

**Synthese einer Kollektion von 3-Acyltetramsäuren und
Identifizierung der Zielproteine
von Meloplin A**

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

Tanja Knoth

aus Hannover

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Mathias Christmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von Mai 2005 bis Mai 2009 angefertigt.

Meinen Eltern und
Peter

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil.....	3
2.1	Chemische Genetik	3
2.2	Die Untersuchung des Ras-Signalwegs mittels chemischer Genomik	13
2.3	Tetramsäuren als Ausgangspunkt für die Synthese von Substanz- Kollektionen	17
3.	Motivation und Ziel der Arbeit.....	28
4.	Spezieller Teil	30
4.1	Synthese einer Tetramsäurebibliothek	30
4.2	Laccarin	38
4.3	Polyenoyl-Tetramsäuren.....	41
4.4	Untersuchung der biologischen Eigenschaften von Melophlin A und der Tetramsäure-Kollektion.....	49
4.5	Identifizierung der Bindungspartner von Melophlin A	59
4.6	Validierung der identifizierten Proteine	69
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Experimenteller Teil	96
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel	96
6.2	Verbindungen zu Kapitel 4.1.....	98
6.3	Verbindungen zu Kapitel 4.2.....	146
6.4	Verbindungen zu Kapitel 4.3.....	149
6.5	Verbindungen zu Kapitel 4.5.1.....	160
7.	Material und Methoden zum biologischen Teil.....	164
7.1	Materialien	164
7.2	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	167
7.3	Methoden.....	169

Inhaltsverzeichnis

8. Literaturverzeichnis	189
9. Abkürzungsverzeichnis	197

1. Einleitung

Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung von Arzneimitteln ist ein detailliertes Verständnis biologischer Prozesse. Da sämtliche biologische Vorgänge auf chemische Prozesse zurückgeführt werden können, lassen sich diese auf molekularer Ebene untersuchen.

Ein großer Durchbruch auf dem langen Weg zum kompletten molekularen Verständnis biologischer Prozesse stellte die um die Jahrtausendwende erfolgreich abgeschlossene Sequenzierung zunächst prokaryotischer^[1-3] und kurz darauf der ersten eukaryotischen Genome (*Saccharomyces cerevesiae*^[4] und *Drosophila melanogaster*^[5]) dar. Im Jahr 2004 schließlich erfolgte die Entschlüsselung des menschlichen Genoms,^[6] die somit wichtigen Zugang zu einer weitreichenden Aufklärung komplexer biologischer Mechanismen bietet. Damit einhergehend steigt die Hoffnung auf die Entwicklung neuartiger Therapien. Jedoch stellte sich schnell heraus, dass die Genomsequenz allein nicht genügt, um die komplexen biologischen Prozesse vollständig zu verstehen. Erst eine erschöpfende funktionelle Aufklärung der Genome kann dies ermöglichen.

Zur Aufklärung der zellulären Funktionen eines Proteins stehen vielfältige Methoden zur Verfügung, von welchen hier nur die wichtigsten aufgezählt werden sollen: Moderne Methoden der klassischen Genetik setzen auf die systematische Störung einzelner Gene mit nachfolgender Analyse der auftretenden Phänotyp-Änderungen.^[7] Durch Techniken wie das Klonen von Genen sowie dem Gen-knock-out werden in Modellorganismen wie der Maus (*Mus musculus*) oder dem Zebrafisch (*Danio rerio*) gezielt Gene ausgeschaltet oder überexprimiert. Obwohl diese Techniken bereits interessante Einblicke in verschiedene biologische Prozesse ermöglichten, unterliegen sie bestimmten Grenzen. So ist es auf Grund des diploiden Genoms und der niedrigen Fortpflanzungsrate schwierig, Säugerzellen zu untersuchen.^[8, 9] Des Weiteren sind Gene, die essentiell für das Leben eines Organismus oder dessen Entwicklung sind, von Untersuchungen gerade ihrer Funktionen in späteren Entwicklungsstadien ausgeschlossen, da ein klassischer Knock-out in vielen Fällen zum Tod des Organismus führen würde.^[10] Auch ist es kaum möglich, dynamische zellbiologische Prozesse mit Hilfe der klassischen Genetik zu untersuchen.

Eine Standardmethode der rückwärtsgerichteten Genetik zur Untersuchung der Funktionen neu entdeckter Gene ist die RNA-Interferenz (RNAi). RNAi bezeichnet einen zellulären Vorgang, bei dem der Abbau einer mRNA durch homologe, doppelsträngige RNA induziert wird und so die Expression einzelner Gene hemmt.^[11]

Einleitung

In den vergangenen Jahren wurde eine große Anzahl an Studien veröffentlicht, in denen einzelne Gene in Zellkultur auf diesem Weg inhibiert wurden, um Aufschluss über ihre Funktionen zu bekommen oder Stoffwechselwege zu untersuchen.^[12] Die Entwicklung von Expressionsbibliotheken für siRNA (small-interfering RNA) und shRNA (short-hairpin RNA) gegen sämtliche Gene des menschlichen Genoms bietet neue Möglichkeiten für die Identifikation therapeutisch wichtiger Zielmoleküle.

Ein neuer, ergänzender Ansatz ist die chemische Genetik. Bei dieser Methode werden niedermolekulare chemische Verbindungen für die Aufklärung biologischer Prozesse verwendet. Chemische Modulatoren binden und interagieren mit Proteinen. Dies führt, beispielsweise über Konformationsänderungen, zum Verlust signifikanter Funktionen des Proteins und kann weiterhin die Ausprägung charakteristischer Phänotypen bewirken. Auf diesem Weg können Aufgaben und Interaktionspartner der Genprodukte identifiziert werden.^[9] Die klassische Genetik und der chemisch-genetische Ansatz ergänzen sich in der Suche nach der Aufklärung komplexer biologischer Systeme. Da in der vorliegenden Arbeit ein chemisch-genetischer Ansatz verfolgt wurde, wird auf diese Methode im folgenden Kapitel näher eingegangen. Bisher sind nur für ungefähr 500 der 100.000 vom menschlichen Genom kodierten Proteine niedermolekulare Liganden verfügbar, so dass auf diesem Gebiet noch großes Forschungspotential besteht.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Chemische Genetik

Wie in der klassischen Genetik werden auch in der chemischen Genetik (CG) vorwärts- und rückwärtsgerichtete Ansätze unterschieden. Vorwärtsgerichtete Genetik agiert vom beobachteten Effekt zum obliegenden Grund bzw. vom Phänotyp zum Genotyp. So untersucht sie morphologische Änderungen nach ungerichteter DNA-Mutation. Erst im letzten Schritt wird das verantwortliche Gen identifiziert.^[13]

Vorwärtsgerichtete chemische Genetik (Abbildung 1) imitiert dies, indem ungerichtete Mutagenese durch eine Kollektion potentieller Modulatoren von Proteinfunktionen ersetzt wird.^[14] Wie in der klassischen, vorwärtsgerichteten Genetik ist der erste Schritt das Auffinden von phänotypischen Änderungen, die durch Hemmung oder Stimulierung von Proteinen hervorgerufen wurden. Während in der klassischen Genetik das verantwortliche Gen identifiziert wird, sucht der chemische Ansatz nach den Bindungsproteinen der niedermolekularen Substanz. Dieser letzte Schritt stellt heutzutage noch eine große Herausforderung dar und limitiert den praktischen Einsatz der chemischen Genetik.^[15-17]

Rückwärtsgerichtete Genetik (Abbildung 1) beginnt hingegen mit der Auswahl eines Gens, welches gezielt mutiert wird. Daraufhin wird nach phänotypischen Änderungen des entstandenen Organismus gesucht.^[18] Ganz ähnlich beginnt auch der rückwärtsgerichtete chemische Ansatz mit einem bekannten Protein, für das im nächsten Schritt nach einem passenden Liganden gesucht wird. Ist dieser gefunden, wird der Organismus der Substanz ausgesetzt, um nun gezielt Änderungen des Phänotyps untersuchen zu können.^[19]

Allgemeiner Teil

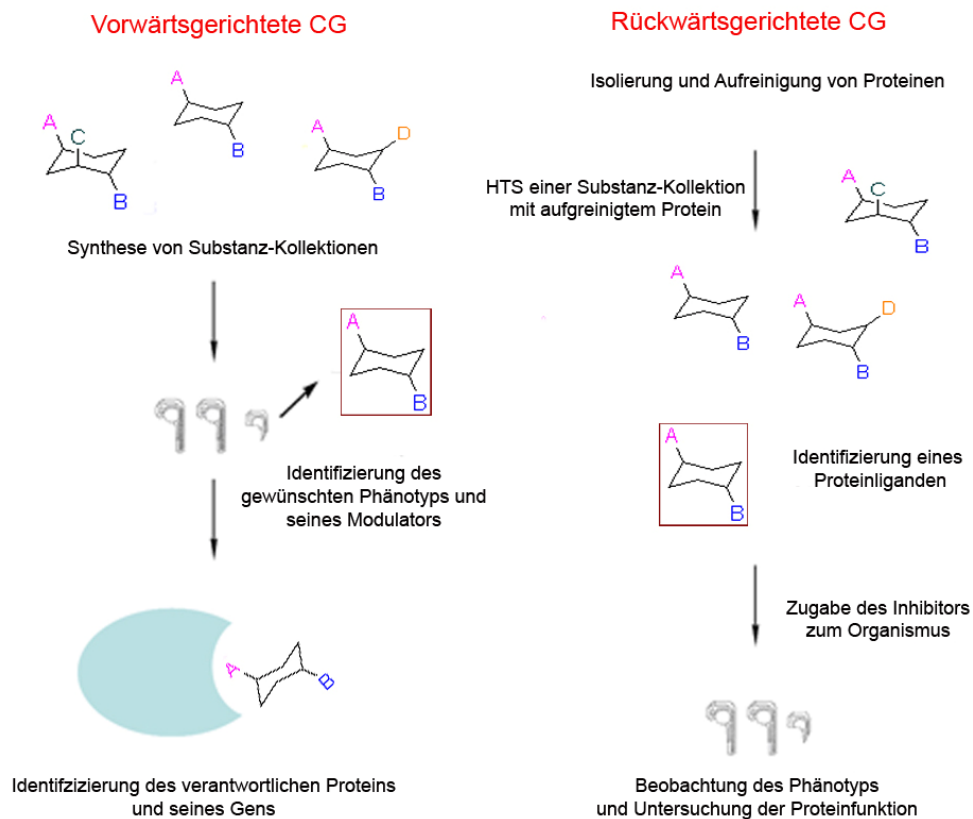


Abbildung 1: Vorwärtsgerichtete chemische Genomik: Eine Kollektion an Substanzen wird synthetisiert und in einem *in vivo*-Assay getestet. Es wird nach gewünschten Phänotypen gesucht und Substanzen, die diesen Phänotyp hervorrufen, werden identifiziert. Hieran schließt sich meist die Identifizierung des Zielproteins. Rückwärtsgerichtete chemische Genomik: Das Protein von Interesse wird exprimiert, aufgereinigt und gegen eine Substanz-Datenbank *in vitro* getestet. Bindungspartner werden anschließend in einem passenden *in vivo*-Experiment auf phänotypische Änderungen untersucht, um die Rolle des Proteins in diesem Zusammenhang näher zu charakterisieren.

Gegenüber den klassischen genetischen Methoden birgt die jüngere chemische Genomik einige Vorteile. Vor allem ist sie flexibel in jedem zellulären bzw. tierischen Modell einsetzbar und erfordert keine zeitintensiven oder sogar möglicherweise letalen Genmutationen. So findet sie beispielsweise auch zur Untersuchung biologischer Prozesse in menschlichen Zellen unter physiologischen Bedingungen Verwendung.^[20]

Einen weiteren Vorteil bietet die Möglichkeit einer gleichzeitigen multiplen Inhibierung mehrerer Proteine durch simultane Verabreichung unterschiedlicher chemischer Substanzen. Dies erlaubt es beispielsweise, die Wechselwirkung von Proteinen gezielt zu untersuchen.

Während in der klassischen Genetik in der Regel die anvisierten Proteine komplett aus dem Organismus entfernt werden, kann mit chemischen Substanzen nur eine Teilfunktion des betrachteten Proteins ausgeschaltet und somit individuell analysiert werden.^[21] In diesem Zusammenhang ist es ebenfalls von Bedeutung, dass die Dosierbarkeit der niedermolekularen Modulatoren eine Untersuchung von Proteinen ermöglicht, deren komplettes Ausschalten in klassisch genetischen Studien zum Tod des Organismus führen würden.^[10]

Zudem ermöglichen chemisch-genetische Ansätze die Untersuchung von dynamischen biologischen Prozessen wie sie beispielsweise bei Signalkaskaden vorliegen. Da die niedermolekularen Substanzen in optimalen Systemen gut zellpermeabel sind, ermöglichen sie eine Echtzeit-Kontrolle.^[15, 22] In der klassischen Genetik werden für zeitliche Untersuchungen temperatursensitive Mutanten eingesetzt. Diese gestatten es, Proteine gezielt durch eine Regulation der Temperatur auszuschalten. Jedoch zeigen diese Ansätze oft unerwünschte Nebeneffekte.^[22] Auch siRNA oder antisense-Oligonucleotide, die die Synthese ihrer Zielproteine auf der Stufe der mRNA inhibieren,^[10, 17, 23] lassen phänotypische Beobachtungen erst nach Zeitverzögerung zu, da die bereits im Organismus existierenden Proteine zunächst abgebaut werden müssen.

Allerdings zeigt die chemische Genetik auch Nachteile gegenüber den klassischen Ansätzen. So können in der klassischen Genetik hochspezifisch Gene moduliert werden, während chemische Verbindungen oft unspezifisch mit mehreren Proteinen interagieren. Diese ungewollten Interaktionen können z. B. Zytotoxizität verursachen oder zu falschen biologischen Aussagen führen.

Zusammenfassend lassen sich die klassischen genetischen gut durch die jüngeren chemischen Ansätze ergänzen, so dass es durch sinnvolle Kombination beider Methoden möglich sein sollte, die komplexen biologischen Prozesse umfassend aufzuklären.^[24]

2.1.1 Das Design von Substanz-Kollektionen

Um das Potential der chemischen Genetik voll ausschöpfen zu können, sind sowohl umsatzstarke Screening-Methoden als auch hochwertige Substanz-Kollektionen von Nöten. Generell sollten Mitglieder solcher Substanzbanken die Funktionen verschiedenster Proteine modulieren und dabei zellpermeabel und synthetisch leicht zugänglich sein.

Die höchste Wahrscheinlichkeit biologisch aktive Moleküle zu identifizieren, erzielt man mit dem Testen von Naturstoffbibliotheken.^[13, 25] Allerdings sind solche

Allgemeiner Teil

Kollektionen schwierig aufzubauen, da Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen extrem zeit- und kostenintensiv sind. Dennoch wurden einige Naturstoffe, wie das Immunosuppressivum Rapamycin^[26] und der PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin^[27] erfolgreich in chemisch-genetischen Fragestellungen eingesetzt.

Einen guten Mittelweg zwischen hochaktiven Naturstoffen und leichter Zugänglichkeit bilden Naturstoff-inspirierte-Substanzsammlungen. Hier werden Strukturelemente bekannter Naturstoffklassen als Ausgangspunkt für den Aufbau von Substanz-Bibliotheken gewählt. Aus Sicht der Evolution können diese Grundgerüste als privilegiert und biologisch vorvalidiert betrachtet werden und bieten somit hohe Wahrscheinlichkeiten für das Auffinden biologisch interessanter Liganden.^[28, 29] Die erfolgreiche Entwicklung einer Biologie-orientierten-Synthese wurde 2007 vom Arbeitskreis von Prof. Waldmann veröffentlicht.^[30] Das Grundgerüst α , β -ungesättigter δ -Lactone wird in vielen Naturstoffen unterschiedlicher biologischer Aktivitäten gefunden. Ein Beispiel für einen solchen Naturstoff ist Pironetin **1**, welches ein Inhibitor für Tubulin-Polymerisation ist und den Zellzyklus in der M-Phase arretiert. In einer Festphasensynthese konnte eine auf diesem Strukturmotiv beruhende Substanzsammlung synthetisiert werden. In einem anschließenden zellbasierten Screen wurden Modulatoren des Zellzyklus mit hoher Trefferrate identifiziert. Ein Beispiel für ein α , β -ungesättigtes δ -Lacton mit Wirkung auf das Mikrotubuli-Zytoskelett ist in Abbildung 2 dargestellt.

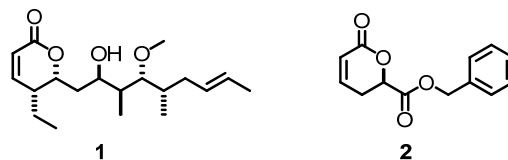


Abbildung 2: Strukturen von Pironetin **1** sowie des neu identifizierten Zellzyklus-Modulators **2**.

Waldmann et al. entwickelten zudem einen Ansatz zur Identifizierung von Proteinliganden, der Naturstoff-basierte-Bibliothekensynthese mit dem so genannten „Protein-Structure-Similarity-Clustering“ (PSSC) verbindet. Hier werden die Ligand-erkennenden Domänen verschiedener Proteine verglichen und gruppiert. Natürlich vorkommende Bindungspartner eines Proteins der Gruppe sollten somit gute Ausgangspunkte für die Entwicklung von Liganden für die anderen Proteine dieser Gruppe darstellen. Das Prinzip beruht somit einerseits auf der Tatsache, dass die Vielfalt an Proteinfaltungen begrenzt ist und andererseits auf der evolutionsbedingten Validierung von Naturstoffen als Proteinbindungspartnern. Erfolgreich wurde diese Methode eingesetzt, um beispielsweise ausgehend von dem Naturstoff Dysidiolid, einem natürlichen Inhibitor der dualspezifischen Phosphatase Cdc25A, Inhibitoren für

Acetylcholinesterase und die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 1 und 2 zu identifizieren. Aus einer 147 Mitglieder umfassenden Substanzbibliothek an Butenoliden konnten potente und selektive Inhibitoren identifiziert werden (Abbildung 3).^[31]

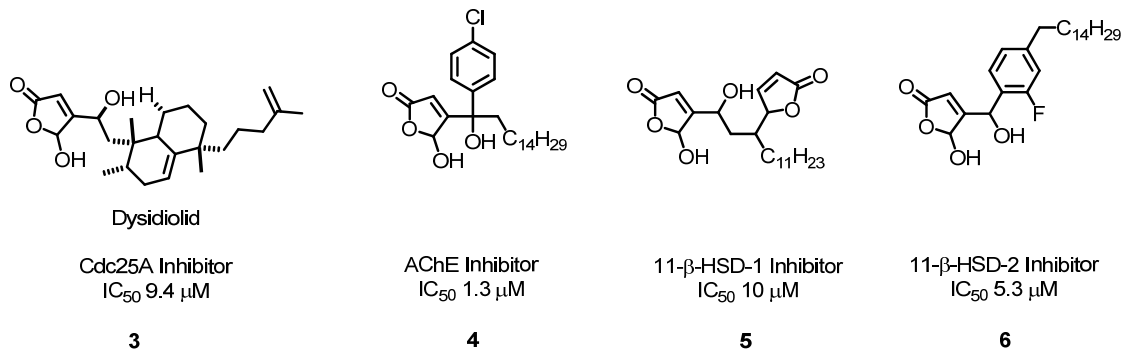


Abbildung 3: Ausgewählte Substanzen einer Butenolid-Bibliothek beruhend auf dem Cdc25A Inhibitor Dysidiolid **3**.

Strukturell weiter von den Leitmotiven der Natur entfernt sind Substanzsammlungen, die auf so genannten Diversitäts-orientierten-Synthesen (DOS) beruhen. Diese Methode basiert auf der Annahme, dass strukturell ähnliche Moleküle auch ähnliche biologische Effekte zeigen. Deshalb ist das Ziel der DOS, Kollektionen mit einem möglichst großen Spektrum an chemisch diversen Strukturen zu synthetisieren, um somit möglichst viele Proteine modulieren zu können. Besonders attraktiv ist der Ansatz, aus einem Synthesebaustein verschiedene Grundstrukturen aufzubauen.^[32] Dabei unterscheidet man zwischen einer Differenzierung (Abbildung 4a), bei welcher durch verschiedene Reagenzien verschiedene Grundstrukturen aufgebaut werden und der so genannten Faltung durch σ -Elemente (Abbildung 4b). Letzteres sind Substituenten, die unter Standardreaktionsbedingungen bestimmte Strukturgerüste vorkodieren.^[32]

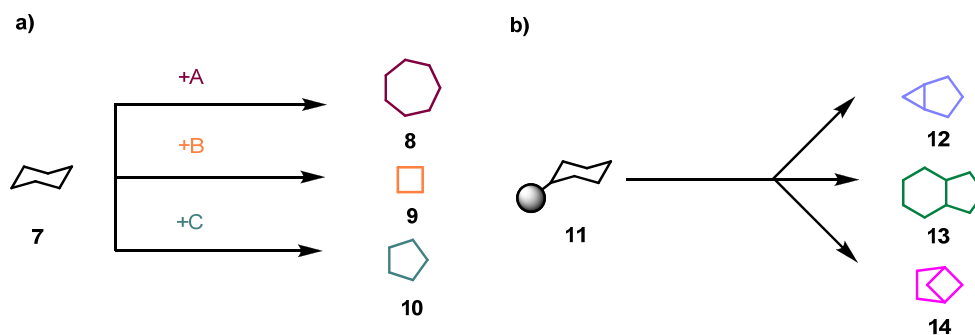


Abbildung 4: Aufbau von Gerüstdiversität. a) Differenzierung; b) Faltungsvorgänge.^[9]

2.1.2 Untersuchungen zur biologischen Aktivität

Ist ein Satz an potentiell interessanten Molekülen zusammengestellt, so ist der nächste Schritt das Auffinden ihrer biologischen Aktivität. In der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik werden die Substanzen in phänotypischen Assays getestet. Durch das Design des Assays soll es letztlich ermöglicht werden, Proteine zu identifizieren, die den biologischen Prozess von Interesse regulieren. Im Gegensatz hierzu beginnt der rückwärtsgerichtete Ansatz direkt mit einem bekannten, isolierten Protein, auf das in *in vitro*-Screens der Einfluss der chemischen Substanzen untersucht wird. Da in der vorliegenden Arbeit ein vorwärtsgerichteter chemisch-genetischer Ansatz verfolgt wurde, soll im Weiteren nur auf diesen näher eingegangen werden.^[9]

In den letzten Jahren wurden für phänotypische Untersuchungen neben Einzeller-Organismen wie Bakterien oder Pilzen auch multizelluläre Organismen wie z. B. Zebrafische oder Pflanzen eingesetzt. Des Weiteren spielt die Hefe eine wichtige Rolle in der Identifizierung von Phänotypen, die durch chemische Substanzen verursacht wurden. Mit diesem Modellorganismus entdeckte beispielsweise die Gruppe um Schreiber weitere Komponenten des „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR)-Netzwerks. Eine besonders interessante und robuste Plattform für phänotypische Untersuchungen stellen zudem Säugetierzellen dar.^[9]

Ein erfolgreiches Beispiel für die Identifizierung aktiver Substanzen aus einem phänotypischen Assay in Säugetierzellen veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Schweitzer^[33]. Sie entwickelten einen krankheitsspezifischen, zellbasierten Screen zur Identifizierung von Leitstrukturen gegen die Huntington'sche Krankheit. Hierzu wurde ein Modellsystem in neuronalen PC12-Zellen entwickelt, welche ähnliche Eigenschaften wie ausgereifte Neuronen zeigen. So wird beispielsweise durch den Entzug von Wachstumsfaktoren Apoptose ausgelöst. In diese Zellen wurde zusätzlich ein Plasmid eingebracht, welches induzierbar (durch Zugabe von Tebufenozid) eine um ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) verlängerte Polyglutaminform des Exons-1 von *Htt* exprimiert. Nach Induktion des *Htt*-Transgens durch Tebufenozid sterben die Zellen innerhalb von 48 h (Abbildung 5H). Aus der getesteten Datenbank (der NIH Custom Collection) verhinderten 18 Verbindungen den programmierten Zelltod (Abbildung 5I). Unter diesen Substanzen befanden sich bekannte Caspase-Inhibitoren sowie verschiedene Cannabinoide, die nun als Leitstrukturen für die Entwicklung von Medikamenten gegen die Huntington'sche Krankheit eingesetzt werden.^[33]

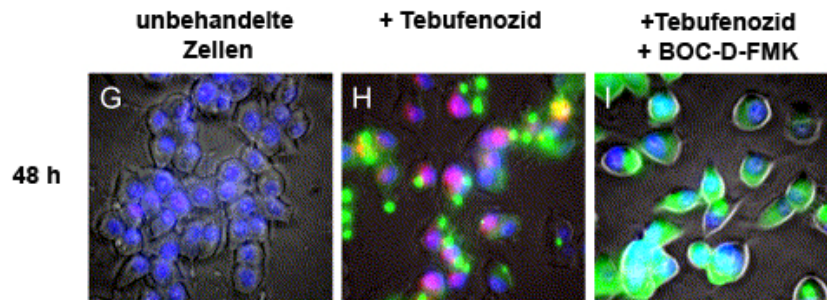


Abbildung 5: Htt^{Q103} bewirkt Apoptose, was durch den Caspase-Inhibitor BOC-*D*-FMK verhindert wird. G) Zeigt PC12-Zellen, in denen Htt^{Q103} nicht aktiviert wurde, H) zeigt Zellen, die 48 h nach Aktivierung mit Tebufenozid durch Htt^{Q103} Expression starben und I) zeigt Zellen, bei denen der Zelltod durch den Caspase-Inhibitor BOC-*D*-FMK verhindert wurde. Die Zellen wurden jeweils mit Hoechst-Farbstoff, welcher die Zellkerne lebender Zellen blau markiert und Ethidiumbromid, welches die Kerne toter Zellen rot markiert, gefärbt. Htt^{Q103} ist in grün dargestellt.^[33]

Eine weitere attraktive Methode zur Identifizierung aktiver Substanzen sind Reporter-Gen-Systeme. Solche Assays ermöglichen es, die durch einen Rezeptor-Agonisten verursachte Transkription eines Proteins sichtbar zu machen. Dazu bedienen sie sich eines Reportergens, das bei Aktivierung exprimiert wird und dabei ein leicht zu messendes, optisches Signal produziert. Für Screening-Experimente wird oft das Luziferase-Gen eingesetzt, da dies leicht durch eine Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden kann.

Den erfolgreichen Einsatz eines Reporter-Gen-Systems zur Identifizierung von spezifischen Inhibitoren zeigten Pasco et al.^[34] Sie nutzten einen Luziferase-Reporter-Gen-Assay mit einem Zyklooxygenase-2 (COX-2)-Promoter, der es ihnen erlaubte, COX-2-Aktivatoren zu identifizieren. Aus einer aus 968 Extrakten von 266 verschiedenen Pflanzen bestehenden Datenbank identifizierten sie Shikonin **15**, eine entzündungshemmende Substanz als aktive Spezies (Abbildung 6).

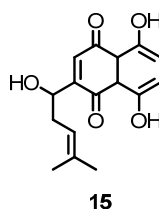


Abbildung 6: Struktur des COX-2-Aktivatoren Shikonin **15**.

Weiterführende Untersuchungen dieser Gruppe zeigten, dass auch andere Mitglieder der Familie der Shikonine spezifische Inhibitoren des bekannten, medizinisch relevanten Proteins COX-2 sind.

2.1.3 Identifizierung und Validierung von Bindungspartnern

Von besonderer Bedeutung für den Erfolg eines chemisch-genetischen Ansatzes ist die Identifizierung der Zielproteine der durch den Screen gefundenen aktiven Verbindungen. Im Allgemeinen wächst die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Charakterisierung von Interaktionspartnern mit der Stärke der Protein-Inhibitor-Bindung. Nano- oder gar picomolare Bindungskonstanten vereinfachen die Identifizierung der Zielproteine, wenngleich auch bei den wesentlich häufigeren, nur micromolar-wirkenden Inhibitoren Interaktionspartner identifiziert werden können.

Der am häufigsten eingesetzte Ansatz zur Zielprotein-Identifizierung beruht auf klassischen Methoden der Affinitätsaufreinigung, auch Pulldown genannt. Typischerweise wird hierzu das aktive Molekül an einer Affinitätsmatrix, beispielsweise Agarose immobilisiert und mit Zelllysate inkubiert (Abbildung 7). Am geläufigsten ist der Einsatz von Säulen. Die nach Waschschritten am Inhibitor verbleibenden Proteine können anschließend massenspektrometrisch identifiziert und ihrer entsprechenden Gensequenz zugeordnet werden.^[35]

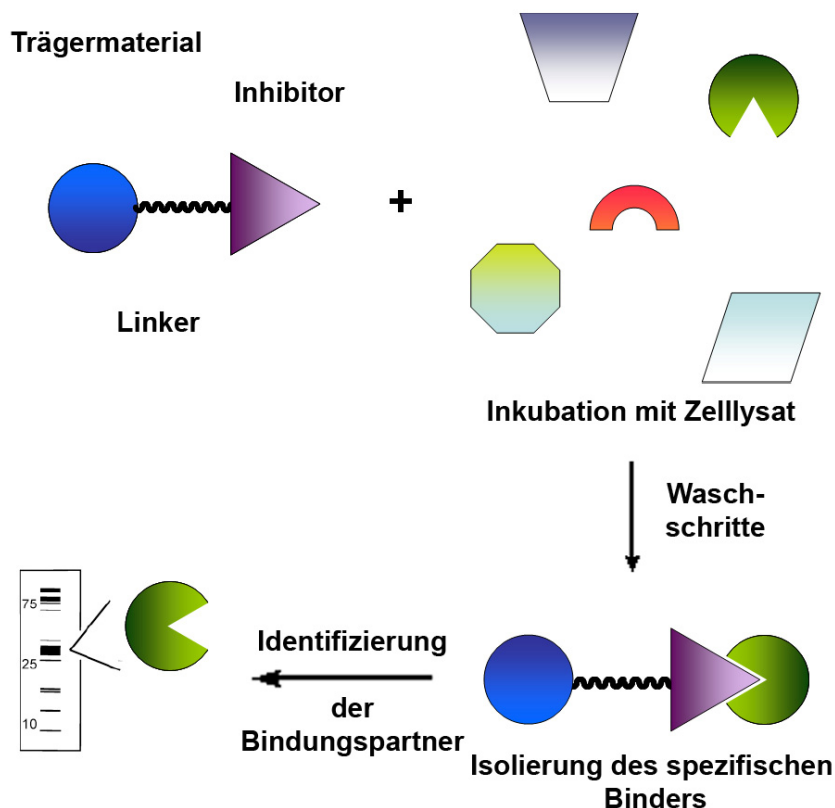


Abbildung 7: Schema für ein Pulldown-Experiment.

Obwohl sie sehr oft verwendet werden, sind solche affinitätschromatographischen Ansätze zur Identifizierung von Bindungspartnern häufig mit vielen Hindernissen

verbunden. Als erstes muss der Inhibitor auf einem Trägermaterial immobilisiert werden. Dies kann zum Verlust der Aktivität der chemischen Verbindung führen und erfordert im Vorfeld zeitintensive Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung.^[9] Hinzu kommen zwei weitere wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Suche nach Interaktionspartnern. Der Ligand sollte eine hohe Affinität zum Zielprotein besitzen, welches wiederum hoch abundant sein sollte.^[16] Auf der praktischen Seite werden affinitätschromatographische Ansätze häufig durch den stark hydrophoben Charakter synthetischer Inhibitoren erschwert. Stark hydrophobe Liganden neigen zu unspezifischen Bindungen an hydrophobe Proteine, die dann zusätzlich zu den relevanten Bindungspartnern aus dem Lysat gezogen werden. Ein Teil dieses Problems lässt sich mit intensiven Waschschrritten beheben, was aber nur dann erfolgreich gelingen kann, wenn die Bindung des Liganden zum Zielprotein ausreichend stark ist.

Kodadek et al. veröffentlichten eine Methode zur vereinfachten Unterscheidung von unspezifisch- und spezifisch bindenden Proteinen. Hierzu versetzten sie das Lysat der Säugerzellen von Interesse mit einem Überschuss an leicht zugänglichen *E. coli* Extrakten. Unspezifische Bindungen werden so vom *E. coli* Lysat abgesättigt und können aufgrund des großen Überschusses unspezifisch bindende Säugetier-Proteine verdrängen. Letztere würden in der Zielprotein-Identifizierung für Verwirrung sorgen. Besonders effektiv wird dieser Ansatz, wenn eines der Lysate, beispielsweise durch Einbau von ³⁵[S]-Methionin, markiert werden kann. Dies vereinfacht die Unterscheidung zwischen Säugetier- und bakteriellen Proteinen, in diesem Fall per Autoradiogramm, und so die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionspartnern.^[36]

Auch Mann et al.^[37] entwickelten eine massenspektrometrische Methode zur quantitativen Auswertung spezifischer bzw. nicht-spezifischer Proteinbindungen mittels isotoopenmarkierter Proteine. Besonders wichtig ist hierbei das richtige Design des inaktiven Kontrollmoleküls, welches der aktiven Verbindung strukturell möglichst ähnlich sein sollte. Im idealen Fall wäre das Kontrollmolekül ein inaktives Enantiomer. Zur späteren Unterscheidung werden die Proteine für einen Pulldown (beispielsweise das Kontrollexperiment) mit schweren Aminosäuren und die des anderen mit den leichten Analoga markiert. Dies wird durch Kultivierung der Zellen in Medien mit den entsprechenden schweren oder leichten Aminosäuren erreicht. Mischt man nach den Pulldown-Experimenten die bindenden Proteine des aktiven Inhibitors mit denen des Kontrollexperiments, kann mittels Massenspektrometrie eine Zuordnung der isolierten Proteine durchgeführt werden. Das Verhältnis der identifizierten Proteine gibt dabei

Allgemeiner Teil

Auskunft, ob das Protein unspezifisch oder spezifisch bindet. Proteine, bei denen die gefundenen Verhältnisse auf der Seite des aktiven Inhibitor-Pulldowns liegen, werden als Kandidaten angesehen, da sie selektiv vom aktiven Molekül aus dem Lysat gezogen wurden. Diese Methode wird als SILAC bezeichnet, was von „stable isotope labeling with amino acids in cell culture“ abgeleitet wurde.

Ein erfolgreiches Beispiel für die Identifizierung von Zielproteinen im Rahmen eines chemisch-genetischen Ansatzes wurde 2007 von der Gruppe um Schultz veröffentlicht. Sie testeten eine Substanz-Bibliothek mit 100.000 Mitgliedern auf ihre Aktivität in einem zellbasierten Assay zur Untersuchung des Wnt- β -Catenin-Signalwegs.^[38] Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Organismen, ist aber auch für die Entstehung verschiedener Krankheiten verantwortlich. So reguliert er neben der Zellmorphologie auch die Beweglichkeit, Proliferation und Differenzierung der Zellen. Eine unkontrollierte Regulierung des Wnt-Signalwegs führt zu Krebs, Osteoporose und neurodegenerativen Erkrankungen.

In einem zellbasierten Screen identifizierten Schultz et al. das Purin-Derivat QS11 **16** (Abbildung 8), welches den Wnt-Signalweg in Gegenwart von Wnt-3a aktiviert.

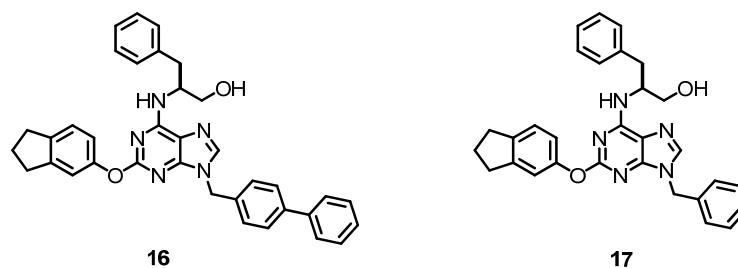


Abbildung 8: Chemische Strukturen des Wnt-Synergisten QS11 **16** und des inaktiven Kontrollmoleküls **17** zur Affinitätschromatographie.

Durch Affinitätschromatographie mit den Verbindungen **16** und **17** konnte das GTPase-aktivierende Protein des ADP-regulierenden Faktors 1 (ARFGAP1) als Interaktionspartner von QS11 massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Bindung von ARFGAP1 an QS11 wurde weiterhin durch Western-Blot-Experimente mit spezifischen Antikörpern bestätigt und mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz konnte die Bindung zwischen Inhibitor und Protein mit einem K_d von 620 nM charakterisiert werden. Weitere funktionale Assays bestätigten zudem die Hemmung von ARFGAP1 durch QS11 und zeigten, dass der Inhibitor die Wnt-Signalkaskade vermutlich über einen Effekt auf die Migration von Proteinen beeinträchtigt. In Übereinstimmung mit der Hemmung von ARFGAP1 durch QS11 wird auch die Migration von ARFGAP1 überexprimierenden Brustkrebszellen durch QS11 verhindert.^[38]

Dieses Beispiel zeigt, dass Affinitätschromatographie mit den entsprechenden Kontrollverbindungen eine erfolgreiche Methode zur Identifizierung von Zielproteinen bekannter Inhibitoren darstellt. Des Weiteren verdeutlicht diese Studie, dass an das eigentliche Auffinden des Bindungspartners diverse Experimente zur Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner angeschlossen werden müssen. Generell werden Versuche zur Charakterisierung der Bindungsstärke, wie in diesem Beispiel Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, aber auch funktionale Assays, die den Einfluss des Inhibitors auf die biochemischen Funktionen der identifizierten Zielproteine untersuchen, eingesetzt.

Alternativ zur Affinitätschromatographie wurden in den letzten Jahren weitere Methoden zur Identifizierung von Bindungspartnern entwickelt, so z. B. genetische Methoden wie das Phagen-Display^[39], Yeast-three-Hybrid-Systeme (Y3H)^[40, 41] oder Proteom-basierte Ansätze wie Protein-Mikroarrays^[42, 43].

2.2 Die Untersuchung des Ras-Signalwegs mittels chemischer Genomik

Die unterschiedlichen Funktionen der Zelle werden durch komplexe Signalwege reguliert, deren Störung zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Krebs führen kann. Einen dieser elementaren Signalwege stellt die Ras/Raf/MAPK-Kaskade dar.

Das Ras-Protein gehört zur Familie der kleinen GTPasen. Sie haben ein Molekulargewicht von 20 - 25 kDa und binden Guanin-Nucleotide.

Ras fungiert als molekularer Schalter, der zwischen aktiver GTP- (Guanosin-Triphosphat) und inaktiver GDP (Guanosin-Diphosphat)-gebundener Form hin- und herwechseln kann. Auf diesem Weg reguliert die durch Ras induzierte Signalkaskade wichtige zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose.^[44, 45] Da die intrinsische GTPase-Aktivität gering ist, bedarf es regulatorischer Unterstützung durch Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF = Guanine nucleotide Exchange Factors) und GTPase-aktivierender Proteine (GAP = GTPase Activating Protein), die die Lebensdauer beider Zustände beeinflussen. In der Ruhestellung bindet Ras GDP, erst durch Aktivierung der GEF wird eine Dissoziation von GDP katalysiert und eine Beladung mit GTP ermöglicht. Nur im GTP-gebundenen Zustand ist Ras aktiv und in der Lage, mit verschiedenen Effektoren zu interagieren, was zur Weiterleitung des Signals führt. Die Signaltransduktion kann durch GAPs gestoppt werden, die die GTPase-Aktivität von Ras beschleunigen.

Allgemeiner Teil

Ein GEF von Ras ist beispielsweise SOS (benannt nach dem *Drosophila*-Gen *Son-of-Sevenless*) (Abbildung 9). SOS agiert als GEF nach einer Rekrutierung an die Plasmamembran. Diese Translokation wird durch Aktivierung und Bindung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie EGF (Epidermal Growth Factor) an GRB2 (Adaptor Protein Growth-Factor-Receptor-Bound Protein 2) ausgelöst. Die Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran erzeugt eine enge Nachbarschaft von SOS zu Ras, was letzteres aktiviert.

Ist Ras aktiv, so ist es in der Lage, mit der nachgelagerten Ser/Thr-spezifischen Protein-Kinase Raf zu interagieren. Die Ras-nachgelagerten Elemente der Signalkaskade werden als downstream-Effektoren bezeichnet. Ist Raf aktiv, so aktiviert es seinerseits durch Phosphorylierung die Protein-Kinase MEK, die dann die Protein-Kinase ERK aktiviert. Diese drei Kinasen bilden das so genannte MAP-Kinase-Modul (Mitogen-Activated Protein Kinase).

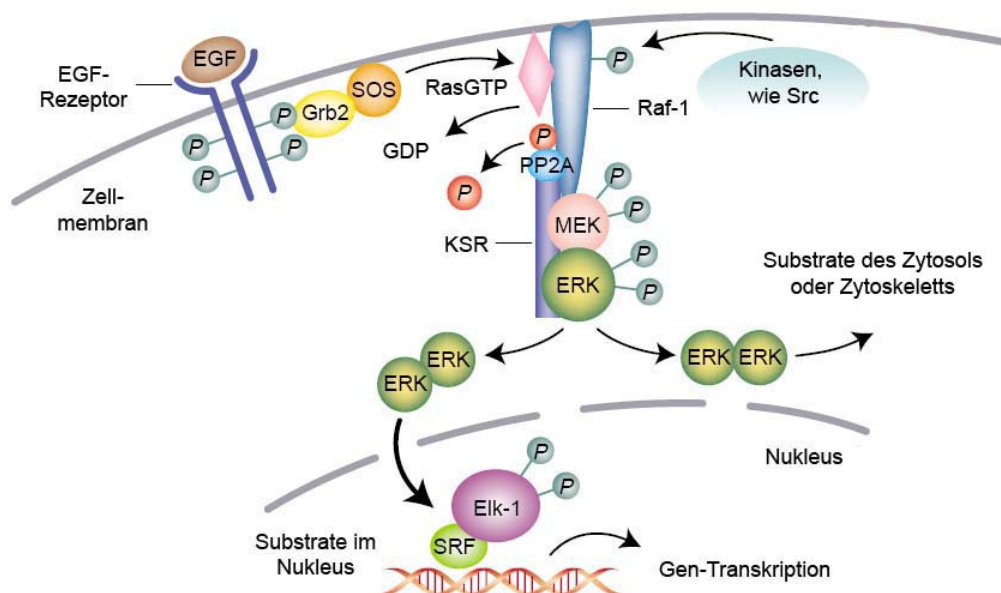


Abbildung 9: Organisation und Funktion des Ras-Signalwegs (nach W. Kolch et al.).^[46]

Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) induziert Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung des Tyrosinrests. Phosphotyrosin dient dann als Andockstelle für Signaltransduktions-Moleküle wie beispielsweise Grb2-SOS-Komplexe. Dies wiederum aktiviert die GTPase Ras durch Stimulierung des Austauschs von GDP (Guanosindiphosphat) durch GTP (Guanosintriphosphat). Mit diesem Austausch geht eine konformative Änderung von Ras einher, welche eine Bindung zu Raf-1 ermöglicht. Dies bewirkt eine Rekrutierung von Raf-1 aus dem Zytosol an die Plasmamembran, wo es durch einen mehrstufigen Prozess aktiviert wird. Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert im Gegenzug MEK, welches wiederum ERK1/2 aktiviert. Die Kaskade wird durch KSR (Kinase Suppressor of Ras) stabilisiert. ERK1/2 hat verschiedene zytosolische Substrate, darunter Proteine des Zytoskeletts, Phospholipase A2

und Signaltransduktionsproteine wie Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Östrogen-Rezeptoren, SOS und andere. Des Weiteren kann ERK in den Zellkern eintreten und kontrolliert hier die Genexpression durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Elk-1.^[46]

Die verschiedenen Funktionen von Ras beschränken sich nicht auf diese eine lineare Signalkaskade. So wurde gezeigt, dass Ras nicht nur durch Rezeptortyrosin-Kinasen (RPTKs), sondern auch durch zytoplasmische Tyrosin-Kinasen wie Src sowie durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert werden kann und durch Wechselwirkung mit verschiedenen Effektoren unterschiedliche Signalkaskaden induziert.

Weitere Effektoren sind die verschiedenen Isoformen der Lipid-Kinase Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)^[47-49], welche sekundäre Boten-Lipide wie Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate generieren, die ihrerseits verschiedene Signalproteine aktivieren, darunter die Kinase AKT/PKB (Abbildung 10).

Andere Ras-Effektoren sind die GEFs des Proteins Ral (RalGDS), welches Transkriptionsfaktoren reguliert, sowie die Phospholipase C ϵ (PLC ϵ), die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Diacylglycerol und Inositol-triphosphat katalysiert. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Mobilisierung von intrazellulären Kalzium-Speichern (Abbildung 10).

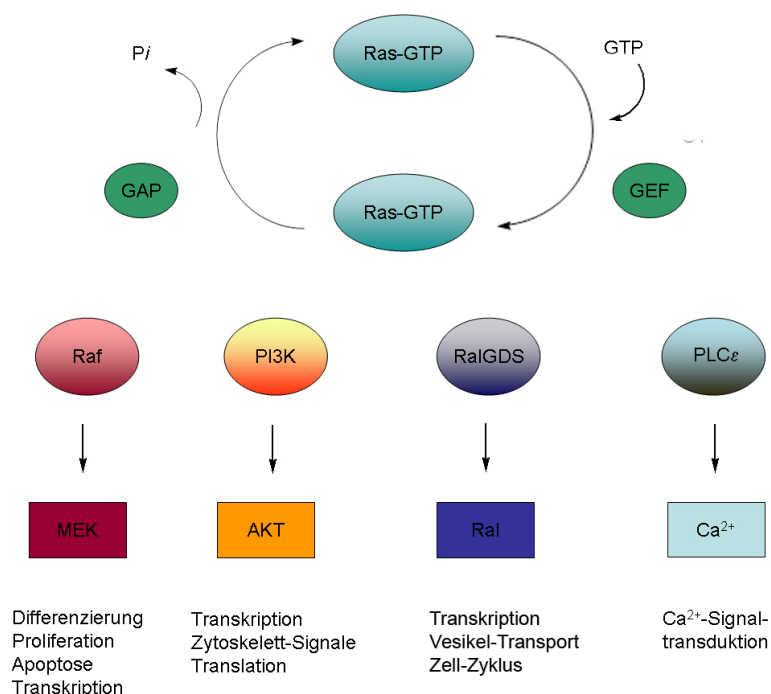


Abbildung 10: Auf Ras folgende Prozesse und ihre Funktionen.

Die Lebenszeit des von Ras ausgelösten Signals ist von der Lebensdauer der aktiven Ras-Spezies abhängig. Wird diese unnatürlich verlängert, beispielsweise durch

Allgemeiner Teil

mutagene Stabilisierung des GTP-gebundenen Zustands, führt dies zu unkontrollierter Zellproliferation. In Übereinstimmung hiermit wurde Ras als Protoonkogen identifiziert.^[50] Bis zu 30 % aller menschlichen Tumore verfügen über ein solches Ras-Onkogen. Auch andere Störungen wie das Fehlen von GAPs^[51], Überaktivierung der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren^[52] und Mutationen in Ras-Effektoren^[53] können eine unkontrollierte Signaltransduktion bewirken. Zusätzlich fungieren auch andere Gene des Ras-Signalweges als Onkogene, was diese Signalkaskade zu einem wichtigen Ziel der Antitumorforschung macht.

Hoch interessant ist auch die Rolle des Ras-Signalwegs im Übergang von Epithel- zu Mesenchymzellen (EMT). Diese Transformation ist für gewöhnlich Teil der embryonalen Morphogenese. Die Zelle wechselt hierbei von einem polarisierten, epithelartigen zu einem freibeweglichen fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Eine solche Morphogenese wird auch mit dem Fortschreiten primärer Tumore zur Metastasenbildung in Verbindung gebracht.^[54]

Neben einem überaktivierten Ras-Signalweg spielt TGF-Signaltransduktion (Transforming growth factor β) eine wichtige Rolle in EMT und Metastasenbildung.^[55] Dies zeigten Janda et al. mit ihren Untersuchungen in polarisierten H-Ras-transformierten Epithelzellen (EpRas). Zusammen mit dem TGF β -Rezeptor bewirkt überaktiviertes H-Ras EMT, was durch spindelförmige Morphologien, den Verlust von Epithelmarkern und Induktion von Mesenchym-Markern charakterisiert wird. H-Ras-transformierte Zellen vollziehen nach Behandlung mit TGF- β eine EMT, die durch Inhibition der Ras-Raf-MAPK-Kaskade mittels des MEK-Inhibitors PD98059 verhindert werden kann. Dies zeigt, dass eine hyperaktive Raf/MAPK-Kaskade für EMT und somit Metastasenbildung nötig ist und verdeutlicht die Synergie zwischen dem Ras-Signalweg und dem TGF β -Rezeptor.

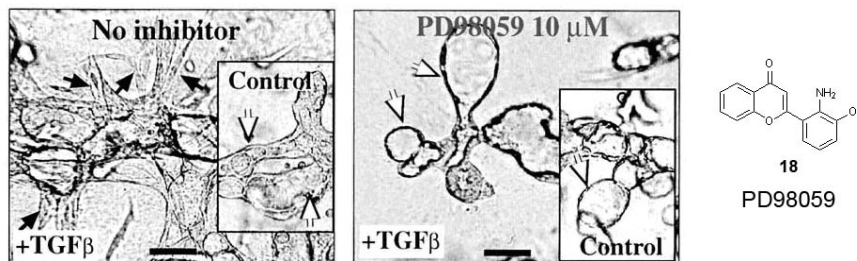


Abbildung 11: Reversion von EMT induziert durch TGF β und onkogenes Ras mit dem MEK-Inhibitor PD98059 **18**. Das linke Bild zeigt spindelförmige unbehandelte Zellen, während im rechten Bild die rücktransformierten PD98059-behandelten Zellen gezeigt sind. Die in den Ausschnitten gezeigten Zellen wurden jeweils nicht mit TGF β behandelt und zeigen als Kontrolle den Phänotyp der Zellen vor Induktion von EMT.

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg kann in Zusammenhang mit Effektoren von Ras und TGF- β ebenfalls EMT hervorrufen. Beispielsweise führt eine transkriptionale Unterdrückung von E-Cadherin zu einem erhöhten β -Catenin-Level im Zytoplasma. Dies führt zu einer verstärkten Transkription von TCF/LCF-Genen (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor), die wiederum Proliferation und EMT bewirken.^[56] Auf einen Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Expression und EMT wird auch in Kapitel 4.4.1.1 noch eingegangen.

Werden Zellen mit einem onkogenen Ras- oder Wnt-Gen transfiziert, löst dies EMT-artiges Verhalten aus.^[57] Diese morphologischen Änderungen ermöglichen den Einsatz dieser transformierten Zelllinien in phänotypischen Assays und erlauben eine direkte Beobachtung der Effekte chemischer Substanzen auf den aktivierten Ras-Signalweg.

2.3 Tetramsäuren als Ausgangspunkt für die Synthese von Substanz-Kollektionen

Als Tetramsäuren werden Derivate des heterozyklischen Pyrrolidin-2,4-dion-Grundgerüsts bezeichnet. Sie finden sich in verschiedensten Naturstoffen. Vertreter dieser Substanzklasse wurden bisher sowohl aus terrestrischen, als auch marinen Spezies, wie z.B. Schwämmen, Bakterien und Pilzen isoliert. Ihr Wirkungsspektrum reicht von antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften über Zyto- und Mycotoxizität bis zu Antitumor- und fungiziden Aktivitäten.^[58]

Ein Großteil der natürlich vorkommenden Tetramsäuren trägt einen Acyl-Substituenten in Position drei des Tetramsäurekopfs (Abbildung 12). Im Prinzip können sie neun verschiedene Tautomere bilden, von denen aber lediglich vier in Lösung nachweisbar sind.

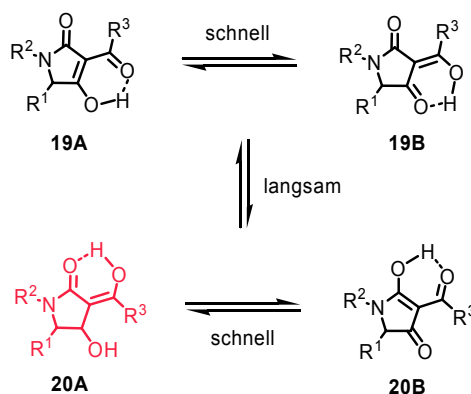


Abbildung 12: Tautomere von 3-Acyltetramsäuren.

Allgemeiner Teil

Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen den internen Tautomerenpaaren **19A** und **19B** sowie **20A** und **20B** (Abbildung 12) erfolgt schnell über einen Protonentransfer entlang der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung, während ein Übergang zwischen den Tautomeren **19A/B** zu **20A/B** auf einer Rotation der Acyl-Seitenkette beruht und wesentlich langsamer verläuft. Steyn und Wessel konnten durch NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass für die einfache 3-Acetyl-5-isopropyl-tetramsäure ($R^3 = \text{CH}_3$, $R^1 = i\text{-Pr}$) das *exo*-Enol (rot) als überwiegendes Tautomer sowohl in Lösung als auch im kristallinen Zustand vorliegt.^[59, 60]

Ihre interessanten biologischen Eigenschaften sowie die anspruchsvolle strukturelle Komplexität machen diese Substanzklasse zu einem interessanten Ziel chemisch-genetischer Ansätze.

2.3.1 Biologisch aktive Tetramsäuren

Aufgrund der ohnehin im Molekül auftretenden Wasserstoffbrückenbindung koordinieren 3-Acyltetramsäuren Metallionen als Chelatkomplexe zwischen dem 3-Acyl-Sauerstoff und der 2-Carbonylgruppe. Die Stabilität einiger Tetramsäuren beruht auf der Chelatisierung bestimmter Metallkationen. Auch ermöglichen diese bisweilen den Transport der Naturstoffe durch Zellmembranen.^[61]

Den einfachsten Vertreter natürlich vorkommender Tetramsäuren stellt das bekannte Phytotoxin *L*-Tenuazonsäure **21** dar. Es wurde ursprünglich aus Kulturen von *Alternaria alternata* isoliert und liegt als eine Mischung von Magnesium- und Kalziumchelaten ($\text{Ca}(\text{TS})_2$ oder $\text{Mg}(\text{TS})_2$) vor, welche diverse biologische Eigenschaften zeigen. So konnte eine Hemmung verschiedener Viren, wie Poliovirus MEF-1, Parainfluenza-3, Vaccina und Herpes simplex HF nachgewiesen werden.^[62] Als Kupferkomplex zeigt Tenuazonsäure zudem antibakterielle Wirkung gegen die Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*.^[63] Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sie auch das Wachstum von *Paenibacillus larvae*, den Auslöser einer amerikanischen Bienenkrankheit, inhibiert. Hierbei zeigt Tenuazonsäure eine vergleichbare Wirksamkeit (MIC von 32 $\mu\text{g/ml}$) wie das derzeitig eingesetzte Antibiotikum Oxytetracyclin.^[64]

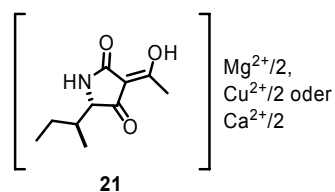
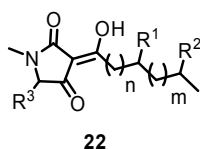


Abbildung 13: Struktur von Tenuazonsäure **21**.

Die Melophline **22** sind *N*-Methyl-3-Acyltetramsäuren, die sich lediglich in ihren Substituenten am C5 des Pyrrolidin-2,4-dionsystems (H oder Methyl) und in ihren Acyl-Seitenketten unterscheiden. Die Seitenketten erreichen eine Länge von 12 bis 16 Kohlenstoffatomen und kommen sowohl verzweigt als auch unverzweigt vor (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Natürlich vorkommende Melophline.



	Melophlin	R ³	R ¹	R ²	n	m
23	A	Me	H	H	12	0
24	B	Me	Me	H	2	6
25	C	H	Me	H	3	5
26	D	H	H	H	11	0
27	E	H	H	Me	11	0
28	F	H	Me	H	11	0
29	G	H	H	H	10	0
30	H	H	H	Me	10	0
31	I	H	Me	H	10	0
32	J	Me	H	H	10	0
33	K	H	H	H	9	0
34	L	Me	H	H	9	0
35	M	Me	H	H	8	0
36	N	Me	H	Me	8	0
37	O	Me	Me	H	8	0
38	P	Me	H	H	12	0
39	Q	Me	H	Me	10	0
40	R	Me	Me	H	10	0
41	S	Me	Me	H	3	8

Die Melophline A und B (**23**, **24**) wurden im Jahr 2000 von Kobayashi et al. aus dem indonesischen Schwamm *Melophlus sarasinorum* von den Spermonde-Inseln isoliert.

Allgemeiner Teil

Sie zeigen Zytotoxizität gegen HL-60 Zellen bei 0.2 und 0.4 µg/ml. Außerdem führen sie zu einer Reversion des Phänotyps Ras-transformierter NIH/3T3-Fibroblasten und arretieren NIH/3T3-Fibroblasten in der G₁-Phase des Zellzyklus bei Konzentrationen von 1-5 µg/ml.^[65] Proksch et al. isolierten dreizehn weitere Analoga (Melophline C-O, **25-37**) aus demselben Schwamm aus dem Gebiet um Saragossa.^[66] In 2006 wurde die Familie der Melophline von Namikoshi um die Mitglieder P-S (**38-41**) erweitert, die ebenfalls aus einer Spezies von *Melophlus sarasinorum* extrahiert wurden.^[67]

Die Melophline C, E, G, H, I, M, N und O zeigen keinerlei Zytotoxizität in HeLa, HL-60 oder TF-1 Zellen. Melophlin C soll antibakterielle Wirkung gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* sowie antifungizide Eigenschaften gegen *Candida albicans* aufweisen.^[66]

Namikoshi et al. untersuchten elf Melophline auf ihre Wirkung auf Fibroblasten V79 aus Hamsterlungen, in welchen lediglich die Melophline H und O Aktivität zeigten. Keine der Substanzen hatte zudem Einfluss auf die Konzentration von Zytokin IL-8 in PMA-stimulierten HL-60 Zellen.^[68]

Erst kürzlich führten Schobert et al. eine Struktur-Wirkungs-Analyse mit sieben strukturell-unterschiedlichen Melophlinen durch, in welcher die 5-Methyl-Melophline B, C, P, Q und R vor allem gegen Gram-positive Bakterien antibakteriell wirkten. Die Studie zeigte zudem, dass die Melophline B, C und R mit methyl-verzweigten Seitenketten das Wachstum von Maus-L929-Fibroblasten, A-498 Nierenkrebszellen und KB-3-1-HeLa Gebärmutterhalskrebszellen mit IC₅₀-Werten unter 10 µM inhibieren.^[69]

In 2002 wurde Vancoresmycin **42**, eine neue, komplexere Tetransäure mit bisher ungeklärter Stereochemie aus dem Ferment des Strahlenpilzes *Amycolaptosis* sp. ST 101170 isoliert.^[70] Strukturell besonders interessant ist bei dieser Substanz die lange, sauerstoffhaltige Alkylkette (Abbildung 14). Vancoresmycin zeigt starke antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, darunter auch *Staphylococcus aureus* (MIC < 0.04 µg/ml), *Enterococcus faecalis* (MIC = 0.3 µg/ml) und gegen Vancomycin-resistente Stämme wie *Enterococcus* spp., während auf Gram-negative Bakterien oder Pilze keine Wirkung nachgewiesen werden konnte.

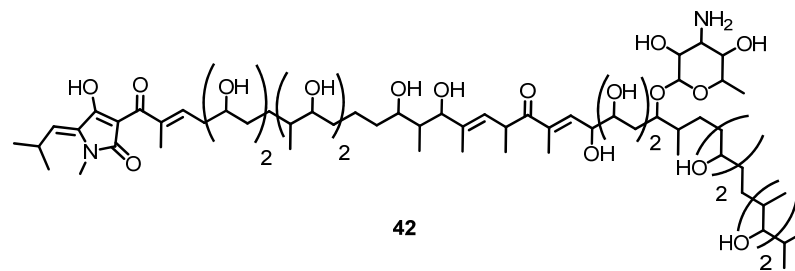


Abbildung 14: Struktur der Tetransäure Vancoresmycin **42**.

Tirandalydigin **43** ist eine 3-Oligoenoyl-Tetransäure, die 2002 aus *Streptomyces tirandis* subsp. *umidus* isoliert wurde (Abbildung 15).^[71] Auch sie zeigt ein breites Spektrum antibiotischer Aktivitäten, insbesondere gegen anaerobe Bakterien, wie *Bacteroides fragilis* (MIC 0.5 mg/ml). Der Wirkmechanismus von Tirandalydigin beruht auf der Hemmung der bakteriellen RNA-Polymerase.^[72]

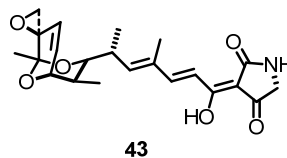


Abbildung 15: Struktur der Tetransäure Tirandalydigin **43**.

Integramycin **44** ist eine der so genannten 3-Decalinoyl-Tetransäuren. Strukturell besonders interessant ist das sechsgliedrige Ringsystem (Abbildung 16). Sie wurde 2002 von Singh et al. aus *Actinoplanes* sp. isoliert und zeigt eine Hemmung der rekombinanten HIV-1 Integrase Strang-Transfer-Reaktion mit einem IC₅₀ von 4 µM.^[73]

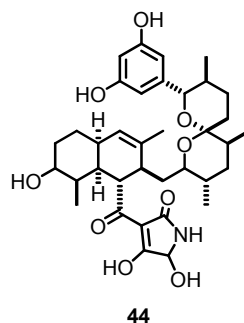


Abbildung 16: Struktur von Integramycin **44**.

Unter den makrozyklischen Tetransäuren stehen die Macrocidine A **45** und B **46** (Abbildung 17) hervor. Sie wurden 2003 von Graupner et. al als phytotoxische Metaboliten des Pilzes *Phoma macrostoma* Montagen, der ein schwaches Pflanzenpathogen und Wundparasit ist, extrahiert.^[74] Sie verursachen chlorotische Flecken auf Pflanzenblättern sowie Nekrose in Holzgewächsen und Unkräutern und bewirken Schwarzfäule in Artischockenblättern. Der genaue Wirkmechanismus bleibt allerdings ungeklärt.

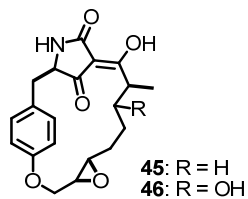


Abbildung 17: Strukturen der Macrocidine A **45** und B **46**.

Des Weiteren wurden peptidische Tetramsäuren als Naturstoffe isoliert. Die Familie der Dolastatine beinhaltet verschiedene lineare und zyklische antineoplastische und zytostatische Peptide.^[75] Die ersten wurden aus dem Seehasen *Dolabella auricularia* isoliert. Eine der potentesten Verbindungen dieser Klasse, Dolastatin 15 **47** (Abbildung 18), trägt ein Tetramat am C-Terminus. Dolostatin 15 induziert Apoptose über den Arrest des Zellzyklus am G2/M Checkpunkt und aktiviert sowohl mitochondriale als auch Fas(CD95)/Fas-L(CD95-L)-vermittelte Signalwege. Des Weiteren hemmt es Angiogenese.

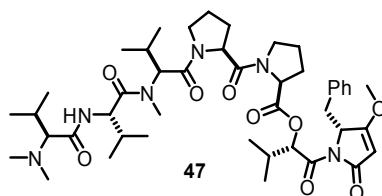


Abbildung 18: Struktur von Dolastatin 15 **47**.

Ein synthetisches Analogon LU 103793 wird derzeit in klinischen Studien (Phase III) in Patienten mit metastierendem Brustkrebs getestet. Die Dolastatine, darunter auch das synthetische LU 103793, binden an die Vinca-Domäne von Tubulin und stören die Ausbildung der Microtubuli. Über einen ähnlichen Mechanismus blockieren sie zusätzlich das Wachstum und die Entwicklung von Malaria-Parasiten.^[76]

2.3.2 Synthesen von Tetramsäuren

2.3.2.1 Lacey-Dieckmann-Zyklisierung

Die erste Synthese einer 3-Acyltetramsäure wurde 1954 von Lacey vorgestellt (Abbildung 19).^[77]

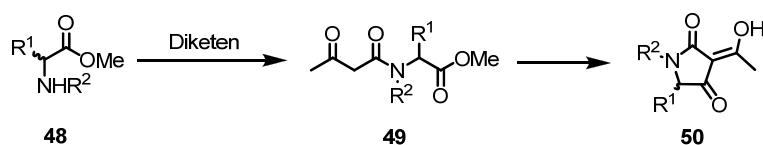


Abbildung 19: Lacey-Dieckmann-Zyklisierung zur Darstellung von 3-Acyltetramsäuren **50**.

Die Originalsynthese umfasst die Kondensation des α -Aminosäureesters **48** mit Diketen, was zur Bildung von *N*-Acetoacetyl- α -aminosäureester **49** führt. Dieser wird weiter in einer Dieckmann-Zyklisierung mit Natriummethanolat zur 3-Acyltetramsäure **50** zyklisiert.

Bis heute ist dies die am häufigsten eingesetzte Methode zur Darstellung von 3-Acyltetramsäuren.^[58] Selbst die jüngsten beschriebenen Totalsynthesen komplexer Tetramsäure-haltiger Naturstoffe nutzen die Lacey-Dieckmann-Zyklisierung zum Aufbau des Tetramsäure-Grundgerüsts (Abbildung 20). So wurden in den letzten Jahren zwei Synthesen des Tetramsäure-Macrolactams Cyclindramid A von den Gruppen Laschat^[78] und Phillips^[79] veröffentlicht, in denen der Tetramsäure-Kopf durch Lacey-Dieckmann-Zyklisierung aufgebaut wurde (Abbildung 20).

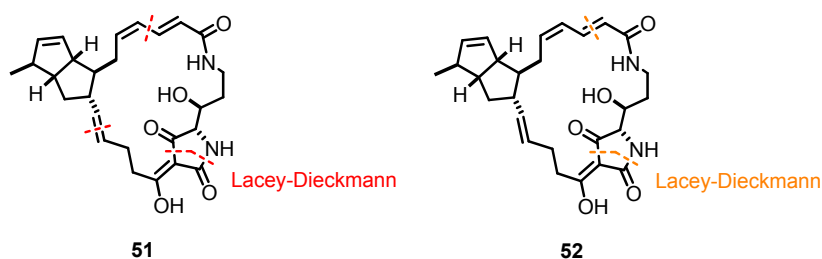


Abbildung 20: Retrosynthetische Analyse von Cyclindramid A nach Laschat **51** und Phillips **52**.

Eine Synthese für ein Analogon der komplexen ebenfalls makrozyklischen Tetramsäuren Macrocidin A und B (Abbildung 17) veröffentlichte 2006 die Gruppe um Ramana.^[80] Auch in dieser Synthese beruht der Aufbau der Tetramsäure-Einheit auf einer Lacey-Dieckmann-Zyklisierung.

Verschiedene Gruppen beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Optimierung dieser Reaktion. Hauptsächlich wurde an der Einführung modifizierter Acyl-Substituenten in Position drei, aber auch an der Übertragung auf andere Aminosäuren und der Entwicklung milderer Zyklisierungsbedingungen gearbeitet.^[81, 82]

Die vermutlich bedeutendste Weiterentwicklung der Synthese von Tetramsäuren wurde von Ley et al. entwickelt. Ihre Strategie beruht auf dem Einsatz von *tert*-Butyl-3-oxobutanthioat und seinem 4-Diethylphosphono-Derivat zur Synthese verschiedenster β -Ketoamide, welche anschließend mittels Lacey-Dieckmann-Zyklisierung zur Tetramsäure geschlossen werden können.^[83, 84] Auf diese Methode wird in 4.3 näher eingegangen.

2.3.2.2 Dominosequenz zur Darstellung von Tetramsäuren

Die Arbeitsgruppe um Schobert entwickelte eine Methode zur Darstellung von 3-Acyltetramsäuren, die von α -Aminosäureestern **53** ausgeht und durch eine Addition-Wittig-Alkenylierungssequenz unter milden Bedingungen den Tetramsäurekopf aufbaut.^[65] Der Ringschluss findet in dieser Sequenz unter neutralen und somit nicht-razemisierenden Bedingungen statt. Die Methode wurde zur Darstellung der Melopline A-G **23-29** entwickelt und konnte kürzlich auch auf die Synthese der Melopline P, Q und R **38-40** ausgeweitet werden.^[69]

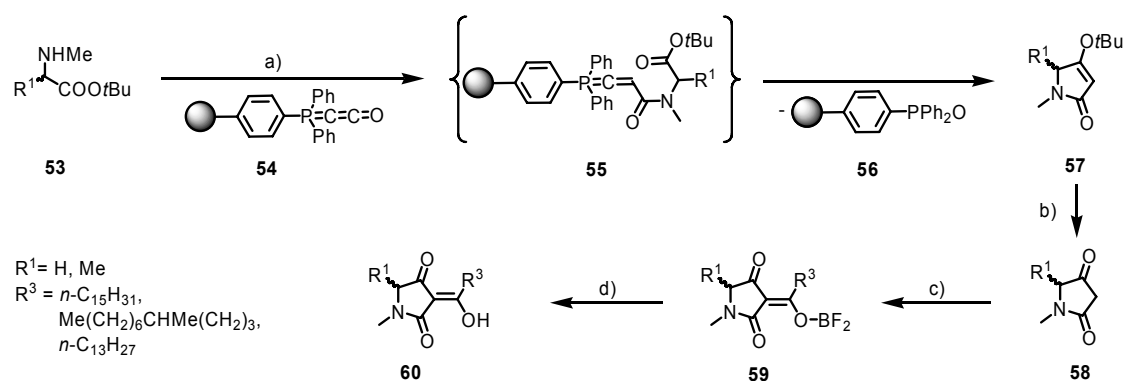


Abbildung 21: Vierstufige Synthese der Melopline A, C und G ausgehend von Sarcosin- oder Methylalanin-*tert*-butylester **53**, immobilisiertem (Triphenylphosphoranyliden)keten **54** und Carbonsäurechloriden. a) THF, 60 °C, 10 h oder Mikrowelle, 120 °C, 30 min; b) TFA, RT, 3 h, 99 %; c) $R^3\text{COCl}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Mikrowelle, 100 °C, 45 min, 47 – 56 %; d) Methanol, RF, 2 h, 91 %.

Exemplarisch ist die Darstellung der in Position fünf unsubstituierten Melopline A **23**, C **25** und G **29** aus Sarcosin-*tert*-butylester gezeigt. Letzterer wird mit Ketenylidetriphenylphosphoran **54** umgesetzt, das an einem Polystyrol-Harz immobilisiert wurde und *N*-Methyl-4-*tert*-butoxypyrrolin-2-on **57** als Produkt der Domino-Addition-Wittig-Alkenylierungssequenz ergab. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt quantitativ mit TFA und ergab *N*-Methylpyrrolidin-2,4-dion **58**. Die Acylseitenketten wurden anschließend mit den entsprechenden Carbonsäurechloriden und BF_3 -Diethyletherat unter Mikrowellen-Bestrahlung eingeführt. Diese Methode ließ sich sowohl für die in Position fünf unsubstituierten Melopline A und G als auch für die substituierten Derivate B, C, P, Q und R einsetzen^[69].

2.3.2.3 Weitere enantioselektive Synthesen von Tetramsäuren

Jouin et al. entwickelten eine Methode zur Darstellung optisch reiner Tetramsäuren durch thermische Umlagerung von Meldrumsäure-Derivat **63**, welches durch Kondensation von Meldrumsäure **62** mit geschützten Aminosäuren in Gegenwart von Isopropenylchloroformiat und DMAP synthetisiert wurde (Abbildung 22).^[86] Vier Jahre

später setzten Pettit et al. diese Methode zur enantioselektiven Darstellung des zyklischen Peptids Dolastatin **47** (2.3.1) ein.^[87]

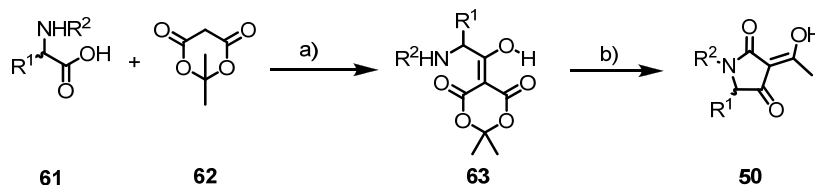


Abbildung 22: Synthese des Tetramsäure-Grundgerüsts **50** nach Jouin. a) Isopropenylchloroformiat, DMAP, CH₂Cl₂, -5 °C, 2h; b) Essigester, RF, 20 min.

Viele weitere Methoden zur Synthese von Tetramsäuren wurden bisher beschrieben. Aufgrund ihrer eingeschränkten Anwendungsmöglichkeiten haben sie allerdings keine größere Bedeutung erlangen können.^[58]

2.3.2.4 Festphasensynthesen zur Darstellung von Tetramsäuren

Zur Darstellung von Tetramsäure-Bibliotheken wurden in den letzten Jahren mehrere Synthesen an polymeren Trägermaterialien entwickelt. Der Großteil dieser Methoden beginnt mit der Immobilisierung geschützter Aminosäuren an funktionalisierten Harzen und endet mit Dieckmann-Zyklisierungen, die simultan zur Abspaltung genutzt werden (Abbildung 23 A). Unterschiede bestehen vor allem in den Reagenzien und den Bedingungen des Abspaltungsschritts.

Beispielsweise wurde die Zyklisierung von an Position fünf unsubstituierten Tetramsäuren mit Natriumethanolat unter Erhitzen auf 85 °C beschrieben.^[88] Strukturell ähnliche Derivate konnten auch von Ganesan et al. dargestellt werden, die Tetrabutylammoniumhydroxid zur Zyklisierung nutzten. Die Synthese verlief erfolgreich, hatte aber den Nachteil, dass stark saure Ionentauscher (Amberlyst A-15) zur Entfernung von überschüssigem Reagenz aus der Reaktionsmischung eingesetzt werden mussten.^[89]

Weber et al. beschrieben die Synthese von in Position fünf des Ringsystems substituierten Tetramsäuren an der festen Phase.^[90] Die gewünschten zyklisierten Produkte wurden mit DIPEA unter Erwärmen des Trägermaterials abgespalten, was allerdings zu einer Razemisierung der Stereozentren (ehemalige α -Position der eingesetzten Aminosäuren) führte. Die Synthese optisch reiner Tetramsäuren gelang erst Romoff et al., welche die Abspaltung und Zyklisierung der Tetramsäuren durch den Einsatz von KOH in Methanol erzielten (Abbildung 23A).^[91]

Allgemeiner Teil

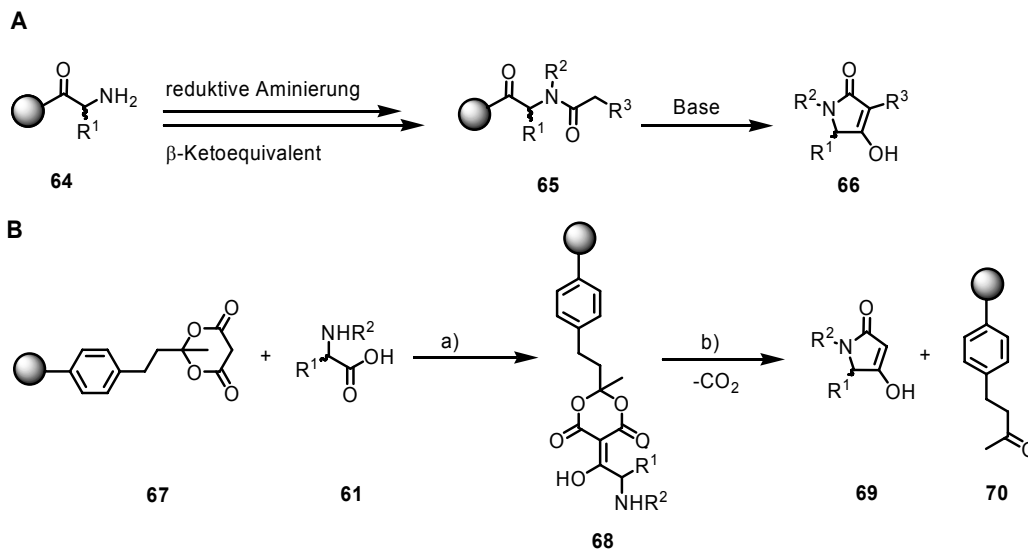


Abbildung 23: Festphasen-Synthese von Tetramsäuren: A) Dieckmann-Zyklisierung und B) nach Huang.^[92] a) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 8 – 12 h; b) Essigester oder CHCl₃, RF.

Ausgehend von einem polymer-gebundenen zyklischen Malonester **67** entwickelte auch die Gruppe um Huang eine effiziente Synthese optisch aktiver Tetramsäuren an polymeren Trägern.^[92] Auf Merrifield-Harz wurde zyklischer Malonester immobilisiert, was zu Verbindung **67** (Abbildung 23B) führte. Anschließend folgte eine C-Acylierung der Meldrumsäure mit geschützten Aminosäuren **61** unter Zugabe von DCC und DMAP. Im letzten Schritt konnten die Tetramsäuren durch Erwärmen in Chloroform oder Essigester zyklisiert und vom Harz gespalten werden. Unter den Reaktionsbedingungen blieb die Stereochemie der eingesetzten Aminosäuren erhalten. Allerdings ist die Synthese auf Tetramsäuren **69** limitiert, die keine Acyl-Substituenten in Position drei tragen.

Die Gruppe um Schmidt synthetisierte 2006 mittels einer Festphasenstrategie eine Bibliothek von Tetramsäuren, mit welcher auf mögliche Inhibitoren der β -Secretase (BACE-1) gescreent wurde.^[93] BACE-1 ist ein Mitglied der Familie der Aspartyl-Proteasen und spielt eine wichtige Rolle in der abnormalen Spaltung des β -Amyloid Vorläufer-Proteins (β -APP; Amyloid Precursor Protein). Die BACE-1 vermittelte Spaltung führt zum Aufbau von β -Amyloidpeptiden und infolgedessen zur Ausbildung von amyloiden Plaques, die im Verdacht stehen für den Ausbruch von Alzheimer mitverantwortlich zu sein. Dementsprechend stellen BACE-1-Inhibitoren mögliche Medikamente gegen Alzheimer dar.^[61]

Die Tetramsäuren wurden ausgehend von Wang-Harz und geschützten Aminosäuren über die bereits in Abbildung 23A beschriebene Festphasensynthese synthetisiert. Anstelle der bisher beschriebenen β -Ketoäquivalente wurden die immobilisierten

Amine **64** mit Thiosäurederivaten **73**, PyBOP, HOBT und DIPEA zu den entsprechenden Amiden **74** umgesetzt (Abbildung 24). Diese wurden daraufhin baseninduziert cyclisiert und vom Harz gespalten. Nachfolgend wurden die synthetisierten Tetramsäuren **75** in einem FRET-basierten Assay untersucht, und es konnten erfolgreich Inhibitoren der β -Secretase (BACE-1) identifiziert werden. Eine der aktivsten Substanzen ist die in Abbildung 24 dargestellte Verbindung **76** mit einem IC_{50} von 60 μ M.

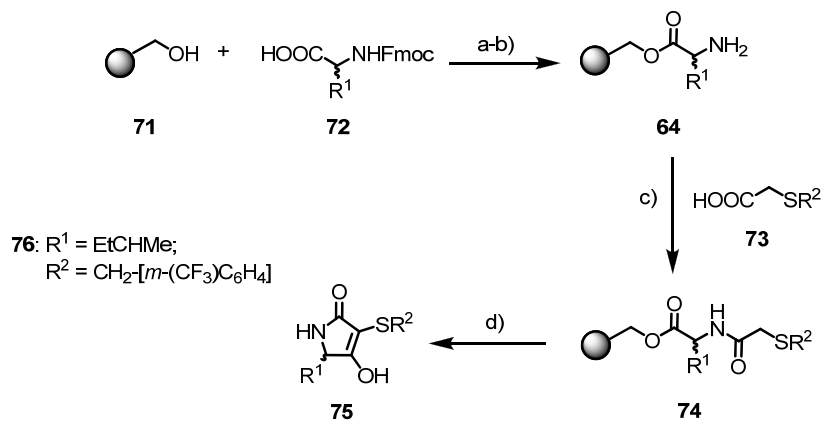


Abbildung 24: Festphasen-Synthese von β -Secretase-Inhibitoren **75**. a) 2,6-Dichlorbenzoylchlorid, Pyridin, RT, 20 h; b) 20 % Piperidin, DMF, RT, 2 h; c) PyBOP, HOBT, DIPEA, DMF, RT, 20 h; d) KO t Bu, THF, RT, 1 h.

Das gezeigte breite Spektrum natürlich vorkommender Tetramsäuren und die Vielfalt an biologischen Aktivitäten sowie die verschiedenen synthetischen Zugänge machen Tetramsäuren zu einem interessanten Ziel für die Bearbeitung chemisch-genetischer Fragestellungen.

3. Motivation und Ziel der Arbeit

In der chemischen Genetik besteht ein großer Bedarf an neuen niedermolekularen Substanzen als Liganden für bisher nicht gezielt inhibierbare Proteine, um mittels dieser Modulatoren unbekannte Zusammenhänge aufdecken zu können.

Ein besonders interessantes Ziel für chemisch-genetische Untersuchungen stellt der Ras-Signalweg dar. Diese Kaskade reguliert wichtige Zellprozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Transkription. Des Weiteren wurde das Ras-Onkogen in vielen menschlichen Tumoren als Ursache von Krebserkrankungen identifiziert. Neue Modulatoren dieses Signalwegs sind somit nicht nur als potentielle Therapeutika von großem Interesse. Vielmehr könnten sie auch in der Aufklärung der komplexen Zusammenhänge um den Ras-Signalweg eingesetzt werden.

Tetramsäuren sind eine interessante Naturstoffklasse mit vielfältigem biologischen Aktivitätsspektrum. In diesem Zusammenhang sind die von Kobayashi et al. isolierten Tetramsäuren Melophlin A und B^[65] von Bedeutung, denn erste biologische Untersuchungen zeigten, dass diese Substanzen eine Reversion des Phänotyps H-Ras-transformierter NIH3T3-Fibroblasten bewirken. Dies macht die Verbindungen zu einem interessanten Ausgangspunkt für die Synthese einer Naturstoff-inspirierten-Substanz-Kollektion, welche neue Modulatoren des Ras-Signalwegs liefern könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die in Kapitel 2.3.2.4 beschriebene Festphasen-Synthese von Romoff^[91] aufgegriffen und für die Darstellung einer Kollektion von Melophlin A-inspirierten 3-Acyltetramsäuren optimiert werden. Diese Synthesesequenz erlaubt in jedem Reaktionsschritt Diversität zu erzeugen, um eine möglichst vielseitige Sammlung von Melophlin-Analoga zu generieren.

Im Folgenden sollte sowohl die Wirkung von Melophlin A als auch die der synthetisierten Derivate auf den aktivierten Ras-Signalweg untersucht werden. Dies sollte mittels eines phänotypischen Assays in H-Ras-transformierten MDCK-F3-Zellen realisiert und mit einem HLR-Elk-1 *Trans*-Reportergensystem weiter charakterisiert werden.

Wenn möglich sollten die aus den biologischen Assays generierten Daten zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse herangezogen werden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte es letztlich möglich werden, über einen Affinitätschromatographischen Ansatz die molekularen Angriffspunkte von Melophlin A zu charakterisieren. Hierzu würden sowohl aktive als auch inaktive Analoga von Melophlin A benötigt, die über ein Linkersystem an einem Trägermaterial immobilisiert

werden können. Dabei sollte zwischen dem aktiven und dem inaktiven Analogon eine möglichst hohe strukturelle Ähnlichkeit bestehen.

Die Identifizierung potentieller Bindungspartner von Melophlin A sollte massenspektrometrisch erfolgen. Im Falle eines erfolgreichen Auffindens von Proteinen, die lediglich mit dem aktiven, nicht aber mit dem inaktiven Analogon wechselwirken, sollte die Bindung zwischen Inhibitor und Zielprotein weiter untersucht werden. Hierzu wurden Western-Blot-Experimente mit spezifischen Antikörpern zur Validierung der identifizierten Proteine angedacht. Weiterhin sollte die Bindung zwischen Melophlin A und seinen potentiellen Interaktionspartnern charakterisiert werden. Dies könnte mit Oberflächen-Plasmonen-Resonanz realisiert werden.

Wenn möglich sollte im letzten Schritt untersucht werden, ob Zusammenhänge zwischen den potentiellen Bindungspartnern von Melophlin A, deren biochemischen Funktionen in der Zelle und dem Ras-Signalweg existieren, die möglicherweise den von Kobayashi in NIH3T3-Zellen beobachteten Effekt erklären würden.

Zusammenfassend war es Ziel dieser Arbeit, ausgehend von einer synthetisierten durch den Naturstoff Melophlin A inspirierten Substanz-Bibliothek Modulatoren des Ras-Signalwegs zu identifizieren. Weiterhin sollte der von Melophlin A hervorgerufene Phänotyp untersucht und die verantwortlichen Interaktionspartner in der Zelle identifiziert werden.

4. Spezieller Teil

4.1 Synthese einer Tetramsäurebibliothek

4.1.1 Syntheseplan

Ausgehend von einer Festphasenstrategie soll eine diverse Kollektion an Tetramsäuren, speziell Analoga der 3-Acyltetramsäuren Meloplin A und B synthetisiert werden. Diese sollte so gestaltet sein, dass in jedem Reaktionsschritt Diversität erzeugt werden kann, was durch den Einsatz von Aminosäuren, verschiedenen Aldehyden und Acylierungsreagenzien als Synthesebausteine realisiert wird.

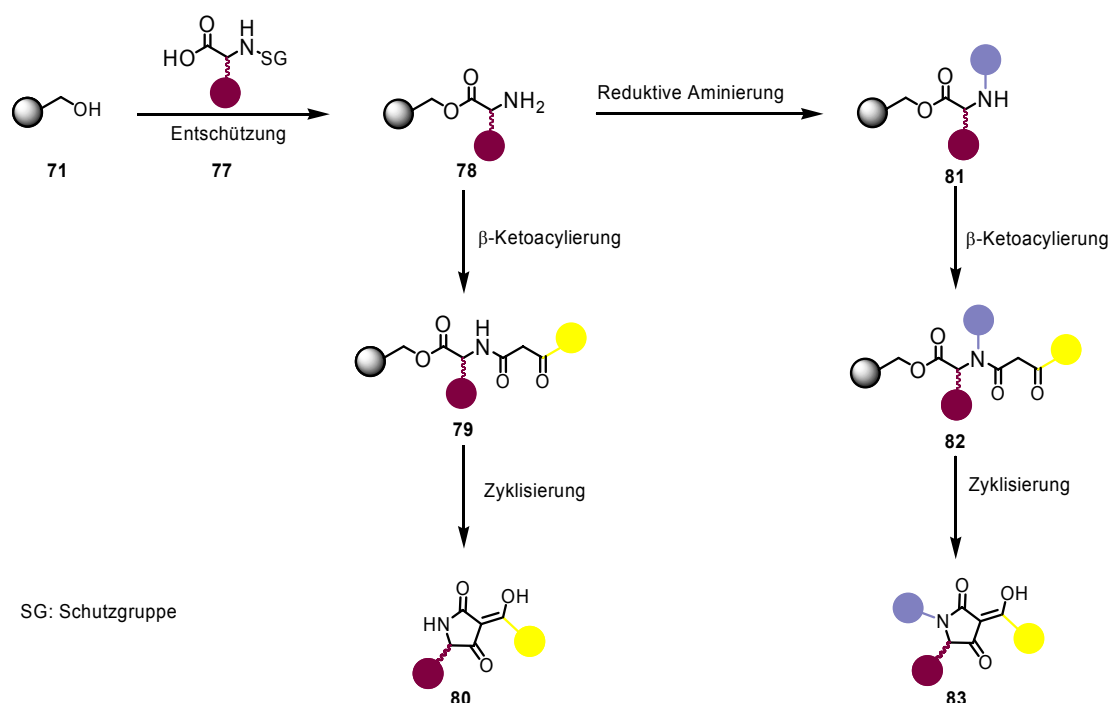


Abbildung 25: Synthesestrategie zum Aufbau einer 3-Acyltetramsäure-Bibliothek.

Hierzu wird in einem ersten Schritt Hydroxyl-funktionalisiertes Harz **71** mit einer *N*-geschützten Aminosäure **77** beladen. Nach Entschützung kann optional durch reduktive Aminierung des entstehenden primären Amins die zweite Varianz in die Zielmoleküle eingeführt werden. Die im nächsten Schritt erfolgende β -Ketoacylierung kann sowohl an einem alkylierten sekundären Amin **81**, als auch am Vorläufer **78** durchgeführt werden. Somit sind alle Funktionalitäten der 3-Acyltetramsäuren am Harz aufgebaut. Baseninduzierte Zyklisierung mit simultaner Abspaltung sollte dann die Tetramsäuren **80** und **83** ergeben.

4.1.2 Anwendung der Syntheseroute

4.1.2.1 Immobilisierung der Aminosäuren am Harz

Im ersten Schritt der Synthese wurde eine Aminosäure auf dem Trägermaterial immobilisiert. Um am Ende der Synthesesequenz eine Zyklisierung unter basischen Bedingungen zu ermöglichen, sollten die Aminosäuren als Ester auf das Harz geladen werden. Somit boten sich Hydroxyl-funktionalisierte Harze, wie z. B. Merrifield- oder Wang-Harz an. Für unsere Synthese erschien Wang-Harz geeigneter, da eine TFA-induzierte Abspaltung von Zwischenprodukten eine effiziente Reaktionskontrolle ermöglicht. Im Fall von Merrifield-Harz lässt sich dies nur mit Einsatz von HF erreichen, was jedoch die Verwendung spezieller Glasgeräte erfordert hätte.

Um eine möglichst diverse Tetramsäure-Bibliothek aufbauen zu können, wurden verschiedene Aminosäuren in der Synthesesequenz eingesetzt. Neben den typischen unpolaren α -Aminosäuren Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin wurde auch die saure Aminosäure Glutaminsäure sowie Ornithin als basischer Vertreter eingesetzt. Des Weiteren fanden Tyrosin und Serin Verwendung. Alle Aminosäuren waren am *N*-Terminus mit der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe geschützt, was eine einfache Beladungsbestimmung ermöglichte. Eine orthogonale Schutzgruppenstrategie für weitere Funktionalitäten wurde durch den Einsatz säurelabiler Gruppen wie der Boc-Gruppe für Ornithin, bzw. *tert*-Butyl für Serin und Glutaminsäure erwirkt. Für die Sauerstoff-Funktionalität des Tyrosins wurde ebenfalls eine *tert*-Butylgruppe verwendet.

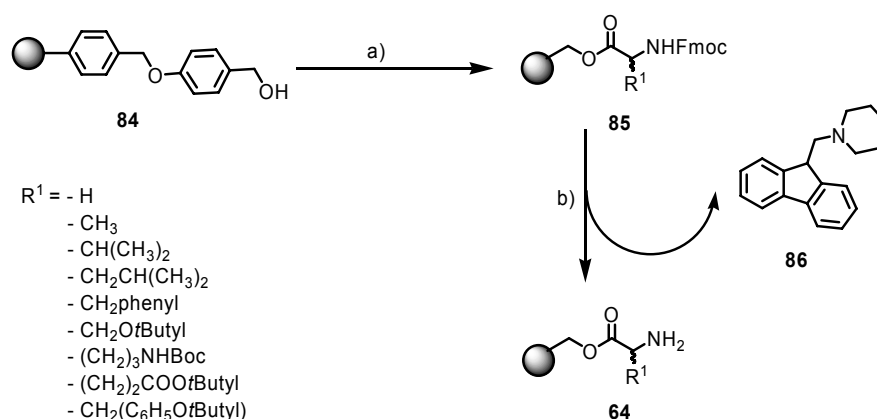


Abbildung 26: Beladung von Wang-Harz mit verschiedenen Aminosäuren. a) Aminosäure, DIC, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C, 1 h, dann Wang-Harz, DMF, DMAP, 6 h; b) 20 % Piperidin in DMF, 2*20 min.

Tabelle 4-1: Beladungsdichte und daraus resultierende Ausbeuten der unterschiedlichen Aminosäuren

Aminosäure	Beladung	Ausbeute
Sarcosin	0.76 mmol/g	63 %
β -Ala	0.74 mmol/g	61 %
Gly	0.7 mmol/g	58 %
Val	0.7 mmol/g	58 %
<i>N</i> -Methyl-Tyr	0.57 mmol/g	48 %
<i>N</i> -Methyl-Ala	0.86 mmol/g	72 %
<i>N</i> -Methyl-Val	0.75 mmol/g	62 %
<i>N</i> -Methyl-ILe	0.77 mmol/g	64 %
<i>N</i> -Methyl-Leu	0.89 mmol/g	74 %
Ser(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.74 mmol/g	61 %
Boc-Orn-OH	0.69 mmol/g	58 %
Glu(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.62 mmol/g	52 %
Tyr(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-OH	0.7 mmol/g	58 %
Phe	0.59 mmol/g	49 %
<i>D</i> -Tyr(<i>O</i> <i>t</i> Bu)	0.44 mmol/g	36 %

Die Fmoc-Aminosäuren wurden mittels Steglich-Veresterung^[94] auf das Hydroxyl-funktionalisierte-Wang-Harz (1 DVB Cross-Verlinkung, 100-200 Siebweite, 1.2 mmol/g Beladung) mit DIC und katalytischen Mengen DMAP in DMF bei Raumtemperatur geladen. Mittels UV-Spektroskopie konnte anschließend die Beladung bestimmt werden. Hierzu wurde von einer Testmenge durch Zugabe von Piperidin die Schutzgruppe als Dibenzylfulvenpiperidin-Addukt abgespalten. Letzteres zeigt eine charakteristische, konzentrationsabhängige UV-Absorption. Die Beladungen lagen im Bereich von 0.44-0.89 mmol/g, welches einer Ausbeute von 36 - 74 % für diesen Schritt entspricht.

Zur Synthese sechsgliedriger Tetransäure-Analoga wurde Wang-Harz mit β -Alanin als erstem Synthesebaustein unter den bereits beschriebenen Steglich-Bedingungen beladen. Die Fmoc-Bestimmung ergab hier eine Beladung von 0.74 mmol/g entsprechend 63 % Ausbeute.

Zur Einführung weiterer Funktionalitäten wurde die Fmoc-Schutzgruppe von der gesamten Harzmenge unter den bereits erwähnten Standardbedingungen (20 % Piperidin in DMF) abgespalten.

4.1.2.2 Reduktive Aminierung

Die nach Fmoc-Entschützung entstandenen primären Amine sollten im nächsten Schritt weiter funktionalisiert werden. Hierzu wurden sie mit verschiedenen käuflichen Aldehyden mit Natriumacetat und Natriumtriacetoxyborhydrid bei Raumtemperatur für 16 h reaktiv alkyliert.^[95] Um eine möglichst breite Palette an Produkten zu generieren, wurden sowohl aromatische als auch aliphatische und heterozyklische Aldehyde in der Synthese eingesetzt (Abbildung 27).

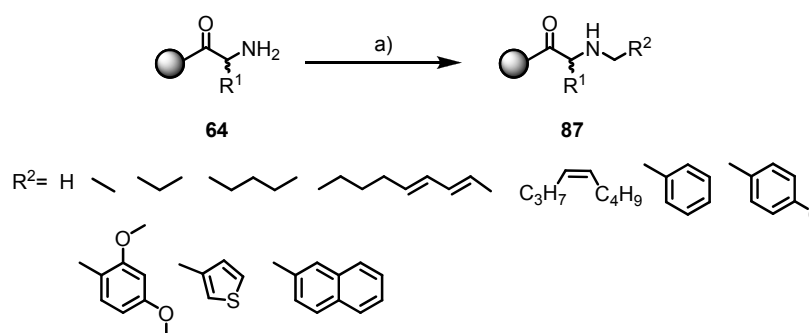


Abbildung 27: Reduktive Aminierung am Harz. a) Aminosäure-funktionalisiertes Harz, Aldehyd, NaOAc, Na(OAc)₃H, 16 h, THF, RT.

Um eine Überalkylierung zum tertiären Amin zu vermeiden, wurde jeweils nur ein Äquivalent des Aldehyds verwendet. Dies erwies sich vor allem in der Alkylierung des stärker nukleophilen und sterisch weniger abgeschirmten β -Alanins als notwendig. Schon ein geringer Überschuss an Aldehyd führte hier zu drastisch verringerten Ausbeuten, vermutlich in Folge einer Überalkylierung des freienamins.

4.1.2.3 Funktionalisierung durch Acylierung

Im letzten Diversifizierungsschritt der Synthese wurden die entstandenen sekundären Amine acyliert. Hierzu wurden verschiedene β -Ketoäquivalente eingesetzt, mit welchen die für die basische Zyklisierung benötigten β -Ketoamide aufgebaut wurden. Um später eine Struktur-Wirkungs-Beziehung zu ermöglichen, wurden β -Ketoäquivalente mit unterschiedlich langen Acyl-Ketten sowie mit verzweigten Seitenketten und diversen elektronischen Eigenschaften eingesetzt.

Spezieller Teil

Zur Synthese des einfachsten β -Ketoamids **88** wurde das am Harz immobilisierte sekundäre Amin mit käuflichem Diketen und Triethylamin in Dichlormethan zur Reaktion gebracht (Abbildung 28a).^[96]

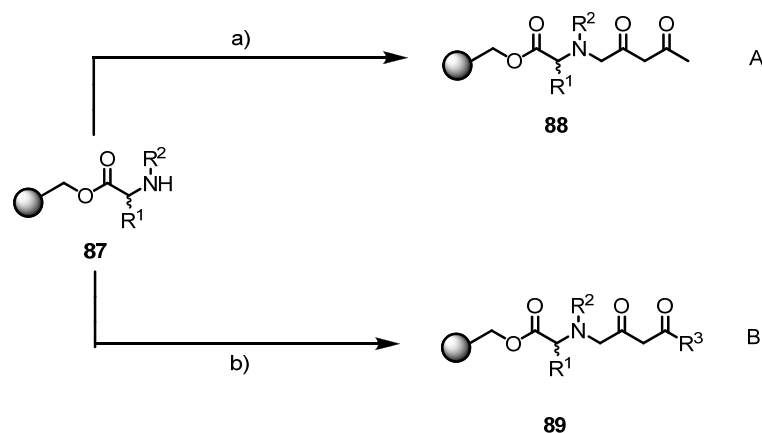


Abbildung 28: Acylierungsschritt. a) Diketen, Triethylamin, CH_2Cl_2 , 0°C , 12 h; b) 5-Acylmeldrumsäure, Toluol, 80°C , 2 h.

Zur Einführung anspruchsvollerer Seitenketten wurden 5-Acyl-Meldrumsäuren als Reagenzien gewählt. Thermische Umlagerung dieser Meldrumsäure-Derivate **90** in Toluol für 2 h lieferte die gewünschten β -Ketoamide **89** (Abbildung 28b).^[97] 5-Acylmeldrumsäuren sind käuflich nicht erhältlich, so dass sie über Literatur bekannte Synthesewege dargestellt werden mussten.

Carbonsäuren lassen sich mit Meldrumsäure **62** nach Aktivierung mit DCC in Gegenwart von DMAP bei 0°C in die gewünschten 5-Acyl-Meldrumsäuren **90** umwandeln.^[98] Der dabei entstehende unlösliche Harnstoff konnte anschließend abfiltriert werden. Die erhaltenen DMAP-Salze wurden mit HCl extrahiert, um die freien 5-Acyl-Meldrumsäuren zu erhalten. Die Produkte **90a)** (Abbildung 29,) wurden in der Regel in über 80 % Reinheit isoliert, so dass sie direkt umgesetzt werden konnten oder lediglich über eine kurze Filtersäule aufgereinigt werden mussten.

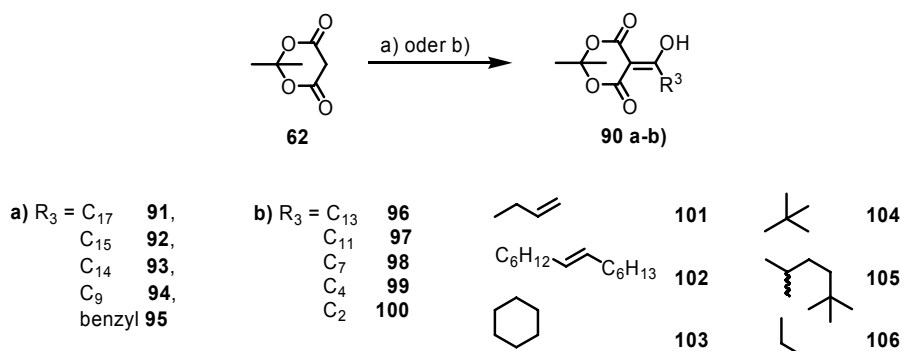


Abbildung 29: Darstellung von 5-Acylmeldrumsäuren. a) R³COOH, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C , 18 h. b) R³COOCl, Pyridin, CH_2Cl_2 , 0°C , 3 h.

Der ebenfalls in Abbildung 29 gezeigte, alternative Weg geht von käuflichen Säurechloriden aus, welche bei 0 °C in Gegenwart von Pyridin mit Meldrumsäure umgesetzt werden.^[99] Auch in dieser Synthese wurden die entstandenen Salze der gewünschten 5-Acyl-Meldrumsäuren **90b**) anschließend durch saure Extraktion in hoher Reinheit (> 80 %) erhalten, so dass lediglich kurze Filtersäulen zur Aufreinigung notwendig waren. Insgesamt konnten auf diesen Wegen die in Abbildung 29 gezeigten 5-Acylmeldrumsäuren in Ausbeuten von 43 - 96 % dargestellt werden.

4.1.2.4 Zyklisierung zu Tetransäuren

Im letzten Schritt der Synthese sollten die Tetransäuren simultan zyklisiert und vom Harz abgespalten werden. Dieser Weg hat den Vorteil, dass nur wenige Nebenprodukte gemeinsam mit den Tetransäuren abgespalten werden.

In der Literatur sind verschiedene Bedingungen zum Abspalten von Tetransäuren vom Trägermaterial mittels einer baseninduzierten Dieckmann-Zyklisierung beschrieben.^[89-91] Tetrabutylammoniumhydroxid als Zyklisierungsreagenz ergab die gewünschten Tetransäuren unter milden Bedingungen, allerdings erforderte die weitere Aufarbeitung den Einsatz des Amberlyst A 15-Ionenaustauschers, um das im Überschuss eingesetzte Abspaltungsreagenz zu entfernen.^[89]

Bei 85 °C konnten Tetransäuren zudem mit Natriumethoxid und 30 % DIPEA zyklisiert werden.^[90] Neben den hohen Temperaturen erforderte diese Methode lange Reaktionszeiten von bis zu 24 h und führte zu partieller Razemisierung der abgespaltenen Produkte.

Romoff et al. beschrieb eine Dieckmann-Zyklisierung unter wesentlich mildereren Bedingungen, bei welcher TBAF oder KOH als Zyklisierungsreagenzien in Methanol eingesetzt wurden.^[91]

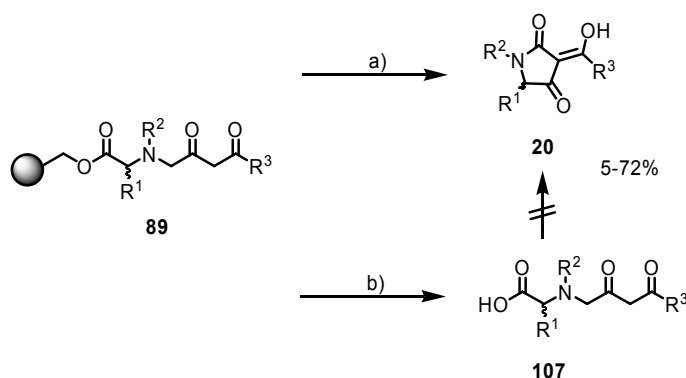


Abbildung 30: Zyklisierung der Tetransäuren. a) 0.1 M KOH in Methanol, CH₂Cl₂, Dioxan, 2 h, RT; b) in Gegenwart von Nukleophilen wie H₂O entstanden die nicht zyklisierbaren freien Säuren als Nebenprodukte.

Spezieller Teil

Die Ausbeuten unter diesen milden Bedingungen waren nicht optimal, jedoch wurden die Tetransäuren in guten Reinheiten gewonnen, so dass für eine Bibliothekensynthese ungünstige komplizierte Reinigungsschritte nicht notwendig waren. Deshalb wurde dieses Protokoll zur Abspaltung der Tetransäuren verwendet.

Nach Zyklisierung der am Harz aufgebauten β -Ketoamide **89** in einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan/Dioxan (1:1) mit 0.1 M KOH in Methanol wurden die Kaliumsalze der gewünschten Tetransäuren in guten Reinheiten nach 1-2 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur erhalten. Es musste darauf geachtet werden, dass unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wurde und die KOH-Lösung immer frisch angesetzt wurde, da Nukleophile wie Wasser zur Bildung der Carbonsäurederivate **107** führten, welche nicht weiter zyklisiert werden konnten. Saure Extraktion mit HCl lieferte die anvisierten Tetransäuren **20**. Trotz hoher Reinheiten der Rohprodukte wurden die Tetransäuren über reverse HPLC weiter aufgereinigt.

Neben dem Naturstoff Melophlin A **23** wurden auf diesem Weg insgesamt 57 Tetransäuren in Gesamtausbeuten von 5 - 72 % synthetisiert (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der über Festphasensynthese dargestellten Tetransäuren.

Substanz	R ¹	R ²	R ³	Ausbeute [%]
23	H	Methyl	Pentadecyl	55
108	H	Methyl	Heptadecyl	32
109	H	Methyl	Pentadec-8-enyl	5
110	H	Methyl	Tridecyl	23
111	H	Methyl	Undecyl	26
112	H	Methyl	Nonyl	42
113	H	Methyl	Butyl	43
114	H	Methyl	Methyl	34
115	H	Methyl	2-Propyl	35
116	H	Methyl	But-3-enyl	35
117	H	Methyl	2,2-Dimethylpropyl	16
118	H	Methyl	2,4,4-Trimethylpentyl	34
119	H	Methyl	Cyclohexyl	32
120	H	Methyl	2-Phenylethyl	27
121	H	Ethyl	Butyl	31
122	H	Propyl	Heptyl	29
123	H	Ethyl	Nonyl	41

124	H	Dec-4-enyl	Methyl	11
125	H	<i>p</i> -Methoxybenzyl	Methyl	33
126	H	2,4-Dimethoxybenzyl	Methyl	36
127	H	Hexyl	Pentadecyl	16
128	H	Methyl	Butadecyl	56
129	H	Ethyl	Methyl	22
130	H	2,4-Dimethoxybenzyl	Pentadecyl	30
131	Methyl	Methyl	Pentadecyl	44
132	Methyl	<i>p</i> -Methoxybenzyl	Cyclohexyl	9
133	1-Methylpropyl	Methyl	Pentadecyl	15
134	2-Methylpropyl	Methyl	Pentadec-8-enyl	16
135	Isopropyl	Methyl	Pentadecyl	51
136	<i>t</i> Butylpropionat	Ethyl	Nonyl	43
137	<i>t</i> Butylpropionat	Ethyl	Butyl	37
138	<i>t</i> Butylpropionat	Naphthyl	Pentadecyl	30
139	Propansäure	Naphthyl	Pentadecyl	21
140	<i>t</i> Butylpropionat	Propyl	Undecyl	28
141	<i>t</i> Butylpropionat	Propyl	Heptyl	26
142	Propansäure	Ethyl	Pentadecyl	23
143	Propansäure	Ethyl	Butyl	30
144	<i>t</i> Butylpropionat	(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)-Deca-2,4-dienyl	Pentadecyl	24
145	Propansäure	(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)-Deca-2,4-dienyl	Pentadecyl	20
146	<i>t</i> Butylpropionat	2,4-Dimethoxybenzyl	Pentadecyl	35
147	<i>t</i> Butylpropionat	Ethyl	Pentadecyl	24
148	4-Hydroxybenzyl	Benzyl	Cyclohexyl	45
149	4-Hydroxybenzyl	Propyl	2,2-Dimethylpropyl	14
150	4-Hydroxybenzyl	2,4-Dimethoxybenzyl	Pentadecyl	26
151	O- <i>t</i> Butyl-4-hydroxybenzyl	Methyl	Pentadecyl	49
152	O- <i>t</i> Butyl-4-hydroxybenzyl	Benzyl	Cyclohexyl	32
153	O- <i>t</i> Butyl-4-hydroxybenzyl	Benzyl	Cyclohexyl	60
154	O- <i>t</i> Butyl-4-hydroxybenzyl	Benzyl	Pentadecyl	72
155	Benzyl	Ethyl	Pentadecyl	30
156	Benzyl	Ethyl	Cyclohexyl	33

Spezieller Teil

157	<i>t</i> Butylpropylcarbamamat	2,4-Dimethoxybenzyl	Pentadecyl	18
158	<i>t</i> Butylpropylcarbamamat	Ethyl	Cyclohexyl	27
159	<i>t</i> Butylpropylcarbamamat	Benzyl	Methyl	38
160	Propylamin	Benzyl	Methyl	38
161	<i>t</i> Butylpropylcarbamamat	Benzyl	Pentadecyl	16
162	2-Ethoxy-2-methylpropyl	Benzyl	Pentadecyl	41
163	2-Ethoxy-2-methylpropyl	Ethyl	Pentadecyl	25
164	2-Ethoxy-2-methylpropyl	Ethyl	Methyl	41

Auch die exemplarisch aufgebauten sechsgliedrigen Tetramsäure-Analoga ließen sich mittels KOH in Methanol/Dioxan/Dichlormethan in guten Ausbeuten zyklisieren und abspalten (Abbildung 31).

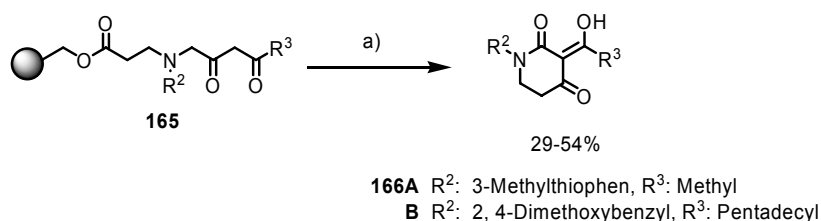


Abbildung 31: Zyklisierung sechsgliedriger Tetramsäure-Analoga. a) 0.1 M KOH in Methanol, CH₂Cl₂, Dioxan, 2 h, RT.

4.2 Laccarin

Mit der in Kapitel 4.1 beschriebenen Festphasensynthese konnte eine Bibliothek an Tetramsäuren, Analoga des Naturstoffs Melophlin A, dargestellt werden. Um zu zeigen, dass auch komplexere Moleküle zugänglich sind, sollte im Folgenden ein Derivat des Naturstoffs Laccarin synthetisiert werden.

Bei (+)-Laccarin **178** handelt es sich um eine bizyklische Tetramsäure, die als Metabolit des japanischen Pilzes *Laccaria Vinaceoavellanea* von Nozoe et al. isoliert wurde.^[100] Des Weiteren wurde gezeigt, dass Laccarin die Aktivität der zyklischen AMP-Phosphodiesterase bei einer Konzentration von 0.64 mg/ml um 30 % senkt. Erst kürzlich wurde Laccarin zudem zusammen mit einer instabilen *N*-acylierten Variante von Yue und seinen Mitarbeitern auch aus *Lactarius subplinthogalus* isoliert.^[101]

Im Jahr 2007 gelang Bower et al.^[102] die erste Lösungssynthese von (+)-Laccarin, beruhend auf einer von dieser Gruppe entwickelten Piperidonsynthese durch Reaktion von Nucleophilen mit reaktiven 1,3-zyklischen Sulfamidaten.

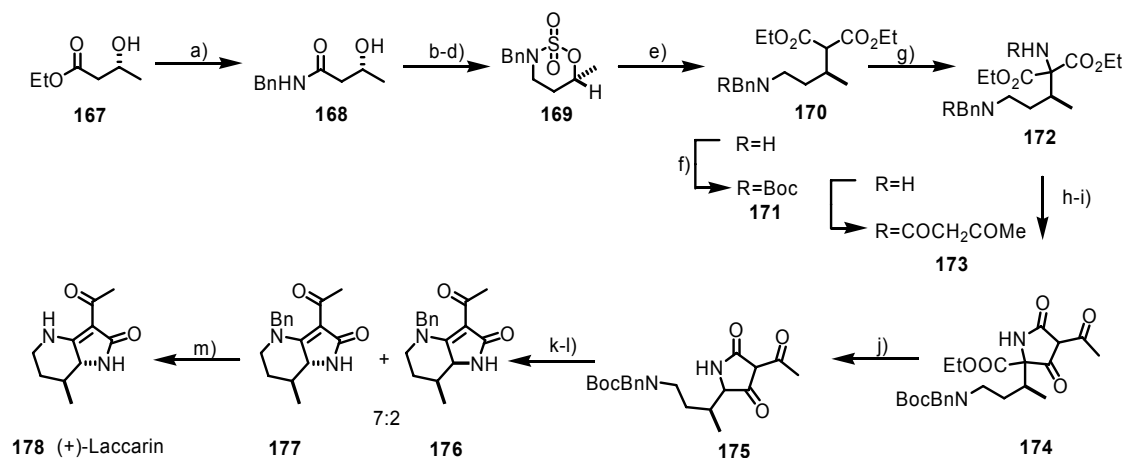


Abbildung 32: Synthese von (+)-Laccarin nach Bower et al. a) AlMe_3 , BnNH_2 , PhMe , 0°C bis RT (88 %); b) LiAlH_4 , THF, RF (98 %); c) SOCl_2 , Triethylamin, Imidazol, CH_2Cl_2 , -20°C bis 0°C (84 %); d) RuCl_3 (0.25 mol%), NaIO_4 , MeCN, H_2O , 0°C (85 %); e) Diethylmalonat, NaH, DMF, 110°C , dann 5 M HCl; f) Boc_2O , NaHCO_3 , MeCN (81 %); g) NH_2Cl (ca. 0.15 M in Et_2O), *tert*-BuOK, THF, 0°C bis RT (75 %, 23 % Startmaterial); h) Diketen, kat. DMAP, THF, 60°C ; i) NaOEt, EtOH, 60°C ; j) H_2O , dann 5 M HCl; k) TFA, CH_2Cl_2 dann Triethylamin; l) PhMe , 80°C (68 % beide Diastereomere); m) 10 % Pd/C (65 wt%), H_2 (5.5 bar), TFA (93 %).

Die Syntheseroute startete von kommerziell erhältlichem Ethyl-(*R*)-hydroxybutyrat **167**, welches zum *N*-Benzylamid konvertiert und anschließend reduziert wurde. Der entstandene Aminoalkohol konnte daraufhin in das Sulfamidat, welches für den Schlüsselschritt der Reaktion eingesetzt wurde, umgewandelt werden. Das zyklische Sulfamidat **169** wurde weiter mit Diethylmalonat umgesetzt, woran sich eine Ringöffnung mit folgender *N*-Boc-Schützung anschloss. Um die Funktionalitäten von Laccarin aufzubauen, mußte **170** des Weiteren in Position C2 aminiert werden, was durch Einsatz von Monochloramin erreicht werden konnte. Hier schloss sich ein *N*-Acylierungsschritt mit Diketen an. Das entstandene Produkt **173** wurde ohne Aufarbeitung einer Claisen-Kondensation unterzogen, gefolgt von einer Esterhydrolyse und Decarboxylierung. Verbindung **175** wurde nun *N*-Boc entschützt und bei 80°C thermisch zyklisiert. Hieraus ergaben sich *N*-Benzyl-Laccarin **177** sowie sein *cis*-Diastereomer **176** in einem Verhältnis von 7:2 und einer Ausbeute von 68 %. Hydrierung zur Entschützung des Amins ergab das gewünschte (+)-Laccarin **178** in einer Gesamtausbeute von 18.4 %.

Im Gegensatz zu einer Synthese in Lösung birgt eine Festphasensynthese den Vorteil einer schnellen und unkomplizierten Derivatisierung. Somit sollte gezeigt werden,

Spezieller Teil

dass mit der für Melophlin A-Analoga entwickelten Syntheseroute auch komplexere bicyklische Verbindungen, wie z. B. die Derivate des Naturstoffs Laccarin, zugänglich sind. Retrosynthetisch ließ sich das Grundgerüst, wie in Abbildung 33 dargestellt, zerlegen. Der Bicyklus konnte auf die Tetramsäure **180** zurückverfolgt werden, welche wiederum aus Ornithin **181** zugänglich sein müßte.

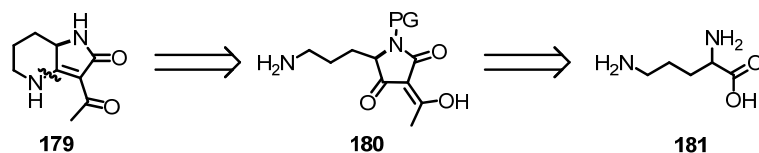


Abbildung 33: Retrosynthetische Analyse zur Darstellung eines Laccarin-Analogons an fester Phase.

Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, wurde zunächst Wang-Harz mit Fmoc-L-Ornithin-(*N*-Boc)-OH (58 % Ausbeute) funktionalisiert. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde das primäre Amin mit Benzaldehyd und Natriumtriacetoxyborhydrid benzyliert **183**. Acylierung mit kommerziell erhältlichem Diketen ergab Verbindung **184**, welche mit KOH zyklisiert und in einer guten Gesamtausbeute von 38 % vom Harz abgespalten werden konnte. Entschützung des sekundären Amins mit TFA in Dichlormethan (1:1) und direkt folgende Benzylierung ergab Verbindung **185**. Schon in der Aufarbeitung vermutlich beim Entfernen des Lösemittels im 40 °C warmen Wasserbad zyklisierte **185** zu dem gewünschten bicyklischen Produkt **186**. Dieses konnte per präparativer HPLC in 45 % Ausbeute von unzyklisierten Nebenprodukten getrennt werden. Die direkte, unzyklisierte Vorstufe konnte bei 80 °C in Toluol nachträglich in Verbindung **186** überführt und nach präparativer HPLC in 63 % Ausbeute isoliert werden.

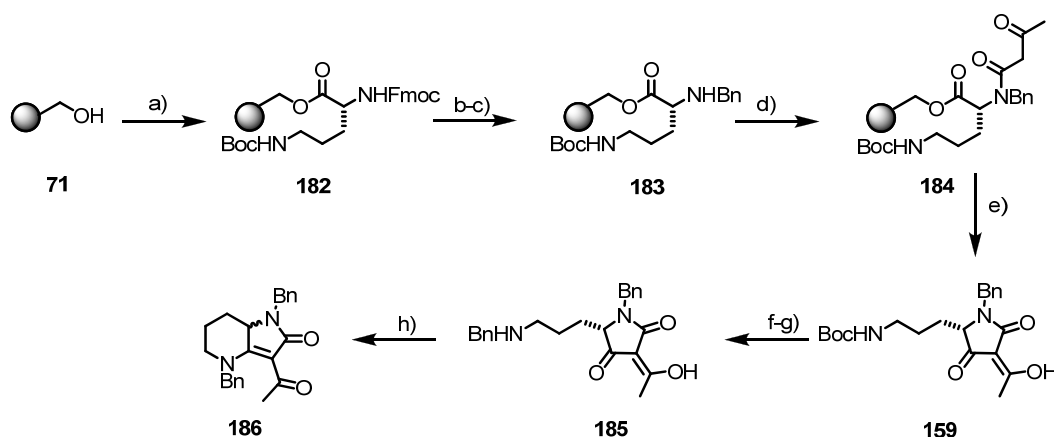


Abbildung 34: Beispielsynthese eines Laccarin-Analogons. a) Fmoc-Orn-(Boc)-OH, DIC, CH₂Cl₂/DMF, 0 °C, 1 h, dann Wang-Harz, DMF, DMAP, 6 h; 58 %; b) 20 % Piperidin in DMF, 2*20 min; c) Benzaldehyd, NaOAc, NaB(OAc₃)H, 16 h, THF, RT; d) Diketen, Triethylamin, CH₂Cl₂, 0 °C, 12 h; e) 0.1 M KOH in Methanol, CH₂Cl₂, Dioxan, 2 h, RT, 38 %; f) TFA/CH₂Cl₂

(1:1), 2 h, 100 %; g) Benzaldehyd, NaOAc, 2 eq. NaB(OAc)₃H, 16 h, THF, RT, 45 %; h) Toluol, 80 °C, 12 h, 63 %.

4.3 Polyenoyl-Tetransäuren

Eine weitere strukturell und biologisch interessante Klasse an Tetransäuren sind die Polyenoyl-Tetransäuren. Die erste Verbindung dieses Typs, die als orangerotes Pigment aus *Penicillium islandicum* isoliert wurde, heißt Erthroskyrin **187**.^[103] Sie zeigt antibakterielle Aktivität gegen einige *Staphylococcus*-Stämme. Der Gruppe um Stephen Ley gelang 1999 die erste Totalsynthese dieses Naturstoffs.^[104]

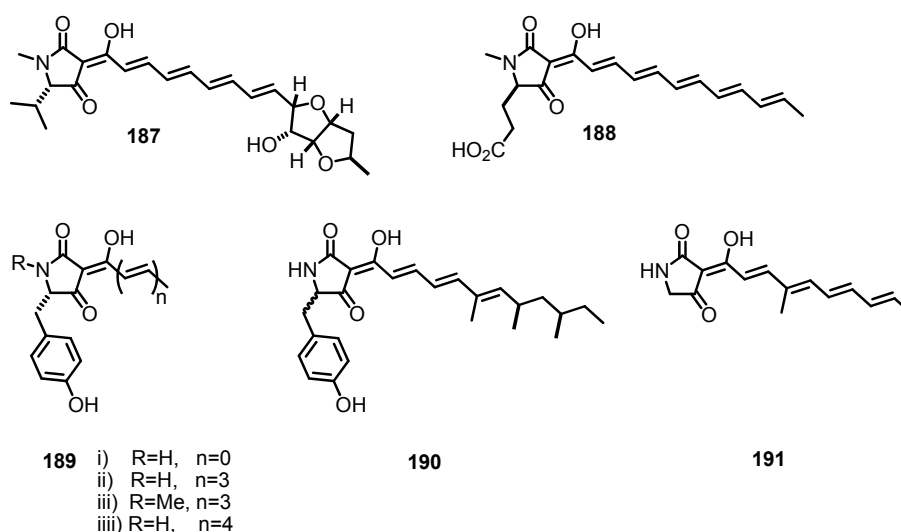


Abbildung 35: Polyenoyl-Tetransäuren, Erthroskyrin **187**, Fuligorubin A **188**, L-Tyrosin-Tetransäuren aus *Leocarpus fragilis* **189**, Militarion C **190** und Raveninsäure **191**.

Steglich et al.^[105] isolierten weitere Polyenoyl-Tetransäuren aus Schimmelpilzen, z. B. Fuligorubin A **188**, das Hauptpigment des gelben *Fuligo septica*^[106] sowie vier von L-Tyrosin abgeleitete Tetransäuren **189(i-iiii)**^[106], die für die orange-gelbe Farbe von *Leocarpus fragilis* verantwortlich sind. Strukturelle Ähnlichkeiten zeigt zudem die von der Gruppe um Hamburger aus *Paecilomyces militaris* isolierte Tetransäure Militarion C **190**, welche ein biosynthetischer Vorläufer des Pyridonalkaloids Militarion A darstellt.^[107]

Ebenfalls zu den Polyenoyl-Tetransäuren zählt die antibiotisch wirksame, erst 2002 aus einem kultivierten *Penicillium sp.* isolierte Raveninsäure **191**.^[108]

Das breite Spektrum verschiedener, biologisch interessanter Polyenoyl-Tetransäuren rechtfertigt die dargestellte Tetransäure-Bibliothek um diese Klasse zu erweitern. Dies sollte - wenn möglich - mittels der bereits beschriebenen Festphasensynthese realisiert werden.

Spezieller Teil

Eine universelle Methode zur Darstellung von Polyenoyl-Tetramsäuren unter Verwendung von *tert*-Butyl-3-oxobutanthioat und seinem 4-Diethylphosphonoderivat **193** (Abbildung 37) wurde 1987 von Stephen Ley beschrieben.^[84]



Abbildung 36: 4-Bromo-*tert*-butyl-3-oxobutanthioat und das entsprechende 4-Diethylphosphonoderivat

Die Umsetzung von **193** mit Carbonylverbindungen erzeugt β -Ketothioester, die mit Aminen oder Aminosäuren unter Zusatz von Silber(I)trifluoracetat zu Amidien umgesetzt werden können. Diese Strategie wurde unter anderem in der ersten Totalsynthese von Fuligorubin A eingesetzt.^[109]

Die Arbeitsgruppe um Ley setzte hierzu *tert*-Butyl-4-diethylphosphono-3-oxobutanthioat **193** mit (2*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-Dec-2,4,6,8-tetraenal um, welches zuvor durch Wittig-Reaktion aus Sorbinaldehyd aufgebaut wurde. Die Reaktion führte zu β -Ketothioester **194**, welcher zur Amidolyse mit dem geschützten Glutaminsäurederivat **195** durch Silber(I)trifluoracetat eingesetzt wurde. Letzteres konnte anschließend mit frisch sublimiertem KO*t*Bu zyklisiert werden, wodurch das Produkt **197** in einem Diastereomerenverhältnis (Z:E) von 7:1 erhalten wurde. Entschützung der Seitenkette mit Ameisensäure bei Raumtemperatur ergab Fuligorubin A.

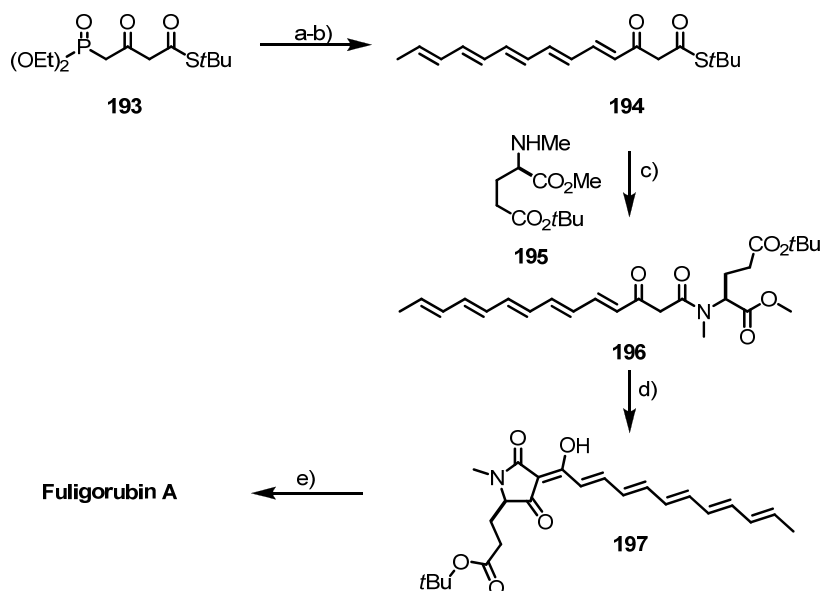


Abbildung 37: Synthese von Fuligorubin A. a) NaH, 0 °C, THF, 25 min; b) (2*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-Decetraenal, 0 °C, THF, 75 %; c) AgOCOCF₃, Na₂HPO₄, THF, RT, 30 min, 67 %; d) *t*BuOK, *t*BuOH, RT, 30 min, 75 %; e) HCOOH, RT, 1 h, 100 %.

Um die bestehende Tetramsäure-Kollektion um Polyenoyl-Tetramsäuren erweitern zu können, sollte die Ketoamidsynthese über β -Ketothioester für die feste Phase adaptiert werden. Deshalb wurde zunächst *tert*-Butyl-4-diethylphosphono-3-oxobutanthioat **193** wie von Ley beschrieben synthetisiert (Abbildung 38).^[110] Hierzu wurde Diketen bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ zunächst mit Brom und anschließend mit *tert*-Butylthiol umgesetzt. Das in guten Ausbeuten entstandene *S-tert*-Butyl-4-bromoxobutanthioat **192** wurde anschließend mit frisch dargestelltem Natriumdiethylphosphit in das Phosphonat **193** umgewandelt.

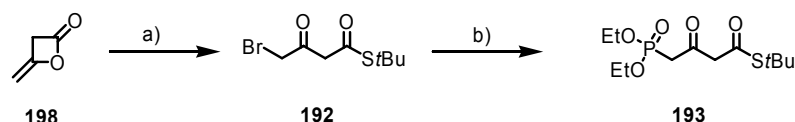


Abbildung 38: Synthese von *tert*-Butyl-4-diethylphosphono-3-oxobutanthioat. a) Br_2 , CCl_4 , $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, dann in eine Lösung von 1-*tert*-Butylthiol in CH_2Cl_2 , $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, 74 %; b) Diethylphosphit, Na, THF, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 min, dann auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, parallel *S-tert*-Butyl-4-brom-3-oxobutanthioat, NaH, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, Natriumdiethylphosphit, $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h, 91 %.

Eine Horner-Wadsworth-Emmons-Kupplung von **193** mit Carbonylverbindungen ermöglichte die Darstellung verschiedener (*E*)-konfigurierter β -Ketothioester. Aus dem kommerziell erhältlichen Sorbinaldehyd **199** konnte beispielsweise das um zwei Kohlenstoffatome verlängerte (*2E*, *4E*, *6E*)-Octatrienal **202** synthetisiert werden (Abbildung 39). Hierzu wurde Sorbinaldehyd mit Triethylphosphonoacetat, welches zunächst mit NaH deprotoniert wurde, umgesetzt. Der Ethyl-(*2E*, *4E*, *6E*)-octatrienester **201** wurde im Anschluss mit DIBALH zum Allylalkohol reduziert und weiter zum gewünschten Aldehyd **202** oxidiert. Die Reaktionssequenz von Oxidation und Reduktion erfolgte quantitativ.

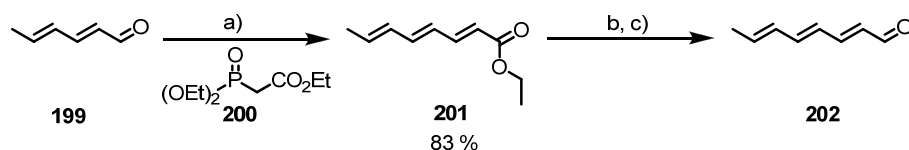


Abbildung 39: Synthese von (*2E*, *4E*, *6E*)-Octatrienal. a) Triethylphosphonoacetat, NaH, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, THF, 1 h dann Sorbinaldehyd, $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18 h; b) DIBALH, Toluol, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min; c) MnO_2 , CH_2Cl_2 , 90 min, RT.

Der entstandene Aldehyd wurde ohne vorherige Aufarbeitung mit Phosphonat **193** zum entsprechenden β -Ketothioester **203** umgesetzt (Abbildung 40). Neben (*2E*, *4E*, *6E*)-Octatrienal wurden auch aus den kommerziellen Aldehyden Sorbinaldehyd und (*2E*, *4E*)-Deca-2,4-dienal die entsprechenden β -Ketothioester **204** und **205** synthetisiert.

Spezieller Teil

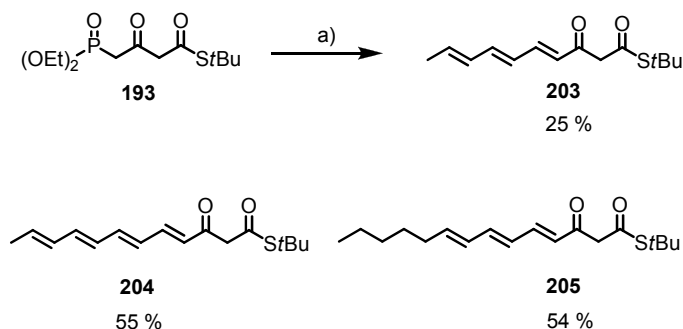


Abbildung 40: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit Phosphonat **193** zur Synthese dreier β -Kethioester. a) NaH, *tert*-Butyldiethylphosphono-3-oxobutanthioat, THF, 0 °C, 30 min dann Aldehyd, 0 °C \rightarrow RT, 18 h.

Die so dargestellten β -Kethioester sollten wie von Ley für Lösungssynthesen beschrieben^[83] zur Amidolyse mit auf Wang-Harz immobilisierten Aminosäuren umgesetzt werden (Abbildung 41). Die Reaktion wurde zunächst mit Silbertrifluoacetat als Aktivator durchgeführt. Nach anschließender Zyklisierung und Aufreinigung wurde das Produkt in 10 % Gesamtausbeute erhalten.

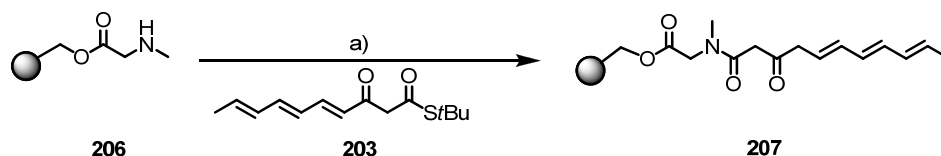


Abbildung 41: Aminolyse an fester Phase. a) Promoter, THF, RT, 12 h.

Zur Optimierung des Amidierungsschrittes wurden verschiedene bekannte Reagenzien zur Aktivierung von Thioestern eingesetzt, z. B. Silber- und ein Kupfersalz (Tabelle 4-1). Jedoch konnte weder mit diesen Aktivatoren noch durch Erhöhung der Reaktionstemperatur der Reaktionsumsatz verbessert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine unspezifische Adsorption der eingesetzten Salze am Harz sein, so dass die effektive Menge an Promoter zur Reaktion zu gering ist. Um dieses Problem durch einen homogenen Katalysator zu umgehen, wurden die aus der Glykosidchemie zur Aktivierung von Thioglykosiden bekannten Reagenzien Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtetrafluorborat (DMTSF) und Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtriflat (DMTST)^[111] sowie eine Mischung aus CuBr_2 und Bu_4NBr ^[112] eingesetzt. Auch unter diesen Bedingungen konnte jedoch keine Verbesserung des Umsatzes erzielt werden.

Tabelle 4-3: Verschiedene Bedingungen zur Amidolyse an fester Phase.

Promoter	Bedingungen	Ausbeute
Ag(OCOCF ₃)	RT	30 % LC-Ausbeute (10 % isoliert)
Ag(OCOCF ₃)	50 °C	< 5 %
DMTSF	RT	nicht reproduzierbar
DMTST	RT	< 5 %
Silberhexafluorantimonat	RT	30 % (LC-Ausbeute)
Silberpentafluorpropionat	RT	< 5 %
Silber- <i>p</i> -toluolsulfonat	RT	< 5 %
Kupfer-(I)-mesylat	RT	20 % (LC-Ausbeute)
CuBr ₂ , Bu ₄ NBr, Ag(OCOCF ₃)	RT	Spuren

Trotz dieser Probleme ließen sich die Polyenoyl-Tetramsäuren **208 - 210** durch Silbertrifluoracetat-Aktivierung auch an Sarcosin-beladenem Wang-Harz in Gesamtausbeuten von 3 – 10 % darstellen.

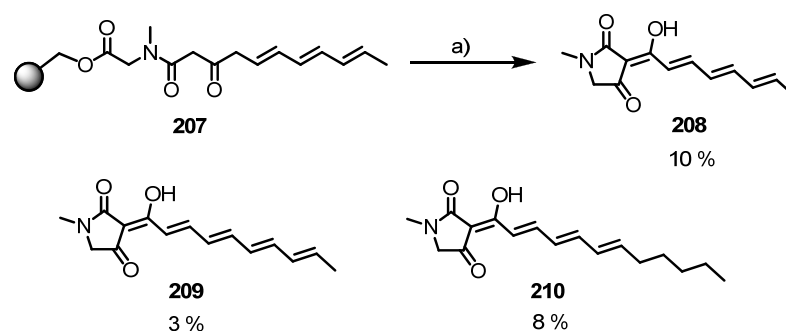


Abbildung 42: Zyklisierung und Abspaltung der Polyenoyl-Tetramsäuren **208 - 210**.
a) Ag(COOCF₃), THF, RT, 12 h.

Wie bereits in Abbildung 35 gezeigt, basieren verschiedene aus Pilzen isolierte Polyenoyl-Tetramsäuren, darunter das aus *Paecilomyces militaris* isolierte Militarion C **190** auf *L*-Tyrosin als Aminosäurebaustein. Um auch ein solches Analogon an fester Phase zu synthetisieren, wurde Fmoc-*L*-Tyrosin auf Wang-Harz immobilisiert.

Da in diesen Naturstoffen das Amin im Ring meist sekundär ist, sollte dies zunächst mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd geschützt werden. Am Ende der Syntheseroute zeigte sich allerdings, dass selbst unter mild sauren Bedingungen (HCOOH, bei

Raumtemperatur) die Schutzgruppe nicht ohne Zersetzung der Zielverbindung entfernt werden konnte. Versuche, die Tetransäure ohne Schutz der Aminfunktion zu synthetisieren, waren dagegen erfolgreich. So wurde β -Ketothioester **205** zur Acylierung des ungeschützten Tyrosins **212** (Abbildung 43) eingesetzt. Nach Zyklisierung konnte das gewünschte Militarion C-Analogon **213** in 4 % Ausbeute erhalten werden. Neben dem Aktivierungsproblem des Thioesters mit Silbersalzen an der festen Phase könnten auch die ungeschützten Funktionalitäten der Aminosäure zu den niedrigen Ausbeuten beigetragen haben. Dennoch konnte auf diesem Weg leicht das gewünschte Analogon dargestellt werden, was in der weiteren strukturellen Evaluierung die Vielfalt der Tetransäure-Bibliothek erhöht.

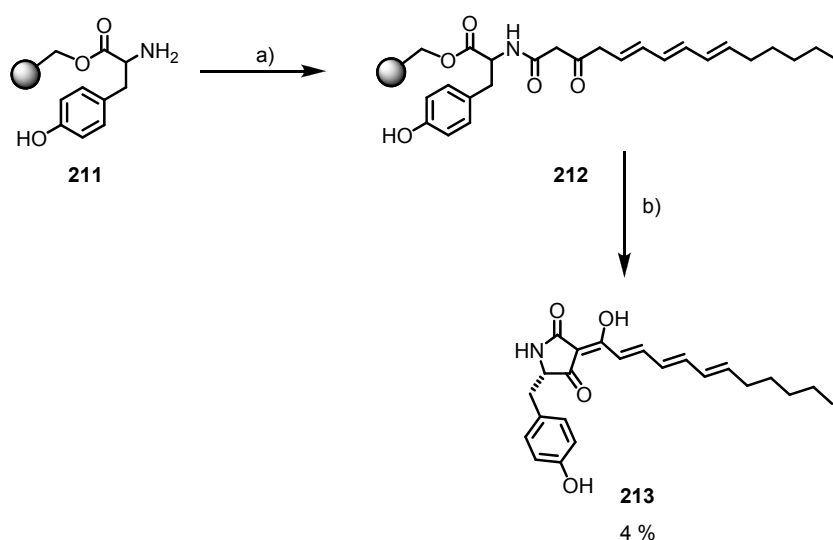


Abbildung 43: Synthese einer *L*-Tyrosin basierten Polyenoyl-Tetransäure. a) (1*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxytetradeca-1,4,6,8-tetraen-3-on, Ag(OOCCF₃), THF, 12 h; b) 0.1 M KOH, Methanol/Dioxan/CH₂Cl₂, 2 h, 4 %.

4.3.1.1 Synthese der Polyenoyl-Tetransäure Raveninsäure

Wie bereits zu Beginn des Kapitels 4.3 vorgestellt, wurde im Jahr 2002 auf der Suche nach neuen Antibiotika aus dem Pilz *Penicillium sp.* (MINAP9902) die Polyenoyl-Tetransäure Raveninsäure **191** isoliert.^[108] Sie wurde aus einem ethanolischen Extrakt des Mycels gewonnen, welches antibiotische Aktivität gegen verschiedene nosocomiale Pathogene, darunter methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), zeigte. Nach Isolierung und Strukturaufklärung zeigte Raveninsäure inhibitorische Aktivität auf das Wachstum von methicillin-resistenten *S. aureus* bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$.^[108] Synthetisch sollte Raveninsäure **191** über den bereits beschriebenen Syntheseweg ausgehend von *tert*-Butyl-3-oxobutanthioat zugänglich sein. Hierzu wurde zunächst das benötigte (2*E*, 4*E*, 6*E*)-2-Methylocta-2,4,6-trienal über eine

Wittig-Reaktion aus Sorbinaldehyd **199** mit 1-(Ethoxycarbonylethyliden)-triphenylphosphoran **214** und folgender Reduktion-Oxidations-Sequenz in guter Ausbeute von 68 % dargestellt (Abbildung 44).

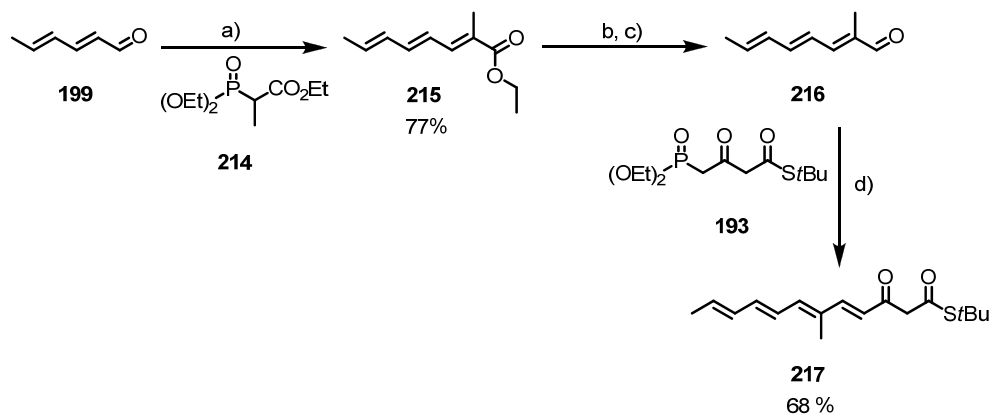


Abbildung 44: Synthese des β -Ketothioesters **217**. a) 1-(Ethoxycarbonylethyliden)-triphenylphosphoran, Toluol, 80 °C, 48 h, 77 %; b) DIBALH, Toluol, -78 °C, 15 min; c) MnO₂, CH₂Cl₂, 2 h, 98 %; d) S-tert-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat, NaH, THF, 0 °C → RT, 12 h, 68 %.

Anschließend sollte 2, 4-Dimethoxybenzyl-Glycin **220** an der festen Phase mit dem β -Ketothioester **217** acyliert werden. Nach Zyklisierung und Abspaltung konnte die gewünschte N-geschützte Tetramsäure **222** erhalten werden. Leider gelang es trotz unterschiedlicher Synthesestrategien nicht, das Amin ohne Zersetzung der Polyenoil-Tetramsäure zu entschützen. Um Zugang zu größeren Mengen des gewünschten Produkts in besseren Ausbeuten zu erhalten, wurde letztlich eine Synthese in Lösung durchgeführt (Abbildung 45). Hierzu wurde Glycinmethylester **218**, welcher zuvor mittels NaHCO₃ aus Glycinmethylester-Hydrochlorid freigesetzt wurde, mit β -Ketothioester **217** unter Silberaktivierung amidiert.

Spezieller Teil

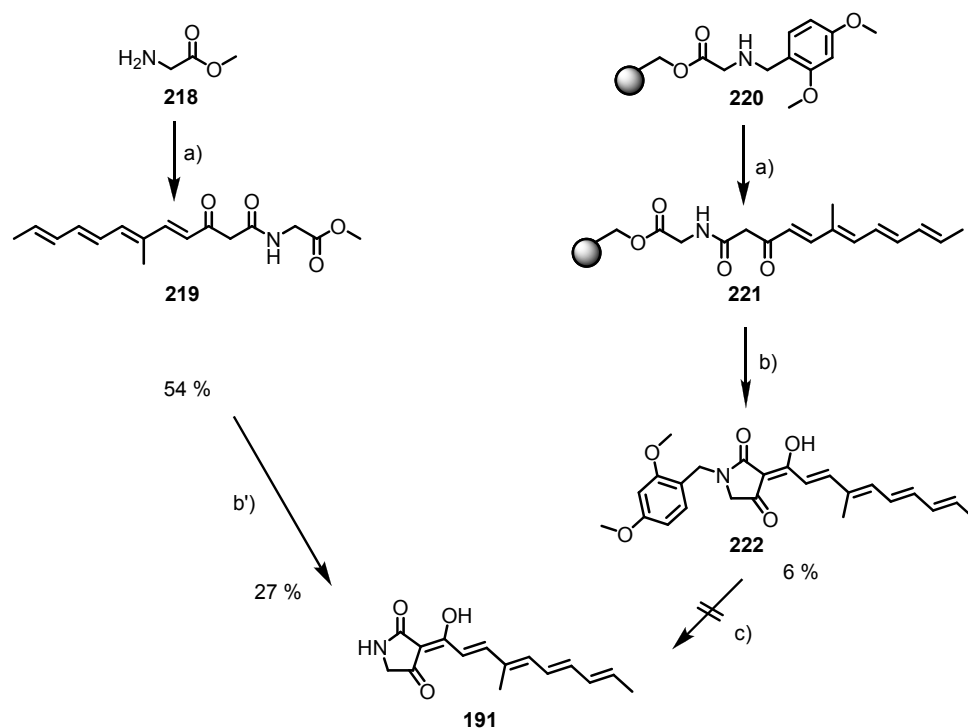


Abbildung 45: Synthese von Raveninsäure. a) $\text{Ag}(\text{OCOCF}_3)$, THF, RT, 12 h; b') $\text{KO}t\text{Bu}$, $t\text{BuOH}$, RT, 2 h, 27 %; b) KOH , MeOH, Dioxan, CH_2Cl_2 , 2 h, 6 %; c) HCOOH , RT, 2 h, Koevaporation mit Toluol führte zur Zersetzung des Produktes.

Zyklisierung mit Kalium-*tert*-butoxid in *tert*-BuOH ergab nach präparativer HPLC das gewünschte Produkt **191** in 27 % Ausbeute. Eventuell trug auch hier das Fehlen einer Schutzgruppe am Amin zur niedrigen Ausbeute bei. Auch die Aufreinigung gestaltete sich schwierig, da Raveninsäure zum einen schwer löslich ist und zum anderen stark am Säulenmaterial haftete. NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchung der isolierten Substanz stimmten mit der postulierten Struktur überein, obwohl einige NMR-Signale nicht exakt denen von Barrow^[108] beschriebenen entsprachen. Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass einige Verschiebungen im NMR-Spektrum stark pH-abhängig sind, so dass für einen sicheren Vergleich beide Substanzen unter exakt gleichen Bedingungen gemessen werden müssten.

4.4 Untersuchung der biologischen Eigenschaften von Melophlin A und der Tetramsäure-Kollektion

4.4.1 Einfluss von Melophlin A auf den Ras-Signalweg

4.4.1.1 Der MDCK-F3 Phänotyp-Assay

Die mit dem viralen H-Ras-Onkogen stabil transfizierte Zelllinie MDCK-F3^[113] eignet sich auf Grund ihres vom Wildtyp charakteristisch abweichenden Phänotyps als System zur Identifizierung von Substanzen, die den aktivierten Ras-Signalweg modulieren.^[114, 115] Untransfizierte MDCK-Zellen besitzen runde epithelartige Morphologien mit stark ausgeprägten Zell-Zellkontakten und wachsen in nur einer Schicht (Abbildung 46A). Mit vH-Ras-transfizierte MDCK-F3-Zellen zeigen dagegen spindelförmige Phänotypen und bilden kaum Zell-Zellkontakte (Abbildung 46B). Zudem wachsen sie bei hoher Zelldichte in mehreren Schichten übereinander, was auf einen Verlust an Kontaktinhibition hinweist.

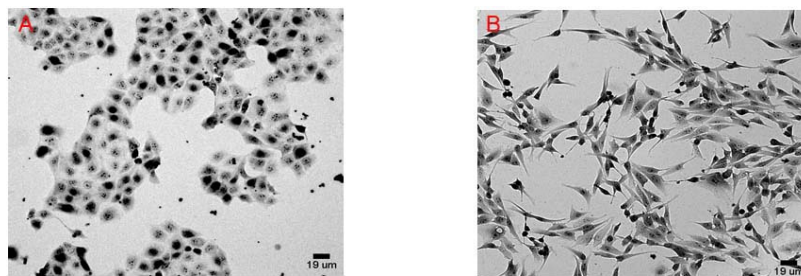


Abbildung 46: A) Wildtyp-MDCK-Zellen; B) MDCK-F3-Zellen

Inkubiert man MDCK-F3-Zellen mit dem bekannten MEK-Inhibitor U0126^[116] **223**, führt dies zu einer Reversion des Phänotyps. Die MDCK-F3-Zellen zeigen nach Inkubation mit 20 µM U0126 wesentlich rundere Morphologien und beginnen wieder vermehrt Zell-Zellkontakte auszubilden (Abbildung 48B).

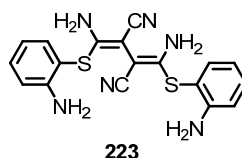


Abbildung 47: Struktur des MEK-Inhibitors U0126.

Da für Melophlin A ein ähnlicher Effekt in NIH3T3-Fibroblasten beschrieben wurde,^[65] sollte auch in MDCK-F3-Zellen eine phänotypische Änderung durch Wirkung der Substanz auf den Ras-Signalweg zu beobachten sein.

Spezieller Teil

MDCK-F3-Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen an Meloplin A inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der MEK-Inhibitor U0126 eingesetzt und als Negativkontrolle wurden MDCK-F3-Zellen mit DMSO inkubiert. Nach 18 h wurden die Zellen fixiert, mit Coelestinblau unspezifisch angefärbt und mikroskopiert. Abbildung 48 zeigt, dass sich bei über 50 % der MDCK-F3-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A bei Konzentrationen von größer oder gleich $30 \mu\text{M}$ die Morphologie der Wildtypzelllinie erneut einstellt. Meloplin A übte somit auch in MDCK-F3-Zellen einen Effekt auf den Ras-Signalweg aus, der zu einer Reversion des Phänotyps der Ras-transformierten Zelllinie führte.

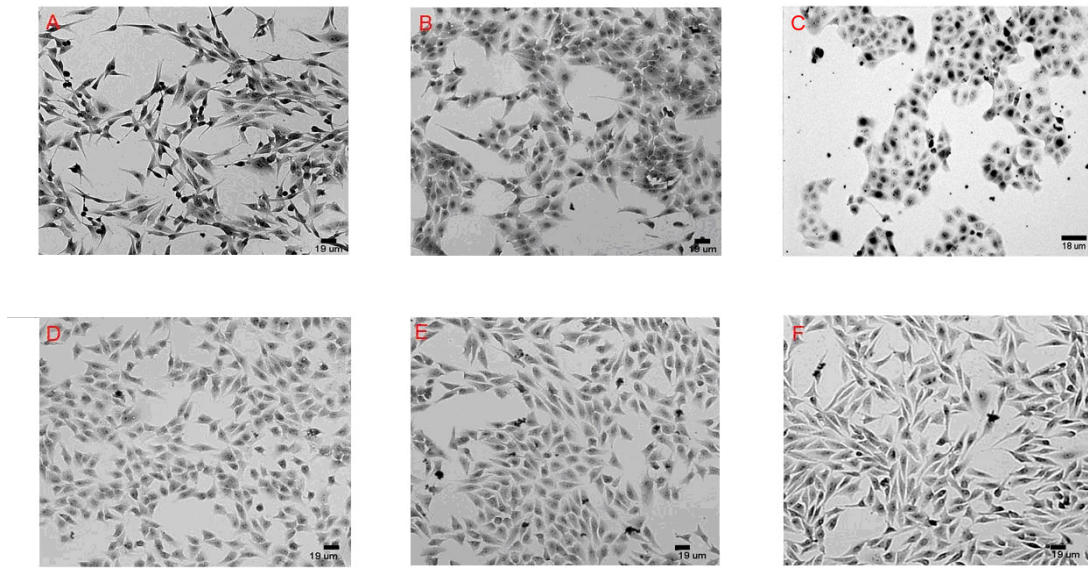


Abbildung 48: Untersuchung des Effekts von Meloplin A auf MDCK-F3-Zellen. A) MDCK-F3-Zellen wurden für 18 h mit DMSO inkubiert. Die Zellen zeigten fibroblastenartige Phänotypen. B) MDCK-F3-Zellen nach Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ U0126 für 18 h. Die Zellen zeigten einen runderen Phänotyp und bildeten erneut Zell-Zellkontakte aus. C) Wildtyp-MDCK-Zellen. Die Zellen zeigten epithelartige Phänotypen mit runden Morphologien und starker Ausprägung an Zell-Zellkontakten. D-F) MDCK-F3-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A ($50 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$). Die Zellen zeigten wie in B) eine Reversion des Phänotyps. Der beobachtete Effekt war zudem konzentrationsabhängig. Bei Konzentrationen von $50\text{-}30 \mu\text{M}$ zeigten die Zellen überwiegend runde Morphologien und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten. Bei Konzentrationen unter $20 \mu\text{M}$ blieb der fibroblastenartige Phänotyp der MDCK-F3-Zellen erhalten.

Weiterhin wurde der Effekt von Meloplin A auf die verringerte Kontaktinhibition in MDCK-F3-Zellen untersucht. Der Verlust der Kontaktinhibition bei MDCK-F3-Zellen kann durch eine verringerte E-Cadherin-Expression an der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden. Das transmembrane Glykoprotein E-Cadherin spielt eine wichtige

Rolle in der Ca^{2+} -abhängigen Ausbildung von Adhensionen zwischen Epithelzellen und ist somit für die Morphogenese gesunder Zellen von großer Bedeutung.^[117] Damit übereinstimmend werden Zellinvasion und Metastasenbildung von Karzinomzellen oft mit durch E-Cadherin-reduzierter Zell-Zelladhäsion in Verbindung gebracht.^[113, 118, 119]

MDCK-F3-Zellen zeigen fibroblastenartige Morphologien, exprimieren kaum E-Cadherin und sind hochinvasiv.^[113, 118] Die Wildtypzelllinie hingegen hat einen epithelartigen Phänotyp und exprimiert E-Cadherin. In unserem Experiment ließ sich exprimiertes E-Cadherin in Wildtyp-MDCK-Zellen an den Zellkontaktflächen mit einem fluoreszenzmarkierten E-Cadherin-Antikörper anfärben (Abbildung 49A). Die MDCK-F3-Zellen zeigten hingegen keine E-Cadherinfärbung an den Zellgrenzen (Abbildung 49B).

Um den Effekt von Melophlin A auf H-Ras-transformierte Zellen zu bestätigen, wurden erneut MDCK-F3-Zellen mit Melophlin A und U0126 inkubiert und nach Methanol-Fixierung mit FITC-markiertem E-Cadherin-Antikörper angefärbt. Abbildung 49C-D zeigt, dass MDCK-F3-Zellen sowohl nach Behandlung mit Melophlin A (D) als auch nach Behandlung mit U0126 (C) wieder verstärkt E-Cadherin-Expression an den Zellkontaktflächen zeigten. Dies unterstützt unsere Annahme, dass Melophlin A eine Reversion des Phänotyps in H-Ras-transformierten Zellen bewirkt.

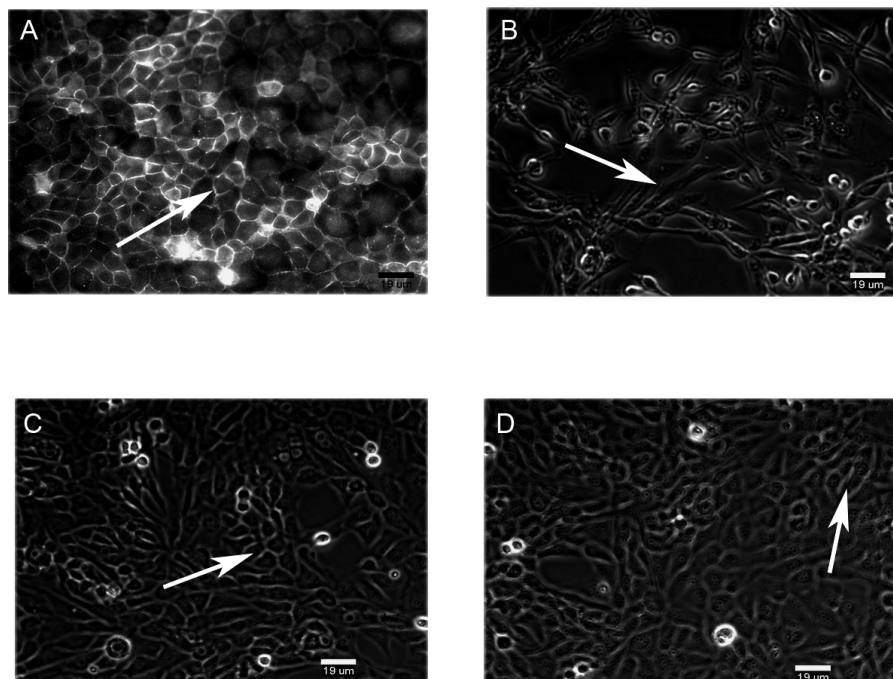


Abbildung 49: E-Cadherin-Färbung. A) Wildtyp-MDCK-Zellen zeigten starke E-Cadherin Expression an den Zellgrenzflächen. B) Anfärbung von MDCK-F3-Zellen mit FITC-Anti-E-Cadherin nach Behandlung mit DMSO. Die Zellen zeigten kaum E-Cadherin-Expression und Lokalisation an den Zellgrenzen. C) MDCK-F3-Zellen, die mit U0126 (20 μM) präinkubiert

Spezieller Teil

wurden, zeigten wieder E-Cadherin-Expression an den Zellkontakten, was auf eine Reversion des Phänotyps schließen lässt. D) Zellen, die mit 50 μM Melophlin A vorinkubiert wurden, zeigten E-Cadherin-Lokalisation an den Zellgrenzflächen. Auch bei einer niedrigeren Konzentration (30 μM) konnte dieser Effekt beobachtet werden.

4.4.2 Der WST-1-Assay

Um sicherzustellen, dass die beobachteten phänotypischen Effekte auf die MDCK-F3-Zelllinie durch eine direkte Wirkung der Substanz auf den Metabolismus der Zelle und nicht durch Zytotoxizität hervorgerufen wurden, wurde ein Proliferationsassay unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

Der Assay beruht auf dem Zusatz des Tetrazoliumsalzes 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat (WST-1), welches durch mitochondriale Dehydrogenasen in das tiefrote Formazan umgewandelt wird (Abbildung 50). Die Stärke der Färbung korreliert direkt mit der Anzahl lebender und metabolisch aktiver Zellen und kann UV-spektroskopisch bei 450 nm gemessen werden. Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit als zytotoxisch gewertet, wenn bei der eingesetzten Konzentration weniger als 75 % der Zellen überlebten.

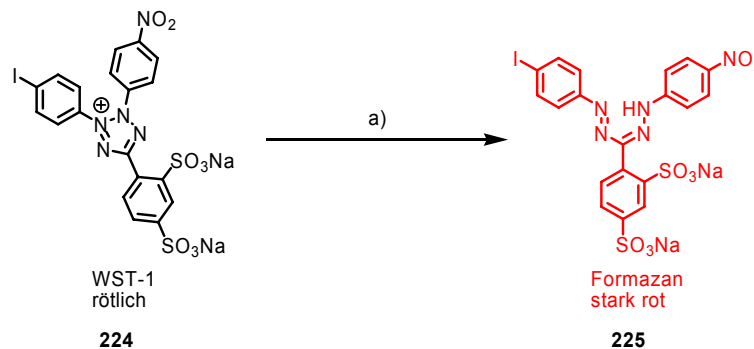


Abbildung 50: Proliferationsassay mit WST-1. a) Mitochondriale Succinat-tetrazolium-reduktase führt zur Umsetzung des Tetrazoliumsalzes zum intensiv roten Formazan.

Eine Behandlung von MDCK-F3-Zellen mit Melophlin A im Konzentrationsbereich von 20 - 80 μM zeigte keine Toxizität.

4.4.3 Der Reporteragen-Assay

Über einen Ras/MAPK-Reporteragen-Assay sollte der inhibierende Effekt von Melophlin A auf den Ras-Signalweg bestätigt werden. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Dipl.-Biol. Karin Warburg durchgeführt.

Die HLR-Elk1 (HeLa Luziferase Reporter Elk1)-Zelllinie von Stratagene wurde erstellt, um die *in vivo*-Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1 untersuchen zu können. Die

Aktivierung von Elk1 steht in engem Zusammenhang mit der Aktivierung der vorgeschalteten Ras/MAPK-Kaskade (Kapitel 2.2). Die Ras-abhängige Raf-MEK-ERK-Signalkaskade kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (Epidermal Growth Factor) aktiviert werden. Eines der direkten Ziele der aktivierten Kinase ERK1/2 ist der Transkriptionsfaktor Elk-1. Bei der so genannten PathDetect^{®[120]} HLR-Elk1-*Trans*-Reporter-Zelllinie (Stratagene) handelt es sich um stabil transfizierte HeLa-Zellen, die neben einem Plasmid, welches ein GAL4-Elk1-Fusionsprotein kodiert, auch ein Reporterplasmid zur Firefly-Luziferase-Expression tragen. Das Reporterplasmid steht hierbei unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors, welcher aus fünf direkten Wiederholungen der Hefe GAL4-Bindungsstelle besteht. Durch Phosphorylierung der Aktivierungsstelle des GAL4-Elk1-Fusionsproteins bindet es an den beschriebenen Promoter und induziert die Luziferase-Expression.

Wird in diesen Zellen nun durch Zugabe eines Wachstumsfaktors (in unserem Fall EGF) die EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade aktiviert, führt dies zur Phosphorylierung der Elk-1-Aktivierungsdomäne. Daraufhin induziert das phosphorylierte Fusionsprotein die Transkription des Luziferase-Gens. Eine Inhibition des Ras-MAPK-Signalwegs oberhalb der Transkriptionsebene würde somit die Expression der Luziferase reduzieren und ginge entsprechend mit einem verringerten Lumineszenz-Signal einher.

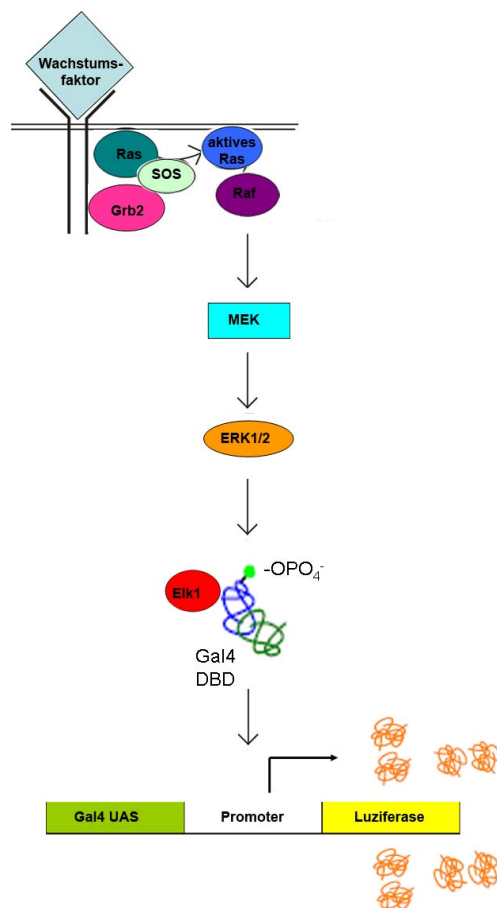


Abbildung 51: Vereinfachte Darstellung der Luziferase-Expression im Ras-Reportergen-Assay.

Um zu untersuchen, ob Melophlin A den Ras-Signalweg oberhalb des Transkriptionsfaktors Elk1 inhibiert, wurden HLR-ELK1-Zellen sowohl mit Melophlin A (zunächst 30, 10, 5 μM) als auch mit dem spezifischen MEK-Inhibitor U0126 und DMSO für 18 h inkubiert und anschließend für 5 min mit EGF stimuliert.^[116] Das Auslesen der Luziferase-Aktivität zeigte, dass Melophlin A bis zu einer Konzentration von 10 μM den Ras-Signalweg inhibierte, wobei eine Inhibition mit einer Reduktion der Luziferase-Aktivität um mindestens 30 % einherging. Zur genaueren Charakterisierung konnte zudem ein IC_{50} -Wert von $18.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

Um sicherzustellen, dass der inhibierende Effekt nicht auf Zytotoxizität der Verbindung zurückzuführen war, wurde auch mit dieser Zelllinie ein WST-1-Assay durchgeführt. In diesem zeigte sich, dass Melophlin A im betrachteten Konzentrationsbereich ($> 30 \mu\text{M}$) nicht toxisch wirkt.

4.4.4 Biologische Evaluierung des Einflusses der Tetransäure-Kollektion auf den Ras-Signalweg

Um neue Modulatoren des Ras-Signalwegs zu identifizieren, sollte auch die synthetisierte Tetransäure-Kollektion in dem beschriebenen phänotypischen sowie dem Reportergen-Assay untersucht werden. Hierzu wurden alle Substanzen bei Konzentrationen von 10 - 80 μM im phänotypischen Assay und bei einer Anfangskonzentration von 30 μM im Reportergen-Assay getestet. Als Kontrollen wurden - wie in den Kapiteln 4.4.1.1 - 4.4.3 - beschrieben, der bekannte MEK-Inhibitor U0126 (30 μM) sowie reines DMSO eingesetzt.

Im Reportergen-Assay wurden Substanzen als aktiv gewertet, die die Luziferase-Expression um mehr als 30 % inhibierten. Für aktive Substanzen wurde im Reportergen-Assay in einem zweiten Experiment ein IC_{50} -Wert bestimmt. Um wiederum auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf Zytotoxizität der untersuchten Substanzen zurückzuführen waren, wurde an jeden Assay im betrachteten Konzentrationsintervall ein Proliferationstest angeschlossen. Lediglich Substanzen, mit Aktivität im Assay und ohne Zytotoxizität im betrachteten Konzentrationsbereich wurden als geeignete Modulatoren gewertet. Verbindungen wurden als zytotoxisch angesehen, wenn die Substanzen die Anzahl lebender, metabolisch aktiver Zellen um mehr als 25 % reduzierten.

Aus der knapp 70 Tetransäuren enthaltenden Bibliothek wurden im phänotypischen Assay zwei Tetransäuren identifiziert, die ebenfalls eine Reversion des Phänotyps H-Ras-transformierter MDCK-F3-Zellen herbeiführten. Bei diesen beiden Substanzen (**131** und **133**) handelte es sich um strukturelle Verwandte von Melophlin A.

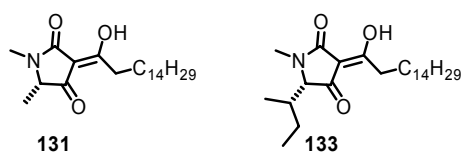


Abbildung 52: Substanzen **131** und **133** zeigen eine Reversion des Phänotyps H-Ras-transformierter MDCK-F3-Zellen.

Abbildung 53 zeigt exemplarisch den konzentrationsabhängigen Effekt, den Substanz **131** auf MDCK-F3-Zellen ausübte. Bei 80 μM (Abbildung 53A) wirkte Verbindung **131** zytotoxisch. Bei einer Konzentration von 50 - 20 μM (Abbildung 53B-C) nahmen die Zellen die vom Wildtyp bekannte, runde Morphologie an und gingen auch wieder Zell-Zellkontakte ein. Bei einer Konzentration von 10 μM behielten die Zellen überwiegend den fibroblastenartigen Phänotyp der MDCK-F3-Zellen bei.

Spezieller Teil

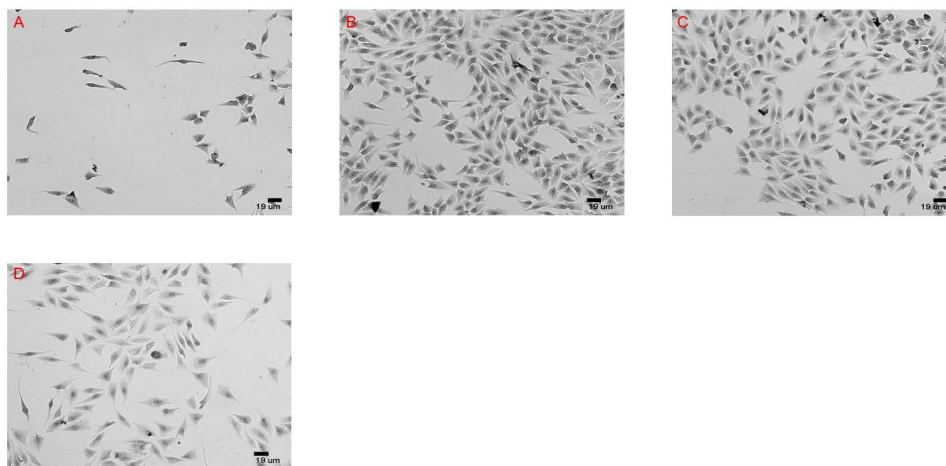
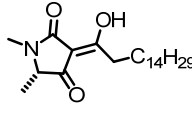
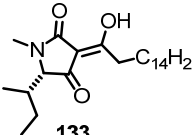
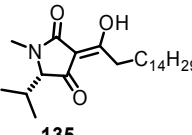
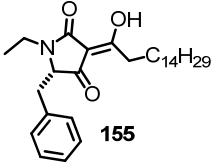
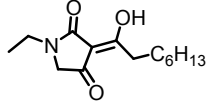
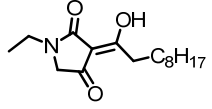
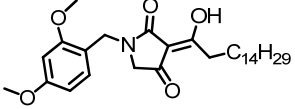
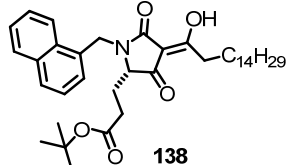
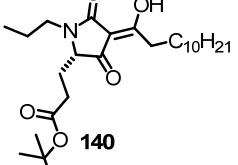
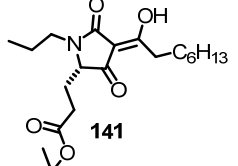
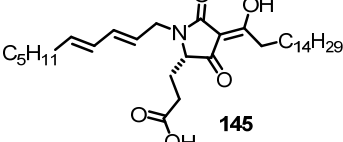
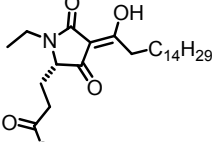


Abbildung 53: MDCK-F3-Zellen nach Behandlung mit **131** in verschiedenen Konzentrationen. A) Behandlung mit 80 µM **131**; die Substanz wirkte zytotoxisch. B) Behandlung mit 30 µM **131**; die Zellen zeigten den runden Phänotyp mit Zell-Zellkontaktbildung der Wildtypzelllinie. C) Behandlung mit 20 µM **131**; auch hier zeigten die Zellen runde Morphologien mit Zell-Zellkontaktausbildung. D) Behandlung mit 10 µM **131**; die Zellen zeigten wieder spindelförmige Zellmorphologie und bildeten kaum Zell-Zellkontakte.

Interessanterweise zeigten wesentlich mehr Mitglieder der Tetramsäure-Kollektion inhibitorische Aktivität im Reporteragen-Assay. Hier konnten insgesamt 10 aktive Verbindungen identifiziert werden, darunter auch die im phänotypischen Assay als aktiv hervorgetretenen Verbindungen **131** und **133**.

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der im Reporteragen-Assay gefundenen aktiven Substanzen.

Verbindung	Effekt im Reporteragen-Assay ^a [µM]	WST-1 in HLR-Zellen ^b [µM]
Melophlin A	18.1 ± 1.2	30
 131	16.8 ± 3.4	30
 133	30	30
 135	30	30

 <p>155</p>	30	30
 <p>122</p>	30	30
 <p>123</p>	23.8 ± 0.8	30
 <p>130</p>	30	30
 <p>138</p>	36.5 ± 5	30
 <p>140</p>	30	30
 <p>141</p>	10	30
 <p>145</p>	30	30
 <p>142</p>	30	30

Spezieller Teil

^aAngegebenen sind entweder die IC₅₀-Werte der Substanzen für eine Inhibition im Reporter-gen-Assay oder, wenn dieser nicht bestimmt wurde, die niedrigste Konzentration (30, 20, 10 µM) bei der noch Inhibition um mehr als 30 % sichtbar war. ^bZytotoxizität in HLR-Zellen, gemessen als Rest-Viabilität der Zellen mit dem Proliferationsreagenz WST-1. Zytotoxizität wurde definiert als die Konzentration, bei der weniger als 75 % der Zellen noch lebten. Wenn bei der höchsten gemessenen Konzentration noch keine Zytotoxizität beobachtet wurde, wurde dieser Wert als Schwelle angenommen.

Aus den Ergebnissen der beiden Assays ließ sich eine Struktur-Wirkungs-Beziehung ablesen. Wie in Abbildung 52 gezeigt, hatten nur die zwei strukturell ähnlichen Melophrin A-Analoga **131** und **133** einen Einfluss auf den Phänotyp von MDCK-F3-Zellen. Das heißt, dass lediglich die Position fünf des Rings (frühere α-Position der eingesetzten Aminosäure) ohne Aktivitätsverlust leicht variiert werden konnte. Die lange Lipidkette in Position drei des Rings erwies sich als unverzichtbar für die betrachtete biologische Aktivität. Schon eine Verkürzung um ein bis zwei Methyleneinheiten (Verbindungen **110** und **128**, Tabelle 4-2) reduzierte die Aktivität drastisch. Auch am Amin des Rings konnten ohne Verlust der betrachteten Aktivität keine größeren Substituenten als die Methylgruppe des Naturstoffs eingeführt werden.

Der mit Hilfe des Reporter-gen-Assays untersuchte inhibitorische Effekt der Substanzen sollte, wie in 4.4.3 beschrieben, zeigen, ob eine Substanz den Ras-Signalweg oberhalb des Transkriptionsfaktors Elk-1 inhibiert. Die in Tabelle 4-4 zusammengefassten Ergebnisse des Reporter-gen-Assays zeigten, dass mehr Substanzen den Reporter-gen-Assay inhibierten als Rücktransformation auslösten.

Dies legte nahe, dass der Rücktransformation ein komplexerer Zellmechanismus zugrunde liegt. Dennoch zeigten sich auch in der Struktur-Aktivitäts-Beziehung des Reporter-gen-Assays vergleichbare Trends.

So spiegelte sich auch in Tabelle 4-4 die Bedeutung der Lipidseitenkette für einen Effekt auf den Ras-Signalweg wieder. Eine Verkürzung der Kette bereits um eine Methylengruppe führte zum Verlust der Aktivität. Auch die Substanzen **110** - **111**, bei denen die Kette um zwei bzw. vier Methyleneinheiten gekürzt wurde, zeigten keine Aktivität mehr.

Interessanterweise schienen die Substanzen **122** und **123** mit nur acht bzw. zehn Methylengruppen wieder eine Inhibition des Ras-Signalwegs zu bewirken, eine weitere Verkürzung der Kette hob den Effekt allerdings wieder auf.

Auch die Substituenten am Amin konnten nicht bedingungslos vergrößert werden. So zeigten unter den von Glycin abgeleiteten Substanzen nur noch solche Aktivität, die

neben der Palmitylkette keinen größeren Amin-Substituenten als eine Methyl- oder Ethylgruppe aufwiesen. Verbindung **130** mit einem 2,4-Dimethoxybenzyl-Substituenten fiel etwas aus dem Trend.

Die größte Variabilität besitzt auch in diesem Assay die Position fünf des Rings (ehemalige α -Position der Aminosäure). Substanzen mit verschiedenen Alkylresten sowie Verbindungen, die von Phenylalanin oder Glutaminsäure abgeleitet wurden, inhibierten die Lumineszenzreaktion.

Interessanterweise konnten Glutaminsäure-basierte Tetramsäuren voluminösere Substituenten am Amin tragen, als die aus Glycin aufgebauten Analoga. So zeigten die von Glutaminsäure abstammenden Tetramsäuren **138** und **145** mit Naphthyl- oder (2*E*, 4*E*)-Deca-2,4-dienyl-Substituent inhibierende Wirkungen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Palmitylkette des Naturstoffs für den beobachteten biologischen Effekt von großer Bedeutung ist. Am Tetramsäurekopf des Moleküls konnten dagegen kleinere Variationen vorgenommen werden, ohne die Aktivität negativ zu beeinflussen. Besonders variabel zeigte sich hier die ehemalige α -Position der zur Synthese eingesetzten Aminosäuren. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden biotinylierte aktive und inaktive Melophlin A-Analoga synthetisiert, die es später erlauben sollten die Bindungspartner von Melophlin A zu identifizieren.

4.5 Identifizierung der Bindungspartner von Melophlin A

Um den Effekt von Melophlin A und seinen nahen Analoga auf den Ras-Signalweg näher charakterisieren zu können, sollten die zellulären Bindungspartner identifiziert werden. Eine Methode hierfür ist die Affinitätsaufreinigung, eine Abwandlung der in 2.1.3 beschriebenen Affinitätschromatographie. Die Affinitätsaufreinigung basiert auf der Immobilisierung des Inhibitors an einem polymeren Träger, welcher dann zu dem Zelllysate gegeben wird. Als System wurden mit Streptavidin beladene magnetische Partikel verwendet. Die magnetischen Eigenschaften der Festphase ermöglichten ein einfaches Aufreinigen nach jedem Schritt.

Um einen solchen Ansatz nutzen zu können, musste der Inhibitor biotinyliert werden. Dies sollte eine Immobilisierung an Magnetpartikeln über die Bindung von Biotin zu Streptavidin ($K_d = 10^{-16}$ M) ermöglichen.

Im Anschluss wurde das System mit Zelllysate inkubiert, so dass Interaktionspartner von Melophlin A an den Magnetpartikeln verblieben, während unspezifisch bindende Proteine gewaschen werden konnten. Nach Elution der gebundenen Proteine

Spezieller Teil

wurden diese massenspektrometrisch analysiert und durch Datenbankabgleich identifiziert.

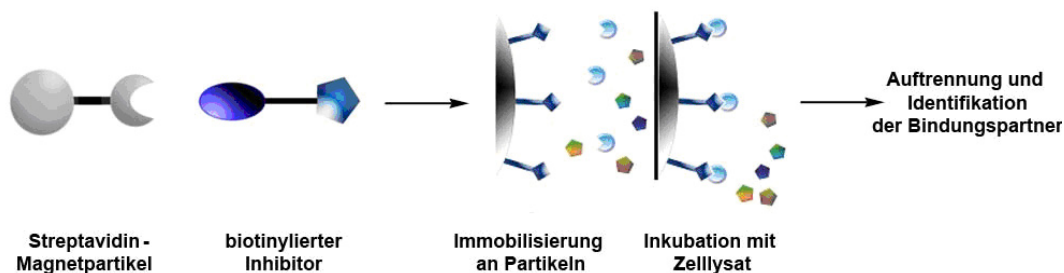


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Affinitätsaufreinigung an magnetischen Streptavidinpartikeln.

4.5.1 Synthese der Affinitätssonden

Zur Identifizierung der Bindungspartner von Meloplin A wurden zunächst die Affinitätssonden **226** und **228** dargestellt. Die in 4.4.4 anhand des Reportergen- sowie des phänotypischen Assays aufgestellte Struktur-Wirkungs-Beziehung erlaubte eine Vorhersage der möglichen Derivatisierungen, welche noch zu einem aktiven, biotinylierten Analogon von Meloplin A führen sollten. Des Weiteren wurde ein inaktives, aber strukturell möglichst ähnliches Analogon zur Identifizierung unspezifisch-bindender Proteine benötigt.

Die ehemalige α -Position der eingesetzten Aminosäuren (Position fünf des Tetramsäurerings) hat sich als besonders geeignet zur Derivatisierung erwiesen. So sollte ausgehend von einer Glutaminsäure-basierten Tetramsäure in dieser Position die nötige Biotineinheit eingeführt werden. Für die Positiv-Sonde **226** sollte zudem die lange Palmitylkette, die sich als relevant für die biologischen Effekte erwiesen hatte, erhalten bleiben. Aus synthetischen Gründen wurde die Aminfunktion nicht methyliert, sondern ethyliert, was die biologische Aktivität laut Struktur-Wirkungs-Beziehung nicht beeinträchtigen sollte. Als Vorläufer zur Synthese der aktiven Probe zur Affinitätschromatographie (Pull-down-Probe) wurde somit die Substanz **142** (Tabelle 4-4) ausgewählt.

Überraschenderweise erwies es sich als komplizierter, die nicht aktive Kontrolle zu biotinylieren. Sowohl die physikalischen als auch strukturellen Eigenschaften von Positiv- und Negativprobe sollten ähnlich sein, um vergleichbare Lipophilie und Löslichkeit zu garantieren. So wurde zunächst die Palmitylkette im Molekül erhalten und dafür der Substituent am Amin vergrößert. Wie schon in Tabelle 4-4 gezeigt, verloren Glycin-basierende Substanzen mit sperrigen Substituenten am Amin ihre biologische Aktivität. Im Rahmen der Synthese der Kontrollsubstanz zeigte sich dann

aber - wie bereits erwähnt - dass Glutaminsäure-basierte Analoga, selbst mit voluminösem Naphthylsubstituenten noch Aktivität im Reporter-Gen-Assay aufwiesen. So musste letztlich die Palmitylkette um elf Methylengruppen gekürzt werden, um eine inaktive und nicht zytotoxische Verbindung zu erhalten (Eintrag **143** in Tabelle 4-2). Die Seitenketten der beiden Vorläufermoleküle wurden mit TFA in Dichlormethan entschützt, bevor die nötige Biotineinheit über einen vier Polyethylenglykol-Einheiten umfassenden Linker mittels einer Amidkupplung mit HOBt, DIPEA und EDC eingeführt wurde (Abbildung 55).

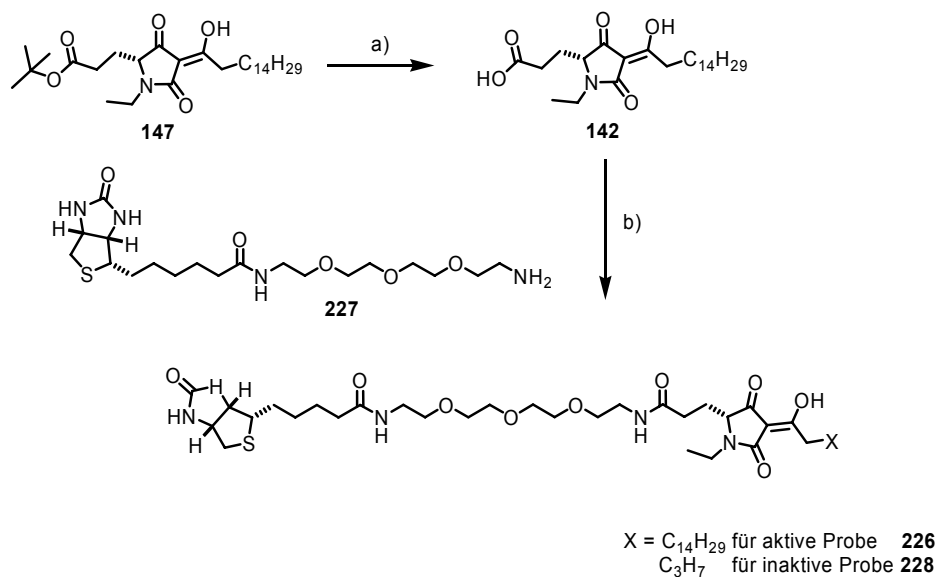


Abbildung 55: Synthese der biotinylierten aktiven und inaktiven Pulldownsonden. a) TFA/CH₂Cl₂, 2 h, RT, quantitativ; b) HOBt, DIPEA, EDC, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 18 h, 71 % **226** und 22 % für **228**.

Um sicher zu gehen, dass Substanz **226** noch Aktivität aufwies, während **228** inaktiv sein sollte, wurden beide Verbindungen im Reporter-Gen-Assay getestet. Auch musste eine Zytotoxizität der beiden biotinylierten Moleküle ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich, dass die Positivprobe **226** wie erwartet im Reporter-Gen-Assay einen inhibitorischen Effekt mit einem IC₅₀-Wert von 25.7 ± 2.9 μM zeigte. In HLR-Zellen konnte zudem bis zu einer Konzentration von 30 μM keine Toxizität nachgewiesen werden. Im Phänotyp-Assay konnte jedoch kein Effekt auf die Morphologie von MDCK-F3-Zellen festgestellt werden, was vermutlich auf die schlechtere Membrangängigkeit der biotinylierten Substanz zurückzuführen ist. Eine weitere Erklärung könnte auch der komplexere Zellmechanismus sein, der einer Phänotyp-Reversion zugrunde liegt.

Die Kontrollprobe **228** zeigte weder Aktivität in einem der beiden Assays, noch Zytotoxizität im betrachteten Konzentrationsintervall.

Damit erfüllten beide Verbindungen die Grundvoraussetzungen, die zur erfolgreichen Suche nach den Bindungspartnern von Melophlin A nötig waren.

4.5.2 Identifizierung von Bindungspartnern mittels Direktverdau und LC-MS/MS-Spektrometrie

Um die zellulären Zielproteine von Melophlin A identifizieren zu können, wurde zunächst ein vereinfachter Ansatz gewählt. Hierbei wurden Bindungspartner des Melophlin A-Analogons **226** auf den beschriebenen Magnetpartikeln (Abbildung 54) aus Zelllysate isoliert und anschließend direkt auf den Partikeln verdaut. Die tryptisch-verdauten Peptide wurden anschließend per RP-LC-MS/MS aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

Als Kontrollexperiment wurde lediglich Biotin mit dem PEG-Linker **227** eingesetzt. Dies ermöglichte eine Unterscheidung der an Melophlin A-Analogon **226** bindenden Proteine von solchen, die am Magnetpartikel-Streptavidin-Biotin-Linker-System verblieben.

Zur Affinitätschromatographie wurden HeLa-Zellen (die Zelllinie des Reporteragen-Assays) verwendet. Analog zum Assay wurden die Zellen zunächst mit EGF stimuliert und dann - wie in 7.3.11 beschrieben - lysiert. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde nach Bradford^[121] bestimmt und für die folgenden Versuche wurden Lysate mit einer Proteinkonzentration von 1.0 mg/ml eingesetzt.

Da auch in der Zelle Biotin und biotinylierte Proteine vorkommen, wurden zunächst der Linker **227** und das biotinylierte Melophlin A-Derivat **226** an die Partikel konjugiert. Erst im nächsten Schritt wurde das System mit Zelllysate bei 4 °C für 1 h inkubiert. Nach Entfernen des Lysats wurden die Magnetpartikel viermal mit Lysepuffer und zusätzlichem MgCl₂ gewaschen, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen (Protokoll von Dr. Dirk Pendzialek im Rahmen seiner Dissertation am MPI Dortmund). Anschließend wurden die auf den Partikeln verbliebenen Proteine mit Trypsin über Nacht bei 34 °C verdaut. Das resultierende Gemisch an Peptidbruchstücken wurde direkt über RP-LC-MS/MS aufgetrennt und analysiert. Die erhaltenen Spektren konnten mittels der kommerziell erhältlichen Bioworks-Software bearbeitet und in ein dta-Format umgewandelt werden. Letzteres ließ sich in die Suchmaske von MASCOT (www.matrixscience.com)^[122] laden. Mit Hilfe dieser Datenbank wurden die identifizierten tryptisch verdauten Peptide den Ursprungproteinen zugeordnet. Die genauen Einstellungen zur MASCOT-Suche sind in Kapitel 7.3.16 beschrieben. Die Signifikanzgrenze zur Proteinidentifikation wurde auf 95 % (p < 0.05) gesetzt.

Anschließend wurde ein Abgleich der im Melophlin A-Pulldown identifizierten Proteine mit jenen aus dem Kontrollexperiment durchgeführt. So wurden nur solche Proteine als potentielle Bindungspartner von Melophlin A akzeptiert, die nur im Melophlin A-Experiment und nicht im Kontrollversuch identifiziert wurden. Hierzu wurden sechs unabhängige Experimente durchgeführt und nur Proteine, die in mindestens fünf der Melophlin A- und keinem der Kontrollversuche identifiziert wurden, wurden als potentielle Bindungspartner zugelassen. Mit dieser Methode wurden 19 Proteine identifiziert, die in Tabelle 4-5 zusammengefasst sind.

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der mittels RP-LC-MS/MS-identifizierten potentiellen Interaktionspartner des Melophlin A-Analogons **226**. In rot sind Proteine wiedergegeben, die in sechs von sechs Experimenten identifiziert wurden und in schwarz Proteine, die in fünf von sechs Experimenten gefunden wurden.

Protein	Funktion
COP subunits A/B/G/E	Coatomer subunits
GCN1L	GCN1-like protein 1 (HsGCN1)
DYHC-HUMAN	Dynein
PRKDC	DNA-dependent Protein kinase
IMB3	Importin β -3 (Kariopherin 3)
IPO7/IPO4/IPO9	Importin-7, 4, 9, (RanBP7)
TNPO1	Transportin, (Importin- β 2)
XPO 1/2/5/6	Exportin-1/2/5/6
EF1A1/2	Elongation factor $\frac{1}{2}$
DHB4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2

So konnten eine Reihe verschiedener Untereinheiten der COP-Proteine identifiziert werden. Bei den Coatomer-Proteinen handelt es sich um zytosolische Proteine, die als Komplex einen Teil der nicht Clathrin-abhängigen Vesikel zum Transport von Proteinen zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi bilden.^[123, 124]

Des Weiteren wurden verschiedene Importine, Exportine und Transportine als potentielle Interaktionspartner von Melophlin A identifiziert. Diese Proteinklasse ist maßgeblich für den Import und Export von Proteinen in den Zellkern verantwortlich. Weiterhin sind diese Vorgänge durch die kleine GTPase Ran reguliert.

Spezieller Teil

Importine sind Heterodimere, die aus den Unterheiten Importin α und Importin β bestehen. Proteine, die in den Kern transportiert werden müssen, tragen so genannte nukleare Lokalisationssignale (NLS). Diese werden von Importin α im Zytosol erkannt und gebunden. Importin β hingegen erkennt und bindet Proteine der Kernpore (NPC), welche sowohl den Kerneintritt als auch den Austritt kontrollieren. Nachdem Importin seine Fracht geladen hat, interagiert es mit der Kernpore und gelangt in den Kern. Hier bindet der Komplex an das Protein Ran und kann so von seiner Fracht dissoziieren (Abbildung 56). Ran-Proteine gehören zur Familie der kleinen G-Proteine und binden nur im GTP-gebundenen Zustand an beladenes Importin. Durch die Bindung des RanGTP wird die Fracht von Importin freigesetzt und der Komplex diffundiert zurück ins Zytosol. Durch die Bindung von RanGAP's (GTPase activating protein) wird hier die Hydrolyse des RanGTP beschleunigt. RanGDP hat nur noch eine geringe Affinität an Importine zu binden, weshalb der Komplex zerfällt und Importin für weitere Transporte zur Verfügung steht. Bei dem Export von Proteinen wird die Fracht von Exportinen und RanGTP im Zellkern gebunden und diffundiert durch die Zellpore ins Zytosol, wo der Komplex wiederum dissoziiert.^[125-127]

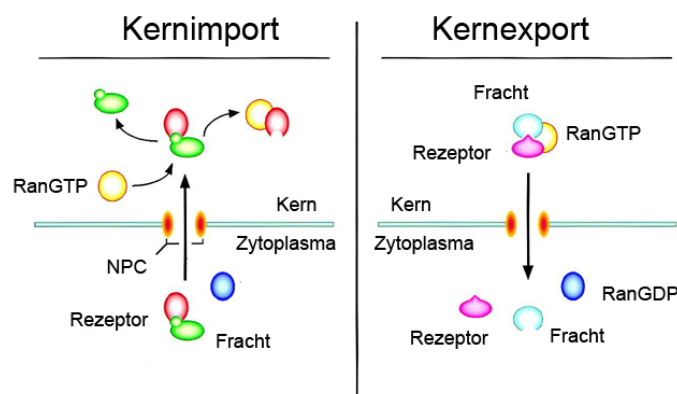


Abbildung 56: Schematische Darstellung des Kernimports und Exports.

Transportine agieren ebenfalls als Rezeptoren für nuklearen Transport analog den Importinen.

4.5.3 Identifizierung von Bindungspartnern nach Auftrennung per SDS-PAGE, In-Gelverdau und Nano-LC-MS/MS-Spektrometrie

Um die Sensitivität der Bindungspartnersuche zu erhöhen, wurde eine zweite Versuchsreihe mit veränderten Parametern durchgeführt. Anstelle der RP-LC-MS/MS wurde nun die wesentlich sensitivere RP-Nano-LC-MS/MS zur Auftrennung und

Charakterisierung der Peptidbruchstücke nach Pulldown und tryptischem Verdau eingesetzt. Die empfindlichere Nano-LC-MS/MS erlaubte es, die Proteine vor dem Verdau per SDS-Gel aufzutrennen und die einzelnen Proteinbanden oder Abschnitte der Proteinspur im Gel zu verdauen. Die vorgeschaltete Auftrennung der Proteine ermöglichte es, auch nur in geringen Mengen vorkommende Proteine zu identifizieren, da Überlagerungen von Peptidionen in der Massenanalyse reduziert werden.

Um zusätzlich direkt nach der Affinitätsaufreinigung Informationen über die Relevanz der identifizierten Proteine für die biologischen Effekte zu erhalten, wurde die in Kapitel 4.5.1 beschriebene, auf einem nicht aktiven Melophrin A-Analogon beruhende Kontrollsubstanz **228** eingesetzt. Proteine, die unter diesen Bedingungen an das aktive Melophrin A-System **226**, nicht aber an die biologisch inaktive Kontrolle **228** banden, konnten als vorvalidiert in Hinblick auf die betrachteten Effekte im Ras-Signalweg interpretiert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.5.2 beschrieben, wurden Pulldown-Experimente mit HeLa-Zelllysate durchgeführt. Dazu wurden die Magnetpartikel mit den Substanzen **226** und **228** vorinkubiert und dann für 1 h mit den Lysaten inkubiert. Nach den bereits beschriebenen Waschschrritten wurden die bindenden Proteine schließlich durch kurzes Erhitzen in SDS enthaltendem Probenpuffer von den Magnetpartikeln gelöst. Zur Vortrennung wurden die Proteinmischungen auf einem 12 % Polyacrylamid-Gel getrennt und die Proteinbanden wurden mit Coomassie angefärbt.

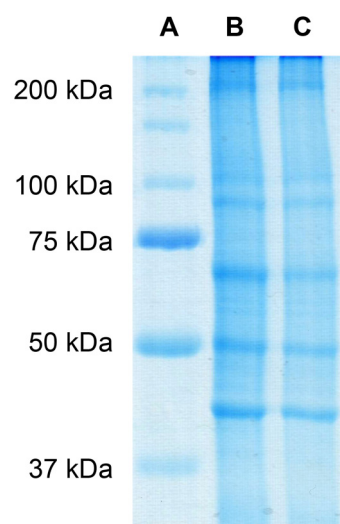


Abbildung 57: Coomassie-Färbung eines Gels nach Pulldown mit Verbindungen **226** und **228**. A) Massenstandard. B) angefärbte Proteine nach Pulldown mit Melophrin A-Analogon **226**. C) Angefärbte Proteine des Kontroll-experiments.

Spezieller Teil

Um auch gering exprimierte und deshalb schwach angefärbte Proteine identifizieren zu können, wurden die Proteinspuren des Gels in 8–10 gleich große Teile geschnitten. Hierbei wurde vor allem darauf geachtet, dass die Proteinstücke des Meloplin A-Experiments in Größe und Position denen des Kontrollexperiments entsprachen. Die Gelstücke wurden anschließend einem Wasch- und Entfärbeprotokoll (siehe Kapitel 7.3.15) unterzogen. Vor dem tryptischen Verdau wurden die Cysteine der Proteine mit DTT reduziert und mittels Iodacetamid alkyliert. Dies führt durch irreversibles Aufbrechen von Disulfidbrücken zu einer optimalen Entfaltung der Proteine und ermöglicht so eine maximale Peptidausbeute und Sequenzabdeckung. Nach tryptischem Verdau im Gel wurden die Proteinbruchstücke aus dem Gel gewaschen und mittels RP-Nano-HPLC weiter aufgetrennt. Massenspektrometrische Analyse konnte durch Online-MS/MS ausgeführt werden. Abbildung 58 gibt exemplarisch das Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 65.18 – 66.33 min wieder. Das zugehörige MS/MS-Spektrum (B) zeigt die Fragmentierung, die zur Vergrößerung in (A) gehört. Hierbei handelt es sich um ein charakteristisches Peptid des humanen Dynamins II. Bei der Fragmentierung entstehen Peptidbruchstücke, die entweder am C- oder am N-Terminus geladen sind. Nach einer Nomenklatur von Roepstorff werden Peptide mit Ladung in der N-terminalen Region als b-Serie und solche mit Ladung am C-Terminus als y-Serie bezeichnet.^[128] In Abbildung 58 sind exemplarisch die Peptidbruchstücke der y-Serie in rot markiert.

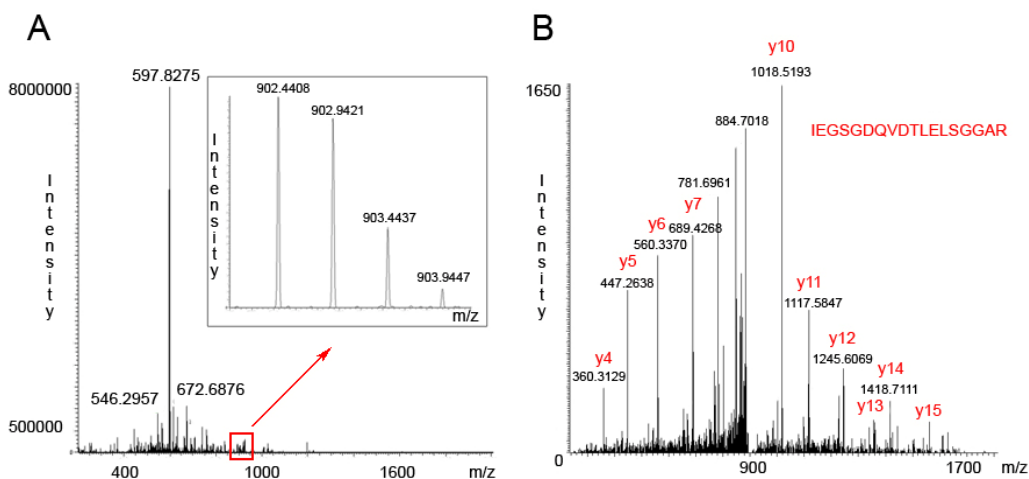


Abbildung 58: LC-MS-Spektrum von Proteinen, die nach Pulldown mit Meloplin A über ein SDS-Gel aufgetrennt und anschließend per RP-Nano-LC-MS/MS analysiert wurden. A) Gezeigt ist exemplarisch das Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 65.18–66.33 min. B) MS/MS Fragmentierung des Peptidfragments IEGSGDQVDTLELSGGAR,

welches charakteristisch für menschliches Dynamin II ist. In rot ist die γ -Serie (Peptidfragmente, die am C-Terminus geladen sind (Roepstorff-Nomenklatur^[128]) markiert.

Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Bioworks bearbeitet und in das dta-Format umgewandelt. So konnten diese Daten anschließend in die bereits erwähnte MASCOT-Suchmaske eingegeben werden (Einstellungen siehe 7.3.17). Aufgrund der höheren Empfindlichkeit der Nano-LC-MS/MS wurde die Signifikanzgrenze zur Proteinidentifikation auf 99 % ($p < 0.01$) erhöht. Zusätzlich wurde die Massengenauigkeit für die Precursor-Ionen auf 10 ppm verbessert. Die MASCOT-Ergebnislisten der identifizierten Proteine wurden weiterhin per Hand nachkontrolliert, so dass nur Proteine, für welche mindestens zwei charakteristische Peptide gefunden wurden (Zusammenarbeit mit Dr. Petra Janning, Abteilung 4, MPI Dortmund), als potentielle Interaktionspartner gewertet wurden. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Nur Proteine, die in mindestens drei Melophlin A-Analoga-Experimenten identifiziert wurden, galten als potentielle Interaktionspartner von Melophlin A und wurden weiterverfolgt.

Insgesamt wurden mit dieser Methode nur noch sechs Proteine als potentielle Bindungspartner von Melophlin A identifiziert, die nicht in den Kontrollexperimenten auftraten (Tabelle 4-6).

Vergleicht man die erhaltenen Listen identifizierter Proteine des in 4.5.2 beschriebenen Direktverdau mit denen nach Auftrennung mittels SDS-Gel und Analyse per Nano-LC-MS/MS wird deutlich, dass die zuletzt beschriebene Methode empfindlicher ist. So wurden mit der LC-MS/MS nach Direktverdau der Proteine von den Magnetpartikeln pro Pulldown-Experiment im Schnitt 120 Proteine identifiziert. Nach Auftrennung und Analyse per Nano-LC-MS/MS konnten hingegen durchschnittlich 500 Proteine zugeordnet werden. Untersuchungen zur Nachweisgrenze beider Methoden wurden von Dr. Petra Janning durchgeführt, die zeigen konnte, dass die zweite Methode etwa 100-fach empfindlicher ist. Des Weiteren konnte sie zeigen, dass auf der Nano-LC-MS/MS noch absolute Proteinmengen zwischen 10 und 100 fmol identifiziert werden können.

Dennoch wurden im zweiten, empfindlicheren Experiment weniger Proteine als potentielle Bindungspartner von Melophlin A identifiziert. Dies lässt sich auf den Einsatz der optimierten Kontrolle **228** zurückführen. Die Kontrollsubstanz ist der aktiven Substanz strukturell ähnlich, was bedeutet, dass sie gleichartige unspezifische Bindungen eingeht. So werden unspezifisch an beide Moleküle bindende Proteine beim Vergleich der MASCOT-Proteinlisten herausgestrichen. Ein direkter Vergleich zwischen dem Linkersystem **226** und der Verbindung **228** als Kontrolle ist allerdings

Spezieller Teil

nicht möglich, da in der zweiten Versuchsreihe zusätzlich zu der verbesserten Kontrolle auch die Methode der Proteinidentifizierung mittels der Nano-LC-MS/MS optimiert wurde. Dies führte dazu, dass in der zweiten Experimentreihe auch im Kontrollexperiment wesentlich mehr Proteine identifiziert wurden.

So wurden beispielsweise die im ersten Experiment als potentielle Bindungspartner von Melophrin A identifizierten Proteine auch in jedem **226**-Experiment der zweiten Versuchsreihe identifiziert. Zusätzlich konnten sie, wenn auch in viel geringerer Häufigkeit, in den Kontrollexperimenten nachgewiesen werden. An dieser Stelle würde eine quantifizierende massenspektrometrische Methode (beispielsweise SILAC siehe Kapitel 2.1.3) helfen zu unterscheiden, ob Proteine stärker an die aktive als an die unaktive Verbindung binden.

Insgesamt zeigt der Vergleich beider Methoden, dass die Nano-LC-MS/MS als Methode zur Identifizierung der Proteine wesentlich empfindlicher ist. Zusätzlich ist eine strukturell ähnliche Verbindung als Kontrolle wichtig, da sie erste Rückschlüsse auf die Relevanz der identifizierten Proteine für die biologischen Effekte von Interesse ermöglicht.

Die langen Proteinlisten beider Experimente verdeutlichen zudem, dass eine große Anzahl an Proteinen unspezifisch an die Melophrin A-Analoga **226** und **228** binden und so die Identifizierung echter Interaktionspartner erschweren.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der durch RP-Nano-LC-MS/MS identifizierten Proteine.

Protein	Name/Funktion
AL3A2 (human)	Fatty aldehyde dehydrogenase; katalysiert die Oxidation von langen aliphatischen Aldehyden zu Fettsäuren. ^[129, 130]
MSH2 (human)	DNA mismatch repair protein; involviert in postreplikative Reparaturmechanismen von DNA mismatch Paarungen. ^[131, 132]
Dynamamin II (human)	Involviert in vesikuläre Transportprozesse, vor allem während der Endozytose.
DNM1L (human)	Dynamamin-1-like protein; beteiligt in mitochondrialer Teilung vermutlich durch Regulation der Membranteilung.
p120 Catenin (human)	beeinflusst Cadherin Haftvermögen sowohl positiv als auch negativ. ^[133] Knockdown führt unter anderem zu Verlust von Zell-Zellkontakten. ^[134, 135]
IQGAP3 (human)	Ras-GTPase-activating-like protein

Allein durch die Tatsache, dass zwei Vertreter einer Proteinfamilie identifiziert wurden, stechen die Proteine Dynamin II und DNM1L aus dieser Proteinliste heraus. Dynamine spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zellprozessen. So sind sie in der Bildung von Transportvesikeln, Teilung von Zellorganellen, Zytokinese und Zellmigration^[136] involviert.^[137] Auf ihre Biologie wird in Kapitel 4.6.3 noch intensiver eingegangen.

Des Weiteren ist die Identifizierung von p120 Catenin interessant, da dieses Protein laut Literatur als potentieller Bindungspartner von E-Cadherin angesehen wird.^[138, 139] Dabei wird angenommen, dass das zelluläre Level von p120 Catenin die Expression von Cadherin reguliert, wobei seine Hauptaufgabe generell in der Regulierung der Internalisierung und dem Abbau von Cadherinen besteht.^[133, 135, 140] Cadherine sind, wie schon in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, für Zell-Zellkontakte, Zellwachstum und Regulierung der Zellform und -migration verantwortlich. Niedrige Cadherin-Expressionslevel werden mit Tumorerkrankung und Metastasenbildung in Verbindung gebracht. Der beschriebene Einfluss von p120 Catenin auf die Cadherin-Expression könnte einen interessanten Zusammenhang zu der beobachteten Phänotypreversion in MDCK-F3-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A aufzeigen.

Auch bei IQGAP3 handelt es sich um ein Protein, das für die in dieser Arbeit untersuchten biologischen Effekte von Interesse sein könnte. Erst kürzlich veröffentlichten Nojima et al. Untersuchungen zur Funktion von IQGAP3 in Epithelzellen, die ergaben, dass IQGAP3 die Proliferation der Zellen durch Ras-abhängige ERK-Aktivierung reguliert.^[141] Zudem konnte eine starke Interaktion zwischen IQGAP3 und Ras festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Meloplin A auf die Funktion der Proteine der IQGAP-Familie nicht weiterverfolgt. Dies verbleibt dennoch ein interessantes Ziel für weiterführende Untersuchungen.

4.6 Validierung der identifizierten Proteine

Die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine sollten in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden. Dies kann z.B. mit spezifischen Antikörpern per Western-Blot erreicht werden.^[142] Des Weiteren sollte die Bindung der validierten Proteine zu Meloplin A mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz oder Isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht werden.^[143, 144] Auch sollte in biochemischen Assays der direkte Einfluss von Meloplin A auf die potentiellen Interaktionspartner untersucht werden.

4.6.1 Western-Blot

Mit Western- oder Immunoblots können Proteine spezifisch durch die entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden.

Hierzu wurden die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine des Pulldowns, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, auf eine Polyvinylidfluoridmembran übertragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte anschließend mit einem Zwei-Antikörper-System. Zunächst wurde die Membran mit dem für das ausgewählte Protein spezifischen primären Antikörper inkubiert. Hierauf folgte ein Inkubationsschritt mit einem sekundären Antikörper, der selektiv den primären Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper ist zusätzlich mit Meerrettichperoxidase markiert. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und Luminol als Substrat entsteht ein luminentes Signal, welches einen Nachweis der Proteine auf lichtempfindlichen Filmen ermöglicht.

Es konnten nicht alle identifizierten Proteine validiert werden, da nicht für alle Proteine spezifische Antikörper zur Verfügung standen. So wurden im Weiteren die Proteine Dynamin II und p120 Catenin aus der zweiten, empfindlicheren Versuchsreihe (4.5.3) weiter untersucht. Zusätzlich sollten auch die Proteine Importin β und COPA stellvertretend für die Proteine der ersten Experimentreihe (4.5.2) validiert werden.

Um Aussagen über die Spezifität der Bindung der identifizierten Proteine zu Melophilin A machen zu können, wurde zusätzlich ein Verdrängungsexperiment mit freiem Melophilin A durchgeführt.^[145] Hierzu wurde HeLa-Zelllysate mit freiem Melophilin A verschiedener Konzentrationen für eine Stunde bei 4 °C vorinkubiert und anschließend wie bereits für die Pulldown-Experimente beschrieben eingesetzt. Auch diese Experimente wurden per Immunoblot ausgewertet.

Für jedes Protein wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, die jeweils die gleichen Ergebnisse lieferten. Ein repräsentativer Blot für jedes der vier Proteine (p120 Catenin, Dynamin II, Importin β und COPA) ist in Abbildung 59 gezeigt. In der ersten Reihe wurden jeweils die Proteinmischungen des Kontrollpulldowns auf das Gel aufgetragen. Die Immunoblotfärbung zeigt deutlich, dass die identifizierten Proteine nicht an das inaktive Kontrollmolekül **228** binden. Überraschend kann mit den spezifischen Antikörpern für Importin β und COPA für das Kontrollexperiment **228** ebenfalls kein Protein nachgewiesen werden, obwohl diese auch in einigen Kontrollexperimenten identifiziert wurden. Dies kann durch die niedrige Nachweisgrenze der Nano-LC-MS/MS erklärt werden. Hier können Proteinmengen im fmol-Bereich nachgewiesen werden, während der Western-Blot unter den eingesetzten Bedingungen nur im pmol-Bereich detektiert. Zusätzlich zeigt

dieses Experiment, dass eine Quantifizierung bereits während der massenspektrometrischen Auswertung, z. B. durch den Einsatz von SILAC, die Datenauswertung wesentlich verbessern könnte.

In der zweiten Reihe sind jeweils die Proteine des Meloplin A **226**-Pulldowns mit unbehandeltem HeLa-Lysat aufgetragen. Hier kann für jedes Protein spezifisch gezeigt werden, dass Meloplin A die identifizierten Proteine bindet. In den Reihen 3 - 5 sind die Proteine von Meloplin A-Pulldown-Experimenten gezeigt, bei denen die Lysate vorher mit steigenden Mengen an freiem Meloplin A vorinkubiert wurden (0.25 mM, 0.5 mM und 1.0 mM). Die Experimente zeigen, dass freies Meloplin A erst in sehr hoher Konzentration (1.0 mM) zu einer leichten Reduktion der jeweiligen Proteinbande führt. Dies kann entweder dadurch erklärt werden, dass Meloplin A die Proteine nicht spezifisch bindet, so dass freies Meloplin A keine Bindestellen besetzen kann. Es kann aber auch durch die starke Lipophilie von Meloplin A hervorgerufen werden, die eine unspezifische Bindung an viele Proteine und Detergenzien des Lysepuffers bewirkt. So stand kaum freies Meloplin A zur Verdrängung zur Verfügung, welches die Bindestellen der identifizierten Proteine hätte belegen können.

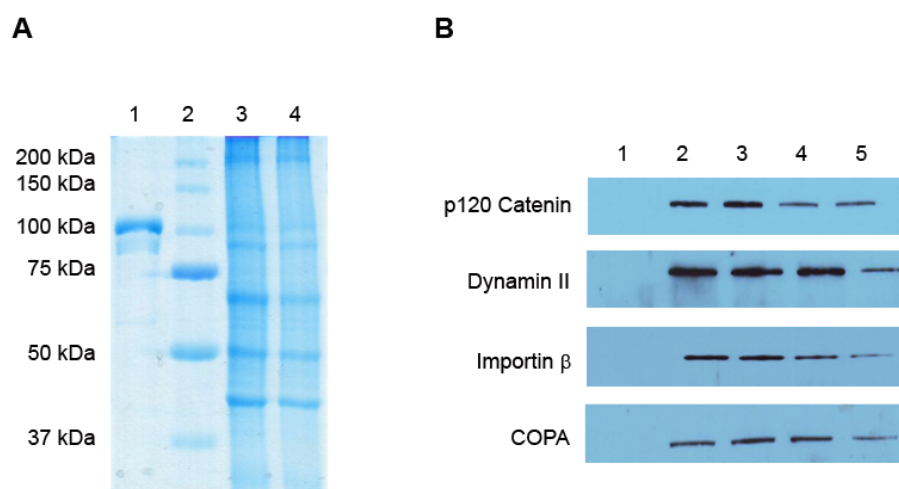


Abbildung 59: Repräsentatives Coomassie-Gel nach einem Pulldown und Bestätigung der vier ausgewählten Proteine durch Immunoblots. A) Exemplarisch ist ein Coomassie-gefärbtes Gel nach Pulldown mit Meloplin A-Analoga **226** (Spalte 3) und Kontrollmolekül **228** (Spalte 4) dargestellt. Zusätzlich sind das aufgereinigte Protein Dynamin II (Spalte 1) und der Marker (Spalte 2) aufgetragen. Es ist deutlich sichtbar, dass Dynamin II aus mehreren splicing-Formen besteht. Auf der Höhe von Dynamin II ist im Pulldown (Spalte 3) eine Proteinbande sichtbar. Im Kontrollversuch (Spalte 4) ist die Bande schwächer ausgeprägt. B) Repräsentativer Blot für jedes der vier Proteine (p120 Catenin, Dynamin II, Importin β und COPA). In Spalte 1 wurden die Proteine des Kontrollpull-downs aufgetragen. Spalte 2 ist der

Spezieller Teil

Pulldown mit dem aktiven Analogon **226** und die Spalten 3 - 5 zeigen Melophrin A-Analogon **228** Experimente, bei denen die Lysate vor dem eigentlichen Pulldown mit verschiedenen Konzentrationen an Melophrin A (3: 0.25 mM; 4: 0.5 mM und 5: 1.0 mM) vorinkubiert wurden.

Zusammenfassend bestätigten die Experimente mit spezifischen Antikörpern die massenspektrometrisch identifizierten Proteine und zeigten anschaulich, dass nur das aktive Melophrin A-Derivat **226** die als potentielle Interaktionspartner identifizierten Proteine Dynamamin II und p120 Catenin aus dem Lysat isolierte. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Proteine Importin β und COPA der ersten Experimentreihe ebenfalls wesentlich stärker an das aktive Molekül binden als an die inaktive Verbindung **228**.

4.6.2 Bindungsstudien für Dynamine und Importin β

Um zeigen zu können, dass Melophrin A und sein biotinyliertes Analogon **226** die identifizierten Proteine binden, wurde die Wechselwirkung über Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR; surface plasmon resonance) näher untersucht. SPR ist eine Methode zur Messung von Adsorptionen auf Goldoberflächen und ermöglicht die Bestimmung von Bindungskonstanten für Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Alexander Wolf durchgeführt.

Proteine oder kleine Moleküle können auf der Oberfläche von SPR-Sensorchips in einer Miniaturflusszelle immobilisiert werden. Mögliche Interaktionspartner werden über die Chip-Oberfläche gespült und Wechselwirkungen mit den immobilisierten Molekülen werden über eine Änderung des Brechungsindex detektiert. Eine zeitabhängige Detektion des Brechungsindex kann dann zur Ermittlung kinetischer Parameter herangezogen werden. Abbildung 60 zeigt das physikalische Prinzip der SPR. Eine Lichtquelle emittiert monochromatisches Licht, das über ein Prisma auf eine Grenzfläche zweier unterschiedlicher Medien trifft. Das Licht wird unter dem Winkel θ reflektiert. Eine dünne Metallschicht befindet sich an der Grenzfläche zwischen Prisma und dem Medium mit dem geringeren Brechungsindex (z.B. Probenpuffer). Die Wechselwirkung von Substanzen mit der Oberfläche führt zu einer Änderung der dielektrischen Eigenschaften in der Umgebung der Metalloberfläche und somit zu einer Änderung der Resonanzbedingungen, was den Winkel des reflektierten Lichts verändert.^[146, 147]

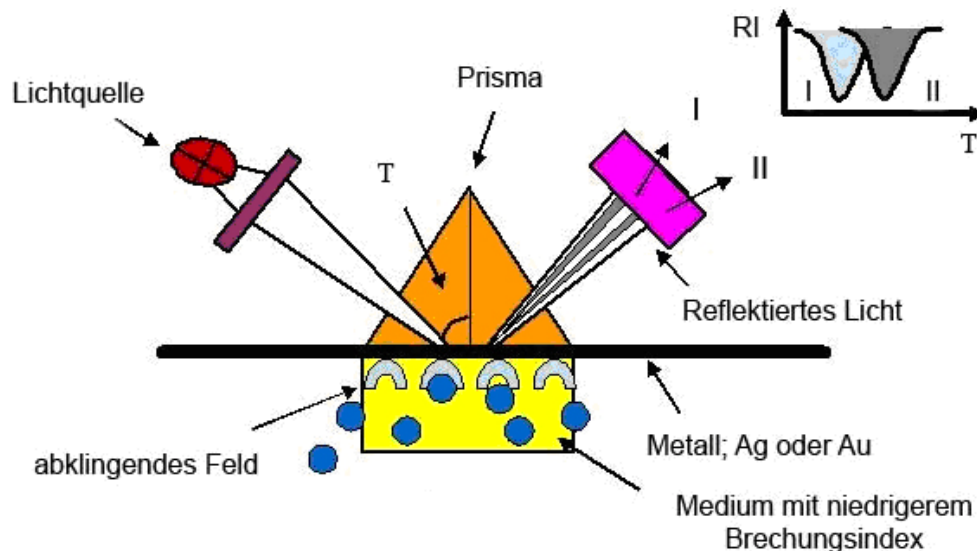


Abbildung 60: Prinzip der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz nach <http://www.biochemie.uni-oldenburg.de/11906.html>.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden die Proteine Dynamin II und Importin β ausgewählt. Aufgereinigtes humanes Dynamin II wurde von Dr. Susanne Eschenburg (MPI Dortmund) bereitgestellt. Importin β konnte aus dem Arbeitskreis von Dr. Ingrid Vetter (MPI Dortmund) erhalten werden.

Biotinyliertes Melophrin **226** sowie die Negativkontrolle **228** wurden auf Streptavidin-Biacore-Chips immobilisiert. Anschließend wurde das Protein in verschiedenen Konzentrationen ($0.2 - 12 \mu\text{M}$) durch die Flusszelle gespült. Abbildung 61 zeigt exemplarisch die Assoziationskurven von Dynamin II bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$. Die Graphik zeigt in rot, dass Dynamin II nicht an die Referenzzelle (immobilisierte Negativkontrolle **228**) bindet. Dagegen zeigt sich bei Durchströmen der Messzelle (gelb), dass Dynamin II an Melophrin bindet und bei Beendigung der Proteinströmung wieder langsam dissoziiert. Aus den Daten dreier unabhängiger Messungen konnte die Dissoziationskonstante mit $K_d = 13.8 \pm 0.12 \mu\text{M}$ ($k_{\text{on}} = 1.42 \cdot 10^3 \pm 1.54 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1.95 \cdot 10^{-2} \pm 9.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) berechnet werden.

Die Proteine der Dynamin-Familie weisen untereinander starke strukturelle Ähnlichkeiten auf. In Säugerzellen findet man drei verschiedene Dynamine, Dynamin I, II und DNM1L. Alle drei verfügen neben einer mittleren Domäne über eine GTPase- und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Die Dynamine I und II weisen zusätzlich eine prolin-reiche- (PR-Domäne) sowie eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PHD) auf.^[137] Näher auf Ihren Aufbau sowie ihre Funktionen wird in Kapitel 4.6.3 eingegangen.

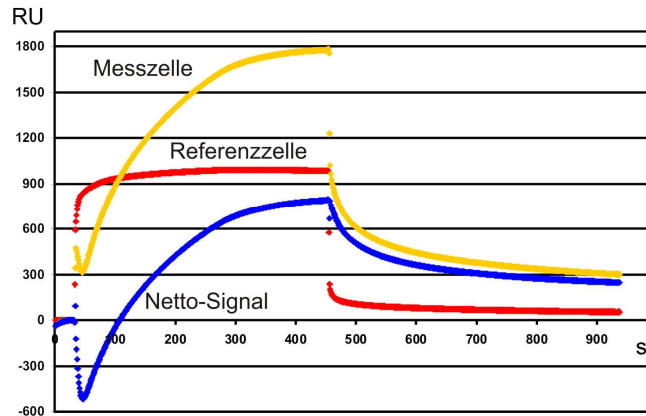


Abbildung 61: Darstellung der Messkurven für die Assoziationsmessung von Dynamin II an immobilisiertes **226** bei einer Dynamin II-Konzentration von $3 \mu\text{M}$. In rot wird das Signal bei Dynamin II-Durchströmung der Referenzzelle (immobilisiertes **228**) gezeigt. Gelb zeigt das Signal bei Durchströmung der Melophilin Analogon **226**-Zelle. Das in blau dargestellte Signal ist die Differenz aus beiden, welche dem Nettosignal entspricht.

Da neben Dynamin II auch DNM1L im Pulldown-Experiment identifiziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass Melophilin A auch mit letzterem und eventuell, auf Grund der strukturellen Gemeinsamkeiten, auch mit dem in HeLa-Zellen nicht exprimierten Dynamin I interagiert. So wurde auch das Bindungsverhalten von Melophilin A zu Dynamin I und DNM1L mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz untersucht.

Die Experimente zeigten, dass Melophilin A auch DNM1L und Dynamin I konzentrationsabhängig bindet (Abbildung 62). Da die Kinetik der Bindung von Melophilin A zu DNM1L und Dynamin I wesentlich komplexer ist als die zu Dynamin II, konnten die Dissoziationskonstanten nicht über k_{on} und k_{off} bestimmt werden. Stattdessen wurde der K_d direkt aus den Gleichgewichtsdaten bei verschiedenen Konzentrationen berechnet.^[148] Hierzu wurde aus den in Abbildung 62 gezeigten Bindungskurven für DNM1L und Dynamin I der Gleichgewichtswert für jede Konzentration nach 270 s abgelesen. Auftragung der Signalstärke gegen die Konzentration ergab die in Abbildung 63 A und B gezeigten Sättigungskurven aus denen die Dissoziationskonstanten über ein sigmoidales Gleichgewichtsmodell als EC_{50} -Werte berechnet werden konnten.

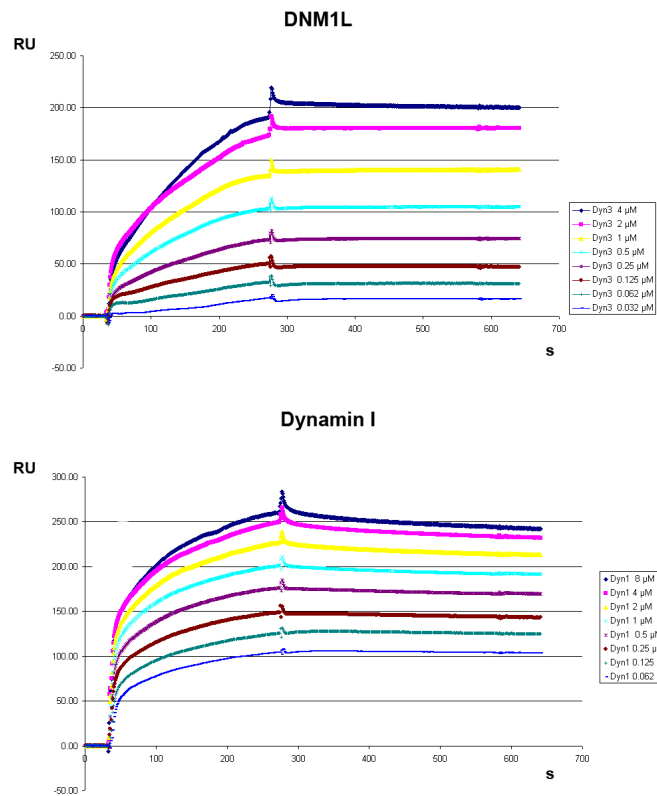


Abbildung 62: Bindungskurven der SPR-Experimente mit DNM1L und Dynamamin I (Daten sind nach Abzug der Referenzmessung und des Pufferlaufs gezeigt). A) Zeigt die Bindungskurven von Melophtin A-Analogon **226** bei Durchströmen der Messzelle mit DNM1L bei Konzentrationen von 2 – 0.032 μM . B) Konzentrationsabhängige Bindungskurven von Melophtin A-Analogon **226** an Dynamamin I im Bereich von 8 – 0.062 μM .

Für DNM1L ergab sich ein K_d von $0.60 \mu\text{M} \pm 0.04 \mu\text{M}$ und für das um die PR-Domäne gekürzte Dynamamin I (1-760) konnte eine Dissoziationskonstante von $0.40 \pm 0.10 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

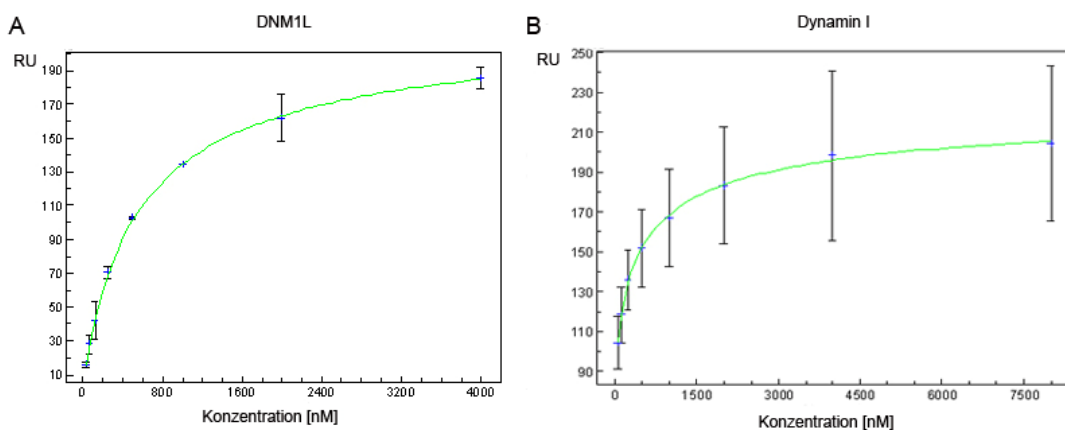


Abbildung 63: Gleichgewichtskurven zur Berechnung der Dissoziationskonstanten von Melophtin A zu DNM1L (A) und Dynamamin I (1-760) (B).

Spezieller Teil

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der unterschiedlich berechneten Dissoziationskonstanten sollte auch für Dynamin II der K_d aus den Gleichgewichtsdaten berechnet werden. Allerdings konnte bei Auftragung der vermessenen Konzentrationen gegen die Signalstärke im Gleichgewicht keine Sättigungskurve erhalten werden, so dass eine Berechnung der Dissoziationskonstante mit den Daten des betrachteten Konzentrationsintervalls nicht möglich war. Dies passt zu dem, um den Faktor 20 schlechteren K_d . Da beide Bestimmungsmethoden in der Literatur häufig angewendet werden, ist auch ohne direkten Vergleich davon auszugehen, dass es sich bei Melophilin A um einen Interaktionspartner der drei Proteine der Dynamin-Familie handelt. Geht man weiterhin von einem ähnlichen Bindungsmodus aus, so lässt sich ableiten, dass weder die PH- noch die PR-Domäne für die Bindung relevant sein können.

Unter vergleichbaren Bedingungen sollte auch die Bindungskonstante von Melophilin A zu Importin β bestimmt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass dieses System nicht mittels SPR untersucht werden konnte, da Importin β unspezifisch und irreversibel an das Biacore-System assoziierte.

Als Alternative sollte die Bindung über Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC; isothermal titration calorimetry) charakterisiert werden. Ein isothermales Titrationskalorimeter besteht aus zwei identischen Kammern aus hoch leitfähigem Material.^[149] Sensitive Thermofühler werden genutzt, um Temperaturunterschiede zwischen der Referenzzelle und der Messzelle zu detektieren. In der Messzelle befindet sich einer der potentiellen Bindungspartner. Vor Zugabe des zweiten Partners wird eine konstante Leistung an die Referenzzelle gelegt, die eine Thermoeinheit an der Messzelle regelt. Eine Interaktion der potentiellen Bindungspartner führt zu einer exothermen oder endothermen Reaktion, was bedeutet, dass zum Temperatúrausgleich entweder Wärme nachproduziert oder aufgenommen werden muss. Die hierfür nötige zeitabhängige Leistung wird gemessen, in $\mu\text{cal}/\text{sec}$ aufgezeichnet und in kcal/mol Injektant zum Molverhältnis (Injektant/Makromolekül) umgerechnet.

In unserem Fall wurde Importin β in der Messzelle vorgelegt und Melophilin A wurde zutitriert. Vor der Messung wurde durch Kontrollexperimente abgesichert, dass weder Melophilin A noch Importin β unerwünschte Temperatureffekte mit dem Puffer zeigen (Abbildung 64A).

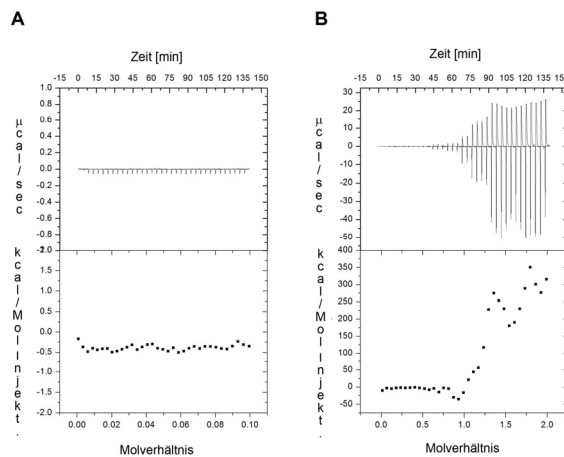


Abbildung 64: ITC-Experiment zur Messung der Bindungskonstante von Melophrin A an Importin β . A) zeigt exemplarisch die Kontrollmessung bei der nur Importin β zum Puffersystem titriert wurde. Es wurde kein Temperatureffekt aufgezeichnet. B) zeigt die Titration von Melophrin A zu Importin β . Der große Wärmeausschlag in beide Richtungen der Skala spricht für ein unspezifisches Binden mehrerer Melophrin A-Moleküle pro Molekül Importin β .

Die zweite Abbildung zeigt den Wärmeeffekt, der bei Titration von Melophrin A zu Importin β in der Messzelle auftrat. Der Effekt war insgesamt sehr stark und ging in beide Richtungen der Skala. Dies deutet darauf hin, dass mehrere Moleküle Melophrin A unspezifisch an Importin β binden und ermöglicht auch eine Erklärung der Ergebnisse des Biacore-Experimentes. Ein unspezifisches Binden von Melophrin A könnte zum Verkleben des Biacore-Chips geführt haben und erklären, warum sich Importin β nicht wieder vom Chip abspülen ließ.

Die Bindungsstudien ergaben somit, dass die Bindung von Melophrin A zu Dynaminen über Dissoziationskonstanten beschrieben werden kann, während die Bindung von Melophrin A zu Importin β unspezifisch ist.

4.6.3 Untersuchung des Einflusses von Melophrin A auf Dynamin-vermittelte Zellprozesse

Die Bindungsstudien aus Kapitel 4.6.2 haben deutlich gezeigt, dass die Bindung von Melophrin A zu Importin β unspezifisch ist, während sich für die Bindung von Melophrin A zu Dynamin II eine Bindungskonstante bestimmen ließ. Des Weiteren konnten bei der Suche nach den Bindungspartnern von Melophrin A unter den sechs Proteinen des empfindlicheren Experiments (4.5.3) nicht nur Dynamin II, sondern auch das Dynamin-1-like Protein identifiziert werden. Dies legt nahe, dass der von Melophrin A in Zellen verursachte Effekt mit seiner Bindungsfähigkeit zu Dynaminen in Zusammenhang steht.

Spezieller Teil

Laut Literatur werden drei verschiedene Dynamin-Gene in Säugerzellen exprimiert. Dynamin I, welches neuronenspezifisch ist, Dynamin II, das ubiquitär exprimiert wird und das sogenannte Dynamin III (Dynamin-1-like), das in verschiedenen Geweben gefunden wurde.^[150, 151]

Dynamine werden allgemein als große GTPasen klassifiziert. Im Gegensatz zu den kleinen GTPasen wie beispielsweise Ras haben Dynamine wesentlich größere GTPase-Domänen und eine sehr viel geringere Affinität zu GTP und GDP.

Zusätzlich zur GTPase-Domäne besitzen alle Dynaminformen eine mittlere Domäne und eine GTPase-Effektordomäne, kurz GED. Die katalytische GTPase-Aktivität der Dynamine kann durch Oligomerisierung der Proteine stimuliert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass die GED sowohl mit der GTPase-Domäne als auch mit sich selbst und der mittleren Domäne interagieren kann.^[152-155] Im Gegensatz zu den kleinen GTPasen sind für Dynamine keine Proteine bekannt, die mit der GTPase- oder PR-Domäne interagieren, was zu der Annahme führt, dass Dynamine ihre eigenen Effektoren sind.

GTP-bindendes Dynamin zeigt eine höhere Affinität zu Liposomen und hat eine höhere Bindefähigkeit für Proteine mit SHR3-Domänen als GDP-bindendes Dynamin. Zusätzlich verfügen Dynamine über Zieldomänen, wie die Pleckstrin-Homologie Domäne (PH) und die Prolin-reiche-Domäne (proline rich domain), welche SRC-Homologie-3-Domänen (SH3) bindet.^[137]

Laut Literatur sind Dynamine in verschiedensten zellbiologischen Funktionen involviert, z. B. in der Ausbildung von Vesikeln, die Organellenteilung, die Zytokinese und die Ausbildung von Resistenzen gegen Pathogene.^[137] Säugetier-Dynamine sind vor allem dafür bekannt, dass sie Vesikelabschnürungen bewirken und somit eine fundamentale Rolle in endozytotischen Prozessen spielen.^[156] Endozytose ist sowohl für die Aufnahme von gelösten Substanzen (Pinocytose) als auch von festen Partikeln (Phagozytose) von großer Bedeutung. Prinzipiell lässt sich Endozytose als Einstülpungsvorgang der Biomembran beschreiben, welcher der Aufnahme von Substanzen in die Zelle dient. Am Ende des Einstülpungsvorgangs wird ein Vesikel ins Innere der Zelle abgeschnürt und so zu einem Teil des Endomembransystems.^[157, 158]

Von besonderer Bedeutung ist die rezeptorvermittelte Endozytose. Hier regeln spezielle Rezeptoren an der Zelloberfläche die selektive Aufnahme bestimmter Substanzen. Nach Binden der aufzunehmenden Substanz an den Rezeptor stülpt sich ein Teil der Zellmembran ins Innere und bildet sogenannte coated Pits, eine

Vertiefung, die mit dem Protein Clathrin ausgekleidet ist. Am Nacken des wachsenden Vesikels lagern sich Dynamine an, welche mit ihrer PH-Domäne spezifisch das Phosphatinositol der Membran erkennen. Amphiphysin vermittelt durch Bindung seiner SH3-Domäne an die PR-Domäne des Dynamins eine Oligomerisierung der Dynamine zu einer rechtsgewundenen Helix um den Vesikelnacken. Durch Interaktion der GED- und der GTPase-Domänen der Dynamine wird GTP hydrolysiert, was zu einer Konformationsänderung der Dynamine mit einhergehender Abstoßung des Vesikels ins Innere der Zelle führt. Dieser Vorgang wird als mechanochemisches Poppase-Model bezeichnet.

Dennoch wird der Wirkmechanismus der Dynaminfamilien in endozytotischen Prozessen kontrovers diskutiert. So wird Dynaminen auch eine andere Funktion während der Ablösung der Vesikel zugeschrieben, in welcher diese regulatorisch eingreifen und somit analog den kleinen GTPasen wirken.

Bei den kleinen GTPasen bewirkt der Argininfinger des aktivierenden Proteins durch Bindung an die aktive Tasche der GTPase die GTP-Hydrolyse.^[159] Da Dynamine bekanntermaßen durch Oligomerisierung aktiviert werden, ist es wahrscheinlich, dass das katalytische Zentrum in der mit der GTPase-Domäne interagierenden Domäne lokalisiert ist. Dies sollte die GED-Domäne sein, welche über eine Arginin-reiche Sequenz verfügt. Diese Arginine könnten in der eigentlichen GTP-Hydrolyse involviert sein.^[160] Mittels der Einführung von Mutationen in diese Arginin-reiche Sequenz konnte jedoch gezeigt werden, dass GTP-Hydrolyse nicht allein die treibende Kraft der Vesikelabstoßung sein kann, da die Endozytose durch diese Mutante nicht inhibiert wurde.^[161]

Auch wenn die genaue Rolle der Dynamine in der Endozytose noch unklar erscheint, ist der Einfluss der Dynamine während der Abschnürung von Vesikeln unumstritten. In diesem Prozess scheinen diese eine mechanochemische Rolle zu übernehmen.^[137]

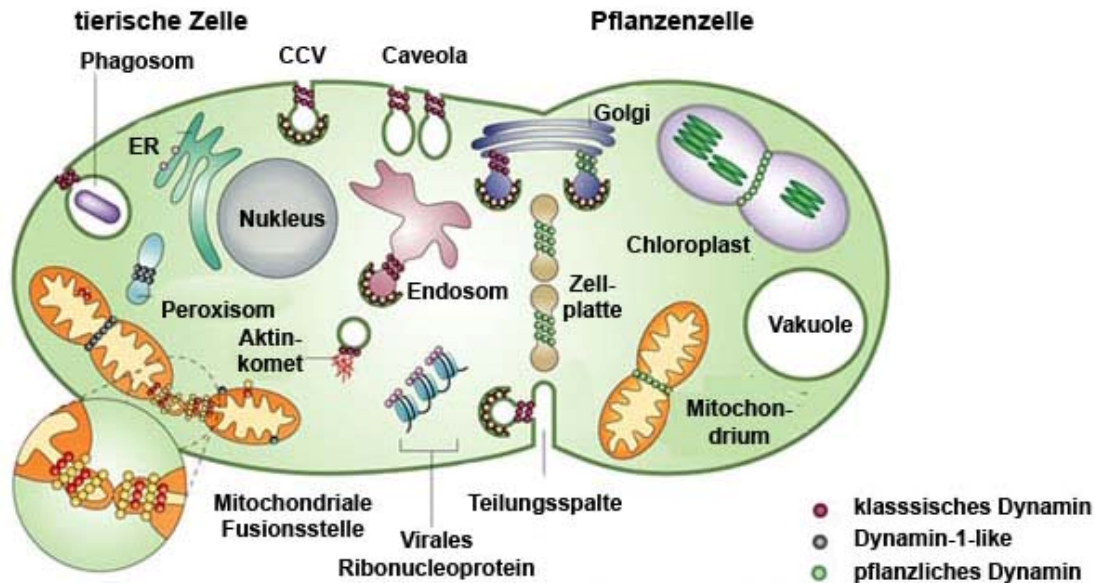


Abbildung 65: Mitglieder der Dynamin-Familie (vereinfacht nach G. J. K. Praefcke, H. T. McMahon, *Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 133-147.). Die klassischen Dynamine haben ihre Hauptfunktion im Aufbau der Clathrin-beschichteten Vesikel (CCV: clathrin coated vesicles), der Teilungsspalte, dem Golgi und der Endosomen sowie in nicht Clathrin-abhängigen Ereignissen wie Phagosomen und Caveolae. Dynamin-like Proteine sind vor allem in der Organellteilung, speziell der Teilung von Mitochondrien involviert. In Pflanzen gibt es noch eine Reihe weiterer Dynamine, die ebenfalls am Aufbau von Vesikeln beteiligt sind. In Pflanzen sind sie des Weiteren im Aufbau der Zellplatte oder in die Teilung von Chloroplasten involviert.

Weiterhin sind Dynamine nicht nur in der Clathrin-abhängigen Endozytose von Bedeutung, sondern haben ebenfalls eine Rolle im Aufbau der Caveoli, während der Phagozytose, der Bildung von Podosomen sowie in der Neuordnung von Aktin.^[162-164]

Demgegenüber ist Dynamin III (DNM1L) hauptsächlich in der Teilung von Mitochondrien involviert.^[165, 166]

Im Rahmen dieser Arbeit ist der beschriebene Zusammenhang zwischen Dynamin-abhängiger Endozytose und Ras-Signaltransduktion besonders interessant. Verschiedene Gruppen bestätigten, dass Endozytose für die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK; ERK) durch aktivierte Wachstumsfaktoren (EGF) von großer Bedeutung ist.^[167] So zeigte die Gruppe um Schmid^[168, 169], dass dominant-negative Dynamin-Mutanten nicht nur Endozytose durch Hemmung der Ablösung Clathrin-beschichteter Vesikel von der Plasmamembran blockieren, sondern auch EGF- und Insulin-stimulierte ERK-Aktivierung inhibieren. Dieser inhibierende Effekt könnte auf der Stufe der Ras-Aktivierung stattfinden, da der aktivierte EGF-Rezeptor

die Beladung von Ras mit GTP von den Endosomen aus stimuliert.^[170, 171] Kontrovers dazu beschreibt Moolenaar^[172], dass eine Blockierung der Endozytose in COS-Zellen keinen Effekt auf die EGF- oder lysophosphatische Säure-induzierte Aktivierung von Ras, Raf-1 oder MEK ausübt. Dies führt zu der interessanten Hypothese, dass MEK, welches an der Plasmamembran aktiviert wird, endosomalen Transport benötigt, um durch das Zytosol zu ERK zu gelangen und dieses zu aktivieren.^[168, 172] Auch scheinen nach Untersuchungen von Pol et al. endosomales Trafficking von Ras und Raf-1 für die insulin-abhängige Stimulierung von ERK1/2 relevant zu sein. Diese These wurde durch eine Isolierung von Ras, Raf-1, MEK und ERK1/2 aus Endosomen EGF-stimulierter Rattenzellen unterstützt.^[173]

Im Kontext dieser Arbeit sind besonders die Untersuchungen von Schmid et al. interessant, welche analog zu den Meloplin A-Bindungspartnerstudien in HeLa-Zellen durchgeführt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von Endozytose durch dominant negatives Dynamin zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 führt.^[169]

4.6.3.1 Untersuchung des Einflusses von Meloplin A auf Transferrin-Endozytose

Ein gängiges Modell zur Untersuchung der Endozytose ist die Transferrin-Aufnahme in Zellen.^[174] Mittels dieses Modellsystems wurde auch der Effekt des bekannten Dynamamin-Inhibitors Dynasore auf endozytotische Prozesse untersucht.^[175, 176] Die Aufnahme des für den Eisentransports wichtigen Proteins Transferrin, beruht vollständig auf Dynamamin-abhängiger Endozytose.^[177] Zur Aufnahme bindet Transferrin an den an der Zelloberfläche befindlichen Transferrinrezeptor. Dieser wird daraufhin über Rezeptor-abhängige Endozytose internalisiert. Zu diesem Prozess ist der Dynamamin-abhängige Aufbau von Clathrin-beschichteten Pits und Vesikeln nötig.^[178] Der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Transferrin macht es möglich, Endozytose in Zellen zu beobachten.

Die Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Meloplin A auf Transferrin-Endozytose wurden von M.Sc. Amrita Rai der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Manstein durchgeführt. Hierzu wurde mit Alexa-546 markiertes Transferrin eingesetzt. Zunächst wurden HeLa-Zellen mit Meloplin A verschiedener Konzentrationen und Dynasore (80 μM) als Positivkontrolle sowie DMSO als Negativkontrolle für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Alexa-Transferrin bei 25 °C für 2 min inkubiert. Die niedrige Inkubationstemperatur erlaubte es dem Transferrin an den Oberflächenrezeptor zu binden, Endozytose wurde aber noch unterdrückt (Abbildung

Spezieller Teil

66 DMSO 0 min). Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit den Inhibitoren oder DMSO bei 37 °C inkubiert. Dies erlaubte wie in Abbildung 66 (DMSO 5 min) gezeigt, die Internalisierung von Alexa-Transferrin. Dynasore-behandelte Zellen (80 µM) (Abbildung 66, Dynasore 5 min) zeigten wie erwartet eine inhibierte Transferrinaufnahme. Der gleiche wenn auch etwas schwächere Effekt wurde auch in mit Meloplin A-vorbehandelten Zellen (20 µM) (Abbildung 66, Meloplin 5 min) beobachtet.

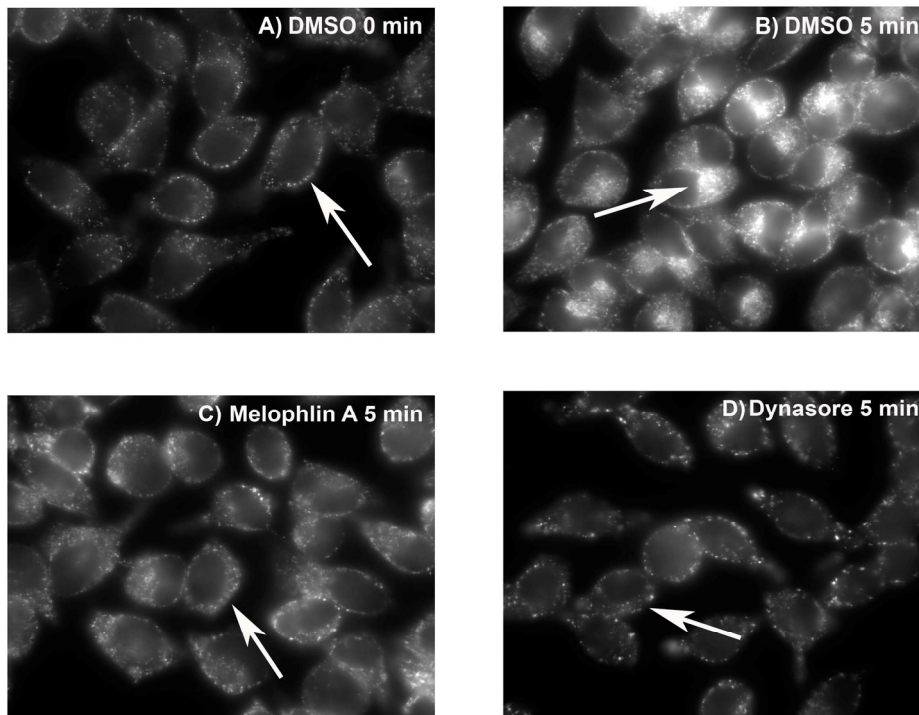


Abbildung 66: Transferrin-Aufnahme in HeLa-Zellen nach Inkubation mit Meloplin A. A) HeLa-Zellen wurden zunächst für 3 h mit DMSO, Meloplin A (20 µM) und Dynasore (80 µM) inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei 25 °C mit Alexa-Transferrin inkubiert, was zu Binden des Transferrins an seinen Oberflächenrezeptor führte (DMSO 0 min). B) Anschließend wurden die Zellen für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Dies führte bei DMSO behandelten Zellen zur Internalisierung von Transferrin (DMSO 5 min). C) Mit Meloplin A-vorinkubierte Zellen zeigten eine verringerte Endozytose. D) Mit Dynasore-vorbehandelte Zellen zeigten auch eine deutliche Hemmung der Transferrin-Endozytose.

Um die Inhibition der Transferrin-Internalisierung durch Meloplin A quantifizieren zu können, wurde das bereits beschriebene Experiment mit verschiedenen Konzentrationen an Meloplin A (1, 5, 10, 20, 40 und 80 µM) wiederholt. Vor den mikroskopischen Untersuchungen wurden die Kerne der Zellen zusätzlich mit DAPI angefärbt. So konnte für die anschließend aufgenommenen Fluoreszenzbilder das absolute Alexa-Signal berechnet und über die DAPI-Färbung auf die Zellzahl pro

Bildausschnitt normiert werden. Als Hintergrund wurde zudem das Signal des Nullzeitpunktexperiments (DMSO, 0 min, Transferrin ist auf den Oberflächenrezeptoren lokalisiert) abgezogen. Als 100 % wurde die Internalisierung von Transferrin DMSO-behandelter Zellen angesetzt. Für jede Konzentration wurden mindestens 200 Zellen ausgewertet. Zusätzlich wurden zwei unabhängige Konzentrationsreihen durchgeführt und in Abbildung 67 zusammengefasst.

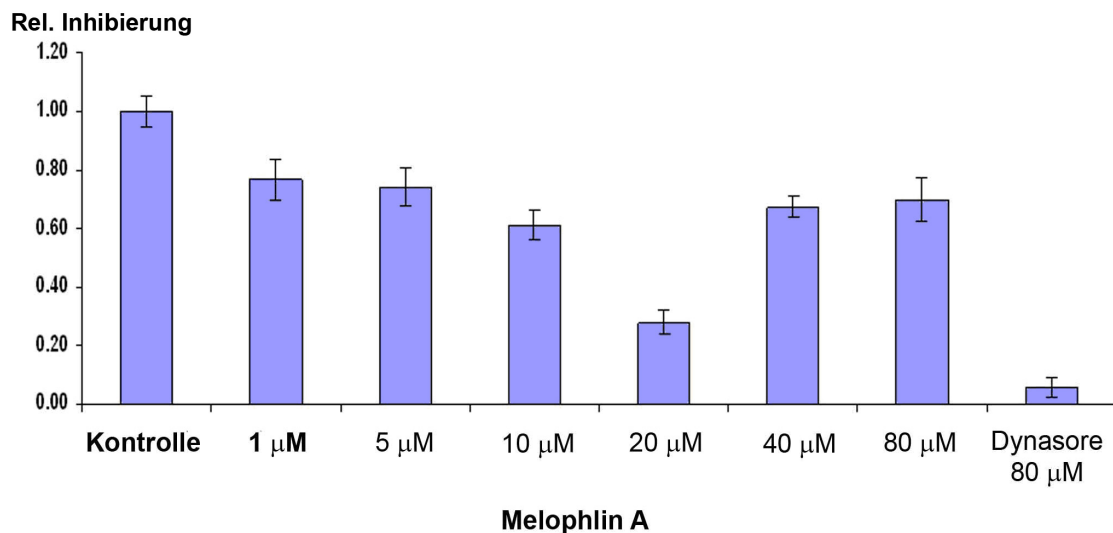


Abbildung 67: Quantifizierung der Transferrin-Aufnahme nach Behandlung der Zellen mit DMSO. Gezeigt ist das Ergebnis zweier unabhängiger Konzentrationsreihen, für die jeweils mindestens 200 Zellen pro Konzentration ausgewertet wurden. Nach beschriebenem Internalisierungs-Assay wurden die Zellen mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Anschließend wurde das absolute Alexa-Signal pro Bildausschnitt auf die Anzahl der Zellen normiert. Die Fluoreszenz des Nullzeitpunkt-Experiments wurde von den Bildern abgezogen, zudem wurde auf 100 % Internalisierung bei DMSO-Behandlung der Zellen normiert. Die Graphik zeigt eine durch Melophlin A-hervorgerufene konzentrationsabhängige Hemmung der Aufnahme von Transferrin. Interessanterweise wurde die stärkste Inhibition von 70 % bei einer Melophlin-Konzentration von 20 µM beobachtet.

Die Graphik zeigt einen konzentrationsabhängigen Effekt von Melophlin A auf Transferrin-Internalisierung. Interessanterweise scheint sich das Maximum der Inhibition bei einer Konzentration von 20 µM Melophlin A zu befinden. Mit höheren Konzentrationen lässt der inhibierende Effekt nach. Mittels dynamischer Lichtstreuung konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 20 µM an Melophlin A in wässrigem Medium ein sprunghafter Anstieg der Streuungsintensität auftritt (Abbildung 68). Auch wenn keine einheitliche Mizellenkonzentration gemessen werden konnte, weisen diese Ergebnisse auf eine Aggregation von Melophlin A in wässrigen Medien bei Konzentrationen über 20 µM hin. Die Quantifizierung

Spezieller Teil

(Abbildung 67) zeigt weiterhin, dass Melophlin A bei einer Konzentration von 20 μM zu einer Hemmung der Transferrin-Internalisierung um 70 % führte.

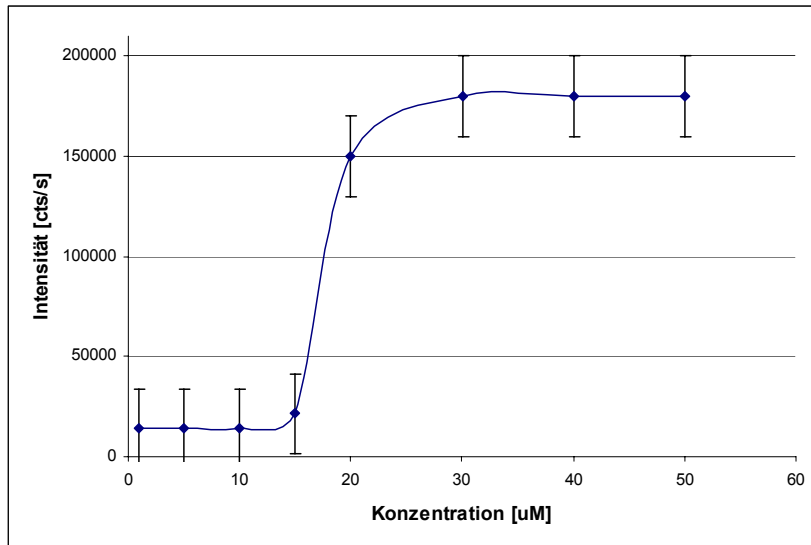


Abbildung 68: Untersuchung der Aggregation von Melophlin A in wässrigem Milieu mittels DLS. Der Anstieg der Streuungsintensität bei 20 μM Melophlin A zeigt, dass sich bei höheren Konzentrationen von Melophlin A in wässrigen Medien Aggregate bilden. Eine einheitliche Mizellenbildung konnte nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Melophlin A-behandelten Zellen nach Auswaschen des Inhibitors wieder erholen. Hierzu wurden die Zellen erneut mit Melophlin A (20 μM) inkubiert. Nach fünfminütiger Inkubation zeigten die mit DMSO behandelten Zellen eine Internalisierung von Transferrin, die in den Melophlin A-Zellen inhibiert wurde. Nach Auswaschen des Inhibitors und Erholung der Zellen für 12 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ wurden die Zellen erneut mit Alexa-Transferrin inkubiert (Abbildung 69). Diesmal zeigte sich eine deutliche Transferrin-Aufnahme, was bedeutet, dass die Wirkung von Melophlin A auf den Endozytose-Mechanismus zur Transferrin-Internalisierung reversibel ist.

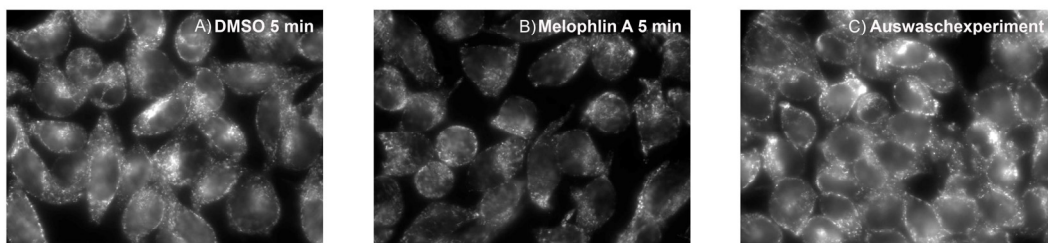


Abbildung 69: Erholungsexperiment. HeLa-Zellen wurden mit Melophlin A und DMSO behandelt und anschließend wie in Abbildung 66 beschrieben mit Transferrin inkubiert. A) Nach DMSO-Inkubierung zeigten die Zellen eine Internalisierung von Alexa-Transferrin.

B) Meloplin A-vorbehandelte Zellen zeigten eine Hemmung der Transferrin-Aufnahme. C) Nach Auswaschen von Meloplin A und Erholung der Zellen für 12 h wurde erneut mit Alexa-Transferrin bei 25 ° und 37 °C inkubiert. Die Zellen waren regeneriert und wieder in der Lage, Transferrin zu internalisieren.

4.6.3.2 Untersuchung des Einflusses von Meloplin A auf ERK1/2-Phosphorylierung

Wie bereits in Kapitel 4.6.3 beschrieben zeigten Schmid et al., dass die dominant-negative Dynamin-Mutante K44A neben der Hemmung der Endozytose auch zu einer Reduktion der Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen führt.^[169] Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Inhibition von endozytotischen Prozessen durch Meloplin A und damit einhergehender Hemmung von ERK1/2 würden die im Reporter- und im Phänotyp-Assay-beobachteten Effekte erklären. Um dies zu verifizieren wurde von Dipl.-Biol. Karin Warburg die Phosphorylierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A per Immunoblot untersucht.

Hierzu wurden die Zellen mit Meloplin A, U0126 als Positivkontrolle und DMSO als Negativkontrolle über Nacht inkubiert. Vor Zellyse wurde für 5 min mit EGF stimuliert. Nach Auftrennung auf einem SDS-Gel und Übertragung auf die Blotmembran wurden die Proteine mit einem p-ERK1/2-Antikörper sowie einem Tubulin-Antikörper zur Ladekontrolle inkubiert. Nach anschließender Behandlung mit den entsprechenden sekundären Antikörpern, welche mit verschiedenen Infrarot-Farbstoffen markiert waren, konnte der Blot mit dem Odyssey Infrared Imaging-System ausgewertet werden. Zusätzlich wurden die Proteinbanden mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software quantifiziert und auf die Ladekontrolle Tubulin normiert.

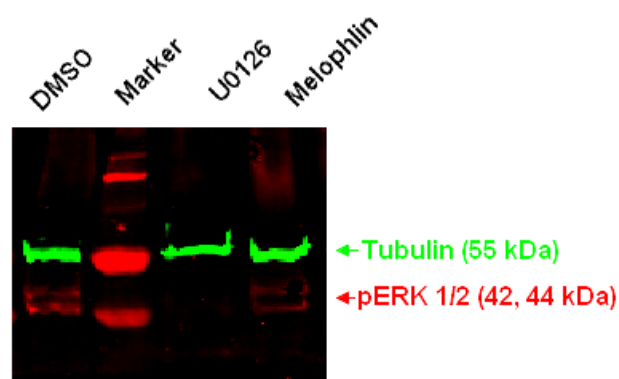


Abbildung 70: Repräsentativer pERK1/2 Western-Blot. Lysate von Zellen, die mit DMSO, U0126 (30 μ M) und Meloplin A (10 μ M) behandelt wurden, wurden per SDS aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tubulin (grün) als Ladungskontrolle und pERK1/2 (rot) sichtbar gemacht. Spalte 1 zeigt die Intensität der pERK-Bande bei DMSO-behandelten Zellen. Spalte 3 zeigt die pERK-Bande von Zellen, die mit U0126 vorbehandelt wurden. Es ist

Spezieller Teil

kein pERK-Signal zu sehen. Im Vergleich zeigt Spalte 4 das pERK-Signal nach Behandlung mit Melophlin A. Das Signal ist wesentlich schwächer als in der Negativkontrolle, aber im Gegensatz zu Spalte 3 noch leicht sichtbar.

Abbildung 70 zeigt, dass nach Behandlung der Zellen mit 10 μM Melophlin A über Nacht ein Rückgang der ERK1/2 Phosphorylierung zu beobachten war. Eine Quantifizierung (Abbildung 71) belegt, dass eine Behandlung der Zellen mit Melophlin A bei einer Konzentration von 10 μM eine Reduktion der pERK-Phosphorylierung um 70 % bewirkt. In höheren Konzentrationen war der inhibierende Effekt von Melophlin A jedoch rückläufig. Dies kann auf die bereits erwähnte Aggregation von Melophlin A in wässrigen Medien bei Konzentrationen von größer 20 μM erklärt werden.

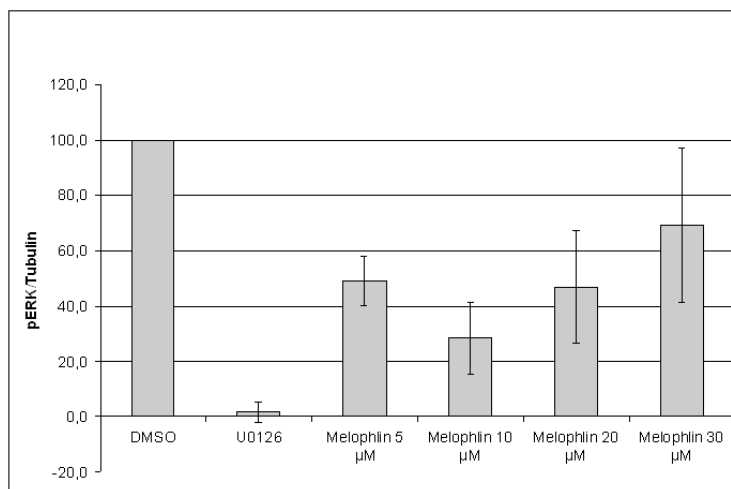


Abbildung 71: Analyse repräsentativer pERK1/2-Western-Blots mit der AIDA Image Analyzer V4.15-Software. Lysate von Zellen, die mit DMSO, U0126 und Melophlin A behandelt wurden, wurden per SDS aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tubulin als Ladungskontrolle und pERK1/2 inkubiert. Die Signalintensität jeder Blotbande wurde bestimmt. Weiterhin wurde jeweils das Verhältnis pERK- zu Tubulin-Signal der jeweiligen Bande berechnet und gegen die DMSO-Kontrolle (100 %) normalisiert. Behandlung der HeLa-Zellen mit Melophlin A führte zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der ERK-Phosphorylierung. Eine Konzentration von 10 μM Melophlin A bewirkte die stärkste Hemmung. Unter diesen Bedingungen ging die Phosphorylierung von ERK1/2 um 70 % zurück. Interessanterweise kommt es bei höheren Konzentrationen zu einer Reduktion der Hemmung. Dies kann durch Aggregat-Bildung von Melophlin A in wässrigem Medium bei höheren Konzentrationen erklärt werden.

Der bekannte MEK-Inhibitor U0126 zeigte bei einer Konzentration von 30 μM eine Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung um über 95 %.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Melophlin A indirekt über Interaktion mit Dynaminen eine Hemmung endozytotischer Prozesse bewirkt. Letzteres führt wie

in der Literatur für inaktive Dynamin-Mutanten beschrieben beispielsweise durch Hemmung der Endozytose von aktiviertem MEK^[169] zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2.

4.6.3.3 Untersuchungen der Wirkung von Meloplin A auf die GTPase-Aktivität von Dynamin II

In weiterführenden Experimenten sollten erste Hinweise auf die Art der Wirkung von Meloplin A auf die Funktion der Dynamine erhalten werden. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Thomas Reubold aus der Arbeitsgruppe von Dr. Susanne Eschenburg durchgeführt. In einem Enzym-gekoppelten regenerativen GTPase-Assay wurde der Einfluss von Meloplin A auf die GTPase-Aktivität von Dynamin II betrachtet. Dies wurde sowohl in Abwesenheit (Abbildung 72A) als auch in Gegenwart von Grb2 (Abbildung 72B) als Stimulator der GTPase-Aktivität untersucht. Der Assay ergab, dass Meloplin A keine Hemmung der GTPase-Aktivität von Dynamin II in Gegenwart von Grb2 bewirkt. Im Gegensatz ist in Abwesenheit von Grb2 ein leicht stimulierender Effekt von Meloplin A auf die GTPase-Aktivität zu erkennen. Die stärkste Stimulierung (um 60 %) wurde bei einer Meloplin A Konzentration von 20 μM ausgemacht. Auch in diesem Assay-System geht der von Meloplin A verursachte Effekt bei höheren Konzentrationen zurück, was in Einklang zu den Ergebnissen der Transferrin-Internalisierung sowie den Untersuchungen der ERK1/2-Phosphorylierung steht.

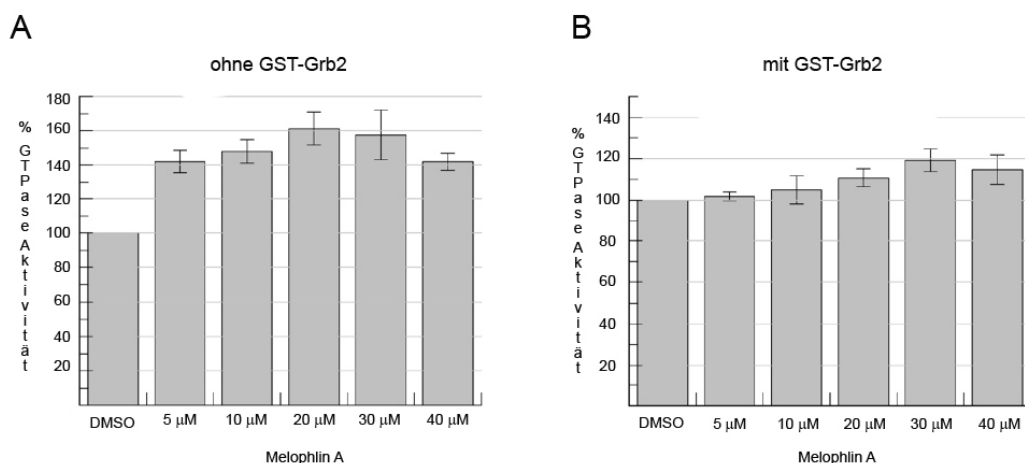


Abbildung 72: Effekt von Meloplin A auf die GTPase-Aktivität von Dynamin II (0.5 μM) in Gegenwart (B) und Abwesenheit von GST-Grb2 (A). Meloplin A bewirkt keine Inhibierung der GTPase-Aktivität von Dynamin II. In Abwesenheit von Grb2 ist hingegen eine konzentrationsabhängige Stimulierung der GTPase-Aktivität zu beobachten. Der stärkste Effekt wurde bei einer Konzentration von 20 μM mit einer Stimulierung um 60 % festgestellt. Bei höheren Konzentrationen ist der Effekt rückläufig.

Spezieller Teil

Zusammenfassend legen die in den Kapiteln 4.6.3.1, 4.6.3.2 und 4.6.3.3 beschriebenen Ergebnisse nahe, dass es sich bei Melophlin A um einen neuen Modulator von Dynaminen handelt. Der nachgewiesene inhibitorische Effekt von Melophlin A auf Transferrin-Endozytose sowie der Rückgang von ERK1/2-Phosphorylierung in Melophlin A-behandelten Zellen nach EGF-Stimulierung bestätigen zudem den in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen Dynamin-abhängiger Endozytose und Ras-Signaltransduktion. Außerdem konnte durch Melophlin A gezeigt werden, dass das Wechselspiel zwischen Endozytose und der Ras-Signalkaskade von niedermolekularen Molekülen beeinflusst werden kann. Diese Ergebnisse machen Melophlin A zu einem interessanten Werkzeug für zukünftige Untersuchungen des Ras-Signalwegs.

5. Zusammenfassung

In der chemischen Genetik werden die Funktionen und Wechselwirkungen der Proteine mittels niedermolekularer Liganden untersucht, um Einblick in die komplexen biochemischen Mechanismen der Zelle zu erhalten. Niedermolekulare Substanzen stellen einen guten Ansatzpunkt für die Aufklärung dynamischer Zellprozesse dar, da sie schnell, dosierbar und reversibel agieren.

Der Ras-Signalweg reguliert essentielle biologische Prozesse und beinhaltet diverse interessante Proteine als Angriffspunkte für die Krebstherapie. Dies macht das Ras-Signalnetzwerk zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung neuer niedermolekularer Inhibitoren und die Aufklärung von Wirkmechanismen.

Kobayashi et al.^[65] entdeckten, dass die 3-Acyltetramsäuren Melophlin A und B zu einer Reversion des Phänotyps Ras-transformierter NIH3T3-Fibroblasten führen und so interessante Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Modulatoren des Ras-Signalwegs darstellen. Ihre genauen zellulären Ziele sowie die Verbindung zum Ras-Netzwerk wurden bisher nicht näher untersucht.

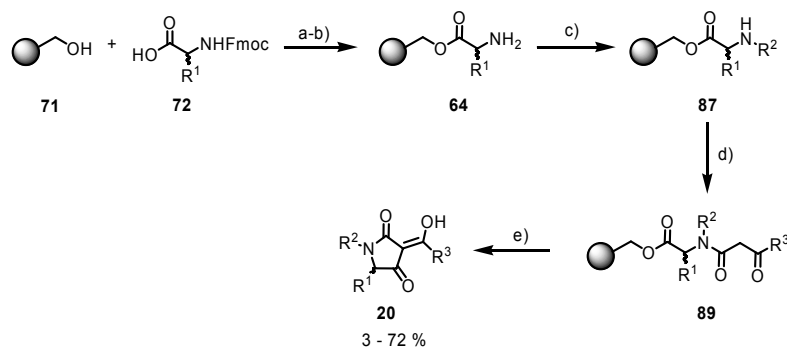
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein chemisch-genetischer Ansatz entwickelt, um basierend auf dem Naturstoff Melophlin A neue Effektoren des Ras-Signalwegs zu identifizieren und ihren Wirkmechanismus zu untersuchen.

Zunächst wurde durch eine Variation der von Romoff et al.^[91] beschriebenen Festphasensynthese eine Bibliothek von 65 Melophlin A-Derivaten synthetisiert. Die Synthese wurde an Hydroxyl-funktionalisiertem Wang-Harz durchgeführt und begann mit der Immobilisierung einer Fmoc-geschützten Aminosäure.^[105] Neben einfachen unpolaren konnten auch funktionalisierte Aminosäuren erfolgreich eingesetzt werden. Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Amin durch reduktive Aminierung mit diversen Aldehyden funktionalisiert. Weitere Diversifizierung konnte durch Acylierung mit verschiedenen β -Ketoestern erreicht werden (Abbildung 73). Die einfachsten 3-Acetyl-Tetramsäuren wurden durch Umsetzung mit Diketen **198** dargestellt. Die Synthese von Tetramsäuren mit komplexeren aliphatischen 3-Acylseitenketten wurde durch thermische Umlagerung geeignet substituierter Meldrumsäure-Derivate **90** (Abbildung 73) realisiert,^[97] letztere konnten nach literaturbekannten Reaktionen dargestellt werden.^[98, 99] Zur Synthese von Polyenoyl-Tetramsäuren wurden die von Ley et al.^[83] publizierten β -Ketothioester **229** eingesetzt. Diese zur Lösungssynthese von Tetramsäuren entwickelten β -Ketoäquivalente konnten auch erfolgreich zur Amidierung am polymeren Träger

Zusammenfassung

eingesetzt werden. Die Ausbeuten in diesem Schritt blieben trotz Optimierung niedrig. Dennoch konnten auf diesem Weg vier Polyenoyl-Tetransäuren am Harz mit Gesamtausbeuten von 3 – 10 % synthetisiert werden.

Im letzten Schritt der Syntheseroute wurden die Tetransäuren unter basischen Bedingungen simultan zyklisiert und vom Harz gespalten. Nach Aufreinigung mit präparativer HPLC wurden die Tetransäuren **20** in Ausbeuten von 3 – 72 % erhalten.



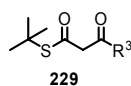
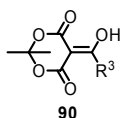
Eingesetzte Aminosäuren:

Sarcosin
Ala
Gly
Val
N-Methyl-Tyr
N-Methyl-Ala
N-Methyl-Val
N-Methyl-Ile
N-Methyl-Leu
H-Ser(OtBu)-OH
H-Orn(Boc)-OH
H-Glu(OtBu)-OH
H-Tyr(OtBu)-OH
Phe
H-D-Tyr(OtBu)
 β -Ala

Aldehyde:

Acetaldehyd
Propanal
Hexanal
Dec-4-enal
Benzaldehyd
p-Methoxybenzaldehyd
2,4-Dimethoxybenzaldehyd
Naphthaldehyd
(2*E*, 4*E*)-Deca-2,4-dienal
Thiophen-3-carbaldehyd

β -Ketoäquivalente:



$R^3 = C_{17}, C_{15}, C_{14}, C_{13}, C_{11}, C_9, C_7, C_4,$
Pentadec-8-enyl-, 2-Propyl-, But-3-enyl-,
2, 2-Dimethylpropyl-, Cyclohexyl-,
2-Phenylethyl-, 2, 4, 4-Trimethylpentyl-

$R^3 = (3E, 5E)$ -Hepta-3,5-dien,
(3*E*, 5*E*, 7*E*)-Nona-3,5,7-trien,
(3*E*, 5*E*)-Undeca-3,5-dien

Abbildung 73: Zusammenfassung der am Harz synthetisierten Tetransäuren. a) Aminosäure, DIC, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, 0 °C, 1 h, dann Wang-Harz, DMF, DMAP, 6 h; b) 20 % Piperidin in DMF, 2*20 min; c) Aminosäure-funktionalisiertes Harz, Aldehyd, NaOAc, $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$, 16 h, THF, RT; d) i) Diketen, Triethylamin, CH_2Cl_2 , 0 °C, 12 h oder ii) 5-Acyl-Meldrumsäure, Toluol, 80 °C, 2 h oder iii) $\text{Ag}(\text{OCOCF}_3)$, THF, RT 12 h; e) 0.1 M KOH in Methanol, CH_2Cl_2 , Dioxan, 2 h, RT.

Neben den fünfgliedrigen Melophlin A-Derivaten wurden basierend auf β -Alanin auch die sechsgliedrigen Tetransäure-Analoga **166A** und **166B** dargestellt (Abbildung 74). Des Weiteren konnte durch die Synthese des Analogons **186** des natürlich vorkommenden (+)-Laccarins **178** gezeigt werden, dass die Syntheseroute an der festen Phase auch für die Darstellung bicyklischer Tetransäuren geeignet ist (Abbildung 74). Zusätzlich wurde die Bibliothek um die natürlich vorkommende Polyenoyl-Tetransäure Raveninsäure **191** erweitert.^[108] Auf Grund der schlechten Ausbeuten der Festphasensynthese mit β -Ketothioestern wurde die Verbindung **191** (Abbildung 74) in Lösung mit einer Gesamtausbeute von 14.5 % synthetisiert.

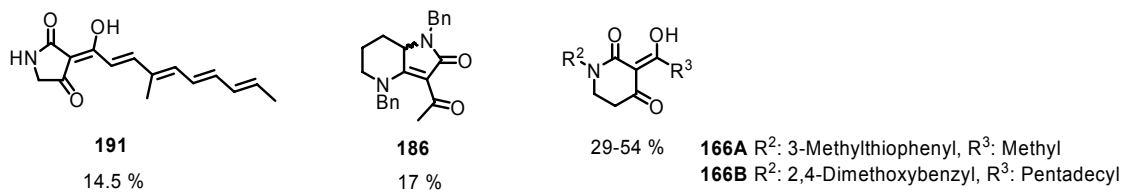


Abbildung 74: Strukturen der Raveninsäure **191**, des Laccarin-Derivats **186** sowie der sechsgliedrigen Tetramsäure-Analoga **166A/B**.

Auf der Suche nach neuen Modulatoren des Ras-Signalwegs wurde die Tetramsäure-Kollektion in einem Ras-spezifischen Phänotyp-Assay in der durch ein virales H-Ras-Onkogen transfizierten Zelllinie MDCK-F3 getestet. Inkubation dieser Zelllinie mit Melophtin A (30 μM) führte zu einer Reversion des Phänotyps (Abbildung 75). Der Effekt wurde zusätzlich durch Anfärbung von E-Cadherin in MDCK-F3-Zellen verifiziert. Die transformierten Zellen zeigen verringerte Zellkontaktbildung, was durch verringerte Expression von E-Cadherin an der Zellmembran sichtbar gemacht werden kann. Behandlung mit Melophtin A führt wieder zu einer Verstärkung der E-Cadherin-Expression in dieser Zelllinie.

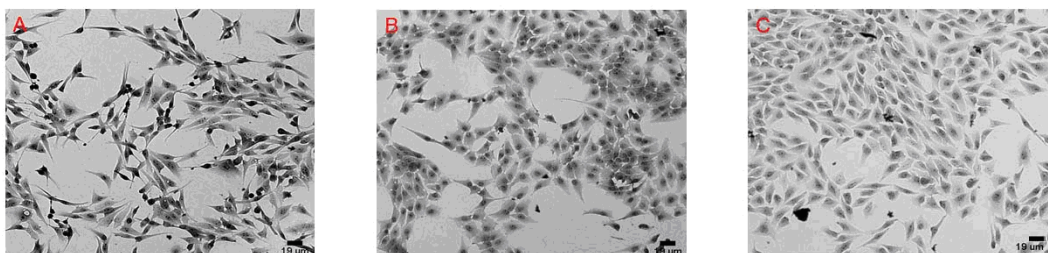


Abbildung 75: Effekt von Melophtin A auf den Phänotyp von MDCK-F3-Zellen. A) Fibroblastenartige MDCK-F3-Zellen. B) Nach Behandlung mit U0126 zeigen die Zellen einen runden Phänotyp mit erneuerten Zell-Zellkontakten. C) Auch Behandlung mit Melophtin A führt zu einer Reversion des Phänotyps.

Abgesehen von Melophtin-A bewirkten zwei weitere, strukturell verwandte Verbindungen eine Reversion des Phänotyps der MDCK-F3-Zellen. Durch einen WST-1-Proliferationsassay wurde sichergestellt, dass die beobachteten Effekte nicht durch Zytotoxizität der Verbindungen verursacht wurden.

Um zu untersuchen, ob die synthetisierten Tetramsäuren den Ras-Signalweg oberhalb des Transkriptionsfaktors Elk1 inhibieren, wurden sie zusätzlich in einem Ras-spezifischen HLR-Elk-1-*Trans*-Reporterassay getestet. 10 Verbindungen führten zu einer Inhibition der Luziferase-Expression um mehr als 30 %, ohne dabei zytotoxisch zu wirken. Unter den aktiven Verbindungen befanden sich auch MelophtinA ($\text{IC}_{50} = 18.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$) und die im phänotypischen Assay als aktiv hervorgetretenen Verbindungen **131** und **133**. Die höhere Anzahl an aktiven

Zusammenfassung

Verbindungen legt nahe, dass der Rücktransformation ein komplexerer Zellmechanismus zugrunde liegt als für eine Inhibition des Ras-Signalwegs oberhalb des Transkriptionsfaktors Elk-1 in der Reportergeren-Zelllinie notwendig ist.

Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Assays ließ sich eine Struktur-Wirkungs-Analyse durchführen (Abbildung 76). Für die Aktivität in beiden Systemen erwies sich die lange Lipidkette des 3-Acylsubstituenten als unverzichtbar. Auch am Ring-Stickstoff konnten keine größeren Substituenten als die Methylgruppe des Naturstoffs eingeführt werden, ohne die Aktivität im phänotypischen Assay zu reduzieren. Im Reportergeren-Assay zeigte sich diese Position nur wenig flexibler. Lediglich Glutaminsäure-basierte Tetramsäuren bewirkten auch mit voluminösen Substituenten am Ring-Stickstoff eine Inhibition des Reportergeren-Assays. Die größten Veränderungen, ohne Verlust der Aktivität in beiden Assays, konnten an Position fünf des Rings eingeführt werden. Die aktiven Verbindungen des phänotypischen Assays (**131**, **133**) tragen an dieser Stelle eine Methyl- bzw. 1-Methylpropylgruppe. Im Reportergeren-Assay zeigten auch Tetramsäuren mit sterisch anspruchsvolleren Resten inhibitorische Aktivität.

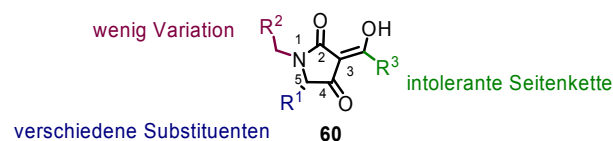


Abbildung 76: Zusammenfassung der Ergebnisse der Struktur-Aktivitäts-Analyse.

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus von Melophlin A auf den Ras-Signalweg, sollten die Bindungspartner der Tetramsäure über einen affinitätschromatographischen Ansatz identifiziert werden. Als Trägermaterial wurden Streptavidin-beladene magnetische Partikel verwendet, die eine Immobilisierung der Inhibitoren über die Bindung von Biotin zu Streptavidin ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden ein aktives sowie ein inaktives biotinyliertes Melophlin A-Derivat dargestellt. Basierend auf der Struktur-Wirkungs-Analyse konnte die nötige Biotin-Einheit über einen PEG-Linker in Position fünf des Tetramsäurekopfs eingeführt werden. Die aktive Verbindung **226** wurde zudem mit einer Palmitylkette als Acyl- sowie einer Ethylgruppe als Aminosubstituenten synthetisiert (Abbildung 77). Als inaktive, strukturell aber ähnliche Kontrollsubstanz wurde die Verbindung **228** mit gekürzter Acylseitenkette dargestellt. Biologische Validierung der Verbindungen ergab, dass **226** im Reportergeren-Assay zu einer Inhibition des Ras-Signalwegs ($IC_{50} = 25.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$) führte. Verbindung **228** zeigte weder Aktivität noch Toxizität.

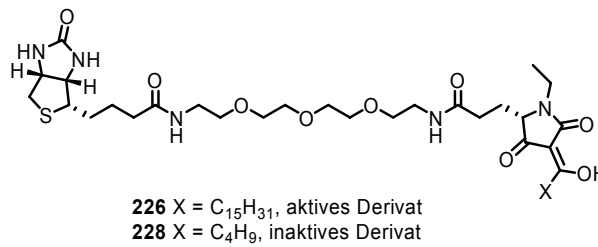


Abbildung 77: Aktives **226** und inaktives **228** biotinyliertes Analogon von Melophlin A.

Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner wurden zwei auf Affinitätschromatographie beruhende Experimente durchgeführt. Zur Unterscheidung zwischen Proteinen, welche Melophlin A-Analogon **226** binden, von jenen, die am Trägermaterial adsorbieren, wurde als Kontrollsystem der Linker (PEG-Biotin) **227** eingesetzt. Die am Träger immobilisierten Verbindungen wurden mit HeLa-Zelllysat inkubiert und bindende Proteine konnten direkt an den Magnetpartikeln tryptisch verdaut und per RP-LC-MS/MS analysiert werden. Im zweiten Experiment wurde das nicht aktive Analogon **228** als Kontrolle eingesetzt. Außerdem wurden die bindenden Proteine nach analogem Pulldown-Experiment auf einem SDS-Gel vorgetrennt und verdaut, bevor sie mit der empfindlicheren RP-Nano-LC-MS/MS analysiert wurden. Aus den erhaltenen Spektren der tryptischen Peptide beider Experimentreihen konnten über eine MASCOT-Suche die Ursprungproteine identifiziert werden. Als potentielle Interaktionspartner galten jeweils nur Proteine, die nicht in den Kontroll-, wohl aber in den Melophlin A-Analogon-Experimenten gefunden wurden.

Aus der vereinfachten Experimentreihe mit dem Linker **226** als Kontrolle konnten 19 Proteine als potentielle Bindungspartner von Melophlin A identifiziert werden. Unter den Proteinen befanden sich verschiedene Untereinheiten der Coatomeere sowie einige für den Kerntransport in die Zelle verantwortliche Importine, Exportine und Transportine.

Mit dem inaktiven Molekül **228** als Kontrolle und Analyse per RP-Nano-LC-MS/MS wurden nur sechs Proteine identifiziert. Unter diesen befanden sich vier Proteine mit beschriebener Relevanz zum Ras-Signalweg, namentlich zwei Vertreter der Familie der Dynamine; Dynamin II und DNM1L sowie p120 Catenin und IQGAP3.

Ein direkter Vergleich der beiden Methoden ist schwierig, da neben der Analysemethode auch das Kontrollmolekül variiert wurde. Die Anzahl der pro Experiment identifizierten Proteine bestätigte jedoch die höhere Sensitivität der Nano-LC-MS/MS. Das dennoch mit der empfindlicheren Methode weniger Proteine als potentielle Interaktionspartner identifiziert wurden, wird auf die strukturell ähnliche Kontrollsubstanz **228** zurückgeführt. Diese geht, der aktiven Verbindung **226**

Zusammenfassung

vergleichbare, unspezifische Interaktionen ein, so dass beim Abgleich der MASCOT-Proteinlisten viele Proteine als unspezifische Interaktionspartner herausfielen. Ein direkter Vergleich der Kontrollsubstanzen ist nicht möglich, da auf Grund der empfindlicheren Nano-LC-MS/MS in der zweiten Versuchsreihe auch in den Kontrollen wesentlich mehr Proteine identifiziert wurden. So konnten auch die im ersten Experiment als potentielle Bindungspartner von Melophlin A identifizierten Proteine, wenn auch in geringerer Häufigkeit, im Kontrollexperiment **228** nachgewiesen werden. Eine quantifizierende Methode der Massenspektrometrie, wie SILAC, könnte hier helfen zu unterscheiden, in welchem Maß identifizierte Proteine stärker an das aktive Molekül binden.

Die Identitäten der massenspektrometrisch identifizierten Proteine Dynamin II und p120 Catenin der zweiten Experimentalreihe sowie Importin β und COPA der ersten Versuche konnten per Western-Blot-Experiment mit spezifischen Antikörpern bestätigt werden. Gleichzeitig zeigten die Versuche, dass diese Proteine nicht detektierbar an das inaktive Kontrollmolekül **228** binden.

Zusätzlich wurde die Bindung von Melophlin A an Dynamine und Importin β mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz kontrolliert. Für die Bindung von Dynamin II an Melophlin A konnte ein K_d -Wert von $13.8 \pm 0.12 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Auch eine Interaktion von Melophlin A mit den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, Dynamin I und DNM1L, konnte mittels SPR bestätigt werden. Ein Vergleich des Aufbaus der drei eingesetzten, mit Melophlin A interagierenden, Dynamine-Proteine legt nahe, dass sowohl die PR- als auch die PH-Domäne für die Interaktion nicht bedeutend sind. Die Bindung könnte hingegen durch die GTPase- oder die GTPase-Effektor-Domäne vermittelt werden.

Die Bindung von Importin β zu Melophlin A scheint hingegen stark unspezifisch zu sein, was auch durch ITC-Messungen abgesichert werden konnte.

Die Proteine der Familie der Dynamine sind als potentielle Bindungspartner von Melophlin A von großem Interesse. Sie spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zellprozessen, vor allem sind sie in endozytotische Vorgänge involviert.^[137, 179] Funktionsfähige Endozytose hingegen ist Voraussetzung für eine Wachstumsfaktoren-abhängige volle Aktivierung von ERK, einer downstream-Kinase des Ras-Signalwegs.^[167] Dominant-negative Mutanten von Dynaminen inhibieren sowohl Endozytose als auch EGF- oder Insulin-stimulierte ERK1/2-Aktivierung.^[169]

In einer Kooperation mit M. Sc Amrita Rai der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manstein wurde untersucht, ob Melophlin A einen direkten Einfluss auf Dynamine-abhängige

Endozytose ausübt. Hierzu wurde die Rezeptor-abhängige Endozytose von fluoreszentmarkiertem Transferrin untersucht. Die Experimente zeigten, dass Meloplin A bei einer Konzentration von 20 μM die Aufnahme von Transferrin in HeLa-Zellen um 70 % reduziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Transferrin-Internalisierung konzentrationsabhängig ist. Interessanterweise ist zu beobachten, dass der hemmende Effekt von Meloplin A mit höheren Konzentrationen ($> 20 \mu\text{M}$) abnimmt. Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Meloplin A in höheren Konzentrationen in wässrigen Medien Aggregate bildet, was durch Streuungsversuche gezeigt werden konnte. Des Weiteren ist der Effekt von Meloplin A auf endozytotische Prozesse reversibel.

Von Dipl.-Biol. Karin Warburg durchgeführte Experimente zeigten zudem, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A (10 μM) um 70 % zurückgeht. Dies ist in voller Übereinstimmung mit den Beobachtungen, dass Expression von dominant-negativem Dynamin zu einem Rückgang der ERK-Phosphorylierung in HeLa-Zellen führt.^[169] Bei Behandlung der Zellen mit höheren Konzentrationen an Meloplin A geht auch dieser Effekt zurück, was ebenfalls durch Aggregation von Meloplin A in wässrigen Medien erklärt wird.

Erste Untersuchungen zur Art der Wirkung von Meloplin A auf Dynamine wurden von Dr. Thomas Reubold durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass die GTPase-Aktivität von Dynamin II in Gegenwart von GST-Grb2 durch Meloplin A nicht beeinflusst wird. Es konnte jedoch ein aktivierender Effekt von Meloplin A auf die GTPase-Aktivität in Abwesenheit von Grb2 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die von Kobayashi et al.^[65] beschriebene Reversion des Phänotyps Ras-transformierter Zellen durch Behandlung mit Meloplin A höchstwahrscheinlich auf eine Bindung von Meloplin A an Dynamine zurückzuführen ist. Diese bewirkt eine Hemmung der Rezeptor-abhängigen Endozytose, was wiederum die volle Aktivierung des Ras-Signalwegs auf der Ebene von ERK1/2 verhindert. Des Weiteren belegen die Untersuchungen, dass die Zusammenhänge zwischen Ras-Signaltransduktion und Dynamin-abhängiger Endozytose durch niedermolekulare Verbindungen modulierbar sind.

6. Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury-VX 400 und einem Bruker Avance DRX 500 aufgenommen. Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das jeweilige Restsignal des nicht deuterierten Lösungsmittels. Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, br.s = breites Singulett, m = Multiplett, ar = aromatisch, ph = phenylisch und benz = benzylich.

Optische Drehungen wurden auf einem Schmidt & Hänsch Polartronic HHP Polarimeter ermittelt und sind auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie (589 nm) bezogen. Die Konzentration c in g/100 ml und das verwendete Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Hochaufgelöste Massen wurden mit einer HPLC Agilent 1100 Series, kombiniert mit einem Massenspektrometer mit LTQ Orbitrap und Nano-Elektrospray-Ionisation aufgenommen. Es wurden C18-Dionex Säulen verwendet.

Gekoppelte Liquid Chromatography-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde an einem Agilent Series 1100-System der Firma Hewlett Packard mit einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 oder einer C18 Gravity-Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Das ESI-Massenspektrometer war ein LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan.

Es wurde folgender Standard-Gradient verwendet:

C4grav_split4pos: Laufmittel A: 0.1 % HCOOH in H₂O; Laufmittel B: 0.1 % HCOOH in Acetonitril; Flussrate 1 ml/min, 1 min 10 % B, dann linearer Anstieg auf 100 % B in 9 min, 2 min 100% B.

Zur Aufnahme der LC-MS Spektren der 3-Acylmeldrumsäure-Derivate wurde der oben gezeigte Gradient mit saurem Lösungsmittel verwendet. Zur Massenbestimmung wurde im negativ-Modus detektiert, da die Meldrumsäuren nur als negativ geladene Spezies detektiert werden konnten.

Für die **analytische chirale HPLC** wurde ein Agilent Series 1100-System mit einer Chiralpak AD-H Säule (Daicel Chemical Industries) eingesetzt.

Für die **MS-gekoppelte, präparative HPLC** wurde folgendes System verwendet: Agilent Series 1100/LC/MSD VL (ESI); Vorsäule: VP50/21 Nucleodur C18 Gravity 5 μm , Hauptsäule: VP125/21 Nucleodur C18 Gravity 5 μm , (beide Macherey&Nagel); Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 25 ml/min; Wasser für HPLC-Trennungen wurde durch ein Milli-Q-System mit Q-Gard 2-Kartuschen der Firma Millipore gereinigt.

Eluent A: Acetonitril + 0.1 %TFA; Eluent B: Wasser + 0.1 % TFA. Als Lösungsmittel für die Ionisierung wurde Wasser/Acetonitril (1:1) + 0.1 % Ameisensäure verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_f-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und folgende Anfärbereagenzien verwendet:

Kaliumpermanganat-Lösung: 1.6 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 2.5 ml 5 % NaOH, 200 ml Wasser.

Seebach-Reagenz: 22.5 g Molybdätosphorsäure, 9 g Ce(SO₄)₂, 54 ml Schwefelsäure, 840 ml Wasser.

Für die **präparative Säulenchromatographie** wurde Kieselgel der Firma Acros mit der Korngröße 35-70 μm verwendet und mit Druck zwischen 0.5 – 1.0 bar durchgeführt. Es wurde ein 70 -100 facher Überschuss an Kieselgel zum Rohprodukt eingesetzt.

UV-spektroskopische Messungen wurden an einem Cary 100-System der Firma Varian gemessen.

Experimenteller Teil

Alle **Reaktionen** fanden unter einer Inert-Atmosphäre aus Argon statt. Glasgeräte wurden vor dem Einsatz im Hochvakuum ausgeheizt und nach Abkühlen mit Argon gespült. Lösungsmittel wurden in wasserfreier Form eingesetzt:

Diethylether, Tetrahydrofuran und Methanol wurden in getrockneter Form über Molsieb von der Firma Fluka bezogen.

Dichlormethan wurde über Calciumhydrid getrocknet und vor Gebrauch destilliert.

Das Harz für die Synthese an der festen Phase wurde von der Firma Novabiochem bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen SIGMA-ALDRICH, ACROS, Fluka oder ABCR erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

6.2 Verbindungen zu Kapitel 4.1

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Harzbeladung

Zu einer 0 °C kalten Lösung der jeweiligen Fmoc-Aminosäure (5.5 eq.) in frisch destilliertem Dichlormethan/DMF (5:3) (0.6 M) wurde *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (2.7 eq.) getropft. Nach 30 minütigem Rühren bei 0 °C wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde in so wenig trockenem DMF wie möglich aufgenommen und zu, in einem Festphasen-Reaktor mit DMF vorgequollenem Wang-Harz (1 eq.) gegeben. Anschließend wurde DMAP (0.1 eq.) in DMF zugetropft und die Reaktion wurde für 8 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde filtriert und dreimal mit DMF (20 ml), dreimal mit Methanol (20 ml) und dreimal mit Dichlormethan (20 ml) gewaschen bevor es am Hochvakuum getrocknet wurde.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Fmoc-Entschützung

Das beladene Wang-Harz wurde in 20 % Piperidin in DMF gelöst und für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Harz filtriert. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt bevor das Harz dreimal mit DMF (20 ml), dreimal mit Methanol (20 ml) und dreimal mit Dichlormethan (20 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet wurde.

Ermittlung der Beladungsdichte

2-3 mg Harz wurden in einen 10 ml volumetrischen Zylinder eingewogen und mit 20 % Piperidin in DMF aufgefüllt. Anschließend wurde für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Hiernach wurden 3 ml des Überstands in eine Quartz-UV-Küvette

überführt und die Absorption der Lösung gegen eine Referenz (20 % Piperidin in DMF) bei $\lambda = 301$ nm gemessen. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz wurde die Beladung c_L ermittelt.

$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ mit $\varepsilon = 7800$ bei 301 nm.

$$c_v = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} = \frac{A \cdot 10^3}{7800}$$

$$c_L = \frac{c_v \cdot V}{m} = \frac{A \cdot 10^3}{7800 \cdot m}$$

Hierbei ist c_v die Volumenkonzentration, A die Absorption der Probe, d die Weglänge des Lichts in der UV-Küvette, V das totale Volumen und m die Masse des Harzes.

Bestimmung der theoretischen Beladung

Die theoretische Beladung wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$Beladung_{neu} (mol/g) = \frac{Beladung_{alt} (mol/g)}{1 + \Delta m \cdot Beladung_{alt} (mol/g)}$$

Hierbei war $Beladung_{alt}$, die Beladung vor dem Reaktionsschritt und Δm die Massendifferenz der zum Harz hinzugefügten Verbindung.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Reduktive Aminierung am Harz^[96]

Das Aminosäure-beladene Harz (1 eq.) wurde in trockenem THF für 15 min vorgequollen. Dann wurde trockenes Natriumacetat (2.2 eq.) und der jeweilige Aldehyd (1 eq.) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend wurde Natriumtriacetoxyborhydrid (2.2 eq.) zugegeben und es wurde für weitere 16 h geschüttelt. Danach wurde die Reaktion mit Methanol (5 ml) abgebrochen, das Harz wurde filtriert und dreimal mit DMF/H₂O 1:1 (20 ml), dreimal

Experimenteller Teil

mit DMF (20 ml), dreimal mit Methanol (20 ml) und dreimal mit Dichlormethan (20 ml) gewaschen. Das Harz wurde im Hochvakuum getrocknet.

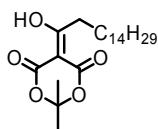
Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): Diketen β -Ketoamidsynthese^[98]

Das Harz (1 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan vorgequollen und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde trockenes Triethylamin (10 eq.) zugetropft gefolgt von einer langsamen Zugabe von Diketen (10eq.). Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur gebracht und für 12 h geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in einen Spritzenreaktor überführt, filtriert, dreimal mit DMF (10 ml), dreimal mit Methanol (10 ml) und dreimal mit Dichlormethan (10 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Harz verfärbte sich hierbei orange-rot.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV5): Synthese acylierter Meldrumsäure-Derivate aus Carbonsäuren^[91]

Die Carbonsäure (1 eq.) wurde in frisch destilliertem Dichlormethan gelöst und mit DCC (1 eq.) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 0 °C gerührt, bevor Meldrumsäure (1 eq.) und DMAP (1.5 eq.) zugesetzt wurden. Nach weiteren 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene unlösliche Harnstoff abfiltriert und das Filtrat wurde mit 1 M HCl (halbes Ansatzvolumen), H₂O (halbes Ansatzvolumen) und gesättigter NaCl-Lösung (halbes Ansatzvolumen) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und die entstandenen Produkte wurden über eine kurze Filtersäule (EE/CH = 1:2) aufgereinigt.

5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**92**)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.08-3.03 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂), 1.72 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.71-1.62 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂CH₂), 1.44-1.34 (m, 2H, CH₂), 1.25 (s, 22H, CH₂), 0.87 (t, J = 6.79 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 (C=C(OH)), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 104.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.5 (C=C(OH)), 36.0 (C=C(OH)CH₂), 32.1 (CH₂), 29.9-29.5 (11*CH₂), 29.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.4 (CH₂), 22.9 (CH₂), 14.3 (CH₃).

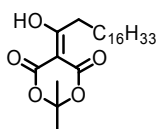
LC-MS: (C4) 380.04 [M-H]⁻; 11.6-11.83 min

HRMS (ESI): berechnet: 381.2647 [$\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 381.2645

R_f-Wert: 0.4; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 60 % (6.2 g, 16.2 mmol);

5-(1-Hydroxyoctadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**91**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.11-2.96 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂), 1.73 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.71-1.56 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂CH₂), 1.45-1.35 (m, 2H, CH₂), 1.35-1.21 (m, 26H), 0.88 (t, J = 6.86 Hz, 3H, CH₃).

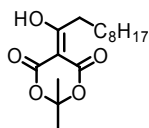
LC-MS: (C4) 409.00 [M-H]⁻; 11.83-12.11 min

HRMS (ESI): berechnet: 409.2960 [$\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 409.2958

R_f-Wert: 0.4; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 64 % (0.95 g, 2.3 mmol)

5-(1-Hydroxydeacyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**94**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.07-3.02 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂), 1.71 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.70-1.61 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂CH₂), 1.43-1.34 (m, 2H, CH₂), 1.34-1.20 (m, 10H, CH₂), 0.86 (t, J = 6.89 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 (C=C(OH)), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 105.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.5 (C=C(OH)), 36.0 (C=C(OH)CH₂), 32.1 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.4 (CH₂), 22.9 (CH₂), 14.3 (CH₂CH₃).

LC-MS: (C4) 296.87 [M-H]⁻; 10.27-10.59 min

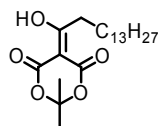
Experimenteller Teil

HRMS (ESI): berechnet: 297.1708 [C₁₆H₂₅O₅-H⁺]⁻, gefunden: 297.1695

R_f-Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 85 % (5.3 g, 17.7 mmol)

5-(1-Hydroxypentadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**93**)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.11-2.99 (m, 2H, C(OH)CH₂), 1.72 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.71-1.62 (m, 2H, (C(OH)CH₂CH₂)), 1.44-1.35 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.25 (s, 20H, CH₂), 0.87 (t, J = 6.85 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 198.5 (C=C(OH)), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 104.9 (C(CH₃)₂), 91.4 (C=C(OH)), 35.9 (C=C(OH)CH₂), 32.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (C(CH₃)₂), 27.0 (C(CH₃)₂), 26.4 (CH₂), 22.9 (CH₂CH₃), 14.3 (CH₃).

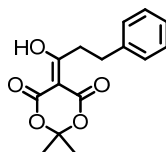
LC-MS: (C4) 366.93 [M-H]⁻; 11.27-11.69 min

HRMS (ESI): berechnet: 367.2490 [C₂₁H₃₅O₅-H⁺]⁻, gefunden: 367.2491

R_f-Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 47 % (1.2 g, 3.3 mmol)

5-(1-Hydroxy-3-phenylpropyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**95**)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38-7.04 (m, 5H, Phe), 3.53-3.49 (m, 2H, Benzyl), 3.13-3.10 (m, 2H, C(OH)CH₂), 1.76 (s, 6H, C(CH₃)₂)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 196.7 (C=C(OH)), 170.7 (COO), 160.4 (COO), 139.9 (phe), 128.8 (phe), 128.7 (phe), 128.7 (phe), 126.7 (phe), 105.1 (C(CH₃)₂), 92.1 (C=C(OH)), 37.4 (CH₂C(OH)), 32.2 (benzyl), 30.82 (C(CH₃)₂), 26.9 (C(CH₃)₂).

LC-MS: (C4) 274.79 [M-H]⁻; 8.73-9.07 min

HRMS (ESI): berechnet: 275.0922 [C₁₅H₁₅O₅-H⁺]⁻, gefunden: 275.0925

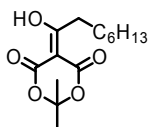
R_f-Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 65 % (2.4 g, 9.0 mmol)

Allgemeine Vorschrift 6: Darstellung von acylierten Meldrumsäure-Derivaten aus Carbonsäurechloriden^[110]

Meldrumsäure (1 eq.) wurde in frisch destilliertem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde trockenes Pyridin (2 eq.) getropft und der Ansatz wurde für 15 min gerührt. Dann wurde das entsprechende Säurechlorid zugetropft und die Reaktion wurde für weitere 1.5 h bei 0 °C und 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde dann mit 1 M HCl, H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt wurde über eine kurze Filtersäule (EE/CH 1:2) gereinigt.

5-(1-Hydroxyoctylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**98**)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.09-3.03 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂), 1.73 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.72-1.65 (m, 2H, C(OH)CH₂CH₂), 1.45-1.22 (m, 8H, 4*CH₂), 0.88 (t, J = 6.87 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 198.5 (C=C(OH)), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 105.0 (C(CH₃)₂), 91.5 (C=C(OH)), 36.0 (C=C(OH)CH₂), 31.8 (CH₂), 29.5 (C(CH₃)₂), 29.1 (CH₂), 27.0 (C(CH₃)₂), 26.4 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.3 (CH₂CH₃).

LC-MS: (C4)268.83 [M-H]⁻; 9.71-10.14 min

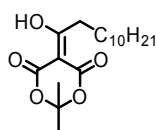
HRMS (ESI): berechnet: 269.1393 [C₁₄H₂₁O₅-H⁺], gefunden: 269.1395

R_f-Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 88 % (5 g, 18.5 mmol)

Experimenteller Teil

5-(1-Hydroxydodecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**97**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.05 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.72 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.70-1.62 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.43-1.34 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.25 (s, 14H, 7^*CH_2), 0.87 (t, $J = 6.84$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 104.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.4 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 36.0 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 32.1 (CH_2CH_2), 29.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 29.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 29.6 (CH_2CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 27.0 (CH_2), 26.4 (CH_2), 22.9 (CH_2), 14.3 (CH_2CH_3).

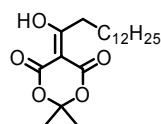
LC-MS: (C4) 324.88 [M-H] $^-$; 10.81-11.03 min

HRMS (ESI): berechnet: 325.2021 [$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 325.2019

R_f -Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 60 % (2.7 g, 8.3 mmol)

5-(1-Hydroxybutadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**96**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.09-3.04 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 1.73 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.73-1.65 (m, 2H, $(\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2)$), 1.46-1.35 (m, 2H, CH_2), 1.26 (s, 18H, 9^*CH_2), 0.88 (t, $J = 6.85$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

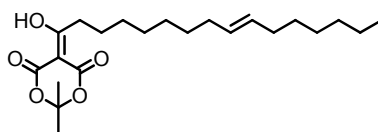
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 105.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 36.1 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 32.1 (CH_2), 29.9 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.8 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 29.3 (CH_2), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.4 (CH_2), 24.9 (CH_2), 22.9 (CH_2CH_3), 14.3 (CH_3).

LC-MS: (C4) 352.91 [M-H] $^-$; 11.17-11.52 min

HRMS (ESI): berechnet: 353.2334 [$\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 353.2329

R_f -Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 52 % (1.7 g, 4.8 mmol)

(E)-5-(1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (102)

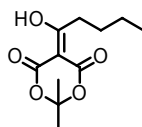
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.32 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.05 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.98 (s, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$), 1.72 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.67 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.30 (m, 16H, $8 \cdot \text{CH}_2$), 0.87 (t, $J=6.89$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 130.2 ($\text{CH}=\text{CH}$), 130.0 ($\text{CH}=\text{CH}$), 105.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 44.0 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 36.0 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})$), 32.0-22.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), CH_2CH_2 8-12 und 13-16), 14.3 (CH_3)

HRMS (ESI): berechnet: 381.2641 [$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5+\text{H}$] $^+$, gefunden: 381.2618

R_f -Wert: 0.3; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 54 % (0.8 g, 2.1 mmol)

5-(1-Hydroxypentyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (99)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.09-3.01 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.71 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.70-1.54 (m, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.42 (q, $J = 7.35$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.93 (t, $J = 7.34$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 198.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 104.965 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.5 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 35.7 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 28.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 22.7 (CH_2CH_3), 13.9 (CH_2CH_3).

LC-MS: (C4) 226.84 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; 8.7-8.79 min

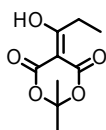
HRMS (ESI): berechnet: 227.0924 [$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_5-\text{H}^+$] $^+$, gefunden: 227.0925

R_f -Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 96 % (0.9 g, 3.9 mmol)

Experimenteller Teil

5-(1-Hydroxypropyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**100**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.10 (dq, $J = 7.42, 0.91$ Hz, 2H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.72 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.24 (dt, $J = 7.44, 0.93$ Hz, 3H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 199.2 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 170.8 (COO), 160.4 (COO), 105.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 91.1 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 29.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 9.9 (CH_2CH_3).

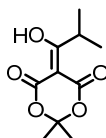
LC-MS: (C4) 198.83 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 7.47-7.80 min

HRMS (ESI): berechnet: 199.0612 $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_5-\text{H}^+]^-$, gefunden: 199.0612

R_f -Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 84 % (2.2 g, 11 mmol)

5-(1-Hydroxy-2-methylpropyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**106**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.09 (m, 1H, CH), 1.73 (s, 6H, $\text{CO}_2(\text{CH}_3)_2$), 1.23 (d, $J = 6.80$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

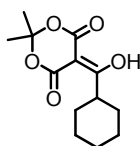
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 202.6 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 171.1 (COO), 160.2 (COO), 104.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 90.4 ($\text{C}=\text{C}(\text{OH})$), 33.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($2\text{O}_2\text{CCH}_3$), 19.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

LC-MS: (C4) 214.54 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.73-8.85 min

R_f -Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 43 % (1.2 g, 5.6 mmol)

5-(1-Cyclohexyl)hydroxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**103**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.85-3.72 (m, 1H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}$), 1.87-1.72 (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.71 (s, 2H, CH_2), 1.56-1.17 (m, 8H, 2^*CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 201.6 (C=C(OH)), 171.2 (COO), 160.2 (COO), 104.8 (C(CH₃)₂), 90.4 (C=C(OH)), 43.1(CH), 29.4 (C(CH₃)₂), 26.9 (C(CH₃)₂), 25.8 (CH₂), 25.7 (CH₂), 14.3 (CH₃).

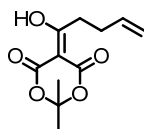
LC-MS: (C4) 252.85 [M-H]⁻; 9.08-9.49 min

HRMS (ESI): berechnet: 253.1082 [C₁₃H₁₇O₅-H⁺], gefunden: 253.108

R_f-Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 84 % (3.0 g, 11.8 mmol)

5-(1-Hydroxypent-4-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**101**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.85 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 5.06 (m, 2H (CH=CH₂), 3.26-3.11 (m, 2H, C(OH)CH₂), 2.66-2.29 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.73 (s, 6H, C(CH₃)₂)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 197.3 (C=C(OH)), 170.7(COO) , 160.4 (COO), 136.3 (CH₂CH=CH₂), 116.4 (CH₂CH=CH₂), 105.1 (C(CH₃)₂) , 91.8 (C=C(OH)), 35.2 (CH₂C(OH)), 30.0 (C(CH₃)₂), 27.0 ((C(CH₃)₂) und CH₂CH₂).

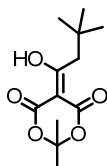
LC-MS: (C4) 224.79 [M-H]⁻; 8.22-8.54 min

HRMS (ESI): berechnet: 225.0769 [C₁₁H₁₃O₅-H⁺], gefunden: 225.0768

R_f-Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 67 % (2.1 g, 9.3 mmol)

5-(1-Hydroxy-3,3-dimethylbutyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**104**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.08 (s, 2H, C(OH)CH₂), 1.69 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.03 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Experimenteller Teil

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 197.0 (C=C(OH)), 170.7 (COO), 160.7 (COO), 104.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 93.2 (C=C(OH)), 46.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2), 30.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

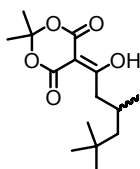
LC-MS: (C4) 240.85 [M-H]⁻; 8.96-9.37 min

HRMS (ESI): berechnet: 241.1082 [$\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 241.1079

R_f-Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 77 % (2.6 g, 10.7 mmol)

5-(1-Hydroxy-3,5,5-trimethylhexyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**105**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 2.98 (dd, $J=7.20, 2.53$ Hz, 1H), 2.31 (dd, $J=14.75, 5.70$ Hz, 1H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2$), 2.12 (m, 1H, $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}$), 1.69 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.20 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 0.97 (dd, $J=6.48, 4.42$ Hz, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 0.87 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 197.7 (C=C(OH)), 179.6 (COO), 160.5 (COO), 104.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 92.3 (C=C(OH)), 51.0 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 43.9 (C=C(OH) CH_2), 31.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.9 (CH), 22.8 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$).

LC-MS: (C4) 282.87 [M-H]⁻; 9.22-9.63 min

HRMS (ESI): berechnet: 283.1551 [$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{-H}^+$], gefunden: 283.1549

R_f-Wert: 0.2; EE/CH (1:2)

Ausbeute: 51 % (1.0 g, 3.5 mmol)

Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): β -Ketoamid-Bildung mit acylierten Meldrumsäure-Derivaten^[91]

Das jeweilige Harz (1 eq.) wurde in trockenem Toluol für 15 min vorgequollen. Dann wurde die Suspension mit der acylierten Meldrumsäure (6 eq.) versetzt und bei 80 °C für 3 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Harz dreimal mit Toluol (10 ml), dreimal mit Methanol (10 ml) und dreimal mit Dichlormethan (10 ml)

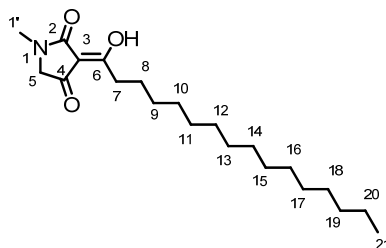
gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Harz verfärbte sich während der Reaktion gelb bis dunkel-orange.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Abspaltung und Zyklisierung der am Harz synthetisierten Tetransäuren^[91]

Das Harz (1 eq.) wurde in frisch destilliertem Dichlormethan für 15 min vorgequollen. Dann wurde das gleiche Volumen an trockenem Dioxan und eine 0.1 M KOH Lösung (1 eq.) (in trockenem Methanol) zugesetzt. Die entstandene Suspension wurde für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor das Harz abfiltriert und dreimal mit Dichlormethan/Methanol (je 10 ml) gewaschen wurde. Die gesammelten Waschfiltrate wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Kaliumsalz der Tetransäure wurde in Essigsäureethylester resuspendiert und mit 1 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die resultierenden Rohprodukte wurden mit präparativer HPLC aufgereinigt.

6.2.1 Synthetisierte Tetransäuren

(Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (Melophlin A **23**)



Nach **AAV1** wurde Wang-Harz mit Fmoc-Sarcosin beladen und entsprechend **AAV2** entschützt. Das resultierende sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Cyclisierung und Abspaltung nach **AAV8** lieferte nach Aufreinigung durch präparative HPLC (C4-Säule) Melophlin A als weißen amorphen Feststoff (60 mg, 55 %, 0.17 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.74 (s, 2H, CH₂ 5), 3.01 (s, 3H, CH₃ 1'), 2.86-2.77 (m, 2H, CH₂ 7), 1.83-1.53 (m, 2H, CH₂ 8), 1.41-1.33 (m, 2H, CH₂ 9), 1.34-1.16 (m, 24H, CH₂ 10-20), 0.87 (t, J = 6.88 Hz, 3H, CH₃ 21).

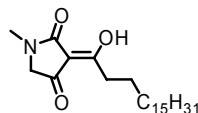
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 191.8 (C2), 188.4 (C6), 173.8 (C4), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 33.0 (C1'), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-20), 14.3 (C21).

LC-MS: (C4) 352.26 [M+H]⁺; 11.88 min

Experimenteller Teil

HRMS (ESI): berechnet $[C_{21}H_{38}O_3N+H^+]$: 352.2846, gefunden: 352.2843

(Z)-3-(1-Hydroxyoctadecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**108**)



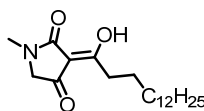
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyoctadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als orange-farbenen amorphen Feststoff (45 mg, 32 %, 0.12 mmol).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.64 (s, 2H, CH_2 5), 2.94 (s, 3H, CH_3 1'), 2.74 (t, J = 7.56 Hz, 2H, CH_2 7), 1.58 (td, J = 14.31, 7.24 Hz, 2H, CH_2 8), 1.34-1.13 (m, 26H, CH_2 10-22), 0.81 (t, J = 6.84 Hz, 3H, CH_3 23).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 191.5 (C2), 187.6 (C6), 173.7 (C4), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 32.8 (C1'), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-C22), 14.3 (C23).

LC-MS: (C4) 380.24 $[M+H]^+$; 12.21 min

(Z)-3-(1-Hydroxypentadecylidene)-1-methylpyrrolidin-2,4dion (**128**)



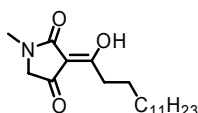
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxypentadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (34 mg, 56 %, 0.1 mmol).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.74 (s, 2H, CH_2 5), 3.01 (s, 3H, CH_3 1'), 2.81 (m, 2H, CH_2 7), 1.64 (m, 2H, CH_2 8), 1.26 (s, 22H, CH_2 9-19), 0.86 (t, J =6.88 Hz, 3H, CH_3 20).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 191.9 (C2), 188.7 (C6), 173.8 (C4), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 33.1 (C1'), 32.1 (C7), 30.0-22.9 (C8-C19), 14.3 (C20).

LC-MS: (C4) 338.47 $[M+H]^+$; 11.79 min

HRMS (ESI): berechnet: 338.2690 $[C_{20}H_{35}O_3N+H^+]$, gefunden: 338.2722

(Z)-3-(1-Hydroxytetradecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**110**)

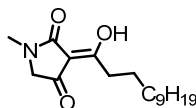
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxybutadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als weißen amorphen Feststoff (4 mg, 23 %, 0.012 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.73 (s, 2H, CH_2 5), 3.03 (s, 3H, CH_3 1'), 2.86-2.80 (m, 2H, CH_2 7), 1.71-1.61 (m, 2H, CH_2 8), 1.45-1.22 (m, 20H, CH_2), 0.89 (t, J = 6.88 Hz, 3H, CH_3 19).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.8 (C2), 188.4 (C6), 173.8 (C4), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 33.0 (C1'), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-20), 14.3 (C21).

LC-MS: (C4) 324.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.32 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 324.2533, gefunden: 324.2533

(Z)-3-(1-Hydroxydodecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**111**)

Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydodecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als rötliches Öl (77 mg, 26 %, 0.26 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, CH_2 5), 3.01 (s, 3H, CH_3 1'), 2.90-2.69 (m, 2H, CH_2 7), 1.82-1.50 (m, 2H, CH_2 8), 1.45-1.14 (m, 18H, CH_2 9-14), 0.87 (t, J = 6.89 Hz, 3H, CH_3 15).

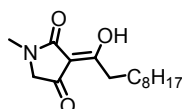
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.5 (C2), 187.8 (C6), 173.8 (C4), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 32.8 (C1'), 32.1 (C7), 29.8-22.9 (C8-14), 14.3 (C15).

LC-MS: (C4) 296.31 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.67 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 296.2220, gefunden: 296.2221

Experimenteller Teil

(Z)-3-(1-Hydroxydecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**112**)



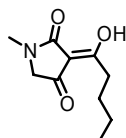
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als weißen amorphen Feststoff (9 mg, 42%, 0.05 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, CH_2), 3.01 (s, 3H, NCH_3), 2.81 (t, $J = 7$ Hz, 2H, CH_2 7), 1.70-1.60 (m, 2H, CH_2 8) 1.36-1.25 (m, 12H, CH_2 9-14), 0.87 (t, $J = 7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.2 (C2), 187.6 (C6), 173.5 (C4), 101.6 (C3), 57.6 (C5), 32.6 (C7), 31.8- 29.1 (C8-C12), 28.3 (C1'), 25.9 (C13), 22.6 (C14), 14.0 (C15).

HRMS (FAB) berechnet: $[\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_3+\text{H}]^+$; 268.1834, gefunden: 268.1890.

(Z)-3-(1-Hydroxypentyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**113**)

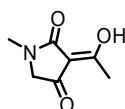


Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxypentyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als rotes Öl (9 mg, 43 %, 0.045 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, CH_2), 3.00 (s, 3H, NCH_3), 2.92 (t, $J = 7$ Hz, 2H, CH_2 7), 1.67-1.59 (m, 2H, CH_2 8), 1.44-1.37 (m, 2H, CH_2 9), 0.92 (t, $J = 7\text{Hz}$, 3H, CH_3 10).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.2 (C2), 187.5 (C6), 173.5 (C4), 101.6 (C3), 57.6 (C5), 32.3 (C7), 28.0 (C1'), 22.32 (C8, 9), 13.6 (C10).

HRMS (FAB): berechnet $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3+\text{H}]^+$: 198.1052, gefunden: 198.1126.

(Z)-3-(1-Hydroxyethyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**114**)

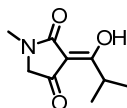
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (14 mg, 34 %, 0.09 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.72 (s, 2H, CH_2), 3.01 (s, 3H, NCH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.5 (C2), 183.4 (C6), 173.2 (C4), 102.2 (C3), 57.6 (C5), 28.3 (C1'), 19.4 (C7).

MALDI-TOF/MS: berechnet $[\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3+\text{H}]^+$: 156.17, gefunden: 156.38.

HRMS (FAB): berechnet $[\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3+\text{H}]^+$: 156.0582, gefunden: 156.0615.

(Z)-3-(1-Hydroxy-2-methylpropyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**115**)

Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxy-2-methylpropyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellgelbes Öl (10 mg, 35 %, 0.055 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.70 (s, 2H, CH_2 5), 3.66 (dq, J = 13.73, 6.88 Hz, 1H, CH), 3.01 (s, 3H, NCH_3), 1.18 (d, J = 6.88 Hz, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

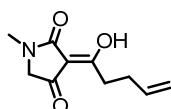
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.2 (C2), 191.2 (C6), 174.2 (C4), 100.3 (C3), 57.9 (C5), 31.2 (C 1'), 28.6 (C7), 18.9 (2 CH_3).

LC-MS: (C4) 183.96 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 7.69 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}+\text{H}]^+$: 184.0967, gefunden: 184.0968

Experimenteller Teil

(Z)-3-(1-Hydroxypent-4-enyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**116**)



Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxypent-4-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als oranges Öl (18 mg, 35 %, 0.09 mmol).

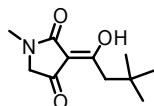
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.82 (tdd, J = 16.85, 10.18, 6.59 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.08 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.00 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.72 (s, 2H, CH_2 5), 3.01 (s, 3H, CH_3 1'), 2.96-2.90 (m, 2H, CH_2 7), 2.42 (m, 2H, CH_2 8).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.4 (C2), 186.5 (C6), 173.6 (C4), 136.4 (C9), 116.2 (C10), 102.1 (C3), 57.9 (C5), 32.1 (C1'), 29.8 (C7), 28.6 (C8).

LC-MS: (C4) 195.91 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 7.85 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 196.0968, gefunden: 196.0966

(Z)-3-(1-Hydroxy-3,3-dimethylbutyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**117**)



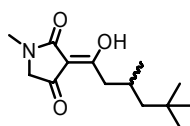
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxy-3,3-dimethylbutyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (9 mg, 16 %, 0.04 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.72 (s, 2H, CH_2 5), 3.02 (s, 3H, CH_3 1'), 2.75 (s, 2H, CH_2 7), 1.05 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 186.3 (C2), 181.9 (C6), 168.3 (C4), 103.2 (C3), 57.8 (C5), 33.8 (C1'), 30.0 (C7), 28.5 (C8), 25.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

LC-MS: (C4) 211.88 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.80 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 212.1281, gefunden: 212.1281

(Z)-3-(1-Hydroxy-3,5,5-trimethylhexyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**118**)

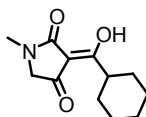
Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene sekundäre Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxy-3,5,5-trimethylhexyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellgelbes Öl (40 mg, 34 %, 0.16 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.73 (s, 2H, CH_2 5), 3.03 (s, 3H, CH_3 1'), 2.95-2.61 (m, 2H, CH_2 7), 2.23-1.93 (m, 1H, CH 8), 1.25 (m, 2H, CH_2 9), 1.01 (t, J = 6.28 Hz, 3H, CH_3), 0.92 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.8 (C2), 187.3 (C6), 174.1 (C4), 103.0 (C3), 58.2 (C5), 51.2 (C9), 42.1 (C7), 31.7 (C10), 30.5 (C8), 28.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.0 (CH_3).

LC-MS: (C4) 254.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.42 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 254.1751, gefunden: 254.1752

(Z)-3-(Cyclohexyl)hydroxymethylen)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**119**)

Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als oranges Öl (22 mg, 32 %, 0.1 mmol).

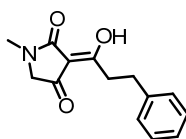
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.74-3.65 (m, 2H, CH_2 5), 3.39 (tt, J = 11.65, 3.29 Hz, 1H, CH), 3.01 (s, 3H, CH_3 1'), 1.95-1.63 (m, 4H, CH_2), 1.52 (ddd, J = 15.51, 12.80, 3.51 Hz, 2H, CH_2), 1.45-1.32 (m, 2H, CH_2), 1.23 (m, 2H, CH_2).

LC-MS: (C4) 224.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.81 min

HRMS (ESI): berechnet: 224.1281 $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 224.1280

Experimenteller Teil

(Z)-3-(1-Hydroxy-3-phenylpropyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**120**)



Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxy-3-phenylpropyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (20 mg, 27 %, 0.082 mmol).

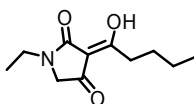
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.28 (m, 4H, ar.), 7.19 (m, 1H, ar.), 3.69 (s, 2H, CH_2 5), 3.14 (m, 1H, benz.), 3.00 (s, 3H, CH_3 1''), 2.96 (m, 1H, benz.).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.3 (C2), 186.0 (C6), 173.6 (C4), 140.2 (ar.), 128.7 (ar.), 128.6 (ar.), 126.6 (ar.), 102.1 (C3), 57.9 (C5), 34.5 (benz.), 31.9 (benz.), 28.6 (C1').

LC-MS: (C4) 344.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.47 min

HRMS (ESI): berechnet: 246.1125 $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 246.1107

(Z)-1-Ethyl-3-(1-hydroxypentyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**121**)



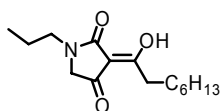
Die Fmoc-Gruppe wurde gemäß **AAV2** von Fmoc-Glycin-beladenem Harz abgespalten. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxypentyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellgelbes Öl (8 mg, 31 %, 0.04 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.65 (s, 2H, CH_2 5), 3.43 (q, $J = 7.28$ Hz, 2H, CH_2 1'), 2.79-2.73 (m, 2H, CH_2 7), 1.61-1.53 (m, 2H, CH_2 8), 1.34 (m, 2H, CH_2 9), 1.13 (t, $J = 7.28$ Hz, 3H, CH_3 2'), 0.86 (t, $J = 7.33$ Hz, 3H, CH_3 10).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.2 (C2), 187.7 (C6), 167.7 (C4), 101.6 (C3), 54.6 (C5), 35.9 (C1'), 32.2 (C7), 27.8 (C8), 22.1 (C9), 13.5 (C10), 12.5 (C2').

LC-MS: (C4) 212.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.69 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 212.12812, gefunden: 212.12803

(Z)-3-(1-Hydroxyoctylden)-1-propylpyrrolidin-2,4-dion (**122**)

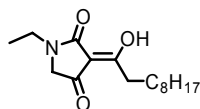
Die Fmoc-Gruppe wurde gemäß **AAV2** von Fmoc-Glycin-beladenem Harz abgespalten. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit Propanal reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyoctylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (7 mg, 29 %, 0.025 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, CH_2 , 5), 3.50 (q, $J = 7.28$, 7.28, 7.28 Hz, 2H, CH_2 , 1'), 2.86-2.77 (m, 2H, CH_2 , 7), 2.17 (s, 1H, OH), 1.73-1.59 (m, 2H, CH_2 , 8), 1.45-1.23 (m, 10H, CH_2 , 2', 9-12), 1.20 (t, $J = 7.28$, 7.28 Hz, 3H, CH_3 , 3'), 0.88 (t, $J = 6.89$, 6.89 Hz, 3H, CH_3 13).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.4 (C2), 188.1 (C6), 173.4 (C4), 102.0 (C3), 55.0 (C5), 36.1 (C1'), 32.7 (C7), 31.9 (C2'), 29.4 (C8), 29.3 (C9), 29.2 (C10), 26.0 (C11), 22.7 (C12), 14.1 (C13), 12.8 (C3').

LC-MS: (C4) 282.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.55 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 282.20637, gefunden: 282.20639

(Z)-1-Ethyl-3-(1-Hydroxydecylden)pyrrolidin-2,4-dion (**123**)

Die Fmoc-Gruppe wurde gemäß **AAV2** von Fmoc-Glycin-beladenem Harz abgespalten. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydecylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Wachs (13 mg, 41 %, 0.049 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.70 (s, 2H, CH 5), 3.49-3.32 (m, 2H, CH_2 1'), 2.91-2.69 (m, 2H, CH_2 7), 1.84-1.49 (m, 2H, CH_2 , 8), 1.47-1.15 (m, 8H, CH_2 9-12), 0.94 (t, $J = 7.40$ Hz, 3H, CH_3 2'), 0.87 (t, $J = 6.92$ Hz, 3H, CH_3 13).

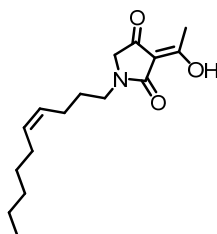
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.7 (C2), 188.2 (C6), 173.8 (C4), 101.9 (C3), 55.6 (C5), 43.3 (C1'), 32.0 (C7), 29.4 (C8), 29.1 (C9), 26.2 (C10), 22.8 (C11), 21.1 (C12), 14.3 (C13), 11.4 (C2').

Experimenteller Teil

LC-MS: (C4) 268.17 [M+H]⁺; 10.30 min

HRMS (ESI): berechnet [C₁₅H₂₆O₃N+H⁺]: 268.19072, gefunden: 268.19008

(Z)-1-((Z)-Dec-4-enyl)-3-(1-hydroxyethyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**124**)



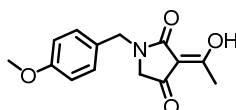
Die Fmoc-Gruppe wurde gemäß **AAV2** von Fmoc-Glycin-beladenem Harz abgespalten. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit cis Dec-4-enal reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als rötliches Öl (20 mg, 11 %, 0.07 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.45-5.12 (m, 2H, CH=CH), 3.64 (s, 2H, CH₂ 5), 3.40-3.33 (m, 2H, CH₂ 1'), 2.37 (s, 3H, CH₃ 7), 1.97 (m, 4H, CH₂, C3', C6'), 1.62-1.51 (m, 2H, CH₂ C2'), 1.31-1.16 (m, 6H, CH₂, C7'-9'), 0.82 (t, J = 6.96 Hz, 3H, CH₃, C10').

LC-MS: (C4) 280.02 [M+H]⁺; 10.24 min

HRMS (ESI): berechnet [C₁₆H₂₆O₃N+H⁺]: 280.1907, gefunden: 280.1907

(Z)-3-(1-Hydroxyethyliden)-1-(4-methoxybenzyl)pyrrolidin-2,4-dion (**125**)



Fmoc-Glycin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit p-Methoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als oranges Öl (37 mg, 33 %, 0.14 mmol).

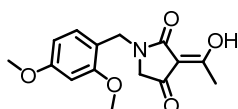
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.11 (d, J = 8.73 Hz, 2H, ar.), 6.81 (d, J = 8.70 Hz, 2H, ar.), 4.47 (s, 2H, benz.), 3.73 (s, 2H, OCH₂), 3.52 (s, 2H, CH₂ 5), 2.37 (s, 3H, CH₃ 7).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.8 (C2), 184.0 (C6), 173.1 (C4), 159.7 (COCH_3), 129.8 (ar.), 127.5 (ar.), 114.6 (ar.), 102.6 (C3), 55.5 (C5), 55.1 (OCH_3), 45.0 (benz.), 19.7 (C7).

LC-MS: (C4) 261.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.44 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4+\text{H}^+]$: 262.1074, gefunden: 262.1074

(Z)-1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-3-(1-hydroxyethyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**126**)



Die Fmoc-Gruppe wurde gemäß **AAV2** von Fmoc-Glycin-beladenem Harz abgespalten. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Wachs (45 mg, 36 %, 0.16 mmol).

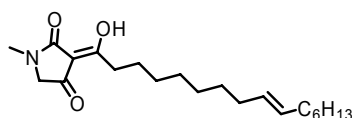
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.16 (d, J = 8.90 Hz, 1H, ar.), 6.48-6.43 (m, 2H, ar.), 4.55 (s, 2H, benzyl.), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.64 (s, 2H, CH_2 5), 2.42 (s, 3H, CH_3 7).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.5 (C2), 183.7 (C6), 173.1 (C4), 161.2 (COCH_3), 158.8 (COCH_3), 131.5 (ar.), 116.1 (ar.), 104.6 (ar.), 102.8 (C3), 98.8 (ar.), 56.0 (C5), 55.6 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 40.2 (benzyl.), 19.7 (C7).

LC-MS: (C4) 291.80 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.57 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}+\text{H}^+]$: 292.1180, gefunden: 292.1180

(Z)-3-((E)-1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**109**)



Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit (E)-5-(1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (5 mg, 5 %, 0.014 mmol).

Experimenteller Teil

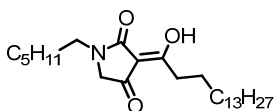
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.35 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.73 (s, 2H, CH_2 5), 3.03 (s, 3H, CH_3 1''), 2.83 (m, 2H, CH_2 7), 2.00 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.67 (td, J = 15.19, 7.65 Hz, 2H, CH_2 8), 1.35 (s, 20H, CH_2 9-11 und 16-19), 0.90 (t, J = 6.68 Hz, 3H, CH_3 20).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 187.7 (C2), 173.8 (C6), 169.6 (C4), 130.2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 130.0 ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 32.8 (C1'), 32.0 (C7), 29.9-22.9 (C8-C12 und C15-19), 14.3 (C20).

LC-MS: (C4) 350.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.55 min

HRMS (ESI): berechnet: 350.2690 $[\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$; gefunden: 350.2708

(Z)-1-Hexyl-3-(1-hydroxyhexadecyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**127**)



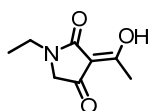
Fmoc-Glycin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Hexanal reduktiv alkyliert und anschließend nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Wachs (19 mg, 16 %, 0.045 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.70 (s, 2H, CH_2 5), 3.41 (m, 2H, CH_2 1'), 2.81 (m, 2H, CH_2 7), 1.64 (m, 2H, CH_2 8), 1.55 (m, 2H, CH_2 2'), 1.33 (s, 10H, 5 CH_2), 1.24 (s, 22H, CH_2), 0.88 (m, 6H, CH_3 21 und 6').

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.8 (C2), 188.4 (C6), 173.7 (C4), 101.0 (C3), 55.6 (C5), 41.7 (C1'), 33.0 (C7), 32.1-22.7 (C8-C20 und C2'-C5'), 14.3 (C6'), 14.2 (C21).

LC-MS: (C4) 422.47 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.65 min

HRMS (ESI): berechnet: 422.3629 $[\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$; gefunden: 422.3661

(Z)-1-Ethyl-3-(1-Hydroxyethyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**129**)

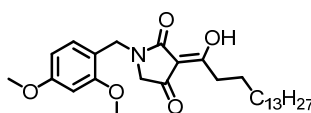
Fmoc-Glycin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (13 mg, 22 %, 0.076 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 2H, CH_2 5), 3.49 (q, J = 7.28 Hz, 2H, CH_2 1'), 2.43 (m, 3H, CH_3), 1.19 (t, J = 7.28 Hz, 3H, CH_3 2').

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.9 (C2), 184.0 (C6), 173.1 (C4), 102.7 (C3), 55.1 (C5), 36.3 (C1'), 19.7 (C7), 13.0 (C2').

LC-MS: (C4) 170.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 6.69-6.84 min

HRMS (ESI): berechnet: 170.0812 $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 170.0840

(Z)-1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-3-(1-hydroxyhexadecyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**130**)

Fmoc-Glycin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes, wachsartiges Öl (38 mg, 30 %, 0.078 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.16 (d, J =8.90 Hz, 1H, ar.), 6.42 (m, 2H, ar.), 4.55 (s, 2H, benz.), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.64 (s, 2H, CH_2 5), 2.80 (m, 2H, CH_2 7), 1.64 (m, 2H, CH_2 8), 1.29 (m, 30H, CH_2 9-20), 0.88 (t, J = 6.87 Hz, 3H, CH_3 21).

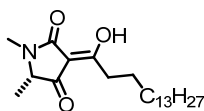
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.3 (C2), 188.2 (C6), 173.5 (C4), 161.2 (ar.), 158.9 (ar.), 131.6 (ar.), 116.2 (ar.), 104.7 (ar.), 102.1 (C3), 98.8 (ar.), 55.9 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 55.6 (C5), 40.2 (benzyl.), 33.0 (C1'), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-C20), 14.3 (C21).

Experimenteller Teil

LC-MS: (C4) 488.28 [M+H]⁺; 12.23 min

HRMS (ESI): berechnet: 486.3181 [C₂₉H₄₅O₅N-H⁺], gefunden: 486.3220

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-1,5-dimethylpyrrolidin-2,4-dion (**131**)



(s)-N-Fmoc-N-(Methyl)-Alanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als weißen amorphen Feststoff (27 mg, 44 %, 0.073 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.72-3.60 (m, 1H, CH 5), 2.96 (s, 3H, CH₃ 1''), 2.86-2.73 (m, 2H, CH₂ 7), 1.71-1.57 (m, 2H, CH₂ 8), 1.34 (d, J = 6.99 Hz, 3H, CH₃ 1'), 1.2 (m, 22H, CH₂ 9-24), 0.87 (t, J = 6.88 Hz, 3H, CH₃ 21).

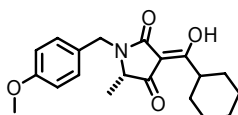
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.8 (C2), 188.1 (C6), 173.1 (C4), 100.7 (C3), 62.9 (C5), 32.8 (C1''), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-C20), 15.0 (C1'), 14.3 (C21).

LC-MS: (C4) 366.52 [M+H]⁺; 12.11 min

HRMS (ESI): berechnet: 366.3003 [C₂₂H₃₉O₃N+H⁺], gefunden: 366.2992

[α]_D²⁰ = -229.0° (c=0.79, CHCl₃)

(s,Z)-1-(4-Methoxybenzyl)-3-(cyclohexyl(hydroxy)methylen)-5-methylpyrrolidin-2,4-dion (**132**)



(s)-N-Fmoc-Alanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit p-Methoxybenzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbliches Öl (22 mg, 9 %, 0.06 mmol).

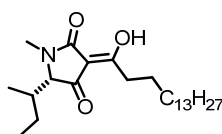
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.16-7.02 (m, 2H, ar.), 6.97-6.61 (m, 2H, ar.), 4.96 (d, J = 15.02 Hz, 1H, benz.), 4.00 (d, J = 14.97 Hz, 1H, benz.), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.54 (q, J = 6.98 Hz, 1H, CH 5), 3.31 (tt, J = 11.64, 3.23 Hz, 1H, CH), 1.85-1.60 (m, 6H, CH_2), 1.54-1.38 (m, 2H, CH_{21}), 1.36-1.09 (m, 6H, CH_2 , CH_3 1').

LC-MS: (C4) 343.95 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.23 min

HRMS (ESI): berechnet: 343.1778 $[\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 343.1754

$[\alpha]^{20} = -36.0^\circ$ (c=0.1, CHCl_3)

(s,Z)-5-sec-Butyl-3-(1-hydroxyhexadecyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**133**)



(s)-*N*-Fmoc-*N*-(Methyl)-Isoleucin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als leicht rötliches Öl (9 mg, 15 %, 0.022 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.61 (d, J =3.04 Hz, 1H, CH 5), 2.95 (s, 3H, CH_3 C''), 2.75 (m, 2H, CH_2 7), 1.93 (m, 1H, CH 2'), 1.57 (m, 4H, CH_2 8 und 2'), 1.27 (m, 22H, CH_2 9-20), 0.96 (t, J =7.43 Hz, 3H, CH_3CH), 0.82 (s, 6H, CH_3 21 und 3').

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.3 (C2), 187.2 (C6), 173.8 (C4), 102.3 (C3), 70.4 (C5), 35.8 (C1''), 32.7 (CHCH_2CH_3), 32.1 (C7), 29.9 (CH_2CH_3), 29.9-22.9 (C8-C20), 14.3 (CH_3CH), 14.1 (C21), 12.5 (C3').

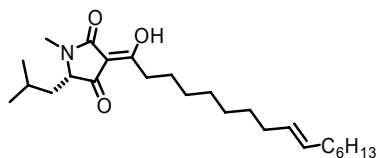
LC-MS: (C4) 408.53 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.48 min

HRMS (ESI): berechnet: 408.3472 $[\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 408.3502

$[\alpha]^{20} = -15.0^\circ$ (c=0.93, CHCl_3)

Experimenteller Teil

(*S,Z*)-3-((*E*)-1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-5-isobutyl-1-methylpyrrolidin-2,4-dion
(**134**)



(*S*)-*N*-Fmoc-*N*-(Methyl)-Leucin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit (*E*)-5-(1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (6 mg, 16 %, 0.015 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.41-5.31 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.68 (dd, $J = 6.49$, 4.65 Hz, 1H, CH 5), 2.99 (s, 3H, CH_3 1''), 2.86-2.80 (m, 2H, CH_2 7), 2.02 (m, 4H, CH_2 10 und 13), 1.86 (m, 1H, CH 2'), 1.77-1.59 (m, 4H, CH_2 8 und 1'), 1.42-1.23 (m, 12H, CH_2 9 und 13-17), 1.03-0.67 (m, 9H, CH_3 18 und 2*3').

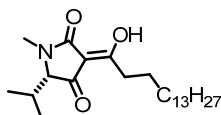
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.4 (C2), 187.8 (C6), 179.1 (C4), 130.2 (C11), 130.0 (C12), 101.8 (C3), 57.9 (C5), 32.8 (C1''), 32.0 (C7), 29.9 (C1'), 29.9 (C13), 29.4 (C10), 29.3 (C8), 29.2 (C9), 28.6 (C14), 27.4 (C15), 27.4 (C16), 26.2 (C17), 22.9 (2* CH_3 3'), 14.3 (CH_3 18).

LC-MS: (C4) 406.40 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.27 min

HRMS (ESI): berechnet: 406.3316 $[\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 406.3313

$[\alpha]^{20} = -32.6^\circ$ (c=0.38, CHCl_3)

(*S,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-isopropyl-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**135**)



(*S*)-*N*-Fmoc-*N*-(Methyl)-Valin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (30 mg, 51 %, 0.076 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.52 (d, $J=2.95$ Hz, 1H, CH 5), 2.97 (s, 3H, CH_3 C1''), 2.79 (m, 2H, CH_2 7), 2.24 (m, 1 H, CH 2'), 1.62 (td, $J=15.21$, 7.51 Hz, 2H, CH_2 8), 1.30 (m, 22H, CH_2 9-20), 1.07 (d, $J=7.02$ Hz, 3H, CH_3 2'), 0.91 (d, $J=7.07$ Hz, 3H, CH_3 2'), 0.85 (m, 3H, CH_3 21).

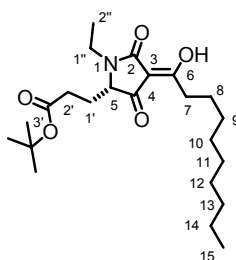
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.3 (C2), 187.3 (C6), 173.9 (C4), 102.1 (C3), 71.6 (C5), 32.7 (C1''), 32.1 (C7), 29.9 ($\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$), 27.5-22.9 (C8-C20), 17.5 (CHCH_3), 17.3 (CHCH_3), 14.3 (CH_3 21).

LC-MS: (C4) 394.49 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.36 min

HRMS (ESI): berechnet: 394.3316 $[\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 394.3349

$[\alpha]^{20} = -266.0^\circ$ (c=0.9, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxydecylden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**136**)



(s)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydecylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (15 mg, 43 %, 0.037 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.87-3.70 (m, 2H, CH_2 1'', CH), 3.05 (m, 1H, CH_2 1''), 2.74 (m, 2H, CH_2 7), 2.22-2.08 (m, 3H, CH_2 2', CH_2 1''), 1.96-1.85 (m, 1H, CH_2 1'), 1.66-1.51 (m, 2H, CH_2 8), 1.36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34-1.16 (m, 10H, CH_2 9-15), 1.13 (t, $J = 7.23$ Hz, 3H, CH_3 2''), 0.81 (t, $J = 6.89$, 6.89 Hz, 3H, CH_3 15).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.3 (C2), 188.5 (C6), 173.4 (C4), 172.1($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 101.5 (C3), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 62.9 (C5), 34.4 (C1''), 33.0 (C7, C2'), 32.1($\text{CH}_2\text{COO}t\text{-butyl}$), 29.6-23.9 (C8-C14 und $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.9 (C1'), 14.3 (C15), 13.1 (C2'').

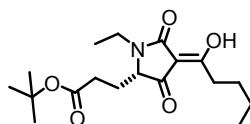
LC-MS: (C4) 409.82 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.37 min

Experimenteller Teil

HRMS (ESI): berechnet $[C_{23}H_{40}O_5N+H^+]$: 412.9010, gefunden: 410.2899

$[\alpha]^{20} = -15.0^\circ$ (c = 0.9, $CHCl_3$)

(S,Z)-3-(1-Hydroxypentyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**137**)



(S)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydecylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (12 mg, 37 %, 0.035 mmol).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.78 (m, 3H, CH_2 1'', CH), 3.04 (m, 1H, CH_2 1''), 2.80-2.69 (m, 2H, CH_2 7), 2.24-2.06 (m, 3H, CH_2 2', CH_2 1'), 1.99-1.85 (m, 1H, CH_2 1'), 1.57 (dt, $J = 15.41, 7.62$ Hz, 2H, CH_2 8), 1.43-1.28 (m, 11H, *t*butyl, CH_2 9), 1.13 (t, $J = 7.24$ Hz, 3H, CH_3 C2''), 0.87 (t, $J = 7.34$ Hz, 3H, CH_3 C10).

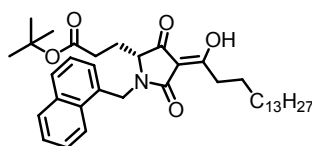
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 194.3 (C2), 188.4 (C6), 173.4 (C4), 172.0 (COO *t*-butyl), 101.5 (C3), 81.0 ($C(CH_3)_3$), 62.9 (C5), 34.4 (C1''), 32.7 (C7, C2'), 29.3 (CH_2COO *t*-butyl), 28.3 (*t*-butyl, C8), 23.9 (C9), 22.6 (C1'), 13.9 (C10), 13.1 (C2'').

LC-MS: (C4) 339.99 $[M+H]^+$; 10.15 min

HRMS (ESI): berechnet $[C_{18}H_{30}O_5N+H^+]$: 340.2119, gefunden: 340.2116

$[\alpha]^{20} = 30.0^\circ$ (c = 0.1, $CHCl_3$)

(S,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-naphthylpyrrolidin-2,4-dion (**138**)



(S)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Naphthylaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative

HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (86 mg, 30 %, 0.14 mmol).

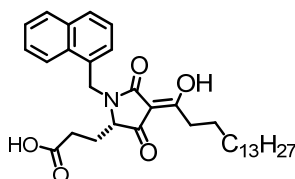
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.07 (t, $J = 6.76$ Hz, 1H, ar.), 7.78 (td, $J = 13.19, 6.54$ Hz, 2H, ar.), 7.47 (m, 2H, ar.), 7.36 (m, 2H, ar.), 5.63 (d, $J = 14.99$ Hz, 1H, benz.), 4.39 (d, $J = 14.96$ Hz, 1H, benz.), 3.34 (m, 1H, CH), 2.74 (m, 2H, CH_2 7), 2.03 (m, 4H, CH_2 1', CH_2 2'), 1.60 (m, 2H, CH_2 8), 1.35 (s, 9H, *t*butyl, CH_2 9), 1.20 (m, 28H, CH_2 10-20), 0.81 (t, $J = 6.81$ Hz, 3H, CH_3 21).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.1 (C2), 188.5 (C6), 173.2 (C4), 172.0 (COO*t*butyl), 134.2 (ar.), 131.6 (ar.), 130.9 (ar.), 129.5 (ar.), 129.1 (ar.), 128.1 (ar.), 127.2 (ar.), 126.4 (ar.), 125.4 (ar.), 123.6 (ar.), 101.6 (C3), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 63.0 (C5), 41.5 (C1''), 32.9 (C7, C2'), 32.1 ($\text{CH}_2\text{COO}t\text{-butyl}$), 31.1-22.9 (C8-C20, C1' und *t*-butyl), 14.3 (C21).

LC-MS: (C4) 606.04 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 550.23 $[\text{M}-t\text{butyl}+1]^+$; 1.88 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 606.4153 gefunden: 606.4149

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-propanoat-1-naphthylpyrrolidin-2,4-dion (**139**)



(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-naphthylpyrrolidin-2,4-dion wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und mit TFA (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit Toluol koevaporiert. Die Titelverbindung wurde nach Aufreinigung durch präparative HPLC (C4-Säule) als gelblicher amorpher Feststoff erhalten (6 mg, 69 %, 0.011 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.11 (d, $J = 8.23$ Hz, 1H, ar.), 7.94-7.78 (m, 2H, ar.), 7.72-7.48 (m, 2H, ar.), 7.46-7.32 (m, 2H, ar.), 5.71 (d, $J = 14.93$ Hz, 1H, benz.), 4.47 (d, $J = 14.99$ Hz, 1H, benz.), 3.44 (dd, $J = 6.61, 2.89$ Hz, 1H, CH), 2.87-2.74 (m, 2H, CH_2 7), 2.46-2.12 (m, 2H, CH_2 2'), 2.13-2.00 (m, 2H, CH_2 1'), 1.76-1.57 (m, 2H, CH_2 8), 1.46-1.14 (m, 24H, CH_2 9-20), 0.88 (t, $J = 6.85$ Hz, 3H, CH_3 21).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 193.9 (C4), 176.3 (C6), 173.2 (C2), 159.1 (COOH), 134.2 (ar.), 130.7 (ar.), 129.6 (ar.), 129.1 (ar.), 127.3 (ar.), 125.4 (ar.), 123.5 (ar.), 101.3 (C3), 62.6 (C5), 41.7 (C1''), 33.0 (C7, C2), 32.1 (CH_2COOH), 29.9- 22.9 (C8-C20, C1'), 14.3 (C21).

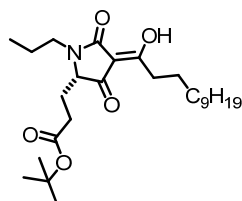
Experimenteller Teil

LC-MS: (C4) 550.39 [M+H]⁺; 11.79 min

HRMS (ESI): berechnet [C₃₄H₄₈O₅N+H⁺]: 550.3527, gefunden: 550.3522

[α]²⁰ = -15.0° (c = 0.1, CHCl₃)

(S,Z)-3-(1-Hydroxydodecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-propylpyrrolidin-2,4-dion
(140)



(S)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Propanal reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxydodecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als rötliches Öl (28 mg, 16 %, 0.07 mmol).

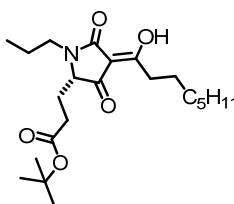
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.83-3.77 (m, 1H, CH 5), 3.77-3.68 (m, 1H, CH₂ 1''), 3.05-2.86 (m, 1H, CH 1''), 2.85-2.72 (m, 2H, CH₂ 7), 2.34-2.06 (m, 3H, CH₂ 1' und CH₂ 2'), 2.05-1.84 (m, 1H, CH₂ 1'), 1.70-1.58 (m, 2H, CH₂ 8), 1.59-1.47 (m, 2H, CH₂ 2''), 1.41 (s, 9H, *t*-butyl), 1.39-1.31 (m, 2H, CH₂ 9), 1.30-1.20 (m, 16H, CH₂ 10-16), 0.91 (t, *J* = 7.40 Hz, 3H, CH₃ 3''), 0.86 (t, *J* = 6.89 Hz, 3H, CH₃ 17).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.3 (C2), 188.6 (C6), 173.7 (C4), 172.1 (COO*t*-butyl), 101.4 (C3), 81.0 (C(CH₃)₃), 63.2 (C5), 41.1 (C1''), 33.0 (C7), 32.1 (C2'), 29.8 (CH₂COO*t*-butyl), 29.7-21.0 (C8-17, *t*-butyl und C1'), 14.3 (C17), 11.5 (C3'').

LC-MS: (C4) 451.91 [M+H]⁺; 396.17 [M-*t*butyl+1]⁺; 12.08 min

HRMS (ESI): berechnet [C₂₆H₄₅O₅N+H⁺]: 452.3371 gefunden: 452.3362

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyoctylden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-propylpyrrolidin-2,4-dion (**141**)



(*s*)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-OH-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Propanal reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyoctylden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (30 mg, 26 %, 0.09 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.81 (dd, $J = 6.44, 2.58$ Hz, 1H, CH 5), 3.78-3.67 (m, 1H, CH_2 1''), 3.06-2.88 (m, 1H, CH 1''), 2.87-2.70 (m, 2H, CH_2 7), 2.28-2.11 (m, 3H, CH_2 1' und CH_2 2'), 2.08-1.83 (m, 1H, CH_2 1'), 1.80-1.46 (m, 4H, CH_2 8, CH_2 2''), 1.42 (s, 9H, *t*-butyl), 1.39-1.21 (m, 8H, CH_2 9-12), 0.93 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H, CH_3 3''), 0.87 (t, $J = 6.94$ Hz, 3H, CH_3 13).

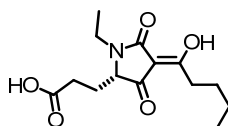
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.3 (C2), 188.5 (C6), 173.7 (C4), 172.0 ($\text{COO}t\text{-butyl}$), 101.4 (C3), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 63.2 (C5), 41.1 (C1''), 34.0 (C7), 31.8 (C2'), 29.4 ($\text{CH}_2\text{COO}t\text{-butyl}$), 29.3-21.0 (C8-17, *t*-butyl und C1'), 14.3 (C17), 11.5 (C3').

LC-MS: (C4) 340.15 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.49 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}+\text{H}^+]$: 340.2119 gefunden: 340.2120

$[\alpha]^{20} = -4.1^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxypentyliden)-5-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**143**)



(*s,Z*)-3-(1-Hydroxypentyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und mit TFA (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit Toluol koevaporiert. Die Titelverbindung wurde nach Aufreinigung durch präparative HPLC (C4-Säule) als gelber amorpher Feststoff erhalten (5 mg, 80 %, 0.018 mmol, Gesamtausbeute 30 %).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.86-3.72 (m, 2H, CH_2 1'', CH), 3.20-2.92 (m, 1H, CH_2 1''), 2.75 (m, 2H, CH_2 7), 2.58 (s, 1H, OH), 2.42-2.30 (m, 2H, CH_2 2'), 2.29-2.16 (m, 1H, CH_2 1''), 2.10 (s, 1H, COOH), 2.01-1.86 (m, 1H, CH_2 1'), 1.65-1.50 (m, 2H, CH_2 8), 1.42-1.27 (m, 2H, CH_2 9), 1.13 (t, $J = 7.24$ Hz, 3H, CH_3 2''), 0.87 (t, $J = 7.34$ Hz, 3H, CH_3 10).

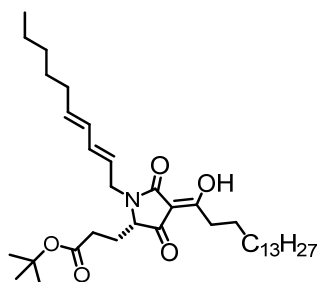
^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.1 (C2), 188.9 (C6), 177.0 (C4), 173.5 (CH_2COOH), 101.4 (C3), 62.6 (C5), 34.4 (C1''), 32.8 (C7, C2'), 28.3 (C8), 23.8 (C9), 22.6 (C1'), 13.9 (C10), 13.1 (C2'').

LC-MS: (C4) 284.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.03 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}+\text{H}^+]$: 284.1493, gefunden: 284.1494

$[\alpha]^{20} = -6.3^\circ$ (c = 0.7, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-(2E,4E)-deca-2,4-dienylpyrrolidin-2,4-dion (**144**)



(s)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit (2E, 4E)-Deca-2,4-dienal reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit *E*-5-(1-Hydroxyhexadec-9-enyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (70 mg, 24 %, 0.12 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.18 (td, $J = 14.96, 10.32$ Hz, 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 5.99 (dd, $J = 15.11, 10.35$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 5.86-5.59 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 5.56-5.34 (m, 1H, $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 4.50 (dd, $J = 15.50, 5.59$ Hz, 1H, CH_2 1''), 3.98-3.63 (m, 1H, CH), 3.58 (m, 1H, CH_2 1''), 2.87-2.76 (m, 2H, CH_2 7), 2.26-2.23 (m, 2H, CH_2 2'), 2.20 (m, 1H, CH_2 1'), 2.10-1.97 (m, 3H, CH_2 1' und CH_2 6''), 1.72-1.56 (m, 2H, CH_2 8), 1.42 (s, 9H, *t*-butyl, CH_2 9), 1.41-1.22 (m, 30H, CH_2 9-20 und 7''-9''), 0.88 (m, 6H, CH_3 21, 10'').

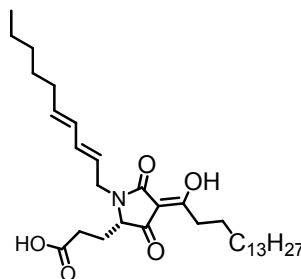
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 193.9 (C2), 188.1(C6), 173.1 (C4), 171.8 (COO*t*butyl), 136.7 (C5''), 135.0 (C2''), 128.6 (C3''), 123.0 (C4''), 101.3 (C3), 80.7(C(CH₃)₃), 62.9 (C5), 41.1 (C1''), 32.7 (C6''), 32.5 (C7), 31.9 (CH₂COO*t*-butyl), 31.3-22.4 (C8-C20, *t*-butyl und C7-C9, C1'), 14.0 (C10''), 13.9 (C21).

LC-MS: (C4) 602.04 [M+H]⁺; 13.29 min

HRMS (ESI): berechnet [C₃₇H₆₄O₅N+H⁺]: 602.4779, gefunden: 602.4774

$[\alpha]_D^{20} = -19.7^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-propanoat-1-(2*E,4E*)-deca-2,4-dienylpyrrolidin-2,4-dion (**145**)



(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-(2*E,4E*)-deca-2,4-dienylpyrrolidin-2,4-dion wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und mit TFA (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit Toluol koevaporiert. Die Titelverbindung wurde nach Aufreinigung durch präparative HPLC (C4-Säule) als rötlicher amorpher Feststoff erhalten (40 mg, 82 %, 0.073 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.19 (m, 1H, NCH₂CH=CH), 5.99 (dd, $J = 15.23, 10.21$ Hz, 1H, CH₂CH=CH(CH₂)₄CH₃), 5.84-5.58 (m, 1H, CH₂CH=CH(CH₂)₄CH₃), 5.58-5.31 (m, 1H, NCH₂CH=CH), 4.51 (m, 1H, CH₂1''), 3.84 (m, 1H, CH), 3.58 (m, 1H, CH₂1''), 2.81 (dt, $J = 7.41, 3.75$ Hz, 2H, CH₂7), 2.36 (t, $J = 7.45, 7.45$ Hz, 2H, CH₂2'), 2.31-2.20 (m, 1H, CH₂1'), 2.12-1.92 (m, 3H, CH₂1'CH₂6''), 1.75-1.53 (m, 2H, CH₂8), 1.42-1.21 (m, 30H, CH₂9-20 und 7''-9''), 0.88 (m, 6H, CH₃21, 10'').

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.0 (C2), 188.8 (C6), 176.5 (C4), 173.4 (COOH), 137.1 (C5''), 135.5 (C2''), 128.8 (C3''), 123.1 (C4''), 101.4 (C3), 62.9 (C5), 41.5 (C1''), 33.0 (C6''), 32.8 (C7), 32.1 (CH₂COO*t*-butyl), 31.6-22.7 (C8-C20 und C7-C9, C1'), 14.3 (C10''), 14.2 (C21).

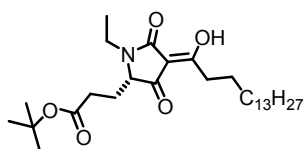
LC-MS: (C4) 546.36 [M+H]⁺; 12.17 min

Experimenteller Teil

HRMS (ESI): berechnet $[C_{33}H_{56}O_5N+H^+]$: 546.4153, gefunden: 546.4147

$[\alpha]^{20} = -122.0^\circ$ (c = 0.1, $CHCl_3$)

(S,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion
(**147**)



(S)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellgelbes Öl (11.5 mg, 24 %, 0.023 mmol).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.84 (m, 2H, CH_2 1''), 3.11 (m, 1H, CH_2 1''), 2.81 (m, 2H, CH_2 7), 2.22 (m, 2H, CH_2 2'), 1.95 (m, 2H, CH_2 1'), 1.63 (m, 2H, CH_2 8), 1.43 (s, 9H, *t*-butyl), 1.31 (m, 26H, CH_2 9-21), 1.19 (t, $J = 7.23$ Hz, 3H, CH_3 2''), 0.88 (t, $J = 6.87$ Hz, 3H, CH_3 22).

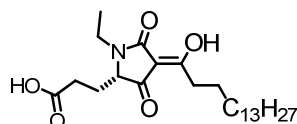
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 193.6 (C2), 187.7 (C6), 172.7 (C4), 171.4 (COO*t*butyl), 100.8 (C3), 80.3 ($C(CH_3)_3$), 62.2 (C5), 33.7 (C1''), 32.3 (C7), 31.4 (CH_2 COO*t*butyl), 29.2 (*t*butyl), 29.2-23.2 (C9-20), 22.2 (C1'), 13.6 (C21), 12.4 (C2'').

LC-MS: (C4) 494.44 $[M+H]^+$; 12.65 min

HRMS (ESI): berechnet $[C_{29}H_{52}O_5N+H^+]$: 494.3767, gefunden: 494.3825

$[\alpha]^{20} = -30.0^\circ$ (c = 0.48, $CHCl_3$)

(S,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**142**)



(S,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und mit TFA (1:1) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit Toluol koevaporiert. Die

Titelverbindung wurde nach Aufreinigung durch präparative HPLC (C4-Säule) als hellrotes Öl erhalten (17 mg, 97 %, 0.039 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.91-3.78 (m, 2H, CH, CH_2 1''), 3.12 (m, 1H, CH_2 1''), 2.94-2.68 (m, 2H, CH_2 7), 2.59-2.34 (m, 2H, CH_2 2'), 2.35-2.22 (m, 1H, CH_2 1'), 2.14-1.88 (m, 1H, CH_2 1'), 1.82-1.49 (m, 2H, CH_2 8), 1.43-1.23 (m, 24H, CH_2 9-20), 1.20 (t, $J = 7.22$ Hz, 3H, CH_3 2''), 0.88 (t, $J = 6.85$ Hz, 3H, CH_3 21).

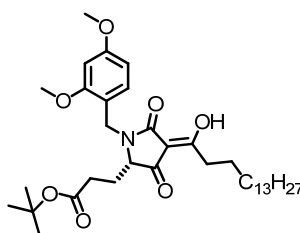
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.1 (C2), 189.0 (C6), 177.7 (C4), 173.5 (COOH), 101.4 (C3), 62.6 (C5), 34.5 (C1''), 33.1 (C7, C2'), 32.1 (CH_2COOH), 29.9-22.9 (C8-C21, C1'), 14.3 (C2''), 13.1 (C21).

LC-MS: (C4) 438.37 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.32 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{N}+\text{H}^+]$: 438.3214, gefunden: 438.3210

$[\alpha]_D^{20} = -16.1^\circ$ (c = 0.1, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-(2,4-dimethoxybenzylpyrrolidin-2,4-dion) (**146**)



(s)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Glutamin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (37 mg, 35 %, 0.06 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.21 (d, $J = 7.99$ Hz, 1H, a.), 6.63-6.29 (m, 2H, ar.), 4.91 (d, $J = 14.69$ Hz, 1H, benz.), 4.18 (d, $J = 14.71$ Hz, 1H, benz.), 3.79 (2s, 6H, 2OCH_3), 3.71-3.58 (m, 1H, CH 5), 2.80 (dt, $J = 7.24, 1.70$ Hz, 2H, CH_2 7), 2.33-1.96 (m, 4H, CH_2 1' und CH_2 2'), 1.77-1.52 (m, 2H, CH_2 8), 1.42 (s, 9H, *t*butyl), 1.40-1.10 (m, 24H, CH_2 9-20), 0.88 (t, $J = 6.86$ Hz, 3H, CH_3 21).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.7 (C2), 188.6 (C6), 173.7 (C4), 172.2 (COO*t*-butyl), 161.2 (ar.), 158.8 (ar.), 131.7 (ar.), 116.3 (ar.), 104.7 (ar.), 101.6 (C3),

Experimenteller Teil

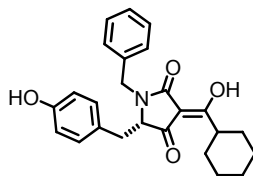
98.7 (ar.), 80.9 (C(CH₃)₃), 63.7 (C5), 55.6 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 38.1 (benz.), 33.1 (C7, C2'), 32.1 (CH₂COO*t*-butyl), 29.9 (C(CH₃)₃), 29.9 (C(CH₃)₃), 29.9 (C(CH₃)₃), 29.8-23.6 (C9-21), 23.0 (C1'), 14.3 (C21).

LC-MS: (C4) 615.99 [M+H]⁺; 12.51 min

HRMS (ESI): berechnet [C₃₆H₅₇O₇N+H⁺]: 616.4208, gefunden: 616.4205

[α]²⁰ = -59.0° (c = 1, CHCl₃)

(*s,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-(4-hydroxybenzyl)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion
(**148**)



(*s*)-*N*-Fmoc-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (20 mg, 45 %, 0.05 mmol).

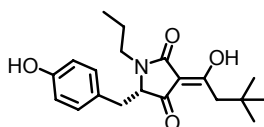
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.27 (m, 3H, ar.), 7.16-7.08 (m, 2H, ar.), 6.97-6.89 (m, 2H, ar.), 6.76-6.55 (m, 2H, ar.), 5.29 (m, 1H, benz.), 3.95 (d, *J* = 15.00 Hz, 1H, benz.), 3.82 (t, *J* = 4.78 Hz, 1H, CH 5), 3.33 (m 1H, CH), 3.13-2.97 (m, 1H, benz.), 1.84-1.12 (m, 11H, CH, CH₂)

LC-MS: (C4, 406.06 [M+H]⁺; 10.10 min

HRMS (ESI): berechnet [C₂₅H₂₈O₄N+H⁺]: 406.2013, gefunden: 406.2006

[α]²⁰ = -65.3° (c = 0.1, CHCl₃)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxy-(3,3-dimethylbutyliden)-5-(4-hydroxybenzyl)-1-propylpyrrolidin-2,4-dion (**149**)



(*s*)-*N*-Fmoc-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Propanal reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxy-3,3-dimethylbutyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (11 mg, 14 %, 0.032 mmol).

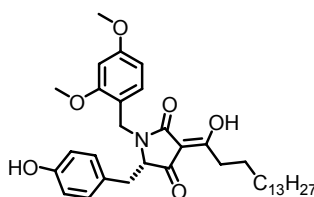
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.95 (d, $J = 8.59$ Hz, 2H, ar.), 6.80-6.53 (m, 2H, ar.), 4.00 (t, $J = 4.56$ Hz, 1H, CH_2 1''), 3.86 (m, 1H, CH 5), 3.13-3.01 (m, 2H, CH_2 7), 3.01-2.90 (m, 1H, 1''), 2.84 (d, $J = 12.13$ Hz, 1H, benz.), 2.51 (d, $J = 12.11$ Hz, 1H, benz.), 1.76-1.36 (m, 2H, CH_2 2''), 0.97 (s, 9H, *t*-butyl), 0.91-0.87 (m, 3H, CH_3 3'').

LC-MS: (C4) 346.04 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.64 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$: 346.2013, gefunden: 346.2013

$[\alpha]_D^{20} = -36.2^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(4-hydroxybenzyl)-1-(2,4-dimethoxy)benzylpyrrolidin-2,4-dion (**150**)



(*s*)-*N*-Fmoc-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (19.8 mg, 26 %, 0.03 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.13 (d, $J = 8.97$ Hz, 1H, ar.), 6.95 (d, $J = 8.49$ Hz, 2H, ar.), 6.68 (d, $J = 8.50$ Hz, 2H, ar.), 6.56-6.22 (m, 2H, ar.), 4.98 (d, $J = 14.64$ Hz, 1H, benz.), 4.24 (d, $J = 14.62$ Hz, 1H, benz.), 3.87 (t, $J = 4.42$ Hz, 1H, CH 5),

Experimenteller Teil

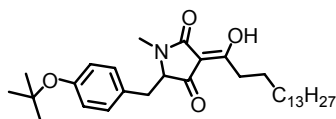
3.83-3.78 (m, 4H, benz. und OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.46 (s, 1H, OH), 3.11 (d, $J = 4.37$ Hz, 1H, benz.), 2.86-2.60 (m, 2H, CH_2 7), 2.54 (t, $J = 7.39$ Hz, 2H, CH_2 8), 1.69-1.44 (m, 2H, CH_2 9), 1.39-1.16 (m, 22H, CH_2 10-20), 0.89 (t, $J = 6.79$ Hz, 3H, CH_3 21).

LC-MS: (C4) 593.99 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.79 min

HRMS (ESI): berechnet: 594.3789 $[\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{O}_6\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 594.3785

$[\alpha]^{20} = -4.5^\circ$ ($c = 0.31$, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(4-*tert*-butyl-hydroxybenzyl)-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**151**)



(s)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (39 mg, 49 %, 0.083 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.99 (d, $J = 8.44$ Hz, 2H, ar.), 6.91-6.73 (m, 2H, ar.), 3.96 (t, $J = 4.34$ Hz, 1H, CH 5), 3.10 (dq, $J = 14.49, 4.83$ Hz, 1H, benz.), 2.93 (m, 3H, CH_2 1'' und benz.), 2.83-2.54 (m, 2H, CH_2 7), 1.61-1.48 (m, 2H, CH_2 8), 1.32-1.21 (m, 33H, CH_2 9-20 und CH_3 2''), 0.87 (t, $J = 6.87$ Hz, 3H, CH_3 21).

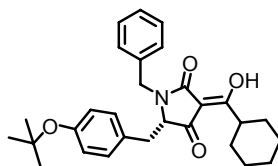
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.5 (C2), 188.8 (C6), 173.7 (C4), 154.4 (ar.), 130.0 (ar.), 124.4 (ar.), 115.7 (ar.), 101.5 (C3), 79.1 (ar.), 68.2 (C5), 35.1 (C1''), 33.1 (benz.), 32.1 (C7), 29.9-22.9 (C8-20), 14.3 (C2'', C21).

LC-MS: (C4) 514.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 470.36 $[\text{M}-t\text{-butyl}+\text{H}]^+$; 11.38 min

HRMS (ESI): berechnet: 514.3891 $[\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 514.3867

$[\alpha]^{20} = -66.1^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3)

(*S,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-(4-*tert*-butyl-hydroxybenzyl)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**152**)



(*S*)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (32.6 mg, 32 %, 0.07 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.40-7.18 (m, 3H, ar.), 7.13-7.03 (m, 2H, ar.), 6.99 (d, $J = 8.43$ Hz, 2H, ar.), 6.88 (d, $J = 8.42$ Hz, 2H, ar.), 5.21 (d, $J = 15.00$ Hz, 1H, benz.), 3.92 (m, 1H, CH 5), 3.87-3.73 (m, 1H, benz.), 3.50-3.19 (m, 1H, benz.), 3.14 (dd, $J = 14.62, 4.05$ Hz, 1H, CH), 3.07-2.88 (m, 1H, benz.), 1.93-1.53 (m, 6H, CH_2), 1.60-0.92 (m, 13H, CH_2 , *t*butyl).

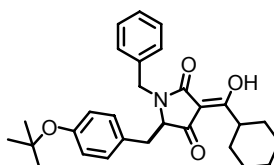
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.1 (C2), 192.6 (C6), 174.2 (C4), 154.4 (ar.), 135.5 (ar.), 130.6 (ar.), 130.1 (ar.), 129.1 (ar.), 128.4 (ar.), 124.5 (ar.), 115.6 (ar.), 100.0 (C3), 79.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 64.9 (C5), 44.0 (benz.), 41.2 (CH), 35.3 (benz.), 29.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.4 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.6 (CH_2).

LC-MS: (C4) 462.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.22 min

HRMS (ESI): 462.2639 berechnet $[\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 462.2634

$[\alpha]_D^{20} = -14.3^\circ$ (c = 0.6, CHCl_3)

(*R,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-(4-*tert*-butylhydroxybenzyl)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**153**)



(*R*)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)-Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-

Experimenteller Teil

dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (126.3 mg, 60 %, 0.27 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38-7.20 (m, 3H, ar.), 7.14-7.02 (m, 2H, ar.), 7.02-6.93 (m, 2H, ar.), 6.91-6.81 (m, 2H, ar.), 5.22 (d, $J = 14.98$ Hz, 1H, benz.), 3.90 (d, $J = 14.98$ Hz, 1H, CH 5), 3.80 (dd, $J = 5.68, 4.11$ Hz, 1H, benz.), 3.42-3.26 (m, 1H, benz.), 3.14 (dd, $J = 14.57, 4.11$ Hz, 1H, CH), 2.98 (dd, $J = 14.56, 5.74$ Hz, 1H, benz.), 1.87-1.57 (m, 5H, CH_2), 1.58-1.39 (m, 3H, CH_2), 1.32 (d, $J = 1.85$ Hz, 9H, *t*-butyl), 1.28-1.13 (m, 2H, CH_2).

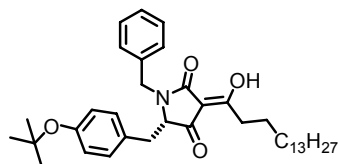
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 193.7 (C2), 191.9 (C6), 174.2 (C4), 154.6 (ar.), 135.7 (ar.), 130.1 (ar.), 129.0 (ar.), 128.4 (ar.), 124.4 (ar.), 100.0 (C3), 78.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 64.8 (C5), 43.9 (benz.), 41.0 (CH), 37.6 (benz.), 29.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.5 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.6 (CH_2).

LC-MS: (C4) 462.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.13 min

HRMS (ESI): berechnet: 462.2639 $[\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 462.2660

$[\alpha]^{20} = +3.4^\circ$ (c = 0.8)

(*S,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(4-*tert*-butylhydroxybenzyl)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**154**)



(*S*)-*N*-Fmoc-(*tert*-butyl)Tyrosin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (76 mg, 72 %, 0.13 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.33-7.26 (m, 3H, ar.), 7.10-7.03 (m, 2H, ar.), 7.02-6.94 (m, 2H, ar.), 6.91-6.83 (m, 2H, ar.), 5.23 (d, $J = 14.97$ Hz, 1H, benz.), 3.90 (m, 1H, CH 5), 3.81 (dd, $J = 5.66, 4.17$ Hz, 1H, benz.), 3.13 (dd, $J = 14.56, 4.10$ Hz, 1H, benz.), 2.99 (dd, $J = 14.51, 5.70$ Hz, 1H, benz.), 2.75 (m, 2H, CH_2 7), 1.65-1.52 (m, 2H, CH_2 8), 1.44-1.10 (m, 33H, CH_2 9-20, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.92-0.81 (m, 3H, CH_3 21).

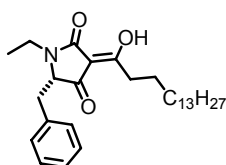
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.0 (C2), 188.2 (C6), 173.7 (C4), 154.6 (ar.), 135.6 (ar.), 130.6 (ar.), 130.1 (ar.), 129.1 (ar.), 128.4 (ar.), 128.2 (ar.), 124.4 (ar.), 101.4 (C3), 78.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 64.9 (C5), 43.9 (benz.), 35.3 (benz.), 32.9 (C7), 32.1- 22.9 (C8-20 und $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.3 (CH_3 21).

LC-MS: (C4) 590.50 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.75 min

HRMS (ESI): berechnet: 590.4204 $[\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 590.4199

$[\alpha]_D^{20} = -9.3^\circ$ (c = 0.1, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-benzyl-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**155**)



(s)-*N*-Fmoc-Phenylalanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (33 mg, 30 %, 0.07 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.30-7.15 (m, 3H, ar.), 7.11 (dd, $J = 7.78, 1.66$ Hz, 2H, ar.), 4.07 (t, $J = 4.83$ Hz, 1H, benz.), 3.92 (m, 1H, CH 5), 3.19-3.06 (m, 2H, CH_2 1''), 3.00 (qd, $J = 14.13, 7.05$ Hz, 1H, benz.), 2.70 (m, 2H, CH_2 7), 1.63-1.40 (m, 2H, CH_2 8), 1.43-1.18 (m, 24H, CH_2 9-20), 1.11 (t, $J = 7.22$ Hz, 3H, CH_3 2''), 0.88 (t, $J = 6.85$ Hz, 3H, CH_3 21).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.0 (C2), 188.2 (C6), 173.5 (C4), 135.6 (ar.), 129.6 (ar.), 128.6 (ar.), 127.2 (ar.), 101.6 (C3), 64.8 (C5), 35.7 (C1''), 34.8 (benz.), 32.9 (C7), 32.1-22.9 (C8-C20), 14.3 (C21), 12.8 (C2'').

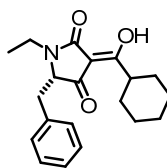
LC-MS: (C4) 367.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.35 min

HRMS (ESI): berechnet: 456.3472 $[\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 456.3487

$[\alpha]_D^{20} = -1.3^\circ$ (c = 0.8, CHCl_3)

Experimenteller Teil

(*S,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-benzyl-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**156**)



(*S*)-*N*-Fmoc-Phenylalanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (58 mg, 33 %, 0.18 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.30-7.16 (m, 3H, ar.), 7.16-7.01 (m, 2H, ar.), 4.05 (t, $J = 4.87$ Hz, 1H, benz.), 3.90 (qd, $J = 14.78, 7.49$ Hz, 1H, CH 5), 3.44-3.20 (m, 1H, CH), 3.12 (dq, $J = 14.56, 4.95$ Hz, 2H, CH_2 1''), 2.99 (qd, $J = 14.03, 7.01, 7.01, 6.96$ Hz, 1H, benz.), 1.83-1.57 (m, 5H, CH_2), 1.60-1.18 (m, 5H, CH_2), 1.10 (t, $J = 7.21, 7.21$ Hz, 3H, CH_3 2'').

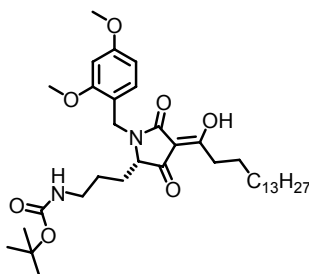
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 193.7 (C2), 191.7 (C6), 173.9 (C4), 129.5 (ar.), 128.6 (ar.), 127.2 (ar.), 110.0 (ar.), 100.2 (C3), 64.7 (C5), 41.0 (C1''), 35.8 (C1'), 34.8 (CH), 28.9 (CH_2), 28.5 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.8 (CH_2), 25.6 (CH_2), 12.8 (C2'').

LC-MS: (C4) 328.23 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.09 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$: 328.1907, gefunden: 328.1904

$[\alpha]^{20} = -5.3^\circ$ ($c = 0.2, \text{CHCl}_3$)

(*S,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-(*t*-butyl-propylcarbamate)-1-(2,4-dimethoxybenzyl)pyrrolidin-2,4-dion (**157**)



(*S*)-*N*-Fmoc-*N*-Boc-Ornithin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative

HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (30 mg, 18 %, 0.05 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.19 (d, J = 8.63 Hz, 1H, ar.), 6.45 (m, 2H, ar.), 4.91 (t, J = 13.58 Hz, 1H, benz.), 4.14 (d, J = 14.71 Hz, 1H, benz.), 3.79 (s, 6H, OCH_3), 3.66 (s, 1H, CH), 3.06 (t, J = 5.91 Hz, 1H, CH_2 C3'), 2.79 (t, J = 7.68 Hz, 2H, CH_2 7), 1.91 (m, 1H, CH_2 C1'), 1.80 (m, 1H, CH_2 C1'), 1.63 (td, J = 15.24, 7.78 Hz, 2H, CH_2 8), 1.44 (s, 9H, *t*butyl), 1.25 (s, 22H, CH_2 9-21 und CH_2 C2'), 0.87 (t, J = 6.85 Hz, 3 H, CH_3 C22).

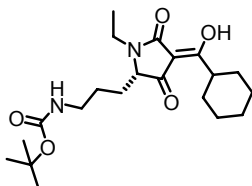
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 188.4 (C2), 173.7 (C6), 173.6 (C4), 161.1 (COCH_3), 161.1 (COCH_3), 158.7 ($\text{NHC(O)O}t\text{-butyl}$), 131.6 (ar.), 116.3 (ar.), 104.8 (C3), 98.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) 64.2 (C5), 55.6 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 40.4 (CH_2 3'), 37.9 (benz.), 33.1 (C7), 33.1- 22.9 (C9-20, C1'-2' und $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.3 (CH_3 21).

LC-MS: (C4) 545.156 [M-Boc+H] $^+$; 12.27 min

HRMS (ESI): berechnet [$\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{O}_7\text{N}_2+\text{H}^+$]: 645.4473, gefunden: 645.4506

$[\alpha]^{20} = -50.0^\circ$ (c = 0.85, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(Cyclohexylhydroxymethylen)-5-(*tert*-butyl-propylcarbamate)-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**158**)



(*s*)-*N*-Fmoc-*N*-Boc-Ornithin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das hieraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Cyclohexyl)hydroxy)methylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (11 mg, 27 %, 0.03 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.92-3.74 (m, 2H, CH 5, CH 1''), 3.36 (tt, J = 11.66, 3.22 Hz, 1H, CH_2 1''), 3.11 (qd, J = 14.21, 7.11 Hz, 1H, CH), 2.33-2.08 (m, 3H, CH_2 3', CH_2 1'), 2.04-1.90 (m, 1H, CH_2 1'), 1.85-1.67 (m, 6H, CH_2), 1.61-1.46 (m, 3H, CH_2 2'), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40-1.29 (m, 2H, CH_2), 1.29-1.22 (m, 2H, CH_2), 1.19 (t, J = 7.24 Hz, 3H, CH_3 2'').

Experimenteller Teil

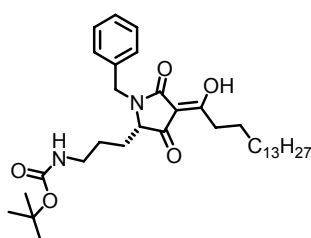
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.0 (C2), 192.2 (C6), 173.9 (C4), 172.1 (NHC(O)Ot-butyl), 100.1 (C3), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 62.9 (C5), 41.2 (CH und C3'), 34.4 (C7, C1''), 29.4- 23.9 (CH_2 und C1'-2'), 13.0 (CH_3 2').

LC-MS: (C4) 365.85 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.57 min

HRMS (ESI): berechnet: 366.2275 [$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}+\text{H}^+$]; gefunden: 366.2302

$[\alpha]^{20} = -35.0^\circ$ (c = 0.61, CHCl_3)

(s,Z)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(tert-butyl-propylcarbamate)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**161**)



(s)-N-Fmoc-N-Boc-Ornithin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als hellrotes Öl (20 mg, 16 %, 0.04 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.42-7.26 (m, 5H, ar.), 5.07 (d, $J = 15.06$ Hz, 1H, benz.), 4.48-4.33 (m, 1H, NH), 4.11 (d, $J = 15.02$ Hz, 1H, benz.), 3.85-3.53 (m, 1H, CH 5), 3.14-2.91 (m, 2H, CH_2 3'), 2.94-2.67 (m, 2H, CH_2 7), 1.97-1.82 (m, 1H, CH_2 1'), 1.77-1.51 (m, 3H, CH_2 1', CH_2 8), 1.44 (s, 9H, tbutyl), 1.35-1.06 (m, 26H, CH_2 9-20, CH_2 2'), 0.88 (t, $J = 6.86$ Hz, 3H, CH_3 21).

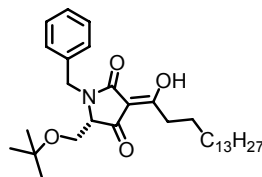
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 182.2 (C2), 173.7 (C6), 168.7 (C4), 153.8 (NHC(O)Ot-butyl), 135.8 (ar.), 129.2 (ar.), 128.5 (ar.), 128.3 (ar.), 126.0 (ar.), 123.2 (ar.), 100.8 (C3), 77.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 63.9 (C5), 43.7 (C3'), 41.6 (benz.), 33.0 (C7), 32.1-22.9 (C9-20, C1'-2' und $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.3 (CH_3 21).

LC-MS: (C4) 584.95 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.43 min

HRMS (ESI): berechnet: 585.4262 [$\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_7\text{N}+\text{H}^+$]; gefunden: 585.4266

$[\alpha]^{20} = -27.0^\circ$ (c = 0.26, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(*tert*-butoxymethyl)-1-(2,4-dimethoxy)benzylpyrrolidin-2,4-dion (**162**)



(*s*)-*N*-Fmoc-*O*-*tert*-butyl-Serin beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als leicht oranges Öl (11 mg, 41 %, 0.02 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.19 (d, J = 8.30 Hz, 1H, ar.), 6.53-6.33 (m, 2H, ar.), 4.97 (d, J = 14.91 Hz, 1H, benz.), 4.28 (d, J = 14.90 Hz, 1H, benz.), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.77-3.69 (m, 1H, CH 5), 3.68-3.57 (m, 2H, CH_2 1'), 2.80 (m, 2H, CH_2 7), 1.79-1.50 (m, 2H, CH_2 8), 1.41-1.20 (m, 24H, CH_2 9-20), 1.12 (s, 9H, *t*butyl), 0.88 (t, J = 6.88 Hz, 3H, CH_3 21).

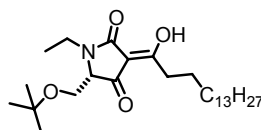
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 193.7 (C2), 187.4 (C6), 174.0 (C4), 160.9 (CO ar.), 158.7 (CO ar.), 131.3 (CH ar.), 116.7 (CH ar.), 104.5 (CH ar.), 102.0 (C3), 98.7 (CH ar.), 73.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 65.6 (C5), 59.5 ($\text{CH}_2\text{O}t\text{-butyl}$), 55.6 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 38.6 (CH_2 benz.), 33.0 (C7), 32.1-22.9 (C9-20, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.3 (CH_3 21).

LC-MS: (C4) 574.54 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 12.73 min

HRMS (ESI): berechnet: 574.4102 $[\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{O}_6\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 574.4088

$[\alpha]^{20} = -46.0^\circ$ (c = 0.56, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-(*t*butoxymethyl)-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**163**)



(*s*)-*N*-Fmoc-*O*-*tert*-butyl-Serin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbes Öl (18 mg, 25 %, 0.04 mmol).

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.89-3.80 (m, 2H, CH 5, CH₂ 1'), 3.75 (m, 1H, CH₂ 1'), 3.58 (m, 1H, CH₂ 1''), 3.32 (m, 1H, CH₂ 1''), 2.98-2.55 (m, 2H, CH₂ 7), 1.64 (td, J = 15.36, 7.49 Hz, 2H, CH₂ 8), 1.38-1.17 (m, 24H, CH₂ 9-20), 1.15 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.21 (t, J = 7.21 Hz, 3H, CH₃ 2''), 0.88 (t, J = 6.88 Hz, 3H, CH₃ 21).

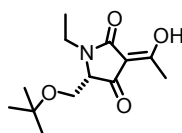
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.7 (C4), 187.6 (C6), 173.6 (C2), 101.8 (C3), 73.6 (C(CH₃)₃), 65.7 (C5), 61.3 (CH₂O*t*-butyl), 35.4 (C1''), 33.0 (C7), 32.1-22.9 (C9-20, C(CH₃)₃), 14.3 (CH₃ 21), 13.2 (CH₃ 2'').

LC-MS: (C4) 452.08 [M+H]⁺; 12.6 min

HRMS (ESI): berechnet: 452.3734 [C₂₇H₄₉O₄N+H⁺], gefunden: 452.3757

$[\alpha]^{20} = -26.1^\circ$ (c = 0.34, CHCl₃)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(*tert*-butoxymethyl)-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion (**164**)



(*s*)-*N*-Fmoc-*O*-*tert*-butyl-Serin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Acetaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als farbloses Öl (25 mg, 41 %, 0.07 mmol).

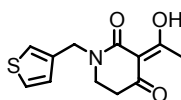
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.18 (d, J = 7.99 Hz, 1H, ar.), 6.44 (d, J = 7.56 Hz, 2H, ar.), 4.98 (d, J = 14.86 Hz, 1H, benz.), 4.86-4.66 (bs, 1H, OH), 4.26 (d, J = 14.84 Hz, 1H, benz.), 3.83 (bs, 1H, CH 5), 3.79 (2s, 6H, 2OCH₃), 3.77-3.69 (m, 1H, -*t*butylOCH₂), 3.65 (dd, J = 9.52, 3.41 Hz, 1H, *t*-butylOCH₂), 2.60-2.38 (m, 4H, CH₃), 1.13 (s, 9H, C(CH₃)₃).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 194.1 (C2), 184.1 (C6), 173.4 (C4), 160.8 (COCH₃ ar.), 158.4 (COCH₃ ar.), 131.1 (ar.), 104.3 (C3), 98.5 (ar.), 73.4 (C(CH₃)₃), 65.4 (C5), 59.2 (CH₂O*t*butyl), 55.4 (OCH₃), 55.3 (OCH₃), 38.5 (benz.), 30.8-27.2 (C(CH₃)₃), 19.8 (CH₃).

LC-MS: (C4) 377.77 [M+H]⁺; 9.93 min

HRMS (ESI): berechnet: 378.1911 [C₂₀H₂₇O₆N+H⁺], gefunden: 378.1921

$[\alpha]^{20} = -45.4^\circ$ (c = 0.7, CHCl₃)

(Z)-3-(1-Hydroxyethyliden)-1-((thiophen-3-yl)methyl)piperidin-2,4-dion (166A)

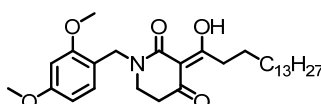
Fmoc- β -Alanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Thionylaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbliches Öl (14 mg, 54 %, 0.06 mmol).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.31 (m, 1H, CH), 7.21-7.13 (m, 1H, CH), 7.03 (m, 1H, CH), 4.66 (2s, J = 5.42 Hz, 2H, CH_2 5), 3.45-3.31 (m, 2H, benz.), 2.66-2.60 (m, 1H, CH_2 5), 2.59-2.53 (m, 4H, CH_2 6, CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 192.5 (C2), 191.4 (C7), 172.0 (C4), 136.8 (CH), 127.6 (CH), 127.0 (CH), 123.6 (CH), 99.8 (C3), 45.6 (C1'), 42.9 (C5), 37.9 (C6), 23.7 (CH_3).

LC-MS: (C4) 252.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.08 min

HRMS (ESI): berechnet: 252.0690 $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{NS}+\text{H}^+]$, gefunden: 252.0690

(Z)-4-(2,4-Dimethoxybenzyl)-2-(1-hydroxyhexadecylidencyclohexan-1,3-dion (166B)

Fmoc- β -Alanin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV7** mit 5-(1-Hydroxyhexadecyliden)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelbliches Öl (20 mg, 29 %, 0.04 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.25-7.10 (m, 1H, ar.), 6.58-6.38 (m, 2H, ar.), 4.61 (s, 2H, benz.), 3.81 (2s, 6H, OCH_3), 3.44-3.35 (m, 2H, CH_2 5), 3.02-2.81 (m, 2H, CH_2 8), 2.55-2.44 (m, 2H, CH_2 6), 1.85-1.51 (m, 4H, CH_2 9-10), 1.54-1.07 (m, 20H, CH_2 11-20), 0.88 (t, J = 6.85 Hz, 3H, CH_3 21).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 196.3 (C2), 172.5 (C7), 160.9 (C4), 158.9 (ar.), 131.2 (ar.), 116.7 (ar.), 104.6 (ar.), 98.8 (C3), 55.6 (OCH_3), 45.1 (C5), 43.1 (benz.), 38.1 (C6), 37.4 (C7), 32.1 (C8), 29.9-22.9 (C 9-20), 14.3 (C 21).

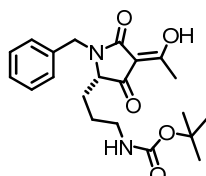
Experimenteller Teil

LC-MS: (C4) 502.18 [M+H]⁺; 12.13 min

HRMS (ESI): berechnet: 502.3527 [C₃₀H₄₇O₅N+H⁺], gefunden: 502.3520

6.3 Verbindungen zu Kapitel 4.2

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(*tert*-butyl-propylcarbamate)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**159**)



(*s*)-*N*-Fmoc-*N*-Boc-Ornithin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene Amin wurde nach **AAV3** mit Benzaldehyd reaktiv alkyliert und anschließend gemäß **AAV4** mit Diketen acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als rötliches Öl (270 mg, 38 %, 0.7 mmol).

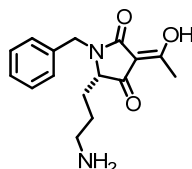
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.41-7.15 (m, 5H, ar.), 5.09 (d, *J* = 15.30 Hz, 1H, benz.), 4.47 (s, 1H, NH), 4.08 (d, *J* = 14.97 Hz, 1H, benz.), 3.65 (bs, 1H, CH 5), 3.01 (m, 2H, CH₂ 3'), 2.44 (s, 3H, CH₃ 6), 2.01-1.79 (m, 1H, CH₂ 1'), 1.79-1.61 (m, 1H, CH₂ 1'), 1.43 (s, 9H, *t*butyl), 1.35-1.15 (m, 2H, CH₂ 2').

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.7 (C2), 184.3 (C6), 173.3 (C4), 156.2 (NHC(O)O*t*-butyl), 135.7 (ar.), 129.2 (ar.), 128.4 (ar.), 102.1(C3), 79.6 (C(CH₃)₃), 63.9 (C5), 43.6 (benz.), 40.3 (C3'), 28.6 (C(CH₃)₃), 25.6 (C1'), 23.8 (C2'), 19.8 (C6).

LC-MS: (C4) 388.83 [M+H]⁺; 289.02 [M+H-Boc]⁺; 9.45 min

HRMS (ESI): berechnet: 389.2071 [C₂₁H₂₉O₅N₂+H⁺], gefunden: 389.2073

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(propylamin)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (**160**)



(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(*tert*-butyl-propylcarbamate)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion (1 eq., 0.27 g, 0.7 mmol) wurde in Dichlormethan (1 ml) gelöst und mit Trifluoressigsäure (1 ml) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur

gerührt, bevor das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde. Koevaporation mit Toluol ergab die Titelverbindung als rötliches Öl (0.27 g, 100 %, 0.7 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.59 (bs, 1H, NH_2), 7.46 (bs, 1H, NH), 7.28-7.20 (m, 2H, ar.), 7.15 (dd, $J = 7.62, 1.44$ Hz, 2H, ar.), 4.94 (d, $J = 15.12$ Hz, 1H, benz.), 4.05 (d, $J = 15.06$ Hz, 1H, benz.), 3.64 (dd, $J = 5.90, 2.94$ Hz, 1H, CH_5), 2.86-2.80 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.05-1.76 (m, 1H, CH_2 1'), 1.65 (m, 1H, CH_2 1'), 1.47 (m, 2H, CH_2 2').

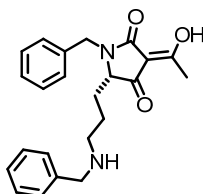
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 187.2 (C2), 187.1 (C6), 161.4 (C4), 135.3 (ar.), 129.3 (ar.), 128.5 (ar.), 128.3 (ar.), 117.0 (ar.), 114.1(ar.), 110.0 (C3), 63.0 (C5), 43.8 (benz.), 40.0 (C3'), 24.9 (C1'), 21.3 (C2'), 20.1 (C6).

LC-MS: (C4) 288.97 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 6.12 min

HRMS (ESI): berechnet: 289.1547 $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}_2+\text{H}^+]$, gefunden: 289.1548

$[\alpha]^{20} = -26.0^\circ$ (c = 0.9, CHCl_3)

(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(*N*-benzyl-propylamin)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion
(**185**)



(*s,Z*)-3-(1-Hydroxymethyliden)-5-(propylamin)-1-benzylpyrrolidin-2,4-dion **160** (1 eq., 267 mg, 0.93 mmol) wurde in trockenem THF gelöst und mit trockenem Natriumacetat (2 eq., 39 mg, 1.9 mmol) und Benzaldehyd (1 eq., 93 μl , 0.93 mmol) versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde Natriumtriacetoxyborhydrid (2 eq., 151 mg, 1.9 mmol) zugegeben und für weitere 12 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Methanol (1 ml) abgebrochen und zur Trockne einrotiert. Der verbleibende Feststoff wurde in Essigester gelöst und mit Wasser (2*5 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (2*5 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Während der Aufarbeitung zyklisierte der Großteil der Titelverbindung zu 3-Acetyl-1,4-dibenzyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-2(4H)-on **186**. Die beiden entstandenen Produkte wurden mit präparativer HPLC getrennt (150 mg, 45 %, 0.42 mmol, 7 mg, 0.02 mmol, 2 %). Das

Experimenteller Teil

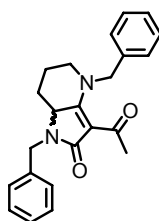
offenkettige Produkt (1 eq., 5 mg, 0.01 mmol) konnte nachträglich durch 12 stündiges Rühren in Toluol bei 80°C zyklisiert werden. Präparative HPLC ergab das gewünschte Zyklisierungsprodukt (3 mg, 0.01 mmol, 63 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.30 (s, 1H, NH), 7.38-7.27 (m, 8H, ar.), 7.31-7.17 (m, 2H, ar.), 5.00 (d, J = 15.11 Hz, 1H, benz.), 4.05 (d, J = 15.13 Hz, 1H, benz.), 3.94 (bs, 2H, benz.), 3.66-3.53 (m, 1H, CH 5), 2.90-2.60 (m, 2H, CH_2 3'), 2.41 (s, 3H, CH_3 6), 1.96-1.75 (m, 1H, CH_2 1'), 1.75-1.09 (m, 3H, CH_2 2', CH_2 1').

LC-MS: (C4) 379.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 6.17 min

HRMS (ESI): berechnet: 379.2016 $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_2+\text{H}^+]$, gefunden: 379.2018

3-Acetyl-1,4-dibenzyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrol[3,2-b]pyridin-2(4H)-on (**186**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.29-7.20 (m, 6H, arom.), 7.18-7.14 (m, 2H, arom.), 7.09 (dd, J = 7.87, 1.63 Hz, 2H, arom.), 5.21 (d, J = 15.05 Hz, 1H, benzyl. CH_2 10), 4.98 (d, J = 15.32 Hz, 1H, benzyl. CH_2 1''), 4.84 (d, J = 15.06 Hz, 1H, benzyl. CH_2 10), 4.08 (d, J = 15.34 Hz, 1H, benzyl. CH_2 1'''), 3.66 (dd, J = 11.67, 7.14 Hz, 1H, CH 5), 3.23 (ddd, J = 13.75, 6.72, 2.23 Hz, 1H, CH_2 8), 3.11 (ddd, J = 13.70, 11.55, 5.55 Hz, 1H, CH_2 8), 2.53 (s, 3H, CH_3 2'), 2.25-2.15 (m, 1H, CH_2 6), 1.66-1.55 (m, 1H, CH_2 7), 1.55-1.39 (m, 1H, CH_2 7), 1.13 (m, 1H, CH_2 6).

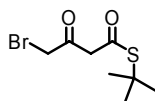
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 196.2 (C6), 171.4 (C4), 167.9 (C2), 137.2 (aromat.), 136.4 (aromat.), 129.0 (aromat.), 128.1 (aromat.), 127.8 (aromat.), 101.2 (C3), 59.3 (benzyl. C10), 55.8 (C5), 48.1 (CH_2 8), 44.2 (benzyl. C1''), 30.1 (CH_3 2'), 22.7 (CH_2 6), 18.0 (CH_2 7).

LC-MS: (C4) 361.03 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.63 min

HRMS (ESI): 361.1911, berechnet: $[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{N}_2+\text{H}^+]$, gefunden: 361.1913

6.4 Verbindungen zu Kapitel 4.3

S-*tert*-Butyl-4-brom-3-oxobutanthioat^[110] (**192**)



Zu einer Lösung von Diketen (1 eq., 1.35 ml, 17 mmol) bei -10 °C in trockenem Tetrachlorkohlenstoff (50 ml) wurde Brom (1 eq., 0.88 ml, 17 mmol) getropft, so dass sich die Lösung jeweils nach Zutropfen entfärben konnte. Die resultierende hellgelbe Lösung wurde für weitere 15 min bei -10 °C gerührt, bevor sie zu einer -10 °C kalten Lösung von *tert*-Butylthiol (5 eq., 9.7 ml, 86 mmol) in trockenem Dichlormethan (100 ml) mittels einer Überführungskanüle getropft wurde. Die Reaktion wurde für weitere 30 min langsam auf Raumtemperatur gebracht und in Wasser (200 ml) geschüttelt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser (100 ml), zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt flash-chromatographisch (Dichlormethan/Petrolether, 2:3) aufgereinigt (gelbes Öl, 3.2 g, 74 %, 12.6 mmol).

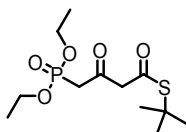
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): (35% Enol) δ ppm = 5.57 (s, 0.35H, C(O)CHC(OH)), 4.03 (s, 1.3H, C(O)CH₂C(O)), 3.82 und 3.78 (2s, 2H, BrCH₂C(O)), 1.51 und 1.47 (2s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 197.0 (BrCH₂C(O)), 194.1 (CH₂C(O)S-*t*butyl), 192.3 (C(OH) Enolform), 167.6, (C(O), Enolform), 101.3 (C(OH)=CHC(O), Enolform), 55.2 (C(O)CH₂C(O)), 49.7 (C(CH₃)₃), 34.4 (BrCH₂C(O)), 30.2 (C(CH₃)₃), 29.8 (C(CH₃)₃), 28.9 (C(CH₃)₃).

LC-MS: (C4) 254.74 [M+H]⁺; 9.27-9.55 min

HRMS (ESI): berechnet [C₈H₁₃BrO₂S+H]⁺: 252.9892 und 254.9872 gefunden: 252.9895 und 254.9874

S-*tert*-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat (**193**)



Diethylphosphit (1 eq., 2.42 ml, 18.8 mmol) wurde zu einer Lösung von Natrium (2 eq., 0.87 g, 37.6 mmol in trockenem THF (50 ml) getropft. Nach Ende der Zugabe

Experimenteller Teil

wurde die Suspension für 90 min unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die entstandene Lösung an Natriumdiethylphosphit wurde dann auf -10 °C gekühlt. *S*-*t*Butyl-4-brom-3-oxobutanthioat **192** (1 eq., 4.3 g, 17.1 mmol) wurde zu einer -10 °C kalten Lösung von Natriumhydrid (1eq., 0.75 g, 60 %, 18.8 mmol) getropft. Die Lösung wurde für weitere 30 min bei -10 °C gerührt, bevor die Lösung an Natriumdiethylphosphit über eine Kanüle zugetropft wurde. Nach weiteren 60 min Rühren bei -10 °C wurde die Reaktion über Nacht auf Raumtemperatur gebracht und in gesättigte Ammoniumchloridlösung und Diethylether (100 ml) gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether nachextrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2*100 ml) und NaCl-Lösung (2*50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das gewünschte Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung als oranges Öl (4.8 g, 91 %, 15.5 mM) gewonnen werden.

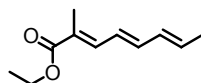
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 5.46 (d, *J* = 3.22 Hz, 0.3H, COCH₂CO), 4.21-4.08 (m, 4H, P(OCH₂CH₃)₂), 3.79 (s, 1.4H, COCH₂CO), 3.24 und 2.70 (m, 2H, COCH₂P), 1.50 (s) und 1.46 (s, 9H, *S*-*t*butyl), 1.33 (t, *J* = 7.07 Hz, 6H, PCH₂CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.3 (CO), 192.5 (CO), 102.4 (C(O)CH=C(OH), Enol), 63.0 (OCH₂CH₃), 62.9 (OCH₂CH₃), 58.7 (COCH₂CO), 49.4 (C(CH₃)₃, Enol), 43.5 (C(CH₃)₃), 42.3 (PCH₂CO), 30.3 (C(CH₃)₃), 29.8 (C(CH₃)₃, Enol), 16.5 (POCH₂CH₃), 16.5 (POCH₂CH₃).

LC-MS: (C₄) 310.72 [M+H]⁺; 8.52-8.91 min

HRMS (ESI): berechnet [C₁₂H₂₄O₅PS+H⁺]: 311.1077, gefunden: 311.1078

(2*E*,4*E*,6*E*)-Ethyl-2-methylocta-2,4,6-trienoat^[109] (**215**)



(2*E*, 4*E*) Hexa-2,4-dienal (1 eq., 0.8 ml, 7.25 mM) wurde in trockenem Toluol gelöst und mit 1-(Ethoxycarbonylethyliden)-triphenylphosphoran (2 eq., 5.3 g, 10 mM) versetzt. Der Ansatz wurde für 48 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt flash-chromatographisch (2 % Diethylether in Pentan) aufgereinigt. (2*E*, 4*E*, 6*E*)-Ethyl 2-methylocta-2,4,6-trienoat (1.0 g, 77 %, 20 mmol) wurde als farbloses Öl erhalten.

R_f-Wert: 0.15

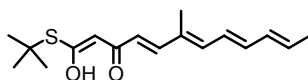
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.20 (d, J = 11.47 Hz, 1H, CH 3), 6.49 (dd, J = 14.75, 10.63 Hz, 1H, CH 5), 6.36 (dd, J = 14.79, 11.45 Hz, 1H, CH 4), 6.19 (ddd, J = 14.88, 10.54, 1.45 Hz, 1H, CH 6), 5.90 (qd, J = 13.97, 6.87 Hz, 1H, CH 7), 4.20 (q, J = 7.11 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 1.94 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CCH}_3$), 1.82 (d, J = 6.66 Hz, 3H, CH_3 8), 1.30 (t, J = 7.12 Hz, 3H, OCH_2CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 168.5 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 139.6 (C3), 138.4 (C4), 133.8 (C5), 131.7 (C6), 126.2 (7), 125.4 (C2), 60.4 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 18.5 (C8), 14.3 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 12.6 ($\text{C}(\text{O})\text{CCH}_3$).

LC-MS: (C4) 181.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.51 min

HRMS (ESI): berechnet: 181.1223 $[\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_2+\text{H}^+]$, gefunden: 181.1222

(1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*, 10*E*) 1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxy-6-methyldodeca-1,4,6,8,10-pentaen-3-on (**217**)



Zu einer Lösung von (2*E*, 4*E*, 6*E*) Ethyl-2-methylocta-2,4,6-trienoat **215** (1 eq., 3.5 g, 19.2 mmol) in trockenem Toluol wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ DIBALH (3 eq., 57 ml, 57 mmol, 1.0 M) getropft. Nach 15 minütigem Rühren wurde die Reaktion mit Wasser (20 ml) abgebrochen und langsam auf Raumtemperatur gebracht. Der Ansatz wurde in eine Suspension aus NaHCO_3 (69.9 g) und MgSO_4 (69.9 g) in Essigester (69.9 ml) gegossen. Anschließend wurde der Feststoff über eine Fritte abgesaugt und der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der entstandene (2*E*, 4*E*, 6*E*)-2-Methylocta-2,4,6-trienol wurde ohne weitere Aufarbeitung in trockenem Dichlormethan gelöst und mit MnO_2 (1 eq., 16.5 g, 190.2 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über Celite filtriert und das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der entstandene (2*E*, 4*E*, 6*E*) 2-Methylocta-2,4,6-trienal (2.59 g, 18.8 mmol, 98 %) mußte ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt werden.

Hierzu wurde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zu einer Suspension von NaH (2.2 eq., 1.1 g, 27.5 mmol) in trockenem THF (50 ml) *S-tert*-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat **193** (1 eq., 3.87 g, 12.48 mol) getropft. Der Ansatz wurde für 1 h gerührt, bevor (2*E*, 4*E*, 6*E*)-2-Methylocta-2,4,6-trienal (1 eq., 1.7 g, 12.5 mmol) zugetropft wurde. Die Reaktion wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht, in Ammoniumchloridlösung (25 ml) gegossen und mit Diethylether (3*25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen

Experimenteller Teil

Phasen wurden mit Wasser (1*20 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (2*25 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Flash-chromatographische Aufreinigung (2 % Diethylether/Pentan) ergaben das gewünschte Produkt (2.5 g, 68 %, 8.6 mmol) als gelbes Öl.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) (85 % Enolform): δ (ppm) = 12.66 (d, J = 1.43 Hz, 0.85H, OH, Enolform), 7.19 (d, J = 15.38 Hz, 1H, CH 5), 6.59-6.31 (m, 3H, CH 4, 7,8), 6.30-6.07 (m, 1H, CH 9), 6.06-5.70 (m, 2H, CH 10-11), 5.42 (s, 0.85H, CH, Enolform), 3.75 (s, 0.3H, 2*CH₂ Ketoform), 1.91 (m, 3H, CHCH₃), 1.85 (dd, J = 9.80, 4.32 Hz, 3H, CH₂C(O)CHCHC(CH₃)), 1.54 (s, 7.65H, C(CH₃)₃, Enolform), 1.49 (s, 1.35H, C(CH₃)₃, Ketoform).

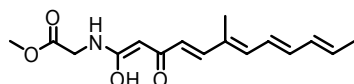
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 196.1 (C1), 167.4 (C3), 149.7 (C5), 142.9 (C6), 137.9 (8), 137.1 (C9), 132.6 (C10), 132.3 (C11), 126.7 (C7), 120.1 (C4), 101.5 (C2), 48.5 (C(CH₃)₃), 30.4 (C(CH₃)₃), 29.9 (C(CH₃)₃), 29.9 (C(CH₃)₃), 18.7 (C12), 12.6 (C6-CH₃).

R_F-Wert: 0.15

LC-MS: (C4) 292.96 [M+H]⁺; 10.22 und 11.24 min

HRMS (ESI): berechnet: 293.1570 [C₁₇H₂₅O₂S+H⁺], gefunden: 293.1572

Methyl-2-((1Z, 4E, 6E, 8E, 10E)-1-hydroxy-6-methyl-3-oxododeca-1,4,6,8,10-pentaenylamino)acetat (**219**)



Glycinmethylester (1.5 eq.) wurde direkt aus Glycinmethylesterhydrochlorid (0.45 g, 3.6 mmol) in Methanol/Wasser mit NaHCO₃ (1 eq., 0.26 g, 3.6 mmol) freigesetzt, einrotiert und im Hochvakuum getrocknet. Der verbleibende Feststoff wurde in trockenem THF gelöst und mit (1E, 4E, 6E, 8E, 10E)-1-(tert-Butylthio)-1-hydroxy-6-methyldodeca-1,4,6,8,10-pentaen-3-on **217** (1 eq., 0.7 g, 2.39 mmol) versetzt. Zusätzlich wurde Silbertrifluoracetat (1.1 eq., 0.58 g, 2.6 mmol) zugegeben und der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der verbliebene Feststoff wurde in Diethylether resuspendiert und die Silbersalze wurden über Celite abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde die Prozedur drei weitere Male wiederholt bis keine Silbersalze mehr ausfielen. Eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC lieferte das gewünschte, jedoch nicht komplett saubere,

instabile Produkt als rotes, zähes Öl (0.125 g, 54 %, 0.43 mmol). Auf eine weitere Aufreinigung wurde auf Grund der Instabilität des Produktes verzichtet. Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt zu Verbindung (3*E*)-3-((2*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-Hydroxy-4-methyldeca-2, 4, 6, 8-tetraenyliden)pyrrolidin-2,4-dion **191**.

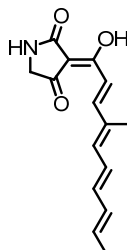
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (~80 % Enol zugeordnet): δ (ppm) = 8.25 (bs, 0.3H, NH), 7.39 (d, $J = 15.56$ Hz, 1H, CH 5), 6.59-6.53 (m, 1H, CH 4), 6.51-6.40 (m, 2H, CH 7-8), 6.31-6.04 (m, 2H, CH 9-10), 5.94 (dq, $J = 20.07, 6.70$ Hz, 1H, CH 11), 4.11 (d, $J = 5.45$ Hz, 2H, $\text{NH}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{O})\text{OMe}$), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.72 (m, 1H, CH 2), 1.85 (d, $J = 5.60$ Hz, 3H, CH_3 12), 1.92 (m, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CHCHC}(\text{CH}_3)$).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 195.1 (C1), 169.8 (C3), 168.3 ($\text{CH}_3\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$), 150.8 (C5), 143.0 (C6), 139.8 (C8), 134.7 (C9), 132.1 (C10), 131.1 (C11), 126.2 (C7), 123.6 (C4), 68.5 (C2), 52.7 (OCH_3), 41.6 ($\text{CH}_3\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$), 18.8 (C12), 12.6 (C6-CH_3).

LC-MS: (C4) 291.81 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.27-8.47 min

HRMS (ESI): berechnet: 292.1543 $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 292.1545

(3*Z*)-3-((2*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-Hydroxy-4-methyldeca-2,4,6,8-tetraenyliden)pyrrolidin-2,4-dion^[109] (**191**)



Methyl-2-((1*Z*, 4*E*, 6*E*, 8*E*, 10*E*)-1-hydroxy-6-methyl-3-oxododeca-1, 4, 6, 8, 10-pentaenylamino)acetat **219** (1 eq., 0.36 g, 1.23 mmol) wurde in trockenem *tert*-Butanol (5 ml) gelöst und portionsweise mit KO^tBu (2.2 eq., 0.3 g, 2.7 mmol) versetzt. Der Ansatz verfärbte sich dunkel und ungelöste Bestandteile lösten sich nach und nach während 1 h Rühren bei Raumtemperatur auf. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser (3 ml) und gesättigter Zitronensäure (200 μl) versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether (5 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (5 ml) gewaschen und über NaSO_4 getrocknet. Anschließend wurde der Ansatz einrotiert und über präparative HPLC aufgereinigt. Das Produkt wurde als oranger amorpher Feststoff (30 mg, 27 %, 0.12 mmol) erhalten.

Experimenteller Teil

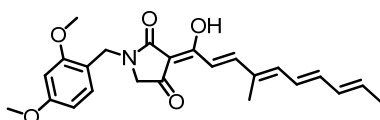
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.97 (t, J = 4.63, 1H, CH 7), 7.37 (dd, J = 15.40, 5.44 Hz, 1H, CH 11), 6.33-6.07 (m, 2H, CH 12, 8), 6.27-6.15 (m, 2H, CH 10, 13), 5.93 (qd, J = 14.01, 6.97 Hz, 1H, CH 14), 4.12 (d, J = 5.13 Hz, 2H, NH, H_2O), 3.67 (s, 2H, CH_2 5), 1.92 (d, J = 7.96 Hz, 3H, CH_3 15), 1.85 (dd, J = 6.94, 1.28 Hz, 3H, CH_3 16).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 195.3 (C2), 191.0 (C6), 172.7 (C4), 150.5 (C8), 142.7 (C9), 139.6 (C11), 134.6 (C12), 133.0 (C13), 132.1 (C14), 126.2 (C10), 123.8 (C7), 103.4 (C3), 46.3 (C5), 41.7 (C5 Ketoform), 18.8 (C15), 12.6 (C9- CH_3).

LC-MS: (C4) 259.96 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 277.84 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 8.0 min

HRMS (ESI): berechnet: 260.1281 $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}+\text{H}]^+$, gefunden: 260.1283

(Z)-1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-3-((2E, 4E, 6E, 8E)-1-hydroxy-4-methyldeca-2,4,6,8-tetraenyliden)pyrrolidin-2,4-dion (**222**)

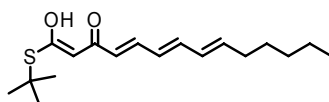


N-Fmoc-Glycin-beladenes Harz wurde gemäß **AAV2** entschützt. Das resultierende Amin wurde nach **AAV3** mit 2,4-Dimethoxybenzaldehyd reduktiv alkyliert. Das daraus entstandene sekundäre Amin wurde mit (1E, 4E, 6E, 8E, 10E)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxy-6-methyldodeca-1,4,6,8,10-pentaen-3-on (2 eq., 0.17 g, 0.56 mmol) und Silbertrifluoacetat (2 eq., 0.13 g, 0.56 mmol) acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelben amorphen Feststoff (7 mg, 6 %, 0.017 mmol).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) (85 % Enolform): δ (ppm) = 7.47 (d, J = 15.28 Hz, 1H, ar.), 7.18-6.97 (m, 2H, ar.), 6.76-6.26 (m, 5H, CH 7, 8, 11, 12, 13), 6.26-6.04 (m, 1H, CH, 10), 5.84 (dd, J = 15.08, 7.17 Hz, 1H, CH, 14), 4.50 (s, 2H, benz.), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.57 (s, 2H, CH_2 5), 2.02-1.82 (m, 3H, CH_3), 1.83-1.68 (m, 3H, CH_3).

LC-MS: (C4) 410.04 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 11.48-11.66 min

(1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxytetradeca-1,4,6,8-tetraen-3-on (**205**)



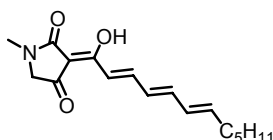
Zu einer Suspension von NaH (2.2 eq., 0.19 g, 7.9 mmol) in trockenem THF (50 ml) wurde bei 0 °C *S*-*t*-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat **193** (1 eq., 1.1 g, 3.6 mmol) getropft. Der Ansatz wurde für 1 h gerührt, bevor (2*E*, 4*E*)-Deca-2,4-dienal (1 eq., 0.58 ml, 3.24 mmol) zugetropft wurde. Die Reaktion wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht, in Ammoniumchloridlösung (25 ml) gegossen und mit Diethylether (3*25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1*20 ml), gesättigter Natriumchloridlösung (2*25 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Flash-chromatographische Aufreinigung (2 % Diethylether/Pentan) ergaben das gewünschte Produkt (0.6 g, 54 %, 1.9 mmol) als gelbes, zähes Öl.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) (Enolform ~ 80 %): δ (ppm) = 12.58 (d, *J* = 1.56 Hz, 1H, OH, Enolform), 7.12 (dd, *J* = 15.04, 11.24 Hz, 1H, CH 5), 6.47 (dd, *J* = 14.78, 10.61 Hz, 1H, CH 6), 6.31-5.84 (m, 4H, CH 4 und 6-8), 5.75 (m, 1H, CH 9), 5.37 (s, 0.8H, CH, Enolform), 3.71 (s, 1H, 0.4H, 2*CH₂ Ketoform), 2.37-1.92 (m, 2H, CH₂ 10), 1.53 (s, 5.3H, C(CH₃)₃, Enolform), 1.46-1.37 (m, 2.7H, C(CH₃)₃, Ketoform), 1.36-1.24 (m, 6H, CH₂ 11-13), 0.97-0.81 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 195.8 (C1), 166.6 (C3), 145.2 (C5), 139.7 (C6), 139.3 (C8), 138.6 (C9), 130.0 (C7), 128.7-123.8 (CH Ketoform), 101.2 (C2), 56.7 (CH₂ Ketoform), 48.2 (C(CH₃)₃), 32.9 (C(CH₃)₃), 31.3 (C(CH₃)₃), 30.1 (C(CH₃)₃), 29.5 (C11), 28.6 (C12), 22.4 (C13), 13.9 (C14).

LC-MS: (C4) 309.06 [M+H]⁺; 12.07-12.65 min

(3*Z*)-3-((2*E*, 4*E*, 6*E*)-1-Hydroxydodeca-2, 4, 6-trienyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**210**)



Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz (1 eq., 0.3 g, 0.98 mmol/g, 0.3 mmol) wurde nach **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene sekundäre Amin wurde mit (1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxytetradeca-1,4,6,8-tetraen-3-on **205** (2 eq., 0.18 g,

Experimenteller Teil

0.6 mmol) und Silbertrifluoracetat (2 eq., 0.13 g, 0.6 mmol) acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als gelben amorphen Feststoff (5.4 mg, 8 %, 0.019 mmol).

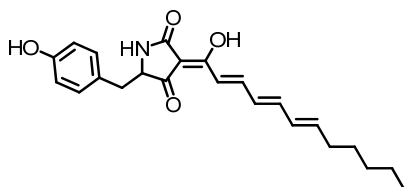
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.62-7.33 (m, 1H, C(OH)CH), 7.14 (d, J = 15.15 Hz, 1H, V), 6.93-6.51 (m, 1H, CH), 6.48-6.34 (m, 1H, CH), 6.35-6.11 (m, 1H, CH), 6.10-5.96 (m, 1H, CH), 3.76 (s, 0.4H, CH_2 5), 3.86 (s, 1.6H, CH_2 5), 3.03 (s, 3H, CH_3 1'), 2.39-1.90 (m, 2H, CH_2 13), 1.59-1.34 (m, 2H, CH_2 14), 1.37-1.23 (m, 4H, CH_2 15-16), 0.89 (t, J = 6.86 Hz, 3H, CH_3 17).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.5 (C2), 189.1 (C6), 173.4 (C4), 145.4 (CH), 144.0 (CH), 142.8 (CH), 130.1 (CH), 128.8 (CH), 120.1 (CH), 100.3 (C3), 57.4 (C5), 33.0 (C1'), 31.3 (13), 28.4 (C14), 22.4 (C15, 16), 13.9 (C17).

LC-MS: (C4) 290.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.33 min

HRMS (ESI): berechnet: 290.1751 $[\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 290.1779

(Z)-5-(4-Hydroxybenzyl)-3-((2E, 4E, 6E)-1-hydroxydodeca-2,4,6-trienyliden)-pyrrolidin-2,4-dion (**213**)



Fmoc-Tyrosin-beladenes Harz (1 eq., 0.5 g, 0.55 mmol/g, 0.28 mmol) wurde nach **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene sekundäre Amin wurde mit (1E, 4E, 6E, 8E)-1-(tert-Butylthio)-1-hydroxytetradeca-1,4,6,8-tetraen-3-on **205** (2 eq., 0.14 g, 0.55 mmol) und Silbertrifluoracetat (2 eq., 0.12 g, 0.55 mmol) acyliert. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als oranges Öl (4.2 mg, 4 %, 0.01 mmol).

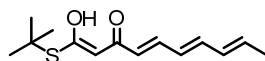
^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) (80 % Enolform) = 9.20 (s, 1H, NH), 7.47-7.07 (m, 2H, ar.), 7.11-6.85 (m, 3H, ar. und CH), 6.79-6.52 (m, 2H, CH), 6.39-5.73 (m, 2H, CH), 5.17 (s, 0.2H), 4.55-4.20 (m, 1H, CH), 3.44 (d, J = 3.12 Hz, 1H, benzyl.), 2.93 (dd, J = 13.88, 4.70 Hz, 1H, benzyl.), 2.76 (dd, J = 13.65, 8.74 Hz, 0.8H, CH 5), 2.23-1.89 (m, 2H, CH_2 13), 1.38 (dt, J = 15.07, 7.62 Hz, 2H, CH_2 14), 1.33-1.22 (m, 4H, CH_2 15-16), 0.86 (dt, J = 6.99, 2.35 Hz, 3H, CH_3).

LC-MS: (C4) 381.91 $[\text{M}+\text{H}]^+$; und 399.90 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 8.40-8.55 min

HRMS (ESI): berechnet: 382.2013 [C₂₃H₂₇O₄N+H⁺], gefunden: 382.2013

[α]_D²⁰ = 24° (c=0.3, Methanol)

(1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxydeca-1,4,6,8-tetraen-3-on (**203**)



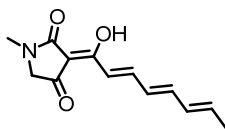
Zu einer Suspension von NaH (2.2 eq., 1 g, 25.8 mmol) in trockenem THF (20 ml) wurde bei 0 °C *S-tert*-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat **193** (1.2 eq., 4 g, 12.9 mmol) getropft. Der Ansatz wurde für 1 h gerührt, bevor (2*E*, 4*E*)-Hexa-2,4-dienal (1 eq., 1.2 ml, 10.8 mmol) zugetropft wurde. Die Reaktion wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht, in Ammoniumchloridlösung (10 ml) gegossen und mit Diethylether (3*10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1*10 ml), gesättigter Natriumchloridlösung (2*10 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Flash-chromatographische Aufreinigung (2 % Diethylether/Pentan) ergab das gewünschte Produkt (0.66 g, 25 %, 2.6 mmol) als gelbes, zähes Öl.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) (70 % Enolform) = 12.57 (bs, 0.7H, OH, Enolform), 7.27-7.05 (m, 1H, CH 5), 6.55 (m, 1H, CH 6), 6.36-6.10 (m, 2H, CH 4, 7), 6.07-5.68 (m, 2H, CH 8-9), 5.37 (s, 0.7H, CH 2 Enol), 3.72 (s, 0.6H, CH₂ Keto), 1.89-1.77 (m, 3H, CH₃), 1.53 (s, 6.3H, C(CH₃)₃, Enol), 1.48 (s, 2.7H, C(CH₃)₃, Keto).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 193.0 (C1), 164.3 (C3), 143.2 (C5), 143.0-124.6 (CH Keto- und Enolform), 106.3 (C2), 59.1 (CH₂ Ketoform), 49.1 (C(CH₃)₃), 30.4 (C(CH₃)₃), 29.9 (C(CH₃)₃), 29.8 (C(CH₃)₃), 24.8 (C10).

LC-MS: (C4) 252.76 [M+H]⁺; 9.33-9.57 min und 252.78 [M+H]⁺; 10.52 min

(*Z*)-3-((2*E*, 4*E*, 6*E*)-1-Hydroxyocta-2,4,6-trienyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**208**)



Fmoc-Sarcosin-beladenes Harz (1 eq., 1.5 g, 0.54 mmol/g, 0.81 mmol) wurde nach **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene sekundäre Amin wurde mit (1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxydeca-1,4,6,8-tetraen-3-on **203** (1 eq., 0.22 g, 0.81 mmol) und Silbertrifluoacetat (1 eq., 0.180 g, 0.81 mmol) in trockenem THF für 15 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz je dreimal mit THF (10 ml), Methanol

Experimenteller Teil

(10 ml) und CHCl_2 (10 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als oranges Öl (19 mg, 10 %, 0.079 mmol).

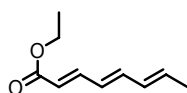
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): (80 % Enolform) δ (ppm) = 7.49 (dd, $J = 15.22, 11.34$ Hz, 1H, CH), 7.22-7.02 (m, 1H, CH), 6.84-6.52 (m, 1H, CH), 6.50-6.29 (m, 1H, CH), 6.22 (m, 1H, CH), 6.17-5.92 (m, 1H, CH), 3.83 (s, 0.4H, CH_2), 3.03 (s, 1.6H, CH_2), 3.73 (s, 3H, NCH_3), 1.86 (d, $J = 6.89$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 191.5 (C2), 174.1 (C6), 173.3 (C4), 145.3 (CH), 143.8 (CH), 137.1 (CH), 131.9 (CH), 129.0 (CH), 120.6 (CH), 100.7 (C3), 57.8 (C5), 28.7 (NCH_3), 19.0 (C13).

LC-MS: (C4) 233.83 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 8.09-8.38 min

HRMS (ESI): berechnet: 234.1125 $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}+\text{H}^+]$, gefunden: 234.11245

(2E, 4E, 6E)-Ethyl octa-2,4,6-trienoat (**201**)



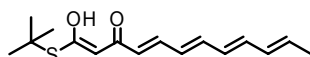
Zu einer Lösung von (2E, 4E,)-Hexadienal (1 eq., 8.6 ml, 78 mmol) in trockenem THF (150 ml) wurde bei 0 °C NaH (1.1 eq., 3.44 g, 86 mmol, 60 %) gegeben. Nach 1 h Rühren wurde Triethylphosphonat (1.1 eq., 17.2 ml, 86 mmol) zugetropft und die Reaktion wurde für eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wurde der Ansatz in gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (50 ml) gegossen und dreimal mit Ether (je 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (60 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (60 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Flash-chromatographische Reinigung (2 % Diethylether in Petrolether) ergab das gewünschte Produkt als hellgelbes zähes Öl (10.75 g, 83 %, 65 mmol).

(1 eq., 2.5 g, 15.1 mmol) des entstandenen (2E, 4E, 6E)-Ethyl-octa-2,4,6-trienoats wurde anschließend in trockenem Toluol (20 ml) gelöst und bei -78 °C mit DIBAL-H (3 eq., 45 ml, 45 mmol, 1.0 M) versetzt. Die Reaktion wurde nach 15 min mit Wasser (16 ml) abgebrochen und nach Erwärmen auf Raumtemperatur in eine Suspension von NaHCO_3 (55 g) und MgSO_4 (55 g) in Essigester (500 ml) geschüttet. Der Feststoff wurde abfiltriert und die verbleibende Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der resultierende Alkohol wurde direkt in trockenem Dichlormethan (25 ml) aufgenommen und für 2 h mit MnO_2 (10 eq., 14.5 g, 150 mmol) gerührt. Anschließend

wurde über Celite filtriert und das Filtrat wurde einrotiert und direkt zur Synthese von (1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxydeca-1,4,6,8-tetraen-3-on eingesetzt **204**.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.41-7.27 (m, 1H, CH 3), 6.52 (dd, J = 14.83, 10.78 Hz, 1H, CH 4), 6.42-6.00 (m, 2H, CH 5-6), 5.93 (m, 1H, CH 7), 5.83 (d, J = 15.26 Hz, 1H, CH 2), 4.20 (q, J = 7.13 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.83 (d, J = 7.08 Hz, 3H, CHCH_3), 1.29 (t, J = 7.13 Hz, 3H, CH_2CH_3).

(1*E*, 4*E*, 6*E*, 8*E*)-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxydeca-1,4,6,8-tetraen-3-on (**204**)



Zu einer Suspension von NaH (2.2 eq., 0.8 g, 33.4 mmol) in trockenem THF (20 ml) wurde bei 0 °C *S-tert*-Butyl-4-diethylphosphino-3-oxobutanthioat **193** (1 eq., 4.7 g, 15.2 mmol) getropft. Der Ansatz wurde für 1 h gerührt, bevor (2*E*, 4*E*, 6*E*)-Octa-2,4,6-trienal (0.8 eq., 1.54 g, 12.6 mmol) in trockenem THF (2 ml) zugetropft wurde. Die Reaktion wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht, in Ammoniumchloridlösung (10 ml) gegossen und mit Diethylether (3*10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (1*10 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (2*10 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Flash-chromatographische Aufreinigung (2 % Diethylether in Pentan) ergab das gewünschte Produkt (2.3 g, 55 %, 8.3 mmol) als oranges, zähes Öl.

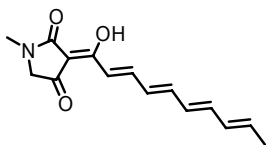
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) (60 % Enolform) = 12.56 (d, J = 1.56 Hz, 0.6H, OH, Enolform), 7.24-7.08 (m, 1H, CH 5), 6.77-6.00 (m, 5H, CH 4, 6-9), 5.95-5.65 (m, 1H, CH 10), 5.36 (s, 0.6H, CH Enol), 3.71 (s, 0.8H, CH_2 Keto), 1.82 (m, 3H, CH_3), 1.52 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Enol), 1.47 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Keto).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 196.1 (C1), 166.9 (C3), 145.2 (C5), 143.6-124.3 (CH Keto- und Enolform), 101.7 (C2), 57.0 (CH_2 Ketoform), 48.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.7 (C11).

LC-MS: (C4) 278.87 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 9.7-9.84 min und 278.83 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 10.6-10.9 min

Experimenteller Teil

(3Z)-3-((2E, 4E, 6E, 8E)-1-Hydroxydeca-2,4,6,8-tetraenyliden)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion (**209**)



Fmoc-Sarcosin beladenes-Harz (1 eq., 1.5 g, 0.54 mmol/g, 0.81 mmol) wurde nach **AAV2** entschützt. Das daraus entstandene sekundäre Amin wurde mit (1E, 4E, 6E, 8E)-1-(*tert*-Butylthio)-1-hydroxydeca-1,4,6,8-tetraen-3-on **204** (1 eq., 0.24 g, 0.81 mmol) und Silbertrifluoracetat (1 eq., 0.180 g, 0.81 mmol) in trockenem THF für 15 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz je dreimal mit THF (10 ml), Methanol (10 ml) und CHCl₂ (10 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Abspaltung gemäß **AAV8** und präparative HPLC (C4-Säule) ergaben die Titelverbindung als orange-farbenes Öl (5.5 mg, 0.02 mmol, 3 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) (85 % Enolform) = 7.44 (dd, *J* = 15.16, 11.49 Hz, 1H, CH 8), 7.07 (d, *J* = 15.17 Hz, 1H, CH 7), 6.73-6.49 (m, 1H, CH), 6.45-6.31 (m, 2H, CH), 6.27-6.05 (m, 2H, CH), 5.84 (m, 1H, CH), 3.75 (s, 0.3H,), 3.66 (s, 1.7H, CH₂), 2.96 (s, 3H, NCH₃), 1.76 (d, *J* = 6.86 Hz, 3H, CH₃).

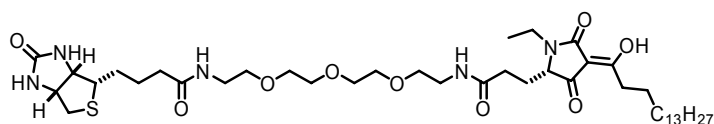
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) (70 % Enolform) = 191.4 (C2), 174.0 (C6), 173.1 (C4), 144.9 (CH), 143.8 (CH), 139.2 (CH), 134.6 (CH), 131.9 (CH), 130.5 (CH), 129.9 (CH), 120.7 (CH), 100.7 (C3), 57.8 (C5), 28.7 (NCH₃), 18.8 (C15).

LC-MS: (C4) 259.88 [M+H]⁺; 8.66-8.92 min

HRMS (ESI): 260.1281, berechnet: [C₁₅H₁₈O₃N+H⁺], gefunden: 260.1282

6.5 Verbindungen zu Kapitel 4.5.1

N-(15-((*s*,*Z*)-1-ethyl-4-(1-hydroxyhexadecylidene)-3,5-dioxopyrrolidin-2-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecyl)-4-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)butanamid (**226**)



(*s*,*Z*)-3-(1-Hydroxyhexadecyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion **147** (1 eq., 33 mg, 0.07 mmol) wurde für 2 h bei Raumtemperatur in Dichlormethan/TFA (1:1) zum Entschützen der Seitenkette gerührt. Koevaporation mit Toluol ergab das gewünschte Produkt, welches ohne weitere Aufreinigung direkt mit

HOBt (11 mg, 1.2 eq.; 0.084 mmol) in trockenem THF/Dichlormethan (1:4) bei 0 °C für 10 min gerührt wurde. Nach Zugabe von DIPEA (1.1 eq., 14 µl, 0.08 mmol), EDC (1.2 eq., 16 µg, 0.084 mmol) und (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamin (1.2 eq., 35 mg, 0.084 mmol) wurde die Reaktion unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer leicht eingengt und anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie 0.1 M HCl und gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und mittels präparativer HPLC (C4-Säule) aufgereinigt. Die Titelverbindung wurde als hellgelbes Wachs erhalten (42 mg, 71 %, 0.05 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.69 (s, 2H, NH Biotin), 6.19 (s, 1H, C(O)NH), 4.60 (dd, *J* = 7.92, 4.48 Hz, 1H, NHCHCH₂S), 4.40 (dd, *J* = 7.90, 4.56 Hz, 1H, NHCHCHS), 4.30-4.09 (m, 1H, CH 5), 3.93-3.75 (m, 1H, CH 1''), 3.64 (m, 8H, OCH₂CH₂O 8'-12'), 3.58 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂O), 3.52-3.35 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂O), 3.25-3.07 (m, 2H, CH₂ 1'', 22'), 2.96 (m, 2H, SCH₂, CH₂ 2'), 2.91-2.71 (m, 2H, SCH₂, CH₂ 2'), 2.36-2.18 (m, 5H, CH₂ 1', CH₂ 7, CH₂ 18'), 2.04-1.91 (m, 1H, CH₂ 1'), 1.78-1.58 (m, 6H, CH₂ 8, CH₂ 21', CH₂ 19'), 1.56-1.42 (m, 2H CH₂ 9), 1.42-1.23 (m, 30H CH₂ 10-20 und 20'), 1.19 (t, *J* = 7.19 Hz, 3H, CH₃ 2''), 0.88 (t, *J* = 6.86 Hz, 3H, CH₃ 21).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 206.1 (C2), 172.2 (C6), 171.8 (C4), 171.7 (CONH 3'), 165.7 (CONH 17'), 164.4 (NHCONH), 97.4 (C3), 80.7-69.7 (OCH₂CH₂O), 61.9 (C5), 60.5 (NHCHCH₂S), 51.6 (NHCHCHS), 52.3 (NHCHCHS), 48.6 (NHCHCH₂S), 43.7 (NHCH₂CH₂O), 43.7 (NHCH₂CH₂O), 35.2 (C 7), 34.1 (C1''), 31.7 (C2'), 29.5 (CH₂CONH), 29.5 (C8), 29.5 (C19'), 29.4 (C 21'), 29.2-22.5 (C1'), C9-20, C20'), 13.9 (C21), 12.7 (C2'').

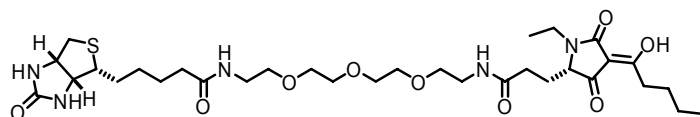
LC-MS: (C4) 838.53 [M+H]⁺; 10.66 min

HRMS (ESI): berechnet [C₄₃H₇₆O₉N₅S+H⁺]: 838.5364, gefunden: 838.5379

[α]_D²⁰ = +10.2° (c = 0.1, CHCl₃)

Experimenteller Teil

N-(15-((*s*,*Z*)-1-Ethyl-4-(1-hydroxypentylidene)-3,5-dioxopyrrolidin-2-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecyl)-5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (**228**)



(*s*,*Z*)-3-(1-Hydroxypentyliden)-5-*tert*-butyl-3-propanoat-1-ethylpyrrolidin-2,4-dion **137** wurde für 2 h (1 eq., 13.5 mg, 0.04 mmol) bei Raumtemperatur in Dichlormethan/TFA (1:1) zum Entschützen der Seitenkette gerührt. Koevaporation mit Toluol ergab das gewünschte Produkt, welches ohne weitere Aufreinigung direkt mit HOBT (1.2 eq., 6.5 mg, 0.048 mmol) in trockenem THF/Dichlormethan (1:4) bei 0 °C für 10 min gerührt wurde. Nach Zugabe von DIPEA (1.1 eq., 7.7 µl, 0.044 mmol), EDC (1.2 eq., 9 mg, 0.048 mmol), und (+)-Biotinyl-3-6,9,-trioxaundecandiamin (1.2 eq., 20 mg, 0.048 mmol) wurde die Reaktion unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer leicht eingeeengt und anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie 0.1 M HCl und gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und mittels präparativer HPLC (C4-Säule) aufgereinigt. Die Titelverbindung wurde als gelbliches Öl erhalten (6.3 mg, 22 %, 0.009 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.53 (s, 2H, NH (Biotin)), 6.45 (s, 1H, C(O)NH), 5.91 (s, 1H, C(O)NH), 5.23 (s, 1H, OH), 4.51 (dd, *J* = 7.76, 4.76 Hz, 1H, NHCHCH₂S), 4.31 (dd, *J* = 7.80, 4.60 Hz, 1H, NHCHCHS), 3.83-3.72 (m, 2H, CH 5, CH 1''), 3.56 (m, 8H, OCH₂CH₂O 8'-12'), 3.49 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂O), 3.43-3.32 (m, 4H, NH₂CH₂CH₂O), 3.16-3.02 (m, 2H, CH₂ 1'', 22'), 2.87 (m, 2H, SCH₂, CH₂ 2'), 2.83-2.77 (m, 2H, SCH₂, CH₂ 2'), 2.30-2.12 (m, 5H, CH₂ 1', CH₂ 7, CH₂ 18'), 1.97-1.86 (m, 1H, CH₂ 1'), 1.73-1.51 (m, 6H, CH₂ 8, CH₂ 21', CH₂ 19'), 1.45-1.28 (m, 4H, CH₂ 9, CH₂ 20'), 1.12 (t, *J* = 7.20 Hz, 3H, CH₃ 2''), 0.87 (t, *J* = 7.20 Hz, 3H, CH₃ 10).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 194.5 (C2), 188.6 (C6), 173.5 (C4), 173.1 (CONH 3'), 172.1 (CONH 17'), 164.4 (NHCONH), 101.2 (C3), 70.3-69.8 (OCH₂CH₂O), 62.8 (C5), 62.1 (NHCHCH₂S), 60.6 (NHCHCHS), 55.2 (NHCHCHS), 40.4 (NHCHCH₂S), 39.3 (NHCH₂CH₂O), 39.3 (NHCH₂CH₂O), 35.5 (C 7), 34.2 (C1''), 32.6 (C2'), 30.0 (CH₂CONH), 28.0 (C8, C19'), 27.8 (C 21'), 25.3 (C1'), 24.4 (C9), 22.4 (C20'), 13.7 (C10), 12.9 (C2'').

LC-MS: (C4) 684.20 [M+H]⁺; 7.29 min

HRMS (ESI): berechnet $[\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_9\text{N}_5\text{S}+\text{H}^+]$: 684.3637 gefunden: 684.3636

$[\alpha]^{20} = +14.3^\circ$ (c = 0.1, CHCl_3)

7. Material und Methoden zum biologischen Teil

7.1 Materialien

7.1.1 Eukaryotische Zelllinien

HeLa: Epithelzellen des Zervixkarzinoms einer Frau namens Henrietta Lacks (ATCC-CL-2).

HLR-ELK1: HeLa Zellen, stabil transfiziert mit einer Luciferase Reporter-kassette und dem offenen Leseraster des GAL4 DBD-Elk1-Fusionsproteins unter Kontrolle eines CMV Promoters (800055; Stratagene, La Jolla, USA).

MDCK: isoliert aus der Niere von *Canis familiaris* (Cocker-Spaniel) (ATCC CRL-1651)

MDCK-F3: MDCK-Zellen, stabil transfiziert mit onkogenem v-H-Ras. Erhalten von Prof. Oliver Müller (Fachhochschule Kaiserslautern).

7.1.2 Antikörper

Dynamamin II-Antikörper (5E4C2F3; sc-81150, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; California, USA)

Importin- β -Antikörper (12534, Sigma, Missouri, USA)

COPA-Antikörper ((T-19): sc-21917, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; California, USA)

p120 Catenin-Antikörper (4989, Cell Signaling Technology Inc.; Danvers, USA)

Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörper (9101, Cell Signaling, Technology, Danvers, USA)

pERK1/2-Antikörper (9102, Cell Signaling, Technology, Danvers, USA)

Monoklonaler β -Tubulin-Antikörper (T4026-2ML, Sigma, Missouri, USA)

Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, Meerrettichperoxidase konjugiert, ImmunoPure® (31460; Pierce, Rockford, USA)

Ziege-Anti-Maus-Antikörper, Meerrettichperoxidase konjugiert, ImmunoPure® (31430; Pierce, Rockford, USA)

Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper, Meerrettichperoxidase konjugiert, ImmunoPure®, (31460; Pierce, Rockford, USA)

IRDye 800CW Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (926-32211, LI-COR Biosciences, Nebraska, USA)

IRDye 680 Ziege-Anti-Maus-Antikörper (926-32221, LI-COR Bioscience, Nebraska, USA)

FITC-Anti E-Cadherin Antikörper (612130, Becton Dickinson, Heidelberg, D)

7.1.3 Proteinstandards

Precision Plus Protein™ Dual Color (161-0374; BioRad, Hercules, USA)

Precision Plus Protein™ Kaleidoscope® (161-0375; BioRad, Hercules, USA)

7.1.4 Reagenzien

Es wurden Reagenzien der jeweils angegebenen Firmen in jeweils höchster Reinheit verwendet.

Acetonitril, 9017 (J.T. Baker, Deventer, NL)

Acrylamid 4K-Lösung 30%, Mix 37,5 : 1, A1672 (AppliChem, Darmstadt, D)

Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x (11140; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Blockierpuffer (927-40000 Odyssey, LI-COR, Nebraska, USA)

Coelestin Blau (C7143; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (17524.02; Serva, Heidelberg, D)

Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor, 11836170001 (Roche, Penzberg, D)

α -Cyano-4-hydroxycimtsäure, C8982 (Sigma, Steinheim, D)

Dimethylsulfoxid (DMSO), 26385 (Serva, Heidelberg, D)

1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT), 1008 (Gerbu, Gaiberg, D)

Eisenammoniumalaun, $(\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2)$, 221260 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Epidermal Growth Factor 13247-051 (Invitrogen, Karlsruhe, D)

Ethylamin Tetraacetat (EDTA), 1034 (Gerbu, Gaiberg, D)

Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-*N, N, N', N'*- Tetraessigsäure (EGTA), E3889 (Sigma, Steinheim, D)

G 418, G81168 (Sigma, Steinheim, D)

Glycerol 99%, 15523 (Riedel-de Haen, Seelze, D)

Material und Methoden zum biologischen Teil

HEPES Natriumsalz, 25249 (Serva, Heidelberg, D)

Hygromycin, 56682 (Fluka, Steinheim, D)

Jodacetamid, I1149 (Sigma, Steinheim, D)

Kälberserum (FCS) 10106-185 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

KCl, 0509 (J.T. Baker, Deventer, NL)

Kim's Ink Liquid No. 29 (Idee-Creativ, Bochum, D)

Luciferin (E1602; Promega, Mannheim, D)

Medium DMEM, 1x, high-glucose 41965 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

2-Mercaptoethanol, 28625 (Serva, Heidelberg, D)

MgCl₂, 0162 (J.T. Baker, Deventer, NL)

MgSO₄, 63136 (Fluka, Steinheim, D)

NaCl, 71379 (Fluka, Steinheim)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1.06580.0500 (Merck, Darmstadt, D)

NaH₂PO₄ x H₂O, 191442 (ICN Biomedicals, Aurora, USA)

Natriumdodecylsulfat (SDS-b), (Gerbu, Gaiberg, D)

Natriumpyruvat MEM, 100 mM, 11360-039 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Nerve Growth Factor (NGF 7s, Maus), 100 µg, 01-170 (Upstate-Millipore, Billerica, USA)

NH₄HCO₃, 09830 (Fluka, Steinheim, D)

N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED), T9281 (Sigma, Steinheim, D)

NP-40, 492015 (Calbiochem, Darmstadt, D)

Penicillin-Streptomycin-Lösung (P4333; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

PIPES, P1851 (Sigma, Steinheim, Hilden, D)

Rinderserum Albumin (BSA) A7906 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

Serie S Sensor Chip SA BR-1005-31 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)

SlimFast Schoko (Allpharm Vertriebs GmbH, Messel, D)

Sodium Pyruvat, 100x 11360070 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Streptavidin Magnetpartikel, 4 mg/ml, S1420S (New England Biolabs, Ipswich, USA)

SNAP Silver Stain Kit II, 24612 (Pierce, Rockford, USA)

Super Signal West Pico Luminol Enhancer Lösung 1856136 (Pierce, Rockford, USA)

Super Signal West Pico Luminol Peroxide Lösung 1856135 (Pierce, Rockford, USA)

Trifluoressigsäure, T6508 (Sigma, Steinheim, D)

Tris, 4855.2 (Roth, Karlsruhe, D)

Triton X-100, 37240 (Serva, Heidelberg, D)

Trypsin-EDTA 0.05%, 25300 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Trypsin, recombinant, proteomics grade, 03708985001 (Roche, Penzberg, D)

Tween 20, 37470 (Serva, Heidelberg, D)

U0126 (U120; Sigma-ALdrich, Steinheim, D)

7.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

96 Kavitäten Mikrotiterplatten, F-Form, 655061 (Greiner, Solingen, D)

BAS Reader 2.9 (Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)

BIACore T 100 Gerät (BIACore AB, Uppsala, Schweden)

DynaPro Titan Gerät (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, USA)

Fluoreszenzküvetten Hellma Suprasil 104F-QS 10 mm (Roth, Karlsruhe, D)

FluoroMAX II (SPEX Instruments, S.A., Inc., New Jersey, USA)

Imaging Plates BAS MP 2040S (Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)

Odyssey Infrared Imaging System mit Software Version 3.0 (LI-COR, Nebraska, USA)

pH-Meter CG 840 (Schott, Mainz, D)

Phosphoimager, BAS-1500 (Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)

Rührer IKAMAG RH (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, D)

Schüttler Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, D)

Spektrometer Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, D)

Spektrometer Infinite M200 (Tecan, Crailsheim, D)

Spektrometer Multiscan Ascent (Thermo-Fischer, Waltham, USA)

Ultraschallbad Sonorex RK 100 H (Bandelin, Mörfelden-Walldorf, D)

Vortex Genie 2 (Roth, Karlsruhe, D)

Material und Methoden zum biologischen Teil

VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, LLC, Northampton, USA)

Zentrifuge Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Hamburg, D)

96-Lochplatten (weiß, 655074, Greiner, Solingen, D)

7.2.1 Gelelektrophorese und Western-Blotting

MiniProtean 3 Gelelektrophorese System (BioRad, Hercules, USA)

PVDF-Transfermembran, 0.45 µm, 88518 (Pierce, Rockford, USA)

Ready Gel Tris-HCl Gel, 15%, 10-well, 30 µl, 161-1103 (BioRad, Hercules, USA)

Ready Gel Tris-HCl Gel, 4–20%, 10-well, 30 µl, 161-1105 (BioRad, Hercules, USA)

Röntgenfilm, CL-Xposure, 8"x10", 34091 (Pierce, Rockford, USA)

Trans-Blot, Transferkammer, 170-3940 (BioRad, Hercules, USA)

7.2.2 Massenspektrometrie

C₁₈ – Säule Atlantis dC₁₈ (Waters, Milford, USA)

C₁₈ – Säule Dionex dC₁₈ (USA)

ESI LTQ (Thermo-Fischer, Waltham, USA)

HPLC Serie U300 Dionex, MS, LTQ Orbitrap, Nano-Elektrospray Ionisation

HPLC Agilent 1100 Serie (Agilent, Santa Clara, USA)

7.2.3 Zellkultur und Mikroskopie

6 Kavitäten Zellkulturschale, 353046 (Falcon, Bedford, USA)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten µClear, schwarz, F-Boden, 655097 (Greiner, Solingen, D)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten Luminiszenz, weiß, F-Boden, 655074 (Greiner, Solingen, D)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten, transparent, steril, 353072 (Falcon, Bedford, USA)

Inkubator Nuair DHD Autoflow, CO₂-Luftmantel Inkubator NU 5510 E (Nuair, Fernwald, D)

Kamera CoolSnap ES (Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA)

Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena, D)

Mikroskop Labovert (Leitz, Wetzlar, D)

Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D)

Sterilbank Microflow (NuncNalge, Rochester, USA)

Wasserbad Memmert (Hettich AG, Bäch, CH)

Zellkulturschale 75 cm², 353136 (Falcon, Bedford, USA)

Zentrifuge

7.3 Methoden

7.3.1 Zellbiologische Methoden

7.3.1.1 MDCK/MDCK-F3-Zellen (Madin Darby Kidney Cells)

MDCK und MDCK-F3-Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM Medium mit essentiellen Aminosäuren (5 %), (L)-Glutamin (5 %), Penicillin/Streptomycin (5 %) und fötalem Kälberserum (5 %) bei 37 °C und 7.5 % CO₂ kultiviert.

7.3.1.2 HeLa Zellen (Henrietta Lacks)

HeLa Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM Medium mit essentiellen Aminosäuren (5 %), (L)-Glutamin (5 %), Penicillin/Streptomycin (5 %) und fötalem Kälberserum (10 %) (hitzeinaktiviert) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

7.3.1.3 HLR Zellen (HeLa Luciferase Reportergene)

HLR Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen in DMEM Medium mit essentiellen Aminosäuren (5 %), (L)-Glutamin (5 %), Penicillin/Streptomycin (5 %), G418 (250 µg/ml), Hygromycin (100 µg/ml), fötalem Kälberserum (10 %) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

7.3.2 Auftauen von Zellen

Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen auf Eis gelagert und dann in einem Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Anschließend wurden sie (1:20) mit dem entsprechenden Medium verdünnt und in 75 cm² Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer ein- bis zweitägigen Anwachsphase wurde das Medium gewechselt.

7.3.3 Passagieren von Zellen

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS (5 ml) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Trypsin/EDTA (je 2 ml) gewaschen. Mit der zweiten Waschfraktion wurde für 2-5 min inkubiert bis sich die Zellen durch Klopfen komplett von der Kulturschale ablösen ließen. Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Medium (6 ml) verdünnt und je nach Bedarf wieder ausgesät.

7.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D) wurde die Zellzahl der jeweiligen Zellsuspension vor Aussaat der Zellen nach Standardprotokoll bestimmt.

7.3.5 Kryokonservierung

Zellen, die eingefroren werden sollten wurden nach dem Trypsinieren bei 4000 rpm für 2 min zentrifugiert und in Einfriermedium (1 ml) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf Aliquots (200 µl) verteilt und langsam (15 min bei 4 °C, 2 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C) gekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingelagert wurden.

7.3.5.1 Puffer und Lösungen

1 x PBS

50 mM NaH₂PO₄

150 mM NaCl

pH 7.4 in H₂O

Trypsin-Lösung

Trypsin-EDTA 0.05 % in DMEM

Einfriermedium

Standardmedium für die jeweilige Zelllinie

10% DMSO

7.3.6 MDCK-F3 Phänotyp-Assay

MDCK-F3-Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^3 pro Kavität in 96-Lochplatten ausgesät. Die Zellen durften für 24 h wachsen, bevor sie mit den zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (10-80 (100) µM) im entsprechenden

Medium behandelt wurden. Jede Konzentration wurde mindestens dreifach getestet. Als Positivkontrollen wurde der MEK-Inhibitor U0126 (20 μM) verwendet. (In sehr frühen Assays wurde Staurosporin als Positivkontrolle genutzt). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit DMSO enthaltendem Medium inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationsphase für 14-16 h wurden die Zellen fixiert und gefärbt.

7.3.6.1 Fixierung und histochemische Färbung mit Coelestin Blau

Um den Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Zellen besser sichtbar zu machen, wurden diese fixiert und angefärbt. Coelestin Blau färbt unspezifisch die ganze Zelle, was gute Aussagen über die gesamte Zellform zulässt. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt und jede Kavität wurde zweimal mit PBS (200 μl) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Formaldehyd (40 μl , 4 %) für 15 min fixiert. Formaldehyd wurde zweimal mit PBS (je 200 μl) gewaschen und die Zellen wurden anschließend für 2 min in PBS stehengelassen, bevor sie für 3 min mit Coelestin Blau (40 μl) gefärbt wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde zweimal schnell mit Ethanol (je 200 μl 70 %) differenziert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS (je 200 μl) gewaschen und anschließend zum Mikroskopieren in PBS gelagert.

7.3.6.2 Lösungen und Reagenzien

Formaldehyd-Stammlösung

37 %ige *para*-Formaldehyd-Lösung

1:10 in PBS

Coelestin Blau

100 ml 5 % Eisenammoniumalaun in H_2O

0.5 g Coelestin Blau zugeben

3 min kochen

abkühlen lassen, filtrieren und 14 ml Glycerin zugeben.

7.3.7 Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin

Die Fluoreszenzfärbung des transmembranen Glykoproteins E-Cadherin wurde mit einem spezifischen FITC-markierten Antikörper durchgeführt. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer (je 200 μl)

Material und Methoden zum biologischen Teil

gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit -20 °C kaltem Methanol (100 µl) für 5 min auf Eis fixiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen wurden für 5 min in PBS (200 µl) stehen gelassen. Anschließend folgte ein zweiter Waschschrift, bevor FITC markierter Anti-E-Cadherin Antikörper (50 µl, (1:500) in PBS) zugegeben wurden. Es wurde für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut zweimal mit PBS (je 200 µl) gewaschen wurde. Die Zellen wurden zum Mikroskopieren in PBS im Dunkeln gelagert.

7.3.8 Mikroskopie

Alle mikroskopischen Bilder wurden mit dem Axiovert 200M (Zeiss) aufgenommen. Für die automatische Bildaufnahme und die anschließende Bearbeitung wurde die Software Metamorph Version 6.2r4 verwendet.

Im Rücktransformationsassay wurden pro Kavität sechs Bilder im Abstand von 50 µm aufgenommen. Alle Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Bildaquisition wurden vorgefertigte Protokolle verwendet. Für die Coelestin Blau Färbung war dies *RücktransCB2.hts* (Dirk Pendzialek).

Zur Aufnahme der Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin wurde ebenfalls das Axiovert 200M (Zeiss) bei 200-facher Vergrößerung (Absorptionsmaximum 490 nm, Emissionsmaximum 520 nm) aufgenommen.

7.3.9 WST-1-Test

Zur Beurteilung des phänotypischen Assays war es wichtig zu wissen, ob die beobachteten Effekte auf die Wirkung der Substanz auf den Metabolismus der Zelle zurückzuführen waren oder durch reine Toxizität verursacht wurden. Um dies zu untersuchen, wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte vor dem Färben der Zellen. In jede Kavität (180 µl Medium) wurde WST-1 (20 µl) gegeben (Verdünnung 1:10). Die Zellen wurden für 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt.

7.3.10 PathDetect® Reporteragen-Assay

Der Reporteragen-Assay wurde in weißen 96-Lochplatten durchgeführt. In jede Kavität wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen in Medium (200 µl) ausgesät und für 24 h inkubiert. Das HLR-Medium wurde anschließend gegen HLR-Hungermedium (100 µl) ausgetauscht, welches mit den zu testenden Substanzen versetzt war. Es wurde zunächst für jede Substanz der Effekt bei einer Konzentration von 30 µM bestimmt. Für aktive

Verbindungen wurde eine Konzentrationsreihe zur IC₅₀-Bestimmung nachgemessen. Als Hintergrundkontrolle dienten mit HLR-Hungermedium und DMSO behandelte Zellen und als Negativkontrolle Zellen, die mit HLR-Hungermedium, DMSO und EGF behandelt wurden. Die Zellen wurden erneut für 18 h inkubiert. Hiernach erfolgte ein weiterer Austausch des Hungermediums gegen HLR-Hungermedium mit EGF (100 µl; 200 ng/ml) und den Substanzen in den angegebenen Konzentrationen. Für die Hintergrundkontrolle wurde das HLR-Medium gegen frisches ohne EGF ausgewechselt. Es wurde wiederum für 6 h inkubiert. Nun wurde das Medium entfernt und es wurde mit einer Mehrkanalpipette möglichst schnell eiskalter Luciferase-Lysepuffer II (30 µl) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 10 min lysiert. Anschließend wurden mit der Mehrkanalpipette Luziferase-Reagenz (je 100 µl) in jede Vertiefung pipettiert und durch dreimaliges Hochpipettieren vermischt. Sofort nach Zugabe wurde die Lumineszenz am Plattenlesegerät (Tecan 200M) gemessen. Die Lumineszenz jeder Kavität wurde für eine Sekunde gemittelt.

7.3.10.1 Puffer und Lösungen

Lysepuffer

40 mM Tricin

50 mM NaCl

2 mM EDTA

1 mM MgSO₄

5 mM DTT

1 % Triton X-100

Luziferase Assaypuffer

40 mM Tricin

0.5 mM ATP

10 mM MgSO₄

0.5 mM EDTA

0.5 mM Coenzym A

0.5 mM Luziferin

10 mM DTT

Material und Methoden zum biologischen Teil

mit 1 M Tris auf pH 7.8 einstellen

EGF-Stammlösung

100 µg/ml

7.3.11 Zellyse

HeLa-Zellen wurden in 75 cm² Kulturschalen ausgesät, bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit EGF (1:10000) für 15 min stimuliert. Anschließend wurde zweimal mit PBS (5 ml) gewaschen, bevor Lysepuffer (1 ml) zugeben und die Zellen mit einem Schaber abgelöst wurden. Der Lyseansatz wurde daraufhin für 20 min auf Eis gestellt und dabei alle 5 min kurz gevortext. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und Membranresten wurde anschließend 20 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C einlagert.

7.3.11.1 Puffer und Lösungen

Lysispuffer

50 mM PIPES

50 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5 mM EGTA

0.1 % NP40

0.1 % Triton X-100

0.1 % Tween 20

0.1 % 2-Mercaptoethanol

Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini

pH 7.4 in H₂O

7.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewandt. Hierbei wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 in Phosphorsäure durch Interaktion mit den Seitenketten von Arginin, Histidin, Lysin,

Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin in seiner anionischen Form stabilisiert. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit Hilfe von BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen erstellt. Zur Bradford-Lösung (1 ml) wurden dann Proteinlösung (5 µl) und Wasser (20 µl) pipettiert. Die Probe wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm gegen eine Referenz von Lysepuffer (5 µl), Wasser (20 µl) in Bradford-Lösung (1 ml) gemessen. Anhand der Extinktionswerte wurde die Proteinkonzentration unter Zuhilfenahme der Eichgeraden berechnet.

7.3.13 Affinitätsaufreinigung

Streptavidinpartikel (0.5 ml, 4 mg/ml) pro Pulldown wurden von der Lagerlösung befreit und mit PBS (0.5 ml) gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde für 30 min mit einer Lösung (0.5 ml, 0.01 mM) der jeweiligen biotinylierten Substanz in PBS inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS (je 0.5 ml) gewaschen, bevor für 1 h bei 4 °C mit HeLa-Lysat (0.5 ml, Proteinkonzentration 1 mg/ml) inkubiert wurde. Die Partikel wurden dann viermal mit Waschpuffer für je 10 min gewaschen.

Zum Direktverdau von den Partikeln wurde noch zweimal kurz mit Verdauopuffer gewaschen.

Zur Aufreinigung über ein SDS-Gel wurden pro 100 µl verwendetem Lysat 10 µl Laemmli-Puffer zugeben, gevortext und für 5-7 min bei 95 °C eluiert.

7.3.13.1 Puffer und Lösungen

Waschpuffer

Lysepuffer

100 mM MgCl₂ in H₂O

Verdaulösung

(0.01 µg/µl Trypsin)

0.1 µg/µl Trypsin-Stock (in 10 mM HCl) 1:1

in 25 mM NH₄HCO₃

7.3.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zunächst wurden die Proteine durch Behandlung mit Mercaptoethanol, SDS und Hitze denaturiert. Das anionische Detergenz SDS maskiert die Proteine mit einer negativen Ladung, so dass sie ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis erhalten. Das Anlegen eines elektrischen Feldes führt dann zu unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine im SDS-Gel.

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde somit das Trenngel in die Apparatur gefüllt und mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisieren für 15 min wurde Ethanol abgesaugt und mit dem Sammelgel überschichtet. Nach Einsetzen des Kammes wurde das Gel für weitere 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert (20 µl beim Minigel, bis zu 50 µl bei kommerziellen Gelen (Ready gel, Tris-HCl-Gel, 12 %, 10-well, 50 µl, 161-1156; Bio-Rad laboratories). Die Proben wurden dann für 10 min bei 20 mA in das Gel einlaufen lassen und anschließend bei konstanten 40 mA für 1-3 h laufen lassen. Anschließend wurde das Gel aus der Apparatur genommen, mit Wasser gespült und entweder zum Blotten weiterverwendet, Silber gefärbt oder zur Färbung mit Coomassie für 60 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Abgießen der Färbelösung wurde mit Entfärber über Nacht entfärbt.

Silberfärbung wurde nach Anleitung mit dem SilverSNAP[®] Stain Kit (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt.

7.3.14.1 Puffer und Lösungen

4 x Trenngelpuffer

1.5 M Tris-Cl, pH 8.8

4x Sammelgelpuffer

0.5 M Tris-Cl, pH 6.8

SDS-Stammlösung

10 % SDS in H₂O

(APS)-Stammlösung

10 % in H₂O

10 x Laufpuffer

0.25 M Tris

1.92 M Glycine

1 % SDS

2 x Probenpuffer

125 mM Tris-Cl

4 % SDS

20 % Glycerol

5 mM DTT

Färbelösung

0.1 % Coomassie Brilliant Blue G-250

20 % Methanol

10 % Eisessig

Entfärber

20 % Methanol

10 % Eisessig

7.3.15 Tryptischer Verdau

Um die Proteine aus der Affinitätsaufreinigung identifizieren zu können, wurden diese tryptisch verdaut. Trypsin ist eine Endopeptidase und gehört zu den Serinproteasen. Trypsin spaltet Peptidbindungen regioselektiv C-Terminal nach Arginin und Lysin, solange kein Prolin als nächste Aminosäure folgt. NH₄HCO₃ als Verdauopuffer sorgt für den passenden pH-Wert. Über ESI (Electrospray Ionisation)-MS/MS-Analysen lassen sich anschließend die Peptidsequenzen aufschlüsseln.

Material und Methoden zum biologischen Teil

Als Vorbereitung für die Nano-LC-MS/MS wurden die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Gelbanden in 8-10 gleich große Stücke geschnitten. Jedes Gelstück wurde weiter in 1-2 mm große Stücke zerkleinert. Die Gelbruchstücke eines Abschnitts wurden für 30 min in Waschlösung 1 (200 µl) bei 37 °C geschüttelt.

Diese wurde anschließend durch Waschlösung 2 ersetzt und es wurde für weitere 15 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde auch diese Waschlösung entfernt und durch Reduktionslösung (100 µl) ersetzt. Es wurde bei 37 °C für weitere 45 min geschüttelt. An die Reduktion schloss sich eine Alkylierung (100 µl) an, für die für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt wurde.

Nach Entfernen der Alkylierungslösung wurde nochmals zweimal für je 15 min mit Waschlösung (200 µl) 2 gewaschen. Danach wurde wiederum die Waschlösung entfernt, es wurde Acetonitril (50 µl) zugeben und für 10 min dehydriert. Nach Entfernen des Acetonitrils wurden die Gelstücke im Abzug für 5 – 10 min getrocknet.

Anschließend wurde Verdaulösung (10 – 15 µl je nach Größe der Gelstücke, die Gelstücke sollten vollständig quellen) zugeben und für 15 min bei Raumtemperatur quellen gelassen. Danach wurde nochmals Verdaupuffer (20 µl) ohne Trypsin nachgegeben und es wurde über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Gelstücke bei 0 °C in einem Ultraschallbad für 30 min inkubiert und danach der Überstand abgenommen. Zum Dehydrieren wurde Acetonitril (30 µl) auf die Gelstücke gegeben und nach 15 min Inkubation wurde der neue Überstand mit dem alten vereinigt. Die Lösungen wurden im Vakuum eingeeengt und in TFA (15 µl, 0.1 %) aufgenommen, um an der Nano-LC-MS/MS vermessen zu werden.

Zur Untersuchung mit der LC-MS/MS wurden die Proteine ohne vorherige Auftrennung direkt von den Magnetpartikeln verdaut. Hierzu wurden die Partikel zweimal mit Verdaupuffer gewaschen und anschließend in Verdaulösung (50-100 µl) suspendiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde der Überstand von den Partikeln entfernt und es wurden 10-20 µl für die ESI-MS/MS Analyse entnommen.

7.3.15.1 Puffer und Lösungen

Waschlösung 1

25 mM NH_4HCO_3 in H_2O /Acetonitril (3:1)

Waschlösung 2

25 mM NH_4HCO_3 in H_2O /Acetonitril (1:1)

Reduktionslösung

50 mM DTT gelöst in 25 mM NH_4HCO_3

Alkylierungslösung

55 mM Jodacetamid in 25 mM NH_4HCO_3

Verdauungslösung

0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3

7.3.16 HPLC-ESI (High performance liquid chromatography-Electrospray ionisation)-Massenspektrometrie

Die Proteingemische aus der Affinitätschromatographie wurden anschließend über HPLC aufgetrennt und mittels MS/MS analysiert. Hierzu wurde eine Agilent HPLC-Anlage mit Autosampler und UV-Diodenarray-Detektor mit einem Spektralbereich von 190 – 400 nm verwendet. Die Temperatur im Autosampler betrug konstante 10 °C. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Waters Atlantis dC₁₈ mit einer Partikelgröße von 3 μm , einer Länge von 150 mm und einem Durchmesser von 2.1 mm.

Es wurden jeweils 20 μl Probe auf die Säule gegeben und über einen Zeitraum von 85 min bei einer Flußrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluiert. Der Lösungsmittelgradient ist in Tabelle 7-1 festgehalten.

Material und Methoden zum biologischen Teil

Tabelle 7-1: Lösungsmittelgradient für die HPLC

Zeit (min)	Lösungsmittel	
	(A: 0.1 % HCO ₂ H in H ₂ O; B: 0.1 % HCO ₂ H in Acetonitril)	
0-5	isokratisch	100 % A, 0 %B
5-60	kontinuierlich	40 % A, 60 %B
60-70	kontinuierlich	20 % A, 80 %B
70-75	kontinuierlich	20 % A, 80 %B
75-76	kontinuierlich	100 % A, 0 %B
76-85	isokratisch	100 % A, 0 %B

Die aufgenommenen Spektren wurden im Bioworks Browser überprüft und mit Hilfe von 'TurboSequestSearch' in ein dta-Format umgewandelt. Dieses Format lässt sich mit Hilfe des Programs 'Merge MS/MS' der Firma Finnigan in ein Dateiformat umwandeln, welches in die Suchmaske von MASCOT (www.matrixscience.com^[122]) geladen werden kann. Folgende Einstellungen wurden für die Suchmaske verwendet:

Database: SwissProt und/oder NCBI

Taxonomy: Human

Enzyme: Trypsin

Missed Cleavages: 0

Fixed Modifications: keine

Variable Modifications: Carbamidomethyl

Quantitation: none

Peptide tolerance: 1.2 Da

¹³C: 0

MS/MS tolerance: 0.6 Da

Peptide Charge: +1, +2 und +3

Die Signifikanzgrenze wurde auf ($p < 0.05$) gesetzt.

Es wurden sechs unabhängige Experimente durchgeführt. Als verlässliche Proteine wurden nur solche betrachtet, welche in fünf **226**-Experimenten und keinem **228**-Kontrollexperiment gefunden wurden.

7.3.17 Nano-HPLC-ESI-MS/MS

Zur Identifizierung mittels Nano-LC-MS/MS wurden die über ein SDS-Gel vorgetrennten Proteine tryptisch verdaut (17.3.15). Die tryptischen Peptide wurden anschließend über eine Nano-HPLC aufgereinigt (Ultimate 3000 Nano-HPLC, Dionex, Idstein, D), die mit einer analytischen Pumpe für die Trap-Säule, einer analytischen Pumpe für den Nano-Splitter, einem Flussmanager, einem Autosampler und einem variablen Zwei-Wellenlängen-Detektor ausgestattet war. Die MS- und MS/MS-Experimente wurden an einem Orbitrap-Massenspektrometer, welches mit einer LTQ XL-linearen Ionenfalle (Thermo Electro Corporation, Dreieich, D) ausgestattet war. Als Lösemittel wurden nur LC-MS-Standard-Lösemittel (Chromasolv, Riedel-de-Haen, Taufkirchen, D) verwendet. Die tryptischen Peptide (10 µl in 0.1 % TFA) wurden injiziert und auf einer C₁₈ PepMap 100 Säule (5 µm, 100 Å, 300 µm ID*5 mm, Dionex, Idstein, D) mit TFA (0.1 %) und einer Flussrate von 30 µl/min für 5 min angereichert. Anschließend wurden die Peptide über eine C₁₈ PepMap 100 Säule (3 µm, 100 Å, 75 µm ID*15 cm, Dionex, Idstein, D) aufgetrennt (linearer Gradient mit 96.8 % Lösemittel A und 3.2 % Lösemittel B, dieser wird auf 62.0 % Lösemittel A und 38.0 % Lösemittel B in 145 min gesteigert, die Flussrate beträgt hierbei 300 nl/min (Lösemittel A: H₂O mit 0.1 % HCO₂H, Lösemittel B: Acetonitril mit 0.1 % HCO₂H). Die Nano-HPLC ist online mit dem Orbitrap-Massenspektrometer über einen „standard coated Pico Tip emitter“ (ID 75 µm, Tip-ID 30 µm, New Objective, Woburn, MA, USA) gekoppelt. Vorläufer-Scans wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60000 aufgenommen. Von den fünf stärksten Ionen wurden simultan in der linearen Ionenfalle MS/MS-Spektren aufgenommen. Listen der entsprechenden Signale wurden mit dem Bioworks Rev. 3.3 (Thermo Electron Corporation, Dreieich, Germany) generiert. Zur Identifizierung der Proteine wurden die Daten wiederum mit der SwissProt Datenbank (Version 54.0) mit Hilfe des MOWSE algorithm [MASCOT: www.matrixscience.com^[122]] analysiert. Hierbei wurde eine MS/MS-Suche für zwei- und dreifach geladene Ionen ausgeführt. Außerdem wurden die Suchen wiederum für komplette enzymatische Trypsinspaltungen durchgeführt, hierbei wurde eine Fehlsplaltung zugelassen. Die Klassifizierung wurde auf „mammalian“ gesetzt und als mögliche Proteinmodifikation musste wieder die Carbamidomethylierung angegeben werden. Im Gegensatz zur LC-MS/MS-Analyse wurde die Genauigkeit für die Peptidmassen auf 10 ppm und für die MS/MS-Daten auf 0.5 Da herunterkorrigiert. Die Signifikanzgrenze wurde entgegen der LC-MS/MS-Analyse auf p < 0.01 herabgesetzt. Zusätzlich wurde per Hand nachkontrolliert, dass lediglich Proteine, in denen mehr als zwei proteinspezifische Peptidstücke identifiziert wurden, für weitere Validierungen

anerkannt wurden. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt und nur Proteine, die in mindestens drei **226** Experimenten und keinem Kontroll-**228**-Experiment identifiziert wurden, wurden weiter als Hits behandelt.

7.3.18 Western-Blots

Die durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine sollten mit spezifischen Antikörpern durch Western-Blots bestätigt werden. Hierzu wurden die zuvor gelelektrophoretisch getrennten Proteine 7.3.14 durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Für den Transfer wurde das Transblot-System von Biorad verwendet, bei welchem nur die Membran, das Gel und die Filterpapiere, welche den Kontakt zu den Elektroden herstellen, mit Puffer getränkt werden. Der Nachweis erfolgte mit einem Zwei-Antikörper-System. Hierzu wurde die Membran mit dem primären Antikörper gegen das Protein von Interesse inkubiert. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper zugegeben, welcher spezifisch gegen den primären Antikörper ist. Dies führte zu einer Signalverstärkung und somit zu einer höheren Empfindlichkeit. Der sekundäre Antikörper war zudem mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Durch Zugabe von H_2O_2 und Luminol konnte die entstehende Lumineszenz mit einem Röntgenfilm festgehalten und so das Protein detektiert werden.

Hierzu wurde wie in 7.3.13 beschrieben eine Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Partikeln (250 μ l Partikel und 250 μ l Lysat pro Versuch) durchgeführt. Dazu wurde zum Nachweis der Proteine p120 Catenin und Importin β mit verdünntem Lysat (0.2 mg/ml) und für die Proteine Dynamin II und COPA (0.4 – 0.5 mg/ml) inkubiert. Für Konkurrenzexperimente wurde Lysat der angegebenen Konzentrationen mit freiem Melophrin A (250 μ M, 500 μ M und 1 mM) für 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Die Lysate wurde anschließend mit Kontrolllysate ohne Inhibitor wie bereits beschrieben zur Inkubation der Inhibitor beladenen Magnetpartikel eingesetzt. Nach beendetem Waschprotokoll wurde dann mit Probenpuffer (25 μ l pro 250 μ l Lysat) eluiert. Dem bereits beschriebenen Protokoll folgend wurden die Proteingemische per SDS-Gel aufgetrennt (12 %), hierzu wurden für die Proteine COPA und Dynamin II pro Experiment 20 μ l, zum Nachweis von p120 Catenin 15 μ l und für Importin β nur 6 μ l aufgetragen. Die Gele wurden nach beendeter Auftrennung mit H_2O gespült und für 20 min in Blotpuffer inkubiert. Parallel wurde die PVDF-Membran vorbereitet und für 20 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurde sie ebenfalls in Blotpuffer inkubiert.

Mit Blotpuffer vollgesogenes Filterpapier wurde auf die untere Elektrode gelegt, hierauf wurden dann die Membran, Gel und das zweite Filterpapier so gestapelt, dass keine Luftblasen im System entstanden. Nach Auflegen der oberen Elektrode wurden die Proteine 40 min bei konstanten 20 V transferiert. Anschließend wurde die Membran mit H₂O gespült und für 30 – 60 min mit Tusche gefärbt. War die Übertragung erfolgreich, wurde für 60 min auf dem Schüttler blockiert. (Blockierlösungen variieren mit verwendetem Antikörper, s. 7.3.18.1).

Anschließend wurde die Blockierlösung entfernt und für 15 h bei 4 °C unter Schütteln mit primärem Antikörper (10 ml, s. 7.3.18.1) inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde dreimal für je 10 min mit TBS-T (10 ml) gewaschen und anschließend für 1 h mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (10 ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösungen wurde erneut dreimal mit TBS-T (je 10 min) gewaschen. Nun wurde Substratlösung zugegeben und für 5 min inkubiert. Die Membran wurde dann aus der Lösung in eine Belichtungskassette überführt, es wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und zwischen 30 s und 30 min (je nach Stärke des Signals) belichtet. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert.

7.3.18.1 Puffer und Lösungen

TBS

100 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

pH 7.5

TBS-T

0.1 % Tween 20 in TBS

Färbelösung

0.1 % Tusche in TBS-T

Substratlösung

Super Signal West Pico Enhancer Lösung (1:1) mit Super Signal West Pico Peroxid Lösung

Tabelle 7-2: Blockier- und Inkubierbedingungen der verschiedenen Antikörper

	Dynamamin II	p120 Catenin	Importin β	COPA
Blockierbedingungen (in TBS-T)	5 % Milchpulver	1 % Slimfast	2 % Slimfast	1 % Slimfast
1° Antikörper (in TBS-T)	5 % BSA 1:200	1 % Slimfast 1:1000	1 % Slimfast 1:2000	1 % Slimfast 1:200
2° Antikörper (in TBS-T)	1:10000	1:10000	1:10000	1:10000

7.3.19 Oberflächen-Plasmonen-Resonanz

Aufgereinigtes Dynamamin II war ein großzügiges Geschenk von Frau Dr. S. Eschenburg (Max-Planck-Institut Dortmund). Oberflächen-Plasmonen-Resonanzexperimente wurden in Kooperation mit Dr. Alexander Wolf (CGC Dortmund) an einem BIAcore T 100 Gerät (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) bei 25 °C durchgeführt. Hierzu wurde der Serie S Sensor Chip SA (BR-1005-31) wie durch den Hersteller beschrieben mit NaCl (1 M) in NaOH (50 mM) aktiviert. Anschließend wurde der biotinylierte Ligand (**226**, 0.1 μM) im BIAcore-Puffer für 1 min bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ immobilisiert. Auf demselben Chip wurde Verbindung **228** in einer separaten Flusszelle als negative Kontrolle immobilisiert. Nun wurden die Proteine für 4 min mit steigenden Konzentrationen (Dynamamin II: 0.188, 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6 und 12 μM , Dynamamin I: 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μM und DNM1L: 0.031, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μM) im BIAcore Puffer und bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Dem folgte eine fünfminütige Dissoziationsperiode. Anschließend wurde die Oberfläche regeneriert (Kontaktzeit 1 min, Flussrate 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, Stabilisierungszeit 1 min). Insgesamt wurden Daten von drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Der Auswertung wurde ein (1:1)-Bindungsmodell zugrunde gelegt. Der K_d wurde mit $13.8 \pm 8.0 \mu\text{M}$ ($k_{\text{on}} = 1.42 \cdot 10^3 \pm 1.54 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{diss}} = 1.95 \cdot 10^{-2} \pm 9.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) berechnet. Die Dissoziationskonstanten für Dynamamin I und DNM1L wurden aus den Gleichgewichtsdaten bei verschiedenen Konzentrationen mittels eines sigmoidalen Gleichgewichtsmodells ($y = D + BL_{\text{max}}(1 - (x^n / (K^n + x^n)))$), BL_{max} = maximale y-Wert, K_d = EC_{50} -Wert, n = Slope-Faktor, D = minimaler y-Wert) berechnet. Es ergaben sich die folgenden Dissoziationskonstanten: $K_d = 0.40 \pm 0.10 \mu\text{M}$ für Dynamamin I (1-760) und $K_d = 0.60 \pm 0.04 \mu\text{M}$ für Dynamamin I-like.

7.3.19.1 Puffer

Aktivierungspuffer

1 M NaCl

50 mM NaOH

BIACore-Puffer

10 mM HEPES

5 mM MgCl₂

150 mM NaCl

0.005 % NP40

pH 7.5

Regnerierpuffer

100 mM NaOH

7.3.20 Isothermale Titrationskalorimetrie

Isothermale Titrationskalorimetrie wurde an einem VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, LLC, Northampton, USA) in Kooperation mit Dr. André Schönichen (MPI Dortmund) durchgeführt. Importin- β war ein großzügiges Geschenk von Dr. Ingrid Vetter (MPI Dortmund). Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Spritze mit Melophlin A (0.5 mM) im ITC-Puffer befüllt und zur mit Puffer befüllten Messzelle titriert. Zur Messung wurde die Spritze mit Melophlin A (0.2 mM) und die Messzelle mit Importin- β (0.02 mM) befüllt.

7.3.20.1 Puffer

ITC-Puffer

50 mM Tris

5 % Glycerin

1 mM TCEP

pH 7.5

7.3.21 Assay zur Internalisierung von Transferrin^[174]

Die Experimente zur Internalisierung von Transferrin wurden in einer Kooperation mit Frau Amrita Rai des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. D. Manstein am Institut für Biophysikalische Chemie in Hannover durchgeführt.

Die Endozytose von fluorophorgelabeltem Transferrin wurde wie in der Literatur beschrieben untersucht.^[162, 174] Zunächst wurden HeLa-Zellen mit FCS-freiem Medium gewaschen und anschließend mit Inhibitoren in ebenfalls FCS-freiem Medium (Meloplin A: 1, 5, 10, 20, 40, und 80 µM) und Dynasore (synthetisiert wie in der Literatur beschrieben^[176], 80 µM als Positivkontrolle) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach den 3 h wurde das Medium durch Medium ohne FCS, aber mit Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen und zusätzlichem Transferrin-Alexa 546 (1:200) ersetzt. Um eine Bindung von Transferrin an den Rezeptor auf der Zelloberfläche zu ermöglichen, wurden die Zellen für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde überschüssiges Transferrin sowie Inhibitor mit FCS-freiem Medium (2 ml) gewaschen und eine Zellschale als Null-Zeitpunkt fixiert und gefärbt. Die anderen Zellschalen wurden erneut mit FCS-freiem Medium (2 ml) mit Inhibitoren für weitere 5 min diesmal bei 37 °C inkubiert. Die erhöhte Temperatur erlaubte hierbei die Internalisierung des Transferrins durch Endozytose. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und es wurde viermal mit Glycin-Puffer (je 2 ml) und zweimal mit PBS (je 2 ml) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (2 ml) für 4 min fixiert, mit DAPI angefärbt und auf Objektträger geklebt. Zur Visualisierung wurden Epi-Fluoreszenzbilder bei 543 nm auf einem OLYMPUS Mikroskop, welches mit einer Hamamatsu C10600 ORCA-R2 CCD Kamera ausgestattet war, aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde das absolute Alexa Signal für jeden Bildausschnitt berechnet und von diesem die Hintergrundintensität abgezogen. Zusätzlich wurde das Signal auf die Anzahl der Zellen pro Bildausschnitt normiert. So wurden für jedes Experiment mindestens 200 Zellen ausgewertet. Vom Signal der Zellen, die Transferrin internalisiert hatten, wurde jeweils das Signal des Null-Zeitpunkts (oberflächengebundenes Transferrin) abgezogen. Als 100 % Signal (100 % Internalisierung) wurde auf das Signal von mit Medium und DMSO behandelten Zellen normiert, so dass die Inhibition relativ zu dieser Aufnahme gezeigt wurde. Die gezeigten Daten entstammen zwei unabhängigen Experimentserien.

Für die Erholungsexperimente wurden die Inhibitoren mit PBS ausgewaschen und die Zellen durften sich für 12 h erholen. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit Transferrin-Alexa behandelt und die Internalisierung wurde quantifiziert.

7.3.21.1 Puffer

Glycin-Puffer

50 mM Glycin

150 mM NaCl

pH 3.0

7.3.22 p-ERK1/2 Western-Blots

HeLa Zellen wurden mit einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 3.5 cm Schälchen ausgesät und über Nacht inkubiert. Dann wurden die Substanzen Meloplin A (10 und 30 μM), U0126 (30 μM) und DMSO in Hungermedium auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die HeLa-Zellen für 5 min mit EGF (100 ng/ml) inkubiert. (MDCK-F3-Zellen wurden für 10 min mit FCS inkubiert). Danach wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen in RIPA-Puffer (100 μl) mit Phosphatase- und Proteaseinhibitor aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schälchenboden entfernt. Die Lysate wurden zum Aufschluss fünfmal durch eine Kanüle (0.9 mm Durchmesser) gezogen und bei 13000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde von den Zelltrümmern getrennt und bei -20 °C eingefroren. Die Zelllysate ($\geq 50 \mu\text{g}$) wurden mit Probenpuffer verdünnt und elektrophoretisch auf einem 12.5 % Gel aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und die Membran wurde mit Blockpuffer (LI-COR Biosciences) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde mit pERK1/2- und Tubulin-Antikörpern jeweils (1:1000) in Blockierpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde mit den sekundären Antikörpern (IRDye 800CW Ziege Anti-Kaninchen und IRDye 680 Ziege Anti-Maus) bei einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierpuffer inkubiert. Mittels des Odyssey Infrared Imaging Systems wurden die Signalintensitäten detektiert und mit der AIDA Image Analyzer Software ausgewertet.

7.3.22.1 Puffer

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl

1 % NP40

0.25 % Natriumdeoxychelate

150 mM NaCl

Material und Methoden zum biologischen Teil

1 mM EDTA

1*Complete protease inhibitor tablets

1 mM Na₃VO₄

1 mM NaF

pH 7.4

7.3.23 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung wurde an einem DynaPro Titan Gerät ausgestattet mit der Software Dynamics 6.7.7.9 in Kooperation mit Dr. Holger Gerlach gemessen. Hierzu wurde Melophlin A in PBS auf verschiedene Konzentrationen verdünnt (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 50 mM) und durch einen 0.2 µm Einmalfilter filtriert. Die Streuungsintensität wurde bei 25°C gemessen. Die Proben wurden mit aufsteigender Konzentration vermessen und ab einer Konzentration von 20 µM wurde ein sprunghafter Anstieg der Streuungsintensität (~ 10 fach) beobachtet. Dies weist auf die Ausbildung von Aggregaten ab dieser Konzentration hin. Die Bildung einheitlicher Mizellen konnte nicht nachgewiesen werden.

7.3.24 GTPase-Assay

Zur Untersuchung des Einflusses von Melophlin A auf die GTPase-Aktivität von Dynamamin II im stationären Zustand wurde ein Enzym-gekoppelter Assay eingesetzt. Diese Experimente wurden von Dr. Thomas Reubold durchgeführt. In diesem Assay wird hydrolysiertes GTP schnell aus GDP und Phosphoenolpyruvat mittels Pyruvatkinase nachgebildet. Das dabei entstehende Pyruvat wird durch Lactatdehydrogenase zu Lactat konvertiert, wozu NADH als Cosubstrat benötigt wird. Da für jedes generierte GTP-Molekül ein Molekül NADH zu NAD⁺ umgesetzt wird, kann der spektroskopische Nachweis von NADH zum Ablesen des Reaktionsfortschritts genutzt werden. Die Reaktionen wurden durch Mischen von 100 µl des Mastermixes (2 mM Phosphoenolpyruvat, 1.2 mM NADH, 1 mM GTP und 2 µl Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase pro 100 µl in Assay-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTE, 5 mM MgCl₂) mit 100 µl Proteinlösung (1 µM Dynamamin II, 20 µM GST-Grb2 und die doppelte der finalen Konzentration an Melophlin A in DMSO) gestartet. Vor dem Mischen wurden die beiden Komponenten für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl jeder Reaktionsmischung in eine 96-Lochplatte überführt und der Reaktionsfortschritt wurde mit einem Tecan-Plattenleser (infinite M200) bei 37 °C und einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] R. D. Fleischmann, M. D. Adams, O. White, et al., *Science* **1995**, 269, 496-512.
- [2] C. M. Fraser, J. D. Gocayne, O. White, et al., *Science* **1995**, 270, 397-403.
- [3] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, et al., *Nature* **1998**, 396, 190-198.
- [4] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, et al., *Science* **1996**, 274, 546.
- [5] E. W. Myers, G. G. Sutton, A. L. Delcher, et al., *Science* **2000**, 287, 2196-2204.
- [6] *Nature* **2004**, 431, 931-945.
- [7] L. Stein, *Nature Reviews Genetics* **2001**, 2, 493-503.
- [8] M. H. Vitaterna, D. P. King, A. M. Chang, et al., *Science* **1994**, 264, 719-725.
- [9] D. P. Walsh, Y. T. Chang, *Chemical Reviews* **2006**, 106, 2476-2530.
- [10] G. E. Ward, K. L. Carey, N. J. Westwood, *Cellular Microbiology* **2002**, 4, 471-482.
- [11] P. A. Sharp, *Genes Dev* **1999**, 13, 139-141.
- [12] J. Kurreck, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48, 1378-1398.
- [13] F. Darvas, G. Dorman, P. Krajcsi, et al., *Current Medicinal Chemistry* **2004**, 11, 3119-3145.
- [14] R. S. Lokey, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, 91-96.
- [15] C. M. Crews, U. Splittgerber, *Trends in Biochemical Sciences* **1999**, 24, 317-320.
- [16] L. Burdine, T. Kodadek, *Chemistry & Biology* **2004**, 11, 593-597.
- [17] K. M. Specht, K. M. Shokat, *Current Opinion in Cell Biology* **2002**, 14, 155-159.
- [18] R. Flaumenhaft, D. S. Sim, *Chemistry & Biology* **2003**, 10, 481-486.
- [19] H. E. Blackwell, Y. D. Zhao, *Plant Physiology* **2003**, 133, 448-455.
- [20] T. K. Kim, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, 37, 53-58.
- [21] P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, 360-367.
- [22] X. F. S. Zheng, T. F. Chan, *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 197-205.
- [23] K. Shokat, M. Velleca, *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 872-879.
- [24] R. L. Strausberg, S. L. Schreiber, *Science* **2003**, 300, 294-295.
- [25] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, 2879-2890.
- [26] J. Huang, H. Zhu, S. J. Haggarty, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 16594-16599.
- [27] Y. Wang, T. Zhong, L. Qian, et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 331, 303-308.
- [28] P. Arya, R. Joseph, D. T. Chou, *Chemistry and Biology* **2002**, 9, 145-156.

Literaturverzeichnis

- [29] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, et al., *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *41*, 307-311.
- [30] T. Lessmann, M. G. Leuenberger, S. Menninger, et al., *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 443-451.
- [31] M. A. Koch, L. O. Wittenberg, S. Basu, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Early Edition* **2004**, *101*, 16721-16726.
- [32] M. D. Burke, E. M. Berger, S. L. Schreiber, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 14095-14104.
- [33] C. T. Aiken, A. J. Tobin, E. S. Schweitzer, *Neurobiology of Disease* **2004**, *16*, 546-555.
- [34] K. Subbaramaiah, P. Bulic, Y. Lin, et al., *Journal of Biomolecular Screening* **2001**, *6*, 101-110.
- [35] D. R. Spring, *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, 472-482.
- [36] P. G. Alluri, M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13995-14004.
- [37] S. E. Ong, L. J. Foster, M. Mann, *Methods* **2003**, *29*, 124-130.
- [38] Q. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Early Edition* **2007**, *104*, 7444-7448.
- [39] R. W. King, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, R327-R333.
- [40] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 12817-12821.
- [41] S. D. Liberles, S. T. Diver, D. J. Austin, S. L. Schreiber, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 7825-7830.
- [42] X. F. S. Zheng, T. F. Chan, H. H. Zhou, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 609-618.
- [43] K. D. Kumble, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 812-819.
- [44] J. Downward, *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 11-22.
- [45] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 4193-4214.
- [46] W. Kolch, A. Kotwaliwale, K. Vass, P. Janosch, *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2002**, *4*, 1-18.
- [47] P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, R. Dhand, et al., *Nature* **1994**, *370*, 527-532.
- [48] T. Kodaki, R. Woscholski, B. Hallberg, et al., *Current Biology* **1994**, *4*, 798-806.
- [49] B. Stoyanov, S. Volinia, T. Hanck, et al., *Science* **1995**, *269*, 690-693.
- [50] J. Downward, *Current Opinion in Genetics & Development* **1998**, *8*, 49-54.
- [51] B. Weiss, G. Bollag, K. Shannon, *American Journal of Medical Genetics* **1999**, *89*, 14-22.
- [52] M. Schmidt, Y. Lu, B. L. Liu, et al., *Oncogene* **2000**, *19*, 2423-2429.

- [53] A. Bellacosa, D. Defeo, A. K. Godwin, et al., *International Journal of Cancer* **1995**, *64*, 280-285.
- [54] C. Cordon-Cardo, C. Prives, *Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190*, 1367-1370.
- [55] E. Janda, K. Lehmann, I. Killisch, et al., *Journal of Cell Biology* **2002**, *156*, 299-313.
- [56] W. J. Nelson, R. Nusse, *Science* **2004**, *303*, 1483-1487.
- [57] E. Janda, G. Litos, S. Grunert, et al., *Oncogene* **2002**, *21*, 5148-5159.
- [58] B. J. L. Royles, *Chemical Reviews* **1995**, *95*, 1981-2001.
- [59] P. S. Steyn, P. L. Wessels, *Tetrahedron Letters* **1978**, 4707-4710.
- [60] M. J. Nolte, P. S. Steyn, P. L. Wessels, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1980**, 1057-1065.
- [61] R. Schobert, A. Schlenk, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 4203-4221.
- [62] F. A. Miller, J. C. French, B. J. Sloan, et al., *Nature* **1963**, *200*, 1338.
- [63] K. Matsuo, I. Kitaguchi, Y. Takata, K. Tanaka, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1980**, *28*, 2494-2502.
- [64] G. L. Gallardo, N. I. Pena, P. Chacana, et al., *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2004**, *20*, 609-612.
- [65] S. Aoki, K. Higuchi, Y. Ye, et al., *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1833-1836.
- [66] C. Y. Wang, B. G. Wang, S. Wiryowidagdo, et al., *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 51-56.
- [67] J. Z. Xu, M. Hasegawa, K. Harada, et al., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *54*, 852-854.
- [68] T. Oda, A. Fujita, J. Z. Xu, et al., *Marine Drugs* **2007**, *5*, 1-5.
- [69] B. Biersack, R. Diestel, C. Jagusch, et al., *Chemistry & Biodiversity* **2008**, *5*, 2423-2430.
- [70] C. Hopmann, M. Kurz, M. Bronstrup, et al., *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 435-438.
- [71] J. P. Karwowski, M. Jackson, R. J. Theriault, et al., *Journal of Antibiotics* **1992**, *45*, 1125-1132.
- [72] V. J. Lee, A. R. Branfman, T. R. Herrin, K. L. Rinehart, *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 4225-4236.
- [73] S. B. Singh, K. Herath, Z. Q. Guan, et al., *Organic Letters* **2002**, *4*, 3337-3337.
- [74] P. R. Graupner, A. Carr, E. Clancy, et al., *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 1558-1561.
- [75] G. R. Pettit, Y. Kamano, C. L. Herald, et al., *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 5015-5017.
- [76] B. J. Fennell, S. Carolan, G. R. Pettit, A. Bell, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *51*, 833-841.
- [77] R. N. Lacey, *Journal of the Chemical Society* **1954**, 850-854.
- [78] N. Cramer, M. Buchweitz, S. Laschat, et al., *Chemistry* **2006**, *12*, 2488-2503.

Literaturverzeichnis

- [79] A. C. Hart, A. J. Phillips, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1094-1095.
- [80] C. V. Ramana, M. A. Mondal, V. G. Puranik, M. K. Gurjar, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 4061-4064.
- [81] L. T. Burke, D. J. Dixon, S. V. Ley, F. Rodriguez, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 274-280.
- [82] M. D. Andrews, A. G. Brewster, K. M. Crapnell, et al., *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1998**, 223-235.
- [83] S. V. Ley, P. R. Woodward, *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 3019-3020.
- [84] S. V. Ley, P. R. Woodward, *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 345-346.
- [85] R. Schobert, C. Jagusch, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2301-2307.
- [86] P. Jouin, B. Castro, D. Nisato, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1987**, 1177-1182.
- [87] G. R. Pettit, D. L. Herald, S. B. Singh, et al., *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 6692-6693.
- [88] J. Matthews, R. A. Rivero, *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 4808-4810.
- [89] B. A. Kulkarni, A. Ganesan, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 4369-4372.
- [90] L. Weber, P. laiza, G. Biringier, P. Barbier, *Synlett* **1998**, 1156.
- [91] T. T. Romoff, L. Ma, Y. W. Wang, D. A. Campbell, *Synlett* **1998**, 1341-1342.
- [92] Z. X. Liu, X. X. Ruan, X. Huang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 2505-2507.
- [93] G. Larbig, B. Schmidt, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, *8*, 480-490.
- [94] B. Neises, W. Steglich, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1978**, *17*, 522-524.
- [95] M. R. Spaller, W. T. Thielemann, P. E. Brennan, P. A. Bartlett, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4*, 516-522.
- [96] L. G. Beholz, P. Benovsky, D. L. Ward, et al., *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 1033-1042.
- [97] S. P. Raillard, G. J. Ji, A. D. Mann, T. A. Baer, *Organic Process Research & Development* **1999**, *3*, 177-183.
- [98] S. R. Chhabra, C. Harty, D. S. W. Hooi, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 97-104.
- [99] S. P. Raillard, W. W. Chen, E. Sullivan, et al., *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4*, 470-474.
- [100] M. Matsuda, T. Kobayashi, S. Nagao, et al., *Heterocycles* **1996**, *43*, 685-690.
- [101] Y. Wang, S. P. Yang, Y. Wu, J. M. Yue, *Natural Product Research* **2004**, *18*, 159-162.
- [102] J. F. Bower, T. Riis-Johannessen, P. Szeto, et al., *Chemical Communications* **2007**, 728-730.
- [103] B. H. Howard, H. Raistrick, *Biochemical Journal* **1954**, *56*, 56-65.
- [104] D. J. Dixon, S. V. Ley, T. Gracza, P. Szolcsanyi, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1999**, 839-841.
- [105] W. Steglich, *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61*, 281-288.

- [106] I. Casser, B. Steffan, W. Steglich, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1987**, *26*, 586-587.
- [107] K. Schmidt, U. Riese, Z. Z. Li, M. Hamburger, *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 378-383.
- [108] A. P. Michael, E. J. Grace, M. Kotiw, R. A. Barrow, *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 1360-1362.
- [109] S. V. Ley, S. C. Smith, P. R. Woodward, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1145-1174.
- [110] P. M. Booth, H. B. Broughton, M. J. Ford, et al., *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7565-7580.
- [111] P. Fugedi, P. J. Garegg, H. Lonn, T. Norberg, *Glycoconjugate Journal* **1987**, *4*, 97-108.
- [112] S. Sato, M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydrate Research* **1986**, *155*, C6-C10.
- [113] J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Vanroy, W. Birchmeier, *Journal of Cell Biology* **1989**, *108*, 2435-2447.
- [114] O. Muller, E. Gourzoulidou, M. Carpintero, et al., *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 450-454.
- [115] I. M. Karaguni, P. Herter, P. Debruyne, et al., *Cancer Research* **2002**, *62*, 1718-1723.
- [116] M. F. Favata, K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, et al., *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 18623-18632.
- [117] M. Takeichi, *Annual Review of Biochemistry* **1990**, *59*, 237-252.
- [118] K. Vleminckx, L. Vakaet, M. Mareel, et al., *Cell* **1991**, *66*, 107-119.
- [119] U. H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, et al., *Journal of Cell Biology* **1991**, *113*, 173-185.
- [120] L. Hexdall, C. F. Zheng, *Biotechniques* **2001**, *30*, 1134.
- [121] M. M. Bradford, *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
- [122] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [123] M. G. Waters, T. Serafini, J. E. Rothman, *Nature* **1991**, *349*, 248-251.
- [124] F. Peter, H. Plutner, H. Y. Zhu, et al., *Journal of Cell Biology* **1993**, *122*, 1155-1167.
- [125] D. Gorlich, S. Prehn, R. A. Laskey, E. Hartmann, *Cell* **1994**, *79*, 767-778.
- [126] L. F. Pemberton, B. M. Paschal, *Traffic* **2005**, *6*, 187-198.
- [127] R. Deane, W. Schafer, H. P. Zimmermann, et al., *Molecular and Cellular Biology* **1997**, *17*, 5087-5096.
- [128] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601-601.
- [129] D. J. Boles, D. A. Craft, D. A. Padgett, et al., *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* **1991**, *45*, 74-91.
- [130] W. B. Rizzo, D. A. Craft, *Journal of Clinical Investigation* **1991**, *88*, 1643-1648.
- [131] G. T. Marsischky, N. Filosi, M. F. Kane, R. Kolodner, *Genes & Development* **1996**, *10*, 407-420.

Literaturverzeichnis

- [132] R. D. Kolodner, G. T. Marsischky, *Current Opinion in Genetics & Development* **1999**, 9, 89-96.
- [133] R. C. Ireton, M. A. Davis, J. van Hengel, et al., *Journal of Cell Biology* **2002**, 159, 465-476.
- [134] M. A. Davis, R. C. Ireton, A. B. Reynolds, *Journal of Cell Biology* **2003**, 163, 525-534.
- [135] R. C. Ireton, M. A. Davis, J. van Hengel, et al., *Molecular Biology of the Cell* **2002**, 13, 218a-218a.
- [136] A. E. Kruchten, M. A. McNiven, *Journal of Cell Science* **2006**, 119, 1683-1690.
- [137] G. J. K. Praefcke, H. T. McMahon, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, 5, 133-147.
- [138] F. Nollet, P. Kools, F. van Roy, *Journal of Molecular Biology* **2000**, 299, 551-572.
- [139] M. A. Thoreson, P. Z. Anastasiadis, J. M. Daniel, et al., *Journal of Cell Biology* **2000**, 148, 189-201.
- [140] K. Y. Xiao, D. F. Allison, K. M. Buckley, et al., *Journal of Cell Biology* **2003**, 163, 535-545.
- [141] H. Nojima, M. Adachi, T. Matsui, et al., *Nature Cell Biology* **2008**, 10, 971-978.
- [142] O. George, B. K. Bryant, R. Chinnasamy, et al., *Acs Chemical Biology* **2008**, 3, 167-179.
- [143] Q. S. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 7444-7448.
- [144] S. Ding, T. Y. H. Wu, A. Brinker, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 7632-7637.
- [145] Q. S. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 12581-12581.
- [146] K. W. Koch, *Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle, Part A* **2000**, 315, 785-797.
- [147] K. E. Komolov, I. I. Senin, P. P. Philippov, K. W. Koch, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 1228-1234.
- [148] J. E. Ladbury, M. A. Lemmon, M. Zhou, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, 3199-3203.
- [149] M. J. Blandamer, P. M. Cullis, P. T. Gleeson, *Chemical Society Reviews* **2003**, 32, 264-267.
- [150] R. Urrutia, J. R. Henley, T. Cook, M. A. McNiven, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 377-384.
- [151] H. Cao, F. Garcia, M. A. McNiven, *Molecular Biology of the Cell* **1998**, 9, 2595-2609.
- [152] A. B. Muhlberg, D. E. Warnock, S. L. Schmid, *Embo Journal* **1997**, 16, 6676-6683.
- [153] E. Smirnova, D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, et al., *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 14942-14947.
- [154] P. M. Okamoto, B. Tripet, J. Litowski, et al., *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 10277-10286.

- [155] P. J. Zhang, J. E. Hinshaw, *Nature Cell Biology* **2001**, 3, 922-926.
- [156] R. M. Steinman, I. S. Mellman, W. A. Muller, Z. A. Cohn, *Journal of Cell Biology* **1983**, 96, 1-27.
- [157] B. M. F. Pearse, M. S. Bretscher, *Annual Review of Biochemistry* **1981**, 50, 85-101.
- [158] B. M. F. Pearse, R. A. Crowther, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1987**, 16, 49-68.
- [159] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, et al., *Science* **1997**, 277, 333-338.
- [160] S. Sever, A. B. Muhlberg, S. L. Schmid, *Nature* **1999**, 398, 481-486.
- [161] S. Sever, H. Damke, S. L. Schmid, *Journal of Cell Biology* **2000**, 150, 1137-1147.
- [162] J. R. Henley, E. W. A. Krueger, B. J. Oswald, M. A. McNiven, *Journal of Cell Biology* **1998**, 141, 85-99.
- [163] P. Oh, D. P. McIntosh, J. E. Schnitzer, *Journal of Cell Biology* **1998**, 141, 101-114.
- [164] E. M. van Dam, W. Stoorvogel, *Molecular Biology of the Cell* **2002**, 13, 169-182.
- [165] A. E. Gammie, L. J. Kurihara, R. B. Vallee, M. D. Rose, *Journal of Cell Biology* **1995**, 130, 553-566.
- [166] D. C. Wienke, M. L. W. Knetsch, E. M. Neuhaus, et al., *Molecular Biology of the Cell* **1999**, 10, 225-243.
- [167] S. Roy, B. Wyse, J. F. Hancock, *Molecular and Cellular Biology* **2002**, 22, 5128-5140.
- [168] B. P. Ceresa, S. L. Schmid, *Current Opinion in Cell Biology* **2000**, 12, 204-210.
- [169] A. V. Vieira, C. Lamaze, S. L. Schmid, *Science* **1996**, 274, 2086-2089.
- [170] P. Burke, K. Schooler, H. S. Wiley, *Molecular Biology of the Cell* **2001**, 12, 1897-1910.
- [171] J. M. Haugh, A. C. Huang, H. S. Wiley, et al., *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 34350-34360.
- [172] O. Kranenburg, I. Verlaan, W. H. Moolenaar, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 35301-35304.
- [173] M. Calvo, A. Pol, A. Lu, C. Enrich, *Molecular Biology of the Cell* **1998**, 9, 98a-98a.
- [174] H. Cao, J. Chen, M. Awoniyi, et al., *Journal of Cell Science* **2007**, 120, 4167-4177.
- [175] E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol, et al., *Developmental Cell* **2006**, 10, 839-850.
- [176] T. Kirchhausen, E. Macia, H. E. Pelish, *Small Gtpases in Disease, Part A* **2008**, 438, 77-93.
- [177] A. L. Schade, L. Caroline, *Science* **1946**, 104, 340-341.
- [178] M. Ehrlich, W. Boll, A. van Oijen, et al., *Cell* **2004**, 118, 591-605.
- [179] H. S. Shpetner, J. S. Herskovits, R. B. Vallee, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 13-16.

Literaturverzeichnis

9. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut (wasser- und sauerstofffrei)
AL3A2	Fatty aldehyde dehydrogenase
APS	Ammonium-Persulfat
ARFGAP-1	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BACE-1	β -Secretase
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Bu	Butyl
CCV	clathrin coated vesicles
CH	chemische Genetik
CH	Cyclohexan
COP	Coatomer
COX-2	Cyclooxygenase-2
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	Diisopropylcarbodiimid
DHB4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
DIBAL-H	Diibutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTST	Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumtriflat
DMTSF	Dimethyl-(methylthio)-sulfoniumfluoroborat
DNM1L	Dynamin-1-like protein
DOS	diversity oriented synthesis
DTT	Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzyl
DYHC	Dynein heavy chain 1, cytoplasmic 1
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-)carbodiimid
EE	Ethylacetat
EDTA	Ethylen diamine tetra acetic acid
EF	elongation factor
EGTA	Ethylen glycol tetra acetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Elk-1	Ets like gene-1
EMT	Epithelial mesenchymal transition
Eq.	Äquivalent
ESI	electron spray ionization
FAB	fast atom bombardment
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAP	GTPase activating protein
GCN1L	general control of amino-acid synthesis 1-like 1
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein

GDP	Guanosin-Diphosphat
GPCR	G-protein coupled receptor
Grb	Growth factor receptor binding protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HF	hippocampal formation
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
Htt	Huntingtin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry
HTS	high throughput screening
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL-8	Interleukin-8
IMB	Importin-β
IPO	Importin
IQGAP	Ras-GTPase-activating-like protein
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K _d	Dissoziationskonstante
KSR	Kinase suppressor of Ras
LC	liquid phase chromatography
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDCK	Madine-Darby canine kidney cell
MDCK-F3	Ras-transformierte Madine-Dary canine kidney cell
Me	Methyl
Me-CN	Acetonitril

Abkürzungsverzeichnis

MeOH	Methanol
min	Minute
MIC	Minimum inhibitory concentration
mRNA	messenger RNA
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSH2	DNA mismatch repair protein
NGF	Nerve growth factor
NIH	National Institute of Health
NIH/3T3	Mouse embryonic fibroblast cell line
NLS	Nuclear localization signal
NMR	Nuclear magnetic resonance
NPC	Nuclear pore complex
OAc	Acetat
PBS	Phosphate buffered saline
PC12	Phäochromocytoma
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
pERK	phosphoERK
PH	Pleckstrin-Homology
PhMe	Toluol
PI3	Phosphoinositid-3-kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC ϵ	Phospholipase C ϵ
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
ppm	parts per million
PR	proline-rich

PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
PSSC	Protein structure similarity clustering
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
Raf	Rapid fibrosarcosis
RanBP	Ran binding protein
Ras	Rat sarcoma
RF	Rückfluss
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RP	reversed phase
Rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPTK	Receptor protein tyrosine kinase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SG	Schutzgruppe
SHR	SRC-Homologie-3
shRNA	short-hairpin RNA
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
siRNA	small interfering RNA
SOS	Son-of-Sevenless
SPR	Surface Plasmon Resonance
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	Tris buffered saline
TCF/LEF	T cell factor/lymphocyte enhancer factor
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylenethylendiamin
TF-1	human erythroleukemia cell line
TFA	Trifluoressigsäure

Abkürzungsverzeichnis

TGF	Transforming growth-factor
THF	Tetrahydrofuran
TNPO	Transportin
TOR	target of rapamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
Wnt	Wingless <i>Int-1</i>
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen- disulfonat
XPO	Exportin
Y3H	Yeast-three-hybrid

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525).

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessante Themenstellung, die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken.

Herrn Prof. Dr. Mathias Christmann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Bei Markus Kaiser möchte ich mich für die nette Unterstützung in diesem Projekt bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben sind hier Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer für die Durchführung der Nano-LC-MS/MS-Messungen, die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren sowie ihre Unterstützung in allen analytischen Fragestellungen.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Kooperationspartnern Amrita Rai für die Durchführung der Endozytose-Experimente, Dr. Alexander Wolf für die SPR-Messungen sowie Dr. André Schönichen für die Einführung in die ITC und Dr. Holger Gerlach für Unterstützung bei der Messung von DLS. Weiterhin danke ich Dr. Ingrid Vetter für die großzügige Spende an Importin β .

Bei Dr. Susanne Eschenburg und Dr. Thomas Reubold möchte ich mich zudem für die Bereitstellung der Dynamin-Proteine sowie die Durchführung des GTPase-Assays bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Dirk Pendzialek für die geduldige Einweisung in die Arbeitstechniken der Biologie. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Bernhard Ellinger und Sascha Menninger für hilfreiche Antworten auf all meine biologischen Fragen danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Projektpartnerin Karin Warburg für die gute Zusammenarbeit und ebenfalls steter Hilfe in biologischen Belangen.

Allen Mitarbeitern in der Abteilung Chemische Biologie am Max-Planck-Institut Dortmund möchte ich für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsatmosphäre danken. Dies gilt insbesondere für meine Laborkollegen Torben Lessmann, Elke Simon, Ester Vaz Araujo, Kathrin Wittstein und Hannah Schuster. Des Weiteren möchte ich meinen Kollegen aus Büro A3.28 Sascha Menninger, Bernhard Ellinger, Karin Warburg,

Danksagung

Matthias Riedrich, Luc Eberhard, Anja Richter und Hannah Schuster für die nette Zeit auf engem Raum danken.

Mein besonderer Dank gilt Marion Müller, ohne die mir viel Unterstützung, viel Ausgleich von der Arbeit und sehr viele nette Stunden in den letzten vier Jahren gefehlt hätten. Außerdem möchte ich mich bei Sebastian Koch für die Freundschaft und viele interessante Geschichten bedanken. Auch Nicola Bisek danke ich für die vielen Antworten sowie eine schöne Zeit in und außerhalb des Instituts. Dirk Pendzialek, Wolfram Wilk und Tobias Zimmermann sei ebenfalls herzlich für die netten letzten Jahre gedankt.

Für das zügige Korrigieren dieser Arbeit geht ein herzlicher Dank an Marion Müller, Sebastian Koch, Karin Warburg und Bernhard Ellinger.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und das Verständnis während all der Jahre der Promotion und des Studiums, ohne die dies nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen Peter für seine unendliche Geduld und die liebevolle Unterstützung während der letzten Jahre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tanja Knoth
Geburtsdatum und -ort	29. Juni 1979, Hannover
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

08/1986 – 08/1990	Besuch der Grundschule Hiddestorf
08/1990 – 08/1999	Besuch der Carl-Friedrich-Gauß-Schule Hemmingen
06/1999	Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung

10/1999 – 03/2005	Studiengang Chemie/Diplom, TU Clausthal
10/2001	Vordiplom
02/2002 – 03/2005	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
04/2002 – 09/2002	Forschungsaufenthalt, „Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique“ in Lyon, Frankreich, Arbeitskreis Prof. M. A. Ciufolini: <i>“Généralisation de la méthodologie de la spirocyclisation avec le diacétoxyiodobenzène”</i>
04/2004 – 03/2005	Diplomarbeit, TU Clausthal, Arbeitskreis Prof. Dr. E. Schaumann: <i>“Cyclisierungen von Silyl-Vinyl-Ketenen zum Aufbau hochfunktionalisierter Fünf- und Sechsringsysteme”</i>
03/2005	Diplom
05/2005 – 05/2009	Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: <i>“Synthese einer Kollektion von 3-Acyltetramsäuren und Identifizierung der Zielproteine von Melophlin A”</i>

Dortmund, Mai 2009.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 21.04.2009