Oberfläche; A: Nachweis von Biotinallylamid **143** durch Bindung von Streptavidin-Cy5; B und C: Stringentes Waschen mit 0.1% SDS-Lösung; D: Erneutes Binden von Streptavidin-Cy5.

Im nächsten Schritt sollte die Abhängigkeit der Reaktion von der Belichtung untersucht werden. Dazu wurden Biotinallylamid **143** und Biotinpropylamid **38** in einem Konzentrationsgradienten mit einem Handspottter auf zwei Thiol-funktionalisierte Glasträger gespottet. Die Besspottung durch einen Roboter im Nicht-Kontakt Verfahren war wegen der geringen Oberflächenspannung des Lösungsmittels nicht möglich. Daher wurde im Folgenden immer mit dem Handspottter gespottet. Einer der Glasträger wurde 3 h bei 365 nm belichtet, der andere wurde nach dem Spotten unter Laborlicht 3 h im Dunkeln verwahrt. Nach intensivem Waschen mit DMF und Wasser wurde die Anbindung wiederum mit einer 100 nM Lösung von Streptavidin-Cy5 nachgewiesen (Abbildung 31).

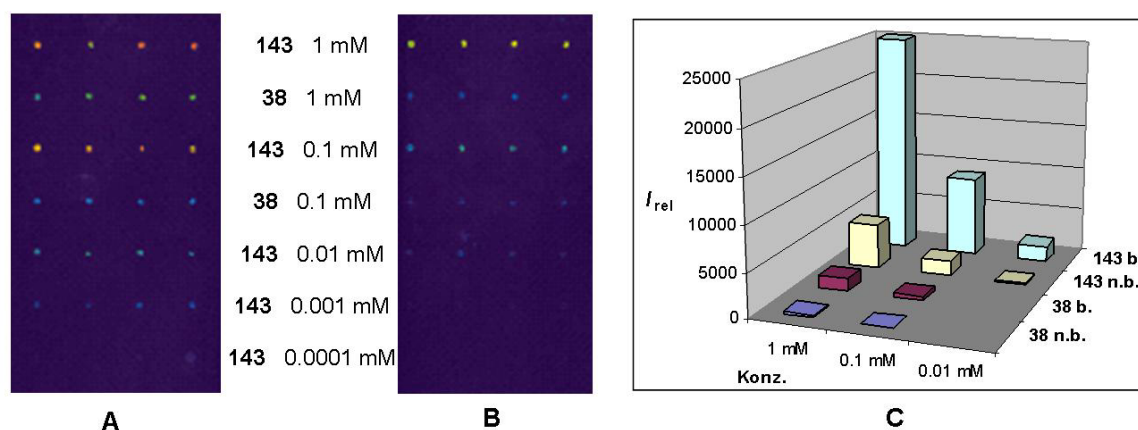
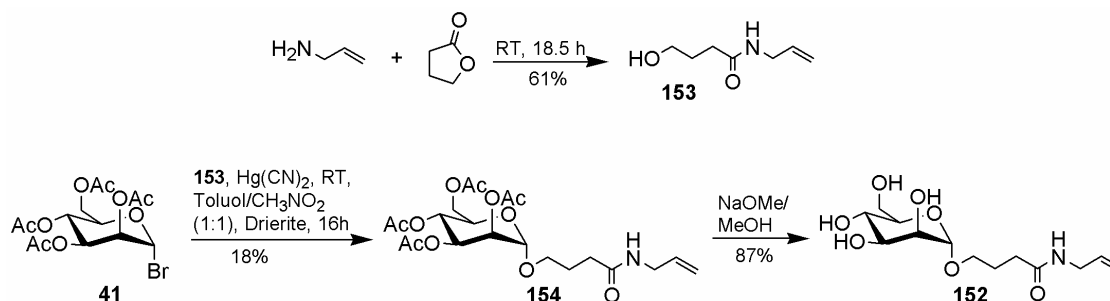


Abbildung 31: Nachweis der Anbindung von in einem Konzentrationsgradienten immobilisierten Biotin **143** mit STV-Cy5; A: 3 h bei 365 nm belichteter Glasträger; B: 3 h im Dunkeln verwahrter Glasträger; C: Histogramm der Signalintensitäten mit I_{rel} = Fluoreszenzsignalintensität (relative Einheiten), b. = belichtet und n.b. = nicht belichtet.

In Abbildung 31A ist der Glasträger dargestellt, der 3 h belichtet worden ist. Die Signalintensitäten entsprechen dem Konzentrationsgradienten und die Nachweisgrenze für das Biotinallylamid **143** liegt bei 1 μM . Es ist ein klarer Intensitätsunterschied beim Nachweis des Biotinallylamids zur Negativkontrolle **38** zu sehen. Die Spuren der Negativkontrolle, die nachgewiesen wurden, sind in der Eintrocknung der Substanz und ungenügendem Waschen begründet. Der in Abbildung 31B dargestellte Glasträger war unter Laborlicht gespottet und dann im Dunkeln verwahrt worden. Im Vergleich zu dem belichteten Träger wurden wesentlich geringere Signale detektiert. Dies wird in dem in Abbildung 31C dargestellten Histogramm verdeutlicht. Somit konnte gezeigt werden, dass die Reaktion an der Oberfläche abhängig von dem eingestrahlt Licht ist und damit die Immobilisierung durch Masken zur Oberflächenstrukturierung möglich sein sollte.

Um zu zeigen, dass die Licht-induzierte Immobilisierung nicht nur für biotinylierte Verbindungen anwendbar ist, wurde analog dem in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Mannose-Azid **43** das Mannosallylamid **152** synthetisiert (Schema 34), zusammen mit der nativen Mannose **44** gespottet und 3 h belichtet. Stringentes Waschen mit DMF und Wasser und anschließende Inkubation mit Alexa-Fluor-647-markiertem Concanavalin A (2 μM) lieferte sehr schwache Signale und wie schon bei der Immobilisierung durch Staudinger-Ligation einen relativ hohen Hintergrund (Abbildung 32).



Schema 34: Synthese des Mannosallylamids **152**.

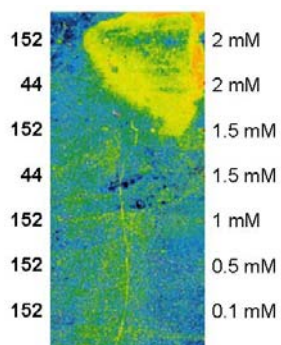
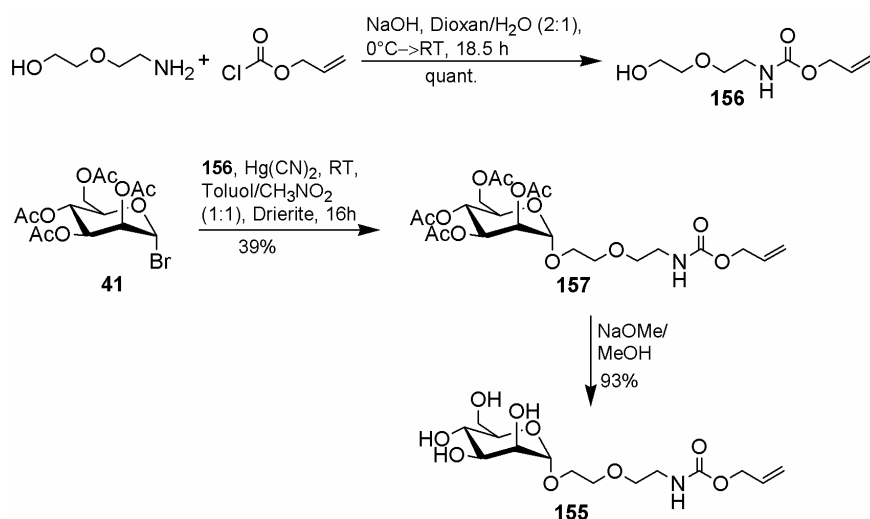


Abbildung 32: Der Nachweis der immobilisierten Mannose **152** mit Concanavalin A (19.2 μM) lieferte sehr schwache Signale.

Dieses Ergebnis könnte mit dem im Gegensatz zum Mannose-Azid **43** verkürzten Linker des Mannosallylamids **152** zusammenhängen. Dies kann die ohnehin schwache Wechselwirkung des

Concanavalin A mit der Mannose durch erschweren Zugang verringern. Außerdem wurden bei in der Literatur beschriebenen Kohlenhydrat-Mikroarrays häufig polare Polyethylenglycol-Linker verwendet,^[46h,46i] so dass im nächsten Schritt das Mannoseallylamid **155**, welches einen polaren, um zwei Atome verlängerten Linker trägt, synthetisiert wurde (Schema 35). Immobilisierung zusammen mit Mannose **44**, intensives Waschen mit DMF und Wasser und Nachweis mit Concanavalin A ergaben einen ähnlichen Hintergrund wie zuvor, aber wesentlich stärkere Signale (Abbildung 33). Die Fluoreszenzsignale bei einer Konzentration von 1 mM Mannoseallylamid **155** lagen im Bereich des Mannose-Azids **43**, was auf eine ähnlich gute Kupplungseffizienz der Licht-induzierten Immobilisierungsreaktion verglichen mit der Staudinger-Ligation hinweist. Weiterhin verdeutlicht dieses Resultat den wichtigen Einfluss von Linkern auf biologische Wechselwirkungen bei Untersuchungen mit Mikroarrays.



Schema 35: Synthese des Mannoseallylamids **155**.

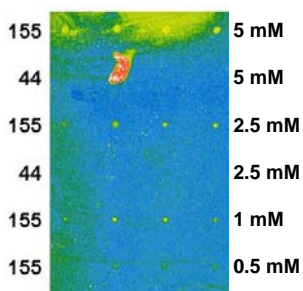
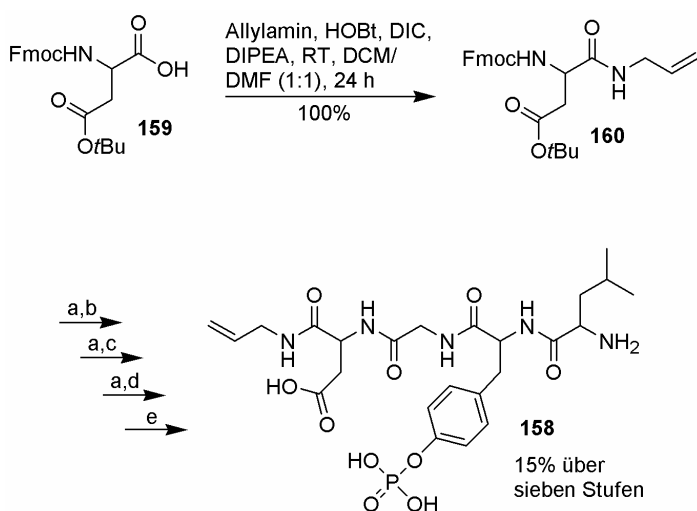


Abbildung 33: Nachweis der immobilisierten Mannose **155** mit Concanavalin A (19.2 μ M).

Als weiteres Beispiel für die Selektivität und Effizienz dieser Immobilisierungsreaktion sollte das Phosphopeptid **158** immobilisiert und mit anti-pTyr-Antikörper nachgewiesen werden. Es wurde in Lösung analog denjenigen am polymeren Träger hergestellt (Schema 36 und auch Kapitel 4.2.2). Das Abspalten der Fmoc-Gruppe erfolgte dabei nicht wie zuvor mit Piperidin in DMF sondern mit Diethylamin/DCM (4:1), da diese Mischung mittels Rotationsverdampfer einfach

entfernt werden konnte und keine weitere Aufarbeitung notwendig war. Das Phosphopeptid **158** wurde in einer Ausbeute von 15% über sieben Stufen erhalten.

Spotten im Konzentrationsgradienten, dreistündige Belichtung, Waschen mit DMF und Wasser und Nachweis mit dem Konjugat aus biotinyliertem anti-pTyr-Antikörper- und Streptavidin-Cy5 (50 nM, Abbildung 34) ergaben hohe Fluoreszenzsignalintensitäten wie zuvor in Kapitel 4.2.3. Dies zeigt, dass das Phosphotyrosin weder durch die Schwefelradikale noch durch die Einstrahlung des UV-Lichts beschädigt worden war. Die Signalabnahme bei höherer Konzentration wurde hier ebenso beobachtet, mit dem Maximum an Signalintensität bei einer Phosphopeptid-Konzentration von 0.5 mM und einer Nachweisgrenze von 10 µM, was wiederum für eine Ursache dieses Phänomens spricht, die nicht mit der Art der Immobilisierung zusammenhängt. Wie die Resultate der Immobilisierung des Mannoseallylamids **155** sprechen auch die des Phosphopeptids für eine gute Bindungseffektivität und Selektivität, welche vergleichbar mit denen der Staudinger-Ligation sind.



Schema 36: Synthese des Phosphopeptids **158** in Lösung. a: DCM/Diethylamin (4:1); b: Fmoc-Gly-OH, HOBT, DIPEA, HBTU, DMF/DCM (1:1), RT, 20 h; c: Fmoc-pTyr[(NMe₂)₂]-OH, HOBT, DIPEA, PyBOP, DMF, RT, 12 h; d: Boc-Leu-OH, HOBT, DIPEA, HBTU, DMF/DCM (1:1), RT, 12.5 h; e: 1. TFA/DCM/TES (95:2.5:2.5), RT, 3 h, 2. H₂O, RT, 13 h.

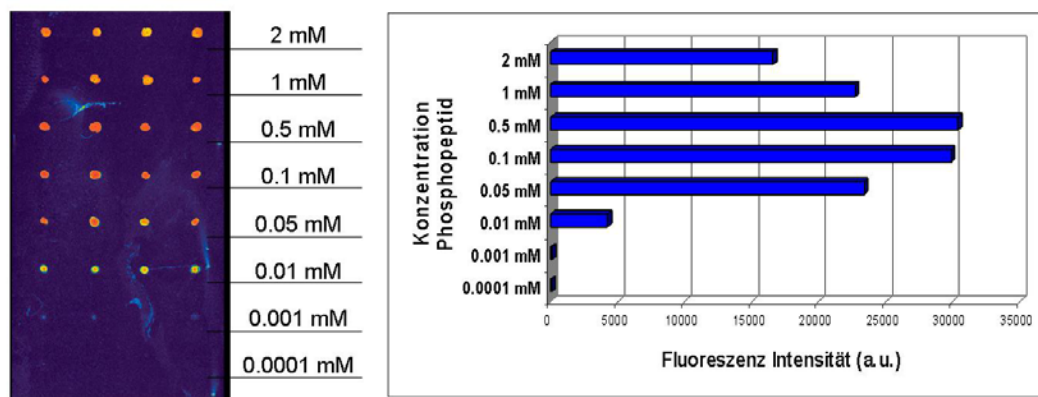


Abbildung 34: Nachweis des Phosphopeptids **158** mit dem biotinylierten anti-pTyr-Antikörper-Streptavidin-Cy5 Konjugat und Histogrammdarstellung der Signalintensitäten.

Es sollte anschließend untersucht werden, ob die Licht-induzierte Reaktion eine Sättigung nach einem bestimmten Zeitraum erreicht. Außerdem war in dem zuvor geführten Experiment keine Negativkontrolle verwendet worden, so dass durch eine zeitabhängige Kontrolle die Abhängigkeit der Anbindung des Phosphopeptids **158** von der Belichtung geprüft werden sollte. So wurde das Phosphopeptid **158** in einer Konzentration von 1 mM auf Thiol-funktionalisierte Glasstücke gespottet, welche dann belichtet wurden. Nach jeweils 45 Minuten wurde ein Glasstück unter der UV-Lampe hervorgehoben und mit DMF und Wasser gewaschen. Als Negativkontrolle (nk) diente ein bespottetes Glasstück, welches 315 Minuten im Dunkeln aufbewahrt worden war. Im Anschluß erfolgte der Nachweis wiederum mit dem anti-pTyr-Antikörper Konjugat (50 nM) (Abbildung 35). Dabei wurde festgestellt, dass sich die Signalintensität bereits nach 135 Minuten nicht weiter erhöhte, d.h. eine Sättigung eingetreten war. Dies zeigte ebenso, dass die Anbindung des Phosphopeptids von der Lichteinstrahlung abhängig war. Die Signalintensität der Negativkontrolle lag im Bereich derjenigen nach 45 Minuten Belichtungszeit, was bedeutet, dass 45 Minuten für eine sichtbare Immobilisierung nicht ausreichen. Allerdings wurde trotzdem bei diesen zwei Proben ein sehr hohes Signal erhalten. Ursache dafür könnten nicht-kovalente Wechselwirkungen des Peptids mit der polaren Oberfläche sein. Diese ließen sich durch ein stringenteres Waschen wie beispielsweise mit Puffer-Lösung beheben, welche ionische Bindungen lösen könnte. Dazu wurde ein Versuch mittels Photolithographie durchgeführt, der in Kapitel 4.3.3 beschrieben ist.

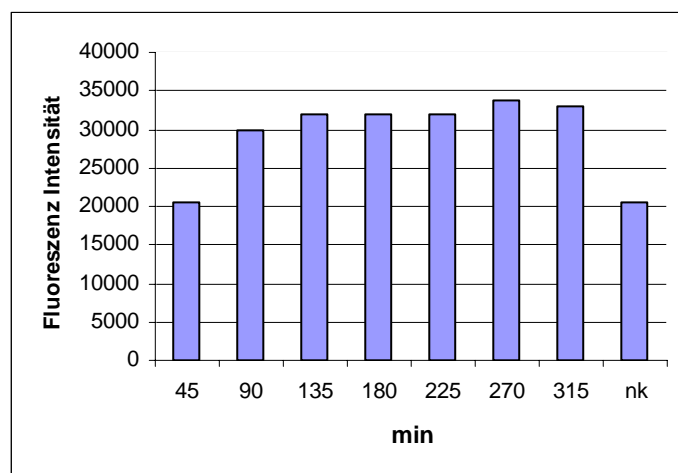


Abbildung 35: Histogramm der Signalintensitäten der zeitabhängigen Immobilisierung von Phosphopeptid **158**.

4.3.3 Anwendung der Licht-induzierten Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen zur Strukturierung von Oberflächen durch Photolithographie

Bevor die Strukturierung von Thiol-modifizierten Oberflächen mittels Photolithographie untersucht wurde, sollte die Durchführbarkeit dieser Methode sichergestellt werden. Dies sollte

mit Hilfe der Belichtung einer mit 1 mM Biotinallylamid **143**-Lösung gefüllten Hybridisierungskammer durch eine einfache Maske durchgeführt werden (Abbildung 36B). Wie im Kapitel 4.3.2 wurde als Lösungsmittel stets absolutes DMF/Toluol (3:1) verwendet. Neben dem Biotinallylamid wurde als Negativkontrolle das Biotinpropylamid **38** durch die Maske 3 h belichtet. Anschließend wurden die Lösungen sofort von dem Glasträger heruntergespült und der Glasträger mehrfach mit DMF und Wasser gewaschen. In Abbildung 36A sind die nach Inkubation mit Streptavidin-Cy5 erhaltenen Fluoreszenzsignale zu sehen.

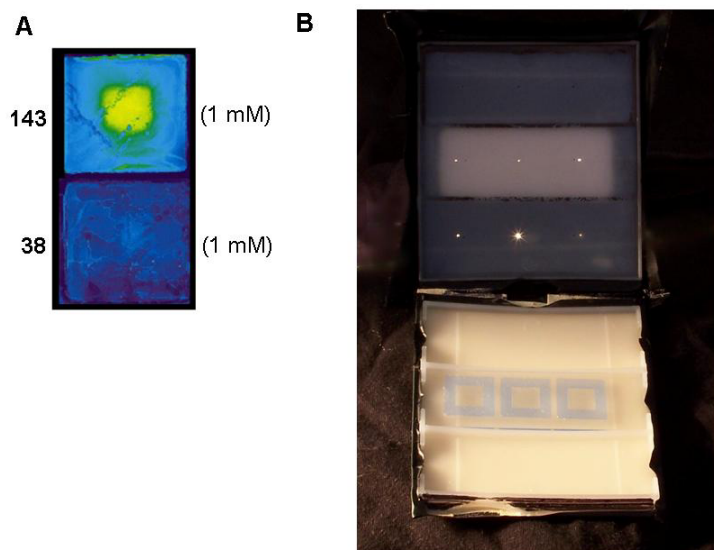


Abbildung 36: A: Nach Inkubation mit Streptavidin-Cy5 erhaltene Fluoreszenzsignale von der Belichtung von Biotinallylamid **143**- sowie Biotinpropylamid **38**-Lösung durch eine Maske; B: Verwendete Maske mit einem Glasträger, auf dem Hybridisierungskammern angebracht sind.

In Abbildung 36A ist ein deutliches Fluoreszenzsignal beim Nachweis des Biotinallylamids **143** zu erkennen, während für die Negativkontrolle **38** wie zu erwarten keines beobachtet wurde. Der Radius des Signals des detektierten Biotins **143** ist dabei aber wesentlich größer als der des Lochs in der Maske, was in der Streuung des Lichts hervorgerufen durch den Abstand der Maske zur Lösung begründet liegt. Es ist anzunehmen, dass sich die Reaktionslösung während der dreistündigen Belichtung erwärmt und dass dadurch eine erhöhte Diffusion stattfindet. Dies ist auch am Rand des Signals zu erkennen, welches nicht scharf endet sondern in zurückgehenden Intensitäten in den Hintergrund übergeht. Trotz Diffusion wurde aber ein eindeutiges Signal erhalten, so dass eine Strukturierung der Oberflächen durch Photolithographie möglich erschien.

Die Photolithographie-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dirk Nüsse am Institut für Hochfrequenztechnik, Dortmund, durchgeführt. Zur Photolithographie wurden Siliciumträger benötigt, die eine Reflexion oder Weiterleitung des Lichts im Träger verhindern. Dazu wurden Siliciumplatten von Dirk Nüsse mit einer ca. 1 µm dicken SiO₂-Schicht hergestellt und in die Form von Objekträgern geschnitten. Anschließend wurden diese Siliciumträger von H.

Schröder, Firma Chimera Biotech, mit den Dendrimeren beschichtet. Die Thiol-Funktionalisierung erfolgte wie bereits für die Glsträger beschrieben (Schema 32).

Die Biotinallaylamid-haltige Lösung (1 mM) wurde auf einer Zentrifuge gleichmäßig auf den Siliciumträger aufgebracht. Es wurden verschiedene Zentrifugationsprogramme mit zwei verschiedenen Geschwindigkeiten probiert. Durch die Zentrifugation und anschließende zehnmünütige Verwahrung in der Zentrifuge, welches beides unter einem Stickstoffstrom stattfand, war die Substanzlösung auf der Oberfläche eingetrocknet. Bei der anschließenden Belichtung wurde eine Maske auf den Träger gedrückt, so dass kein Abstand zwischen Maske und Träger vorhanden war. Das Muster der verwendeten Maske bestand aus Linien, die im ersten Abschnitt von 3 bis 20 µm und im zweiten Abschnitt 20 bis 100 µm breit waren. Vor und nach der Belichtung wurde unter Gelblicht gearbeitet. Das Zentrifugieren und Aufbewahren unter Stickstoff sowie das Arbeiten unter Gelblicht als auch die Maske wurden im Folgenden beibehalten. Nach 30 sec Belichtung mit der Belichtungsanlage und intensivem Waschen mit DMF und Wasser durch Spülen und Schütteln in einer Box wurde anhand der erzielten Ausleseergebnisse mit Streptavidin-Cy5 (100 nM) das am besten geeignete Programm ermittelt (Abbildung 37, Tabelle 14).

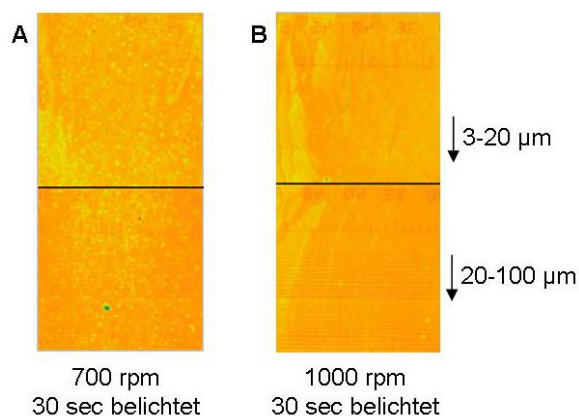


Abbildung 37: Nachweis von mittels Photolithographie immobilisiertem Biotin mit Streptavidin-Cy5. A: Träger, bei dem mit Programm 1 die Substanz aufgeschleudert wurde; B: Träger, bei dem mit Programm 2 die Substanz aufgebracht wurde. Der Träger in B zeigt eine einheitliche Aufbringung der Substanz, während der in A eine fleckige Oberfläche aufweist.

Zeit (sec)	Beschleunigung (acc. index)	Programm1 Geschwindigkeit (rpm)	Programm2 Geschwindigkeit (rpm)
5	12	500	500
40	3	700	1000
20	1	0	0

Tabelle 14: Verschiedene Zentrifugationsprogramme zum Aufschleudern der Substanzlösung auf den Träger.

Der Träger, bei dem die Substanz mit Programm 1 aufgeschleudert worden war (Abbildung 37A) zeigte nach Auslesen eine fleckige Oberfläche. Dies ließ auf eine schlechte Verteilung der Substanz schließen. Bei dem Träger, der mit Programm 2 behandelt worden war, konnten keine Flecken beobachtet werden. Der Träger in 37B zeigt schwache Signale an den Stellen, an denen durch die Maske belichtet wurde. Dies ist bei dem Träger in 37A nicht der Fall. Daher wurde nachfolgend zur Substanzaufbringung Programm 2 verwendet. Bei beiden Siliciumträgern wurde ein sehr hoher Hintergrund detektiert. Dies könnte zum einen mit der 1 μm dicken SiO_2 -Schicht zusammenhängen, die das Licht unter der Maske reflektieren und transportieren kann. Zum anderen wäre aber auch das unzulängliche Waschprogramm nach der Belichtung eine Möglichkeit für die Ursache des hohen Hintergrunds. Die durch Zentrifugation aufgetragene Substanz **143** könnte durch Fliehkräfte in die Dendrimerschichten hinein zentrifugiert worden sein. Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis durch eine zu kurze Belichtungszeit begründet ist, wurde ein Thiol-funktionalisierter, mit Biotinallylamid-Lösung (1 mM) beschichteter Siliciumträger 60 sec durch die Maske belichtet. Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (100 nM) ergab eine höhere Signalintensität an den belichteten Stellen mit einem Signal/Hintergrundverhältnis von 1.5:1 (Abbildung 38A). Dies ließ auf die Notwendigkeit einer längeren Belichtungszeit schließen.

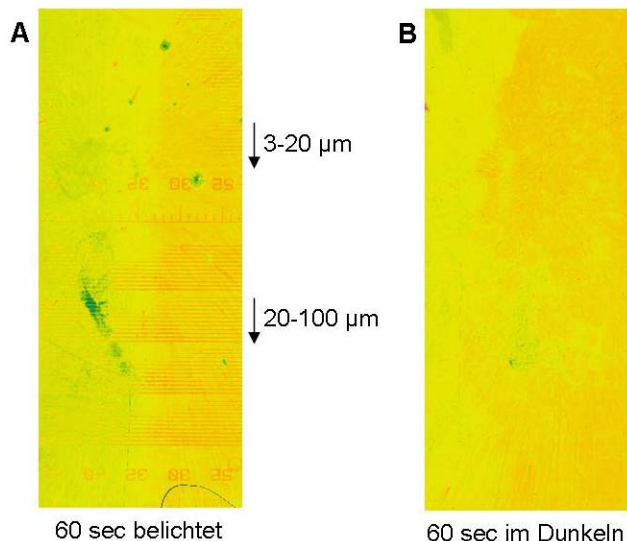


Abbildung 38: A: 60 sec belichteter mit Biotinallylamid **143** benetzter Siliciumwafer; B: Mit Biotinallylamid **143** benetzter Siliciumwafer, der 60 sec im Dunkeln verwahrt worden war.

Bei diesem Experiment war zusätzlich zu DMF und Wasser noch mit Methanol gewaschen worden, in welchem die Dendrimere auf der Oberfläche quellen und mit dem so das „gefangene“ Biotin herausgespült werden könnte. Der Hintergrund war dadurch sichtlich zurückgegangen, jedoch immer noch zu hoch.

Es wurde daraufhin ein Siliziumträger mit Biotinallylamid **143** (1 mM) durch Zentrifugation benetzt und nach dem Eintrocknen für 60 sec im Dunkeln verwahrt. Anschließendes intensives Waschen mit DMF, Wasser und Methanol durch Spülen sowie Schütteln in einer Box ergab nach Auslesen mittels Streptavidin-Cy5 (100 nM) eine dem Hintergrund des vorhergegangenen Experiments gleich hohe Signalintensität (Abbildung 38B). Dieses Resultat belegte, dass die Ursache des hohen Hintergrunds nicht in der Eigenschaft der SiO₂-Schicht, das Licht zu transportieren, sondern in dem unzulänglichen Waschprozess nach dem Belichten lag.

Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurden Experimente in verschiedenen Herangehensweisen durchgeführt. Die Art der Substanzauftragung wurde variiert, indem neben der Zentrifugation die Substanzlösung durch Sprühen sowie mit der Pipette auf die Oberfläche aufgebracht und unter Stickstoff zum Trocknen stengelassen wurde. Mit dieser Variante, die Substanzlösungen ohne Zentrifugation trocknen zu lassen, sollte eine gleichmäßige Verteilung der Substanz auf den Trägern ohne das Hineindringen in die Dendrimerschicht erreicht werden. Diese beiden Siliciumträger wurden nach dem einminütigen Belichten wie zuvor gewaschen, während der Waschprozess bei dem durch Zentrifugation benetzten Träger verändert wurde. Die Substanz wurde nach dem einminütigen Belichten wieder abzentrifugiert, d.h. der Träger wurde zweimal mit dem gleichen Programm wie beim Aufschleudern (Programm 2, Tabelle 14) zentrifugiert, während fortwährend zunächst DMF und anschließend Methanol auf ihn gegeben wurde. Die Ergebnisse der Inkubation dieser Träger mit Streptavidin-Cy5 sind in Abbildung 38 dargestellt.

Bei allen drei Siliciumträgern wurde ein wesentlich geringerer Hintergrund detektiert, der in dem Bereich derjenigen bei den gespotteten Experimenten lag. Auffällig ist, dass auch die Fluoreszenzsignale an den belichteten Stellen stark zurückgegangen sind. Dies ist aber mit der Tatsache im Einklang, dass die Biotinmoleküle, welche vorher den Hintergrund verursacht hatten, weg gewaschen worden sind, da das Hintergrundsignal auch unter den belichteten Signalen liegt. Somit wurde nochmals gezeigt, dass der hohe Hintergrund nur mit der Substanzauftragung durch Zentrifugation zusammenhängt. Vergleicht man die drei untersuchten Varianten der Substanzauftragung und des Waschens, so liefert die Auf- und Abzentrifugation die beste einheitliche Benetzung des Trägers mit der Substanz (Abbildung 39A), was an den Flecken auf den beiden anderen Trägern zu erkennen ist (Abbildung 39B und C). Das Signal/Hintergrund-Verhältnis liegt bei dem in Abbildung 39A gezeigten Träger bei 2:1, so dass trotz Signlrückgang eine Verbesserung des Verhältnisses erzielt wurde.

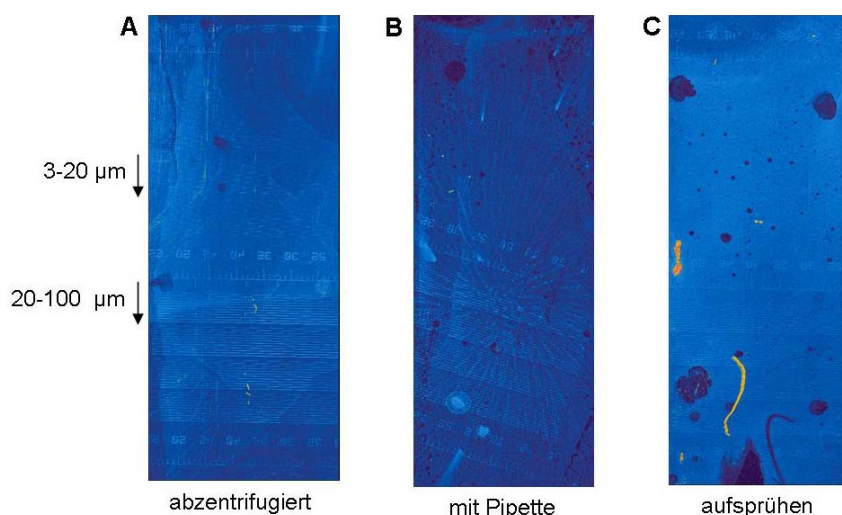


Abbildung 39: Experiment zur Reduktion des Hintergrundsignals. Nachweis von immobilisiertem Biotinylamid **143** mit Streptavidin-Cy5; A: Benetzen und Waschen durch Zentrifugation; B: Benetzen und Waschen durch Auftragen mit einer Pipette und Eintrocknen; C: Benetzen und Waschen durch Aufsprühen und Eintrocknen.

Die logische Schlussfolgerung aus diesen Resultaten war, Träger mit der Auf- und Abzentrifugationstechnik mit der Biotinylamid **143**-Lösung zu benetzen und dabei zur Erhöhung der Fluoreszenzsignalintensitäten eine höhere Konzentration der Lösung zu verwenden sowie länger zu belichten. Dies wurde mit einer 1 mM und 10 mM Biotinylamid-Lösung und Belichtungszeiten von 10 und 30 min realisiert. Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (100 nM) lieferte die erwarteten Resultate (Abbildung 40).

Der Nachweis der Immobilisierung von Biotinylamid **143** (10 mM) durch zehnmünütige Belichtungszeit ergab eine Signalintensität der belichteten Stellen (Abbildung 40A), die derjenigen beim Nachweis der Immobilisierung von Biotinylamid (1 mM) durch dreißigminütige Belichtungszeit entsprach (Abbildung 40D). Die geringste Intensität der belichteten Stellen wurde bei der Reaktion der 1 mM Lösung von Verbindung **143** nach 10 min erhalten (Abbildung 40C), die höchste bei derjenigen der 10 mM Lösung nach 30 min (Abbildung 40B, unterschiedliche Kontrasteinstellungen bei der Darstellung). Dieser Trend entspricht genau dem aus den vorherigen Experimenten erwarteten. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis konnte bei der dreißigminütigen Belichtung der 10 mM Biotinylamid-Lösung auf 9:1 verbessert werden und das Hintergrundsignal erhöhte sich durch die höhere Konzentration des Biotins nur unwesentlich.

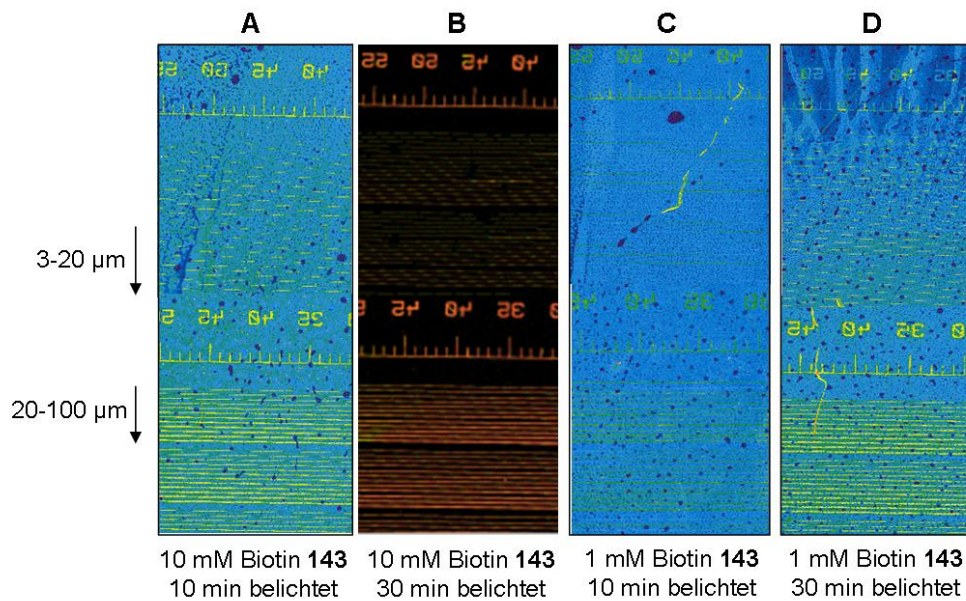


Abbildung 40: Nachweis von immobilisiertem Biotinallylamid **143** mit Streptavidin-Cy5; Biotin **143** wurde in Konzentrationen von 1 und 10 mM eingesetzt und die Belichtungszeit wurde mit 10 und 30 min variiert. A: 10 mM Biotin **143**, 10 min Belichtungszeit; B: 10 mM Biotin **143**, 30 min Belichtungszeit; C: 1 mM Biotin **143**, 10 min Belichtungszeit; D: 1 mM Biotin **143**, 30 min Belichtungszeit.

Vergößert man den oberen Abschnitt des in Abbildung 40A gezeigten Experimentes wird deutlich, dass die Auflösung der Licht-induzierten Oberflächenstrukturierung der Auflösung von 5 μm entspricht, was die höchste Auflösung des Fluoreszenz-Scanners ist (Abbildung 41). Dies ist daran zu erkennen, dass die 3 μm breite Linie in der Mitte einmal etwas nach unten verschoben wird, was durch den Wechsel zwischen Pixel-Reihen des Scanners bei einer Abweichung der Linie von der horizontalen Ebene bedingt ist. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die Moleküle tatsächlich nur an den Stellen immobilisiert werden, an denen sie belichtet werden, mit einer möglichen Abweichung von $\pm 2 \mu\text{m}$.

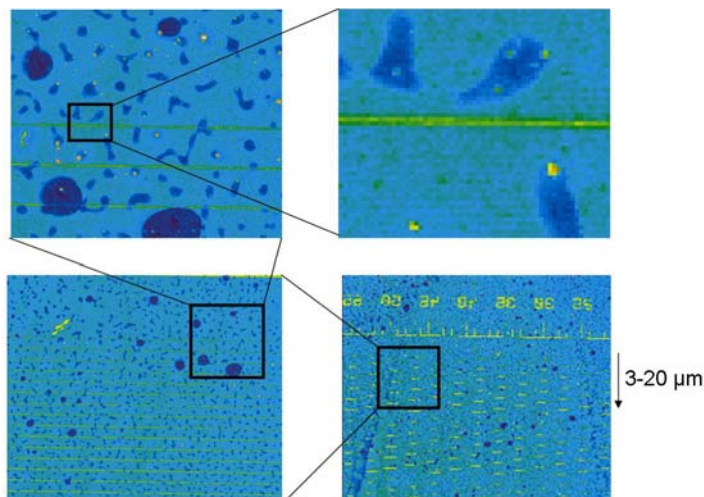


Abbildung 41: Vergrößering des oberen Abschnitts von Abbildung 40A.

Da die Auflösung der Licht-induzierten Oberflächenstrukturierung in diesen Experimenten von der Auflösung des Fluoreszenz-Scanners abhängt, sollte es in Zukunft möglich sein, Strukturen im sub-Mikrometer-Bereich herzustellen und mittels hochauflösender Techniken wie beispielsweise der Mikroskopie nachzuweisen.

Nachdem die Oberflächenstrukturierung durch Photolithographie mittels Biotin erfolgreich optimiert worden war, sollte diese Technik auf weitere Substanzen angewendet werden. Dazu wurde zum einen das Phosphopeptid **158** und zum anderen das von M. Lovrinovich, AK Niemeyer, Universität Dortmund, hergestellte Pentensäure-funktionalisierte Streptavidin **161** verwendet (Abbildung 42D). Im vorigen Kapitel wurde ein Versuch mit dem Phosphopeptid durchgeführt, der auf unspezifische Wechselwirkungen des Phosphopeptids **158** mit der Oberfläche schließen ließ. Daher wurde für dieses Experiment nur eine 0.5 mM Lösung des Peptids in absolutem DMF/Toluol (3:1) benutzt und nach dem dreißigminütigen Belichten mit DMF, Methanol und TETBS-Puffer abzentrifugiert. Das Pentensäure-funktionalisierte Streptavidin **161** wurde in einer 200 μ M Lösung in Wasser eingesetzt. Da Wasser eine hohe Oberflächenspannung hat, war das gleichmäßige Verteilen durch Zentrifugation problematisch. Das Wasser bildete einen großen Tropfen in der Mitte, der während der Zentrifugation trocknete. In zukünftigen Experimenten sollte deshalb etwas Detergenz hinzugegeben werden. Nach dreißigminütigen Belichten wurde mit TETBS-Puffer und Wasser abzentrifugiert. Das Auslesen wurde bei der Immobilisierung des Phosphopeptids mit dem Konjugat aus biotinyliertem anti-pTyr-Antikörper und Streptavidin-Cy5 (50 nM) und bei der des Streptavidins mit Biotin-Cy5 (10 nM) vollzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42A und C dargestellt.

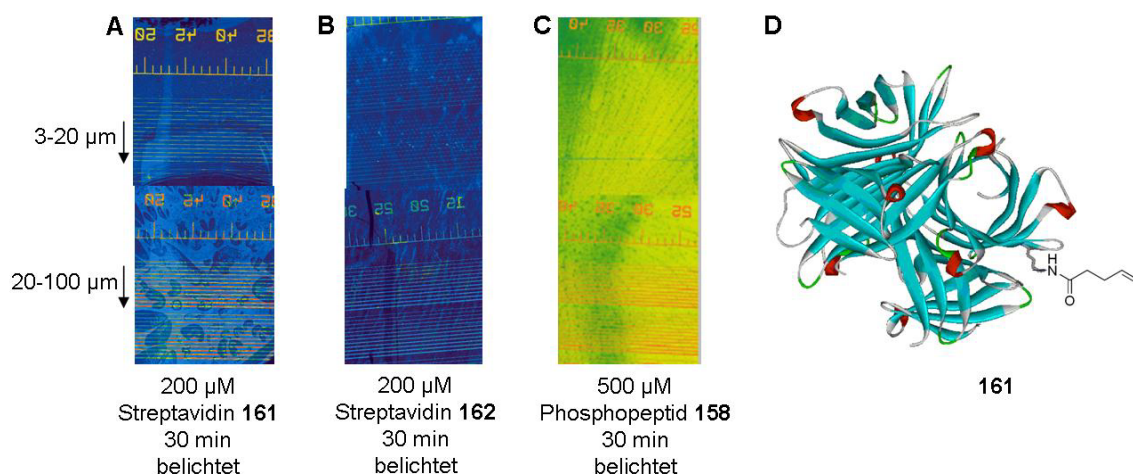


Abbildung 42: A: Nachweis von immobilisiertem Streptavidin **161** mit Biotin-Cy5; B: Nachweis von immobilisiertem Streptavidin **162** mit Biotin-Cy5 als Negativkontrolle zu A; C: Nachweis von immobilisiertem Phosphopeptid **158** mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper-Konjugat; D: Pentensäure-funktionalisiertes Streptavidin **161** (schematisch).

Beide Haptene konnten an den belichteten Stellen nachgewiesen werden. Bei dem Streptavidin ist die Eintrocknung der Substanz durch die Unebenheit des Hintergrundes sichtbar. Trotzdem konnten auch der erste Abschnitt der Maske mit den Linienbreiten von 3-20 μm detektiert werden. Also wird das Streptavidin nicht durch die UV-Strahlung zerstört und die Immobilisierung ist Licht-abhängig. Die Tatsache, dass für ein gutes Immobilisierungsergebnis nur eine 200 μM Lösung des Streptavidins notwendig war, ist durch die vier Bindungsstellen des Streptavidins für das Biotin zu erklären, weil die mögliche vierfache Bindung des Biotin-Cy5 einen Signalintensitäts-verstärkenden Effekt hat. Die deutlichen Signale des nachgewiesenen Phosphopeptids an den belichteten Stellen der Oberfläche zeigen, dass das Peptid in wesentlich geringeren Konzentrationen als das Biotin nachgewiesen werden kann. Die unspezifische Bindung des Peptids mit der Oberfläche konnte durch Waschen mit Puffer-Lösung wesentlich unterbunden werden, so dass ein niedriger Hintergrund detektiert wurde.

Dass das Streptavidin tatsächlich über die Doppelbindung an die Oberfläche bindet sollte mittels unfunktionalisiertem Streptavidin **162** gezeigt werden, welches der gleichen Immobilisierungsprozedur wie das Streptavidin **161** unterzogen wurde. In Abbildung 42B ist das Resultat gezeigt. Zwar ist eine Strukturierung mittels Streptavidin zu erkennen, aber das Signal/Hintergrund-Verhältnis ist mit $\sim 6:1$ wesentlich geringer als das durch die Immobilisierung von Streptavidin **161** erzielte ($\sim 50:1$). Somit findet zwar eine geringe Nebenreaktion statt, aber die Anbindung verläuft hauptsächlich durch die Addition der Thiole auf der Oberfläche an die terminalen Doppelbindungen, welche am Streptavidin lokalisiert sind.

Es konnte anhand verschiedener Verbindungen, die durch unterschiedliche biologische Wechselwirkungen nachgewiesen wurden, die Oberflächenstrukturierung mittels Photolithographie realisiert werden. In weiteren Studien muss aber noch gezeigt werden, dass das Phosphopeptid **158** auch über die Doppelbindung an die Thiol-funktionalisierte Oberfläche bindet. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Als eine weitere Variante der Belichtung sollte die Bestrahlung mit Hilfe eines Lasers untersucht werden. In Zusammenarbeit mit N. Optiz, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, wurden dazu Experimente am konfokalen Lasermikroskop durchgeführt. Da kein Laser mit der Wellenlänge von 365 nm zur Verfügung stand, wurde versucht, die Energie dieser Wellenlänge durch Zwei-Photonen-Anregung zu erzeugen. Zwei-Photonen-Anregung kann durch die hohe, lokalisiert gebündelte Energie der Pico- und Femtosekunden Laser-Pulse entstehen. Das bedeutet, dass während der Dauer eines Pulses Moleküle gleichzeitig zwei oder drei (bei Drei-Photonen-Anregung) Photonen einer längeren Wellenlänge aufnehmen, wodurch

ein Elektron in den ersten Singulett-Anregungszustand angehoben wird. Diese hohe Energie ist lokalisiert, d.h. nicht nur in der X- und Y- Ebene sondern auch in der Z-Ebene definiert. Dadurch kann die zwei-Photonen-Anregung zur Erstellung dreidimensionaler Abbildungen verwendet werden. Die Fokussierung des hochenergetischen Peaks erreicht man durch die Verwendung von optischen Mikroskop-Objektiven. Die Multi-Photonen-Anregung ist kein linearer Prozess und daher erreicht man bei einer eingestrahnten Wellenlänge von 728 nm nur theoretisch den halbierten Wert von 364 nm. Da man so die benötigte Wellenlänge nur ungefähr erreichen kann, ist die Zwei-Photonen-Anregung für die Strukturierung von Oberflächen durch die Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen nur bedingt geeignet. Ein weiteres Problem war die Fokussierung des Strahls auf den Punkt auf der Oberfläche, an dem die Thiole lokalisiert sind, und an dem sie mit den Doppelbindungen reagieren können. Dies ist so schwierig, da ein Pixel, d.h. der fokussierte Punkt, einen Durchmesser von 0.661 μm hat. Es wurde versucht, eine Voreinstellung der Fokussierung mit einem auf einem anderen Objektträger befindlichen Fluorophor zu erreichen. Bei einer Abweichung der Dicken des zur Einstellung und des für die Oberflächenstrukturierung verwendeten Objektträgers von nur einem halben μm wäre diese Voreinstellung aber schon fehlerhaft. Unter Berücksichtigung dieser Probleme wurde in eine Hybridisierungskammer auf einem Thiol-funktionalisierten Glasträger eine Lösung von Biotinallylamid **143** in DMF/Toluol (3:1) (1 mM) gegeben. Innerhalb dieser Hybridisierungskammer wurde jeweils eine Fläche von 338.4 μm^2 (512x512 Pixel) gescannt, wobei der Scan pro Fläche 10, 30 und 100mal wiederholt wurde. Zwischen diesen drei Scans wurde der Objektträger geringfügig mit der Hand verschoben, so dass die gescannten Felder in einer Reihe lagen (Abbildung 43A und B). 30 Scanwiederholungen entsprechen einer Belichtungszeit von 1×10^{-4} Sekunden pro Pixel. Die Laserintensität wurde bei 100% gewählt. Nach dem Scannen wurde der Glasträger sofort stringent mit DMF und Wasser gespült. Anschließende Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (100 nM) ergab die in Abbildung 43A und vergrößert in 43B gezeigten quadratischen Signale. Da eine quadratische Fläche gescannt worden war, entsprach dieses Ergebnis dem Erwarteten. Die Fluoreszenzsignalintensitäten entsprechen der jeweiligen Scanwiederholung, also der Belichtungszeit. Das bedeutet, dass eine geringere Scanwiederholung und dementsprechend eine niedrigere Belichtungszeit ein Signal mit geringerer Intensität lieferten.

In dem folgenden Experiment wurde durch die Immobilisierung von Biotinallylamid **143** (100 nM) in DMF/Toluol (3:1) mit einer Laserintensität von 100% und 100facher Scanwiederholung versucht, ein Muster auf der Oberfläche zu immobilisieren. Dazu wurden drei Felder im rechten Winkel gescannt. Anschließendes Waschen wie zuvor und Inkubation mit Streptavidin-Cy5 (100 nM) ergab das in Abbildung 43C dargestellte Muster. Das hergestellte Muster ist deutlich zu

erkennen, jedoch sind die Signalintensitäten geringer als im vorherigen Experiment. Dies kann durch die Einstellung der Fokussierung des Laserstrahls in der Z-Ebene begründet sein, die in diesem Falle möglicherweise nicht so genau wie in dem vorherigen Versuch war.

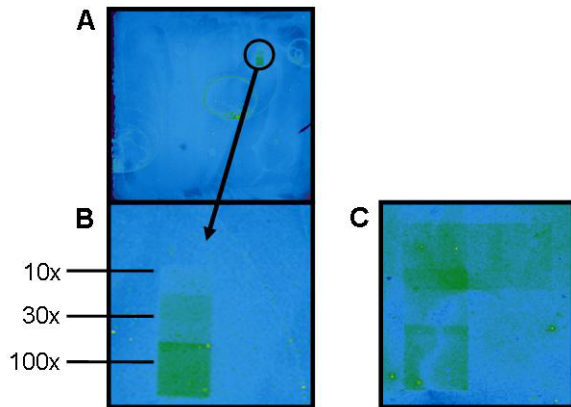


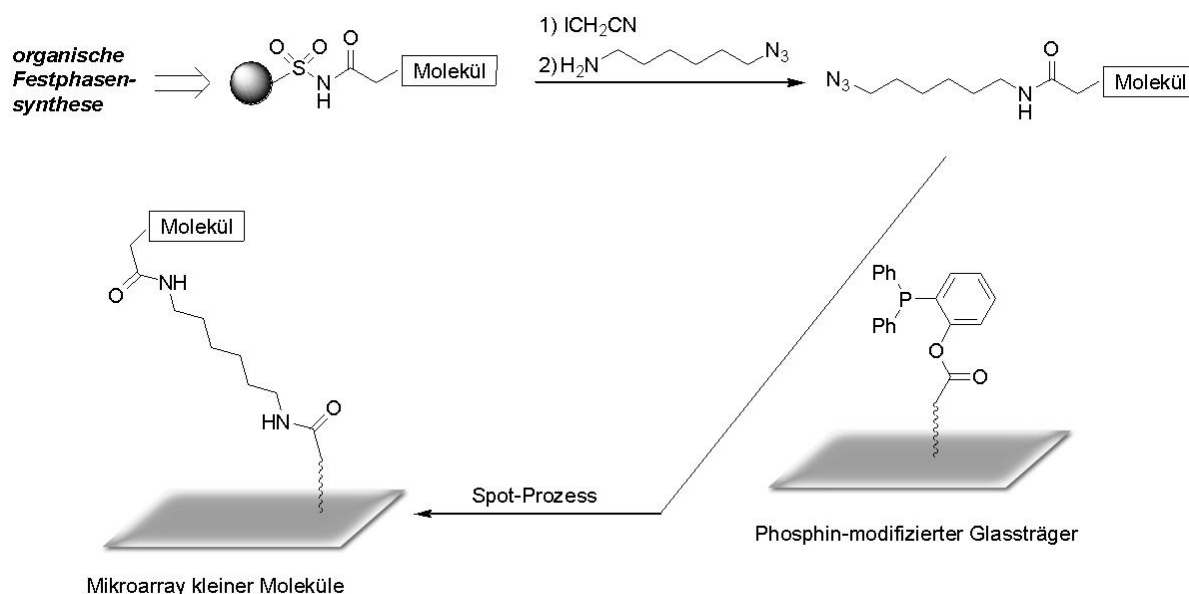
Abbildung 43: A: Nachweis von mittels Laserstrahl immobilisiertem Biotinylamid **143** mit Streptavidin-Cy5; B: Vergrößerung von A; C: Scan dreier Felder im rechten Winkel, nachgewiesen mit Streptavidin-Cy5.

Somit konnte trotz der Schwierigkeiten, die durch Zwei-Photonen-Anregung verursacht werden, die Oberflächenstrukturierung mittels Laser erfolgreich durchgeführt werden.

Die Anwendung von Lasermikroskopen, welche über einen computergesteuerten, in der X-Y-Ebene beweglichen Objektträgertisch verfügen, könnte zukünftig eine Auflösung im nm-Bereich ermöglichen. Durch die Fokussierung des Laserstrahls mit Hilfe von Objektiven zur Erzeugung eines beugungsbegrenzten Punktes wäre die Breite der Strukturen nicht mehr durch den Durchmesser des Laserstrahls begrenzt. Die optische Auflösung eines solchen Mikroskops kann 100 nm betragen, so dass man die Strukturen scannen kann und nicht mehr auf die Auflösung des bei der Photolithographie verwendeten Fluoreszenz-Scanners angewiesen ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, chemoselektive und bioorthogonale Kupplungsstrategien zur Herstellung von Microarrays und strukturierten Oberflächen zu entwickeln. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dazu die Staudinger-Ligation zwischen einem Phosphin und einem Azid herangezogen. Die Staudinger-Ligation hatte in vielen Anwendungen bereits gute Chemoselektivität und Bioorthogonalität gezeigt.^[87,92,93,95] Die konzipierte Immobilisierungsstrategie sollte einen schnellen Zugang zu den am polymeren Träger synthetisierten Substanzen in einem aktivierten Zustand ermöglichen. Das bedeutet, dass die Substanzen vor der Kupplung an die Oberfläche nicht weiter funktionalisiert werden müssen und direkt nach dem Abspalten vom polymeren Träger auf der Oberfläche immobilisiert werden können. Durch die Verwendung des Kenner-safety-catch-Linkers ist die Möglichkeit der Einführung des zur Kupplung benötigten Azids im Abspaltungsschritt gegeben, wodurch das Azid während der Festphasensynthese keine störenden Nebenreaktionen eingehen kann. Diese Vorgehensweise wurde Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie genannt. In Schema 37 ist die Immobilisierungsstrategie mittels Staudinger-Ligation dargestellt.



Schema 37: Immobilisierungsstrategie zur Herstellung von Mikroarrays mittels Staudinger-Ligation.

Nach Ermittlung des geeigneten Phosphins und der Evaluierung der Staudinger-Ligation an fester Phase konnte anhand der Azid-modifizierten Haptene Biotin **37** und Mannose **43** und der entsprechenden Verbindungen **38** und **44**, die kein Azid enthielten, die selektive Immobilisierung durch Staudinger-Ligation auf Phosphin-funktionalisierten Oberflächen demonstriert werden

(Abbildung 44). Die Verbindungen **37** und **43** wurden in einem Konzentrationsgradienten auf die Oberfläche gespottet und bei dem folgenden Nachweis mittels Fluoreszenz-markiertem anti-Biotin-Antikörper und Concanavalin A wurden Signale erhalten, die in ihrer Intensität den Konzentrationsgradienten wiedergaben (Abbildung 44B und C). Die Verbindungen **38** und **44**, die kein Azid enthielten, lieferten keine Fluoreszenzsignale und daher konnte gezeigt werden, dass die Anbindung der Moleküle an die Oberfläche selektiv über das Azid stattfand.

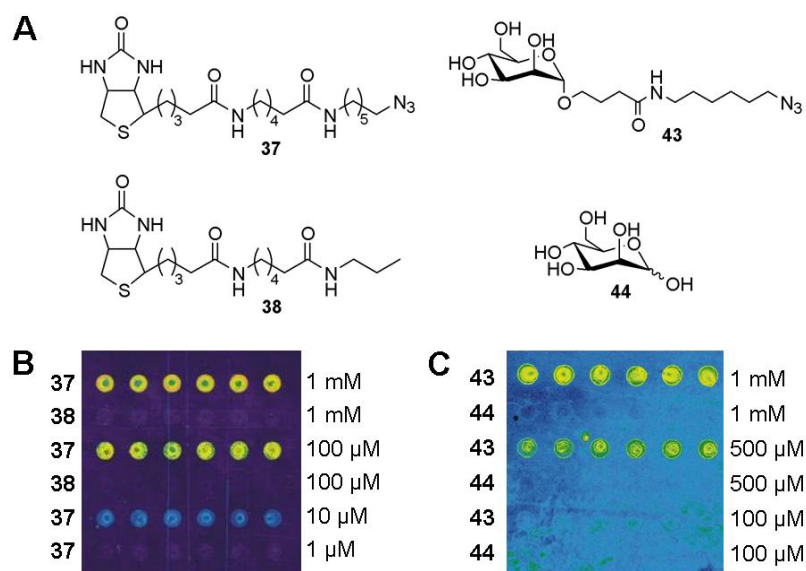


Abbildung 44: A: Strukturen der immobilisierten Haptene; B und C: Nachweis von den mittels Staudinger-Ligation immobilisierten Verbindungen durch entsprechende Fluoreszenz-markierte Proteine. B: Biotin nachgewiesen mit anti-Biotin-Antikörper; C: Mannose nachgewiesen mit Concanavalin A.

Die Effizienz der Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie wurde mittels der Festphasensynthese zweier biotinylierter Verbindungen, die Beispiele für in der Industrie verwendete Wirkstoff-Kandidaten darstellten, und deren erfolgreicher Immobilisierung gezeigt (Abbildung 45).

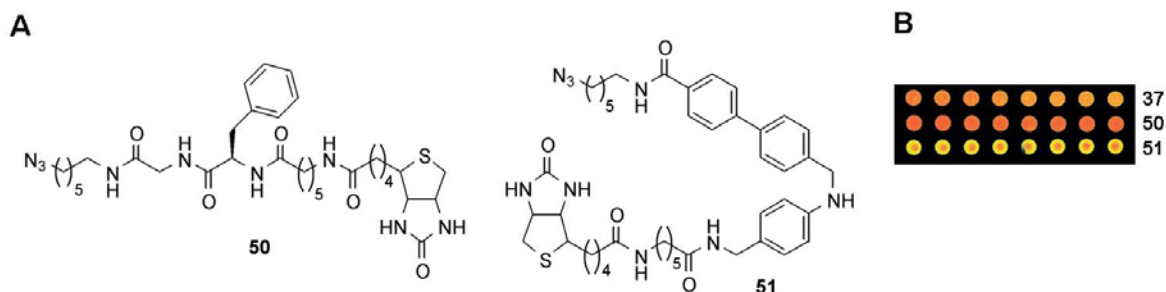


Abbildung 45: A: Strukturen der biotinylierten Wirkstoff-Analoga; B: Nachweis von den mittels Staudinger-Ligation immobilisierten Verbindungen **37**, **50** und **51** mit Streptavidin-Cy5.

So wurde eine neue und effiziente Methode zur Herstellung von Mikroarrays entwickelt, welche den bisherigen Strategien gegenüber über den Vorteil der chemischen Orthogonalität zu funktionellen Gruppen verfügt, die häufig wichtig für die Wechselwirkung mit biologischen Systemen sind. Erstmals wurde die chemoselektive Staudinger-Ligation zwischen dem *ortho*-Diphenylphosphinophenylester und einem Azid zur Immobilisierung von Molekülen auf Oberflächen eingesetzt. Die entwickelte Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie verknüpft die synthetische Effizienz der kombinatorischen Festphasensynthese mit den analytischen Vorteilen der Wirkstoff-Arrays, wie der Möglichkeit zum Hochdurchsatz-Screening und dem Auskommen mit nur geringen Mengen an Analyt und Sondenmolekülen.

Diese Methodik wurde im zweiten Teil der Arbeit zur Entwicklung eines Mikroarrays zur Untersuchung der Substratspezifitäten von PTPs herangezogen. Kenntnisse über die Substratspezifitäten von PTPs sind aufgrund der großen Bedeutung von PTPs in Signaltransduktionsprozessen und in damit verbundenen Krankheiten von besonderem Interesse. Das Konzept dieses Mikroarrays ist in Abbildung 46 gezeigt. Nach der Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie wird eine Phosphopeptid-Bibliothek an fester Phase synthetisiert (46A) und anschließend auf einem Phosphin-funktionalisierten Objektträger (46B) immobilisiert. Der Substrat-Mikroarray (46C) wird anschließend mit verschiedenen Phosphatasen inkubiert (46D) und mit einem Fluoreszenz-markiertem anti-pTyr-Antikörper behandelt (46E). Gleichzeitig wird ein Kontroll-Array an Stelle der Phosphatase nur mit einer Puffer-Lösung inkubiert. Bevorzugte Substrate werden durch kein oder ein niedrigeres Signal verglichen mit dem Kontroll-Mikroarray angezeigt, während Peptide, die keine Substrate sind, keine Veränderung in der Signalintensität zeigen.

Die Effizienz und Selektivität der Staudinger-Ligation wurde durch die Verwendung des Phosphins **62** weiter optimiert. Dies war aufgrund der Beobachtung notwendig, dass als Nebenreaktion bei der Staudinger-Ligation Aminogruppen von Peptiden mit Lysin-Seitenketten mit dem Phosphinophenylester (Schema 37) zu Amiden reagieren.^[169] Nach der Optimierung der Staudinger-Ligation mit Phosphin **62** durch Evaluierung der Reaktion in Lösung und am polymeren Träger wurde das Konzept des Testsystems mit der Phosphatase PTP1B validiert. In der Literatur bekannte Substrate von PTP1B wurden nach der in Schema 38 gezeigten Strategie synthetisiert. Außerdem wurden weitere Substrate synthetisiert, die aufgrund ihrer basischen und neutralen Eigenschaften weniger gute Substrate von PTP1B sein sollten.

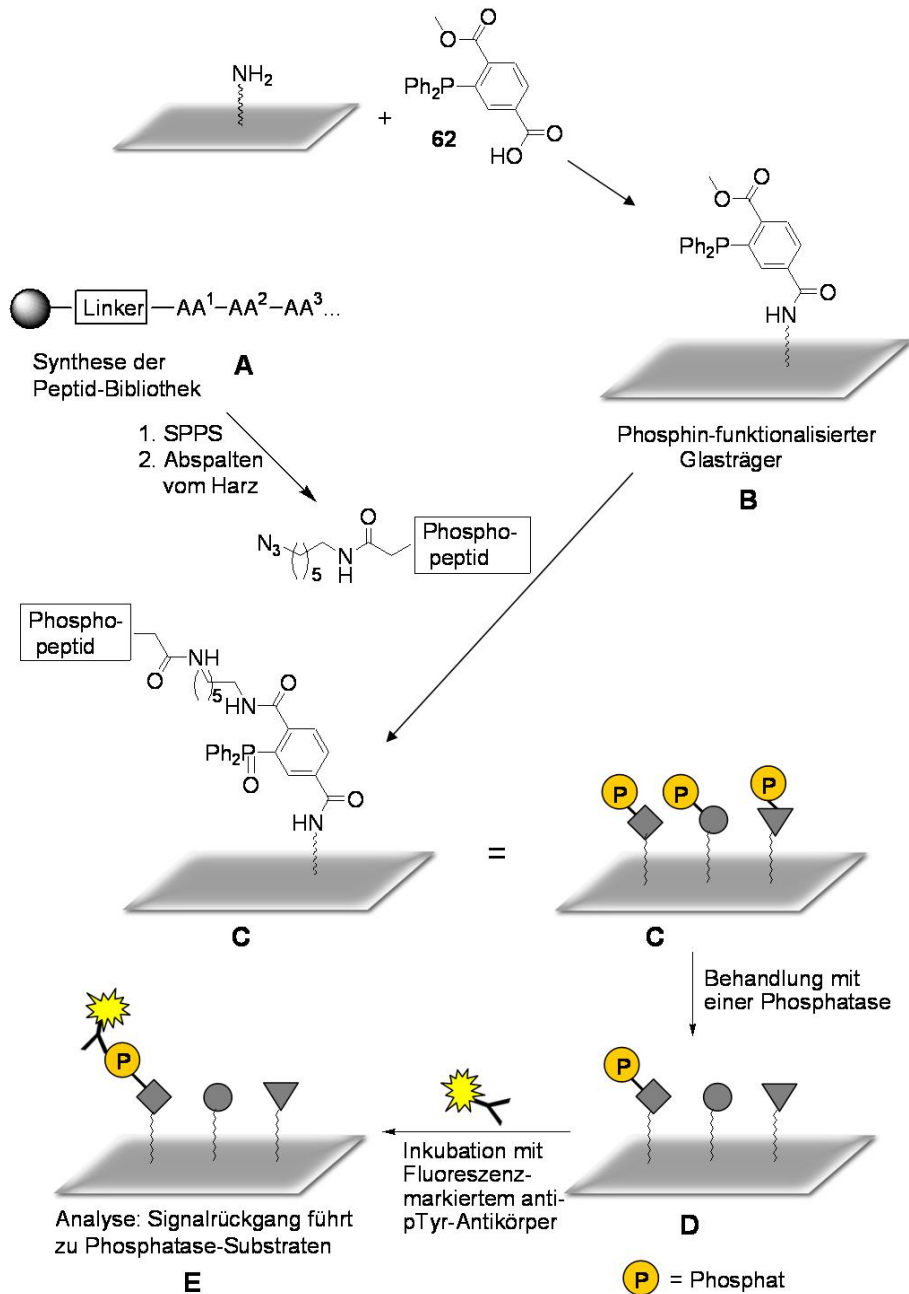
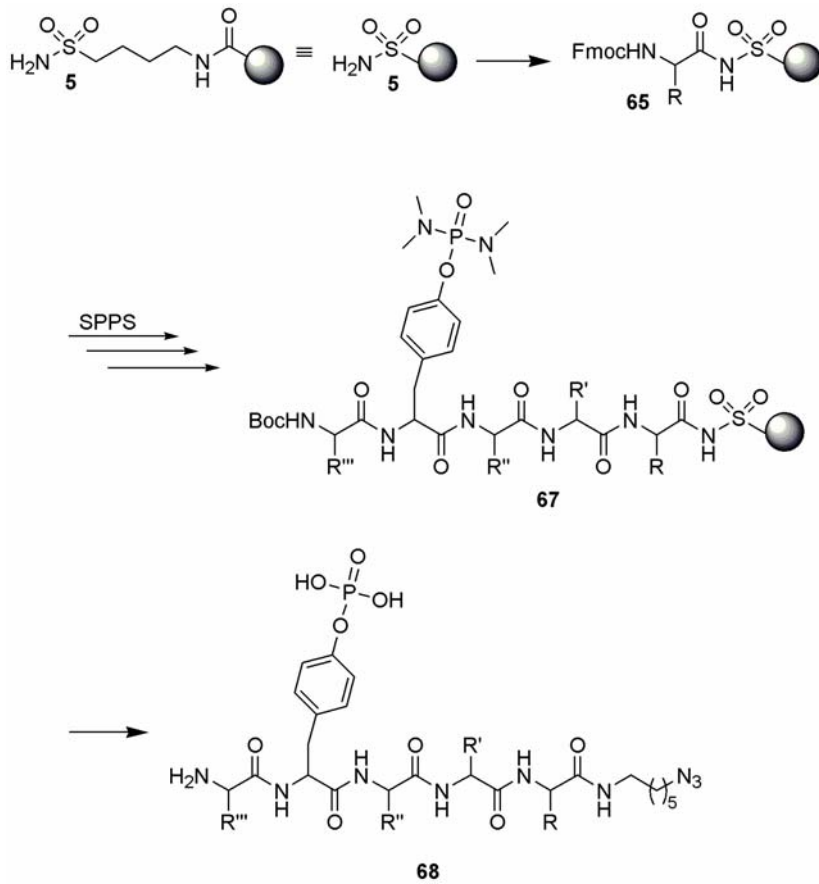


Abbildung 46: Konzept zur Herstellung und Methodik des Mikroarrays zum Erkennen der Substratspezifitäten von PTPs.

Dass sich die Substrate gegenüber PTP1B tatsächlich wie in der Literatur beschrieben^[130a] verhielten, wurde anhand von Assays in Lösung und Detektion mittels HPLC-ESI überprüft. Die Peptide **92** (LpYEDAD) und **93** (ApYHAG), bei denen der größte Unterschied in der Geschwindigkeit der Dephosphorylierung durch PTP1B gemessen wurde, wurden für die Validierung des Konzepts auf Glasträgern immobilisiert und mit PTP1B behandelt. Durch den Nachweis mit Fluoreszenz-markiertem anti-pTyr-Antikörper wurde demonstriert, dass PTP1B auf der Oberfläche die gleiche Substratspezifität wie in Lösung zeigte (Abbildung 47).



Schema 38: Syntheschema zur Phosphopeptid-Bibliothek-Herstellung.

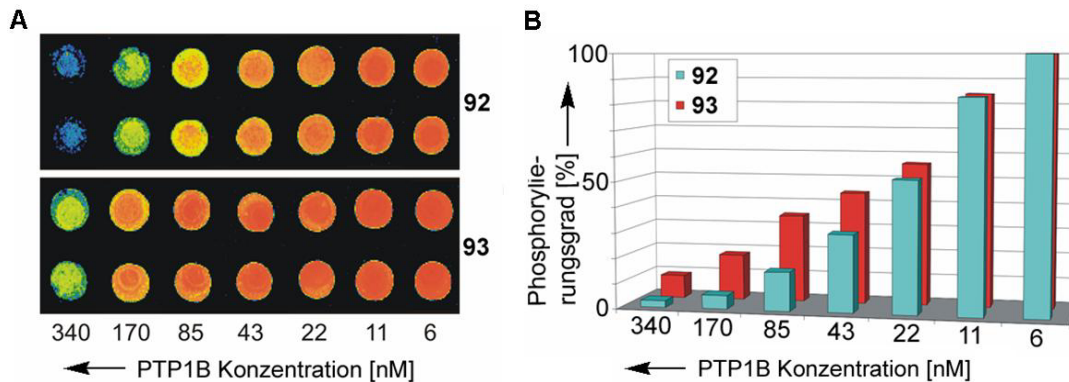


Abbildung 47: A: Nachweis der immobilisierten Phosphopeptide **92** und **93** mit anti-pTyr-Antikörper nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PTP1B; B: Auftragung des prozentualen Phosphorylierungsgrades der Peptide verglichen mit dem mit der geringsten PTP1B-Konzentration inkubierten Array (6 nM, entspricht 100% Signalintensität). Peptid **92**: LpYEDAD; Peptid **93**: ApYHAG.

Im Anschluss wurden fünf Phosphatasen, eine davon in zwei strukturellen Versionen, gegen 48 Phosphopeptide, welche nach dem Syntheschema 38 hergestellt worden waren, mit der neuen Mikroarray-Technik gescreent (Abbildung 48). Die Ergebnisse dieser Screens, die eine Aussage über die Substratspezifitäten und Aktivitäten der Phosphatasen lieferten, wurden mittels

Malachitgrün-Assay in Lösung kontrolliert. Dabei wurden Anhaltspunkte zur Substratspezifität und Aktivität dieser Phosphatasen erhalten. Für PTP1B, die eine hohe Aktivität zeigte, ergab sich folgende Substratspezifität: unpolar (A/L) – polar – pTyr – unpolar (G) – sauer (D). Dies stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Substratspezifität von PTP1B überein, nach der PTP1B saure Sequenzen den basischen vorzieht.^[130a] PTP μ zeigte ebenfalls eine Bevorzugung von sauren und neutralen Aminosäuren. Es konnte ermittelt werden, dass das pTyr in der bevorzugten Sequenz von unpolaren Aminosäuren flankiert wird. Für MPTPA und PRL-3 ergab sich sowohl auf dem Mikroarray als auch in Lösung eine sehr geringe Aktivität der Phosphatasen. Daher musste bei beiden Phosphatasen davon abgesehen werden, eine bevorzugte Aminosäuresequenz aus den Ergebnissen zu folgern. Für MPTPA, die ein wenig aktiver war als PRL-3, konnte aber ermittelt werden, dass die bevorzugten Aminosäuren saure (D, E) und unpolare (A, G, M) Eigenschaften hatten. Für die zwei Versionen von PTP-SL, die getestet wurden, wurde ebenfalls eine Präferenz für saure und unpolare Aminosäuren festgestellt. Die kürzere Version, PTP-SL-KIM, zeigte auf dem Mikroarray und in Lösung wenig Aktivität. PTP-SL-EX war auf dem Mikroarray hoch aktiv. Dies konnte aber in Lösung nicht bestätigt werden. Anhand der Ergebnisse in Lösung wurde die folgende bevorzugte Sequenz für PTP-SL-EX ermittelt: sauer (E) – pTyr – sauer/unpolar (D/G) – sauer (D). Das Peptid **123** MpYGDA wurde von beiden Versionen als bevorzugtes Substrat erkannt.

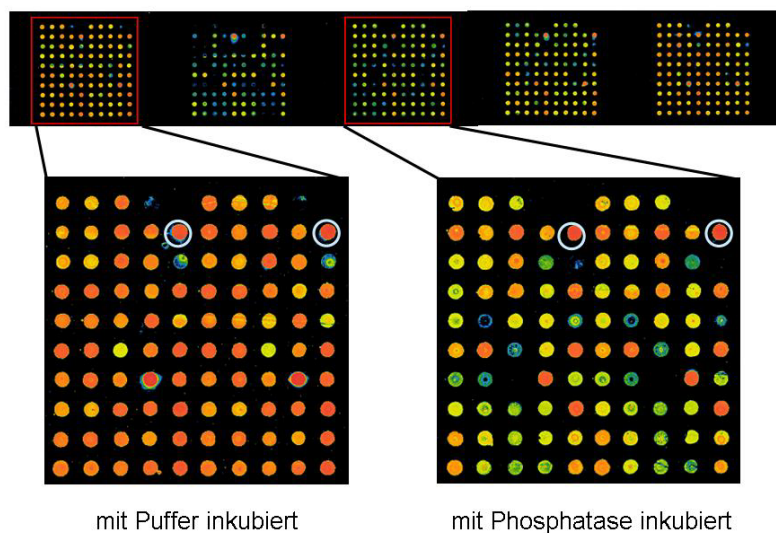


Abbildung 48: Detektion des Phosphorylierungsgrades nach Inkubation mit einer Phosphatase (rechte vier Arrays) bzw. mit einem Puffer (links) am Beispiel PTP μ . Cy5 wurde als Standardisierungsfaktor mitgespottet und ist in beiden Abbildungen blau gekennzeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Faktoren Zeit und Temperatur bei der Mikroarray-Technik näher zu untersuchen. Dies muss Gegenstand zukünftiger Optimierung sein. Außerdem sollte der Einfluss der Struktur der Proteine auf die Ergebnisse und auf Wechselwirkungen mit der Oberfläche untersucht werden, da die abweichende Aktivität von der

„langen“ Version der Phosphatase PTP-SL in Lösung möglicherweise durch ihre Größe und Struktur hervorgerufen wird.

Es konnte gezeigt werden, dass der Peptid-Substrat-Mikroarray zur Detektion von Substratspezifitäten von Phosphatasen genutzt werden kann. Bezüglich der Aktivitäten der Phosphatasen konnten alle Ergebnisse, mit Ausnahme von einer Version der Phosphatase PTP-SL, in Lösung bestätigt werden. Bei der Erkennung der bevorzugten Substrate wurde grundsätzlich eine gute Übereinstimmung und nur bei sehr hoher oder niedriger Aktivität der Phosphatase eine mäßige erhalten. Die Immobilisierung durch Staudinger-Ligation ermöglicht durch die Chemoselektivität und Bioorthogonalität der Reaktion die Differenzierung von Substraten durch Enzyme auf Mikroarrays. Das Konzept liefert einen schnellen Zugang zu den benötigten Azid-funktionalisierten Peptiden und gewährleistet eine einfache, rasche Detektion der dephosphorylierten Substrate. Diese neue und effiziente Technik kann in Zukunft zum Hochdurchsatz-Screening von Phosphatase-Substratspezifitäten genutzt werden. Informationen über die Substratspezifitäten von Phosphatasen können zur Aufklärung ihrer Rollen in biologischen Signalwegen und zur Entwicklung von Inhibitoren genutzt werden, die möglicherweise zu neuen Medikamenten gegen Phosphatase-involvierte Krankheiten wie Krebs und Diabetes^[2,4,115] führen könnten.

Im dritten Teil der Arbeit wurde eine neue Reaktion zur regioselektiven Immobilisierung von Molekülen für die Herstellung von strukturierten Oberflächen entwickelt. Die dafür verwendete Reaktion ist die durch UV-Licht bei 365 nm induzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen (Abbildung 49).

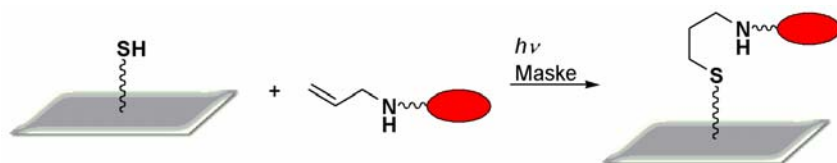


Abbildung 49: Licht-induzierte Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen zur Oberflächenstrukturierung.

Nach der Evaluierung der Reaktion bezüglich Kupplungseffizienz und Selektivität am polymeren Träger wurde anhand des Phosphopeptids **158** sowie der Alken-modifizierten Substanzen Biotin **143** und Mannose **155** die selektive, Licht-induzierte Immobilisierung auf Thiol-funktionalisierte Oberflächen demonstriert (Abbildung 50). Als Negativkontrollen wurden wiederum Mannose **44**

und Biotin **38** eingesetzt (Abbildung 44A). Die Substanzen waren durch Spotten auf die Glasträger aufgebracht worden.

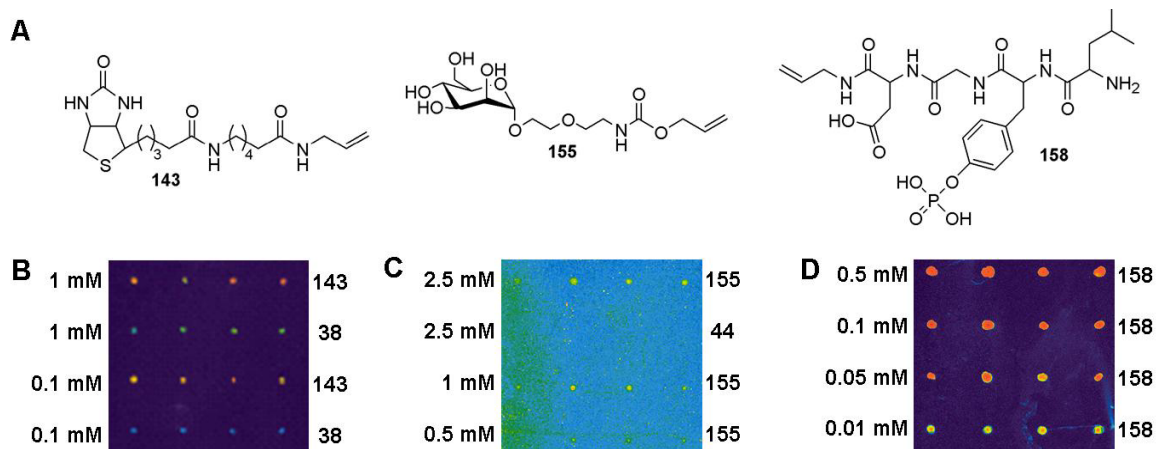


Abbildung 50: A: Strukturen der immobilisierten Haptene; B-D: Nachweis von mittels Licht-induzierter Addition von Mercaptanen an terminale Doppelbindungen immobilisierten Verbindungen durch entsprechende Fluoreszenz-markierte Proteine. B: Biotin nachgewiesen mit Streptavidin; C: Mannose nachgewiesen mit Concanavalin A; D: Phosphopeptid LpYGD-OAll nachgewiesen mit anti-pTyr-Antikörper.

Anschließend wurde die neue Methode zur Herstellung von strukturierten Oberflächen mittels Photolithographie angewendet. Dabei wurden die Thiol-funktionalisierten Siliciumträger komplett mit der entsprechenden Substanz benetzt und durch Masken bei 365 nm belichtet. Die Abbildungen 51A und B zeigen die Ergebnisse der Immobilisierung von Biotin **143** und dem Phosphopeptid **158**. Auch ein Protein, das Alken-funktionalisiertem Streptavidin **161**, konnte erfolgreich zur Oberflächenstrukturierung herangezogen werden (Abbildung 51C). Der Nachweis mit Biotin-Cy5 zeigt deutlich, dass das Protein nicht durch das UV-Licht zerstört wird, da es seine Fähigkeit, Biotin zu binden, nicht verliert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein nicht-funktionalisiertes Streptavidin **162** der gleichen Prozedur zur Immobilisierung unterzogen. Dabei wurde ein wesentlich geringeres Signal detektiert (Abbildung 51D) und so konnte demonstriert werden, dass das Streptavidin **161** tatsächlich über die Addition des Thiols an die Doppelbindung immobilisiert wurde. Ob biologische Funktionen wie beispielsweise eine Dephosphorylierung durch Enzyme nach der Einstrahlung erhalten bleiben, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Es konnte durch die Strukturierung in 3 μm breiten Linien gezeigt werden, dass die Auflösung der Immobilisierung 5 μm beträgt und durch den Fluoreszenz-Scanner bedingt ist. Daraufhin wurde ein Experiment zur Strukturierung mittels Lasermikroskop durchgeführt. Biotin **143** wurde mittels Laser-Belichtung auf einer Thiol-funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert und

erfolgreich mittels Streptavidin-Cy5 nachgewiesen. Dieses Resultat eröffnet die Möglichkeit, mittels Laser-gesteuerter Immobilisierung und Nachweis mit konfokaler Laserspektroskopie zukünftig eine Auflösung im nm-Bereich zu erzielen.

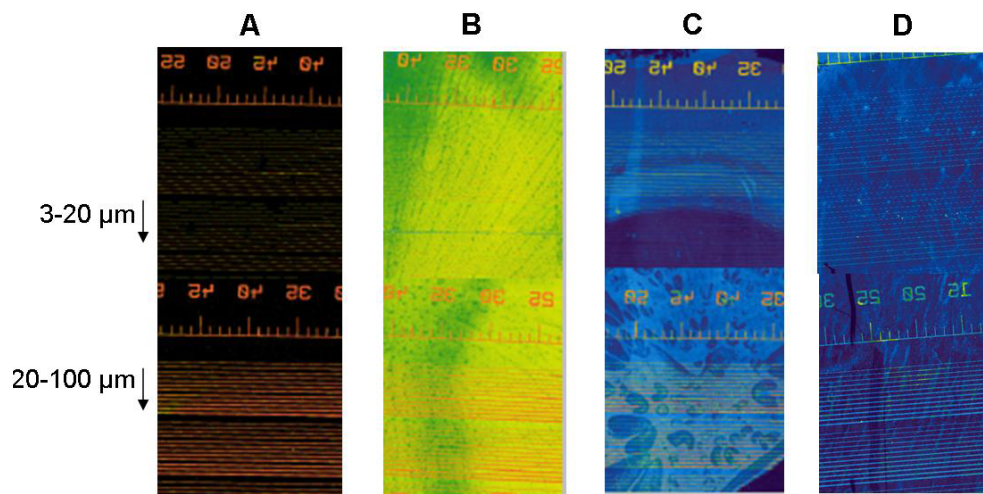


Abbildung 51: A: Nachweis von immobilisiertem Biotin **143** mit Streptavidin-Cy5; B: Nachweis von immobilisiertem Phosphopeptid **158** mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper-Konjugat; C: Nachweis von immobilisiertem Streptavidin **161** mit Biotin-Cy5; D: Negativkontrolle zu C, Nachweis von Streptavidin **162** mit Biotin-Cy5.

Es konnte also anhand verschiedener Verbindungen, die durch unterschiedliche biologische Wechselwirkungen nachgewiesen wurden, die Oberflächenstrukturierung mittels Photolithographie realisiert werden. Die Licht-induzierte Thiol-En-Addition wurde hier erstmals zur Oberflächenstrukturierung herangezogen. Dabei konnte eine für eine radikalische Addition erstaunlich gute Chemoselektivität erzielt werden, die sogar die Immobilisierung von Proteinen zulässt. Diese Technik könnte in Zukunft zur Herstellung von Mikrokanälen für Reaktionen auf Oberflächen oder von zur Nachahmung von Zell- und Protein-Oberflächen zur Untersuchung biologischer Vorgänge wie Zell-Zell- und Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet werden. Vorstellbar wäre auch, Lösungsassays wie den Malachitgrün-Assay, welche derzeit in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, auf eine im Schachbrettmuster polar, mit kurzkettigen Molekülen und unpolar, mit langkettigen Molekülen strukturierte Oberfläche zu übertragen („Nanotiterplatten“, „Lab on a chip“).

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines, Messgeräte und Hilfsmittel

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker AM 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR;
Varian Mercury 400	400 MHz ^1H -NMR, 100.6 MHz ^{13}C -NMR, 162.0 MHz ^{31}P -NMR.

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan, CHCl_3 , H_2O oder MeOH als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben und die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, m = Multipllett, br = breites Signal, Z = Zucker, AS = Aminosäure. Die Zucker-Protonen bzw. Kohlenstoffe wurden mit 1-6 bezeichnet, beginnend am anomeren Zentrum.

Die FAB-Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Als Matrix diente bei den FAB-Messungen standardmäßig 3-Nitrobenzylalkohol (3-NBA). Wurde eine andere Matrix benutzt, ist dies entsprechend angegeben. Die ESI-Messungen wurden mit einem Finnigan LCQ Massenspektrometer durchgeführt. Angegeben sind jeweils die m/z -Werte. Die ESI-FTMS-HR-Messungen wurden mit dem LTQ FT der Firma Thermo Electron am ISAS – Institute for Analytical Sciences, Dortmund, gemessen.

Die GC-MS-Untersuchungen wurden mit einem Gaschromatographen 5890 Serie II der Firma Hewlett Packard mit einer Kapillarsäule Optima 1, 0.2 mm, 25 m x 0.2 mm ID der Firma Macherey-Nagel und einem Massendetektor 5972 Serie von Hewlett Packard durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium und als Standardgradient folgender benutzt: 1 min 100°C , dann innerhalb von 5 min auf 280°C , die 5 min gehalten wurden.

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in g/100 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen vermerkt.

Schmelzpunkte wurden an der Schmelzpunktapparatur B-540 der Firma Büchi gemessen und sind unkorrigiert.

Die UV/VIS-Spektren wurden mit Cary 50 UV/VIS-Spektrometer der Firma Varian aufgenommen.

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F254). Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm bzw. 366 nm und zur Anfärbung folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz A: 5 g Kaliumpermanganat auf 100 g Wasser;

Reagenz B: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat, 6 ml konz. Schwefelsäure und 94 ml Wasser;

Reagenz C: 10% konz. Schwefelsäure in Ethanol.

Die entsprechenden Laufmittel und R_f -Werte sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Flash-Kieselgel der Firma Merck mit einem Überdruck von 0.3-0.8 bar.

Die präparative Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurde mit einem System der Firma Agilent (1100 Series) durchgeführt. Als Säulen fanden eine CC125/21 Nucleosil 120-5 C4 Säule bzw. CC125/21 Nucleodur 120-5 C18 Gravity der Firma Macherey&Nagel bei Flussraten von 25 ml/min Verwendung. Die analytische HPLC wurde mit einem HP 1100-Modell der Firma Hewlett-Packard mit CC125/4 Nucleosil 120-5 C4 Säule bzw. CC125/4 Nucleodur 120-5 C18 Gravity der Firma Macherey & Nagel mit Flussraten von 1 ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte jeweils bei den Wellenlängen 210 nm und 280 nm. Als Laufmittel wurden Wasser + 0.1 Vol.-% TFA (A) und Acetonitril + 0.1 Vol.-% TFA (B) verwendet.

Als Standardgradienten wurden folgende benutzt:

Analytische HPLC: 1 min 10 % B, dann innerhalb von 10 min auf 90 % B;

Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 15 min auf 100 % B.

Alle weiteren genutzten Gradienten sind individuell angegeben.

Das verwendete Sulfamylbutyryl- und Trityl-Harz wurde von der Firma Novabiochem bezogen. Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich, Novabiochem, Merck, ABCR, und Acros bezogen. Die getestete Phosphatase PTP1B wurde von BIOMOL Research Laboratories Inc., Plymouth bezogen, MPTPA von Prof. Schwalbe, Frankfurt, und PTP μ , PRL-3, PTP-BL sowie PTP-SL von Prof. Szedlaczek, Bukarest, Rumänien, zur Verfügung gestellt.

Trockene Lösungsmittel wurden, mit Ausnahme von Dichlormethan, von der Firma Fluka bezogen. Dichlormethan wurde unter Argon über Calciumhydrid destilliert.

Die Silicium-Wafer (SSP, Dicke: 125 mm, Größe: 2.5x7.5 cm²) wurden mit einer beschichteten Oberseite (1 μ m PECVD-SiO₂) von dem Institut für Hochfrequenztechnik, Universität Dortmund, hergestellt. Die verschiedenen funktionalisierten Dendrimer-modifizierten Glas- und Siliciumträger wurden von der Firma Chimera Biotec GmbH, Dortmund, bezogen.

Zum automatischen Besspotten der Oberflächen wurde der Nanoplotter 1.2 der Firma Gesim, Dresden, verwendet. Als Handspotter wurde das Modell MicroCaster von der Firma Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, benutzt. Alle auf Glasträgern durchgeführten Experimente wurden in Doppelbestimmung, d.h. ein Experiment wurde parallel auf zwei Glasträgern durchgeführt.

Für die Photolithografie wurde zum Auftragen der Substanzen ein Spin-Coater der Firma Laurell zusammen mit einem Chuck-Adapter aus Mylar-Folie (zur Sicherstellung des benötigten Vakuums) benutzt und die Belichtung wurde mit der Anlage MA6 (Firma Süss, Wellenlänge: 365 nm, Leistung: 20 mW/cm², Programm: Softkontakt) mit der Maske PKI im Institut für Hochfrequenztechnik durchgeführt. Die Belichtung ohne photolithografische Anlage wurde mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe („Pen Ray“-Lampe von der Firma UVP, Kalifornien, USA, Wellenlängenmaximum 365 nm, Leistung 5.5 W, Länge 2 1/8 inches) ausgeführt. Die photochemische Immobilisierung am Laser-Rastermikroskop der Firma Biorad, Typ MRC-1024, wurde mit einem Kr-Ar-Laser durchgeführt.

Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem Microarray-Fluorescence-Reader 4000B der Firma Axon ausgelesen und mit dem Programm Axon Gene Pix Pro 4.0 ausgewertet. Streptavidin-Cy5 wurde von der Firma Chimera Biotec zur Verfügung gestellt und stammt von der Firma Zyomed. Alexa-Fluor-647-markiertes Concanavalin A wurde von der Firma Molecular Probes, anti-Phosphotyrosin-Biotin von der Firma BIOTREND Chemikalien bezogen.

Zum Pipettieren von Lösungen für die Malachitgrün-Assays wurde der Pipettier-Roboter SciClone ALH500 der Firma Zymark verwendet.

Für biologische Tests und Nachweise verwendete Puffer:

TETBS: 20 mM TRIS-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% Tween-20, pH 7.5, bei Bedarf + DTT;

MESTBS: 20 mM TRIS-Cl, 150 mM NaCl, 4.5% Milchpulver (Oxoid), 5 mM EDTA, 0.2% NaN₃, 1 mg/ml DNA MB Grade (Roche);

TE: 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5;

Biotin-TETBS: TETBS, 800 µM D-Biotin;

HEPES: 25 mM HEPES-Na-Salz, 50 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.2.

Für die Bestimmung der Menge Thiol auf der Oberfläche wurde das „Thiol and Sulfide Quantification Kit“ (T-6060) der Firma Molecular Probes verwendet.

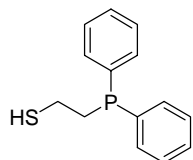
Soweit nicht anders beschrieben wurden die Reaktionen bei RT durchgeführt.

Die prozentualen und die anteiligen Lösungsmittelzusammensetzungen sind in v/v angegeben.

6.2 Versuche zu Kapitel 4.1

6.2.1 Versuche zu Kapitel 4.1.2

2-(Diphenylphosphino)ethanthiol (12)^[181]



In einem ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurde eine Lösung von 3.50 ml (20.0 mmol) Diphenylphosphin in 9.50 ml abs. Diethylether unter Eiskühlung tropfenweise mit 10.6 ml einer 1.8 M Lösung von Phenyllithium in abs. Cyclohexan/Diethylether = 1:1 und anschließend mit einer Lösung von 1.13 ml (19.0 mmol) Ethylensulfid in 9.50 ml abs. Diethylether versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT unter Argon gerührt und dann wurden 9.5 ml abs. MeOH und 4.8 ml entgaste ges. NH₄Cl-Lösung hinzugefügt. Die organische Phase wurde abgetrennt, einmal mit entgastem H₂O gewaschen und durch Codestillation mit abs. Toluol getrocknet. Destillation im HV (0.01 mbar) lieferte ein farbloses Öl.

Ausbeute: 2.13 g (8.66 mmol), 46%.

Sdp.: 132-140°C (0.01 mbar).

GC: t_r = 4.54 min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.46-7.38 (4 ar-H *ortho* zu P), 7.35-7.31 (6 ar-H), 2.61 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, CH₂-S), 2.40 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, CH₂-P).

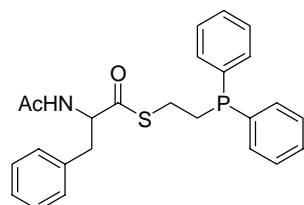
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.5 (2 ar-C_q), 132.7, 132.5, 128.8, 128.6, 128.5 (10 ar-C), 33.4 (CH₂-P), 21.4 (CH₂-S).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = -17.1.

C₁₄H₁₅PS (246.06).

GC-MS, m/z (rel. Int. %): 246 (68) [M]⁺, 218 (100), 183 (94), 140 (38), 121 (31), 108 (72).

N-Acetylphenylalanin-(2-diphenylphosphinoethylen)thioester (13)



Zu einer Lösung von 84 mg (0.45 mmol) Ac-Phe-OH in 4 ml abs. THF wurden unter Argon sowie unter Eiskühlung 102 mg (0.50 mmol) DCC und nach 10 min 100 mg (0.41 mmol) 2-Diphenylphosphinoethanthiol gegeben. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und der Ansatz 2 d bei RT gerührt. Der Harnstoff wurde danach unter Argon abfiltriert, der Filterkuchen mit etwas abs. THF gewaschen und das Filtrat i. Vak. eingengt. Anschließend folgte die flash-säulenchromatographische Aufreinigung mit getrocknetem Silicagel und entgastem Cy/EA = 2:1 als Laufmittel unter Argon.

Ausbeute: 86 mg (0.20 mmol), 48%.

Gelbliches Öl.

$R_f = 0.32$ (Cy/EA = 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.45-7.41 (m, 4H, 4 phenyl-ar-H), 7.38-7.33 (m, 6H, 6 phenyl-ar-H), 7.28-7.23 (m, 3H, 3 Phe-ar-H), 7.14-7.11 (m, 2H, 2 Phe-ar-H), 5.00-4.95 (m, 1H, Phe- α -H), 3.15 (dd, $^2J = 5.9$ Hz, $^3J = 14.1$ Hz, 1H, Phe-CHa), 3.08 (dd, $^2J = 6.9$ Hz, $^3J = 14.1$ Hz, 1H, Phe-CHb), 2.97-2.91 (m, 2H, CH_2 -S), 2.29 (dd, $^2J = 6.9$ Hz, $^3J = 9.1$ Hz, 2H, CH_2 -P), 1.99 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 199.6$ (C=O, Thioester), 169.8 (C=O, Amid), 137.4 (2 phenyl-ar- C_q), 135.5 (Phe-ar- C_q), 132.8, 132.6, 129.3, 128.9, 128.6, 128.5 (10 phenyl-ar-C, 4 Phe-ar-C), 127.2 (Phe-ar-C), 59.5 (Phe- α -C), 38.2 (Phe- CH_2), 28.3 (CH_2 -P), 26.1 (CH_2 -S), 23.1 (CH_3).

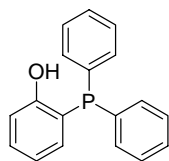
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = -15.5$.

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{PS}$ (435.14).

ESI-MS: ber.: 436.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 436.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$

2-Diphenylphosphinophenol (1)^[155]



In einen ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 2.20 g (10.0 mmol) 2-Iodphenol, 1.96 g (20.0 mmol) Kaliumacetat und 15 ml abs. *N,N*-Dimethylacetamid gegeben. Die Suspension wurde durch drei Vakuum/Argon-Zyklen entgast, dann wurden 34 mg (0.15 mmol) Palladium(II)acetat hinzugefügt und die Suspension wiederum entgast. Danach wurden 1.74 ml (10.0 mmol) Diphenylphosphin in einer mit Argon gefüllten Spritze hinzu gegeben. Die jetzt rotbraune Lösung wurde wieder entgast, auf 110°C unter Argon erhitzt und 18 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel i. Vak. einkondensiert. Anschließend wurden 120 ml entgaste 5% HCl-Lösung zu dem Rückstand gegeben, wiederum entgast und zur Extraktion unter Argon 30 min stark gerührt. Danach wurde die Suspension durch eine ausgeheizte, mit Argon gefüllte Schlenk-Fritte filtriert und der Filterkuchen mit 60 ml entgastem H_2O gewaschen. Der Filterkuchen wurde in wenig abs. EA aufgenommen und flash-säulenchromatographisch unter Argon mit getrocknetem Silicagel und dem Laufmittel Cy/EA = 4:1, welches entgast und mit Argon gesättigt war, aufgereinigt.

Weißer Feststoff.

Ausbeute: 2.28 g (8.20 mmol), 82%

$R_f = 0.46$ (Cy/EA = 3:1).

Schmp.: 92-93°C.

GC: $t_r = 6.23$ min (Standardgradient).

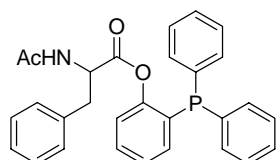
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.41\text{-}7.25$ (m, 10H, 10 ar-H), $7.00\text{-}6.78$ (m, 4H, 4 ar-H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = -14.9$ (PPh_3).

$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{OP}$ (278.09).

GC-MS, m/z (rel. Int. %): 278 (100) $[\text{M}]^+$, 199 (93), 183 (76), 152 (32), 107 (22), 77 (25), 51 (18).

N-Acetylphenylalanin-(2-diphenylphosphinophenyl)ester (26)



In einem ausgeheiztem, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 17 mg (0.06 mmol) 2-Diphenylphosphinophenol, 13 mg (0.06 mmol) Ac-Phe-OH und 6 mg (0.05 mmol) DMAP in 0.5 ml abs. DCM gelöst und der Ansatz wurde durch drei Vakuum-Argon-Zyklen entgast. Dann wurden unter Eiskühlung und Argon 10.2 μl (0.07 mmol) DIC hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 8 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Kühlfalle i. Vak. entfernt und das Produkt flash-säulenchromatographisch mit getrocknetem Silicagel unter Argon mit dem Laufmittel Cy/EA = 2:1, welches entgast und mit Argon gesättigt war, aufgereinigt.

Gelbliches, viskoses Öl.

Ausbeute: 8.4 mg (0.02 mmol), 30%.

$R_f = 0.46$ (Cy/EA = 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.33\text{-}7.17$ (m, 20H, 20 ar-H), $7.10\text{-}7.05$ (m, 4H, 4 ar-H), $4.79\text{-}4.75$ (m, 1H, Phe- α -H), 3.07 (dd, $^2J = 5.5$ Hz, $^3J = 14.0$ Hz, 1H, Phe-CHa), 2.83 (dd, $^2J = 7.0$ Hz, $^3J = 14.2$ Hz, 1H, Phe-CHb), 1.79 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.9, 169.7$ (2 C=O), 136.3, 134.5, 134.3, 134.2, 130.5, 129.8, 129.6, 129.5, 129.2, 129.1, 129.0, 127.5, 126.9, 122.5 (24 ar-C), 53.6 (Phe- α -C), 37.7 (Phe- CH_2), 23.4 (CH_3).

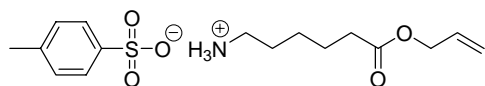
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = -15.5$.

$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{NO}_3\text{P}$ (467.17).

FAB-HR: ber.: 468.1723 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 468.1711 $[\text{M} + \text{H}]^+$

6-Aminocaprinsäureallylester-Toluolsulfonat (16)



Es wurden 10.0 g (76.2 mmol) 6-Aminocaprinsäure, 15.2 g Toluolsulfonsäure Hydrat (80.0 mmol), 60 ml (880 mmol)

Allylalkohol und 360 ml Benzol zusammengegeben und am Wasserabscheider unter Rückfluss

erhitzt. Nach 16 h wurde die Mischung abgekühlt und i. Vak. eingengt. Der Rest wurde mit 300 ml Ethylacetat digeriert und filtriert. Der farblose Feststoff wurde im HV getrocknet.

Ausbeute: 20.7 g (60.2 mmol), 79%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.74 (d, 3J = 8.1 Hz, 2H, ar-H), 7.20 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H, ar-H), 5.96-5.86 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32 (d, 3J = 17.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.22 (d, 3J = 10.5 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.53 (d, 3J = 5.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 2.80-2.74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.37 (s, 3H, CH_3), 2.19 (t, 3J = 7.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 1.53-1.42 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.27-1.18 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2$).

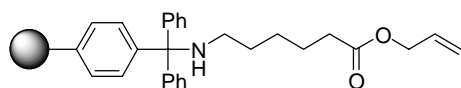
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 172.9 (C=O), 141.1, 140.9 (2 ar-C), 132.2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 129.1, 125.8 (4 ar-C), 118.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 65.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 39.7 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 33.7, 27.0, 25.8, 24.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$).

$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{S}$ (343.15).

FAB-LR: ber.: 344.15 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 344.15 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Triphenylmethylchlorid-Harzbeladung mit 6-Aminocapronsäureallylester (17)



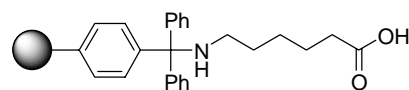
In einem Festphasenreaktor wurden 200 mg (0.22 mmol, 1.1 mmol/g) Tritylchlorid-Harz in 5 ml abs. DCM für 10 min gequollen während Argon durch den Ansatz geblubbert wurde. Dann wurde das DCM entfernt und 302 mg (0.88 mmol) 6-Aminocapronsäureallylester Toluolsulfonat in 5 ml abs. DCM sowie 306 μl (1.76 mmol) DIPEA unter Argon hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 4 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt und das Harz dreimal mit je 5 ml $\text{DCM/MeOH/DIPEA} = 17:2:1$ je 5 min geschüttelt. Das Harz wurde dann hintereinander mit je 5 ml DCM (3x), $\text{DMF/H}_2\text{O} = 1:1$ (1x), DMF (1x) und DCM (2x) gewaschen und anschließend 24 h im HV getrocknet.

Beladungsbestimmung

Es wurden 19.6 mg (theor. 0.021 mmol) Harz abgenommen und dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit DCM gewaschen und die gesammelten Lösungen i. Vak. konzentriert. Der Rückstand wurde 24 h im HV getrocknet und per $^1\text{H-NMR}$ kontrolliert. Das Spektrum gleicht dem des 6-Aminocapronsäureallylesters.

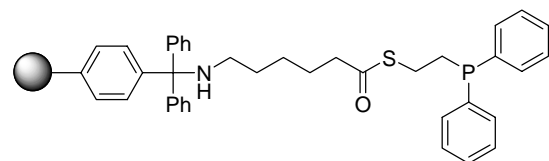
Ausbeute: 5.37 mg (0.018 mmol, TFA-Salz, MW = 301.15), 86%.

Neue Beladung: 0.94 mmol/g.

N-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäure (18)


In einem Festphasenreaktor wurden 210 mg (0.20 mmol, 0.94 mmol/g) Trityl-Harz **17** in 5 ml abs. DCM für 10 min gequollen während Argon durch den Ansatz geblubbert wurde. Dann wurden eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄ sowie 548 µl (4.45 mmol) Phenylsilan unter Argon hinzu gegeben, wobei sich das Harz dunkelbraun verfärbte. Der Ansatz wurde 3 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt und das Harz einmal mit abs. DCM gewaschen. Dann wurde wiederum die gleiche Menge an abs. DCM hinzugefügt und der Ansatz wie oben beschrieben wiederholt. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt, das Harz mit je 5 ml DCM (2x), DMF/H₂O = 1:1 (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und EA (2x) gewaschen und anschließend 24 h im HV getrocknet. Das Harz wurde direkt weiter umgesetzt.

Neue theoretische Beladung: 1.05 mmol/g.

N-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäure-2-diphenylphosphinoethyl-thioester (19)


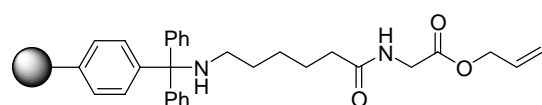
In einem Festphasenreaktor wurden 190 mg (0.200 mmol, 1.05 mmol/g) 6-Aminocaprinsäure-beladenes Trityl-Harz in 7 ml abs. DCM für 10 min gequollen während Argon, durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Dann wurden 392 mg (2.00 mmol) EDC sowie 492 mg (2.00 mmol) 2-Diphenylphosphinoethanthiol unter Argon hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 18 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt und das Harz zweimal mit abs. DCM gewaschen. anschließend im HV getrocknet.

Zur Produktkontrolle wurde wenig Harz abgenommen und unter Argon dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in abs. DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit abs. DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert.

C₂₂H₂₉N₂O₂PS (416.17).

Im ESI war nur das oxidierte Produkt festzustellen.

Neue theoretische Beladung: 0.85 mmol/g.

N-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäureamidoglycinalylester (20)


In einem Festphasenreaktor wurden 84 mg (0.09 mmol, 1.05 mmol/g) Trityl-Harz-gebundene 6-Aminocaprinsäure in 5 ml abs. DCM für 10 min gequollen. Dann wurden 135 mg (0.88 mmol) HOBt, 308 µl (1.76 mmol) DIPEA sowie 137 µl (0.88 mmol) DIC unter Argon hinzu gegeben

und der Ansatz wurde 3 h geschüttelt. Anschließend wurden 253 mg (0.88 mmol) Glycinalylester Toluolsulfonat hinzugefügt und es wurde weitere 23 h geschüttelt. Dann wurde das Lösungsmittel abgesaugt und das Harz mit je 5 ml DCM (2x), DMF/H₂O = 1:1 (1x), DMF (1x), DCM (2x), MeOH (2x) und EA (2x) gewaschen und anschließend im HV getrocknet.

Zur Produktkontrolle wurde wenig Harz abgenommen und dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert. Der 6-Aminocaprinsäureglycinalylester konnte im HPLC-ESI als einziges Produkt nachgewiesen werden.

Ausbeute: 100%.

C₁₁H₂₀N₂O₃ (228.15).

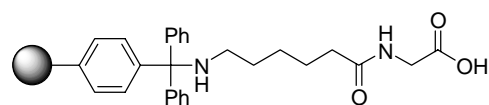
HPLC (C4): t_r = 4.71-6.08 min (1 min 10% B, dann innerhalb von 22 min auf 100% B).

ESI-MS: ber.: 229.2 [M + H]⁺

gef.: 229.2 [M + H]⁺

Neue theoretische Beladung: 0.95 mmol/g.

N-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäureamidoglycin (21)

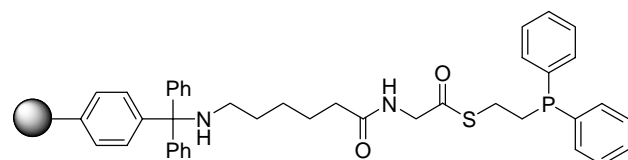


In einem Festphasenreaktor wurden 100 mg (0.095 mmol, 0.95 mmol/g) 6-Aminocaprinsäureamidoglycinalylester-beladenes Trityl-Harz in 5 ml abs.

DCM für 10 min gequollen während Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Dann wurden eine Spatelspitze Pd(PPh₃)₄ sowie 310 µl (2.52 mmol) Phenylsilan unter Argon hinzu gegeben, wobei sich das Harz dunkelbraun verfärbte. Der Ansatz wurde 3 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt und das Harz einmal mit abs. DCM gewaschen. Dann wurde wiederum die gleiche Menge an abs. DCM hinzugefügt und der Ansatz wie oben beschrieben wiederholt. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt, das Harz mit je 5 ml DCM (2x), DMF/H₂O = 1:1 (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und EA (2x) gewaschen und anschließend im HV getrocknet. Das Harz wurde direkt weiter umgesetzt.

Neue theoretische Beladung: 0.99 mmol/g.

N-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäureamidoglycin-2-diphenylphosphinoethylthioester (22)



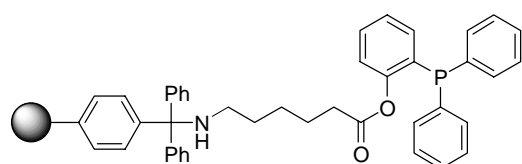
In einem Festphasenreaktor wurden 89 mg (0.088 mmol, 0.99 mmol/g) 6-Aminocaprinsäureamidoglycin-beladenes

Trityl-Harz in 5 ml abs. DCM für 10 min gequollen während Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Dann wurden 150 µl (0.97 mmol) DIC sowie 271 mg (1.10 mmol) 2-Diphenylphosphinoethanthiol unter Argon hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 21 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt, das Harz zweimal mit abs. DCM gewaschen und im HV getrocknet. Das Harz wurde aufgrund der Oxidationslabilität ohne Kontrolle direkt weiter umgesetzt.

$C_{22}H_{29}N_2O_2PS$ (416.17).

Neue theoretische Beladung: 0.78 mmol/g.

***N*-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäure-2-diphenylphosphinophenyl-ester (29)**



In einem ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 25 mg (0.027 mmol, 1.05 mmol/g) 6-Aminocaprinsäure-beladenes Trityl-Harz in 3.5 ml abs. DCM für 10 min gequollen. Dann wurden 73

mg (0.26 mmol) 2-Diphenylphosphinophenol, 25 mg (0.21 mmol) DMAP sowie 44 µl (0.29 mmol) DIC unter Argon hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 21 h langsam gerührt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt, das Harz dreimal mit abs. DCM gewaschen und im HV getrocknet.

Zur Produktkontrolle wurde wenig Harz abgenommen und unter Argon dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in abs. DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit abs. DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert.

$C_{24}H_{26}NO_2P$ (391.17).

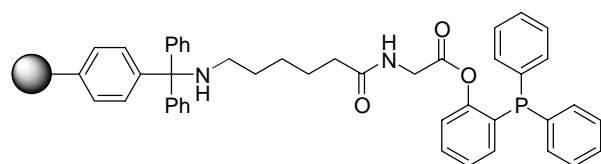
ESI-MS: ber.: 392.2 [M + H]⁺

gef.: 392.3 [M + H]⁺

Nach einem HPLC-Lauf konnte nur noch oxidiertes Produkt detektiert werden, so dass anzunehmen ist, dass die Substanz auf der Säule oxidierte.

Neue theoretische Beladung: 0.82 mmol/g.

***N*-Triphenylmethyl-Harz-6-Aminocaprinsäureamidoglycin-2-diphenylphosphinophenyl-ester (30)**



In einem Festphasenreaktor wurden 50 mg (0.049 mmol, 0.99 mmol/g) 6-

Aminocaprinsäure-amidoglycin-beladenes

Trityl-Harz in 5 ml abs. DCM für 10 min

gequollen während Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Dann wurden 138 mg

(0.49 mmol) 2-Diphenylphosphinophenol, 50 mg (0.39 mmol) DMAP sowie 84 μ l (0.54 mmol) DIC unter Argon hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 21 h geschüttelt, das Lösungsmittel anschließend abgesaugt, das Harz dreimal mit abs. DCM gewaschen und im HV getrocknet.

Zur Produktkontrolle wurde wenig Harz abgenommen und unter Argon dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in abs. DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit abs. DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert.

$C_{26}H_{29}N_2O_3P$ (448.19).

ESI-MS: ber.: 449.2 [M + H]⁺

gef.: 449.2 [M + H]⁺

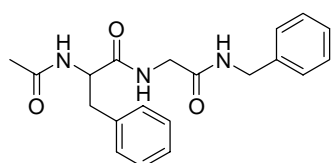
Nach einem HPLC-Lauf konnte nur noch oxidiertes Produkt detektiert werden, so dass anzunehmen ist, dass die Substanz auf der Säule oxidierte.

Neue theoretische Beladung: 0.79 mmol/g.

Staudinger-Ligationen in Lösung: AAV 6.2.1

Zu einer Lösung des Diphenylphosphino(thio)esters in entsprechendem Lösungsmittel und unter Luft- oder Argonatmosphäre wurde Azidoessigsäurebenzylamid **14** gegeben. Die Reaktionsmischung wurde gerührt, anschließend in einigen Fällen mit H₂O versetzt und eine weitere Stunde gerührt. Zur Produktkontrolle wurde eine HPLC-ESI-Analyse vorgenommen.

N-Acetyl-phenylalanyl-glycin-benzylamid (**15**)



Alle in der Tabelle aufgeführten Reaktionen wurden nach AAV 6.2.1 durchgeführt.

$C_{20}H_{23}N_3O_3$ (353.17).

ESI-MS: ber.: 354.18 [M + H]⁺, 376.16 [M + Na]⁺

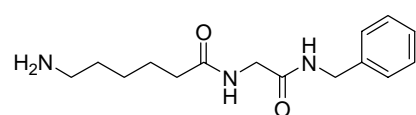
Menge an Phosphin	Menge an Azid 14	Lösungsmittel	Argon	H ₂ O-Zugabe/ Reaktionszeit	Produkt (HPLC-ESI)	m/z (ESI) gef.:
19 mg (0.04 mmol) 13	12 mg (0.06 mmol)	1 ml THF/H ₂ O=3:1 entgast, Argon ges.	ja	16 h	-	-
20 mg (0.05 mmol) 13	12 mg (0.06 mmol)	1 ml THF/H ₂ O=3:1	nein	16 h	-	-
20 mg (0.05 mmol) 13	10 mg (0.06 mmol)	1 ml THF	nein	16 h	-	-
11 mg (0.03 mmol) 13	7 mg (0.04 mmol)	1 ml abs. THF	ja	0.5 ml/ 16 h	+	354.2 [M + H] ⁺ 376.3 [M + Na] ⁺
11 mg (0.03 mmol) 13	8 mg (0.04 mmol)	1 ml abs. DMF	ja	0.5 ml/ 16 h	-	-

11 mg (0.03 mmol) 13	7 mg (0.04 mmol)	1 ml abs. Dioxan	ja	0.5 ml/ 17 h	+	354.0 [M + H] ⁺ 376.2 [M + Na] ⁺
8.4 mg (0.02 mmol) 26	3.4 mg (0.02 mmol)	0.5 ml THF	ja	15 h	+	354.1 [M + H] ⁺ 376.3 [M + Na] ⁺

Staudinger-Ligationen an fester Phase: AAV 6.2.2

Zum Phosphin-modifizierten Harz wurde Lösungsmittel gegeben und es wurde 10 min Argon durch die Reaktionsmischung geleitet. Unter Argon wurde anschließend in Lösungsmittel gelöster Azidoessigsäurebenzylester **14** hinzugefügt und der Ansatz über Nacht geschüttelt. Danach wurde in einem Fall H₂O dazu gegeben und eine weitere Stunde geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Harz mit THF (1x), DCM (2x), MeOH (2x) und EA (2x) gewaschen. Die Abspaltung erfolgte durch dreimaliges zehnmütiges Behandeln mit je 2 ml 5% TFA in DCM. Das Harz wurde zweimal mit DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert.

N-(6-Aminocapronsäureamido)glycin-benzylamid (**23**)



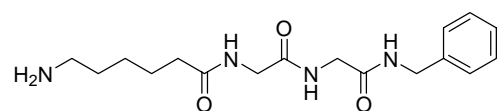
Alle in der Tabelle aufgeführten Reaktionen wurden nach AAV 6.2.2 durchgeführt.

C₁₅H₂₃N₃O₂ (277.18).

ESI-MS: ber.: 278.19 [M + H]⁺

Menge an Phosphin	Menge an Azid 14	Lösungsmittel	H ₂ O-Zugabe/ Reaktionszeit	Produkt (HPLC-ESI)	m/z (ESI) gef.:
235 mg (0.20 mmol) 19	380 mg (2.00 mmol)	11 ml abs. THF	3 ml/ 21 h	-	-
32 mg (0.03 mmol) 29	50 mg (0.26 mmol)	3 ml THF	17 h	+	278.3 [M + H] ⁺

N-(6-Aminocapronsäureamido)glycyl-glycin-benzylamid (**24**)



Alle in der Tabelle aufgeführten Reaktionen wurden nach AAV 6.2.2 durchgeführt.

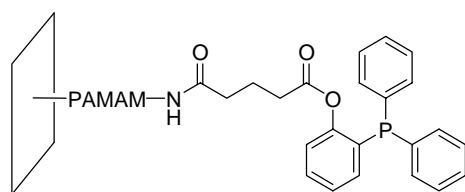
C₁₇H₂₆N₄O₃ (334.20).

ESI-MS: ber.: 335.21 [M + H]⁺

Menge an Phosphin	Menge an Azid 14	Lösungsmittel	H ₂ O-Zugabe/ Reaktionszeit	Produkt (HPLC-ESI)	m/z (ESI) gef.:
115 mg (0.09 mmol) 22	168 mg (0.88 mmol)	4 ml abs. THF	1 ml/ 17 h	-	-
63 mg (0.05 mmol) 30	94 mg (0.49 mmol)	3 ml THF	22.5 h	+	335.3 [M + H] ⁺

6.2.2 Versuche zu Kapitel 4.1.3

Funktionalisierung von Carbonsäure-terminierten Oberflächen mit 2-Diphenylphosphinophenol (**33**)



In ein langes, schlankes Schlenk-Gefäß (Abbildung 50), in dem sich vier auf einem Teflonhalter angebrachte Carbonsäure-funktionalisierte PAMAM-Glasträger befanden, wurden unter Argon 65 ml abs. DCM, 30 mg (3.84 mM, 0.96 mM pro Glasträger) DMAP, 87 mg (4.80 mM, 1.20 mM pro Glasträger) 2-Diphenylphosphinophenol und 53 μ l (5.28 mM, 1.32 mM pro Glasträger) DIC gegeben. Sowohl bei der Reaktion als auch bei dem Waschvorgang müssen alle Träger komplett mit Flüssigkeit bedeckt sein. Die Lösung wurde durch drei Vakuum-Argon-Zyklen entgast und der Ansatz mindestens 15 h unter Argon gerührt. Die überstehende Lösung wurde mit einer Spritze mit langer, dicker Kanüle entfernt, die Glasträger mit abs. DCM gespült, die Lösung wieder entfernt und 65 ml abs. DCM hinzugegeben. Während der gesamten Prozedur wurden die Glasträger im Schlenk-Gefäß unter Argon behandelt. Der Ansatz wurde 30 min gerührt, das Lösungsmittel wieder entfernt, die Glasträger mit abs. DCM gespült, i. Vak. getrocknet und unter Argon gelagert.



Abbildung 50: Schlenk-Gefäß und Teflonhalter zur Funktionalisierung von Oberflächen

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Hand-Bespotten Phosphin-funktionalisierter Glasträger: AAV 6.2.3

In ein weites Becherglas mit Teflonhaltern (zwei pro Glasträger) wurde H₂O gegeben, bis die Teflonhalter bis zur Hälfte in H₂O standen. Dann wurde das Becherglas mit einem größeren abgedeckt und durch eine kleine Öffnung 15 min Argon durch das H₂O geblubbert (Abbildung 51). Dann wurden mit einer Eppendorfpipette in einem gewünschten Muster 0.5 µl Tröpfchen einer Lösung der zu immobilisierenden Substanz abgesetzt. Direkt nach der Bespottung wurden die Glasträger auf jeweils zwei Teflonhalter in das Becherglas gelegt. Das zweite, größere Becherglas wurde wieder über das untere gestülpt. Die Glasträger wurden über Nacht inkubiert, anschließend stringent mit Dioxan und H₂O gespült, dann 30 min in Dioxan/H₂O = 2:1 in einer Box für Objektträger geschüttelt, wieder mit Dioxan und H₂O gespült und im HV getrocknet.

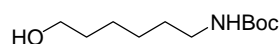


Abbildung 51: Becherglas, das mit einem größeren Becherglas abgedeckt ist, mit Teflonhaltern und Argonzufuhr.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum automatischen Bespotten Phosphin-funktionalisierter Glasträger: AAV 6.2.4

Die in abs. Dioxan/H₂O = 2:1 gelösten, zu immobilisierenden Sondenmoleküle wurden in eine Mikrotiterplatte vorgelegt, aus der der Roboter die benötigte Menge entnahm. Nach dem Bespotten wurden die Glasträger unter Stickstoff mindestens über Nacht inkubiert. Anschließend wurden sie mit H₂O und TETBS gewaschen, mit MESTBS 30 min blockiert und ausgelesen (Dr. Ron Wacker, Chimera Biotec GmbH) oder entsprechend weiter inkubiert (s. Kapitel 6.3).

6-(N-tert-Butyloxycarbonyl)aminohexanol (zu 36)^[154]



Es wurden 4.54 g (38.8 mmol) 6-Aminohexanol und 2.16 g (54.0 mmol; 1.4 Äq) NaOH in 40 ml Dioxan und 20 ml H₂O gelöst. Dann wurde unter Eiskühlung innerhalb von 40 min eine Lösung von 10.0 g (46.6 mmol; 1.2 Äq) t-Butyloxycarbonylanhydrid in 40 ml Dioxan zugetropft und der Ansatz über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wurde Dioxan i. Vak. entfernt, der Rückstand mit 50 ml Ethylacetat sowie 50 ml H₂O überschichtet und der pH-Wert mittels 1 M HCl-Lösung auf 5 eingestellt. Die Phasen

wurden getrennt, die wässrige Phase dreimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Farbloses viskoses Öl.

Ausbeute Rohprodukt: 7.2 g (≈ 38.8 mmol), quantitativ.

GC: $t_r = 3.99$ min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.52$ (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 3.01 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 1.48 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.41 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-OH), 1.37 (s, 9H, *t*Bu), 1.32-1.22 (m, 4H, 2 CH₂).

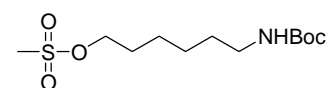
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.0$ (C=O), 79.5 (C_q-*t*Bu), 67.2 (CH₂-OH), 62.4 (CH₂-NH), 32.5 (CH₂-CH₂-OH), 30.0 (CH₂-CH₂-NH), 28.5 (3 *t*Bu-CH₃), 26.5 (CH₂), 25.4 (CH₂).

C₁₁H₂₃NO₃ (217.17).

GC-MS, m/z (rel. Int. %): 161 (7) [M - *t*Bu + H]⁺, 144 (5) [M - O-*t*Bu]⁺, 116 (10), 100 (5), 74 (14), 57 (100) [*t*Bu]⁺.

Die Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[154]

6-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminohexylmethansulfonsäureester (zu 36)^[154]

 Unter Argonatmosphäre wurden 38.8 mmol 6-(*N*-Boc)-Aminohexanol in 140 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 7.55 ml (54.7 mmol; 1.4 Äq) Triethylamin versetzt. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 3.60 ml (45.6 mmol; 1.2 Äq) Methansulfonsäurechlorid zugetropft und 15 min bei Eiskühlung und für weitere 60 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 100 ml ges. Ammoniumchloridlösung zugesetzt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase weitere zweimal mit 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Es wurde ein schwach gelbes Öl erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

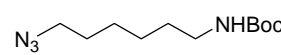
Ausbeute Rohprodukt: 11.5 g (≈ 38.8 mmol), quantitativ.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.21$ (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-OMs), 3.10 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.99 (s, 3H, S-CH₃), 1.77-1.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.51-1.21 (m, 15H, 3 *t*Bu, 3 CH₃).

C₁₂H₂₅NO₅S (295.15).

Die Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[154]

6-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminohexylazid (zu 36)^[154]

 Der aus obiger Umsetzung erhaltene Methansulfonsäureester (38.8 mmol) wurde in 200 ml absolutem DMF gelöst und es wurden 25.3 g NaN₃ (388 mmol; 10 Äq) zugesetzt. Die resultierende Suspension wurde unter kräftigem Rühren für 12 h auf 50°C erhitzt und anschließend das DMF im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 200 ml Ethylacetat aufgenommen und fünfmal mit 100 ml Wasser sowie zweimal mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt flash-chromatographisch an SiO₂ mit dem Laufmittel Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1 gereinigt.

Schwach gelbes Öl.

Ausbeute: 9.21 g (38.0 mmol), 98%

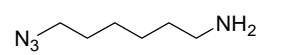
R_f = 0.53 (Cy/EA = 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.25 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-N₃), 3.10 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 1.61-1.57 (m, 2H, CH₂-CH₂-N₃), 1.49-1.44 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.40-1.33 (m, 4H, 2 CH₂).

C₁₁H₂₂N₄O₂ (242.17).

Die Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[154]

6-Aminoethylazid (36)^[154]

 Zu einer Lösung von 9.21 (38.0 mmol) Boc-geschütztem 6-Aminoethylazid in 71 ml Dichlormethan wurden unter Eiskühlung 56 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Es wurde 10 min bei Eiskühlung gerührt und 1 h weiter bei RT bis laut DC-Kontrolle das Edukt verbraucht war. Zur Neutralisation der Trifluoressigsäure wurde ges. NaHCO₃-Lösung hinzugegeben bis pH 8 erreicht war. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige auf 200 ml eingeeengt. Ausgefallenes NaHCO₃ wurde abfiltriert und der Filterkuchen mit DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden ebenfalls i. Vak. eingeeengt und anschließend wurde das wässrige Filtrat über Nacht mit der organischen Phase in einer Extraktionsapparatur extrahiert. Die Phasen wurden getrennt, die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Grün-braunes Öl.

Ausbeute: 5.23 g (37.4 mmol), 99%.

R_f = 0.03 (Cy/EA = 4:1).

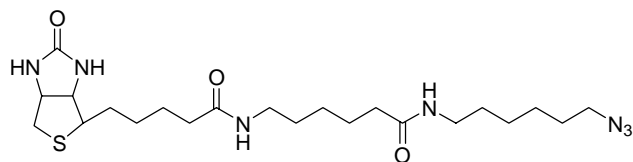
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.20 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-N₃), 2.75 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-NH₂), 1.58-1.49 (m, 4H, CH₂-CH₂-N₃, CH₂-CH₂-NH₂), 1.35-1.28 (m, 4H, 2 CH₂).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 51.5$ ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 41.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 30.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 28.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 26.5, 26.3 (2 CH_2).

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4$ (142.12).

Die Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[154]

Biotin-6-amidocapronsäure(6-azidohexyl)amid (37)



Eine Lösung von 50 mg (0.14 mmol) Biotin-6-amidocapronsäure in 3 ml abs. DMF wurde hergestellt, indem die nach Zugabe erhaltene Suspension mit einem Heißluftfön

erhitzt wurde und, nachdem sich alles gelöst hatte, wieder auf rt abgekühlt wurde. Dann wurden 30 mg (0.15 mmol) EDC und 24 mg (0.15 mmol) HOBT dazu gegeben und 1 h gerührt. Danach wurden 51 mg (0.20 mmol) 6-Azidohexylamin-trifluoacetat in 1 ml abs. DMF hinzugefügt und 15 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der Rest in wenig MeOH aufgenommen und mit viel Et_2O wurde das Produkt ausgefällt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 34 mg (0.07 mmol), 49%.

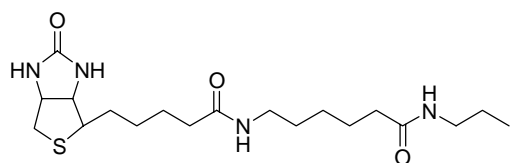
Schmp.: 164°C.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 4.50$ (dd, $^2\text{J} = 5.0$ Hz, $^3\text{J} = 8.0$ Hz, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-S}$), 4.32-4.27 (m, 1H, CH-CH-S), 3.24-3.12 (m, 7H, S-CH, 2 C(O)-NH-CH_2 , $\text{N}_3\text{-CH}_2$), 2.91 (dd, $^2\text{J} = 5.0$ Hz, $^3\text{J} = 12.7$ Hz, 1H, S-CHa), 2.69 (d, $^3\text{J} = 12.5$ Hz, 1H, S-CHb), 2.31-2.16 (m, 4H, 2 CH_2), 1.75-1.34 (m, 20H, 10 CH_2).

$\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ (481.28).

FAB-HR: ber.: 482.2913 $[\text{M} + \text{H}]^+$
 gef.: 482.2908 $[\text{M} + \text{H}]^+$
 ber.: 504.2733 $[\text{M} + \text{Na}]^+$
 gef.: 504.2727 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Biotin-6-amidocapronsäurepropylamid (38)



Eine Lösung von 50 mg (0.14 mmol) Biotin-6-amidocapronsäure in 3 ml abs. DMF wurde hergestellt, indem die nach Zugabe erhaltene Suspension mit einem Heißluftfön erhitzt wurde und,

nachdem sich alles gelöst hatte, wieder auf RT abgekühlt wurde. Dann wurden 30 mg (0.15

mmol) EDC und 24 mg (0.15 mmol) HOBt dazu gegeben und alles 2 h gerührt. Danach wurden 25 μ l (0.30 mmol) Propylamin hinzugefügt und 15 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der Rest in wenig MeOH aufgenommen und mit viel Et₂O wurde das Produkt ausgefällt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Grülicher Feststoff.

Ausbeute: 44 mg (0.11 mmol), 79%.

Schmp.: 183°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ = 7.75-7.64 (br, 2H, Amid-NH), 6.38 (s, 1H, Biotin-NH), 6.32 (s, 1H, Biotin-NH), 4.29-4.25 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{-S}$), 4.13-4.07 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH-S}$), 3.09-3.02 (m, 1H, S-CH), 2.99-2.90 (m, 4H, 2 Amid-NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.78 (dd, ²J = 4.9 Hz, ³J = 12.5 Hz, 1H, S-CHa), 2.54 (d, ³J = 12.5 Hz, 1H, S-CHb), 2.00 (t, ³J = 7.0 Hz, 4H, 2 CH₂-C=O), 1.52-1.13 (m, 14H, 7 CH₂), 0.79 (t, ³J = 7.6 Hz, 3H, CH₃).

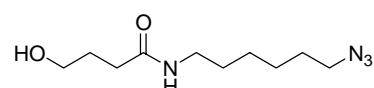
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 177.4, 177.3 (Amid-C=O), 168.2 (Biotin-C=O), 66.5, 64.7, 60.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{-S}$, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH-S}$, S-CH), 45.6, 44.3, 43.7, 40.8, 40.7, 34.4, 33.7, 33.5, 31.6, 30.8, 30.5, 27.8 (12 CH₂), 16.8 (CH₃).

C₁₉H₃₄N₄O₃S (398.24).

FAB-HR: ber.: 399.2430 [M + H]⁺

gef.: 399.2442 [M + H]⁺

4-Hydroxybuttersäure(6-azidohexyl)amid (39)



Unter Argon und Rühren wurden zu 500 mg (3.52 mmol) 6-Azidohexylamin 2.68 ml (35.2 mmol) Butyrolacton gegeben und die Mischung 18 h gerührt. Das Rohprodukt wurde anschließend ohne weitere Behandlung oder Einengung direkt aus der Reaktionsmischung säulenchromatographisch aufgereinigt (5% MeOH in DCM).

Hellbraune Flüssigkeit.

Ausbeute: 581 mg (2.55 mmol), 72%.

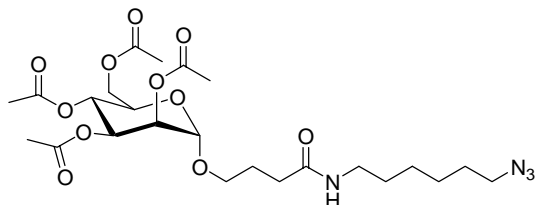
R_f = 0.24 (5% MeOH in DCM).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.67 (t, ³J = 5.3 Hz, 2H, CH₂-OH), 3.27-3.20 (m, 4H, CH₂-N₃, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH}$), 2.36 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-C=O), 1.90-1.82 (m, 2H, CH₂), 1.63-1.47 (m, 4H, 2 CH₂), 1.41-1.31 (m, 4H, 2 CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.6 (C=O), 62.2 (CH₂-OH), 51.2 (N₃-CH₂), 39.5 (CH₂-NH), 33.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C=O}$), 29.3, 28.6, 26.3, 26.2 (5 CH₂).

C₁₀H₂₀N₄O₂ (228.16).

***O*-[(2,3,4,6-Tetra-*O*'-acetyl)- α -D-mannopyranosyl]-*O*-4-oxybuttersäure-(6-azidohexyl)-amid (42)^[162]**



Es wurden 498 mg (1.21 mmol) Acetobromomannose **41** unter Argon in einem ausgeheizten Schlenkkolben zusammen mit 117 mg Drierite und 234 mg (1.03 mmol) 4-Hydroxybuttersäure(6-azidohexyl)amid **39** in abs. Toluol/Nitromethan = 1:1 gelöst. Dann wurden 260 mg (1.03 mmol) Hg(CN)₂ hinzugefügt und die Mischung für 18 h gerührt. Die Mischung wurde durch Celite filtriert, i. Vak. eingengt, in Chloroform gelöst und wiederum eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit einem Laufmittelgradienten von Cy/EA = 1:2, Cy/EA = 1:4 bis purem EA lieferte einen leicht gelblichen Sirup.

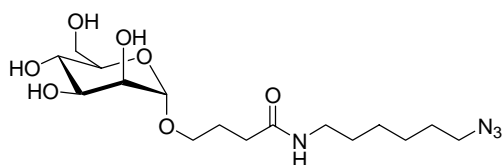
Ausbeute: 87 mg (0.16 mmol), 15%.

R_f = 0.30 (Cy/EA = 1:4).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.27-5.15 (m, 2H, 2 Z-H), 4.74-4.72 (m, 1H, Z-H) 4.23-4.18 (m, 1H, Z-H), 4.10-4.04 (m, 2H, CH₂-O), 3.94-3.90 (m, 1H, Z-H), 3.73-3.66 (m, 1H, Z-H), 3.47-3.42 (m, 1H, Z-H), 3.23-3.17 (m, 4H, CH₂-N₃, CH₂-NH), 2.26-2.20 (m, 2H, CH₂-C=O), 2.10-1.84 (m, 14H, 4 (C=O)-CH₃, CH₂), 1.58-1.43 (m, 4H, 2 CH₂), 1.38-1.26 (m, 4H, 2 CH₂).

C₂₄H₃₈N₄O₁₁ (558.25).

α -D-Mannopyranosyl-*O*-4-oxybuttersäure-(6-azidohexyl)amid (43)^[163]



Zu einer Lösung von 75 mg (0.14 mmol) **42** in 1 ml abs. MeOH wurde unter Argon 1M NaOMe in MeOH solange hinzugetropft, bis pH 9 erreicht war. Der Umsatz des Substrats wurde mittels DC (Laufmittel MeOH/EA = 1:9) kontrolliert. Nach 2 h wurde wieder 1 M NaOMe in MeOH hinzugefügt, bis pH 10 erreicht war. Weitere 2 h später wurde Na⁺-Amberlite Ionenaustauscher hinzu gegeben, bis pH 7 erreicht war. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. entfernt.

Leicht gelblicher Sirup.

Ausbeute: 49 mg (0.13 mmol), 92%.

R_f = 0.29 (MeOH/EA = 1:9), lang gezogener Fleck.

[α]_D²⁰ = +37.2° (c = 0.5, MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 4.73 (d, ³J = 1.6 Hz, 1H, Z-H1), 3.83-3.55 (m, 6H, 4 Z-H, Z-O-CH₂), 3.53-3.41 (m, 2H, 2 Z-H), 3.28 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-N₃), 3.16 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H,

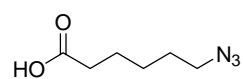
$\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.29-2.24 (m, 2H, CH_2), 1.93-1.84 (m, 2H, CH_2), 1.63-1.46 (m, 4H, 2 CH_2), 1.45-1.32 (m, 4H, 2 CH_2).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 174.4 (C=O), 100.4 (Z-C1), 73.4, 71.5, 71.0, 67.4, 66.6, 61.6 (5 Z-C, Z-O- CH_2), 51.2 ($\text{N}_3\text{-CH}_2$), 39.1 (N- CH_2), 32.7, 29.1, 28.6, 26.4, 26.3, 25.7 (6 CH_2).

$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$ (390.21).

FAB-HR: ber.: 391.2193 $[\text{M} + \text{H}]^+$
 gef.: 391.2171 $[\text{M} + \text{H}]^+$
 ber.: 413.2012 $[\text{M} + \text{Na}]^+$
 gef.: 413.1993 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

6-Azidocaprinsäure (46)



Zu einer Lösung von 1.00 g (5.13 mmol) 6-Bromocaprinsäure (45) in 30 ml abs. DMF wurden unter Argon 1.67 g (25.7 mmol) NaN_3 gegeben. Die

Suspension wurde auf 55°C erhitzt und 16 h bei dieser Temperatur intensiv gerührt. Anschließend wurde das DMF i. Vak. entfernt, der Rückstand in 100 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{EA} = 1:1$ aufgenommen und mit 1 M KHSO_4 -Lösung auf pH 5 eingestellt. Die Phasen wurden getrennt, die organische zweimal mit 50 ml H_2O und die vereinigten wässrigen einmal mit 50 ml EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden wiederum mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. konzentriert.

Leicht gelbliches viskoses Öl.

Ausbeute: 781 mg (4.97 mmol), 97%.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.26 (t, $^3\text{J} = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.35 (t, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 1.69-1.56 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$), 1.45-1.38 (m, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 179.5 (C=O), 51.1 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 33.7 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$), 28.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 26.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$), 24.0 (CH_2).

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ (157.09).

FAB-LR: ber.: 156.08 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 gef.: 155.87 $[\text{M} - \text{H}]^-$

(N-6-Azidocaprinsäureamido)-alanyl-tryptophyl-arginyl-histidyl-prolyl-glutamyl-phenylalanyl-glycyl-glycin („Strep Tag I - Azid“) (48)

(N-6-Azidocaprinsäureamido)-Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly

Die Aminosäurekupplungen wurden an 500 mg Glycin-vorbeladenem Wang-Harz (0.5 mmol, 1 mmol/g) durchgeführt. Die Kupplungs- und Fmoc-Abspaltungsschritte erfolgten nach AAV

6.3.3 und 6.3.5, Kapitel 6.3.2. Zur Kupplung wurden abweichend von AAV 6.3.3 25 ml DMF für 0.5 mmol Harz verwendet, und nach jedem Kuppeln wurde das Harz zweimal 10 min mit 25 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin = 1:9 behandelt (s. AAV 6.3.1). Zur Fmoc-Abspaltung wurden 25 ml 20% Piperidin in DMF benutzt. Die verwendeten Fmoc-Aminosäuren waren: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH und Fmoc-Ala-OH. Im letzten Schritt wurde 6-Azidocaprinsäure nach AAV 6.3.3 über Nacht an das Alanin angeknüpft. Zur Abspaltung vom Harz und gleichzeitigen Entschützung der Seitenketten wurden 100 mg Harz (0.033 mmol, theor. Beladung 0.334 mmol/g bei 100% Umsatz) in 2 ml TFA 3.5 h gerührt. Dann wurde der Ansatz filtriert, das Harz mit MeOH gewaschen und das Filtrat i. Vak. konzentriert. Dann wurde der Rückstand in wenig MeOH aufgenommen und in eiskalten Diethylether getropft, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde filtriert, in H₂O aufgenommen, wieder filtriert und anschließend durch präparative HPLC (C18; 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 40% B und nach weiteren 3 min auf 100% B) aufgereinigt.

Ausbeute: 8.9 mg (0.008 mmol), 24%.

HPLC (C18): $t_r = 1.37$ min (1 min 10% B, dann innerhalb von 10 min auf 40% B).

$[\alpha]_D^{20} = -51.6^\circ$ (c = 0.8, H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.52$ (s, 1H, His-ar-H), 7.55 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.36 (t, ³J = 8.1 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.30-7.08 (m, 8H, 5 Phe-ar-H, 3 Trp-ar-H), 7.04-7.00 (m, 1H, His-ar-H), 4.67-4.62 (m, 1H, AS- α -H), 4.43-4.38 (m, 1H, AS- α -H), 4.28-4.20 (m, 3H, 3 AS- α -H), 4.02-3.89 (m, 4H, 2 AS- α -H, Gly-CH₂), 3.69 (s, 2H, Gly-CH₂), (3.68, s, CH₃ Nebenprodukt Methylester), 3.29-2.95 (m, 10H, CH₂-N₃, Trp-CH₂, His-CH₂, Phe-CH₂, Pro-CH₂), 2.29-1.87 (m, 14H, 7 CH₂), 1.79-1.24 (m, 11H, 4 CH₂, Ala-CH₃).

C₅₅H₇₅N₁₉O₁₂ (1193.58).

ESI-MS: ber.: 1194.6 [M + H]⁺

gef.: 1194.6 [M + H]⁺

gef.: 1208.6 [M + H]⁺ (Nebenprodukt Methylester, ber.: 1208.61 [M + H]⁺)

Maldi-MS: gef.: 1194.9 [M + H]⁺

Produkt und Nebenprodukt konnten mit präparativer HPLC nicht getrennt werden.

Alanyl-tryptophyl-arginyl-histidyl-prolyl-glutamyl-phenylalanyl-glycyl-glycin („Strep Tag I“) (49)

Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly

Strep Tag I wurde entsprechend Strep Tag I-Azid hergestellt. Nach der Anknüpfung von Alanin wurde direkt vom Harz abgespalten, wobei zunächst mit DCM und anschließend mit MeOH gewaschen wurde, um die Bildung des Methylesters zu vermeiden.

Ausbeute: 4 mg (0.003 mmol), 11%.

HPLC (C18): $t_r = 1.42$ min (1 min 10% B, dann innerhalb von 10 min auf 40% B).

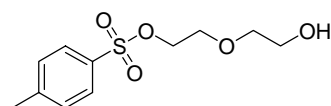
$C_{49}H_{66}N_{16}O_{11}$ (1054.51).

FAB-HR: ber.: 1055.5175 [M + H]⁺

gef.: 1055.5197 [M + H]⁺

6.2.3 Versuche zu Kapitel 4.1.4

2-(2-Hydroxyethoxy)ethanoltoluolsulfonsäureester (52)



Zu einer Lösung von 95 μ l (1.00 mmol) Diethylenglycol in 10 ml DCM wurden unter Argon und Rühren bei 0°C 350 mg (1.50 mmol) Silberoxid, 210 mg (1.10 mmol) Toluolsulfonsäurechlorid und 33 mg (0.20 mmol) Kaliumjodid gegeben. Die Lösung wurde weitere 5 min bei 0°C gerührt, durch eine schmale Schicht Silicagel filtriert und der Filterkuchen mit EA gewaschen. Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und das Produkt flash-säulenchromatographisch mit dem Laufmittel 2% MeOH in DCM aufgereinigt.

Farbloses Öl.

Ausbeute: 124 mg (0.48 mmol), 48%.

$R_f = 0.26$ (1% MeOH in DCM).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.78$ (m, 2H, 2 ar-H), 7.32 (m, 2H, 2 ar-H), 4.17 (t, ³J = 4.9 Hz, 2H, CH₂-O-S), 3.70-3.63 (m, 4H, CH₂-O-CH₂), 3.51 (t, ³J = 4.6 Hz, 2H, CH₂-OH), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 144.9$ (ar-C-CH₃), 132.9 (ar-C-S), 129.7, 127.8 (2 ar-C), 72.3, 69.0 (CH₂-O-CH₂), 68.5 (CH₂-O-S), 61.6 (CH₂-OH), 21.5 (CH₃).

$C_{11}H_{16}O_5S$ (260.07).

FAB-HR: ber.: 261.0744 [M + H]⁺

gef.: 261.0808 [M + H]⁺

2-(2-Azidoethoxy)ethanol (53)

N=[N+]=[N-]CCOCCO Eine Mischung von 113 mg (0.43 mmol) 2-(2-Hydroxyethoxy)ethanoltoluolsulfonsäureester und 80 mg (1.20 mmol) Natriumazid in 1 ml abs. DMF wurde unter Argon 4 h bei 50°C gerührt. Der Ansatz wurde direkt flash-säulenchromatographisch mit dem Laufmittel EA/Cy = 1:1 aufgereinigt. Gelbliches Öl.

Ausbeute: 51 mg (0.39 mmol), 90%.

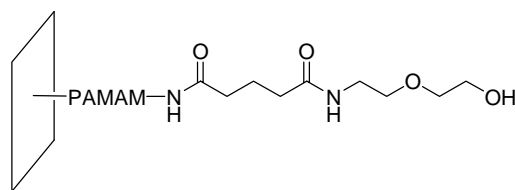
$R_f = 0.23$ (Cy/EA = 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.73$ (t, $^3J = 4.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.67 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.59 (t, $^3J = 4.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.39 (t, $^3J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{N}_3\text{-CH}_2$).

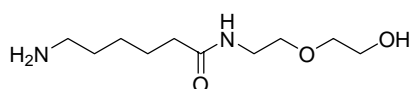
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 72.3$, 70.0 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 61.7 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 50.6 ($\text{N}_3\text{-CH}_2$).

$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ (131.07).

Im FAB-MS, EI-MS und ESI-MS konnte kein Massenpeak detektiert werden.

Staudinger-Ligation zur Blockierung Phosphin-funktionalisierter Glasträger (54)


Zu zwei Phosphin-funktionalisierten Glasträgern, gesteckt in einen Teflonhalter, wurden unter Argon in einem hohen, schlanken Schlenk-Gefäß (Abbildung 50) mit Rührmagneten 26 mg (0.19 mmol, 1.5 mM pro Glasträger) 2-(2-Azidoethoxy)ethanol gegeben. Dazu wurden 65 ml entgastes Dioxan/ H_2O = 2:1 gefügt. Der Ansatz wurde durch drei Vakuum-Argon-Zyklen entgast und 16.5 h unter Argon gerührt. Dann wurde die überstehende Lösung herausgenommen, die Glasträger mit entgastem Dioxan/ H_2O = 2:1 gespült, 30 min in dem gleichen Lösungsmittel gerührt, wieder mit gleichem Lösungsmittel gespült, im HV getrocknet und unter Argon verwahrt.

2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl-6-aminocaprinsäureamid (56)


Die Reaktion wurde nach AAV 6.2.2 durchgeführt. Nach der Reaktion wurde eine Testabspaltung zur Produktkontrolle durchgeführt. Dazu wurde wenig Harz entnommen und unter Argon dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in abs. DCM behandelt. Das Harz wurde zweimal mit abs. DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert. Das restliche Harz wurde unter Argon verwahrt und zur Reaktion mit Biotin-6-amidocaprinsäure(6-azidohexyl)amid verwendet.

Bedingungen: 96 mg (0.08 mmol, 0.82 mmol/g) *N*-Triphenylmethyl-Harz gebundener 6-Aminocaprinsäure-2-diphenylphosphinophenyl-ester **29**;

104 mg (0.79 mmol) 2-(2-Azidoethoxy)ethanol;

18 ml entgastes Dioxan/H₂O;

Reaktionszeit: 17 h.

Hauptbestandteil der durch die Testabspaltung erhaltenen Fraktion war nach dem HPLC-Lauf oxidiertes Aminocapronsäure-2-diphenylphosphinophenyl-ester.

2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl-6-aminocapronsäureamid 56:

HPLC (C4): $t_r = 1.75$ min (Standardgradient).

C₁₅H₂₃N₃O₂ (218.16).

ESI-MS: ber.: 218.2 [M + H]⁺

gef.: 219.2 [M + H]⁺

oxidiertes Aminocapronsäure-2-diphenylphosphinophenyl-ester 57:

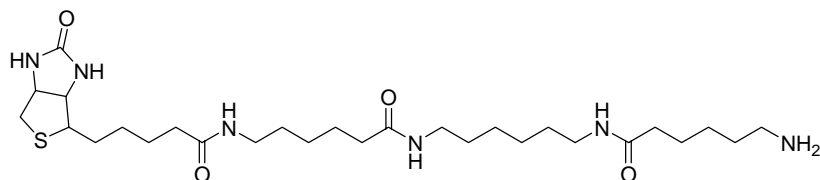
HPLC (C4): $t_r = 7.77$ min (Standardgradient).

C₂₄H₂₆NO₃P (407.17).

ESI-MS: ber.: 408.2 [M + H]⁺

gef.: 408.1 [M + H]⁺

6-(Biotin-amido)aminocapronsäure-6-(6-aminocapronsäure)azahexylamid (59)



Die Reaktion wurde nach AAV 6.2.2 durchgeführt.

Bedingungen: 25 mg *N*-Triphenylmethyl-Harz aus der vorausgegangenen Reaktion;

33 mg (0.07 mmol) Biotin-6-amidocapronsäure(6-azidohexyl)amid;

2 ml entgastes Dioxan/H₂O;

Reaktionszeit: 21 h.

Hauptbestandteil der durch die Abspaltung erhaltenen Fraktion war nach dem HPLC-Lauf oxidiertes Aminocapronsäure-2-diphenylphosphinophenyl-ester. Das Produkt aus der vorausgegangenen Reaktion, 2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl-6-aminocapronsäureamid, und 6-(Biotin-amido)aminocapronsäure-6-(6-aminocapronsäure)azahexylamid lagen im Verhältnis von ca. 2:1 vor (HPLC-MS-Auswertung).

HPLC (C4): $t_r = 5.46$ min (Standardgradient).

C₂₈H₅₂N₆O₄S (568.38).

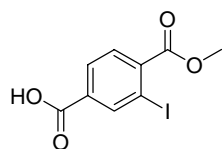
ESI-MS: ber.: 569.4 [M + H]⁺

gef.: 569.5 [M + H]⁺

6.3 Versuche zu Kapitel 4.2

6.3.1 Versuche zu Kapitel 4.2.2

1-Methyl-2-iodoterephthalat (64)^[97]



Eine Suspension von 1.00 g (5.12 mmol) 1-Methyl-2-aminoterephthalat in 10 ml konz. HCl-Lösung wurde in einem Eis/NaCl-Bad gekühlt und eine Lösung von 692 mg (5.28 mmol) NaNO₂ in 5 ml H₂O wurde innerhalb von 15 min hinzugegeben. Nach 20 min wurde das Bad entfernt und weiter 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz filtriert und der Filterkuchen mit etwas H₂O gewaschen. Eine eiskalte Lösung von 8.50 g (51.2 mmol) KI in 14 ml H₂O wurde langsam zu dem Filtrat gegeben, worauf ein dunkelroter Feststoff ausfiel. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt. Danach wurden 60 ml DCM hinzu gegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit ges. Na₂SO₃-Lösung, einmal mit H₂O und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH aufgenommen und durch tropfenweises Zugabe von H₂O zur Kristallisation gebracht. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C verwahrt und das Produkt danach abfiltriert.

Gelber Feststoff.

Ausbeute: 817 mg (2.69 mmol), 52%.

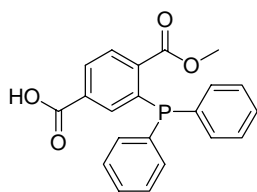
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.55 (s, 1H, ar-H *ortho* zu I), 8.04 (dd, ²J = 1.6 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, ar-H), 7.75 (dd, ²J = 0.4 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, ar-H), 3.93 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 169.4, 166.4 (2 C=O), 142.5, 140.0, 132.4, 130.5, 129.3 (5 ar-C), 93.3 (ar-C-I), 52.8 (CH₃).

C₉H₇IO₄ (305.94).

Die analytischen Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[97]

1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat (62)



In einen ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 804 mg (2.63 mmol) 1-Methyl-2-iodoterephthalat und 8 ml abs. DMF gegeben. Die Lösung wurde durch drei Vakuum/Argon-Zyklen entgast und dann wurden 765 µl (5.52 mmol) abs. TEA und 30 mg (0.13 mmol) Palladium(II)acetat dazugefügt. Die Lösung wurde wie oben beschrieben entgast und danach wurden 910 µl (5.26 mmol) Diphenylphosphin in einer mit Argon gefüllten Spritze hinzu gegeben. Die jetzt dunkelrote Lösung wurde wieder entgast, auf 120°C unter Argon erhitzt und

16 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel i. Vak. abkondensiert. Anschließend wurden 140 ml entgastes H₂O und 100 ml abs. DCM zu dem Rückstand gegeben, wiederum entgast und zur Extraktion unter Argon 15 min heftig gerührt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und 50 ml entgaste 1 M HCl-Lösung wurden zu der organischen Phase gegeben. Es wurde wieder entgast und 10 min durch heftiges Rühren unter Argon extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die organische mit Hilfe einer Kühlfalle eingengt. Zu dem braunen Rückstand wurde soviel entgastes Acetonitril gegeben, bis sich der meiste Rückstand gelöst hatte und etwas gelber Feststoff in der Suspension zu sehen war. Die Suspension wurde nochmals entgast und über Nacht zur Kristallisation unter Argon bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde sie durch eine ausgeheizte, mit Argon gefüllte Schlenk-Fritte filtriert, der Filterkuchen mit wenig entgastem Acetonitril gewaschen und in der Schlenk-Fritte im HV getrocknet.

Dunkelgelber Feststoff.

Ausbeute: 608 mg (1.67 mmol), 64%.

Schmp.: 186-190°C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.06-7.99 (m, 2H, ar-H) 7.61-7.58 (m, 1H, ar-H *ortho* zu PPh₂), 7.30-7.19 (m, 10H, PPh₂), 3.68 (s, 3H, CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = -3.2.

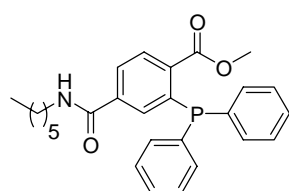
C₂₁H₁₇O₄P (364.09).

FAB-LR: ber.: 365.09 [M + H]⁺

gef.: 365.21 [M + H]⁺

Die analytischen Daten entsprechen den in der Literatur beschriebenen.^[97]

1-Methyl-2-diphenylphosphino-4-hexylamido-terephthalat (78)



In einen ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 50 mg (0.14 mmol) 1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat und 2 ml abs. DCM gegeben. Die Lösung wurde durch drei Vakuum/Argon-Zyklen entgast und dann wurden 21 mg (0.14 mmol) HOBt, 24 µl (0.14 mmol) DIPEA und 23 µl (0.15 mmol) DIC dazugefügt. Die Lösung wurde wie oben beschrieben entgast und nach 10 min wurden 36 µl (0.14 mmol) Hexylamin hinzugefügt. Nach 19 h wurde der Ansatz auf eine Säule mit entgastem, getrocknetem Silicagel gegeben und flash-chromatographisch unter Argon aufgereinigt (Laufmittel Cy/EA = 1:2, entgast).

Gelber Feststoff.

Ausbeute: 51 mg (0.11 mmol), 83%.

Schmp.: 173-175°C.

$R_f = 0.31$ (Cy/EA = 1:2).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.10$ (dd, $^2J = 3.3$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, terephthal-ar-H) 7.83 (dd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, terephthal-ar-H), 7.38-7.28 (m, 11H, 11 ar-H) 3.74 (s, 3H, O- CH_3), 3.31 (dd, $^2J = 7.0$ Hz, $^3J = 12.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 1.51-1.43 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 1.31-1.23 (m, 6H, 3 CH_2), 0.89 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 166.5, 166.1$ (2 C=O), 137.7, 136.4 (3 ar-C), 134.0, 133.8, (4 ar-C), 132.3, 131.1, 131.0 (4 ar-C), 129.2 (2 ar-C), 128.7, 128.6 (4 ar-C), 127.5 (1 ar-C), 52.5 (O- CH_3), 40.3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 31.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 29.5, 26.8, 22.8 (3 CH_2), 14.3 (CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): $\delta = -1.8$ (PPh_3).

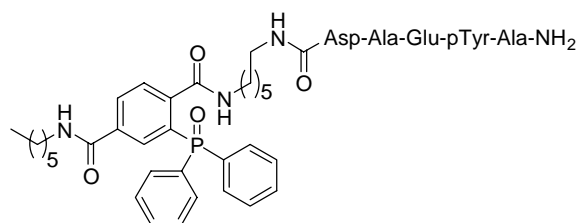
$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{NO}_3\text{P}$ (447.20).

FAB-HR: ber.: 448.2042 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 448.2020 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Die Synthese der Peptide **75**, **76** und **77** und des Fmoc-pTyr **69** ist in Kapitel 6.3.2 beschrieben.

1-[(Alanyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-alanyl-asparaginsäure-yl)-(6-hexylazacarbonyl)]-amido-2-diphenylphosphinoxido-4-hexylamido-terephthalat (79)



Zu einer Lösung von 0.9 mg (2.0 μmol , 10 mM)

1-Methyl-2-diphenylphosphino-4-

hexylamidoterephthalat (**78**) in 100 μl entgastem

Dioxan/ H_2O /THF = 7:3:1 wurde eine Lösung

von 0.6 mg (0.8 μmol , 4 mM) $\text{H}_2\text{N-Ala-pTyr-}$

Glu-Ala-Asp-N-6-Azidohexyl-amid (**75**) in 100 μl entgastem Dioxan/ H_2O = 2:1 gegeben. Nach

16 h wurde eine HPLC-ESI Probe von dem Ansatz gemessen.

Ausbeute: ca. 65% (HPLC).

$\text{C}_{56}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{P}_2$ (1176.47).

HPLC (C18): $t_r = 6.55$ min (Standardgradient).

ESI-MS: ber.: 1177.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$

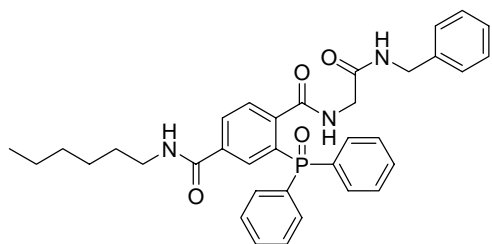
gef.: 1177.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$

1-(Acetbenzylamido)-amido-2-diphenylphosphinoxido-4-hexylamido-terephthalat (80)

Zu einer Lösung von 20 mg (0.045 mmol, 26 mM) 1-Methyl-2-diphenylphosphino-4-

hexylamidoterephthalat (**78**) in 1.50 ml entgastem Dioxan/ H_2O /THF = 2:1:3 wurde eine

Lösung von 8.5 mg (0.045 mmol, 26 mM) Azidoessigsäurebenzylamid **14** in 0.25 ml Dioxan/H₂O



= 2:1 gegeben. Nach 4 h wurde eine HPLC-ESI Probe von dem Ansatz gemessen.

Ausbeute: ca. 50% (HPLC).

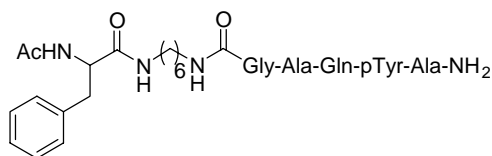
C₃₅H₃₈N₃O₄P (595.26).

HPLC (C4): t_r = 8.37 min (Standardgradient).

ESI-MS: ber.: 596.27 [M + H]⁺

gef.: 596.22 [M + H]⁺

[(Alanyl-phosphotyrosyl-glutamyl-alanyl-glycyl)-(6-hexylazacarbonyl)]-amido-N-acetylphenylalanin (81)



Zu einer Lösung von 3.3 mg (7.0 μmol, 50 mM) N-Acetylphenylalanyl-2-Diphenylphosphinophenylester

(**26**) in 70 μl entgastem Dioxan/H₂O = 2:1 wurde eine

Lösung von 5.0 mg (7.0 μmol, 50 mM) H₂N-Ala-pTyr-Gln-Ala-Gly-N-6-Azidohexylamid (**76**) in 70 μl entgastem Dioxan/H₂O = 2:1 gegeben und der Ansatz wurde 20 h unter Argon gerührt.

Anschließend wurde eine HPLC-ESI Probe gemessen.

Ausbeute: Spuren (HPLC).

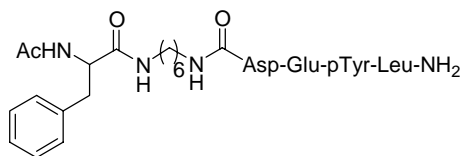
C₃₉H₅₈N₉O₁₂P (875.39).

HPLC (C18): t_r = 4.52 min (Standardgradient).

ESI-MS: ber.: 876.4 [M + H]⁺

gef.: 876.4 [M + H]⁺

[(Leucyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-asparaginsäure-yl)-(6-hexylazacarbonyl)]-amido-N-acetylphenylalanin (82)



Zu einer Lösung von 0.6 mg (1.4 μmol, 50 mM) N-Acetylphenylalanyl-2-Diphenylphosphinophenylester (**26**)

in 13.5 μl entgastem Dioxan/H₂O = 2:1 wurde eine

Lösung von 1.0 mg (1.4 μmol, 50 mM) H₂N-Leu-pTyr-Glu-Asp-N-6-Azidohexylamid (**77**) in 13.5 μl entgastem Dioxan/H₂O = 2:1 gegeben und der Ansatz wurde 15 h unter Argon gerührt.

Anschließend wurde eine HPLC-ESI Probe gemessen.

Ausbeute: Spuren (HPLC).

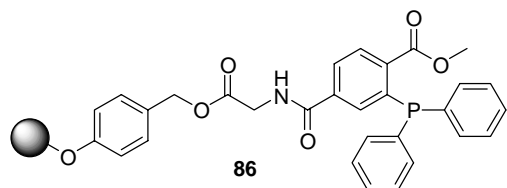
C₄₁H₆₀N₇O₁₄P (905.39).

HPLC (C18): t_r = 5.14 min (Standardgradient).

ESI-MS: ber.: 906.4 [M + H]⁺

gef.: 906.4 [M + H]⁺

Beladung von Wang-Gly-Harz mit 1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat



In einen ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben wurden 94 mg (0.26 mmol) 1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat und 2 ml abs. DCM gegeben. Die Lösung wurde durch drei

Vakuum/Argon-Zyklen entgast und dann wurden 39 mg (0.26 mmol) HOBt, 89.8 μ l (0.52 mmol) DIPEA und 43.8 μ l (0.28 mmol) DIC dazugefügt. Nach 20 min Rühren wurde die Lösung in einer Spritze zu 20 mg (0.03 mmol, 1.29 mmol/g) in einem ausgeheizten, mit Argon gefüllten Schlenk-Kolben vorgelegtem Wang-Gly-Harz gegeben. Die Lösung wurde wie oben beschrieben entgast und der Ansatz wurde 24 h unter Argon geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, das Harz dreimal mit 2 ml abs. DCM unter Argon gewaschen, im HV getrocknet und unter Argon verwahrt.

Zur Produktkontrolle wurde wenig Harz abgenommen und unter Argon dreimal 10 min mit je 2 ml TFA behandelt. Das Harz wurde zweimal mit abs. THF gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert.

HPLC (C4): $t_r = 7.54$ min (Standardgradient).

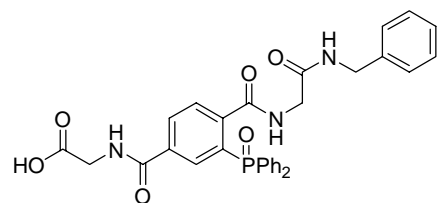
C₂₃H₂₀NO₅P (421.11).

ESI-MS: ber.: 422.1 [M + H]⁺

gef.: 422.4 [M + H]⁺

Neue theoretische Beladung: 0.89 mmol/g.

1-(Acetbenzylamido)-amido-2-diphenylphosphinoxido-4-glycydamido-terephthalat (87)



Zu 10 mg (0.009 mmol, 11.2 mM) mit 1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat-beladenem Glycin-Wang-Harz **86** wurden unter Argon 0.8 ml entgastes Dioxan/H₂O = 2:1 gegeben und nach 10 min wurden 17 mg (0.089 mmol,

112 mM) Azidoessigsäurebenzylamid **14** hinzugefügt. Der Ansatz wurde 24 h unter Argon geschüttelt, dann wurde die Lösung abgesaugt und das Harz dreimal mit 2 ml THF gewaschen. Anschließend wurde das Harz dreimal 10 min mit je 2 ml TFA behandelt. Das Harz wurde zweimal mit THF gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert. Von dem Rückstand wurde eine HPLC-ESI Probe entnommen.

Ausbeute: ca. 100% (HPLC).

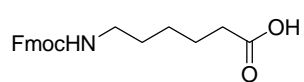
HPLC (C18): $t_r = 6.23$ min (Standardgradient).

$C_{31}H_{28}N_3O_6P$ (569.17).

ESI-MS: ber.: 570.2 [M + H]⁺

gef.: 570.2 [M + H]⁺

N-Fluorenmethyloxycarbonyl-6-Aminocaprinsäure (88)^[182]



Zu einer Lösung von 1.00 g (7.62 mmol) 6-Aminocaprinsäure in 18 ml 10%iger Na_2CO_3 -Lösung wurden 1.97 g (7.62 mmol) Fmoc-Chlorid in 5 ml THF bei 0°C in 10 min getropft. Nach 30 min Rühren wurde das Eisbad entfernt und weitere 17 h bei RT gerührt. Danach wurden 300 ml H_2O dazu gegeben und die Lösung mit 1 M HCl-Lösung auf pH 3 eingestellt, wobei sich ein voluminöser weißer Niederschlag bildete. Die Suspension wurde dreimal mit je 300 ml DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und i. Vak. konzentriert.

Weißer Feststoff.

Ausbeute: 2.70 g (\approx 7.62 mmol), quantitativ.

Schmp.: 105-105°C.

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.75 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.58 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.39 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 3.33-7.28 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 4.40 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.21 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.20-3.17 (m, 2H, CH₂), 2.35 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.85-1.63 (m, 2H, CH₂), 1.62-1.50 (m, 2H, CH₂), 1.40-1.32 (m, 2H, CH₂).

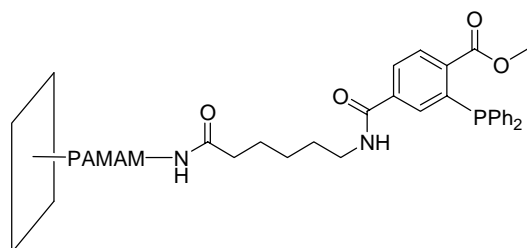
¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 178.9 (COOH), 156.6 (NH-C=O), 144.1, 141.5, 127.8, 127.2, 125.2, 120.2 (12 ar-C), 68.3 (Fmoc-CH₂), 47.7 (CH₂-NH), 41.2 (Fmoc-CH), 34.2 (CH₂-COOH), 30.0, 26.5, 24.7 (3 CH₂).

$C_{21}H_{23}NO_4$ (353.16).

FAB-HR: ber. 354.1700 [M + H]⁺

gef.: 354.1713 [M + H]⁺

Funktionalisierung von Amino-terminierten Oberflächen mit 1-Methyl-2-diphenylphosphinoterephthalat (90)

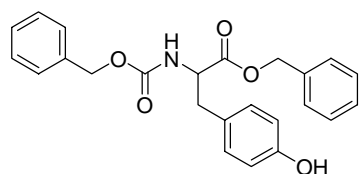


Eine Lösung von 102 mg (4.8 mM, 1.2 mM pro Glasträger) *N*-Fmoc-6-Aminocaprinsäure (**88**) in 60 ml abs. DMF wurde unter Argon mit 50 μ l (4.8 mM, 1.2 mM pro Glasträger) DIPEA, 44 mg (4.8 mM, 1.2 mM pro Glasträger) HOBt sowie 45 μ l (4.8 mM, 1.2

mM pro Glasträger) DIC versetzt und 10 min gerührt. Dann wurde die Lösung in ein langes, schlankes Schlenk-Gefäß (Abbildung 50, Kapitel 6.2.2) gefüllt, welches vier in einen Teflonhalter gesteckte Amino-terminierte-PAMAM-Dendrimer-funktionalisierte Glasträger enthielt. Sowohl bei der Reaktion als auch bei dem Waschvorgang müssen alle Träger komplett mit Flüssigkeit bedeckt sein. Der Ansatz wurde 16 h bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Dann wurde die überstehende Lösung mittels einer Spritze mit dicker, langer Kanüle entfernt und die Glasträger wurden zweimal mit DMF gespült. Sie wurden anschließend zum Waschen zweimal 20 min in DMF gerührt und wieder zweimal mit DMF gespült. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurden die Glasträger zweimal 20 min in 60 ml 20% Piperidin in DMF gerührt und danach wurde die zuvor beschriebene Waschprozedur wiederholt, wobei nach dem letzten Schritt zusätzlich einmal 15 min in DCM gerührt und anschließend mit DCM gespült wurde. Während der gesamten Prozedur wurden die Glasträger im Schlenk-Gefäß unter Argon behandelt. Sie wurden dann im HV mindestens 6 h getrocknet. Im darauf folgenden Schritt wurden 122 mg (5.2 mM, 1.3 mM pro Glasträger) 1-Methyl-2-diphenylphosphino-terephthalat, 65 ml abs. DMF, 52 mg (5.2 mM, 1.3 mM pro Glasträger) HOBt, 117 µl (10.4 mM, 2.6 mM pro Glasträger) DIPEA und 52 µl (5.2 mM, 1.3 mM pro Glasträger) DIC nacheinander unter Argon zu den Glasträgern gegeben. Die Lösung wurde durch drei Vakuum/Argon-Zyklen entgast und 17 h gerührt. Daraufhin wurde die überstehende Lösung wieder entfernt und die Glasträger wie folgt unter Argon gewaschen: zweimal mit abs. DMF spülen, in abs. DMF/DCM = 1:1 zweimal 20 min rühren und wieder zweimal mit abs. DMF spülen. Am Beginn jedes Rührschritts wurde die Lösung wie oben beschrieben entgast. Anschließend wurden die Glasträger zweimal 10 min mit einer Lösung von 27.1 µl (4.8 mM, 1.2 mM pro Glasträger) Essigsäureanhydrid und 209 µl (43.2 mM, 10.8 mM pro Glasträger) Pyridin in 60 ml abs. DMF unter Argon behandelt. Dann wurden sie mit abs. DMF und abs. DCM gespült, zweimal 20 min in abs. DCM gerührt, wieder mit abs. DCM gespült, im HV getrocknet und unter Argon verwahrt. Auch bei dieser gesamten Prozedur wurden die Glasträger im Schlenk-Gefäß unter Argon behandelt und am Beginn jedes Rührschritts wurde die Lösung wie oben beschrieben entgast.

6.3.2 Versuche zu Kapitel 4.2.3 und 4.2.4

N-Benzoyloxycarbonyltyrosinbenzylester (71)^[175]



Zu einer Lösung von 10.0 g (22.5 mmol) L-Tyrosinbenzylester-Tosylat in 80 ml abs. MeOH wurden 6.30 ml (45.0 mmol) TEA gegeben und der Ansatz auf 0°C im Eisbad gekühlt. Dann wurden 3.17 ml (22.5 mmol) Chlorameisensäurebenzylester langsam hinzu

getropft und die Mischung bei 0°C 2 h gerührt. Das Eisbad wurde entfernt, 5 ml Wasser zum Ansatz gegeben und die Mischung i. Vak. konzentriert. Der Rückstand wurde in je 100 ml Wasser und Diethylether aufgenommen, die Phasen getrennt und die organische mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde sie über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cy/EA = 3:1) gereinigt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 7.01 g (17.3 mmol), 77%.

R_f = 0.24 (Cy/EA = 3:1).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.32-7.26 (m, 10H, 2 Ph), 6.95 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 6.65 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 5.10 (s, 2H, CH₂-O), 5.03 (s, 2H, CH₂-O), 4.43-4.39 (m, 1H, Tyr-α-H), 3.00 (dd, ²J = 6.2 Hz, ³J = 13.7 Hz, 1H, Tyr-CHa), 2.85 (dd, ²J = 8.6 Hz, ³J = 13.9 Hz, 1H, Tyr-CHb).

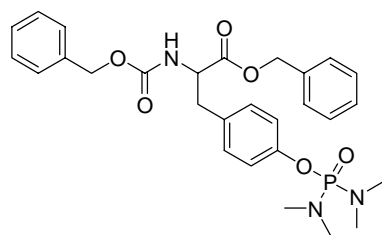
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 171.7 (C=O Ester), 156.0 (C=O Urethan), 155.1 (ar-C-OH), 136.4, 135.3, 130.7, 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 127.6 (15 ar-C), 115.7 (2 ar-C *ortho* zu OH), 67.5 (2 ar-C-CH₂), 55.2 (Tyr-α-C), 37.6 (Tyr-CH₂).

C₂₄H₂₃NO₅ (405.16).

Die Daten stimmen mit den beschriebenen überein.^[175]

***N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-(*N,N'*-phosphorsäurebisdimethylamido)-tyrosinbenzylester**

(73)^[175]



Eine Lösung von 6.97 g (17.3 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyltyrosinbenzylester **71** in 40 ml abs. DCM wurde unter Argon auf 0°C im Eisbad gekühlt. Es wurden 3.88 ml (26.0 mmol) Diazabicycloundecen, 4.23 g (34.6 mmol) DMAP und 5.01 ml (34.6 mmol) Phosphorsäurebisdimethylamidochlorid

hinzugefügt. Die Mischung wurde 1 h im Eisbad gerührt, das Eisbad wurde entfernt und eine weitere Stunde gerührt. Die Mischung wurde mit 50 ml DCM verdünnt und nacheinander mit je einmal 100 ml 5% KHSO₄-, 10% NaHCO₃- und ges. NaCl- Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden viermal mit DCM gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. konzentriert. Säulenchromatografische Aufreinigung (Cy/EA = 1:5) lieferte ein gelbes, viskoses Öl.

Ausbeute: 8.40 g (15.6 mmol), 90%.

R_f = 0.27 (Cy/EA = 1:4).

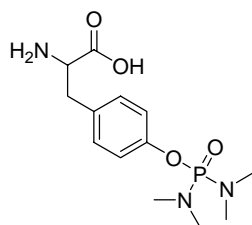
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38-7.29 (m, 10H, 2 Ph), 7.02 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 6.94 (d, 3J = 8.4 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 5.15-5.12 (m, 2H, CH_2 -ar), 5.09 (s, 2H, CH_2 -ar), 4.66 (dd, 2J = 5.9 Hz, 3J = 13.7 Hz, 1H, Tyr- α -H), 3.12-3.01 (m, 2H, Tyr- CH_2), 2.72 (s, 6H, 2 CH_3), 2.69 (s, 6H, 2 CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 171.4 (Ester-C=O), 155.9 (Cbz-C=O), 135.3, 131.6, 130.7, 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 120.5, 120.4 (18 ar-C), 67.2, 60.6, 55.0, 37.6 (3ar- CH_2 , Tyr- α -C), 36.9 (4 CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 17.0.

$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$ (539.22).

***O*-(*N,N'*-Phosphorsäurebisdimethylamido)-tyrosin (74)**



Zu einer Lösung von 9.11 g (16.9 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-*O*-(*N,N'*-phosphorsäurebisdimethylamido)-tyrosinbenzylester (**73**) in 100 ml MeOH wurden unter Argon 1.06 g (16.9 mmol) Ammoniumformiat sowie eine Spatelspitze Pd/C gegeben. Die Lösung wurde unter H_2 -Atmosphäre gesetzt und mit einem Ballon der H_2 -Druck erhöht. Der Ansatz wurde 16

h gerührt, die Produktabnahme mittels DC (Cy/EA = 1:5) kontrolliert und anschließend die Mischung über Celite filtriert. Nachdem die Lösung i. Vak. konzentriert worden war wurde sie in 250 ml H_2O aufgenommen und zweimal mit je 250 ml EA extrahiert. Die wässrige Phase wurde i. Vak. eingengt und lyophilisiert.

Farbloses Pulver.

Ausbeute: 5.46 g (\approx 16.9 mmol), quantitativ.

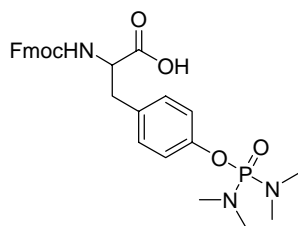
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 7.31 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 7.11 (d, 3J = 8.6 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 3.76 (dd, 2J = 4.3 Hz, 3J = 8.8 Hz, 1H, Tyr- α -H), 3.29 (dd, 2J = 4.3 Hz, 3J = 14.5 Hz, 1H, Tyr-CHa), 2.99 (dd, 2J = 8.8 Hz, 3J = 14.6 Hz, 1H, Tyr-CHa), 2.73 (s, 6H, 2 CH_3), 2.71 (s, 6H, 2 CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 18.2.

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$ (315.13).

ESI-MS: ber.: 316.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 316.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$

***N*-Flourenmethyloxycarbonyl-*O*-(*N'*,*N''*-Phosphorsäurebisdimethylamido)-tyrosin (69)**

Eine Lösung von 5.46 mg (≈ 16.9 mmol) *O*-(*N'*,*N''*-Phosphorsäurebisdimethylamido)tyrosin in 100 ml abs. MeOH/DCM = 1:1 wurde bei 0°C im Eisbad mit 6.55 g (25.4 mmol) Fmoc-Succinimidylester und 3.51 ml (25.4 mmol) TEA versetzt. Der Ansatz wurde 15 h gerührt, wobei er sich auf RT erwärmte. Dann wurde er i.

Vak. konzentriert, in EA aufgenommen und zweimal mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung mit einem Laufmittelgradienten von 5% MeOH in DCM, 10% MeOH in DCM, 20% MeOH in DCM bis MeOH/DCM = 1:1 lieferte einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 5.88 g (10.9 mmol), 65%.

Schmp.: 81-84°C; Lit.: 64-67°C.^[183]

R_f = 0.27 (Cy/EA = 1:4).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12.9^\circ$ (c = 1, DMF); Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -21.9^\circ$ (c = 1, DMF).^[183]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74$ (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.57 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.40 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.29 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.09 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 7.03 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 Tyr-ar-H), 4.65-4.61 (m, 1H, Tyr- α -H), 4.43 (dd, ²J = 7.4 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, Fmoc-CHa), 4.30 (dd, ²J = 7.0 Hz, ³J = 10.2 Hz, 1H, Fmoc-CHb), 4.19 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.20-3.11 (m, 2H, Tyr-CH₂), 2.71 (s, 6H, 2 CH₃), 2.68 (s, 6H, 2 CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): $\delta = 17.0$ (P[N(CH₃)₂]₂).

C₂₈H₃₂N₃O₆P (537.20).

ESI-MS: ber.: 538.2 [M + H]⁺

gef.: 538.5 [M + H]⁺

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Beladung von Sulfamylbutyryl-Harz mit Fmoc-Aminosäuren: AAV 6.3.1^[170]

In einem Rundkolben mit Magnetrührstäbchen wurde 1 Äq Sulfamylbutyryl-Harz in Chloroform (11 ml für 1 mmol Harz), welches vorher durch basisches Aluminiumoxid filtriert worden war, 10 min unter Argon gequollen. Dann wurden 3 Äq Fmoc-Aminosäure und 5 Äq DIPEA hinzugefügt und 10 min langsam gerührt. Der Ansatz wurde auf -20°C gekühlt und 3 Äq PyBOP wurden zugegeben. An der Kolbenwand klebendes PyBOP wurde mit 300 μ l Chloroform in den Ansatz gespült. Nachdem der Ansatz 8 h bei -20°C gerührt worden war, wurde das Harz filtriert, dreimal mit je 2 ml Chloroform und zweimal mit je 2 ml MeOH gewaschen. Bei der Anknüpfung

von Fmoc-Glycin wurde nach den 8 h weitere 12 h bei RT gerührt und dann filtriert und gewaschen. Der Beladungsprozess wurde einmal wiederholt und das Harz danach im HV getrocknet. Nachdem für die Beladungsbestimmung Harz abgenommen worden war, wurde das restliche in einem Festphasenreaktor zweimal 10 min mit je 10 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin = 1:9 pro mmol Harz behandelt, mit je 10 ml DMF (3x) gewaschen, zweimal 20 min in je 10 ml 20% Piperidin in DMF geschüttelt, mit je 10 ml DMF (3x) sowie DCM (3x) gewaschen und im HV getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Beladungsbestimmung mittels UV-Messung: AAV 6.3.2

Zweimal ca. 5 mg Harz wurden zur doppelten Beladungsbestimmung entnommen und 30 min in 5 ml 20% Piperidin in DMF geschüttelt. Dann wurde je 1 ml von beiden Proben entnommen und mit 2 ml 20% Piperidin in DMF verdünnt. Die Proben wurden dann einer UV-Messung unterzogen (350-250 nm, 20% Piperidin in DMF als Nullpunkt der Absorption) und die Beladungen mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes folgendermaßen berechnet:

$$\text{Beladung} = \frac{\text{Abs (301 nm)} * 1.523}{m}$$

basierend auf $\epsilon = 7800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und mit $m = \text{mg Harz}$.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc/Boc-Aminosäure-Festphasensynthese: AAV 6.3.3^[172]

Eine Lösung von 4 Äq entsprechend Seitenketten-geschützter Fmoc/Boc-Aminosäure in abs. DMF (2 ml pro 0.15 mmol Harz) wurde unter Argon nacheinander mit 4 Äq HOBt, 8 Äq DIPEA sowie 3.6 Äq HBTU versetzt. Nach 10 min Rühren wurde diese Lösung zum Harz in einen Spritzenreaktor gegeben und 3-16 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz jeweils dreimal mit DMF und DCM gewaschen.

Es wurden folgende Aminosäuren verwendet:

Fmoc-Aminosäuren	Fmoc-Aminosäuren	Boc-Aminosäuren
Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Val-OH	Boc-Ala-OH
Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Phe-OH	Boc-Leu-OH
Fmoc-pTyr[PO(NMe ₂) ₂]-OH	Fmoc-Met-OH	Boc-Phe-OH
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Pro-OH	Boc-Glu(<i>t</i> Bu)-OH
Fmoc-Glu(<i>t</i> Bu)-OH	Fmoc-Ile-OH	Boc-Pro-OH
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	Fmoc-Cys(Trt)-OH	Boc-Gly-OH
Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	Boc-Met-OH
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	
Fmoc-Lys(Boc)-OH		

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc-Phosphotyrosin-Kupplung: AAV 6.3.4^[172]

Eine Lösung von 4 Äq entsprechend Seitenketten-geschütztem Fmoc-Phosphotyrosin in abs. DMF (2 ml pro 0.15 mmol Harz) wurde unter Argon nacheinander mit 4 Äq HOBt, 8 Äq DIPEA sowie 4 Äq PyBOP versetzt. Diese Lösung wurde nach 3 min zum Harz in einen Spritzenreaktor gegeben und 4 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz jeweils dreimal mit DMF und DCM gewaschen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Abspalten der Fmoc-Gruppe am Harz: AAV 6.3.5^[172]

Das Harz wurde 20 min in 20% Piperidin in DMF (2 ml pro 0,15 mmol Harz) geschüttelt, mit je 10 ml DMF (3x) sowie DCM (3x) gewaschen und im HV getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Aktivieren von Sulfamylbutyryl-Harz: AAV 6.3.6^[170]

1 Äq Harz wurde dreimal mit abs. NMP gewaschen. Dann wurde eine Lösung von 5 Äq DIPEA und 30 Äq Iodacetonitril in abs. NMP (2.5 ml pro 0.15 mmol Harz) unter Argon hinzu gegeben und der Ansatz unter Lichtausschluss 24 h geschüttelt. Danach wurde das Harz jeweils dreimal 2 min mit NMP, THF und DCM gewaschen und im HV getrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Abspalten vom Sulfamylbutyryl-Harz: AAV 6.3.^[170]

In einem Rundkolben wurde unter Argon zu 1 Äq aktiviertem Harz eine Lösung von 7.5 Äq 6-Azidohexylamin in abs. THF (4 ml pro 0.15 mmol Harz) gegeben und der Ansatz 18 h langsam gerührt. Dann wurde filtriert, das Harz dreimal mit DCM gewaschen und die vereinigten Filtrate i. Vak. konzentriert. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit 1 M NaHSO₄-Lösung extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurde sie i. Vak. eingengt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Entfernen der säurelabilen Schutzgruppen nach dem Abspalten: AAV 6.3.8^[174]

Zu 1 Äq abgespaltenem Rohprodukt wurde eine Mischung von TFA/TES/DCM = 95:2.5:2.5 (1440 µl pro 0.15 mmol Rohprodukt) gegeben und der Ansatz 3 h gerührt. Dann wurde Wasser in einem Verhältnis von 1:1 zur Mischung hinzugefügt und weitere 14 h gerührt. Anschließend wurde zweimal mit Toluol koevaporiert (10 ml Toluol pro 0.15 mmol Rohprodukt) und der Rückstand mittels präparativer HPLC (C18-Säule) aufgereinigt oder bei Schwerlöslichkeit umgefällt.

Alle folgenden Peptide dieses Kapitels wurden nach AAV 6.3.1 bis AAV 6.3.8 hergestellt. Analytische Daten wurden nicht bestimmt, wenn dies aufgrund von Schwerlöslichkeit oder geringer Substanzmenge nicht möglich war.

Alanyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-alanyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (75)

H₂N-Ala-pTyr-Glu-Ala-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Gelber amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21.4 mg (0.028 mmol), 27%.

HPLC (C18): $t_r = 5.08$ min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.11$ (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.53-4.49 (m, 2H, pTyr- α -H, Asp- α -H), 4.21 (dd, ²J = 5.6 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, Glu- α -H), 4.12 (q, ³J = 7.2 Hz, 1H, Ala- α -H), 3.93 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 3.22 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.09 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, pTyr-CH₂), 2.89 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.82 (dd, ²J = 5.9 Hz, ³J = 16.4 Hz, 1H, Asp-CHa), 2.75 (dd, ²J = 7.3 Hz, ³J = 16.6 Hz, 1H, Asp-CHb), 2.32 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, Glu-CH₂), 1.99-1.90 (m, 1H, Glu-CHa), 1.85-1.75 (m, 1H, Glu-CHb), 1.61-1.45 (m, 4H, 2 CH₂), 1.39 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.33-1.19 (m, 7H, Ala-CH₃, 2 CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 177.2, 177.1, 174.3, 172.8, 172.6, 171.9, 170.7$ (7 C=O), 151.3 (pTyr-ar-C-O), 131.8, 130.5, 120.8, 118.3 (5 ar-C), 58.2, 52.7, 51.2, 50.5, 50.2, 49.0 (CH₂-N₃, 5 AS- α -C), 44.3, 39.6, 36.4, 35.6 (Asp-CH₂, pTyr-CH₂, NH-CH₂, CH₂), 29.9, 28.3, 27.9, 26.5, 25.6 (2 Glu-CH₂, 3 CH₂), 16.7, 16.5 (2 Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -2.9$.

C₃₀H₄₆N₉O₁₃P (771.30).

FAB-HR: ber.: 772.3031 [M + H]⁺

gef.: 772.3062 [M + H]⁺ (Matrix: Glycerin + 2 M HCl)

Alanyl-phosphotyrosyl-glutamyl-alanyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (76)

H₂N-Ala-pTyr-Gln-Ala-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 26.9 mg (0.038 mmol), 37%.

HPLC (C18): $t_r = 4.68$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +17.8^\circ$ ($c = 0.55$; DMSO).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.10$ (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.50 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.19-4.09 (m, 2H, Gln- α -H, Ala- α -H), 3.93 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.75 (dd, $^2J = 17.0$ Hz, $^3J = 37.8$ Hz, 2H, Gly- CH_2), 3.24-3.15 (m, 2H, N_3 - CH_2), 3.13-3.04 (m, 2H, pTyr- CH_2), 2.95-2.85 (m, 2H, CH_2), 2.20-2.13 (m, 2H, Gln- CH_2), 1.93-1.77 (m, 2H, Gln- CH_2), 1.58-1.17 (m, 14H, 4 CH_2 , 2 Ala- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 177.9, 175.6, 172.6, 172.3, 171.2, 170.7$ (6 C=O), 151.3 (pTyr-ar-C-O), 131.7, 130.5, 120.7 (5 ar-C), 55.4, 52.6, 51.3, 50.3, 49.2, 49.0 (CH_2 - N_3 , 5 AS- α -C), 42.8, 39.5, 36.5, 31.0 (Gln- CH_2 , pTyr- CH_2 , NH- CH_2 , CH_2), 28.3, 27.9, 26.8, 25.6 (Gln- CH_2 , 3 CH_2), 16.7, 16.4 (2 Ala- CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.2$.

$\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}$ (712.31).

FAB-HR: ber.: 713.3136 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 713.3112 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Leucyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (77)

$\text{H}_2\text{N-Leu-pTyr-Glu-Asp-N-Azidohexyl}$

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 3.0 mg (0.004 mmol), 4%.

HPLC (C18): $t_r = 5.41$ min (Standardgradient).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.07$ (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 6.98 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.54-4.50 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.49-4.45 (m, 1H, Asp- α -H), 4.18-4.14 (m, 1H, Glu- α -H), 3.80-3.75 (m, 1H, Leu- α -H), 3.13 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.06-3.02 (m, 2H, NH- CH_2), 2.97 (dd, $^2J = 6.5$ Hz, $^3J = 14.5$ Hz, 1H, pTyr-CHa), 2.82 (dd, $^2J = 9.4$ Hz, $^3J = 14.5$ Hz, 1H, pTyr-CHb), 2.75 (dd, $^2J = 6.2$ Hz, $^3J = 17.0$ Hz, 1H, Asp-CHa), 2.63 (dd, $^2J = 7.0$ Hz, $^3J = 17.0$ Hz, 1H, Asp-CHb), 2.24-2.19 (m, 2H, Glu- CH_2), 1.97-1.91 (m, 1H, Glu-CHa), 1.82-1.74 (m, 1H, Glu-CHb), 1.55-1.32 (m, 7H, Leu-CH, Leu- CH_2 , 2 CH_2), 1.25-1.15 (m, 4H, 2 CH_2), 0.80-0.76 (m, 6H, 2 Leu- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 176.6, 172.4, 172.2, 171.5, 170.5$ (6 C=O), 147.3 (pTyr-ar-C-O), 133.8, 130.3, 120.6 (5 ar-C), 51.2, 50.4 (CH_2 - N_3 , AS- α -C), (48.5-47.7 CD_3OD), 40.1, 39.4,

35.6, 35.3 (Asp-CH₂, pTyr-CH₂, Leu-CH₂, NH-CH₂), 29.8, 28.4, 28.1, 26.0, 25.8, 25.7, 24.2 (Leu-CH, 2 Glu-CH₂, 4 CH₂), 21.8, 21.1 (2 Leu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ = -3.2.

C₃₀H₄₇N₈O₁₂P (742.31).

FAB-HR: ber.: 743.3129 [M + H]⁺

gef.: 743.3149 [M + H]⁺ (Matrix: Glycerin + 2 M HCl)

Leucyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-asparaginsäure-yl-alanyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (92)

H₂N-Leu-pTyr-Glu-Asp-Ala-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 6.6 mg (0.007 mmol), 7%.

HPLC (C18): t_r = 5.30 min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.22 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.68-4.63 (m, 3H, pTyr-α-H, 2 Asp-α-H), 4.34 (dd, ²J = 5.5 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, Glu-α-H), 4.20 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala-α-H), 3.81-3.77 (m, 1H, Leu-α-H), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.21-3.12 (m, 2H, pTyr-CH₂), 3.02-2.86 (m, 4H, Asp-CH₂, NH-CH₂), 2.83-2.73 (m, 2H, Asp-CH₂), 2.40-2.34 (m, 2H, Glu-CH₂), 2.13-2.03 (m, 1H, Glu-CHa), 1.97-1.87 (m, 1H, Glu-CHb), 1.71-1.32 (m, 14H, Leu-CH, Leu-CH₂, 4 CH₂, Ala-CH₃), 1.00-0.96 (br, 6H, 2 Leu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ = -3.1.

C₃₇H₅₇N₁₀O₁₆P (928.37).

FAB-HR: ber.: 929.3764 [M + H]⁺

gef.: 929.3744 [M + H]⁺

Alanyl-phosphotyrosyl-histidyl-alanyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (93)

H₂N-Ala-pTyr-His-Ala-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Braunes Öl.

Ausbeute: 3.2 mg (0.004 mmol), 4%.

HPLC (C18): t_r = 3.83 min (Standardgradient).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.50$ (s, 1H, His-ar-H), 7.10-7.05 (m, 3H, 2 pTyr-ar-H, His-ar-H), 6.99 (d, $^3\text{J} = 8.8$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.47-4.40 (m, 2H, pTyr- α -H, His- α -H), 4.13 (q, $^3\text{J} = 7.2$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.94 (q, $^3\text{J} = 7.3$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.77 (dd, $^2\text{J} = 16.9$ Hz, $^3\text{J} = 36.0$ Hz, 2H, Gly- CH_2), 3.24-2.85 (m, 8H, His- CH_2 , N_3 - CH_2 , pTyr- CH_2 , CH_2), 1.60-1.18 (m, 14H, 4 CH_2 , 2 Ala- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 175.6, 172.5, 171.2, 170.6, 170.5$ (5 C=O), 151.3 (pTyr-ar-C-O), 135.3, 133.6, 131.5, 130.4, 128.4, 126.2, 120.7, 117.5 (8 ar-C), 55.5, 52.0, 51.2, 50.2, 49.2, 48.9 (CH_2 - N_3 , 5 AS- α -C), 42.8, 39.5, 36.6, 32.8 (His- CH_2 , pTyr- CH_2 , NH- CH_2 , CH_2), 28.3, 27.9, 25.6 (3 CH_2), 16.8, 16.5 (2 Ala- CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.0$.

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_{11}\text{O}_9\text{P}$ (721.31).

FAB-HR: ber.: 722.3139 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 722.3124 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Leucyl-phosphotyrosyl-alanyl-seryl-glycin-(6-azidohexyl)amid (94)

$\text{H}_2\text{N-Leu-pTyr-Ala-Ser-Gly-N-Azidohexyl}$

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 16.4 mg (0.023 mmol), 13%.

HPLC (C18): $t_r = 4.94$ min (1 min 10 % B, dann innerhalb von 10 min auf 70 % B).

$[\alpha]_D^{20} = +7.7^\circ$ (c = 0.52; DMSO).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.20$ (d, $^3\text{J} = 8.0$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.12 (d, $^3\text{J} = 8.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.68 (dd, $^2\text{J} = 5.7$ Hz, $^3\text{J} = 9.6$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.35-4.29 (m, 2H, Ser- α -H, Ala- α -H), 3.92-3.75 (m, 5H, Ser- CH_2 , Leu- α -H, Gly- CH_2), 3.26 (t, $^3\text{J} = 6.8$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.21-3.12 (m, 3H, CH_2 - CH_2 -NH, pTyr-CHa), 2.93-2.86 (m, 1H, pTyr-CHb), 1.79-1.35 (m, 14H, 5 CH_2 , Leu-CH, Ala- CH_3), 1.02-0.95 (m, 6H, 2 Leu- CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): $\delta = -3.3$.

$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{P}$ (713.33).

FAB-HR: ber.: 736.3159 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 736.3179 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Leucyl-seryl-phosphotyrosyl-aragyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (95)

H₂N-Leu-Ser-pTyr-Arg-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 8.5 mg (0.011 mmol), 6%.

HPLC (C18): $t_r = 6.00$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -6.5^\circ$ (c = 1.00; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.12$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.03 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.51 (t, ³J = 7.3 Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.42 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, AS- α -H), 4.09 (dd, ²J = 5.7 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, AS- α -H), 3.94 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, AS- α -H), 3.74-3.69 (m, 4H, 2 CH₂), 3.19 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.13-3.02 (m, 4H, 2 CH₂), 2.97 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, Tyr-CH₂), 1.75-1.35 (m, 11H, CH, 5 CH₂), 1.31-1.18 (m, 4H, 2 CH₂), 0.85 (t, ³J = 6.7 Hz, 6H, 2 Leu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.1$.

C₃₂H₅₅N₁₂O₁₀P (798.39).

FAB-HR: ber.: 799.3974 [M + H]⁺

gef.: 799.4009 [M + H]⁺

Alanyl-alanyl-phosphotyrosyl-lysyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (96)

H₂N-Ala-Ala-pTyr-Lys-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 40 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 9.5 mg (0.013 mmol), 7%.

HPLC (C18): $t_r = 5.11$ min (1 min 5% B, dann innerhalb von 10 min auf 40% B).

$[\alpha]_D^{20} = -19.5^\circ$ (c = 1.00; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.13$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.03 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.48 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.24 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 4.08 (dd, ²J = 6.1 Hz, ³J = 8.4 Hz, 1H, Lys- α -H), 3.95 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 3.92 (s, 2H, Gly-CH₂), 3.19 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.15-3.06 (m, 2H, CH₂), 2.96 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Tyr-CH₂), 2.86 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.73-1.38 (m, 11H, Ala-CH₃, 4 CH₂), 1.33-1.16 (m, 9H, Ala-CH₃, 3 CH₂).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.1$.

$C_{29}H_{49}N_{10}O_9P$ (712.34).

FAB-HR: ber.: 713.3500 $[M + H]^+$

gef.: 713.3477 $[M + H]^+$

Phenylalanyl-seryl-phosphotyrosyl-asparaginsäure-yl-glycin-(6-azidohexyl)amid (97)

H_2N -Phe-Ser-pTyr-Asp-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 12.6 mg (0.016 mmol), 9%.

HPLC (C18): $t_r = 7.17$ min (1 min 5 % B, dann innerhalb von 10 min auf 60 % B).

$[\alpha]_D^{20} = -4.2^\circ$ (c = 0.48; DMSO).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , TEA zur Löslichkeit zugesetzt): $\delta = 7.21$ -7.15 (m, 3H, 3 ar-H), 7.10-6.99 (m, 6H, 6 ar-H), 4.41-4.36 (m, 2H, pTyr- α -H, Asp- α -H), 4.23 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 1H, Ser- α -H), 3.73-3.66 (m, 3H, Phe- α -H, Gly- CH_2), 3.53 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 2H, Ser- CH_2), 3.18-3.11 (m, 3H, CHa, N_3 - CH_2), 3.07-2.92 (m, 1H, CHb), 2.88-2.75 (m, 4H, 2 CH_2), 2.50 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, Asp- CH_2), 1.47-1.32 (m, 4H, 2 CH_2), 1.25-1.11 (m, 4H, 2 CH_2).

^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O , TEA zur Löslichkeit zugesetzt): $\delta = 0.9$.

$C_{33}H_{46}N_9O_{12}P$ (791.30).

FAB-HR: ber.: 792.3082 $[M + H]^+$

gef.: 792.3078 $[M + H]^+$

Alanyl-lysyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-glycin-(6-azidohexyl)amid (98)

H_2N -Ala-Lys-pTyr-Glu-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 40 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 15.3 mg (0.020 mmol), 11%.

HPLC (C18): $t_r = 5.36$ min (1 min 5 % B, dann innerhalb von 10 min auf 40 % B).

$[\alpha]_D^{20} = -15.3^\circ$ (c = 1.00; H_2O).

1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.12$ (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.54 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.23 (dd, $^2J = 5.5$ Hz, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, Asp- α -H), 4.14 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Lys- α -H), 3.95 (q, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.74 (s, 2H, Gly- CH_2),

3.18 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.13-3.08 (m, 2H, CH₂), 3.01 (dd, $^2J = 6.9$ Hz, $^3J = 13.9$ Hz, 1H, Tyr-CHa), 2.92 (dd, $^2J = 8.7$ Hz, $^3J = 13.8$ Hz, 1H, Tyr-CHb), 2.83 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂), 2.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂), 2.06-1.96 (m, 1H, Asp-β-CHa), 1.88-1.78 (m, 1H, Asp-β-CHb), 1.60-1.35 (m, 11H, Ala-CH₃, 4 CH₂), 1.31-1.12 (m, 6H, 3 CH₂).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = -3.2.

C₃₁H₅₁N₁₀O₁₁P (770.35).

FAB-HR: ber.: 771.3555 [M + H]⁺

gef.: 771.3562 [M + H]⁺

Leucyl-phosphotyrosyl-arginyl-alanyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (99)

H₂N-Leu-pTyr-Arg-Ala-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21.4 mg (0.027 mmol), 15%.

HPLC (C18): t_r = 5.54 min (1 min 5 % B, dann innerhalb von 10 min auf 60 % B).

[α]_D²⁰ = +6.7° (c = 1.00; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.11 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.52 (t, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, pTyr-α-H), 4.17-4.07 (m, 2H, 2 AS-α-H), 3.91-3.67 (m, 3H, Gly-CH₂, AS-α-H), 3.22-3.16 (dd, $^2J = 6.8$ Hz, $^3J = 12.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.11-2.86 (m, 6H, 3 CH₂), 1.69-1.15 (m, 18H, Leu-CH, Ala-CH₃, 7 CH₂), 0.83 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 6H, 2 Leu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = -3.1.

C₃₂H₅₅N₁₂O₉P (782.40).

FAB-HR: ber.: 783.4031 [M + H]⁺

gef.: 783.4022 [M + H]⁺

Glycyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-seryl-glycin-(6-azidohexyl)amid (100)

H₂N-Gly-pTyr-Glu-Ser-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 50 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21.6 mg (0.030 mmol), 17%.

HPLC (C18): t_r = 4.71 min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -3.3^\circ$ ($c = 1.00$; H_2O).

1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.10$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.01 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.53 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.31-4.23 (m, 2H, Ser- α -H, Glu- α -H), 3.93-3.62 (m, 6H, Ser- CH_2 , 2 Gly- CH_2), 3.17 (dd, $^2J = 6.8$ Hz, $^3J = 11.8$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.10-3.03 (m, 2H, CH_2), 3.00-2.85 (m, 2H, pTyr- CH_2), 2.30 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Glu- CH_2), 2.00-1.93 (m, 1H, Glu-CHa), 1.87-1.77 (m, 1H, Glu-CHb), 1.49-1.33 (m, 4H, 2 CH_2), 1.29-1.13 (m, 4H, CH_2).

^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.1$.

$C_{27}H_{42}N_9O_{12}P$ (715.27).

FAB-HR: ber.: 716.2769 $[M + H]^+$

gef.: 716.2742 $[M + H]^+$

Glycyl-seryl-phosphotyrosyl-alanyl-glycin-(6-azidohexyl)amid (101)

H_2N -Gly-Ser-pTyr-Ala-Gly-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 37.0 mg (0.056 mmol), 31%.

HPLC (C18): $t_r = 5.00$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -14.6^\circ$ ($c = 0.57$; DMSO).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 7.04$ (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 6.94 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.48-4.40 (m, 2H, pTyr- α -H, Ala- α -H), 4.27-4.18 (m, 1H, Ser- α -H), 3.75-3.38 (m, 6H, 2 Gly- CH_2 , Ser- CH_2), 3.36-3.29 (m, 3H, pTyr-CHa, N_3 - CH_2), 3.09-2.96 (m, 3H, pTyr-CHb, NH - CH_2), 1.53-1.46 (m, 2H, CH_2), 1.43-1.35 (m, 2H, CH_2), 1.33-1.21 (m, 7H, 2 CH_2 , Ala- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 173.0$, 171.6, 170.3, 169.1, 166.4 (5 C=O), 152.9 (pTyr-ar-C-O), 131.6 (pTyr-ar-C- \underline{C} - CH_2), 130.5 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 119.9 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 62.1 (Ser- CH_2), 55.2, 54.6 (pTyr- α -C, Ser- α -C), 51.3 (CH_2 - N_3), 49.4, 46.3, 42.8 (2 Gly- α -C, Ala- α -C), 39.6, 39.1 (pTyr- CH_2 , CH_2 -NH), 29.6, 28.9, 26.5 (4 CH_2), 18.4 (Ala- CH_3).

^{31}P -NMR (162 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = -4.2$.

$C_{25}H_{40}N_9O_{10}P$ (657.26).

FAB-HR: ber.: 658.2714 $[M + H]^+$

gef.: 658.2682 $[M + H]^+$

Alanyl-arginyl-phosphotyrosyl-glutamyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (102)

H₂N-Ala-Arg-pTyr-Gln-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1.5 mg (0.002 mmol), 1%.

HPLC (C18): $t_r = 4.40$ min (1 min 5% B, dann innerhalb von 10 min auf 60 % B).

C₃₃H₅₄N₁₃O₁₂P (855.38).

FAB-HR: ber.: 856.3831 [M + H]⁺

gef.: 856.3814 [M + H]⁺

Leucyl-alanyl-phosphotyrosyl-glutaminsäure-yl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (103)

H₂N-Leu-Ala-pTyr-Glu-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 70 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 4.4 mg (0.005 mmol), 4%.

HPLC (C18): $t_r = 5.25$ min (Standardgradient).

C₃₃H₅₂N₉O₁₃P (813.34).

FAB-HR: ber.: 814.3500 [M + H]⁺

gef.: 814.3481 [M + H]⁺

Phenylalanyl-phosphotyrosyl-arginyl-alanyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (104)

H₂N-Phe-pTyr-Arg-Ala-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1.4 mg (0.002 mmol), 1%.

HPLC (C18): $t_r = 4.54$ min (Standardgradient).

C₃₇H₅₅N₁₂O₁₁P (874.39).

FAB-HR: ber.: 875.3924 [M + H]⁺

gef.: 875.3907 [M + H]⁺

Alanyl-glutaminsäure-yl-phosphotyrosyl-glycyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (105)

H₂N-Ala-Glu-pTyr-Gly-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 70 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 20.2 mg (0.027 mmol), 18%.

HPLC (C18): $t_r = 5.07$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -37.5^\circ$ (c = 1.09; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.10$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.00 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.56 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.53-4.46 (m, 1H, Asp- α -H), 4.26-4.22 (m, 1H, Glu- α -H), 3.92 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 3.86-3.68 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.16 (dd, ²J = 5.0 Hz, ³J = 6.7 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.19-3.01 (m, 3H, Tyr-CH_a, CH₂), 2.91-2.68 (m, 3H, pTyr-CH_b, CH₂), 2.27-2.22 (m, 2H, Glu-CH₂), 1.93-1.75 (m, 2H, Glu-CH₂), 1.49-1.31 (m, 7H, Ala-CH₃, 2 CH₂), 1.27-1.14 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 177.0, 174.2, 172.8, 172.7, 172.0, 171.2, 170.7$ (7 C=O), 151.1 (pTyr-ar-C-O), 132.1 (pTyr-ar-C-CH₂), 130.5 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 120.7 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 55.2, 55.1, 53.0, 51.3, 50.4, 49.1 (CH₂-N₃, pTyr- α -C, Asp- α -C, Gly- α -C, Glu- α -C, Ala- α -C), 42.8, 39.6, 35.7 (pTyr-CH₂, Asp-CH₂, CH₂-NH), 29.9, 28.3, 28.1, 26.4, 25.7, 25.6 (6 CH₂), 16.7 (Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.3$.

C₂₉H₄₄N₉O₁₃P (757.28).

FAB-HR: ber.: 758.2869 [M + H]⁺

gef.: 758.2870 [M + H]⁺

Glycyl-phosphotyrosyl-seryl-glycyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (106)

H₂N-Gly-pTyr-Ser-Gly-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 11.8 mg (0.017 mmol), 11%.

HPLC (C18): $t_r = 4.92$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +0.2^\circ$ (c = 0.94; H₂O).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.14$ (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.03 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.61-4.55 (m, 2H, pTyr- α -H, Asp- α -H), 4.34-4.31 (m, 1H, Ser- α -H), 3.85 (s, 2H, Gly- CH_2), 3.75-3.60 (m, 4H, Ser- CH_2 , Gly- CH_2), 3.18 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.09-3.04 (m, 3H, pTyr-CHa, CH_2), 2.93-2.70 (m, 3H, pTyr-CHb, CH_2), 1.50-1.37 (m, 4H, 2 CH_2), 1.30-1.17 (m, 4H, 2 CH_2).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -2.9$.

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{P}$ (701.25).

FAB-HR: ber.: 702.2607 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 702.2585 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Phenylalanyl-lysyl-phosphotyrosyl-glycyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (107)

$\text{H}_2\text{N-Phe-Lys-pTyr-Gly-Asp-N-Azidohexyl}$

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21.0 mg (0.025 mmol), 17%.

HPLC (C18): $t_r = 4.71$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +3.5^\circ$ ($c = 1.00$; H_2O).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.26$ -7.22 (m, 3H, 3 Phe-ar-H), 7.16-7.09 (m, 4H, 2 Phe-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 7.05 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.58-4.52 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, Asp- α -H), 4.17-4.10 (m, 2H, Phe- α -H, Lys- α -H), 3.88-3.67 (m, 2H, Gly- CH_2), 3.19-3.14 (m, 2H, N_3 - CH_2), 3.10-3.00 (m, 5H, Tyr-CHa, 2 CH_2), 2.95-2.88 (m, 1H, pTyr-CHb), 2.83-2.75 (m, 4H, 2 CH_2), 1.52-1.33 (m, 8H, 4 CH_2), 1.20-1.06 (m, 6H, 3 CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 174.2, 173.6, 172.7, 171.9, 171.2, 169.1$ (6 C=O), 151.3 (pTyr-ar-C-O), 133.8, 132.0, 130.6, 129.6, 129.4, 128.2, 120.7, 120.6 (11 ar-C), 55.5, 55.4, 54.4, 53.7, 51.3, 50.4 (CH_2 - N_3 , 5 AS- α -C), 42.7, 39.6, 39.3, 37.0, 36.1 (Phe- CH_2 , pTyr- CH_2 , Asp- CH_2 , Lys- CH_2 - NH_2 , NH- CH_2), 30.8, 28.3, 28.0, 26.5, 25.7, 25.6, 22.0 (7 CH_2).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.1$.

$\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{P}$ (832.36).

FAB-HR: ber.: 833.3706 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 833.3728 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Phenylalanyl-glutamyl-phosphotyrosyl-glutamyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (108)

H₂N-Phe-Gln-pTyr-Gln-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 7.5 mg (0.008 mmol), 6%.

HPLC (C18): $t_r = 5.37$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +10.8^\circ$ (c = 0.36; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 7.33$ -7.22 (m, 6H, 4 Phe-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 7.13-6.99 (m, 3H, 1 Phe-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 4.53-4.45 (m, 2H, pTyr- α -H, Asp- α -H), 4.35-4.09 (m, 3H, 2 Gln- α -H, Phe- α -H), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.08-2.93 (m, 5H, pTyr-CHa, CH₂-NH, Phe-CH₂), 2.86-2.57 (m, 3H, pTyr-CHb, Asp-CH₂), 2.13-2.02 (m, 4H, 2 Gln-CH₂), 1.89-1.79 (m, 2H, Gln-CH₂), 1.78-1.67 (m, 2H, Gln-CH₂), 1.53-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.41-1.33 (m, 2H, CH₂), 1.31-1.18 (m, 4H, 2 CH₂).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-D₆): $\delta = -5.6$ (PO₄).

C₃₈H₅₄N₁₁O₁₃P (903.36).

FAB-HR: ber.: 904.3713 [M + H]⁺

gef.: 904.3759 [M + H]⁺

Glutaminsäure-yl-phenylalanyl-phosphotyrosyl-methionyl-asparaginsäure-(6-azidohexyl)amid (109)

H₂N-Glu-Phe-pTyr-Met-Asp-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 3.5 mg (0.004 mmol), 3%.

HPLC (C18): $t_r = 8.18$ min (1 min 5% B, dann innerhalb von 10 min auf 60% B).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, TEA zur Löslichkeit zugesetzt): $\delta = 7.23$ -7.12 (m, 3H, 3 ar-H), 7.08-6.98 (m, 6H, 6 ar-H), 4.47-4.35 (m, 4H, 4 AS- α -H), 4.19 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, AS- α -H), 3.18-3.06 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 2.82-2.69 (m, 4H, 2 CH₂), 2.56 (dd, ²J = 4.3 Hz, ³J = 15.9 Hz, 1H, CHb), 2.47-2.27 (m, 3H, CHb, CH₂), 1.95 (s, 3H, Met-CH₃), 1.94-1.80 (m, 6H, 3 CH₂), 1.59-1.31 (m, 6H, 3 CH₂), 1.21-1.09 (m, 4H, 2 CH₂).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, TEA zur Löslichkeit zugesetzt): $\delta = 1.1$.

C₃₈H₅₄N₉O₁₃PS (907.33).

FAB-HR: ber.: 908.3372 [M + H]⁺
gef.: 908.3368 [M + H]⁺

Alanyl-valyl-phosphotyrosyl-tryptophyl-threonin-(6-azidohexyl)amid (110)

H₂N-Ala-Val-pTyr-Trp-Thr-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient, keine TFA.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 2.9 mg (0.003 mmol), 5%.

HPLC (C18): t_r = 6.28 min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 7.53 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.41 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.19-7.09 (m, 5H, 3 Trp-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.79-4.50 (br, H₂O), 3.98-3.90 (m, 3H, 3 AS-α-H), 3.25-2.80 (m, 9H, N₃-CH₂, Trp-CH₂, pTyr-CH₂, NH-CH₂, CH), 1.81-1.75 (m, 1H, CH), 1.53-1.20 (m, 11H, 4 CH₂, Ala-CH₃), 0.97 (d, ³J = 6.6 Hz, 3H, Thr-CH₃), 0.75 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.65 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, Val-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = -3.2 (PO₄).

C₃₈H₅₅N₁₀O₁₀P (842.38).

FAB-HR: ber.: 843.3919 [M + H]⁺
gef.: 843.3930 [M + H]⁺

Alanyl-tryptophyl-phosphotyrosyl-glycyl-threonin-(6-azidohexyl)amid (111)

H₂N-Ala-Trp-pTyr-Gly-Thr-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient, keine TFA.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 7.6 mg (0.010 mmol), 14%.

HPLC (C18): t_r = 5.83 min (Standardgradient).

[α]_D²⁰ = -6.4° (c = 0.36; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.61 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.29 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, Trp-ar-H), 7.09-6.93 (m, 7H, 3 Trp-ar-H, 4 pTyr-ar-H), 4.62-4.56 (m, 1H, Trp-α-H), 4.51-4.44 (m, 1H, pTyr-α-H), 4.11 (dd, ²J = 4.1 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, Thr-α-H), 4.01-3.95 (m, 1H, Ala-α-H), 3.80 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, Gly-CH₂), 3.65-3.20 (br, H₂O), 3.25 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.11-2.96 (m, 4H, pTyr-CH₂, NH-CH₂), 2.85 (dd, ²J = 9.5 Hz, ³J = 14.9 Hz, 1H, Trp-CH_α), 2.74-2.67 (m, 1H, Trp-CH_β), 1.51-1.43 (m, 2H, CH₂), 1.42-1.34 (m, 2H, CH₂), 1.30-1.21 (m, 4H, 2 CH₂), 1.16 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, Ala-CH₃), 1.02 (d, ³J = 6.4 Hz, 3H, Thr-CH₃).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 172.2, 171.9, 170.4, 169.6, 169.5$ (5 C=O), 136.8, 130.4, 127.9, 126.8, 124.5, 123.4, 121.5, 120.0, 119.1, 118.8 (10 ar-C), 112.0 (Trp-ar-C), 67.1 (Thr-CH), 59.1, 54.1 (2 AS- α -C), 51.2 (CH $_2$ -N $_3$), 40.6, 39.2 (pTyr-CH $_2$, NH-CH $_2$), 29.5, 28.8, 26.5 (4 CH $_2$), 20.7 (Ala-CH $_3$), 17.6 (Thr-CH $_3$).

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -5.4$.

$\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}$ (800.34).

FAB-HR: ber.: 801.3444 [M + H] $^+$

gef.: 801.3447 [M + H] $^+$

Prolyl-isoleucyl-phosphotyrosyl-alanyl-threonin-(6-azidohexyl)amid (112)

HN-Pro-Ile-pTyr-Ala-Thr-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 13.1 mg (0.017 mmol), 25%.

HPLC (C18): $t_r = 5.61$ min (Standardgradient).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.09$ (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 6.97 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.52-4.47 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.37-4.31 (m, 1H, Ala- α -H), 4.16-4.05 (m, 2H, Thr- α -H, Ile- α -H), 3.98-3.93 (m, 1H, Pro- α -H), 3.65-3.20 (br, H $_2$ O), 3.28 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, N $_3$ -CH $_2$), 3.11-2.95 (m, 6H, pTyr-CH $_2$, NH-CH $_2$, Pro-CH $_2$), 2.72-2.64 (m, 1H, Ile-CH), 1.89-1.81 (m, 2H, Pro-CH $_2$), 1.71-1.64 (m, 1H, Pro-CHa), 1.62-1.45 (m, 3H, Pro-CHb, CH $_2$), 1.43-1.20 (m, 11H, 3 CH $_2$, Ile-CH $_2$, Ala-CH $_3$), 1.16 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3H, Ile-CH $_3$), 1.00 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3H, Thr-CH $_3$), 0.81-0.77 (m, 3H, Ile-CH $_3$).

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -4.5$.

$\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{P}$ (767.37).

FAB-HR: ber.: 768.3804 [M + H] $^+$

gef.: 768.3829 [M + H] $^+$

Prolyl-phosphotyrosyl-asparaginsäure-yl-isoleucyl-threonin-(6-azidohexyl)amid (113)

HN-Pro-pTyr-Asp-Ile-Thr-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 8.9 mg (0.011 mmol), 16%.

HPLC (C18): $t_r = 5.75$ min (Standardgradient).

$C_{34}H_{54}N_9O_{12}P$ (811.36).

FAB-HR: ber.: 812.3702 [M + H]⁺

gef.: 812.3708 [M + H]⁺

Glycyl-phosphotyrosyl-prolyl-glycyl-threonin-(6-azidohexyl)amid (114)

H₂N-Gly-pTyr-Pro-Gly-Thr-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5.1 mg (0.007 mmol), 11%.

HPLC (C18): $t_r = 5.09$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -34.0^\circ$ (c = 0.50; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.19$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.05 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.84 (dd, ²J = 5.2 Hz, ³J = 9.4 Hz, 1H, AS- α -H), 4.37 (dd, ²J = 5.6 Hz, ³J = 8.1 Hz, 1H, AS- α -H), 4.19-4.10 (m, 1H, Pro- α -H), 3.93-3.73 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.70-3.60 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.58-3.50 (m, 1H, Thr-CH), 3.22-3.02 (m, 6H, N₃-CH₂, Pro-CH₂, NH-CH₂), 2.91-2.75 (m, 2H, pTyr-CH₂), 2.24-2.16 (m, 1H, Pro-CHa), 1.97-1.85 (m, 3H, Pro-CHa, Pro-CH₂), 1.50-1.39 (m, 4H, 2 CH₂), 1.32-1.18 (m, 4H, 2 CH₂), 1.12 (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, Thr-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.0$.

$C_{28}H_{44}N_9O_{10}P$ (697.29).

FAB-HR: ber.: 698.3022 [M + H]⁺

gef.: 698.3019 [M + H]⁺

Leucyl-phosphotyrosyl-arginyl-isoleucyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (115)

H₂N-Leu-pTyr-Arg-Ile-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 6.8 mg (0.008 mmol), 8%.

HPLC (C18): $t_r = 5.17$ min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.12$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.03 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.58 (t, ³J = 7.9 Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.19 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, AS- α -H), 4.12 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 4.01 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, AS- α -H), 3.87 (t, ³J = 7.0 Hz, 1H, AS- α -H), 3.20 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.10-3.03 (m, 5H, pTyr-CH₂, CH₂, Ile-CH), 2.97-2.92 (m, 2H, CH₂),

1.76-1.72 (m, 1H, Leu-CH), 1.60-1.35 (m, 12H, 6 CH₂), 1.28-1.20 (m, 7H, 2 CH₂, Ala-CH₃), 0.86-0.79 (m, 12H, 2 Leu-CH₃, 2 Ile-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.0$.

C₃₆H₆₃N₁₂O₉P (838.46).

FAB-HR: ber.: 839.4657 [M + H]⁺

gef.: 839.4664 [M + H]⁺

Leucyl-cysteyl-phosphotyrosyl-lysyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (116)

H₂N-Leu-Cys-pTyr-Lys-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 2.4 mg (0.003 mmol), 3%.

HPLC (C18): t_r = 4.64 min (Standardgradient).

C₃₃H₅₇N₁₀O₉PS (800.38).

FAB-HR: ber.: 801.3847 [M + H]⁺

gef.: 801.3893 [M + H]⁺

Glycyl-phosphotyrosyl-cysteyl-seryl-alanin-(6-azidohexyl)amid (117)

H₂N-Gly-pTyr-Cys-Ser-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 14.0 mg (0.012 mmol), 12%.

HPLC (C18): t_r = 5.26 min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +7.2^\circ$ (c = 0.56; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 7.10$ (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.00 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.65-4.59 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.41 (dd, ²J = 7.4 Hz, ³J = 13.5 Hz, 1H, AS- α -H), 4.27 (q, ³J = 6.3 Hz, 1H, Ala- α -H), 4.22-4.14 (m, 1H, AS- α -H), 3.64 (dd, ²J = 5.9 Hz, ³J = 10.8 Hz, 1H, AS-CHa), 3.54-3.47 (m, 2H, AS-CHb, AS-CHa), 3.37 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H, AS-CHb), 3.28 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.05-2.93 (m, 3H, NH-CH₂, AS-CHa), 2.83-2.65 (m, 3H, AS-CH₂, AS-CHb), 1.53-1.45 (m, 2H, CH₂), 1.40-1.18 (m, 9H, 3 CH₂, Ala-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 172.4, 171.8, 170.4, 170.3, 166.5$ (5 C=O), 154.1 (pTyr-ar-C-O), 131.5 (pTyr-ar-C-CH₂), 130.5 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 120.4 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 62.3

(Ser-CH₂), 56.0, 55.8, 55.0 (3 AS- α -C), 51.3 (N₃-CH₂), 49.2 (AS- α -C), 39.6, 39.1, 37.8 (CH₂-NH, pTyr-CH₂, Gly-CH₂), 29.4, 28.9, 26.7, 26.5, 26.4 (Cys-CH₂, 4 CH₂), 18.7 (Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): $\delta = -4.1$.

C₂₆H₄₂N₉O₁₀PS (703.25).

FAB-HR: ber.: 704.2591 [M + H]⁺

gef.: 704.2614 [M + H]⁺

Glycyl-methionyl-phosphotyrosyl-methionyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (118)

H₂N-Gly-Met-pTyr-Met-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/H₂O/Et₂O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Gelber amorpher Feststoff.

Ausbeute: 21.0 mg (0.028 mmol), 27%.

HPLC (C18): t_r = 6.13 min (Standardgradient).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): $\delta = -4.2$.

C₃₀H₅₀N₉O₉PS₂ (775.29).

FAB-HR: ber.: 776.2989 [M + H]⁺

gef.: 776.2953 [M + H]⁺

Phenylalanyl-lysyl-phosphotyrosyl-seryl-alanin-(6-azidohexyl)amid (119)

H₂N-Phe-Lys-pTyr-Ser-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 25.6 mg (0.031 mmol), 30%.

HPLC (C18): t_r = 4.75 min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -14.7^\circ$ (c = 1.10; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.27-7.24$ (m, 3H, 3 Phe-ar-H), 7.16-7.08 (m, 4H, 2 Phe-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 7.04 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.48 (dd, ²J = 6.3 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.27 (t, ³J = 5.7 Hz, 1H, Ser- α -H), 4.19-4.10 (m, 3H, Lys- α -H, Ala- α -H, Phe- α -H), 3.74-3.63 (m, 2H, Ser-CH₂), 3.18 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.10-2.88 (m, 6H, pTyr-CH₂, Phe-CH₂, CH₂), 2.82 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.54-1.36 (m, 8H, 4 CH₂), 1.30-1.05 (m, 9H, 4 CH₂, Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.2$.

C₃₆H₅₅N₁₀O₁₀P (818.38).

FAB-HR: ber.: 819.3919 [M + H]⁺
 gef.: 819.3885 [M + H]⁺ (3-NBA + Essigsäure)

Phenylalanyl-phosphotyrosyl-tyrosyl-prolyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (120)

H₂N-Phe-pTyr-Tyr-Pro-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 30.7 mg (0.036 mmol), 34%.

HPLC (C18): t_r = 6.04 min (Standardgradient).

[α]_D²⁰ = -12.3° (c = 0.64; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.23-7.18 (m, 5H, 5 Phe-ar-H), 7.10-6.99 (m, 6H, 4 Tyr-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 6.63 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.64-4.51 (m, 2H, pTyr-α-H, Tyr-α-H), 4.32 (dd, ²J = 3.1 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, Pro-α-H), 4.18-4.12 (m, 1H, Ala-α-H), 3.96-3.91 (m, 1H, Phe-α-H), 3.60-3.54 (m, 1H, Pro-CHa), 3.44-3.35 (m, 1H, Pro-CHb), 3.26 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.09-2.82 (m, 6H, NH-CH₂, 2 AS-CH₂), 2.76-2.64 (m, 2H, AS-CH₂), 2.26-1.95 (m, 1H, Pro-CHa), 1.86-1.73 (m, 3H, Pro-CHb, Pro-CH₂), 1.52-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.41-1.32 (m, 2H, CH₂), 1.30-1.15 (m, 7H, 2 CH₂, Ala-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.7, 171.6, 171.0, 170.6, 168.6 (5 C=O), 156.6, 153.0 (Tyr-ar-C-O, pTyr-ar-C-O), 135.5, 131.5, 131.2, 130.9, 130.8, 130.4, 130.3, 129.1, 128.3, 127.7, 120.3, 115.7 (16 ar-C), 60.3 (Pro-α-C), 54.7, 53.7, 53.1 (pTyr-α-C, Tyr-α-C, Phe-α-C), 51.2 (N₃-CH₂), 49.2 (Ala-α-C), 47.6 (Pro-CH₂), 39.6, 39.0, 37.7 (3 CH₂), 29.5, 28.9, 26.5, 26.4, 25.1 (Pro-CH₂, 4 CH₂), 18.9 (Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ = -4.3.

C₄₁H₅₄N₉O₁₀P (863.37).

FAB-HR: ber.: 864.3810 [M + H]⁺
 gef.: 864.3774 [M + H]⁺ (3-NBA + Essigsäure)

Alanyl-arginyl-phosphotyrosyl-phenylalanyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (121)

H₂N-Ala-Arg-pTyr-Phe-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 13.0 mg (0.016 mmol), 15%.

HPLC (C18): $t_r = 5.20$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +1.8^\circ$ ($c = 0.38$; DMSO).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.25\text{-}7.07$ (m, 5H, 5 Phe-ar-H), 7.00 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 6.94 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.48-4.39 (m, 2H, pTyr- α -H, Phe- α -H), 4.11-4.03 (m, 2H, Ala- α -H, Arg- α -H), 3.88 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.17-3.12 (m, 3H, $\text{N}_3\text{-CH}_2$, pTyr-CHa), 3.01-2.72 (m, 7H, Phe- CH_2 , pTyr-CHb, CH_2 , NH- CH_2), 1.51-1.41 (m, 4H, 2 CH_2), 1.38-1.00 (m, 14H, 4 CH_2 , 2 Ala- CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.3$.

$\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{N}_{12}\text{O}_9\text{P}$ (830.40).

FAB-HR: ber.: 831.4025 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 831.4047 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Alanyl-asparaginsäure-yl-phosphotyrosyl-tyrosyl-alanin-(6-azidohexyl)amid (122)

$\text{H}_2\text{N-Ala-Asp-pTyr-Tyr-Ala-N-Azidohexyl}$

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 70% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 25.1 mg (0.031 mmol), 30%.

HPLC (C18): $t_r = 5.69$ min (Standardgradient).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7.05\text{-}6.95$ (m, 6H, 4 Tyr-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 6.63 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.52-4.45 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.43-4.35 (m, 2H, Tyr- α -H, Asp- α -H), 4.20 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.63 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, Ala- α -H), 3.27 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{N}_3\text{-CH}_2$), 3.08-2.86 (m, 4H, NH- CH_2 , AS- CH_2), 2.71 (dd, $^2J = 9.2$ Hz, $^3J = 13.9$ Hz, 1H, AS-CHa), 2.61 (dd, $^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 14.0$ Hz, 1H, AS-CHb), 2.35 (dd, $^2J = 9.2$ Hz, $^3J = 17.2$ Hz, 2H, AS- CH_2), 1.53-1.45 (m, 2H, CH_2), 1.40-1.13 (m, 12H, 3 CH_2 , 2 Ala- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 172.4, 172.3, 171.5, 171.3, 170.6, 170.0$ (6 C=O), 156.6 (2 Tyr-ar-C-O), 130.8, 130.5, 128.3, 120.4, 115.6 (10 ar-C), 55.1, 54.4 (2 Tyr- α -C), 51.3 ($\text{N}_3\text{-CH}_2$), 50.5, 49.0, 48.6 (Asp- α -C, 2 Ala- α -C), 39.6, 39.0, 37.3, 36.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}$, 2 Tyr- CH_2 , Asp- CH_2), 29.5, 28.9, 26.5, 26.4 (4 CH_2), 19.1, 17.6 (2 Ala- CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -5.1$.

$\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{P}$ (805.32).

FAB-HR: ber.: 806.3238 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 806.3254 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Methionyl-phosphotyrosyl-glycyl-asparaginsäure-yl-alanin-(6-azidohexyl)amid (123)

H₂N-Met-pTyr-Gly-Asp-Ala-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 9.7 mg (0.013 mmol), 12%.

HPLC (C18): $t_r = 5.36$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -3.2^\circ$ (c = 0.41; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.12$ (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.02 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.54 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, AS- α -H), 4.13 (q, ³J = 7.1 Hz, 1H, Ala- α -H), 3.97 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, Met- α -H), 3.76 (dd, ²J = 17.0 Hz, ³J = 63.9 Hz, 2H, Gly-CH₂), 3.19 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.14-2.91 (m, 4H, pTyr-CH₂, NH-CH₂), 2.83 (dd, ²J = 6.0 Hz, ³J = 17.1 Hz, 1H, Asp-CHa), 2.74 (dd, ²J = 7.1 Hz, ³J = 17.2 Hz, 1H, Asp-CHb), 2.48-2.42 (m, 2H, Met-CH₂), 2.04-1.98 (m, 5H, Met-CH₂, Met-CH₃), 1.51-1.35 (m, 4H, 2 CH₂), 1.29-1.18 (m, 7H, 2 CH₂, Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.0$ (PO₄).

C₂₉H₄₆N₉O₁₁PS (759.28).

FAB-HR: ber.: 760.2848 [M + H]⁺

gef.: 760.2863 [M + H]⁺

Glutaminsäure-yl-lysyl-phosphotyrosyl-histidyl-valin-(6-azidohexyl)amid (124)

H₂N-Glu-Lys-pTyr-His-Val-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 7.8 mg (0.009 mmol), 10%.

HPLC (C18): $t_r = 4.33$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -17.9^\circ$ (c = 0.80; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 8.51$ (s, 1H, His-ar-H), 7.12 (s, 1H, His-ar-H), 7.08 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.00 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.53 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, AS- α -H), 4.47 (t, ³J = 8.4 Hz, 1H, AS- α -H), 4.15 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, AS- α -H), 3.95 (t, ³J = 6.4 Hz, 1H, AS- α -H), 3.85 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, AS- α -H), 3.20 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.16-2.87 (m, 6H, His-CH₂, pTyr-CH₂, CH₂), 2.83 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.39-2.34 (m, 2H, CH₂), 2.06-1.98

(m, 2H, CH₂), 1.92-1.86 (m, 1H, CH), 1.58-1.38 (m, 8H, 4 CH₂), 1.26-1.12 (m, 6H, 3 CH₂), 0.85 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.82 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, Val-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = -3.1.

C₃₇H₅₉N₁₂O₁₁P (878.42).

FAB-HR: ber.: 879.4242 [M + H]⁺

gef.: 879.4212 [M + H]⁺

Leucyl-phosphotyrosyl-cysteyl-cysteyl-valin-(6-azidohexyl)amid (125)

H₂N-Leu-pTyr-Cys-Cys-Val-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et₂O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 37.7 mg (0.047 mmol), 52%; noch Verunreinigungen vorhanden (LCMS).

HPLC (C18): t_r = 6.48 min (Standardgradient).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ = -4.1.

C₃₂H₅₄N₉O₉PS₂ (803.32).

ESI-MS: ber.: 804.3 [M + H]⁺

gef.: 804.3 [M + H]⁺

Prolyl-tyrosyl-phosphotyrosyl-tyrosyl-valin-(6-azidohexyl)amid (126)

H₂N-Pro-Tyr-pTyr-Tyr-Val-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 20.7 mg (0.023 mmol), 25%.

HPLC (C18): t_r = 6.24 min (Standardgradient).

[α]_D²⁰ = -13.4° (c = 0.58; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.03-6.90 (m, 8H, 4 Tyr-ar-H, 4 pTyr-ar-H), 6.63-6.57 (m, 4H, 4 Tyr-ar-H), 4.55-4.48 (m, 1H, pTyr-α-H), 4.45-4.39 (m, 1H, Tyr-α-H), 4.30-4.23 (m, 1H, Tyr-α-H), 4.08 (dd, ²J = 7.1 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, Val-α-H), 3.72-3.67 (m, 1H, Pro-α-H), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.07-2.83 (m, 8H, pTyr-CH₂, 2 Tyr-CH₂, NH-CH₂), 2.76-2.68 (m, 3H, Val-CH, Pro-CH₂), 2.04-1.87 (m, 2H, Pro-CH₂), 1.68-1.58 (m, 2H, Pro-CH₂), 1.51-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.39-1.34 (m, 2H, CH₂), 1.31-1.24 (m, 4H, 2 CH₂), 0.82 (d, ³J = 6.7 Hz, 6H, 2 Val-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 171.6, 171.5, 171.1 (5 C=O), 156.6 (2 Tyr-ar-C-OH), 153.1 (pTyr-ar-C-O), 131.0, 130.8, 130.7, 131.4, 131.3, 128.2 (6 Tyr-ar-C, 3 pTyr-ar-C), 120.1 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 115.6 (4 Tyr-ar-C *ortho* zu O), 59.6, 58.6, 54.9, 51.3, 51.2, 46.2, 46.1 (5 AS-α-C,

N₃-CH₂, Pro-CH₂), 39.6, 39.0, 37.3 (2 Tyr-CH₂, CH₂-NH, pTyr-CH₂), 31.3, 30.1, 29.5, 28.9, 26.6, 26.5, 24.4 (2 Pro-CH₂, Val-CH, 4 CH₂), 19.8, 18.9 (2 Val-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ = -4.2.

C₄₃H₅₈N₉O₁₁P (907.40).

FAB-HR: ber.: 908.4072 [M + H]⁺

gef.: 908.4060 [M + H]⁺

Phenylalanyl-phosphotyrosyl-seryl-seryl-valin-(6-azidoheptyl)amid (127)

H₂N-Phe-pTyr-Ser-Ser-Val-N-Azidoheptyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et₂O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Hellrötlich-weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 35.4 mg (0.044 mmol), 49%; noch Verunreinigungen vorhanden (LCMS).

HPLC (C18): t_r = 5.90 min (Standardgradient).

[α]_D²⁰ = +6.0° (c = 0.48; DMSO).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.29-7.22 (m, 5H, 5 Phe-ar-H), 7.12 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.01 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.66-4.59 (m, 1H, pTyr-α-H), 4.43-4.31 (m, 2H, 2 Ser-α-H), 4.08 (dd, ²J = 6.4 Hz, ³J = 8.8 Hz, 1H, Val-α-H), 3.94-3.90 (m, 1H, Phe-α-H), 3.66-3.62 (m, 2H, Ser-CH₂), 3.58-3.53 (m, 2H, Ser-CH₂), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.18-2.88 (m, 6H, pTyr-CH₂, Phe-CH₂, NH-CH₂), 2.79-2.73 (m, 1H, Val-CH), 1.51-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.40-1.32 (m, 2H, CH₂), 1.20-1.16 (m, 4H, 2 CH₂), 0.81 (d, ³J = 6.7 Hz, 3H, Val-CH₃), 0.79 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, Val-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 172.7, 172.2, 171.9, 171.6, 169.8 (5 C=O), 154.1 (pTyr-ar-C-O), 137.5 (Phe-ar-C_q), 136.6, 132.5, 131.6, 131.4, 131.3 (4 Phe-arC, pTyr-ar-C-CH₂), 130.1 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 128.7 (Phe-ar-C), 121.5 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 63.4, 59.6, 56.9, 56.0, 54.8 (5 AS-α-C, 2 Ser-CH₂), 52.3 (N₃-CH₂), 40.6, 40.1, 38.6 (Phe-CH₂, CH₂-NH, pTyr-CH₂), 31.9, 30.4, 29.9, 27.5 (Val-CH, 4 CH₂), 20.9, 19.5 (2 Val-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ = -3.0.

C₃₅H₅₂N₉O₁₁P (805.35).

FAB-HR: ber.: 806.3597 [M + H]⁺

gef.: 806.3639 [M + H]⁺

Phenylalanyl-isoleucyl-phosphotyrosyl-isoleucyl-valin-(6-azidohexyl)amid (128)

H₂N-Phe-Ile-pTyr-Ile-Val-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 10% B, dann innerhalb von 12 min auf 90% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 49.8 mg (0.058 mmol), 64%.

HPLC (C4): $t_r = 6.94$ min (Standardgradient).

C₄₁H₆₄N₉O₉P (857.46).

ESI-FTMS-HR: ber.: 858.46374 [M + H]⁺

gef.: 858.46381 [M + H]⁺

Glutaminsäure-yl-phosphotyrosyl-alanyl-prolyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (129)

H₂N-Glu-pTyr-Ala-Pro-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 13.4 mg (0.027 mmol), 19%.

HPLC (C18): $t_r = 5.55$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -57.2^\circ$ (c = 0.65; H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 7.10$ (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.01 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.54-4.47 (m, 2H, pTyr- α -H, Ala- α -H), 4.29 (dd, ²J = 5.7 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1H, Gln- α -H) 4.09 (dd, ²J = 5.3 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1H, Pro- α -H), 3.82 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, Glu- α -H), 3.62-3.48 (m, 2H, Pro-CH₂-N), 3.18 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.12-3.04 (m, 2H, CH₂), 2.99 (dd, ²J = 6.7 Hz, ³J = 14.1 Hz, 1H, pTyr-CHa), 2.82 (dd, ²J = 9.1 Hz, ³J = 13.9 Hz, 1H, pTyr-CHb), 2.38-2.19 (m, 5H, CHa, 2 CH₂), 1.99-1.76 (m, 7H, CHb, 3 CH₂), 1.51-1.36 (m, 4H, 2 CH₂), 1.35-1.18 (m, 7H, 2 CH₂, Ala-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.1$.

C₃₃H₅₁N₁₀O₁₂P (810.34).

FAB-HR: ber.: 811.3504 [M + H]⁺

gef.: 811.3549 [M + H]⁺ (3-NBA + Essigsäure)

Glutaminsäure-yl-glycyl-phosphotyrosyl-glycyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (130)

H₂N-Glu-Gly-pTyr-Gly-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 3.7 mg (0.005 mmol), 6%.

HPLC (C18): $t_r = 5.48$ min (Standardgradient).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.11$ (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.04 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.51 (dd, $^2J = 6.2$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.16 (dd, $^2J = 5.1$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, 1H, Gln- α -H) 3.91-3.71 (m, 5H, Glu- α -H, 2 Gly- CH_2), 3.19 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.12-3.04 (m, 3H, pTyr-CHa, CH_2), 2.90 (dd, $^2J = 8.9$ Hz, $^3J = 14.1$ Hz, 1H, pTyr-CHb), 2.42-2.37 (m, 2H, CH_2), 2.23 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.10-1.98 (m, 3H, CHa, CH_2), 1.91-1.82 (m, 1H, CHb), 1.51-1.39 (m, 4H, 2 CH_2), 1.31-1.19 (m, 4H, 2 CH_2).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): $\delta = -3.0$.

$\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{P}$ (756.30).

FAB-HR: ber.: 757.3034 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 757.3014 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Glutaminsäure-yl-phosphotyrosyl-asparaginsäure-yl-asparaginsäure-yl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (131)

$\text{H}_2\text{N-Glu-pTyr-Asp-Asp-Gln-N-Azidohexyl}$

Aufreinigung: Präparative HPLC: Standardgradient.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 7.9 mg (0.009 mmol), 11%.

HPLC (C18): $t_r = 5.51$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.4^\circ$ ($c = 0.37$; DMSO).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7.08$ (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 6.97 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.61-4.54 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.53-4.42 (m, 2H, 2 Asp- α -H), 4.13-4.05 (m, 1H, Gln- α -H), 3.42-3.38 (m, 1H, Glu- α -H), 3.28 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, N_3 - CH_2), 3.07-2.96 (m, 4H, NH-CH_2 , pTyr- CH_2), 2.72 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, Asp-CHa), 2.68 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, Asp-CHb), 2.62-2.52 (m, 2H, Asp- CH_2), 2.23-2.00 (m, 4H, Gln- CH_2 , Glu- CH_2), 1.95-1.85 (m, 1H, AS-CHa), 1.81-1.61 (m, 3H, AS-CHb, AS- CH_2), 1.53-1.45 (m, 2H, CH_2), 1.41-1.33 (m, 2H, CH_2), 1.31-1.19 (m, 4H, 2 CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 174.8, 172.7, 172.6, 172.3, 172.0, 171.7, 171.6, 171.4, 170.9$ (9 C=O), 152.0 (pTyr-ar-C-O), 132.5 (pTyr-ar-C- CH_2), 130.7 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 120.8 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 54.3, 53.3, 52.4 (pTyr- α -C, Gln- α -C, Glu- α -C), 51.3 (N_3 - CH_2), 50.6 (2 Asp- α -C), 39.7, 39.1 (CH_2 -NH, pTyr- CH_2), 36.4, 36.3 (2 Asp- CH_2), 32.3, 31.7 (Gln- CH_2 , Glu- CH_2), 29.4, 28.9, 28.5, 26.7, 26.5, 26.4 (Gln- CH_2 , Glu- CH_2 , 4 CH_2).

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -5.2$.

$\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}$ (872.31).

FAB-HR: ber.: 873.3144 $[\text{M} + \text{H}]^+$
gef.: 873.3159 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Leucyl-tyrosyl-phosphotyrosyl-lysyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (132)

H_2N -Leu-Tyr-pTyr-Lys-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et $_2$ O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 18.3 mg (0.020 mmol), 23%.

HPLC (C18): $t_r = 4.75$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = +18.4^\circ$ ($c = 0.43$; DMSO).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.06$ - 6.97 (m, 6H, 4 Tyr-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 6.60 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.58-4.49 (m, 1H, pTyr- α -H), 4.46-4.37 (m, 1H, Tyr- α -H), 4.20-4.06 (m, 2H, Lys- α -H, Gln- α -H), 3.61-3.54 (m, 1H, Leu- α -H), 3.27 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2H, N $_3$ -CH $_2$), 3.08-2.81 (m, 5H, NH-CH $_2$, Tyr-CH α , Tyr-CH $_2$), 2.73-2.55 (m, 3H, Tyr-CH β , Lys-CH $_2$), 2.09-2.02 (m, 2H, Gln-CH $_2$), 1.89-1.71 (m, 2H, Gln-CH $_2$), 1.64-1.07 (m, 17H, Leu-CH, Leu-CH $_2$, 3 Lys-CH $_2$, 4 CH $_2$), 0.83 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 6H, 2 Leu-CH $_3$).

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -5.0$.

$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{P}$ (917.45).

FAB-HR: ber.: 918.4603 $[\text{M} + \text{H}]^+$
gef.: 918.4623 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Leucyl-phosphotyrosyl-lysyl-lysyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (133)

H_2N -Leu-pTyr-Lys-Lys-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et $_2$ O), dann präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 19.3 mg (0.022 mmol), 25%.

HPLC (C18): $t_r = 2.20$ min (Standardgradient).

$[\alpha]_D^{20} = -7.3^\circ$ ($c = 1.09$; H $_2$ O).

^1H -NMR (400 MHz, D $_2$ O): $\delta = 7.10$ (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 7.01 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.53 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, pTyr- α -H), 4.14-4.05 (m, 3H, Gln- α -H, 2 Lys- α -H), 3.90

(t, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Leu- α -H), 3.20 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.16-3.08 (m, 2H, pTyr-CH₂), 3.01-2.90 (m, 4H, 2 CH₂), 2.85 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.25 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, CH₂), 1.99-1.83 (m, 2H, CH₂), 1.70-1.32 (m, 19H, Leu-CH, 9 CH₂), 1.20-1.16 (m, 4H, 2 CH₂), 0.83 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 6H, 2 Leu-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 178.0, 173.7, 172.9, 172.6, 172.0, 170.2$ (6 C=O), 151.2 (pTyr-ar-C-O), 131.6 (pTyr-ar-C-CH₂), 130.5 (2 pTyr-ar-C *meta* zu O), 120.7 (2 pTyr-ar-C *ortho* zu O), 55.4, 53.9, 53.6, 53.0, 51.9, 51.3 (5 AS- α -C, CH₂-N₃), 40.1, 39.4, 39.3, 36.5 (CH₂-NH, pTyr-CH₂, Leu-CH₂, 2 Lys-CH₂-NH₂), 31.3, 31.1, 30.6, 28.8, 28.1, 27.2, 26.6, 26.5, 25.7, 25.6, 24.0, 22.3, 22.0 (12 CH₂, Leu-CH), 21.8, 21.4 (2 Leu-CH₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): $\delta = -3.1$.

C₃₈H₆₇N₁₂O₁₀P (882.48).

FAB-HR: ber.: 883.4919 [M + H]⁺

gef.: 883.4893 [M + H]⁺

Glycyl-tryptophyl-phosphotyrosyl-tryptophyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (134)

H₂N-Gly-Trp-pTyr-Trp-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et₂O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5.6 mg (0.006 mmol), 7%.

HPLC (C18): $t_r = 6.62$ min (Standardgradient).

C₄₄H₅₅N₁₂O₁₀P (942.39).

ESI-FTMS-HR: ber.: 943.39745 [M + H]⁺

gef.: 943.39783 [M + H]⁺

Glycyl-phosphotyrosyl-arginyl-arginyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (135)

H₂N-Gly-pTyr-Arg-Arg-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Präparative HPLC: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 40% B und nach weiteren 3 min auf 100% B.

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 2.7 mg (0.003 mmol), 4%.

HPLC (C18): $t_r = 2.38$ min (Standardgradient).

C₃₄H₅₉N₁₆O₁₀P (882.43).

FAB-HR: ber.: 883.4416 [M + H]⁺

gef.: 883.4438 [M + H]⁺

Glycyl-tryptophyl-phosphotyrosyl-tryptophyl-glutamin-(6-azidohexyl)amid (136)

H₂N-Phe-Phe-pTyr-Phe-Gln-N-Azidohexyl

Aufreinigung: Umkristallisiert (MeOH/Et₂O; aus Suspension, nicht komplett löslich).

Weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 13.6 mg (0.014 mmol), 16%.

HPLC (C18): $t_r = 6.65$ min (Standardgradient).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 7.35-7.08$ (m, 17H, 15 Phe-ar-H, 2 pTyr-ar-H), 7.07-6.96 (m, 2H, 2 pTyr-ar-H), 4.59-4.41 (m, 3H, pTyr- α -H, 2 Phe- α -H), 4.20-4.11 (m, 1H, Gln- α -H), 3.59-3.53 (m, 1H, Phe- α -H), 3.20 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, N₃-CH₂), 3.09-3.01 (m, 3H, AS-CH_a, AS-CH₂), 2.99-2.81 (m, 4H, AS-CH_b, NH-CH₂, AS-CH_a), 2.71-2.56 (m, 3H, AS-CH_b, AS-CH₂), 2.12-2.02 (m, 2H, Gln-CH₂), 1.89-1.71 (m, 2H, CH₂), 1.52-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.42-1.20 (m, 6H, 3 CH₂).

C₄₇H₅₉N₁₀O₁₀P (954.42).

ESI-FTMS-HR: ber.: 955.42260 [M + H]⁺

gef.: 955.42166 [M + H]⁺

PTP1B-Substratspezifitäts-Assay mittels HPLC

PTP1B wurde 1:1000 mit HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 13 nM verdünnt und die Peptide **75**, **76**, **77**, **88** und **89** wurden als 1 mM Lösung in H₂O eingesetzt (Endkonzentration 50 μ M). Zum Messen der Substratspezifität wurden je 1.5 μ l der Substratlösungen mit 30 μ l der Enzymlösung zusammen gegeben. Als Negativkontrolle wurden je 1.5 μ l der Substrate mit 30 μ l Puffer versetzt. Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert, und nach 10, 30 und 60 min wurden aus jedem Ansatz 10 μ l herausgenommen und zu 40 μ l 10%iger Essigsäure zum Stoppen der Reaktion gegeben. Diese Proben wurden anschließend mittels HPLC-ESI vermessen.

Zur quantitativen Bestimmung der Dephosphorylierung wurden 10 μ l der 1 mM Substratlösungen von **88** und **89** jeweils mit 200 μ l der 13 nM Lösung von PTP1B im HEPES-Puffer gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 10, 30, 60, 90 und 120 min wurden jeweils 20 μ l Probe entnommen und zu 80 μ l 10%iger Essigsäure gegeben. Als Negativkontrollen wurden **88** und **89** in gleicher Weise mit Puffer an Stelle der PTP1B-Lösung inkubiert. Alle Proben wurden anschließend mittels HPLC-ESI vermessen. Zur Kalibrierung wurden jeweils eine 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M und 10 μ M Lösung der beiden Peptide mittels HPLC-ESI vermessen und aus den sich ergebenden Peakflächen konnte die Konzentration bzw. Substanzmenge der obigen Proben ermittelt werden.

Herstellung des anti-Phosphotyrosin-Biotin-Streptavidin-Cy5-Konjugats

Um eine 50 nM Lösung herzustellen wurden 157.5 μ l biotinylierter anti-Phosphotyrosin-Antikörper mit 10.5 μ l Streptavidin-Cy5 und 42 μ l TE-Puffer vermischt und 15 min inkubiert, Anschließend wurde die Mischung auf 2100 μ l mit Biotin-TETBS verdünnt.

Phosphatase-Substratspezifitäts-Assay mittels Mikroarrays

Die nach dem Spotten der Substrate nach AAV 6.2.4 unter Stickstoff aufbewahrten Glaträger wurden mit TETBS und Wasser gewaschen, 30 min mit MESTBS inkubiert, wieder mit H₂O gewaschen und es wurde jeweils ein fünf Felder enthaltender Gene Frame-Rahmen aufgebracht. Dann wurden je 50 μ l der Enzym-enthaltenden Lösungen bzw. der Pufferlösung in die Rahmen pipettiert und die Mikroarrays 60 min bei 37°C inkubiert. PTP1B und MPTPA wurden in HEPES-Puffer, PTP μ , PTP-BL, PTPSL (EX und KIM) sowie PRL-3 in TETBS-Puffer + 1 mM DTT verdünnt. Die Mikroarrays wurden mit TETBS gewaschen und mit einer 50 nM Lösung des anti-Phosphotyrosin-Biotin-Streptavidin-Cy5-Konjugats 45 min behandelt. Danach wurden sie wieder mit TETBS gewaschen und ausgelesen.

Malachitgrün-Assay

Herstellung der Malachitgrün-enthaltenden Nachweis-Lösung

Es wurden 350 mg (0.38 mmol) Malachitgrün, 3.2 g (2.59 mmol) Ammoniummolybdat und 45 ml 33%ige HCl-Lösung in ein Gefäß gegeben und das Volumen auf 150 ml mit H₂O aufgefüllt. Bei diesem Gefäß wurde darauf geachtet, dass es vorher nicht mit Phosphat-haltigen Lösungen oder Salzen wie z.B. durch Waschmittel in Berührung gekommen war. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und daraufhin zweimal gefiltert. Die erhaltene orangene Lösung wurde in einem Lichtgeschützten, Phosphat-freien Gefäß aufbewahrt.

Ermittlung der Parameter Substratkonzentration, Zeit und Phosphatasekonzentration

In eine 96-well Mikrotiterplatte wurde in well A1-A12 eine hochkonzentrierte Phosphatase-Lösung vorgelegt und in den darauf folgenden wells B1-B12 bis F1-F12 wurde sie jeweils 1:1 verdünnt, so dass sieben verschiedene Phosphatasekonzentrationen vorlagen. PTP1B und MPTPA wurden in HEPES-Puffer, PTP μ , PTP-BL sowie PTPSL (EX und KIM) in TETBS-Puffer + 1 mM DTT und PRL-3 wurde in TETBS-Puffer + 6 mM DTT verdünnt. In die wells G1-G12 wurde die verwendete Pufferlösung zur Negativkontrolle pipettiert. In eine weitere Mikrotiterplatte wurde in die wells A1-H1 ein für diese Phosphatase entsprechendes, aus den

vorhergehenden Mikroarray-Experimenten ermitteltes Substrat in einer Konzentration von 200 mM vorgelegt. In den wells A2-H2 bis A12-H12 wurde die Substratlösung 1:1 herunter verdünnt, so dass ein Gradient mit zwölf verschiedenen Konzentrationen erhalten wurde. In eine dritte Mikrotiterplatte wurde komplett Malachitgrün-Lösung hinein pipettiert.

Mittels des Pipettier-Roboters wurden die Enzym- und die Substratlösungen in Quadrupletts in eine 384-well Mikrotiterplatte bei RT zusammen mit einem Reaktionsvolumen von 8 μ l pro well pipettiert, und nach Inkubationszeiten von 3, 5, 20 und 60 min wurde jeweils zu einem well dieser Quadrupletts 4.8 μ l Malachitgrünlösung gegeben, was die enzymatische Reaktion durch die Anwesenheit von Säure stoppte. Es wurde mit der Malachitgrünlösung mindestens 15 min inkubiert, bevor die Ergebnisse im Plattenleser ermittelt wurden.

Zur Auswertung wurden die Werte, die durch Inkubation des Substrates mit der Pufferlösung in der Reihe G1-G12 erhalten worden waren, als Hintergrundsignal von denen, die durch Inkubation der Substrate mit Phosphatase-Lösung erhalten worden waren, abgezogen. So konnten aus 12 verschiedenen Substrat- und 7 verschiedenen Phosphatasekonzentrationen sowie vier Inkubationszeiten die geeignetsten Parameter für das Screenen der Substrate gewählt werden.

Screenen der Substrate gegen die Phosphatasen

PTP1B, MPTPA, PRL-3, PTP-SL: In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden 30 μ l der 48 verschiedenen Substrate in einer Konzentration pro Reihe in zwei Reihen pipettiert, so dass die Substrate in Dubletts untereinander vorlagen. Dann wurde 30 μ l der entsprechenden Phosphatase-Lösung in einer Konzentration in den wells A1-A12, C1-C12, E1-E12 und G1-G12 gegeben, wobei die verwendeten Puffer denen der Parameterbestimmung entsprachen. In die wells zwischen den vorher genannten wurde Pufferlösung zur Bestimmung des Hintergrundes für jedes einzelne Substrat vorgelegt, der bei der Auswertung von den Werten, die durch Inkubation der Substrate mit Phosphatase-Lösung erhalten worden waren, abgezogen wurde. Die Mikrotiterplatte wurde auf einer Vortex-Apparatur geschüttelt. Nach der unten angegebenen Inkubationszeit bei 25°C wurden 40 μ l Malachitgrünlösung hinzugegeben, geschüttelt und nach 15 min die Absorption bei 620 nm im Plattenleser gemessen.

Zur Kalibrierung wurde eine Konzentrationsreihe einer Na₂HPO₄-Lösung im entsprechenden Puffer, beginnend bei 500 μ M und dann 24mal 1:1 verdünnt, aufgenommen. Dazu wurden 60 μ l der Na₂HPO₄-Lösung mit 40 μ l Malachitgrünlösung in einer 96-well Mikrotiterplatte zusammen pipettiert und nach 15 min die Absorption bei 620 nm gemessen.

PTP μ : In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden 24 verschiedene Substrate in jeweils zwei Konzentrationen pro Reihe in zwei Reihen pipettiert, so dass die Substrate in Quadrupletts mit den zwei gleichen Konzentrationen untereinander vorlagen. In eine weitere Mikrotiterplatte

wurde PTP μ in TETBS + 1 mM DTT in einer Konzentration in den wells A1-A12, C1-C12, E1-E12 und G1-G12 gegeben. In die wells zwischen den vorher genannten wurde die Pufferlösung zur Bestimmung des Hintergrundes für jedes einzelne Substrat vorgelegt, der bei der Auswertung von den Werten, die durch Inkubation der Substrate mit Phosphatase lösung erhalten worden waren, abgezogen wurde. In eine dritte Mikrotiterplatte wurde komplett Malachitgrün-Lösung hinein pipettiert.

Mittels des Roboters wurden je 4 μ l der Enzym- und Substratlösungen in Quadrupletts in eine 384-well Mikrotiterplatte zusammen pipettiert, bei RT inkubiert, und nach vorher ermittelter Inkubationszeit wurden 4.8 μ l Malachitgrünlösung hinzu gegeben. Nach 15 min wurden die Ergebnisse im Plattenleser ermittelt. So wurde jeder zu einem Substrat gehörende Wert vierfach bestimmt.

Zur Kalibrierung wurde eine Konzentrationsreihe einer Na₂HPO₄-Lösung in TETBS-Puffer, beginnend bei 500 μ M und dann 24mal 1:1 verdünnt, aufgenommen. Dazu wurden 8 μ l der Na₂HPO₄-Lösung mit 4.8 μ l Malachitgrünlösung in eine 384-well Mikrotiterplatte mit dem Roboter zusammen pipettiert und nach 15 min die Absorption bei 620 nm gemessen.

Parameter (Endkonzentrationen):

PTP1B:

Substratkonzentrationen: 100 μ M.

Phosphatasekonzentration: 0.5 μ g/ml.

Inkubationszeit: 6 min.

PTP μ :

Substratkonzentrationen: 100 μ M und 50 μ M.

Phosphatasekonzentration: 10.8 μ g/ml.

Inkubationszeit: 10 min.

PTP-SL-EX:

Substratkonzentrationen: 100 μ M.

Phosphatasekonzentration: 19.1 μ g/ml.

Inkubationszeit: 10 min.

PTP-SL-KIM:

Substratkonzentrationen: 100 μ M.

Phosphatasekonzentration: 271 μ g/ml.

Inkubationszeit: 10 min.

MPTPA:

Substratkonzentrationen: 100 μM .
 Phosphatasekonzentration: 40 $\mu\text{g/ml}$.
 Inkubationszeit: 10 min.

PRL-3:

Substratkonzentrationen: 100 μM .
 Phosphatasekonzentration: 91.5 $\mu\text{g/ml}$.
 Inkubationszeit: 10 min.

Bestimmung von und K_m , k_{cat} und K_m/k_{cat} für PTP μ

In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden die Substrate **111**, **109** und **105** in jeweils vier Konzentrationen in einer 1:1 Verdünnungsreihe beginnend bei 500 μM in die wells A1-A6 bis F1-F6 pipettiert, so dass die gleichen Substratkonzentrationen untereinander vorlagen. Dabei wurden pro Substrat je zwei Reihen untereinander pipettiert. In eine weitere Mikrotiterplatte wurde PTP μ in einer Konzentration von 21.6 $\mu\text{g/ml}$ in den wells A1-A6, C1-C6 und E1-E6 gegeben. In die wells B1-B6, D1-D6 und F1-F6 wurde Pufferlösung zur Bestimmung des Hintergrundes vorgelegt, der bei der Auswertung von den Werten, die durch Inkubation der Substrate mit Phosphatase lösung erhalten worden waren, abgezogen wurde. In eine dritte Mikrotiterplatte wurde wiederum Malachitgrün-Lösung hinein pipettiert.

Mittels des Roboters wurden je 4 μl der Enzym- und Substratlösungen in Quadrupletts in eine 384-well Mikrotiterplatte zusammen pipettiert, bei RT inkubiert, und nach 4 min wurde Malachitgrünlösung hinzu gegeben. Nach 15 min wurden die Ergebnisse im Plattenleser ermittelt. So wurde jeder zu einem Substrat gehörende Wert vierfach bestimmt.

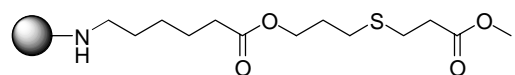
Die Ergebnisse wurden nach Abzug des Hintergrundes in einem Michaelis-Menten-Plot aufgetragen und die Auswertung mit Microsoft Excel vollzogen. Der Fehler wurde aus der linearen Regression mittels der mittleren Abweichung der Einzelwerte von der Regressionsgeraden ermittelt. Angegeben ist der für die jeweiligen Werte daraus prozentual sich ergebende Fehler. Zur Berechnung von k_{cat} wurde V_{max} , welches aus dem Michaelis-Menten-Plot mittels Kalibrierung erhalten wurde, durch die molare Konzentration der Phosphatase geteilt.

6.4 Versuche zu Kapitel 4.3

6.4.1 Versuche zu Kapitel 4.3.1

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition an ein Harz-gebundenes Olefin:

AAV 6.4.1



In einem mit innerer Kühlung versehenen Festphasenreaktor (Abbildung 52) wurde 1 Äq Harz 17 mit 3 ml abs. Lösungsmittel versetzt und für 20 min wurde Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert. Dann wurden 21 Äq 3-Mercaptopropionsäuremethylester und gegebenenfalls 21 Äq Additiv dazu gegeben und erneut für 10 min Argon durchgeblubbert. Danach wurde mit Hilfe der in der Kühlvorrichtung befindlichen UV-Lampe die Mischung belichtet während als Ersatz für das Schütteln weiterhin Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz mit DCM (2x), DMF mit wenig H₂O (1x), DMF (1x) und DCM (3x) gewaschen.

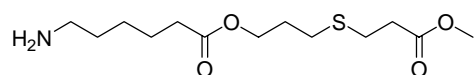


Abbildung 52: Festphasenreaktor mit Kühlvorrichtung und UV-Lampe.

Abspaltung vom Harz: AAV 6.4.2

Das Harz wurde dreimal 10 min mit je 2 ml 5% TFA in DCM behandelt, dann zweimal mit DCM gewaschen und die gesammelte Lösung i. Vak. konzentriert. Der Rest wurde 24 h im HV getrocknet.

(6-Aminocapronsäure)-[3-(3-Propionsäuremethylester)-mercaptopropyl]ester (138)



Die Verbindung wurde nach AAV 6.4.1 und AAV 6.4.2 hergestellt.

Lösungsmittel	Belichtungsdauer	Additiv	Umsatz (¹ H-NMR)
abs. MeOH	3 h	-	44%
abs. DMF	1 h	-	56%
abs. DMF	2 h	-	91%
abs. DMF	3 h	-	100%

abs. DMF	2 h	Ethylendiamin	12%
abs. DMF	3 h	5-Bromvaleriansäure	90%

Gelbliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 4.18 (t, ^3J = 6.3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.69 (s, 3H, CH_3), 2.92 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)}$), 2.78 (m, ^3J = 7.5 Hz, 2H, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)}$), 2.66-2.60 (m, 4H, 2 CH_2), 2.39 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 1.95-1.88 (m, 2H, CH_2), 1.70-1.63 (m, 4H, 2 CH_2), 1.46-1.40 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ = 175.1, 174.2 (2 C=O), 64.1 (O-CH_2), 52.2 (CH_3), 40.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 35.5, 34.6, 29.7, 29.6, 29.1, 28.2, 27.8, 25.4 (8 CH_2).

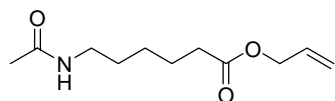
$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$ (291.41).

FAB-HR: ber.: 292.1583 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 291.1583 $[\text{M}]^+$

gef.: 292.1580 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 292.1510 $[\text{M}]^+$

Es wurden keine Nebenprodukte beobachtet. Die nach Abspaltung isolierte Substanzmenge würde jeweils einer quantitativen Ausbeute entsprechen.

6-Acetylamidocapronsäureallylester (142)



Eine Lösung von 2.0 g (5.83 mmol) 6-Aminocapronsäureallylester-

Toluolsulfonat (**16**) in 175 ml DCM wurde unter Eiskühlung nacheinander mit 3.23 ml (23.3 mmol) TEA und 1.66 ml (23.3 mmol) Acetylchlorid versetzt. Die Lösung wurde für 24 h gerührt, wobei sie sich auf RT erwärmte. Dann wurde sie i. Vak. bis auf ca. 50 ml konzentriert und auf 50 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, dreimal mit 1 M KHSO_4 -Lösung und einmal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und i. Vak. konzentriert. Säulenchromatographische Aufreinigung (Laufmittel: EA) lieferte ein gelbes viskoses Öl.

Ausbeute: 906 mg (4.25 mmol), 73%.

R_f = 0.42 (EA).

HPLC (C4): t_r = 5.85 min (Standardgradient).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 5.98-5.88 (m, 1-H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.29 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.20 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.57 (d, ^3J = 5.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 3.14 (t, ^3J = 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.37 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 1.93 (s, 3H, CH_3), 1.62 (qu, ^3J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$), 1.52 (qu, ^3J = 7.3 Hz, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.39-1.33 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2$).

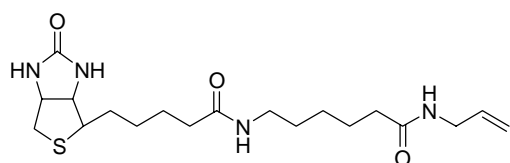
^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 175.7, 174.0$ (2 C=O), 134.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 119.0 ($\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 66.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 41.1 ($\text{C}\text{H}_2-\text{N}$), 35.7, 30.8, 28.3, 26.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}=\text{O}$), 23.4 (CH_3).

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ (213.14).

FAB-HR: ber.: 236.1263 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 236.1268 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Biotin-6-amidocaprinsäureallylamid (143)



Eine Lösung von 50 mg (0.14 mmol) Biotin-6-amidocaprinsäure in 3 ml abs. DMF wurde hergestellt, indem die durch Zugabe erhaltene Suspension mit einem Heißluftfön erhitzt wurde und,

nachdem sich alles gelöst hatte, wieder auf rt abgekühlt wurde. Dann wurden 30 mg (0.15 mmol) EDC und 24 mg (0.15 mmol) HOBt zugegeben und 1 h gerührt. Danach wurden 23 μl (0.3 mmol) Allylamin hinzugefügt und 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der Rest in wenig MeOH aufgenommen und mit viel Et_2O wurde das Produkt ausgefällt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Gräulicher Feststoff.

Ausbeute: 49 mg (0.12 mmol), 86%.

Schmp.: 134°C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.0^\circ$ ($c = 0.6$, DMSO).

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 7.92-7.81$ (br, 1H, Amid-NH), 7.74-7.67 (br, 1H, Amid-NH), 6.38 (s, 1H, Biotin-NH), 6.32 (s, 1H, Biotin-NH), 5.82-5.68 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 5.16-4.96 (m, 2H, $\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.28-4.23 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}\text{H}_2-\text{S}$), 4.10-4.05 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}\text{H}-\text{S}$), 3.81-3.75 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_a-\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.65-3.60 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}_b-\text{C}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.08-3.01 (m, 1H, S-CH), 3.01-2.92 (m, 2H, Amid-NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.77 (dd, $^2\text{J} = 5.1$ Hz, $^3\text{J} = 12.6$ Hz, 1H, S-CHa), 2.53 (d, $^3\text{J} = 12.6$ Hz, 1H, S-CHb), 2.14 (t, $^3\text{J} = 7.3$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}\text{H}$), 2.06-1.96 (m, 3H, $\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$, CH_2), 1.49-1.15 (m, 12H, 6 CH_2).

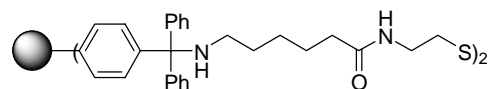
$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ (396.22).

FAB-HR: ber.: 397.2273 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 397.2261 $[\text{M} + \text{H}]^+$

***N*-Trityl-Harz-6-Aminocaprone-*N*'-(3-mercaptoethyl)-amid^[184]**

Herstellung des Disulfids (140)



Es wurden 0.11 mmol *N*-Trityl-Harz-6-Aminocaprone-**18** 10 min in 3 ml DCM gequollen. Dann wurden 211 mg (1.10 mmol) EDC, 169 mg (1.10 mmol) HOBt und 190 μ l (1.10 mmol) DIPEA in 3 ml DCM gelöst und zum gequollenen Harz gegeben. Der Ansatz wurde 1.5 h geschüttelt. Anschließend wurden 124 mg (0.5 mmol) Cystamindihydrochlorid, gelöst in 2 ml DMF, 190 μ l (1.10 mmol) DIPEA sowie 13 mg (0.11 mmol) DMAP zugegeben und der Ansatz 22.5 h geschüttelt. Dann wurde die Lösung abgesaugt und das Harz nacheinander mit je 5 ml DCM (2x), DMF mit wenig H₂O (1x), DMF (1x) sowie DCM (2x) gewaschen. Das Harz wurde mit 4 ml DCM, 174 μ l DIPEA und 95 μ l Ac₂O für 4 h behandelt, dann wurde die Lösung abgesaugt, das Harz nacheinander mit je 5 ml DCM (2x), DMF mit wenig H₂O (1x), DMF (1x) sowie DCM (2x) gewaschen und im HV getrocknet. Zur Reaktionsüberprüfung wurden 20 mg Harz entnommen und das Produkt nach AAV 6.4.2 vom Harz abgespalten.

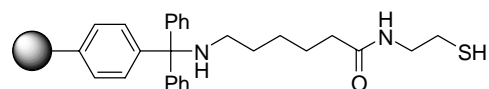
Brauner Sirup.

C₁₆H₃₄N₄O₂S₂ (378.21).

FAB-LR: ber.: 401.20 [M + Na]⁺

gef.: 401.48 [M + Na]⁺

Reduktion zum Thiol (141)



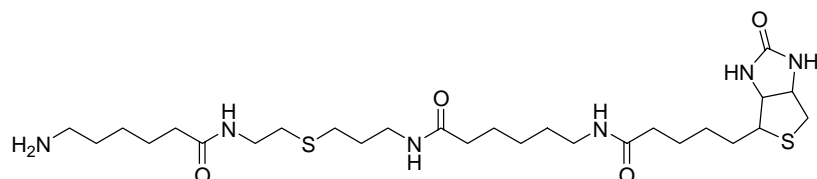
Zu dem Harz-gebundenem Disulfid (ca. 0.11 mmol) wurden unter Argon 5 ml abs. DCM gegeben. Nach 10 min wurden 136 mg (0.88 mmol) DTT und 60 μ l (0.44 mmol) TEA in 2 ml abs. DCM hinzugefügt und der Ansatz 4 h geschüttelt. Die Lösung wurde abgesaugt, das Harz nacheinander mit je 5 ml DCM (2x), DMF mit wenig H₂O (1x), DMF (1x) sowie DCM (2x) gewaschen und im HV getrocknet. Alle Lösungsmittel zum Waschen waren vorher durch drei Vakuum-Argon-Zyklen an der Schlenk-Linie entgast worden. Das Harz wurde unter Argon gelagert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition an das Harz-gebundene Mercaptan: AAV 6.4.3

Mercapto-funktionalisiertes Harz wurde in einem mit innerer Kühlung versehenen Festphasenreaktor (Abbildung 52) mit abs. Lösungsmittel versetzt und für 10 min wurde Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert. Dann wurde die entsprechende Verbindung dazu

gegeben und mit Hilfe der in der Kühlvorrichtung befindlichen UV-Lampe die Mischung belichtet während weiterhin als Ersatz für Schütteln Argon durch die Reaktionsmischung geblubbert wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt, das Harz mit DCM (2x), DMF (2x) und DCM (2x) gewaschen.

S-[(6-Aminocapronsäure)-ethylenamido]-S-[3-(biotin-6-amidocapronsäure)azapropyl]-thioether (145)



Die Verbindung wurde nach AAV 6.4.3 und 6.4.2 hergestellt.

Bedingungen: 5 mg (0.006 mmol) Mercapto-funktionalisiertes Harz;
 22 mg (0.055 mmol, 10 Äq) Biotin-6-amidocapronsäureallylamid;
 1.5 ml abs. DMF;
 Belichtungszeit: 3 h.

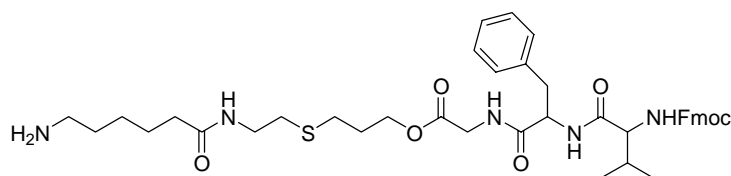
Das Produkt ist laut HPLC-Spur sowie ESI zum Großteil entstanden. Wegen der geringen Menge konnte keine Bestimmung des Umsatzes mittels ¹H-NMR vorgenommen werden. Die nach Abspaltung isolierte Substanzmenge wurde wegen DMF-Verunreinigung nicht bestimmt.

C₂₇H₅₀N₆O₄S₂ (586.33).

HPLC (C4): t_r = 9.56 min (Standardgradient).

ESI: ber.: 587.3 [M + H]⁺
 gef.: 587.5 [M + H]⁺

S-[(6-Aminocapronsäure)-ethylenamido]-S-[3-(N-Fmoc-Val-Phe-Gly)oxypropyl]-thioether (144)



Die Verbindung wurde nach AAV 6.4.3 und 6.4.2 hergestellt.

Bedingungen: 5 mg (0.006 mmol) Mercapto-funktionalisiertes Harz;
 8.6 mg (0.015 mmol) FmocNH-Val-Phe-Gly-OAll;
 1 ml abs. DMF;
 Belichtungszeit: 3 h.

Isolierte Substanzmenge: 1.3 mg ≈ 41% Produkt (bei 100% Umsatz, Grundlage theor. Beladung).

Das Produkt ist laut FAB-HR sowie ESI zum Großteil entstanden. Wegen der geringen Menge konnte keine Bestimmung des Umsatzes mittels $^1\text{H-NMR}$ vorgenommen werden.

$\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ (773.38).

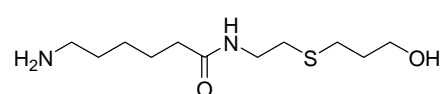
ESI: ber.: 774.39 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 774.47 $[\text{M} + \text{H}]^+$

FAB-HR: ber.: 774.3900 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 774.3903 $[\text{M} + \text{H}]^+$

***S*]-[(6-Aminocapronsäure)-ethylenamido]-*S*-(3-hydroxypropyl)-thioether (147)**



Die Verbindung wurde nach AAV 6.4.3 und 6.4.2 hergestellt.

Bedingungen: 15 mg (0.02 mmol) Mercapto-funktionalisiertes Harz;

10.9 μl (0.16 mmol) Allylalkohol;

16.2 μl (0.16 mmol) Cyclohexen (zur Konkurrenzreaktion)

1 ml abs. DMF;

Belichtungszeit: 2 h.

Das Produkt ist laut HPLC-Spur sowie ESI zum Großteil, der Cyclohexanthioether als Nebenprodukt in Spuren entstanden. Wegen der geringen Menge konnte keine Bestimmung des Umsatzes mittels $^1\text{H-NMR}$ vorgenommen werden. Die nach Abspaltung isolierte Substanzmenge wurde wegen DMF-Verunreinigung nicht bestimmt.

$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (248.16).

HPLC (C4): $t_r = 3.65$ min (1 min 10 % B, dann innerhalb von 20 min auf 100 % B).

ESI: ber.: 249.16 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 249.15 $[\text{M} + \text{H}]^+$

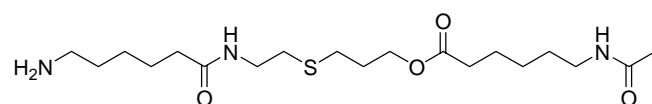
Cyclohexanthioether **149**: $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (272.19).

HPLC (C4): $t_r = 14.50$ min (1 min 10 % B, dann innerhalb von 20 min auf 100 % B).

ESI: ber.: 273.20 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 273.19 $[\text{M} + \text{H}]^+$

***S*]-[(6-Aminocapronsäure)-ethylenamido]-*S*-[3-(6-Acetylamidocapronsäure)oxypropyl]-thioether (148)**



Die Verbindung wurde nach AAV 6.4.3 und 6.4.2 hergestellt.

Bedingungen: 3 ml abs. DMF;

Belichtungszeit: 2 h.

Mercapto-Harz 141	6-Acetylamidocapron-säureallylester 142	Additiv	Ausbeute	Hauptprodukt : Nebenprodukt 149
46 mg (0.063 mmol)	128 mg (0.626 mmol)	-	19.5 mg (0.048 mmol), 77%	-
52 mg (0.068 mmol)	145 mg (0.680 mmol)	69 μ l (0.680 mmol) Cyclohexen	10.9 mg	2 : 1 (LCMS)

Gelbes Öl.

 HPLC (C4): $t_r = 5.31$ min (Standardgradient).

 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.15$ (t, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.37 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.95-2.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.63 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.57 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.30 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.20 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.96 (s, 3H, CH_3), 1.89 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.71-1.57 (m, 8H, 4 CH_2), 1.52-1.46 (m, 2H, CH_2), 1.41-1.29 (m, 4H, 2 CH_2).

 $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (403.25).

 FAB-HR: ber.: 404.2583 $[\text{M} + \text{H}]^+$

 gef.: 404.2589 $[\text{M} + \text{H}]^+$

 Cyclohexanthioether **149**: $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{OS}$ (272.19).

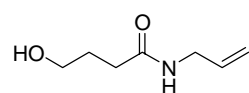
 HPLC (C4): $t_r = 7.52$ min (Standardgradient).

 ESI: ber.: 273.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$

 gef.: 273.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$

6.4.2 Versuche zu Kapitel 4.3.2

4-Hydroxybuttersäureallylamid (**153**)^[185]



In einem Rundkolben mit Rückflusskühler wurden unter Argon und Rühren 751 μ l (10.0 mmol) Allylamin und 1.15 ml (12.5 mmol) Butyrolacton auf 125°C erhitzt und für 18.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Nachdem die Mischung abgekühlt war, wurde eine DC-Kontrolle zur Umsatzverfolgung gemacht (5% MeOH in DCM). Da die Umsetzung noch nicht vollständig war, wurde weitere 24 h bei RT gerührt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (5% MeOH in DCM) lieferte ein farbloses viskoses Öl.

Ausbeute: 877 mg (56.1 mmol), 61%.

 $R_f = 0.43$ (5% MeOH in DCM).

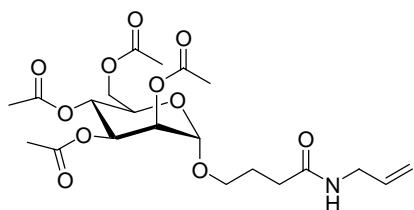
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.24$ (br, 1H, NH), 5.84-5.73 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.14 (d, $^3J = 17.1$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.09 (d, $^3J = 10.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 3.83 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 3.64 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.24 (br, 1H, OH), 2.35 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-(C=O)}$), 1.84 (qu, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 173.5 (C=O), 133.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 116.3 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 61.9 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 41.9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 33.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-(C=O)}$), 28.0 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$).

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (143.09).

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur berichteten überein.^[185]

***O*-[(2,3,4,6-Tetra-*O*'-acetyl)- α -D-mannopyranosyl]-*O*-4-oxybuttersäureallylamid (154)^[162]**



Es wurden 516 mg (1.26 mmol) Acetobromomannose **41** unter Argon in einem ausgeheizten Schlenkkolben zusammen mit 114 mg Drierite und 145 mg (1.02 mmol) Hydroxybuttersäureallylamid in abs. Toluol/Nitromethan = 1:1 gelöst. Dann wurden 271 mg (1.07 mmol) $\text{Hg}(\text{CN})_2$

hinzugefügt und die Mischung für 16 h gerührt. Die Mischung wurde durch Celite filtriert, i. Vak. eingengt, in Chloroform gelöst und wiederum eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit einem Laufmittelgradienten von Cy/EA = 1:2, Cy/EA = 1:4 bis purem EA lieferte einen leicht gelblichen Sirup.

Ausbeute: 85 mg (0.18 mmol), 18%.

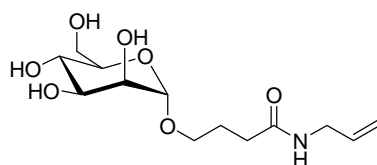
R_f = 0.32 (Cy/EA = 1:4).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.89-5.78 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 5.33-5.12 (m, 5H, $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Z-H2, Z-H3, Z-H4), 4.79 (d, ^3J = 1.8 Hz, 1H, Z-H1), 4.26 (dd, ^2J = 5.3 Hz, ^3J = 12.3 Hz, 1H, Z-O-CHa), 4.12-4.07 (dd, ^2J = 2.5 Hz, ^3J = 12.3 Hz, 1H, Z-O-CHb), 4.00-3.95 (m, 1H, Z-H5), 3.90 (t, ^3J = 5.7 Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 3.77 (m, 1H, Z-H6a), 3.50 (m, 1H, Z-H6b), 2.34 (t, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.25 (t, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 2.15, 2.09, 2.03, 1.99 (4s, je 3H, 4 (C=O) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 172.4, 170.8, 170.2, 170.1, 169.8 (5 C=O), 134.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 116.9 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 97.8 (Z-C1), 69.9, 69.5, 68.9, 67.8, 66.5 (5 Z-C), 62.9 (Z-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 42.5 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 33.2 ((C=O)- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$), 21.5, 21.4, 21.2, 21.1 (4 (C=O)- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{11}$ (473.19).

α -D-Mannopyranosyl-*O*-4-oxybuttersäureallylamid (152)^[163]



Zu einer Lösung von 72 mg (0.15 mmol) **154** in 1 ml abs. MeOH wurde unter Argon 1M NaOMe in MeOH solange hinzuge tropft, bis pH 9 erreicht war (insgesamt 0.15 ml). Der Umsatz der Reaktion wurde mittels DC (Laufmittel MeOH/EA

= 1:9) kontrolliert. Nach 1.5 h wurde Na^+ -Amberlite Ionenaustauscher hinzu gegeben, bis pH 7 erreicht war. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 40 mg (0.13 mmol), 87%.

Leicht gelblicher Sirup.

$R_f = 0.37$ (MeOH/EA = 1:9), lang gezogener Fleck.

$[\alpha]_D^{20} = +48.4^\circ$ (c = 0.5, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 5.89\text{-}5.78$ (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.17 (dd, $^2J = 1.6$ Hz, $^3J = 17.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.09 (dd, $^2J = 1.4$ Hz, $^3J = 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.73 (d, $^3J = 1.2$ Hz, 1H, Z-H1), 3.84-3.65 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, 3 Z-H, Z-O- CH_2), 3.60 (t, $^3J = 9.6$ Hz, 1H, Z-H), 3.53-3.41 (m, 2H, 2 Z-H), 2.33-2.28 (m, 2H, CH_2), 1.93-1.86 (m, 2H, CH_2).

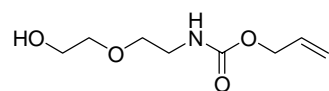
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 174.1$ (C=O), 134.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 115.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 100.4 (Z-C1), 73.5, 71.5, 71.1, 67.6, 66.7, 61.9 (5 Z-C, Z-O- CH_2), 41.7 (N- CH_2), 32.8, 25.9 (2 CH_2).

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_7$ (305.15).

FAB-HR: ber.: 306.1547 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 306.1542 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Ethoxy-[(N-allyloxycarbonyl)-aminoethyl]-ether (156)



Es wurden 1.94 ml (19.4 mmol) 2.2-Aminoethoxyethanol und 1.08 g (27.0 mmol) NaOH in 20 ml Dioxan und 10 ml Wasser gelöst.

Unter Eiskühlung und Rühren wurde innerhalb von 40 min 2.48 ml (23.3 mmol) Allylchloroformat in 20 ml Dioxan hinzugesetzt, wobei eine weiße Suspension entstand. Die Mischung wurde anschließend 21 h bei rt gerührt und dann wurde das Lösungsmittelgemisch i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde mit 100 ml Chloroform und 100 ml Wasser überschichtet und mit 1 M HCl-Lösung auf pH 5 gebracht und die Phasen nach Extraktion getrennt. Die wässrige Phase wurde drei weitere Male mit Chloroform extrahiert. Danach wurde per DC (DCM/MeOH/ $\text{NH}_3 = 10:8:0.5$) die wässrige Phase auf Produkt kontrolliert und weitere zwei Male extrahiert, bis kein Produkt mehr in der wässrigen Phase enthalten war. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Farblose Flüssigkeit.

Ausbeute: 4.05 g, (≈ 19.4 mmol), quantitativ.

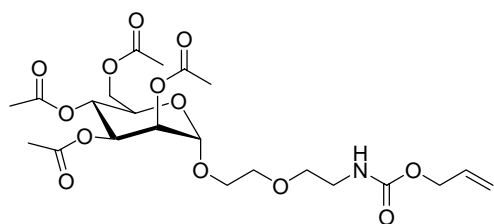
$R_f = 0.52$ (DCM/MeOH/ $\text{NH}_3 = 10:8:0.5$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.95\text{-}5.84$ (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.28 (dd, $^2J = 1.6$ Hz, $^3J = 17.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.18 (dd, $^2J = 1.4$ Hz, $^3J = 10.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.54 (d, $^3J = 5.7$, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 3.71 (t, $^3J = 4.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.57-3.53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.36 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.7$, (C=O), 133.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 117.9 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 72.5, 70.3 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 65.8, 61.9, 41.1 (3 CH_2).

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (189.10).

[*O*'-(2,3,4,6-Tetra-*O*'-acetyl- α -D-mannopyranosyl)ethoxy]-[2-(*N*-allyloxycarbonyl)-aminoethyl]ether (157)^[162]



Es wurden 500 mg (1.21 mmol) Acetobromomannose unter Argon in einem ausgeheizten Schlenkkolben zusammen mit 117 mg Drierite und 213 mg (1.13 mmol) *N*-Alloc-aminoethyl-2-ethoxyethanol **156** in abs. Toluol/Nitromethan = 1:1 gelöst. Dann wurden 260

mg (1.03 mmol) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ hinzu gegeben und die Mischung für 16.5 h gerührt. Die Mischung wurde durch Celite filtriert und i. Vak. eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit dem Laufmittel Cy/EA = 1:1 lieferte einen leicht gelblichen Sirup.

Ausbeute: 242 mg (0.47 mmol), 39%.

$R_f = 0.23$ (Cy/EA = 1:1).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.98\text{-}5.86$ (m, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 5.32-5.15 (m, 5H, $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Z-H2, Z-H3, Z-H4), 4.89 (d, $^3J = 1.6$ Hz, 1H, Z-H1), 4.52 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 4.26-4.21 (dd, $^2J = 5.5$ Hz, $^3J = 12.5$ Hz, 1H, Z-O-CHa), 4.13-4.07 (m, 2H, Z-O-CHb, Z-H5), 3.78 (m, 1H, Z-H6a), 3.72-3.65 (m, 3H, Z-H6b, CH_2), 3.55 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.37 (m, 2H, CH_2), 2.15, 2.09, 2.03, 1.99 (4s, je 3H, 4 (C=O) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

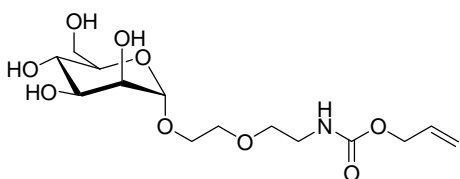
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.9$, 170.3, 170.1, 170.0 (4 C=O), 133.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 117.7 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 97.8 (Z-C1), 70.5, 70.2, 69.9, 69.2, 68.7, 67.3, 66.5, 65.7, 62.8 (5 Z-C, 4 CH_2), 41.1 (N- CH_2), 21.2, 21.1, 21.0, 20.9 (4 (C=O)- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}$ (519.20).

ESI-MS: ber.: 542.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 542.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

[(*O*'- α -D-mannopyranosyl)ethoxy]-[2-(*N*-allyloxycarbonyl)-aminoethyl]ether (155)^[163]



Zu einer Lösung von 226 mg (0.44 mmol) **157** in 2 ml abs. MeOH wurde unter Argon 1M NaOMe in MeOH solange hinzuge tropft, bis pH 10 erreicht war (insgesamt 0.7 ml). Der Umsatz der Reaktion wurde mittels DC

(Laufmittel MeOH/EA = 1:9) kontrolliert. Nach 1.5 h wurde Na^+ -Amberlite Ionenaustauscher hinzugefügt, bis pH 8 erreicht war. Die Mischung wurde filtriert und das Lösungsmittel

anschließend i. Vak. entfernt. Zur Entfernung restlicher Salze wurde in Ethanol suspendiert, filtriert und wieder eingengt.

Ausbeute: 142 mg (0.41 mmol), 93%.

Leicht gelblicher Sirup.

$R_f = 0.34$ (MeOH/EA = 1:9), lang gezogener Fleck.

$[\alpha]_D^{20} = +46.9^\circ$ (c = 1, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 5.98\text{-}5.86$ (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32-5.26 (dd, $^2J = 1.4$ Hz, $^3J = 17.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHa}$), 5.17 (d, $^3J = 10.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHb}$), 4.78 (s, 1H, Z-H1), 4.52 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 3.85-3.80 (m, 3H, Z-H, Z-O- CH_2), 3.73-3.68 (m, 2H, 2 Z-H), 3.65-3.52 (m, 7H, 3 Z-H, 2 CH_2), 3.28 (m, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 163.0$ (C=O), 133.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 116.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 100.5 (Z-C1), 73.4, 71.4, 70.9, 70.0, 69.8, 67.5, 66.6, 65.2, 61.8 (5 Z-C, 4 CH_2) 40.5 (N- CH_2).

$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_9$ (351.15).

FAB-HR: ber.: 374.1422 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

gef.: 374.1429 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

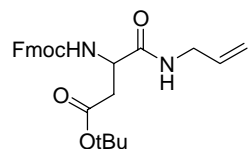
ber.: 352.1602 $[\text{M} + \text{H}]^+$

gef.: 352.1608 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc-Entschützung in Lösung: AAV 6.4.4

Zur Fmoc-Entschützung wurde die Substanz zu 5 ml DCM/Diethylamin = 4:1 gegeben und 4 h gerührt. Danach wurden 10 ml Toluol zugegeben, die Mischung i. Vak. eingengt und im HV getrocknet. Eine weitere Aufreinigung erfolgte nicht.

N-Fluorenmethyloxycarbonyl-asparaginsäure(*O*-*tert*-butyl)allylamid (160)



Unter Argon wurden 100 mg (0.24 mmol, 1 Äq) Fmoc-Asp(OtBu)-OH in einem Schlenkkolben in 2 ml abs. DCM/DMF = 1:1 gelöst, 37 mg (0.24 mmol, 1 Äq) HOBt, 45.2 μl DIC (0.29 mmol, 1.2 Äq) sowie 84.9 μl (0.49 mmol, 2 Äq) DIPEA wurden hinzu gegeben und alles 10 min gerührt. Dann wurden 18.3 μl (0.24 mmol, 1 Äq) Allylamin hinzugefügt und 24 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch i. Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Laufmittel 2% MeOH in DCM) aufgereinigt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 109 mg (0.24 mmol), 100%.

$R_f = 0.39$ (2% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.00 (s, 1H, NH), 7.75 (d, ^3J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.57 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.39 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.33-7.27 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 5.85-5.74 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.16 (d, ^3J = 17.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.11 (dd, ^2J = 1.4 Hz, ^3J = 10.4 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.72 (m, 1H, Asp- α -H), 4.43 (d, ^3J = 6.6, 2H, Fmoc- CH_2), 4.21 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.88-3.81 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 2.59 (dd, ^2J = 6.6 Hz, ^3J = 17.4 Hz, 2H, Asp- CH_2), 1.44 (s, 9H, tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 171.5, 170.5 (2 C=O), 162.8 (Fmoc-C=O), 143.9, 141.6 (4 Fmoc-ar-C), 133.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 128.0, 127.3, 125.2, 120.3 (8 Fmoc-ar-C), 116.6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 82.1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 67.4 (Fmoc- CH_2), 47.4, 42.2 (Asp- α -C, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 36.7, 31.7 (Asp- CH_2 , Fmoc-CH), 28.3 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$).

$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ (450.22).

Die Fmoc-Gruppe wurde nach AAV 6.4.4 abgespalten.

N-Fluorenmethyloxycarbonyl-glycyl-[asparaginsäure(*O*-tert-butyl)]allylamid (zu 158)

Zu einer Lösung von 107 mg (0.36 mmol, 1.1 Äq) Fmoc-Gly-OH in 2 ml DMF/DCM = 1:1 wurden nacheinander 55 mg (0.36 mmol, 1.1 Äq) HOBt, 127 μl (0.73 mmol, 2.2 Äq) DIPEA und 277 mg (0.36 mmol, 1.1 Äq) HBTU hinzu gegeben. Nach 10 min Rühren wurde die Mischung zu 0.33 mmol (1 Äq) Asp(OtBu)-allylamid gelöst in 1 ml DMF/DCM = 1:1 gegeben. Nach 20 h Rühren wurde die Mischung i. Vak. konzentriert und das Produkt säulenchromatographisch (Laufmittel 2% MeOH in DCM) aufgereinigt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 145 mg (0.29 mmol), 87%.

R_f = 0.31 (2% MeOH in DCM).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.01 (s, 1H, NH), 7.75 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.58 (d, ^3J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.40 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.31 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 5.82-5.71 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.14 (dd, ^2J = 1.4 Hz, ^3J = 17.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_a$), 5.05 (dd, ^2J = 1.4 Hz, ^3J = 10.4 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_b$), 4.77 (m, 1H, Asp- α -H), 4.44 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.22 (t, ^3J = 7.2 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.88 (d, ^3J = 4.7 Hz, 2H, Gly- CH_2), 3.83 (t, ^3J = 5.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 2.57 (dd, ^2J = 6.7 Hz, ^3J = 17.2 Hz, 2H, Asp- CH_2), 1.40 (s, 9H, tBu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 171.6, 170.1, 169.1 (3 $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 162.8 (NH-C=O), 143.9, 141.5 (4 Fmoc-ar-C), 133.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 127.9, 127.3, 125.2, 120.2 (8 Fmoc-ar-C), 116.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 82.2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 67.7 (Fmoc- CH_2), 49.5 (Gly- α -C), 47.3, 42.2 (Asp- α -C, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 36.8, 31.7 (Asp- CH_2 , Fmoc-CH), 28.2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$).

$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ (507.24).

Die Fmoc-Gruppe wurde nach AAV 6.4.4 abgespalten.

***N*-Fluorenmethyloxycarbonyl-[tyrosyl-*O*-(*N'*,*N''*-Phosphorsäurebisdimethylamido)]-glycyl-[asparaginsäure(*O*-*tert*-butyl)]allylamid (zu 158)**

Zu einer Lösung von 0.29 mmol (1 Äq) Gly-Asp(OtBu)-allylamid in 3 ml abs. DMF wurden nacheinander 169 mg (0.32 mmol, 1.1 Äq) Fmoc-pTyr[(NMe₂)₂]-OH, 48 mg (0.32 mmol, 1.1 Äq) HOBt, 110 µl (0.63 mmol, 2.2 Äq) DIPEA und 164 mg (0.32 mmol, 1.1 Äq) PyBOP hinzugefügt. Nach 12 h Rühren wurde die Mischung i. Vak. konzentriert und das Produkt säulenchromatographisch (Laufmittelgradient 3% MeOH in DCM, dann 6% MeOH in DCM) aufgereinigt.

Farbloser Feststoff.

Ausbeute: 205 mg (0.25 mmol), 86%.

R_f = 0.45 (4% MeOH in DCM).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.73 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.53 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.36 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.28 (m, 2H, 2 Fmoc-ar-H), 7.15-7.01 (m, 4H, 4 Tyr-ar-H), 5.83-5.73 (m, 1H, CH=CH₂), 5.14 (m, 1H, CH=CH_a), 5.04 (m, 1H, CH=CH_b), 4.75 (m, 1H, Asp-α-H), 4.44-4.38 (m, 3H, Fmoc-CH₂, pTyr-α-H), 4.17 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.94-3.72 (m, 4H, Gly-CH₂, CH₂-CH=CH₂), 3.10-2.94 (m, 2H, pTyr-CH₂), 2.71-2.62 (m, 14H, P[N(CH₃)₂]₂, Asp-CH₂), 1.40 (s, 9H, tBu).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = 17.2 (P[N(CH₃)₂]₂).

C₄₁H₅₃N₆O₉P (804.36).

Die Fmoc-Gruppe wurde nach AAV 6.4.4 abgespalten.

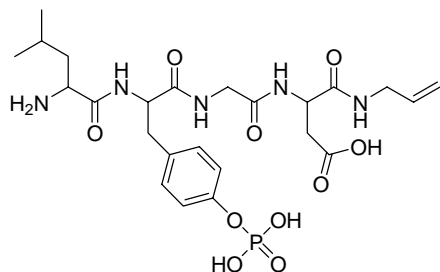
***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-leucyl-[tyrosyl-*O*-(*N'*,*N''*-Phosphorsäurebisdimethylamido)]-glycyl-[asparaginsäure(*O*-*tert*-butyl)]allylamid (zu 158)**

Zu einer Lösung von 79 mg (0.32 mmol, 1.3 Äq) Boc-Leu-OH in 2 ml DMF/DCM = 1:1 wurden nacheinander 48 mg (0.32 mmol, 1.3 Äq) HOBt, 110 µl (0.63 mmol, 2.6 Äq) DIPEA und 120 mg (0.32 mmol, 1.3 Äq) HBTU hinzu gegeben. Nach 10 min Rühren wurde die Mischung zu 0.25 mmol (1 Äq) pTyr[(NMe₂)₂]-Gly-Asp(OtBu)-allylamid gelöst in 1 ml DMF/DCM = 1:1 gegeben. Nach 12.5 h Rühren wurde die Mischung i. Vak. konzentriert und der Rest danach wieder in 20 ml DCM aufgenommen. Die Lösung wurde mit 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung und anschließend mit 20 ml 1 M HCl-Lösung extrahiert, die Phasen getrennt, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt.

C₃₇H₆₂N₇O₁₀P (795.43).

ESI-MS: ber.: 818.4 [M + Na]⁺
 gef.: 818.5 [M + Na]⁺, 662.7 [M - 2 tBu + Na]⁺

Leucyl-phosphotyrosyl-glycyl-asparaginsäureallylamid (158)



Das Rohprodukt wurde 3 h in 2 ml TFA/DCM/TES = 95:2.5:2.5 gerührt und dann wurden 2 ml Wasser hinzugefügt. Nach 13 h wurde dreimal mit je 20 ml Toluol koevaporiert, der Rest in 20 ml Wasser aufgenommen und mit 20 ml DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde i. Vak. konzentriert, das Rohprodukt in wenig MeOH gelöst

und durch Zugabe von viel Et₂O wieder ausgefällt. Abfiltrieren und im HV trocknen lieferte einen weißen Feststoff.

Rohausbeute: 90 mg.

Die Substanz wurde durch präparative HPLC (C18, Gradient: 3 min 5% B, dann innerhalb von 12 min auf 60 % B und nach weiteren 3 min auf 100%, die 2 min gehalten werden) aufgereinigt.

Ausbeute: Fraktion 1: 30 mg (0.05 mmol), 20% (sauberes Produkt);

Fraktion 2: 29 mg (gering verunreinigtes Produkt).

HPLC (C18): t_r = 4.94 min (Standardgradient).

[α]_D²⁰ = +8.65° (c = 1, H₂O).

Schmp.: 171°C.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.20 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Tyr-ar-H *meta* zum O), 7.13 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, Tyr-ar-H *ortho* zum O), 5.86-5.76 (m, 1H, CH=CH₂), 5.18 (m, 1H, CH=CH_a), 5.07 (m, 1H, CH=CH_b), 4.76 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, Asp-α-H), 4.47 (dd, ²J = 6.5 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1H, pTyr-α-H), 3.99 (d, ³J = 16.8 Hz, 1H, Gly-CH_a), 3.86 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, Leu-α-CH), 3.79 (d, ³J = 5.3 Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 3.66 (d, ³J = 16.8 Hz, 1H, Gly-CH_b), 3.15 (dd, ²J = 6.3 Hz, ³J = 14.1 Hz, 1H, pTyr-CH_a), 3.01 (dd, ²J = 9.0 Hz, ³J = 13.9 Hz, 1H, pTyr-CH_b), 2.88 (dd, ²J = 6.3 Hz, ³J = 16.8 Hz, 1H, Asp-CH_a), 2.77 (dd, ²J = 7.2 Hz, ³J = 16.8 Hz, 1H, Asp-CH_b), 1.66 (m, 3H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 0.97 (t, ³J = 5.6 Hz, 6H, CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 172.9, 172.5, 171.5, 170.2, 170.1 (5 C=O), 151.9 (pTyr-ar-C am O), 133.9 (CH=CH₂), 132.8 (pTyr-ar-C an CH₂), 130.1 (2 pTyr-ar-C *meta* zum O), 120.3 (2 pTyr-ar-C *ortho* zum O), 115.1 (CH=CH₂), 56.0, 51.7 (pTyr-α-C, Leu-α-C), 50.1 (Gly-α-C), 42.5, 41.7 (Asp-α-C, CH₂-CH=CH₂), 40.4 (Leu-CH₂), 36.0, 35.8 (Asp-CH₂, pTyr-CH₂), 24.1 (C-(CH₃)₂), 22.1, 20.6 (C-(CH₃)₂).

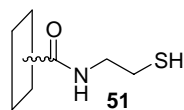
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ = -3.9.

$C_{24}H_{36}N_5O_{10}P$ (585.22).

FAB-HR: ber.: 586.2273 [M + H]⁺

gef.: 586.2253 [M + H]⁺

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Thiol-Funktionalisierung von Oberflächen: AAV 6.4.5



Fünf Carbonsäure-funktionalisierte Glas- oder Siliciumträger wurden auf einem Teflonhalter in ein hohes, schlankes Schlenk-Gefäß mit Rührmagneten (Abbildung 50, Kapitel 6.3.1) gegeben, wobei auf Sauberkeit des Gefäßes sowie der Oberflächen geachtet wurde. Wegen ihrer geringen Dicke mussten die Siliciumwafer zusätzlich mit Deckgläsern an ihrer unfunktionalisierbaren Seite im Teflonhalter festgesteckt werden. Das Schlenk-Gefäß wurde 10 min am HV angeschlossen und anschließend mit Argon gespült. Dann wurden 58 ml abs. DMF hinzugegeben, die Mischung in einem Eisbad auf 0°C gekühlt und danach mit 40 mg (2.5 mM, 0.5 mM pro Träger) DCC versetzt und bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Nach 15 min wurden 41 mg (3.0 mM Lösung, 0.6 mM pro Träger) Cystamindihydrochlorid, die in 1 ml abs. DMF und einem Tropfen H₂O zusammen mit 59.5 µl (6.0 mM Lösung, 1.2 mM pro Träger) DIPEA gelöst worden waren, hinzu gegeben. Das Gefäß, in dem diese Lösung angesetzt worden war, wurde mit 1 ml abs. DMF gespült und dieses dann zu den Trägern gegeben. Die Träger wurden mindestens 14 h in der Reaktionslösung gerührt, wobei die Mischung sich auf rt erwärmte. Die Reaktionslösung wurde mittels einer Spritze mit dicker, langer Kanüle entfernt, die Träger mit DMF im Gefäß gespült, das DMF wieder entfernt und anschließend wurden die Träger 30 min in 80 ml DMF/H₂O = 3:1 (v/v) wie beschrieben gerührt. Sowohl bei der Reaktion als auch bei dem Waschvorgang müssen alle Träger mit Flüssigkeit bedeckt sein. Die Flüssigkeit wurde wieder entfernt, die Träger nacheinander mit DMF und H₂O gespült und im Schlenk-Gefäß am HV getrocknet.

Nach mindestens 5 h Trocknung wurden unter Argon 60 ml abs. DMF, 230 mg (25 mM Lösung, 5 mM pro Träger) DTT und 104 µl (12.5 mM Lösung, 2.5 mM pro Träger) TEA zu den Trägern gegeben. Die Lösung wurde durch drei Zyklen Vakuum/Argon nochmals entgast und mindestens 16 h unter Argon gerührt. Die Reaktionslösung wurde entfernt, die Träger mit abs. DMF im Gefäß gespült, das DMF wieder entfernt und anschließend wurden die Träger 15 min in 60 ml abs. DMF gerührt. Das DMF wurde entfernt, die Träger mit abs. DCM gespült und 60 ml abs. DCM hinzugefügt. Alle Waschvorgänge wurden unter Argon durchgeführt. Nach 15 min Rühren wurde das DCM entfernt, die Träger mit abs. DCM nochmals gespült, im HV getrocknet und unter Argon aufbewahrt.

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Hand-Bespotten Thiol-funktionalisierter Glaträger:
AAV 6.4.6**

In ein weites Becherglas mit Teflonhaltern (zwei pro Glaträger) wurde DMF gegeben, bis die Teflonhalter bis zur Hälfte in DMF standen. Dann wurde das Becherglas mit einem größeren abgedeckt und durch eine kleine Öffnung Argon durch das DMF geblubbert (Abbildung 51, Kapitel 6.3.1). Für die Bespottung mit dem Handspotter wurden in eine 384 well Mikrotiterplatte pro Spot 40 µl der entsprechenden Lösung vorgelegt, die Nadeln des Handspotters dort eingetaucht und dann die Tröpfchen auf dem Glaträger abgesetzt. Bei der Bespottung durch Eppendorfpipetten wurden in einem gewünschten Muster 0.5 µl Tröpfchen abgesetzt. Das Durchblubbern mit Argon wurde beendet und das zweite, größere Becherglas entfernt. Direkt nach der Bespottung wurden die Glaträger auf jeweils zwei Teflonhalter in das Becherglas gelegt. Die UV-Lampe wurde ca. 10 cm über dem Becherglas mit den Glaträgern angebracht. Nach dem Belichten wurden die Glaträger mit DMF gespült, dann 30 min in DMF/H₂O = 2:1 in einer slide-Box geschüttelt, wieder mit DMF und H₂O gespült und im HV getrocknet.

6.4.3 Versuche zu Kapitel 4.3.3

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Photoimmobilisierung durch eine Maske oder ein Lasermikroskop auf Glaträgern: AAV 6.4.7

Auf einen Thiol-modifizierten Glaträger wurden drei 25 µl (1.0 x 1.0 cm, AB-0576) Rahmen der Firma ABGene, Surrey, UK, aufgebracht. Es wurde die entsprechenden Lösung im Dunkeln in die Rahmen gefüllt und anschließend wurde der Glaträger entweder in die Maske hineingelegt und von oben durch die geschlossene Maske mit der ca. 10 cm entfernten UV-Lampe oder auf einem Lasermikroskop durch ein Objektiv von unten belichtet. Danach wurde der Glaträger sofort intensiv mit DMF und H₂O gespült und am HV getrocknet.

Einstellungen der Laser-Belichtung:

Slow scan,

40er Objektiv extra long working distance,

Scanwiederholung: 100,

Größe der belichteten Quadrate: 512x512 pixel = 338.4 µm² (0.661 µm = 1 Pixel),

Laserpower: 100% bei 728 nm ≈ 150-200 mW (zwei Photonen-Anregung ergab theor. 364 nm).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zu Photolithografie-Experimenten auf Siliciumwafern: AAV 6.4.8

Auf Thiol-funktionalisierte Siliciumwafer wurden 400 µl der entsprechenden Lösung aufgegeben. Die Lösung wurde durch Zentrifugation gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Das Programm zur Zentrifugation lautete:

Zeit (sec)	Geschwindigkeit (rpm)	Beschleunigung (acc. index)
5	500	12
40	1000	3
20	0	1

Nach der Auftragung wurde der Siliciumwafer 10 min unter Stickstoffstrom im Spin-Coater zum Trocknen gelassen. Dann wurde mit variabler Dauer belichtet. Nach der Belichtung wurde mit dem gleichen Zentrifugationsprogramm gewaschen:

Haptene		
Biotin	Phosphopeptid	STV
1. DMF	1. DMF	1. TETBS
2. MeOH	2. MeOH	2. H ₂ O
	3. TETBS	

Für jeden Waschschrift wurde das Zentrifugationsprogramm einmal durchlaufen. Anschließend wurden die Wafer weiter gewaschen:

- Biotin:
- je einmal mit DMF, H₂O und MeOH gespült,
 - in der slide-Box jeweils einmal 30 sec mit DMF/H₂O=1:1 und MeOH geschüttelt,
 - mit MeOH abgespült;

- Phosphopeptid:
- je einmal mit DMF, TETBS und MeOH gespült,
 - in der slide-Box jeweils einmal 30 sec mit DMF, TETBS sowie MeOH geschüttelt,
 - mit MeOH abgespült;

- Streptavidin:
- je einmal mit TETBS und H₂O gespült,
 - in der slide-Box jeweils einmal 30 sec mit TETBS und H₂O geschüttelt,
 - wieder je einmal mit TETBS und H₂O abgespült.

Nach dem Waschprozess wurden die Wafer an der Luft zum Trocknen stehengelassen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Reents, M. Wagner, S. Schlummer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *CemBioChem* **2005**, *6*, 86-94.
- [2] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottoni, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Ostermann, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, *117*, 699-711.
- [3] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Robert, J.D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, VCH, Weinheim, **1995**.
- [4] Z.-Y. Zhang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 416-423.
- [5] R. Breinbauer, M. Köhn, C. Peters in C. Schmuck, H. Wennemers (Hrsg.) *Bioorganic Chemistry II*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [6] A.S. Blawas, W.M. Reichert, *Biomaterials* **1998**, *19*, 595-609.
- [7] G. MacBeath, A.N. Koehler, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967-7968.
- [8] C.M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039-3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865-2869.
- [9] D.J. Lockhart, E.A. Winzeler, *Nature* **2000**, *405*, 827-836.
- [10] a) G. MacBeath, S.L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760-1763; b) H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamyor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R.A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, *293*, 2101-2105; c) H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 55-63; d) E. Phizicky, P.I.H. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **2003**, *422*, 208-215; e) J. Eppinger, D.P. Funeriu, M. Miyake, L. Denizot, J. Miyake, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3894-3898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3806-3810; f) G.Y. Jung, G. Stephanopoulos, *Science* **2004**, *304*, 428-431; g) K.T. Pilobello, L. Krishnamoorthy, D. Slawek, L.K. Mahal, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 985-989.
- [11] N. Ramachandran, E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter, J. LaBaer, *Science* **2004**, *305*, 86-90.
- [12] a) D. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017; b) T. Feizi, W. Chai, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 582-588.
- [13] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M.E. Huflejt, R. Alvarez, M.C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J.J. Skehel, I. van Die, D.R. Burton, I.A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J.C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17033-17038.
- [14] a) R. Breinbauer, I.R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002-3015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878-2890; b) S.L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964-1969; c) M.D. Burke, E.M. Berger, S.L. Schreiber, *Science* **2003**, *302*, 613-618.

- [15] a) K.S. Lam, M. Renil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 353-358; b) J. Khandurina, A. Guttman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 359-366.
- [16] M. Uttamchandani, D.P. Walsh, S.M. Kersonsky, X. Huang, S.Q. Yao, Y.-T. Chang, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 862-868.
- [17] D. Barnes-Seeman, S.B. Park, A.N. Koehler, S.L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2478-2481; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2376-2379.
- [18] A.N. Koehler, A.F. Shamji, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8420-8421.
- [19] N. Winssinger, S. Ficarro, P.G. Schultz, J.L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139-11144.
- [20] S.N. Bailey, D.M. Sabatini, B.R. Stockwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16144-16149.
- [21] F.G. Kuruvilla, A.F. Shamji, S.M. Sternson, P.J. Hergenrother, S.L. Schreiber, *Nature* **2002**, *416*, 653-657.
- [22] M.D. Disney, P.H. Seeberger, *Drug Discovery Today* **2004**, *3*, 151-158.
- [23] M.D. Disney, S. Magnet, J.S. Blanchard, P.H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1618-1620; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1591-1594.
- [24] B.T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [25] S. Park, M.-R. Lee, S.J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [26] M. Schutkowski, U. Reineke, U. Reimer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 513-521.
- [27] M. Schutkowski, U. Reimer, S. Panse, L. Dong, J.M. Lizcano, D.R. Alessi, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2725-2728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2671-2674.
- [28] M. Uttamchandani, E.W.S. Chan, G.Y.J. Chen, S.Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2997-3000.
- [29] S. Panse, L. Dong, A. Burian, R. Carus, M. Schutkowski, U. Reimer, J. Schneider-Mergener, *Mol. Diversity* **2004**, *8*, 291-299.
- [30] M.C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326-1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276-1289.
- [31] R. Benters, C.M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.
- [32] T.P. Sullivan, W.T.S. Huck, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 17-29.
- [33] H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reinecke, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2000**, *55*, 188-206.
- [34] a) J.B. Lamture, K.L. Beattie, B.E. Burke, M.D. Eggers, D.J. Ehrlich, R. Fowler, M.A. Hollis, B.B. Kosicki, R.K. Reich, S.R. Smith, R.S. Varma, M.E. Hogan, *Nucleic Acid Res.* **1994**, *22*, 2121-2125; b) M.D. Eggers, M.E. Hogan, R.K. Reich, J.B. Lamture, D.J. Ehrlich, M. Hollis, B.B. Rosicki, T. Powdrill, K.L. Beattie, S. Smith, *BioTechniques* **1994**, *17*, 516-525; c) W.G. Beattie, L. Meng, S.L. Turner, R.S. Varma, D.D. Dao, K.L. Beattie, *Mol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 213-225; d) Y.

- Belosludtsev, B. Iverson, S. Lemeshko, R. Eggers, R. Wiese, S. Lee, T. Powdrill, M. Hogan, *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 250-256; e) H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 40-45; f) H. Zhu, J.F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamyor, K.G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M.A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 283-289.
- [35] S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J.R. Havens, T.J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4793-4802.
- [36] a) N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 143-150; b) K.-B. Lee, S.-J. Park, C.A. Mirkin, J.C. Smith, M. Mrksich, *Science* **2002**, *295*, 1702-1705; c) G. Korbel, G. Lalic, M.D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 361-362; d) B. Joos, H. Kuster, R. Cone, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 96-101; e) Y. Fang, A.G. Frutos, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2394-2395.
- [37] M.B. Biskup, J.U. Müller, R. Weingart, R.R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.
- [38] N. Nakanishi, H. Muguruma, I. Karube, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1695-1700.
- [39] L.C. ShriverLake, B. Donner, R. Edelstein, K. Breslin, S.K. Bathia, F.S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1101-1106.
- [40] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5742-5745; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5584-5587.
- [41] a) B.B. Habb, M.J. Dunham, P.B. Brown, *Genome Biol.* **2000**, *1*, 1-22; b) M. Schena, D. Schalon, R.W. Davis, P.O. Brown, *Science* **1995**, *270*, 467-470; c) D.A. Lashkari, J.L. DeRisi, J.H. McCusker, A.F. Namath, C. Gentile, S.Y. Hwang, P.O. Brown, R.W. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13057-13062.
- [42] a) T.O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, S. Rupp, K. Solm, H. Hämmerle, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2641-2650; b) H. Ge, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e3; c) D. Wang, S. Liu, B.J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nature Biotech.* **2002**, *20*, 275-281.
- [43] a) P.N. Gilles, D.J. Wu, C.B. Foster, P.J. Dillon, S.J. Chanock, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 365-370; b) M.-L. Lesaichere, R.Y.P. Lue, G.Y.J. Chen, Q. Zhu, S.Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8768-8769; c) J.F. Mooney, A.J. Hunt, J.R. McIntosh, C.A. Liberko, D.M. Walba, C.T. Rogers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12287-12291; d) J. Yin, F. Liu, X. Li, C.T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754-7755.
- [44] a) N. Winssinger, J.L. Harris, B.J. Backes, P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3152-3155; b) R. Wacker, H. Schröder, C.M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281-287; c) R. Wacker, C.M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 453-459.
- [45] N. Winssinger, R. Wacker, persönliche Mitteilungen.

- [46] a) T. Strother, W. Cai, X. Zao, R.J. Hamers, L.M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205-1209; b) T. Strother, R.J. Hamers, L.M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3535-3541; c) T. Okamoto, T. Suzuki, N. Yamamoto, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 438-441; d) E.A. Smith, M.J. Wanat, Y. Cheng, S.V.P. Barreira, A.G. Frutos, R.M. Corn, *Langmuir* **2001**, *17*, 2502-2507; e) V. Benoit, A. Steel, M. Torres, Y.-Y. Yu, H. Yang, J. Cooper, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2412-2420; f) A. Steel, M. Torres, J. Hartwell, Y.-Y. Yu, N. Ting, G. Hoke, H. Yang in *Microarray Biochip Technology* (Ed.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, 87-118; g) S. Park, I. Shin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3312-3314; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180-3182; h) D.M. Ratner, E.W. Adams, J. Su, B.R. O'Keefe, M. Mrksich, P.H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379-383; i) B.T. Houseman, E.S. Gawalt, M. Mrksich, *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.
- [47] P.J. Hergenrother, K.M. Depew, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7849-7850.
- [48] J.R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 346-353.
- [49] a) Y.H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z.-J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson, M.T. Boyce-Jacino, *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 23-30.
- [50] a) B.T. Houseman, J.H. Huh, S.J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270-274; b) B.T. Houseman, M. Mrksich, *Trends Biotech.* **2002**, *20*, 279-281; c) G.M. Husar, D.J. Anziano, M. Leuck, D.P. Sebesta, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* **2001**, *20*, 559-566; d) H.A. Latham-Timmons, A. Wolter, J.S. Roach, R. Giare, M. Leuck, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* **2003**, *22*, 1495-1497.
- [51] a) C.F.W. Becker, C.L. Hunter, R.P. Seidel, S.B.H. Kent, R.S. Goody, M. Engelhard, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 243-252; b) H.-M. Chen, W.-C. Wang, S.-H. Chen, *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1237-1244; c) J.-M. Nam, S. W. Han, K.-B. Lee, X. Liu, M.A. Ratner, C.A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1266-1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1246-1249.
- [52] A. Hoff, T. André, T.E. Schäffer, G. Jung, K.-H. Wiesmüller, R. Brock, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1183-1191.
- [53] a) M.-L. Lesaichere, M. Uttamchandani, G.Y.J. Chen, S.Q. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2079-2083; b) J.A. Camarero, Y. Kwon, M.A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730-14731.
- [54] a) F. Fazio, M.C. Bryan, O. Blixt, J.C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402; b) J.K. Lee, Y.S. Chi, I.S. Choi, *Langmuir* **2004**, *20*, 3844-3847.
- [55] a) Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193; b) A.E. Speers, G.C. Adam, B.F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687; c) R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147-1149; d) V.O. Rodionov, V.V. Fokin, M.G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2250-2255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215; e) S. Punna, J. Kuzelka, Q. Wang, M.G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2255-2260; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2215-2220.

- [56] F. Tian, M.-L. Tsao, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15962-15963.
- [57] D. Drutschmann, Dissertation, Bremen, **2004**.
- [58] M. Lebl., *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1998**, *47*, 397-404.
- [59] M.C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473-488.
- [60] G.H. McGall, A.D. Barone, M. Diggelmann, S.P.A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5081-5090.
- [61] M.C. Pirrung, L. Fallon, G.H. McGall, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 241-246.
- [62] A.D. Barone, J.E. Beecher, P. Bury, C. Chen, T. Doede, J.A. Fidanza, G.H. McGall, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* **2001**, *20*, 525-531.
- [63] G. Wallraff, J. Labadie, P. Brock, T. Nguyen, T. Huynh, W. Hinsberg, G.H. McGall, *Chemtech* **1997**, 22-32.
- [64] S.P.A. Fodor, R.J. Leighton, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-776.
- [65] www.affymetrix.com
- [66] S. Venkatasubbarao, *Trends Biotech.* **2004**, *22*, 630-637.
- [67] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [68] R. Frank, H. Overwin, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *66*, 149-169.
- [69] A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *J. Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25-39.
- [70] A. Kramer, U. Reinecke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 319-327.
- [71] X. Espanel, S. Wälchli, T. Rückle, A. Harrenga, M. Huguenin-Reggiani, R. Hooft van Huijsduijnen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15162-15167.
- [72] R.C. Haddon, A.A. Lamola, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1874-1878.
- [73] N.A. Higgins, *Electron Power* **1985**, 761-763.
- [74] G. Wadhwa, *J. Sci. Ind. Res.* **1990**, *49*, 486-491.
- [75] W.S. Dillmore, M.N. Yousaf, M. Mrksich, *Langmuir* **2004**, *20*, 7223-7231.
- [76] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568-594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550-575.
- [77] S.K. Bhatia, L.C. Shriver-Lake, K.J. Prior, J.H. Georger, J.M. Calvert, R. Bredehorst and F.S. Ligler, *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 408-413.
- [78] D.J. Pritchard, H. Morgan, J.M. Cooper, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3605-3607.
- [79] M. Yan, S.X. Cai, M.N. Wybourne, J.F.W. Keana, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 814-816.
- [80] M.A. Holden, P.S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8074-8075.
- [81] a) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16314-16315; b) D.A. Nivens, D.W. Conrad, *Langmuir* **2002**, *18*, 499-504.

- [82] A. Revzin, P. Rajagopalan, A. W. Tilles, F. Berthiaume, M.L. Yarmush, M. Toner, *Langmuir* **2004**, *20*, 2999-3005.
- [83] I. Caelen, H. Gao, H. Sigrüst, *Langmuir* **2002**, *18*, 2463-2467.
- [84] E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrüst, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H.J. Mathieu, *Langmuir* **1996**, *12*, 1997-2006.
- [85] S. Monsathaporn, F. Effenberger, *Langmuir* **2004**, *20*, 10375-10378.
- [86] D. Ryan, B.A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S.K. Sia, J. Su, M. Mrksich, G.M. Whitesides, *Langmuir* **2004**, *20*, 9080-9088.
- [87] E. Saxon, C.R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [88] H.C. Hang, C.R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727-736.
- [89] Y. Kho, S.C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S.W. Kwon, J. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12479-12484.
- [90] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168-3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
- [91] F.L. Lin, H.M. Hoyt, H. Van Halbeek, R.G. Bergman, C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [92] a) B.L. Nilsson, L.L. Kiessling, R.T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941; b) B.L. Nilsson, L.L. Kiessling, R.T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12; c) M.B. Soellner, B.L. Nilsson, R.T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993-4996.
- [93] E. Saxon, J.I. Armstrong, C.R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [94] E. Saxon, S.J. Luchansky, H.C. Hang, C. Yu, S.C. Lee, C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902.
- [95] J.A. Prescher, D.H. Dube, C.R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.
- [96] H. Ovaas, P.F. van Swieten, B.M. Kessler, M.A. Leeuwenburgh, E. Fiebigler, A.M.C.H. van den Nieuwendijk, P.J. Galaray, G.A. van der Marel, H.L. Ploegh, H.S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3754-3757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626-3629.
- [97] K.L. Kiick, E. Saxon, D.A. Tirrell, C.R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19-24.
- [98] B.L. Nilsson, R.J. Hondal, M.B. Soellner, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268-5269.
- [99] C.C.-Y. Wang, T.S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 697-701.
- [100] H.C. Hang, C. Yu, M.R. Pratt, C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6-7.
- [101] O. David, W.J.N. Meester, H. Bieräugel, H.E. Schoemaker, H. Hiemstra, J.H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4509-4511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373-4375.

- [102] P.N.M. Botman, O. David, A. Amore, J. Dinkelaar, M.T. Vlaar, K. Goubitz, J. Fraanje, H. Schenk, H. Hiemstra, J.H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3553-3555; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3471-3473.
- [103] A. Bianchi, A. Russo, A. Bernardi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 381-386.
- [104] T. Posner, *Chem. Ber.* **1905**, *38*, 646.
- [105] W.E. Vaughan, F.F. Rust, *J. Org. Chem.* **1942**, *7*, 472-476.
- [106] C.S. Marvel, R.R. Chambers, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 993-998.
- [107] D.A. Fulton, J.F. Stoddart, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1113-1116.
- [108] M. Köhn, J.M. Benito, C. Ortiz Mellet, T. K. Lindhorst, J.M. García Fernández, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 771-777.
- [109] K.E. Koenig, United States Patent 5,973,200, Oktober 26, **1999**.
- [110] Q.B. Broxtermann, B. Kaptein, J. Kamphuis, H.E. Shoemaker, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6286-6294.
- [111] B.R. Stranix, J.P. Gao, R. Barghie, J. Salha, G.D. Darling, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8987-8993.
- [112] P. Brunet, E. Demers, T. Maris, G.D. Enright, J.D. Wuest, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5461-5464; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5303-5306.
- [113] C. Baleizao, A. Corma, H. García, A. Leyva, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 439-446.
- [114] E. Klemm, U. Holfter, S. Sensfuß, H.-J. Flammersheim, *Angew. Makromol. Chem.* **1987**, *150*, 161-169.
- [115] L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem. und Angew. Chem. Int. Ed.*, online publiziert am 18. Mai **2005**.
- [116] T. Hunter, B.M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 1311-1315.
- [117] Y. Wang, J. E. Dixon, Z.-Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 1624-1627.
- [118] N.K. Tonks, K.A. Walsh, E.H. Fischer, H. Charbonneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 7182-7186.
- [119] A.R. Aricescu, T.A. Fulga, V. Cismasiu, R.S. Goody, S.E. Szedlacsek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 319-327.
- [120] A.R. Schievella, C.A. Jost, R.L. Erikson, B.G. Nell, J. Chernoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 2735-2739.
- [121] S. Broyles, J.E. Dixon, K.L. Guan, *Nature*, **1991**, *350*, 359-361.
- [122] C.D. Diltz, E.H. Fischer, N.K. Tonks, *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 6722-6730.
- [123] B.J. Goldstein, *Receptor* **1993**, *3*, 1-15.
- [124] F. Ahmad, P.M. Li, J. Meyerovitch, B.J. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20503-20508.
- [125] K.A. Kenner, E. Anyanwu, J.M. Olefsky, J. Kusari, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19810-19816.
- [126] O. Ukkola, M. Santaniemi, *J. Internal Med.* **2002**, *251*, 467-475.

- [127] L.D. Klaman, O. Boss, O.D. Peroni, J.K. Kim, J.L. Martino, J.M. Zabolotny, N. Moghal, M. Lubkin, Y.B. Kim, A.H. Sharpe, A. Stricker-Krongrad, G.I. Shulman, B.G. Neel, B.B. Kahn, *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 5479-5489.
- [128] M. Elchebly, P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A.L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C.C. Chan, C. Ramachandran, M.J. Gresser, M.L. Tremblay, B.P. Kennedy, *Science* **1999**, *283*, 1544-1548.
- [129] R. Hooft van Huijsduijnen, W.H.B. Sauer, A. Bombrun, D. Swinnen, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4142-4146.
- [130] Struktur: a) Z. Jia, D. Barford, A.J. Flint, N.K. Tonks, *Science* **1995**, *268*, 1754-1758; b) A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers, N.K. Tonks, D. Barford, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1401-1412; c) C. Wiesmann, K.J. Barr, J. Kung, J. Zhu, D.A. Erlanson, W. Shen, B.J. Fahr, M. Zhong, L. Taylor, M. Randal, R.S. McDowell, S.K. Hansen, *Nature Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730-737; Y.A. Puius, Y. Zhao, M. Sullivan, D.S. Lawrence, S.C. Almo, Z.-Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 13420-13425.
- [131] Substratspezifität: a) S.W. Vetter, Y.-F. Keng, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2265-2268; b) G. Xu, C. Arregui, J. Lilien, J. Balsamo, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49989-49997; c) X. Espanel, R. Hooft van Huijsduijnen, *Methods* **2005**, *35*, 64-72; d) X. Espanel, M. Huguenin-Reggiani, R. Hooft van Huijsduijnen, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2326-2334; e) [124a].
- [132] Inhibitoren: a) J. Park, D. Pei, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15014-15021; b) G. Liu, Z. Xin, H. Liang, C. Abad-Zapatero, P.J. Hajduk, D.A. Janowick, B.G. Szczepankiewicz, Z. Pei, C.W. Hutchins, S.J. Ballaron, M.A. Stashko, T.H. Lubben, C.E. Berg, C.M. Rondinone, J.M. Trevillyan, M.R. Jirousek, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3437-3440; c) M. Taing, Y.-F. Keng, K. Shen, L. Wu, D.S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3793-3803; d) S.D. Taylor, C.C. Kotoris, A.N. Dinaut, Q. Wang, C. Ramachandran, Z. Huang, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1457-1468; e) C. Liljebris, S.D. Larsen, D. Ogg, B.J. Palazuk, J.E. Bleasdale, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1785-1798; f) A. Fürstner, K. Reinecke, H. Prinz, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1575-1579.
- [133] S.E. Ensslen, S.M. Brady-Kalnay, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *25*, 558-571.
- [134] www.sitter.de: Lexikon der Kybernetik
- [135] A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A.K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh, A. Ullrich, *J. Bact.*, **2000**, *182*, 5425-5432.
- [136] S.C. Cowley, R. Babakaiff, Y. Av-Gay, *Res. Microbiol.* **2002**, *153*, 233-241.
- [137] K. Sharma, P. Chopra, Y. Singh, *Expert Opin. Ther. Targets* **2004**, *8*, 79-93.
- [138] K.-A. Kim, J.-S. Song, J. Jee, M.R. Sheen, C. Lee, T.G. Lee, S. Ro, J.M. Cho, W. Lee, T. Yamazaki, Y.H. Jeon, C. Cheong, *FEBS Lett.* **2004**, *565*, 181-187.

- [139] G. Kozlov, J. Cheng, E. Ziomek, D. Banville, K. Gehring, I. Ekiel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11882-11889.
- [140] Q. Zeng, J.-M. Dong, K. Guo, J. Li, H.-X. Tan, V. Koh, C.J. Pallen, E. Manser, W. Hong, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2716-2722.
- [141] A. Bardelli, S. Saha, J.A. Sager, K.E. Romans, B. Xin, S.D. Markowitz, C. Lengauer, V.E. Velculescu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5607-5615.
- [142] S. Saha, A. Bardelli, P. Buckhaults, V.E. Velculescu, C. Rago, B. St. Croix, K.E. Romans, M.A. Choti, C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, *Science* **2001**, *294*, 1343-1346.
- [143] H. Kato, S. Semba, U.A. Miskad, Y. Seo, M. Kasuga, H. Yokozaki, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7318-7328.
- [144] S.E. Szedlascek, A.R. Aricescu, T.A. Fulga, L. Renault, A.J. Scheidig, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 557-568.
- [145] M. Buschbeck, J. Eickhoff, M.N. Sommer, A. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 29503-29509.
- [146] a) K.W. Harder, P. Owen, L.K.H. Wong, R. Aebersold, I. Clark-Lewis, F.R. Jirik, *Biochem. J.* **1994**, *298*, 395-401; b) H. Cho, S.E. Ramer, M. Itoh, D.G. Winkler, E. Kitas, W. Bannwarth, P. Burn, H. Saito, C.T. Walsh, *Biochem.* **1991**, *30*, 6210-6216.
- [147] J. Montalibet, K.I. Skorey, B.P. Kennedy, *Methods* **2005**, *35*, 2-8.
- [148] C. Pasquali, M.-L. Curchod, S. Wälchli, X. Espanel, M. Guerrier, F. Arigoni, G. Strous, R. Hooft van Huijsduijnen, *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 2228-2239.
- [149] www.jpt.com/phosphatase.
- [150] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010-6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830-5834.
- [151] G.W. Kenner, J.R. McDermott, R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 636-637.
- [152] B.J. Backes, A.A. Vergilio, J.A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055-3056.
- [153] P. Heidler, A. Link, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 585-599.
- [154] C. Peters, Dissertation, Dortmund, **2003**.
- [155] O. Herd, A. Heßler, M. Hingst, P. Machnitzki, M. Tepper, O. Stelzer, *Catalysis Today* **1998**, *42*, 413-420.
- [156] S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J.R. Havens, T.J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4793 – 4802.
- [157] M. Völkert, Dissertation, Dortmund, **2003**.
- [158] R. Wacker, Dissertation, Dortmund, **2004**.
- [159] J.B. Corbell, J.J. Lundquist, E.J. Toone, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111.
- [160] T. Ren, D. Liu, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7621-7625.

- [161] B. Werschkun, W.A. König, V. Kren, J. Thiem, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, *19*, 2459-2466.
- [162] R.T. Lee, Y.C. Lee, *Carbohydrate Res.* **1995**, *271*, 131-136.
- [163] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- [164] I.J. Goldstein, C.E. Hollerman, E.E. Smith, *Biochemistry* **1965**, *4*, 876-883.
- [165] J.B. Sumner, S.F. Howell, *J. Biol. Chem.* **1936**, *115*, 583-588.
- [166] T.G.M. Schmidt, A. Skerra, *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 337-345.
- [167] T.G.M. Schmidt, A. Skerra, *Prot. Eng.* **1993**, *6*, 109-122.
- [168] A. Skerra, T.G.M. Schmidt, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 79-86.
- [169] R. Merckx, D.T.S. Rijkers, J. Kemmink, R.M.J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515-4518.
- [170] B.J. Backes, J.A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [171] *Synthesis Notes*, Novabiochem Katalog **2002/3**, 2.31.
- [172] W.C. Chan, P.D. White (Hrsg.) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [173] *Synthesis Notes*, Novabiochem Katalog **2002/3**, 3.27.
- [174] H.-G. Chao, B. Leiting, P.D. Reiss, A.L. Burkhardt, C.E. Klimas, J. B. Bolen, G.R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7710-7711.
- [175] H. Nakamura, M. Fujiwara, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7529-7530.
- [176] A. Watzke, Dissertation, Dortmund **2005**.
- [177] M. Schutkowski, persönliche Mitteilung.
- [178] S. Szedlacsek, persönliche Mitteilung.
- [179] T. Machama, J.E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13375-13378.
- [180] C. Peters, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6053-6055.
- [181] B.M. Sutton, J. Weinstock, Patent DE 2437146, 13. Februar **1975**.
- [182] L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [183] Novabiochem Product Data Sheet: Produkt Nr. 04-12-1205, Batch Nr. A25684.
- [184] X. Bu, G. Xie, C.W. Law, Z. Guo, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2419-2422.
- [185] J. Zhang, P. Kovac, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1091-1094.

8 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
$[\alpha]_D^{20}$	Spezifischer Drehwert bei 20 Grad Celsius
abIgG-Cy5	Cy5-markierter gegen Biotin spezifischer Antikörper
Abs (nm)	Absorption in Nanometern
abs.	absolut (trocken, entgast und Argon gesättigt)
Ac	Acetyl
acc	acceleration (Beschleunigung)
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AIBN	Azobisisobutyronitril
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
ar	aromat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br	breites Signal
bu	Butyl
Cbz	Carboxybenzyl
ConA	Concanavalin A
Cy	Cyclohexan
d (NMR)	Dublett
d (Vorschrift)	Tag(e)
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dual spezifische Phosphatase
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat
ECL	enhanced chemoluminescence
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
Äq	Äquivalent(e)
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
FAB	fast atom bombardement Massenspektrometrie
FERM	Four Point one/Ezrin/Radixin/Moesin
FG	funktionelle Gruppe
Fmoc	Fluorenmethyloxycarbonyl
Fmoc-OSu	Fluorenmethyloxycarbonyl-Succinimidylester
FT	Fourier Transformation
GC(-MS)	Gaschromatographie (mit massenselektiven Detektor)
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin-Markierung (X ₆ = sechs Histidine)
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol Hydrat
HPLC	Hochdruckflüssigchromatografie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
i. Vak.	im Vakuum
kDa	kilo Dalton
KIM	kinase interaction motif
KIND	kinase noncatalytic C-lobe

konz.	Konzentriert
l	Liter
LRMS	niedrigauflösende Massenspektrometrie
Lsg.	Lösung
m	Multiplett (NMR); milli (Konzentration)
M	molar
μ	mikro
MAPK	mitogen activated protein kinase
Me	Methyl
min	Minuten
mM	milimolar = mmol/l
Ms	Methylsulfonat
MS	Massenspektrum
MPTPA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein-Tyrosin-Phosphatase A
NaOMe	Natriummethanolat
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NC	Negativkontrolle
NCL	Native Chemical Ligation
n.d.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAMAM	Polyamidoamid (-Dendrimer)
Pam ₃ Cys	<i>N</i> -Palmitoyl- <i>S</i> -[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2 <i>R,S</i>)-propyl]-(<i>R</i>)-cystein
Pbf	2,2,4,6,7,-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PC	Positivkontrolle
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDZ	PSD-95/ <i>Drosophila</i> discs large/Zonula occludens
Ph	Phenyl
PHC	<i>S</i> -(1,2-Dicarboxyhexadecyl)ethyl- <i>N</i> -palmitoyl- <i>L</i> -cystein
PNA	Peptidnukleinsäure
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenolphosphat
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase

PTP-Bas	PTP-Basophil
PTP-BL	PTP-Basophil like
pTyr	Phosphotyrosin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
qu	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPTP	rezeptorähnliche PTP
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAM	self assembled monolayer
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
sec	Sekunde
STV	Streptavidin
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
<i>tert</i>	tertiär
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
Trityl	Triphenylmethyl
Trt	Trityl
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VIS	visible light
W	Watt
Z	Zucker

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Drei-Buchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525) und haben L-Konfiguration nach der Fischer-Konfiguration.

Danksagung

Zu dem Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken möchte.

Bei Prof. Herbert Waldmann möchte ich mich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis zu arbeiten, für alle Mittel und Freiheiten bei der Umsetzung der Themenstellung sowie für die Ermöglichung und Unterstützung bei der Umsetzung eigener Ideen bedanken.

Bei Prof. Rolf Breinbauer möchte ich mich für die gute Betreuung und die große Unterstützung bedanken und auch besonders dafür, dass er seinen Urlaub früher beendet hat, um mir die Prüfung zu diesem Zeitpunkt zu ermöglichen.

Bei Ron Wacker, Hendrik Schröder, Sven Schultz und Michael Adler möchte ich mich für die gute Kooperation und Hilfe bedanken. Ganz besonderer Dank gilt dabei Ron Wacker und Hendrik Schröder, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Christof Niemeyer möchte ich mich für die jahrelange gute Kooperation bedanken.

Besonders danken möchte ich auch dem „alten Unilabor“ mit Anja Watzke, Miguel Sanz, Daniel Gottlieb, Sandra Eichhorn, Christian Dose, Stefan Sommer, Svenja Röttger, Tobias Voigt, Luc Brunsveld und Christiane Vornweg für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfe besonders zu Beginn der Arbeit und den guten Zusammenhalt.

Desweiteren bedanke ich mich für die tolle Zeit im „Mädelslabor“ bei Nici, Anja, Julia, Sasi und unserer „Gelegenheitsarbeiterin“ Sandra. Ich werde Euch sehr vermissen!

Bei meiner Auszubildenen Julia Keßler möchte ich mich für ihre tatkräftige Hilfe und Zuverlässigkeit bedanken.

Bei Dirk Nüsse möchte ich mich für die große Hilfe mit der Photolithografie und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Marina Lovrinovich möchte ich mich für die Proteinsynthese bedanken.

Bei Dr. Norbert Opitz bedanke ich mich herzlich für seine Hilfe bei den Versuchen mit dem Lasermikroskop.

Dr. Heino Prinz und Sandra Eichhorn möchte ich für die große Hilfe bei den Malachitgrün-Assays danken. Auch Heike Rimpel möchte ich für die Hilfe bei den biologischen Assays danken.

Für die umfangreiche Analytik möchte ich mich bei S. Eichhorn, C. Vornweg, Dr. P. Janning, A. Danzmann und Dr. B. Costisella bedanken.

Bei Dr. Carsten Peters möchte ich mich für die anfängliche Hilfe und gute Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei den Korrekturlesern dieser Arbeit, Rolf Breinbauer, Anja Watzke, Joaquín Gomis, Ron Wacker und Thorben Lessmann.

Lebenslauf

Name: Maja Köhn
Geburtsdatum: 16.04.1975
Geburtsort: Kiel
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule Flintbek
1985 – 1993 Max-Planck-Gymnasium Kiel
1993 – 1995 Humboldt-Gymnasium Kiel
07/1995 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1995 – 03/1996 Ruhr-Universität Bochum, Studiengang Biochemie/Diplom
04/1996 – 08/2001 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Studiengang Chemie/Diplom
11/1998 Vordiplomprüfung
10/2000 Mündliche Diplomprüfungen
12/2000 – 07/2001 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. T. K. Lindhorst an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum Thema „Synthese und Derivatisierung von Kohlenhydrat-Carbodiimiden“
07/2001 Abschluss Diplom

Promotion

01/2002 – 08/2005 Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Waldmann, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, zum Thema „Immobilisierungsstrategien zur Herstellung von Peptid- und Wirkstoff-Arrays und deren Anwendung“

Praktika

02/1998 – 03/1998 Forschungspraktikum bei Dade Behring, Marburg, zum Thema „Kopplung von viralem Antigen an partikuläre Festphasen“
09/2001 – 12/2001 Forschungsaufenthalt am Instituto de Investigaciones Químicas, C.S.I.C., Sevilla, Spanien, in der Arbeitsgruppe von Dr. J. M. García Fernández, mit dem Thema „Synthese von Kohlenhydrat-zentrierten Glycoclustern“

Stipendium

09/2001 – 12/2001 Forschungsaufenthalts-Stipendium vom Verein zur Förderung der Glycowissenschaften e.V., Hamburg