

**Entwicklung multifunktionaler Photoaffinitätslabels  
zur semisynthetischen Ausstattung von  
Michael-Akzeptoren**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

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

von M. Sc. Sabri Chiha

geboren am 1. März 1987 in Kairouan (Tunesien)

Gutachter:

- 1) Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt, Jena
- 2) Prof. Dr. Georg Pohnert, Jena

Tag der Verteidigung: 31. Mai 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1	Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung .....	12
1.2	Das Konzept der Polypharmakologie .....	14
1.3	Herausforderungen der Target-Identifizierung.....	16
1.3.1	Computergestützte Targetidentifizierungsmethoden .....	16
1.3.2	Targetidentifizierung durch Phänotypabgleich.....	17
1.3.3	Chemische Proteomik.....	19
1.3.3.1	Affinitätsbasiertes Protein-Profilng.....	19
1.4	Die Klasse der Thiopeptide.....	21
1.4.1	Strukturmerkmale der Thiopeptide .....	21
1.4.2	Biosynthese der Thiopeptide.....	23
1.4.3	Polypharmakologisches Wirkprofil der Thiopeptide.....	24
1.4.3.1	Inhibitorische Aktivität auf die bakterielle Proteinbiosynthese .....	25
1.4.3.2	TipA-Geninduktion.....	26
1.4.3.3	Zytostatische Aktivität .....	27
1.4.3.4	Antiplasmodiale Wirkung .....	28
1.4.3.5	Weitere Aktivitäten .....	28
1.5	Zielsetzung.....	29
<b>2</b>	<b>Chemische Proteomik.....</b>	<b>32</b>
2.1	Verbindungszentrierte chemische Proteomik.....	33
2.1.1	CCCP gekoppelt mit Phagen-Display.....	35
2.1.2	Hefe-Drei-Hybrid-System (Y3H) .....	36
2.2	<i>Label</i> -freie Methoden.....	38
2.3	Aktivitätsbasiertes Protein- <i>Profiling</i> .....	41

2.3.1	Die bioreaktive Gruppe .....	42
2.3.2	Der Linker .....	45
2.3.3	Die Reportereinheit .....	45
2.3.3.1	Zwei-Schritt ABPP .....	46
2.4	Affinitätsbasiertes Protein-Profilng.....	48
2.4.1	Aufbau einer Photoaffinitätssonde.....	50
2.4.2	Die photoreaktive Gruppe .....	51
2.4.3	Arylazide .....	52
2.4.4	Benzophenone .....	54
2.4.5	3H-Diazirine.....	56
2.4.5.1	Vorteile der Diazirin-basierten Photophore.....	57
2.4.5.2	Synthetische Methoden zur Darstellung von Diazirinen .....	58
<b>3</b>	<b>Bekannte Targets des Thiostreptons.....</b>	<b>61</b>
3.1	Inhibierung des 70S Ribosoms.....	62
3.1.1	Struktureller Aufbau und Funktion des Ribosoms .....	62
3.1.2	Die Proteinbiosynthese in Prokaryoten.....	63
3.1.3	Inhibierung der Proteinbiosynthese bei Prokaryoten .....	65
3.1.4	Inhibierung des GTPase-assoziierten Zentrums .....	68
3.1.5	Bindemodus von Thiostrepton am GAC.....	69
3.1.6	Induktion der TipA-Gene .....	71
3.1.6.1	Multiple Wirkstoff-Resistenz.....	71
3.1.6.2	Die TipA Proteine .....	72
3.2	Inhibierung des 26S Proteasoms.....	73
3.2.1	Biologische Bedeutung des Proteasoms .....	73
3.2.2	Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS).....	74
3.2.3	Strukturaufbau des Proteasomalen Komplexes .....	75

3.2.4	Substratspezifitäten und katalytische Aktivität des Proteasoms.....	77
3.2.5	Inhibitoren des 26S Proteasoms.....	79
3.2.5.1	Kovalente Proteasom-Inhibitoren.....	79
3.2.5.2	Nicht-kovalente Inhibitoren.....	84
3.2.6	Bindemodus von Thiostrepton am 26S Proteasom.....	87
3.3	Zytostatische und antineoplastische Wirkung von Thiostrepton.....	90
3.3.1	Stabilisierung von Tumorsuppressoren.....	90
3.3.1.1	Inhibition der FoxM1-Genexpression.....	91
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>94</b>
4.1	Konzeptionelle Gedanken.....	95
4.1.1	Funktionalisierungsstrategie am Thiostrepton-Grundgerüst.....	95
4.1.2	Selektive Reaktionsführung der Michael Addition.....	98
4.1.3	Design der Photoaffinitätslabel.....	99
4.1.4	Auswahl des Photophors.....	100
4.1.5	Auswahl der Reportereinheit.....	100
4.1.6	Design der Linkersysteme .....	101
4.1.6.1	Vereinfachter Linker.....	101
4.1.6.2	Spaltbarer Linker.....	102
4.1.7	Linkerfreies Photoaffinitätslabel.....	104
4.2	Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonden.....	106
4.2.1	Synthese des Carboxy-substituierten Photophors 101 .....	106
4.2.2	Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats 105.....	107
4.2.3	Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonde 129 .....	108
4.2.4	Darstellung des Sulfonsäureamid-Linkersystems 134.....	110
4.2.5	Funktionalisierung des Linkersystems 134.....	111
4.2.6	Verlängerung des Sulfonsäureamid-Linkers.....	112

4.2.7	Funktionalisierung des verlängerten Sulfonsäureamid-Linkers 144 .....	114
4.2.8	Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonde 151 .....	116
4.2.9	Synthese des linkerfreien Photoaffinitätslabels.....	118
4.2.9.1	Aufbau des Difluorpropargylacetophenon-Grundgerüsts .....	118
4.2.9.2	Installation der Diazirin-Einheit .....	119
4.2.9.3	Optimierung der Thiol-Installation in benzylicher Position .....	119
4.2.9.4	Synthese des vervollständigten linkerfreien Photoaffinitätslabels 175 .....	122
4.2.9.5	Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonde 177 .....	123
4.3	Untersuchung der hergestellten Photoaffinitätslabels.....	126
4.3.1	Photolysierbarkeitsuntersuchungen.....	126
4.3.2	Bioaktivitätsuntersuchungen .....	129
4.3.2.1	Agardiffusionstests .....	129
4.3.2.2	Gekoppelter <i>in vivo</i> Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay .....	130
4.3.3	Spaltbarkeitsuntersuchungen.....	132
4.3.4	Bioorthogonale Konjugation von PAL-Sonde 151.....	134
4.3.5	Photoaffinitäts-Markierungsexperimente .....	137
4.3.6	Diskussion .....	142
<b>5</b>	<b>Schlusswort.....</b>	<b>147</b>
5.1	Zusammenfassung.....	148
5.2	Ausblick.....	152
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>156</b>
6.1	Methoden .....	157
6.1.1	Geräte und Verfahren .....	157
6.1.2	Spektroskopie .....	157
6.1.3	Qualitative Analytik .....	159
6.1.4	Mikrobiologische Arbeiten und Zellkultur.....	159

6.1.5	Biochemische Arbeiten .....	160
6.1.6	Chromatographie .....	161
6.2	Biochemische Materialien .....	163
6.3	Pufferlösungen .....	165
6.4	Reagenzien und Lösungsmittel .....	165
6.5	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	167
6.6	Synthese des <i>para</i> -carboxysubstituierten 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirin-Photophors nach Bender <i>et al.</i> <sup>[436]</sup> .....	170
1.1	Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats 105 .....	177
6.7	Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats 149 .....	181
6.8	Synthese des linkerfreien Photoaffinitätslabels 175 .....	193
6.9	Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonden.....	211
6.10	Biologische Arbeiten .....	220
6.10.1	Mikrobiologische Methoden .....	220
6.10.1.1	Bakterienkulturen.....	220
6.10.2	Eukaryotische Zellkulturen .....	223
6.10.3	Proteinbiochemie.....	224
6.10.3.1	UV-Vis-Spektroskopie-Konzentrationsbestimmungen.....	224
6.10.3.2	Bradford-Test .....	224
6.10.3.3	Ellmans Test.....	225
6.10.3.4	Natriumodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	226
6.10.3.5	Western Blot.....	229
6.10.4	Präparative Biochemie .....	230
6.10.4.1	Ribosomenreinigung.....	230
6.10.5	Assays .....	232
6.10.5.1	Gekoppelter in vitro Translations-Inhibitions-Assay .....	232

6.10.5.2	Proteasom-Inhibierungs-Assay .....	233
6.10.5.3	Proteasom-Inhibierungs-Assay in HeLa-Zelllysat.....	235
6.10.6	Aktivitätsbasierte Testierungen.....	235
6.10.6.1	Proximity Induced Covalent Capture (PICC).....	235
6.10.6.2	Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente in Zelllysaten .....	236
6.10.6.3	Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit reinen L11Q29C-Chimärribosomen .....	237
6.10.6.4	Photoaffinitätsmarkierung mit nachfolgender Cu <sup>(I)</sup> katalysierter Azid-Alkyn Huisgen Cycloaddition .....	237
6.10.6.5	Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit vorheriger CuAAC .....	239
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>241</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>248</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>276</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>315</b>
<b>11</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>317</b>
<b>12</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>318</b>



Meinem Sohn Elyas gewidmet.



---

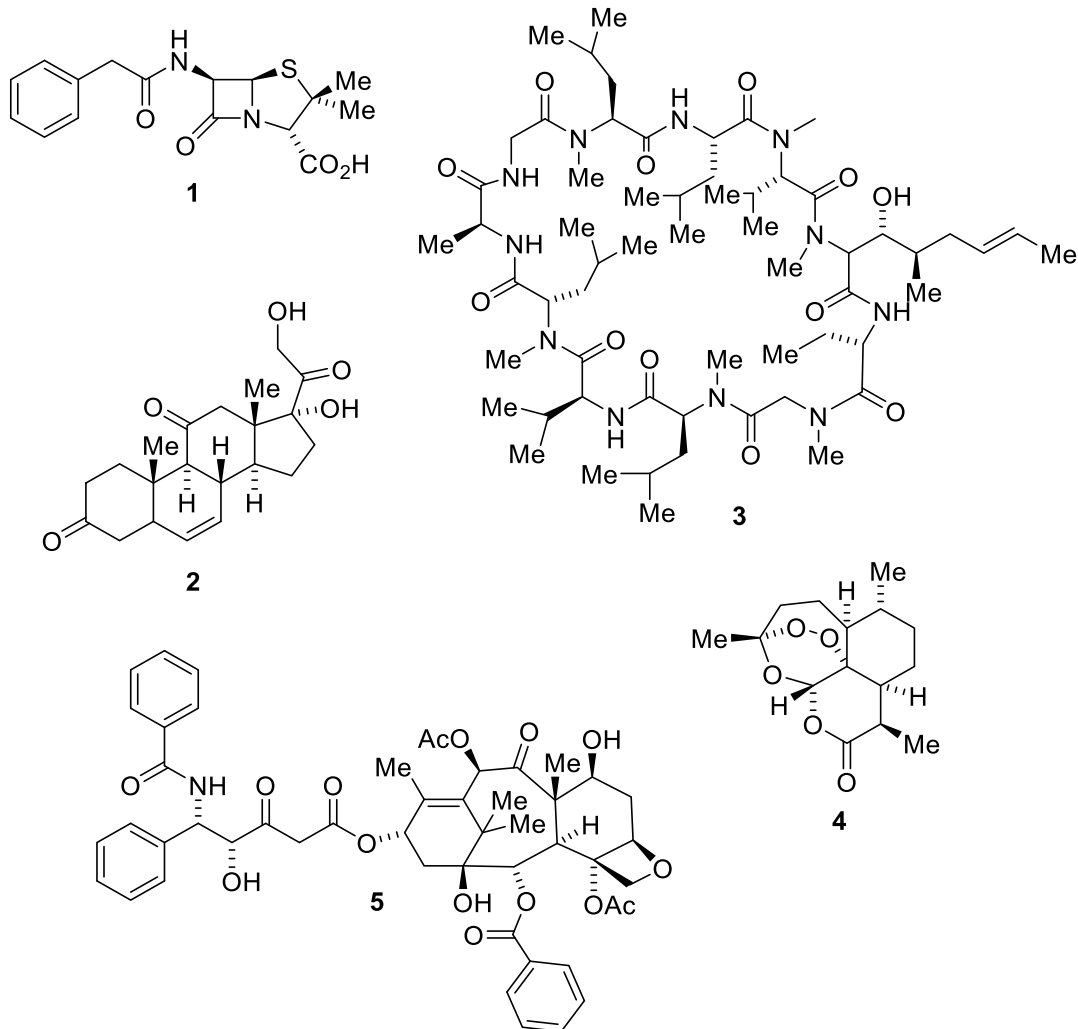
# 1 Allgemeine Einleitung

## 1.1 Naturstoffe in der Wirkstoffentwicklung

In der modernen pharmazeutischen Forschung bedeutet die Suche nach neuen Wirkstoffen oft eine jahrelange Entwicklungsarbeit, die mit beträchtlichen Kosten und einem hohen Grad an Ungewissheit verbunden ist. Aktuellen Schätzungen zufolge belaufen sich die Kosten für die Entwicklung eines neuen Arzneistoffes auf ca. 2.3 Milliarden Euro.<sup>[1]</sup> Der Prozess beginnt in der Regel mit der Identifizierung und Validierung eines biologischen Targets, meist ein Protein, dessen Modulierung von therapeutisch relevanter Bedeutung ist. Durch biochemische Charakterisierung des zuvor genannten Proteins wird ein Assay entwickelt, der die Untersuchung einer hohen Zahl verschiedenartiger Verbindungen hinsichtlich ihrer Bindungsstärke zum Target ermöglicht. Die besten Treffer werden ausgewählt und ihre strukturelle Beschaffenheit analysiert, sodass eine Leitstruktur definiert werden kann. Diese dient dann als „Ausgangspunkt“ für die Einführung chemischer Modifikationen, sodass anhand von Struktur-Wirkbeziehungsstudien Target-Affinität und physikochemische Eigenschaften des Wirkstoffs optimiert werden können.<sup>[2]</sup>

Bei der Suche nach potenziellen Wirkstoffkandidaten spielen Naturstoffe nach wie vor eine wichtige Rolle. Etwa die Hälfte der 1328 zugelassenen Arzneimittel der letzten 30 Jahre waren entweder Naturstoffe, Naturstoffderivate oder aus Leitstrukturen abgeleitet, die in der Natur gefunden wurden.<sup>[3]</sup> Dies liegt zum Teil an ihrer hohen strukturellen Komplexität, die noch immer eine große Herausforderung für die organische Synthese darstellt. Darüber hinaus besitzen Naturstoffe häufig eine höhere Bioverfügbarkeit als synthetische Verbindungen, weil sie unter physiologischen Bedingungen gebildet werden und daher generell über ein Mindestmaß an Wasserlöslichkeit und Zellgängigkeit verfügen müssen. Tatsächlich gelten *Lipinski's* empirisch definierte Regeln zur Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit („*Lipinski's Rules of Five*“) nicht für Naturstoffe.<sup>[4]</sup> Auch eignen sich Naturstoffe besonders für die Auffindung von Leitstrukturen, da ihre biosynthetische Herkunft eine evolutionäre Optimierung der Wechselwirkungen mit biologischen Zielstrukturen bedingte.<sup>[5,6]</sup> Sie bilden häufig individuelle Naturstoff-Familien, in denen die unterschiedlichen Vertreter leichte strukturelle Variationen, sowie abweichende pharmakologische Profile aufweisen. Die Untersuchung solcher Naturstoff-Familien liefert nützliche Struktur-Wirkbeziehungsdaten, sowie systembiologische Erkenntnisse bzgl. der verschiedenen Wirkorte. Zusätzlich verfügen die Vertreter nicht selten über eine begrenzte

chemische Stabilität, welche genutzt werden kann, um chemische Modifikationen zur Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften einzuführen. Aus diesem Grund eignen sich Naturstoffe allgemein besonders als Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von Wirkstoffkandidaten.<sup>[7-9]</sup>



**Abbildung 1-1:** Strukturen prominenter biologisch aktiver Naturstoffe. Penicillin **1** ist ein vom Schimmelpilz *Penicillium notatum* produziertes Antibiotikum; Cortison **2** ist ein Steroidhormon mit diversen Anwendungsgebieten; Paclitaxel **3** wird aus der Rinde der Pazifischen Eibe gewonnen und gehört zu den Zytoskelett-inhibierenden Zytostatika; Artemisin **4** ist ein Sesquiterpen, welches in den Blättern des Einjährigen Beifußes vorkommt und gegen den Malariaerreger *Pl. falciparum* eingesetzt wird; Cyclosporin **5** ist ein aus dem norwegischen Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* isoliertes Immunsuppressivum.

## 1.2 Das Konzept der Polypharmakologie

Eine Annahme bei der Entwicklung von Wirkstoffen unterstellt, dass Verbindungen mit einer maximalen Target-Spezifität ein gemindertes Potenzial für unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen und somit als Arzneimittel besonders geeignet sind. Bei der Target-Suche wird daher oft besonderer Wert darauf gelegt, individuelle „krankheitsverknüpfte Proteine“ zu identifizieren, für die selektive Liganden entwickelt werden können.<sup>[10,11]</sup>

Aktuelle Erkenntnisse aus der Systembiologie, sowie die rückblickende Betrachtung von bereits zugelassenen Arzneistoffen legen jedoch nahe, dass viele erfolgreiche Verbindungen gerade auf Grund der Vielfalt ihrer Wirkorte effektiv sind.<sup>[12]</sup> Tatsächlich wird aus diversen großangelegten funktionellen genomischen Studien ersichtlich, dass sowohl bei niederen als auch höheren Organismen nur eine geringe Zahl von Einzelgen-*Knockouts* einen signifikanten Einfluss auf den Phänotyp hervorrufen.<sup>[13-16]</sup> Damit ist die Zahl potenzieller Einzel-Targetproteine beschränkt.<sup>[17-19]</sup>

Der Grund dafür liegt in der Robustheit zellulärer Phänotypen. In der Tat sind zahlreiche Zellfunktionen redundant angelegt, und es gibt eine Vielfalt an kompensatorischen Signal- und Stoffwechselwegen, welche komplexe Netzwerke mit zahlreichen beteiligten Proteinen bilden.<sup>[20]</sup> Beim Design von Wirkstoffen lohnt es sich daher auch Moleküle zu untersuchen, die ein polypharmakologisches Wirkprofil besitzen, d. h. an mehreren „Knotenpunkten“ eines solchen biologischen Netzwerks gleichzeitig intervenieren können.<sup>[21]</sup> Tatsächlich legen diverse Studien nahe, dass synthetische Letalitäten bereits beobachtet werden können, wenn zwei nicht essenzielle Gene deletiert werden.<sup>[22]</sup> Darüber hinaus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Stummschalten von einzelnen Genen mittels RNA-Interferenz die Empfindlichkeit gegenüber chemischen Interventionen stark erhöht wird, wobei eine hohe Zahl an Deletionen schwerwiegende Beeinträchtigungen des Phänotyps mit Fitnessdefekten zur Folge hat.<sup>[23]</sup>

In diesem Zusammenhang gewinnt das Konzept der Polypharmakologie für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zunehmend an Bedeutung. Die Hauptherausforderungen dabei sind einerseits die Charakterisierung von biologischen Netzwerken, sodass kritische „Knotenpunkte“ identifiziert werden können, andererseits

die Entwicklung von „multitarget Wirkstoffen“, die simultan auf verschiedene Zielstrukturen einwirken.

Für die komparative Analyse von biologischen Netzwerken werden in der Regel drei Methoden eingesetzt: systematische *Screenings*, erkenntnisbasierte Wirkstoffkombinationen und die systematische Analyse von biologischen Netzwerken.

Bei den systematischen *Screenings* werden meist synergistische Effekte zweier Wirkstoffe bzw. einem Wirkstoff und einer Einzelgen-Stillegung durch RNA<sub>i</sub> untersucht. Auf diese Weise werden therapeutisch relevante Target-Kombinationen definiert.<sup>[24,25]</sup> Der Hauptnachteil dabei ist jedoch oftmals die schlechte Reproduzierbarkeit von RNA<sub>i</sub>-induzierter Gen-Stillegung durch wirkstoffbasierte Inhibierung des Targets, da metabolische und pharmakokinetische Zusammenhänge dabei eine bedeutende Rolle spielen. Darüber hinaus generieren derartige großangelegte Studien eine erhebliche Menge an Daten, die nicht immer leicht interpretiert werden können.

Beim Einsatz von erkenntnisbasierten Wirkstoff-Kombinationsstrategien steht das Wissen hinsichtlich der pathologisch relevanten biochemischen Mechanismen im Vordergrund. Darauf basierend werden Hypothesen aufgestellt, um potentielle Wirkstoff-Synergien abzuleiten.<sup>[26]</sup> Der Hauptnachteil dabei ist, dass komplexe systemische Antworten mit diesem Ansatz häufig nicht vorhergesagt werden können.

Die dritte Methode setzt auf die systematische Analyse von biologischen Netzwerken. Hier werden primär Anzahl und Vernetzungsgrad der verschiedenen Knotenpunkte eines Netzwerks untersucht. Das Ziel ist es, Netzwerk-Topologie und Phänotyp miteinander zu korrelieren, um potenzielle Interventionspunkte zu erkennen.<sup>[27,28]</sup> Allerdings ist die Erkenntnisübertragung für die Wirkstoffentwicklung oft schwierig, da die so ermittelten Targets chemisch nicht immer adressierbar sind

## 1.3 Herausforderungen der Target-Identifizierung

Das Proteom ist räumlich und zeitlich sehr dynamisch. Im Gegensatz zum Genom ist der Proteinbestand einer eukaryotischen Zelle stark gewebeabhängig (Spleißvarianten) und unterliegt zudem posttranslationalen Modifikationsmechanismen, die durch Umweltstimuli beeinflusst werden.<sup>[29-32]</sup> In der Praxis bedeutet dies, dass die Gesamtzahl der Proteine, welche sich unter gegebenen physiologischen Bedingungen in einer Zelle befindet etwa um einen Faktor 100 bis 1000 die der exprimierten Gene übertrifft.<sup>[33]</sup> In einer durchschnittlichen humanen Zelle besteht somit das Proteom aus mehreren Millionen verschiedenen Proteinen bzw. deren Varianten. Demgegenüber ermöglicht die zweidimensionale Gelelektrophorese, bei aktuellem Technikstand und abhängig von der Größe des Gels, die Auftrennung von maximal einigen Tausenden verschiedenen Proteinen.<sup>[34]</sup> Eine direkte Erkennung der biologischen Zielstrukturen durch Visualisierung von wirkstoffinduzierten Laufweitenverschiebungen ist daher nur ganz selten möglich. Aus diesem Grund erfordert die Suche nach den Wirkorten eines Arzneistoffes meist hypothesengestütztes Vorgehen („*qualified guess*“). Dabei werden die strukturellen Merkmale des Wirkstoffs sowie die biochemischen Erkenntnisse bzgl. dessen phänotypischen Wirkprofils näher betrachtet, um mögliche Targets zu erkennen und somit die Zahl der zu untersuchenden Proteine auf ein Minimum zu beschränken.<sup>[35,36]</sup>

### 1.3.1 Computergestützte Targetidentifizierungsmethoden

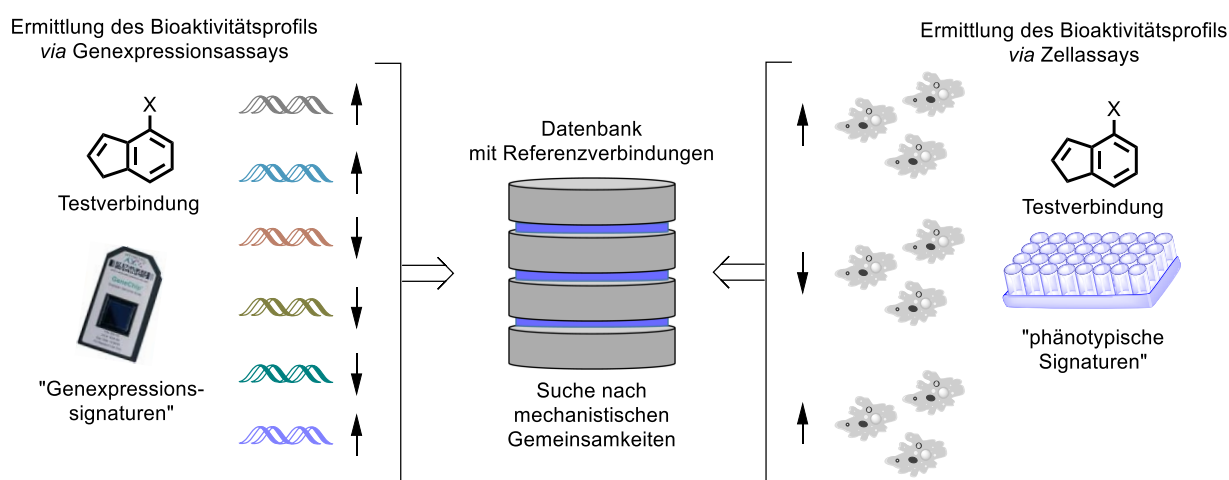
Computergestützte Target-Prädiktionmethoden („*computational inference methods*“) sind von großer Bedeutung beim Eingrenzen der Suche nach den biologischen Zielstrukturen neuartiger Wirkstoffkandidaten.<sup>[37,38]</sup> Darüber hinaus werden sie häufig eingesetzt, um zusätzliche Wirkorte (*Off-Targets*) bekannter Therapeutika zu entdecken.<sup>[36]</sup>

Die Analyse fängt in der Regel mit dem Erstellen eines Bioaktivitätsprofils des zu untersuchenden Liganden an. Hierfür wird die Verbindung vorerst über Standardassays auf bestimmte strukturelle und funktionelle Merkmale untersucht, um spezifische „pharmakologische Signaturen“ zu erkennen.<sup>[39-42]</sup> Das daraus ermittelte Bioaktivitätsprofil wird dann mit dem Profil bekannter Referenzverbindungen verglichen, sodass mechanistische Hypothesen hinsichtlich der pharmakologischen Wirkung und somit



potenzielle Targetproteine abgeleitet werden können.<sup>[43,44]</sup> Die vorausgesagten Targets müssen dabei sowohl mit dem Aktivitäts- als auch Affinitätsprofil des Liganden übereinstimmen, d. h. Proteine darstellen, die einerseits mit dem prädiktiven Phänotyp in Korrelation stehen und außerdem die topologischen Voraussetzungen erfüllen, um eine Wechselwirkung mit dem Liganden zu erlauben.

Die Hauptvorteile dieser Methode sind ihre Schnelligkeit und der relativ geringe experimentelle Aufwand, den sie verlangt. Demgegenüber erfordert sie große Vorkenntnisse und führt für gewöhnlich nicht zu einem umfassenden Verständnis der pharmakodynamischen Eigenschaften des zu analysierenden Wirkstoffs.



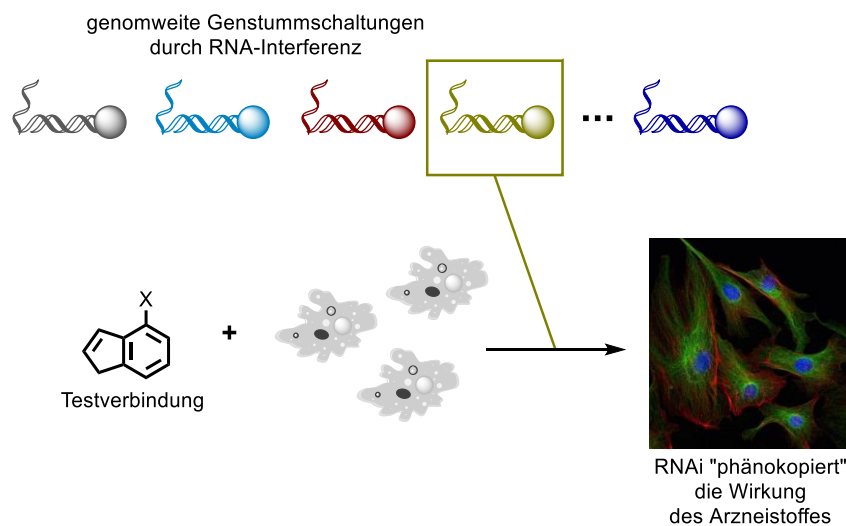
**Abbildung 1-2:** Schematische Darstellung der computergestützten Targetidentifizierung modifiziert nach Schenone *et al.*<sup>[36]</sup>

### 1.3.2 Targetidentifizierung durch Phänotypabgleich

Der Einsatz von genetischen Methoden bei der Suche nach biologischen Zielstrukturen bietet bei vergleichsweise geringem experimentellem Aufwand die Möglichkeit umfangreiche phänotypische Modifikationen zu erzeugen. Ziel dieser Modifikationen ist es, den wirkstoffinduzierten Phänotyp durch Gendeletionen bzw. Stummschalten mittels RNA<sub>i</sub> nachzuahmen, um so *Knockdowns* zu identifizieren, welche die pharmakologischen Auswirkungen des zu untersuchenden Wirkstoffs „phänokopieren“.<sup>[45]</sup> Eine Behandlung der selektierten Mutanten mit subletalen Konzentrationen des Wirkstoffs ermöglicht anschließend die Identifizierung von pharmakologisch überempfindlichen Stämmen. Auf diese Weise werden „chemisch-genetische Interaktionen“ ermittelt („*chemical-genetic interactions*“), die potenzielle Wirkorte eingrenzen.<sup>[46,47]</sup> Die postulierten Proteine werden

abschließend auf ihre Struktur und Funktion hin untersucht, um zu überprüfen, ob sie plausible Targets darstellen können.

Ein erheblicher Vorteil dieser Vorgehensweise ist ihr Einsatz *in vivo*, welcher die Untersuchung von wirkstoffinduzierten Veränderungen auf zellulärer Ebene und somit unter physiologisch relevanten Bedingungen ermöglicht.<sup>[48]</sup> Demgegenüber ist die Methodik aus technischer Sicht noch unausgereift und erfordert weitere Fortschritte auf den Gebieten der automatisierten Mikroskopie und Bilderkennung. Dessen ungeachtet ist die Reproduktion der pharmakologischen Wirkung niedermolekularer Verbindungen durch Genmanipulationen oftmals schwierig, u. a. weil kompensatorische Stoffwechselwege phänotypische Effekte maskieren können.<sup>[49]</sup> Auch stellt die Untersuchung von „Multitarget Wirkstoffen“ über Phänotypabgleich ein weiteres Problem dar, weil die erzeugten Phänotypen überlagert erscheinen und daher schwierig zu interpretieren sind.



**Abbildung 1-3:** Schematische Darstellung des Phänotypabgleichs, modifiziert nach Schenone *et al.*<sup>[36]</sup>

### 1.3.3 Chemische Proteomik

In der chemischen Proteomik findet die Suche nach biologischen Zielstrukturen durch gezieltes Modifizieren des Wirkstoffs statt. Das erhaltene Analogon wird dabei als „Köder“ (*Bait*) eingesetzt und ermöglicht – nach Inkubation mit potenziellen Bindungspartnern – eine selektive Markierung bzw. Anreicherung seiner Wirkorte. Um dies zu erreichen, können prinzipiell unterschiedliche Methoden eingesetzt werden (siehe **Kapitel 2**), wobei im Wesentlichen zwei Strategien verfolgt werden:<sup>[50]</sup>

(1) Die zu untersuchende Verbindung wird auf einem biologisch inerten Trägermaterial immobilisiert, sodass Targetproteine chromatographisch angereichert werden können.

(2) Die zu untersuchende Verbindung wird durch Einführen einer reaktiven Gruppe (Gefechtskopf), zu einer aktivitäts- bzw. affinitätsbasierten Sonde umgestaltet, welche zusätzlich über ein Identifizierungsmerkmal verfügt (z. B. ein Fluorophor), sodass Targetproteine kovalent gebunden und eindeutig detektiert werden können.

Der Hauptunterschied zwischen einer aktivitätsbasierten und einer affinitätsbasierten Sonde liegt in der Natur ihrer reaktiven Gruppe. Bei einer aktivitätsbasierten Sonde bildet ein mildes Elektrophil den Gefechtskopf, welcher mit der konkreten Proteinfunktion mechanistisch wechselwirken kann. Bei einer affinitätsbasierten Sonde besteht der Gefechtskopf aus einem Photophor, sodass zur kovalenten Markierung der Targets keine spezifische Reaktivität des Targets vorausgesetzt wird und die Sonde unabhängig von dieser mit den Zielproteinen reagieren kann.

#### 1.3.3.1 Affinitätsbasiertes Protein-Profilings

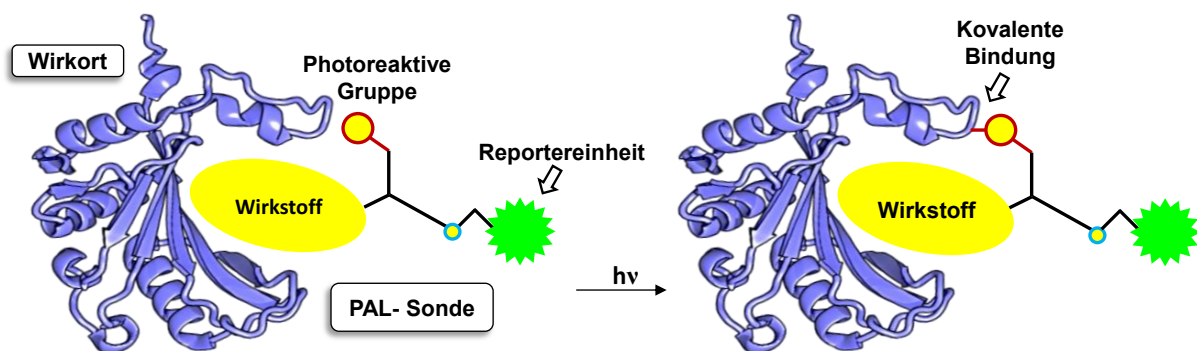
Das Konzept des affinitätsbasierten Protein-Profilings, meist Photoaffinitätsmarkierung genannt (*Photoaffinity Labeling*, PAL), wurde Anfang der 1960er von Westheimer eingeführt. In einem initialen Experiment wurde das Enzym Chymotrypsin mit einer Diazoacetyl-Gruppe versehen und durch anschließende Photolyse intramolekular markiert.<sup>[51]</sup> Einige Jahre später wurden Arylazide als photoreaktive Gruppe zur Markierung von Antikörpern eingesetzt.<sup>[52]</sup>

Das Grundprinzip der Photoaffinitätsmarkierung sieht vor, dass ein lichtaktivierbares Analogon<sup>[53]</sup> des Liganden durch UV-Bestrahlung mit einer vordefinierten Wellenlänge eine

hochreaktive Zwischenstufe bildet, welche irreversibel in der Nähe der Bindungsstelle des biologischen Targets reagiert.<sup>[54]</sup> Hierzu wird der niedermolekulare Ligand vorher mit einem Photophor<sup>[55,56]</sup> gekoppelt und so zu einer PAL-Sonde funktionalisiert.

Neben der photoreaktiven Gruppe beinhaltet eine PAL-Sonde zusätzlich einen Linker und ein Reportermerkmal („Tag“).<sup>[54,57]</sup> Bei letzterem handelt es sich meist um einen Fluoreszenz-Farbstoff, ein Epitop zur Antikörperbindung oder eine radioaktive Isotopenmarkierung.<sup>[58,59]</sup> Er dient der schnellen Identifikation und Anreicherung der markierten Proteine und wird durch den Linker von der reaktiven Gruppe räumlich getrennt, sodass die PAL-Sonde über ein ähnliches Affinitätsprofil verfügt wie die Ausgangsverbindung.

Aufgrund der intrinsischen Reaktivität der durch die Photolyse gebildeten Zwischenstufe wird zur PAL-Markierung keine katalytische Aktivität der bindenden Proteine benötigt. Zudem spielen die strukturelle Beschaffenheit der Bindungsstelle und chemische Natur der wechselwirkenden Aminosäuren-Seitenketten, für die Bildung der kovalenten Bindung, nur eine mittelbare Rolle. Hauptsächlich bestimmend für die Effizienz der Photomarkierung ist die Affinität des Liganden zum Wirkort. Aus diesem Grund eignet sich PAL hervorragend als Targetidentifizierungsmethode. Allerdings ist die Methode mit einem vergleichsweise hohen synthetischen Aufwand verbunden und setzt Kenntnisse über Struktur-Wirkbeziehungen des zu funktionalisierenden Wirkstoffs voraus.



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung. Durch UV-Bestrahlung wird eine chemisch hochreaktive Spezies gebildet, welche die Sonde mit dem Targetprotein kovalent verknüpft. Durch das Vorhandensein einer Reportereinheit können markierte Proteine anschließend erkannt und angereichert werden.

## 1.4 Die Klasse der Thiopeptide

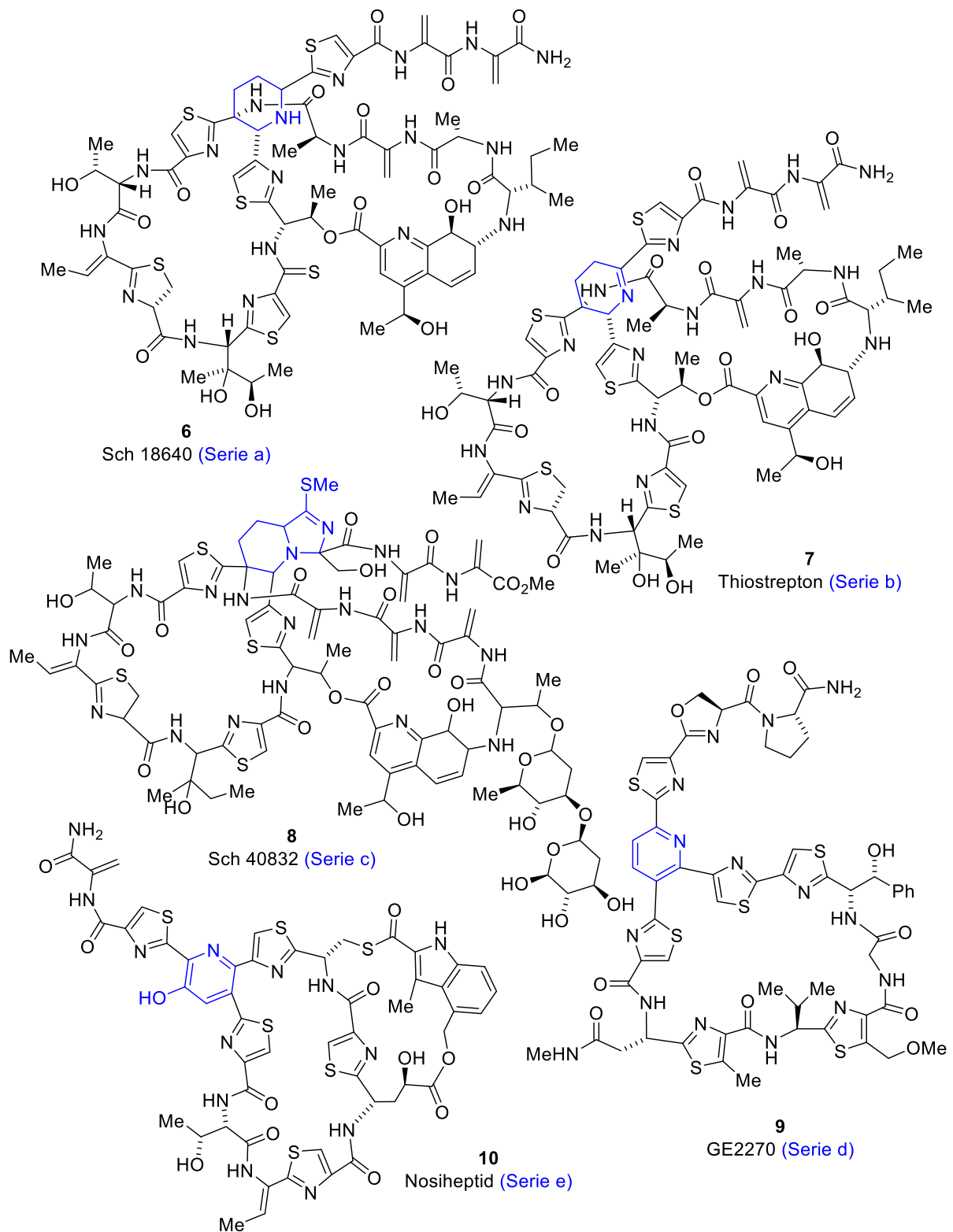
Thiopeptide bilden eine Klasse schwefelreicher, makrozyklischer Sekundärmetaboliten, mit herausragender antibiotischer Aktivität gegen eine Vielzahl Gram-positiver Bakterien, darunter auch Problemkeime, wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente *Enterococcus* (VRE) und Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* (PRSP).<sup>[60]</sup> Als erster Vertreter dieser Naturstoffklasse wurde Micrococcin P1 im Jahre 1948 in einer Abwasser-Probe der Stadt Oxford entdeckt.<sup>[61]</sup> Seither wurden mehr als 100 verschiedene Thiopeptide isoliert, meist aus Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces*. Der prominenteste Vertreter darunter ist Thiostrepton, welches zum ersten Mal im Jahre 1954 beschrieben wurde.<sup>[62-64]</sup>

### 1.4.1 Strukturmerkmale der Thiopeptide

Thiopeptide sind hochmolekulare (1-2 KDa), makrozyklische Verbindungen mit meist mäßiger Wasserlöslichkeit. Als Hauptmerkmal besitzen sie einen zentralen tri- oder tetrasubstituierten Heterozyklus, welcher als „Ankerpunkt“ für mindestens einen Makrozyklus und eine azyklische Molekül-Seitenkette dient. Charakteristisch für letztere Strukturelemente sind ein auffällig hohes Vorhandensein diverser dehydratisierter Cys-, Ser- und Thr-Einheiten sowie zyklisierte Aminosäurereste zu Oxazolen, Thiazolen und Thiazolinen.<sup>[65]</sup> Der zentrale Ring beinhaltet einen sechsgliedrigen stickstoffhaltigen Heterozyklus, welcher in vier unterschiedlichen Oxidationsstufen vorkommen kann und die Grundlage für die Klassifizierung der verschiedenen Thiopeptide bildet<sup>[65]</sup> (siehe **Abbildung 1-5**).

Alle Thiopeptide der Serien *a*, *b* und *c* beinhalten einen trisubstituierten Kern, als zentrales Element eines *bis*-makrozyklischen Grundgerüsts. In der *a* Serie stellt der zentrale Heterozyklus einen vollständig reduzierten Piperidin-Kern dar. In den Serien *b* und *c* dagegen handelt es sich jeweils um ein 1,2-Dehydropiperidin und ein Dehydroimidazopiperidin, wobei letzteres bisher einzig beim Thiopeptid Sch 18640 vorgefunden wurde. Die Mitglieder der Serie *d* bilden die Mehrheit der bisher vorgefundenen Strukturen. Charakteristisch für diese Thiopeptide ist das Vorkommen eines trisubstituierten Pyridin-

Rings. In der *e* Serie, weist der Pyridin-Kern zusätzlich eine Hydroxylierung in der Position 3 auf, und ist somit tetrasubstituiert.



**Abbildung 1-5:** Klassifizierung der Thiopeptidantibiotika nach der Oxidationsstufe ihres zentralen Heterozyklus modifiziert nach Baringo *et al.*<sup>[60]</sup>

## 1.4.2 Biosynthese der Thiopeptide

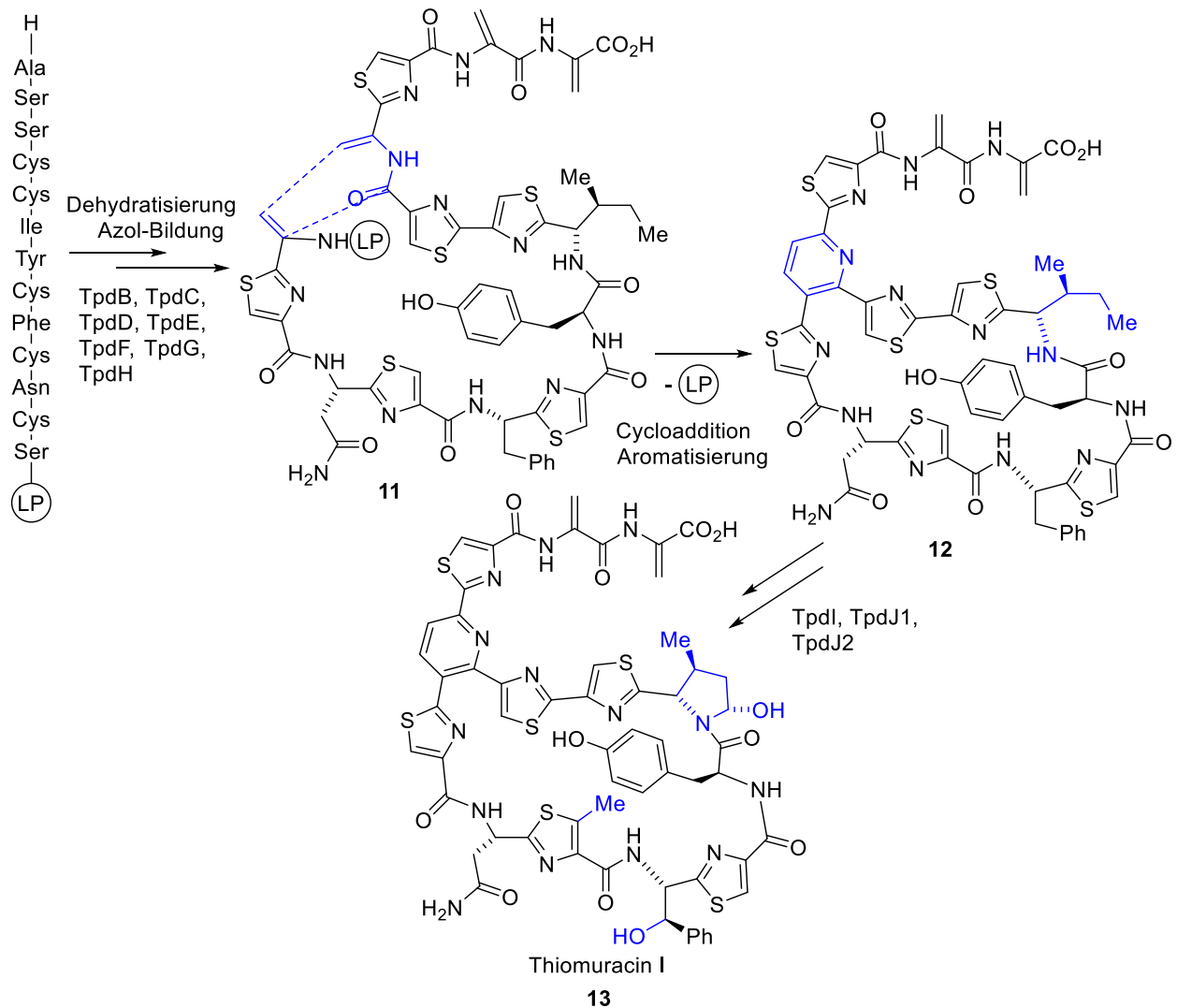
Aufgrund der Größe und Komplexität der Thiopeptide, sowie der Vielzahl an modifizierten Aminosäureresten, wurde lange eine nichtribosomale Biosynthese dieser Moleküle postuliert. Erst kürzlich konnte mittels bioinformatischer und genomischer Untersuchungen der Produzentenstämme das Gegenteil belegt werden.<sup>[66-68]</sup>

Die Aminosäuren-Abfolge eines Thiopeptids kann auf die Sequenz eines genetisch codierten Vorläuferpeptids zurückgeführt werden, welches innerhalb eines biosynthetischen Genclusters, umgeben von den modifizierenden Enzymen, vorliegt.<sup>[69-77]</sup>

Das Vorläuferpeptid besteht aus einem C-terminalen Struktur-Peptid aus 12 bis 17 Aminosäuren und einem N-terminalen Leitpeptid aus 34 bis 55 Aminosäuren, welches im Laufe des biosynthetischen Prozesses gespalten wird. Die einzelnen Funktionen der modifizierenden Enzyme wurden mittels Strukturabgleich mit bekannten Enzymen, sowie gezielter Gendeletion bestimmt. Zudem konnte die Abfolge der Transformationen mittels Isolierung und Charakterisierung der Zwischenprodukte abgeleitet werden.<sup>[67,76-85]</sup>

Die Bildung der Oxazol-, Thiazol- und Thiazolinringe erfolgt durch Cyclisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Serin-, Threonin- und Cystein-Reste. Im Anschluss werden Dehydroaminosäurereste durch Phosphorylierung mit nachfolgender Eliminierung dargestellt. Der zentrale Heterozyklus wird dann über eine Hetero-(Aza-)Diels-Alder-ähnliche Cycloaddition mit nachfolgender Dehydratisierung und eventueller Eliminierung gebildet (siehe **Abbildung 1-6**). Weitere Seitenketten-Modifikationen, wie Oxidationen, Cyclisierungen, Methylierungen, Einführung der Indolin- bzw. Chinaldinsäure-Einheiten erfolgen in späteren Schritten der Biosynthese. Für die Indolin- bzw. Chinaldinsäure-Einheiten konnte über Markierungsexperimente<sup>[86-89]</sup> gezeigt werden, dass beide aus *L*-Tryptophan hervorgehen. Das sogenannte C-terminale *Tailoring*, bei welchem meist eine terminale Amid-Gruppe an der azyklischen Molekül-Seitenkette eingeführt wird,<sup>[78]</sup> erfolgt im letzten Schritt. Zwei unterschiedliche Mechanismen wurden diesbezüglich beschrieben:

- Bei Nosiheptid (**10**) wird das C-terminale Amid durch Spaltung des Serin-Rests erhalten.
- Bei Thiostrepton (**7**) erfolgt dies durch Aminolyse eines durch vorherige Methylierung des C-Terminus erhaltenen Methylesters. Dabei dient Gln als Stickstoff-Donor.<sup>[90]</sup>



**Abbildung 1-6:** Biosynthese von Thiomuracin I adaptiert nach Baringo *et al.*<sup>[60]</sup> LP: Leitpeptid. Die modifizierenden Enzyme (TdpX) werden entsprechend der Bezeichnung ihrer jeweiligen Gene (*tdpX*) im *tdp*-Gencluster angegeben.

### 1.4.3 Polypharmakologisches Wirkprofil der Thiopeptide

Thiopeptide sind primär für ihre antibakterielle Aktivität bekannt, verfügen jedoch über ein breiteres pharmakologisches Wirkprofil. Zahlreiche Vertreter dieser Naturstoffklasse zeigen zusätzlich eine antiplasmodiale und –fungale,<sup>[91-97]</sup> sowie immunsuppressive<sup>[98]</sup> und zytostatische Wirkung.<sup>[99-105]</sup> Darüber hinaus weisen einige Thiopeptide inhibitorische Eigenschaften gegenüber dem humanen Plasma-Enzym Renin auf, welches mit Bluthochdruck, Diabetes und Alzheimer in Verbindung steht. Aus diesen Gründen hat das makrozyklische Grundgerüst der Thiopeptide in den letzten Jahren eine hohe Bedeutung als privilegierte Leitstruktur gewonnen.



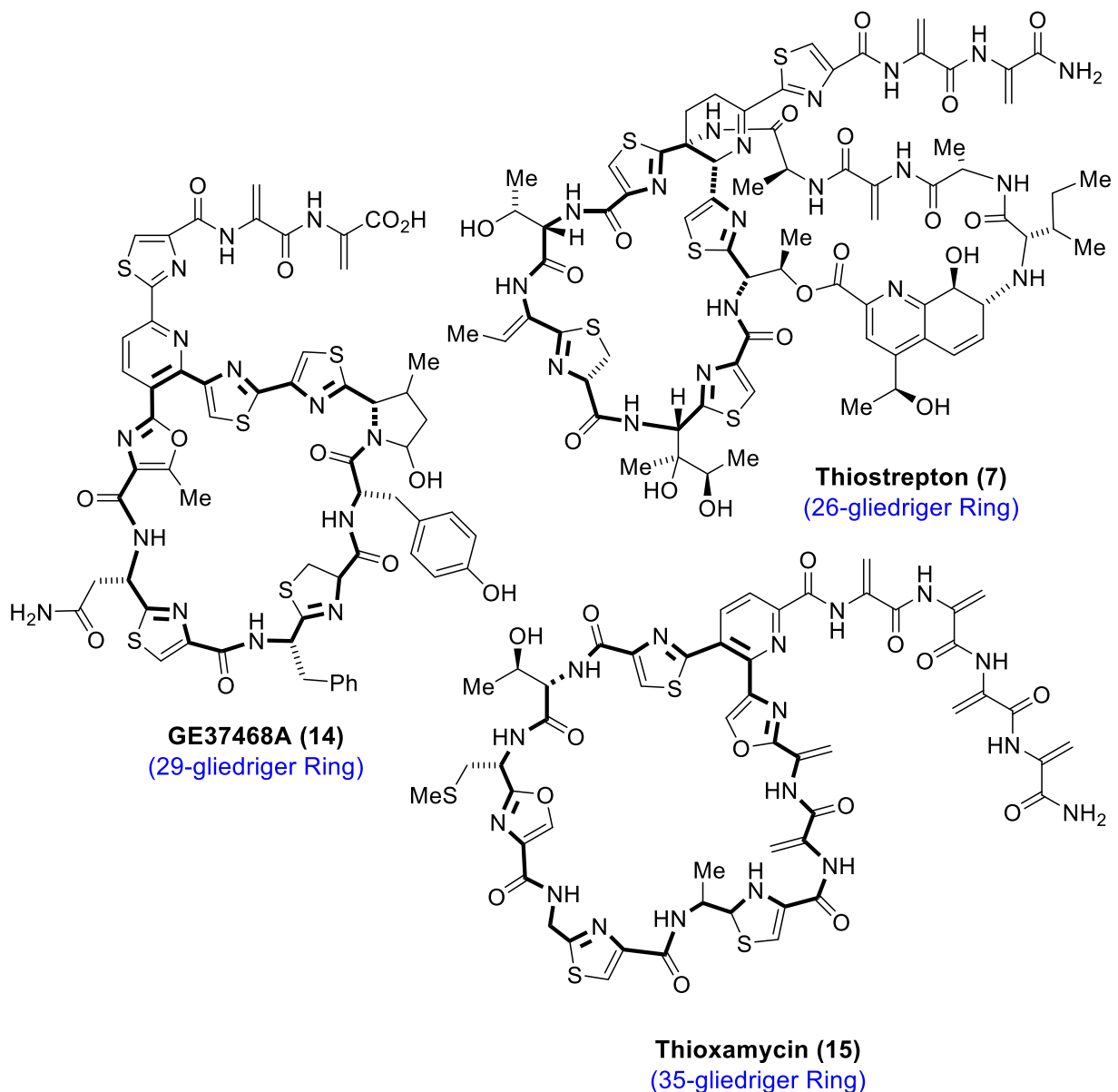
### 1.4.3.1 Inhibitorische Aktivität auf die bakterielle Proteinbiosynthese

Beinahe alle bisher untersuchten Thiopeptide weisen eine starke antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien auf. Die bakterizide Wirkung resultiert dabei aus einer Inhibierung der Protein-Translation, wobei unterschiedliche Wirkmechanismen, abhängig von der Größe des makrozyklischen Grundgerüsts, beschrieben wurden.

Thiopeptide mit einem 26-gliedrigen Makrozyklus, etwa Thiostrepton oder Micrococcin P1, binden an das sogenannte GTPase-assoziierte Zentrum des Ribosoms und verhindern damit das Andocken des Elongationsfaktors G (EF-G). So wird die GTP-abhängige Translokation des mRNA/Peptid-Komplexes von der P- in die E-Stelle unterbunden und es kommt zum Erliegen des Elongationsschritts.<sup>[106-108]</sup>

Thiopeptide mit einem 29-gliedrigen makrozyklischen Aufbau, etwa GE37468A, binden an den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu). Dadurch unterbinden sie den Transport des mRNA/Aminoacyl-Komplexes an die A-Stelle des Ribosoms, und somit die Verlängerung des naszierenden Peptids.<sup>[109-111]</sup>

Eine letzte Gruppe innerhalb der Thiopeptide bilden die 35-gliedrigen Vertreter, wie Thioxamycin, Berninamycin oder Promoinducin. Sie zeigen ebenfalls eine translationsinhibierende Wirkung. Der genaue Wirkmechanismus und die Bindungsstelle sind derzeit jedoch noch unbekannt.



**Abbildung 1-7:** Die unterschiedlichen makrozyklischen Ringgrößen innerhalb der Thiopeptid-Naturstoffklasse adaptiert nach Baringo *et al.*<sup>[60]</sup>

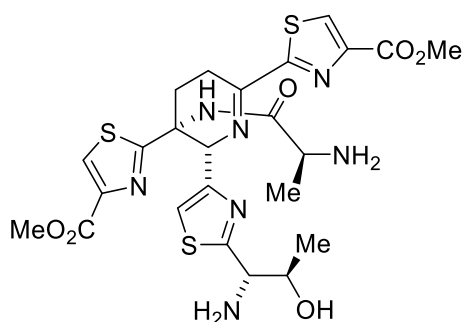
### 1.4.3.2 TipA-Geninduktion

Einen weiteren bakteriellen Wirkort der Thiopeptide stellen die sogenannten Thiostrepton-induzierten Proteine TipAL und TipAS dar.<sup>[112]</sup> Sie wurden bisher nur in nicht-Produzentenstämmen der Gattung *Streptomyces* beschrieben. Ihre Funktion ist weitgehend unklar.<sup>[113,114]</sup> Die Interaktion der TipA-Proteine mit Thiopeptiden kann kovalenter Natur sein und erfolgt dann vermutlich über eine *Sulfa*-Michael-Addition an der Dehydroalanin-Molekül-Seitenkette.

TipAL und TipAS werden aus demselben Gen (*tipA*) exprimiert, wobei TipAS nur aus der C-terminalen Ligand-bindenden Domäne von TipAL besteht. Letzteres verfügt zusätzlich über eine Dimerisierungs- sowie eine DNA-Bindedomäne. Durch Interaktion mit einem Thiopeptidmolekül, kann TipAL anschließend an den *tipA*-Genpromotor (*ptipA*) binden und die TipA-Genexpression retroaktivieren. Eine Anwendung der TipA-Geninduktion ist ihr Einsatz in Hochdurchsatzscreenings zum Identifizieren neuer Thiopeptidantibiotika,<sup>[115-118]</sup> sowie als Selektionsmerkmal in Streptomyzeten.

### 1.4.3.3 Zytostatische Aktivität

Eine weitere Aktivität mancher Thiopeptidantibiotika ist ihre wachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen.<sup>[119]</sup> Für Thiostrepton (7) konnte eine selektive zytostatische Wirkung auf Krebszelllinien im unteren mikromolaren Bereich gezeigt werden.<sup>[99]</sup> Dabei weist es interessanterweise keinerlei zytotoxische Aktivität auf gesunde Zellen auf. Als Zielstruktur wurde der onkogene Transkriptionsfaktor FoxM1 („Forkhead Box M1“) vorgeschlagen, dessen Hochregulierung mit zahlreichen Karzinomen in Verbindung steht und in differenzierten Zellen praktisch nicht exprimiert wird.<sup>[101,104,105]</sup> Dabei besonders bemerkenswert ist, dass FoxM1 lange als chemisch nicht adressierbar galt,<sup>[120,121]</sup> auch wenn die direkte Wirkung von Thiostrepton (7) auf FoxM1 kontrovers diskutiert wird.<sup>[122]</sup> Des Weiteren konnte bei einem Thiostrepton-Fragment, welches dem trisubstituierten Dehydropiperidin-Kern entspricht und im Laufe der Totalsynthese von Nicolaou *et al.* dargestellt wurde, eine deutlich gesteigerte zytostatische Wirkung nachgewiesen werden.<sup>[99]</sup>



16

**Abbildung 1-8:** Struktur des im Laufe der Totalsynthese von Thiostrepton erhaltenen zytostatischen Fragments 16.

#### 1.4.3.4 Antiplasmodiale Wirkung

Viele Thiopeptide zeigen eine starke toxische Aktivität gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*.<sup>[91-95]</sup> Aufgrund der großen Ähnlichkeit des bakteriellen 70S Ribosoms mit der Protein-Translationsmaschinerie des plasmodialen Apicoplasten wurde Letzteres als Zielstruktur angenommen.<sup>[123]</sup> Tatsächlich sind zahlreiche Ribosom-gerichtete Antibiotika wie z. B. Clindamycin gegen Plasmodien aktiv und werden z. T. in der Antimalariatherapie eingesetzt.<sup>[94]</sup> Charakteristisch für diese Antibiotika ist eine verzögerte Wirkung, welche in der Regel erst nach vier Tagen einsetzt und als „*delayed death effect*“ bekannt ist.

Interessanterweise wird beim Einsatz von Thiopeptiden kein solcher „*delayed death effect*“ beobachtet, sodass ein abweichender Wirkmechanismus mit zusätzlichen Wirkorten postuliert wurde.<sup>[96]</sup> Auch konnte mittels Einsatz einer fluoreszierenden Thiostrepton-Sonde gezeigt werden, dass parallel zum Apicoplasten das plasmodiale 20S Proteasom angesteuert wird.<sup>[96]</sup> Diese Hypothese konnte kürzlich mit spezifischen Inhibitoren des plasmodialen Proteasoms erläutert werden, die gegen den Erreger wirksam sind.<sup>[124]</sup>

#### 1.4.3.5 Weitere Aktivitäten

Über ein *Screening*-Programm zur Identifizierung neuer Inhibitoren der B-Lymphozyten-vermittelten Antikörperproduktion, wurde das Thiopeptid Siomycin gefunden<sup>[98]</sup>. Durch Einsatz von Siomycin in murinen Arthritis-Modellsystemen konnte eine signifikante Linderung der Krankheitssymptome erreicht werden. Interessanterweise wurde dabei eine Inhibierung der sowohl T-Zellen-abhängigen als auch -unabhängigen Antikörper-Produktion nachgewiesen, was einen von bekannten Immunsuppressiva-abweichenden Wirkmechanismus anzeigte.

Cyclothiazomycine gehören zu den Thiopeptiden der Serie *d* und beinhalten einen zentralen Pyridin-Kern. Auffällig für diese Gruppe ist das Fehlen eines azyklischen Molekül-„Schwanzes“, welcher über eine Thioetherverknüpfung zum makrozyklischen Gerüst einen zusätzlichen Ring bildet. Als mögliche Konsequenz dieser strukturellen Besonderheit weisen einige Cyclothiazomycine abweichende pharmakologische Aktivitäten auf. Eine bedeutende Wirkung ist die Inhibierung der proteolytischen Aktivität des humanen Plasma-

Enzyms Renin.<sup>[125]</sup> Letzteres spielt eine zentrale Rolle in der Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II und gilt als vielversprechender therapeutischer Ansatz gegen arterielle Hypertonie,<sup>[126]</sup> Diabetes<sup>[127]</sup> sowie die Alzheimer-Erkrankungen.<sup>[128]</sup>

## 1.5 Zielsetzung

Affinitätsbasiertes Protein-Profilung – ebenfalls Photoaffinitätsmarkierung genannt (*Photoaffinity Labeling*, PAL) – stellt eine besonders effiziente und breit anwendbare Strategie bei der Suche nach den Targets biologisch aktiver Verbindungen dar. Dabei wird eine photolytisch induzierbare reaktive Gruppe im Analyt eingebaut, welche nach UV-Aktivierung eine kovalente Bindung mit dem Zielprotein eingeht. Bestimmend für die Effizienz der Markierungsreaktion ist dabei hauptsächlich die Affinität der Sonde für das Target. Bei der Darstellung einer PAL-Sonde ist es daher von zentraler Bedeutung, dass das Photophor an einer für die biologische Aktivität des Wirkstoffs nicht relevante Position des Grundgerüsts eingeführt wird. Um dies zu erreichen, können sowohl semi- als auch totalsynthetische Ansätze verfolgt werden. Aufgrund mangelnder selektiv adressierbarer Reaktivitäten innerhalb der zu modifizierenden Zielmoleküle sind totalsynthetische Ansätze jedoch nicht selten die einzige Möglichkeit. Dies ist für hochmolekulare und strukturell komplexe Verbindungen ein bedeutendes Problem, da die Synthese der entsprechenden PAL-Sonden mit einem sehr hohen Arbeitsaufwand und einer geringen Gesamtausbeute verbunden ist.

Ein Beispiel für derartige komplexe Zielerbindungen stellen die verschiedenen Vertreter der Thiopeptid-Naturstoffklasse dar. Trotz bemerkenswert breiter pharmakologischer Wirkung war zu Beginn dieser Arbeit noch keine Thiopeptid-basierte PAL-Sonde in der Literatur beschrieben. Auch ist der Wirkmechanismus dieser Naturstoffklasse – insbesondere in eukaryotischen Organismen – noch weitgehend unbekannt. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Photoaffinitätslabels, welches sich zur Implementierung von Thiopeptiden eignet.

Um die Anwendbarkeit der Methode zu demonstrieren, sollte Thiostrepton (**7**) als prominentester und am besten untersuchter Vertreter innerhalb dieser Familie mithilfe des entwickelten Systems zu einer lichtinduzierbaren Sonde funktionalisiert werden. Thiostrepton (**7**) ist kommerziell verfügbar und eignet sich daher besonders gut für

semisynthetische Ansätze. Darüber hinaus ist für Thiostrepton (7) bereits eine Totalsynthese<sup>[129]</sup> in der Literatur beschrieben worden. Auch wurden in der Arbeitsgruppe diverse semisynthetische Derivate des Naturstoffs hergestellt, sowie Struktur-Wirkbeziehungsuntersuchungen bzgl. dessen translationshemmenden, antiplasmodialen und Proteasom-inhibierenden Aktivitäten durchgeführt.<sup>[96,130,131]</sup> Somit können die grundlegenden chemischen Reaktivitäten des Naturstoffs, sowie die für die biologische Aktivität relevanten Positionen in dessen Grundgerüst als bekannt vorausgesetzt werden. Des Weiteren ist der Wirkmechanismus von Thiostrepton (7) auf die bakterielle Proteinbiosynthese weitgehend charakterisiert und eine Röntgen-Kristallstrukturanalyse des Naturstoffs in Komplex mit der 50S Untereinheit aus *D. radiodurans* 2008 sogar veröffentlicht worden.<sup>[132]</sup> Ausgehend von den biochemischen Erkenntnissen hinsichtlich der Thiostrepton-Bindestelle am 70S Ribosom könnte daher die Effizienz der dargestellten Thiostrepton-PAL-Sonde geprüft werden, indem die erhaltenen Markierungsprodukte mit den zu erwartenden Zielproteinen verglichen werden. Auf diese Weise könnte die Validität des entwickelten Photoaffinitätslabels und somit dessen potenzielle Anwendbarkeit auf andere Zielverbindungen untersucht werden.



---

## 2 Chemische Proteomik



## 2.1 Verbindungszentrierte chemische Proteomik

Verbindungszentrierte chemische Proteomik (*Compound-Centric Chemical Proteomics*, CCCP) stellt eine „postgenomische“ Version der klassischen Affinitätschromatographie dar.<sup>[133,134]</sup> Niedermolekulare Wirkstoffe, welche über Screenings identifiziert wurden, werden dafür auf biologisch inertem Material (meist Agarose oder Sepharose) immobilisiert und bilden die stationäre Phase einer Affinitätschromatographie.<sup>[135,136]</sup> Trägermaterial und Wirkstoff werden dabei über einen Linker verknüpft, welcher dazu dient, beide Elemente räumlich voneinander zu trennen und so potenzielle sterische Hinderungen zu vereiteln. Die Einführung der Linkerregion darf dabei nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität bzw. -spezifität des zu untersuchenden Wirkstoffs haben, sodass die erhaltene stationäre Phase über ein vergleichbares Aktivitätsprofil verfügt. Dafür ist die Kenntnis von Struktur-Aktivitätsbeziehungsstudien von großer Bedeutung.

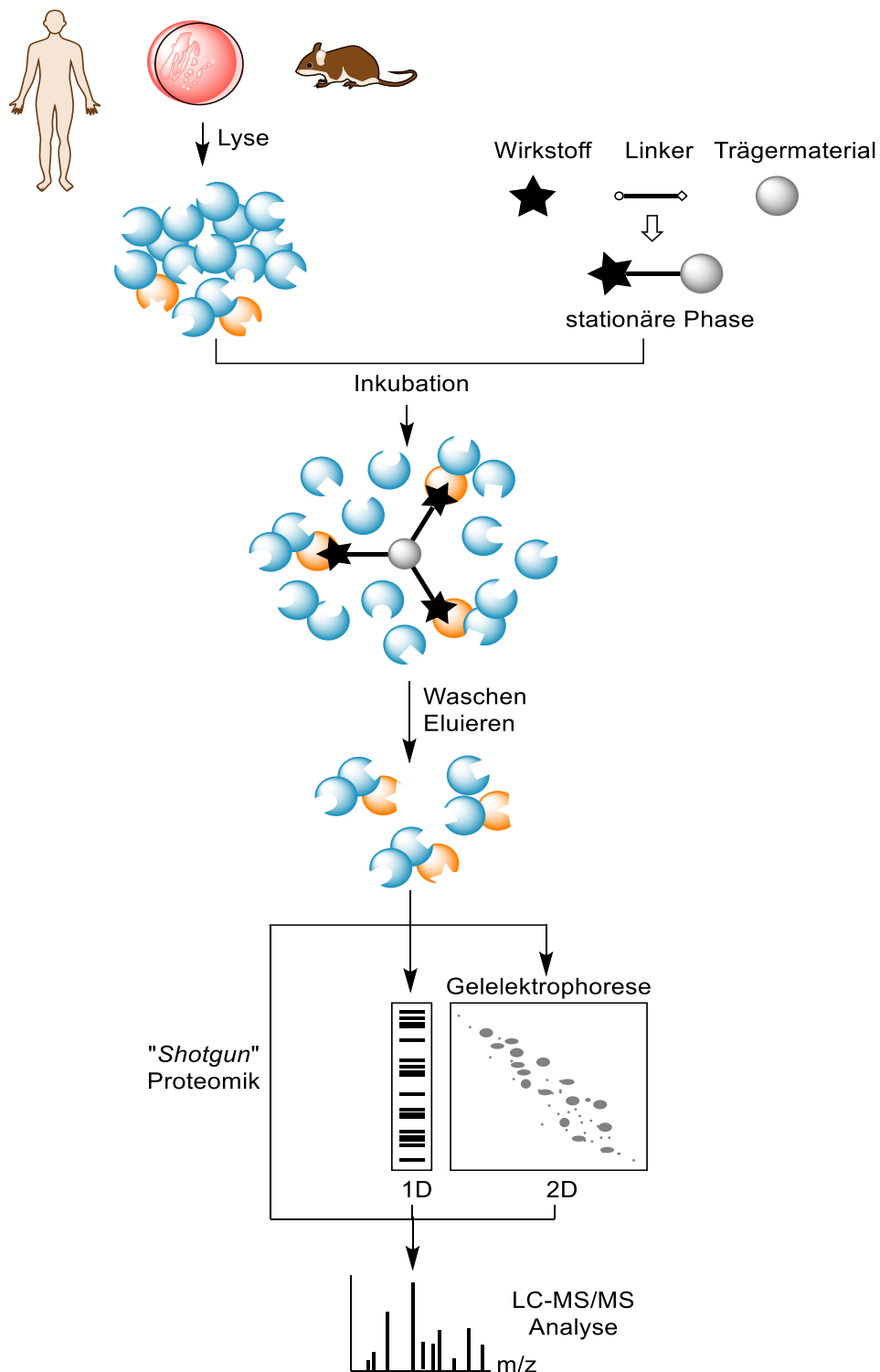
Nach Inkubation des hergestellten Säulenmaterials mit Zellysate werden zunächst unspezifische Bindungspartner durch mehrere Waschschrte entfernt.<sup>[137,138]</sup> Im Anschluss erfolgt die Elution, wobei abhängig von der Beschaffenheit der stationären Phase, unterschiedliche Strategien eingesetzt werden können. Meist erfolgt die Elution unspezifisch durch Zugabe von Chaotropen (z. B. Salze oder Tenside) bzw. kompetitiv mit einem Überschuss an löslichem Wirkstoff. Spezifischere Elutionen können jedoch erreicht werden, wenn zur Herstellung des Säulenmaterials ein spaltbarer Linker eingesetzt wurde.<sup>[50]</sup>

Die Charakterisierung der eluierten Binder erfolgt anschließend typischerweise über Massenspektrometrie. Hierbei können zwei Ansätze verfolgt werden:

- Die eluierten Proteine werden über Gelelektrophorese (1D oder 2D) aufgetrennt, proteolytisch gespalten (typischerweise mit Trypsin) und die daraus erhaltene Peptidmischung über nano-HPLC-ESI-MS/(MS) analysiert.<sup>[139]</sup>
- Die Proteine werden ohne vorherige elektrophoretische Trennung trypsiniert, mittels iterativer HPLC getrennt und über ESI-MS/(MS) analysiert („*Shotgun* Proteomik“).<sup>[140]</sup>

Ein Abgleich der gefundenen Massen mit Protein-Datenbanken (z. B. SwissProt oder *US National Center for Biotechnology Information*) mittels geeigneter Suchmaschine (z. B. Mascot oder Sequest) erlaubt dann die Identifizierung der Proteine.<sup>[141]</sup> Als Voraussetzung dafür

sollte allerdings das Transkriptom (oder zumindest das Genom) des untersuchten Organismus vollständig sequenziert sein.



**Abbildung 2-1:** Schematische Darstellung der verbindungszentrierten chemischen Proteomik modifiziert nach Rix *et al.*<sup>[50]</sup>

Verbindungs-zentrierte chemische Proteomik stellt die am häufigsten eingesetzte Strategie bei der Suche nach den biologischen Zielstrukturen eines Wirkstoffs dar.<sup>[135]</sup>

Seit ihrer Konzeptentwicklung in den späten 1960er Jahren<sup>[136]</sup> wurde die Methode fortlaufend optimiert. Aktuell erlebt sie einen signifikanten Aufschwung, u. a. weil sie von den erheblichen Fortschritten der Massenspektrometrie, Bioanalytik und Bioinformatik profitiert.<sup>[142-144]</sup> Der Hauptnachteil dieser Strategie ist aber nach wie vor ihr hoher Bedarf an Analyt und biologischem Material (Zelllysate).<sup>[145]</sup> Besonders problematisch ist dies für wenig exprimierte, kurzlebige, sowie gewebe- oder zellzyklusabhängige Proteine. Darüber hinaus, stellt die Untersuchung von Membranproteinen immer noch eine große Herausforderung dar, weil diese in nativer Konformation aufgetragen werden müssen, um eine Wechselwirkung mit der stationären Phase zu ermöglichen.<sup>[146]</sup>

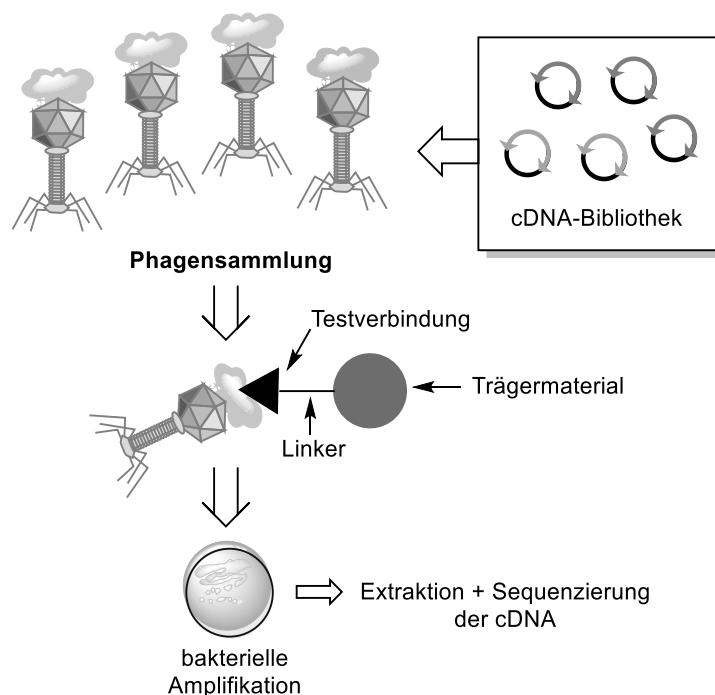
### **2.1.1 CCCP gekoppelt mit Phagen-Display**

Das Phagen Display ist eine Affinitätsselektionsmethode, welche ursprünglich für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Identifikation von spezifischen Antikörpern entwickelt wurde.<sup>[147]</sup> Dieselbe Methode kann aber auch eingesetzt werden, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und niedermolekularen Wirkstoffen zu ermitteln. Das Prinzip dabei ist ähnlich zu herkömmlichen Affinitätschromatographie-Methoden, mit dem Unterschied, dass die zu untersuchenden Proteine einzeln auf dem Kapsid eines Bakteriophagen präsentiert werden.<sup>[148]</sup> Dementsprechend sind die Proteine in nahezu identischen Verhältnissen vertreten, sodass der Einsatz von Phagen Display sehr vorteilhaft sein kann, wenn die gesuchten Targets von geringem Vorkommen bzw. instabil sind.

Zur Erzeugung einer rekombinanten Phagensammlung werden zunächst die einzelnen Sequenzen einer DNA-Bibliothek (meist cDNAs) mit der Gensequenz eines Hüllproteins des Bakteriophagen ligiert. Die nach bakterieller Prozessierung erhaltenen rekombinanten Phagen präsentieren auf ihrer Oberfläche jeweils ein cDNA-codiertes Protein, welches als N-terminales Fusionsprodukt vorliegt.<sup>[148]</sup> Im Anschluss werden die Phagen mit dem zu untersuchenden Wirkstoff inkubiert und nach ihrer Affinität zu Letzterem selektiert. Dabei wird die Verbindung vorherig auf einem Trägermaterial immobilisiert, sodass bindende von nicht-bindenden Phagen getrennt werden können. Aus den bindenden Bakteriophagen

wird anschließend die Gensequenz des Oberflächenproteins extrahiert und über PCR vervielfältigt.<sup>[149,150]</sup> Abschließend wird die Nukleotid-Abfolge bestimmt und das Protein mittels bioinformatischem Abgleich mit Protein-Datenbanken identifiziert.

Insbesondere zur Herstellung von Antikörpern hat das Phagen-Display in den letzten Jahren signifikante Verbesserungen erfahren und ermöglicht inzwischen die Erzeugung von besonders großen und sogar semisynthetischen DNA-Bibliotheken.<sup>[151]</sup> Der Hauptnachteil dieser Methode ist jedoch nach wie vor, dass die präsentierten Proteine weder in nativer Konformation vorliegen, noch posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierungen oder Glykosylierungen) aufweisen.



**Abbildung 2-2:** Schematische Darstellung der Targetidentifizierung mittels Phagen-Display.

### 2.1.2 Hefe-Drei-Hybrid-System (Y3H)

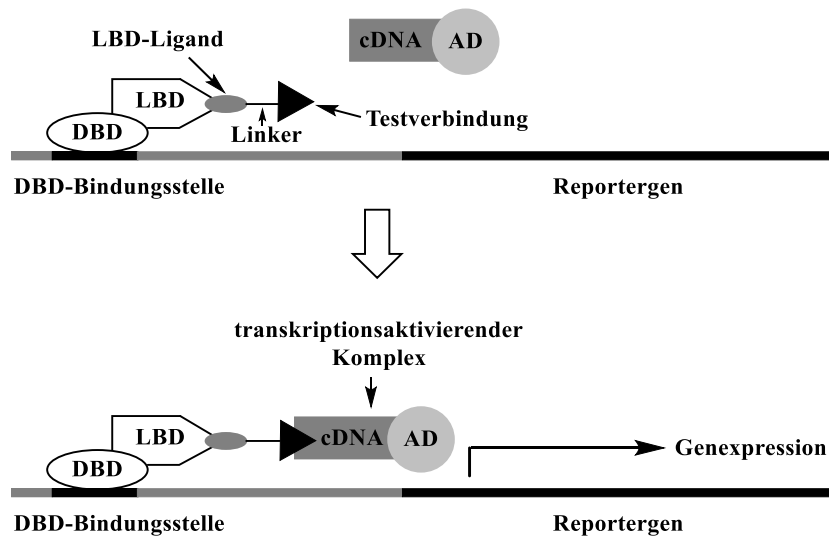
Das Hefe-Drei-Hybrid-System (Y3H) wurde bisher nur selten zur Charakterisierung des pharmakologischen Profils von Wirkstoffen eingesetzt.<sup>[152]</sup> Dabei stellt das Y3H eine besonders interessante Strategie dar, weil es die Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen *in vivo* ermöglicht.

Die Grundelemente eines Y3H-Systems sind auf der Abbildung 2-3 dargestellt. Die Methode basiert auf dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H),<sup>[153]</sup> wobei die Bildung des

transkriptionsaktivierenden Komplexes hier von einem sogenannten chemischen „Dimerizer“ abhängig ist.<sup>[154-156]</sup>

In einer Hefezelle werden zwei Chimärenproteine exprimiert. Eines der beiden besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne (meist LexA) und einer Ligand-Bindungsdomäne (LBD) mit bekannter Affinität. Das zweite Chimärenprotein beinhaltet eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (in der Regel B42 oder GAL4), welche mit einem cDNA-codierten Protein fusioniert ist.<sup>[154]</sup> Zum Ermitteln der Affinität der cDNA-codierten Proteine für den untersuchten Wirkstoff muss dieser zuerst chemisch modifiziert werden. Dabei wird die Verbindung über einen Linker mit dem bekannten LBD-Liganden zum Heterodimer überführt. Daraus resultierend bewirkt eine ausreichend starke Interaktion zwischen Wirkstoff und cDNA-codiertem Protein eine ligandabhängige Dimerisierung der Chimärenproteine mit Bildung eines funktionsfähigen transkriptionsaktivierenden Komplexes und somit die Expression des Reportergens.<sup>[152]</sup>

Ähnlich wie beim Phagen-Display besteht der Hauptnachteil dieser Methode darin, dass die untersuchten potenziellen Proteintargets nicht zwingend in nativer Konformation vorliegen.

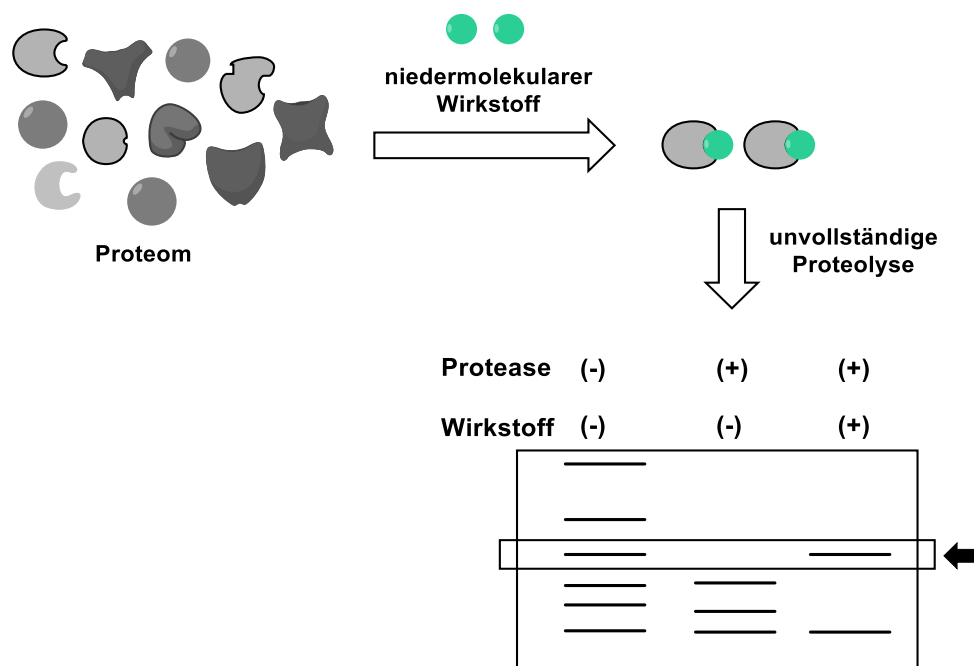


**Abbildung 2-3:** Schematische Darstellung des Hefe-Drei-Hybrid-Systems adaptiert nach Kley *et al.*<sup>[154]</sup> Zwei Chimärenproteine werden innerhalb einer Hefezelle exprimiert. Eines besteht aus einer DNA-bindenden Domäne fusioniert mit einer Ligand-bindenden Domäne. Das zweite Protein besteht aus einer transkriptionsaktivierenden Domäne fusioniert mit einem cDNA-kodierten Protein. Der zu untersuchende Wirkstoff wird über einen Linker mit dem LBD-Liganden gekoppelt. Bindet eines der cDNA-kodierten Proteine an den zu untersuchenden Wirkstoff, erfolgt eine Dimerisierung der Chimärenproteine mit Bildung eines funktionsfähigen transkriptionsaktivierenden Komplexes.

## 2.2 Label-freie Methoden

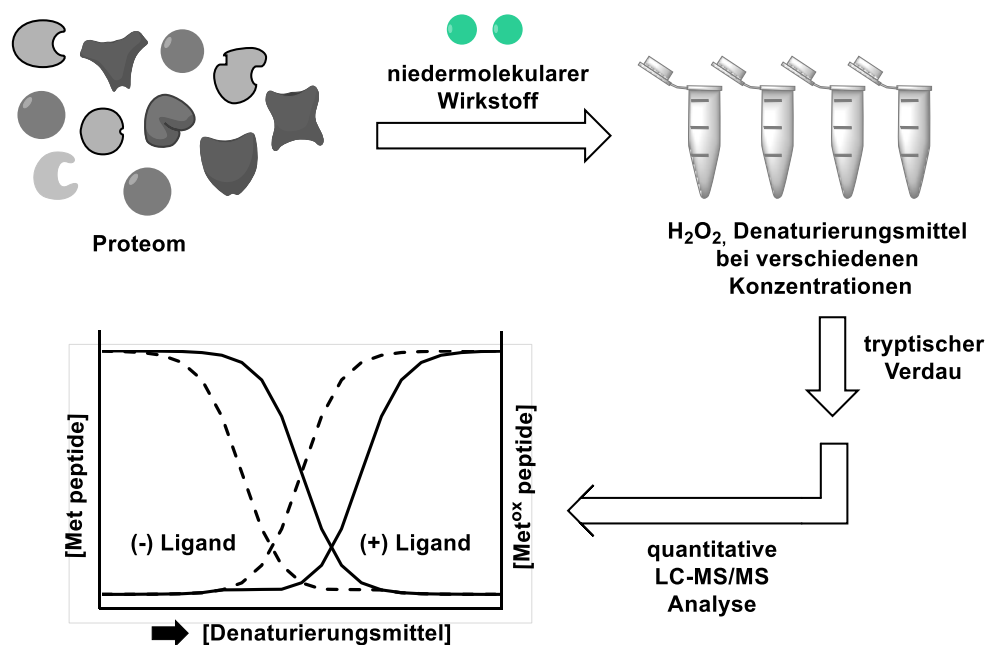
Label-freie Methoden haben den erheblichen Vorteil, dass sie keine chemische Funktionalisierung des Analyten erfordern. Die Targetidentifizierung basiert hier auf einer Abnahme der konformationellen Flexibilität des bindenden Proteins, als Ergebnis seiner Interaktion mit dem niedermolekularen Liganden. Dadurch weist das gebundene Protein eine erhöhte thermodynamische Stabilität auf und ist weniger empfindlich gegenüber enzymatischem und chemischem Abbau.<sup>[157]</sup>

Eine Methode, welche auf diesem Prinzip basiert ist DARTS (*Drug Affinity Responsive Target Stability*). Hierbei werden die Proteine einer unvollständigen Proteolyse (*limited proteolysis*) unterzogen und die erhaltenen Peptide mittels Gelelektrophorese analysiert. Durch Wiederholung des Experiments, nach Inkubation mit dem zu untersuchenden Liganden, werden veränderte elektrophoretische Verdauungsmuster gesucht, welche auf eine Proteolyse-Resistenz hindeuten. Die vermerkten Peptide werden anschließend über Massenspektrometrie analysiert und die Targets *in silico* ermittelt.<sup>[158,159]</sup>



**Abbildung 2-4:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs von DARTS. Ligand-gebundene Proteine weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteasen auf. Die Proteolyse-resistenten Proteine können über SDS-PAGE visualisiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Eine weitere Strategie ist die quantitative MS-basierte Methode, genannt SPROX (*Stability of Proteins from Rates of Oxidation*). Ähnlich wie bei DARTS wird bei diesem Ansatz die thermodynamische Stabilität von Ligand-Protein-Komplexen untersucht, um potenzielle Targets zu identifizieren. Statt proteolytischem Verdau werden hier die Proteine unter oxidativen Bedingungen (mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) steigenden Konzentrationen an Denaturierungsmittel ausgesetzt.<sup>[160]</sup> Nach Quenchen des Oxidationsmittels wird anschließend über MS die Zahl der oxidierten Methionin-Reste je Protein ermittelt und gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen. Proteine, welche dazu in der Lage sind mit dem Liganden zu interagieren, zeigen dabei eine Verschiebung der sigmoidalen Kurve hin zu höheren Konzentrationen an Denaturierungsmittel.<sup>[161,162]</sup>

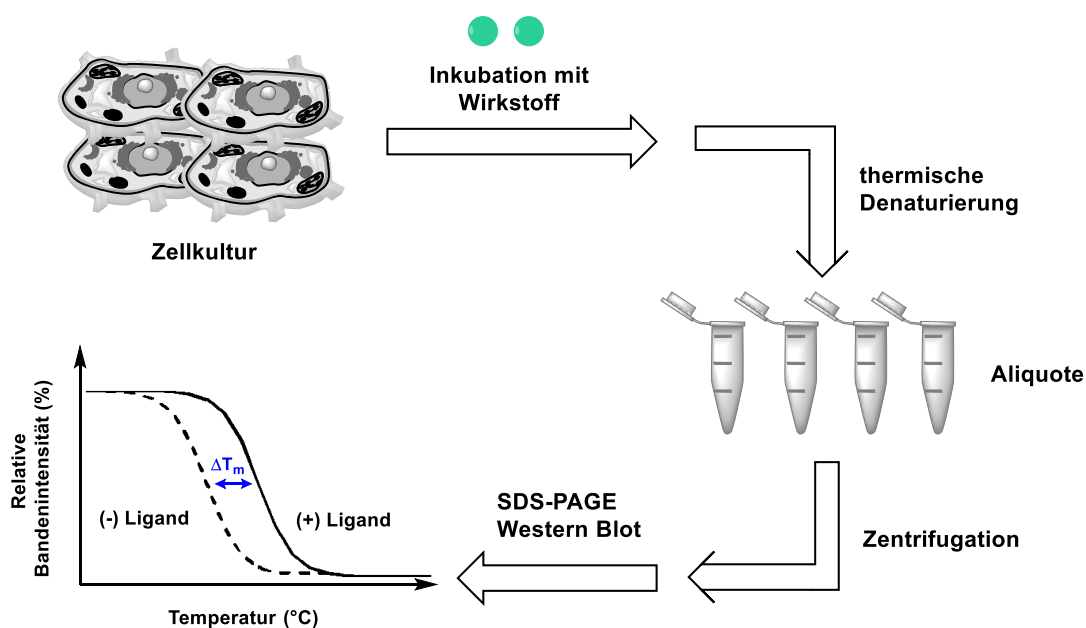


**Abbildung 2-5:** Schematische Darstellung von SPROX. Ligand-gebundene Proteine sind resistenter gegenüber Oxidationsmittel und erfordern höhere Denaturierungsmittel-Konzentrationen, um einen identischen Oxidationsgrad der Methionine zu zeigen wie ungebundene Proteine.

Ein weiterer und vielversprechender Ansatz stellt die erst kürzlich eingeführte Methode CETSA dar.<sup>[163]</sup> CETSA steht für *Cellular Thermal Shift Assay* und basiert auf dem von Semisotnov *et al.* 1991 beschriebenen Thermofluor-Assay<sup>[164]</sup> und dessen Weiterentwicklung durch die Firma 3 Dimensional Pharmaceuticals.<sup>[165]</sup> Das Grundprinzip dieser Methode sieht vor, dass Proteine nach Zugabe eines Bindungspartners eine erhöhte Thermostabilität aufweisen, wodurch ihre Konformation bei höheren Temperaturen erhalten bleibt.

Unter denaturierenden Bedingungen tendieren Proteine zur Bildung von unlöslichen Aggregaten, welche durch Zentrifugation ausgefällt werden können. Bei CETSA erfolgt die Ermittlung der konformationellen Stabilitätszunahme *in cellulo* durch Quantifizierung (beispielsweise über Immunblot) der im geklärten Zellysate löslichen Proteine nach thermischer Behandlung. Durch Auftragung der Konzentration an Überstand-löslichen Proteinen in Abhängigkeit zur Temperatur kann für die jeweiligen Proteine eine Schmelzkurve bestimmt werden. Bei Wiederholen des Experiments nach vorheriger Inkubation der Zellen mit einem niedermolekularen Wirkstoff werden potenzielle Proteintargets gesucht, indem veränderte Schmelzkurven identifiziert werden, die auf eine erhöhte thermische Stabilität hindeuten.

Erhebliche Vorteile dieser Methode sind ihre Schnelligkeit, ihr vergleichsweise geringer experimenteller Aufwand und die Möglichkeit Protein-Ligand-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Die Hauptlimitierung ist jedoch, dass bei weitem nicht alle Proteine unter denaturierenden Bedingungen aggregieren, weshalb die Anwendbarkeit von CETSA intrinsisch beschränkt bleibt.



**Abbildung 2-6:** Schematische Darstellung von CETSA. Ligand-gebundene Proteine weisen eine erhöhte konformationelle Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung als ungebundene Proteine auf. Diese drückt sich u. a. dadurch aus, dass gebundene Proteine im geklärten Zellysate eine geminderte Tendenz zur Aggregation zeigen. Durch Quantifizierung der Proteinkonzentration im Überstand, vor und nach Inkubation mit dem Wirkstoff, können somit wirkstoffinduzierte thermische Stabilisierungen gewisser Proteine detektiert werden, welche auf eine Wechselwirkung mit dem eingesetzten Analyt hindeuten.



## 2.3 Aktivitätsbasiertes Protein-*Profiling*

Aktivitätsbasiertes Protein-*Profiling* (*Activity-Based Protein Profiling*, ABPP) stellt eine besonders effiziente Strategie der chemischen Proteomik dar. Neben der Charakterisierung von biologischen Zielstrukturen<sup>[35,166-168]</sup> und der Entdeckung potenter und selektiver Enzyminhibitoren,<sup>[169-171]</sup> ermöglicht ABPP auch die quantitative Bestimmung von Enzymaktivitäten im ganzen Proteom.<sup>[172-174]</sup> Letztere Anwendung erlaubt die Durchführung von komparativen *Profiling*s, wobei die enzymatische Aktivität diverser metabolischer Marker *in vivo* und unter gegebenen physiologischen Bedingungen miteinander verglichen werden können.

Zur Durchführung eines ABPP-Experiments wird der zu untersuchende niedermolekulare Wirkstoff durch chemische Modifikation zu einer aktivitätsbasierten Sonde (*activity-based probe*, ABP) funktionalisiert. Eine ABP entspricht – gemäß weitverbreiteter, allerdings nicht von allen anerkannter Definition – einem Wirkstoffanalogon, welches intrinsisch oder über eine eingeführte Funktionalität kovalent mit der katalytischen Aktivität eines Enzyms reagieren kann.<sup>[135,169,175,176]</sup> Sie ist in der Regel modular aufgebaut und besteht aus drei Basiselementen: einer bioreaktiven Gruppe oder „*Warhead*“, einem Linker und einem Reportertag.<sup>[57,177]</sup> Eine ABP kann mit interagierenden Proteinen eine kovalente Bindung eingehen und verfügt zusätzlich über eine Erkennungseinheit, sodass „eingefangene“ Proteine detektiert und angereichert werden können. Gleichzeitig besitzt sie ein nahezu identisches Aktivitätsprofil wie das der Ausgangsverbindung.

In den nächsten Abschnitten sollen die unterschiedlichen Komponenten einer ABP näher beschrieben werden.

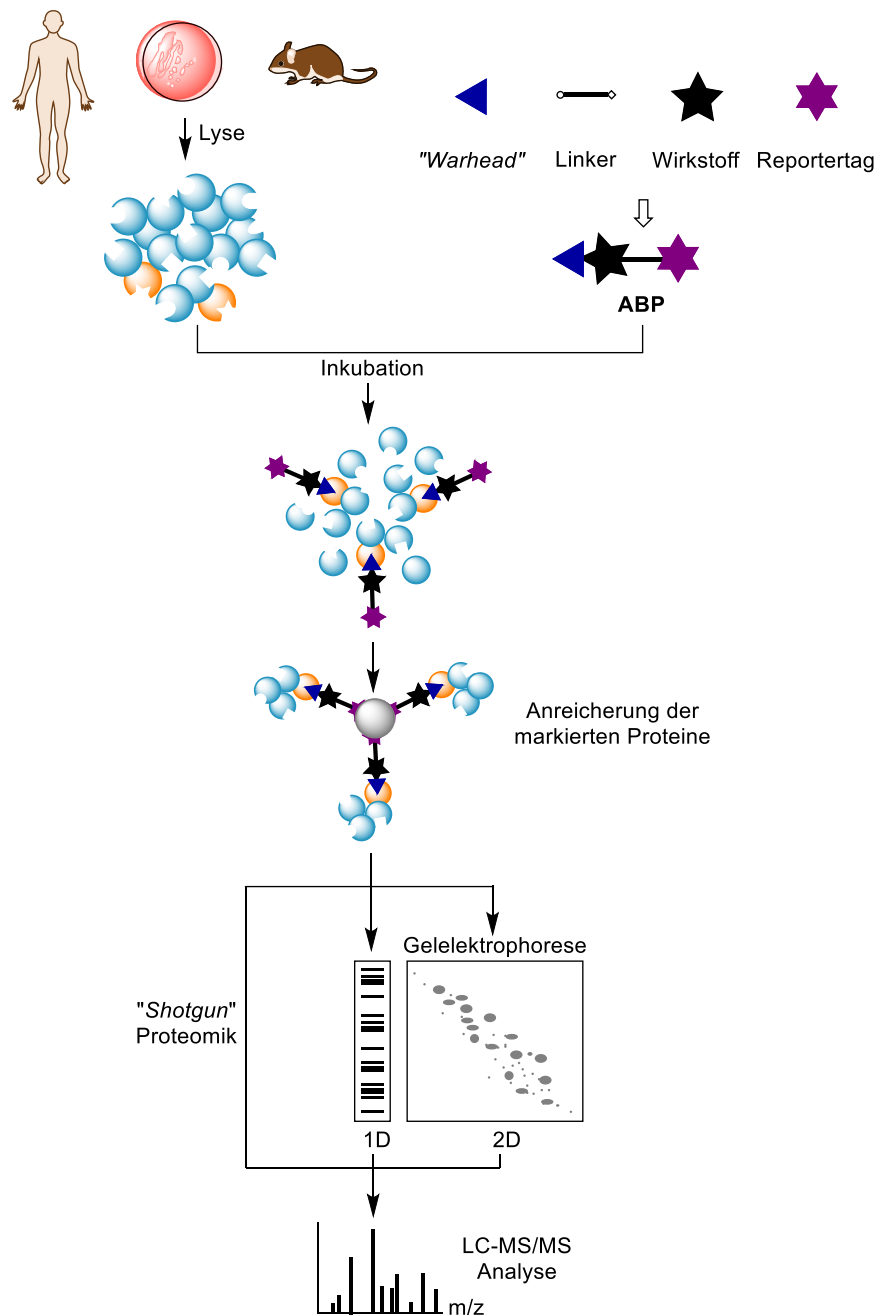


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des ABPP-Ansatzes adaptiert nach Rix *et al.*<sup>[50]</sup>

### 2.3.1 Die bioreaktive Gruppe

Der „*Warhead*“ bildet die kritischste Komponente einer ABP. In der Regel handelt es sich um ein Elektrophil, welches mit interagierenden Proteinen (meist Enzymen) über eine nukleophile Addition bzw. Substitution reagieren kann.<sup>[58,59]</sup> Das Elektrophil sollte dabei über eine ausreichend hohe Reaktivität verfügen, sodass es auch von latenten Nucleophilen angegriffen werden kann, jedoch nicht zu reaktiv sein, da die Sonde sonst zu unspezifisch

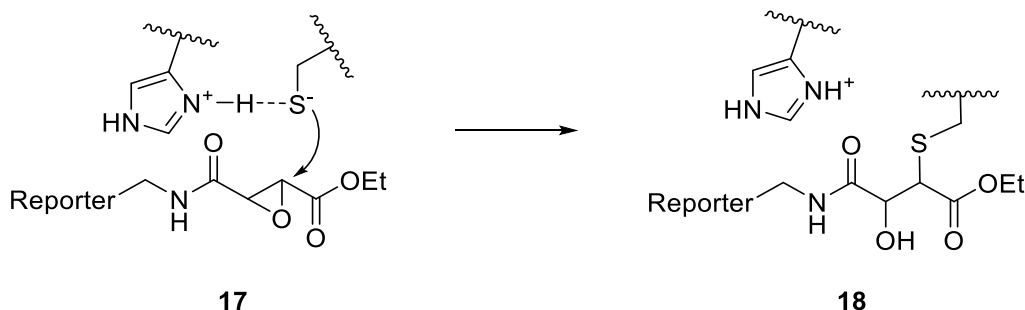
wäre. In diesem Zusammenhang haben sich schwache Elektrophile, wie Epoxide<sup>[178]</sup>, Michael-Akzeptoren,<sup>[179,180]</sup> Lactone,<sup>[181]</sup>  $\beta$ -Lactame,<sup>[182]</sup> N-Oxide,<sup>[183]</sup> Imide<sup>[184]</sup> oder Halogene<sup>[185]</sup> als besonders geeignet erwiesen.

Des Weiteren bedingt die Auswahl der reaktiven Gruppe weitgehend den Wirkmechanismus einer ABP und somit auch ihre Anwendbarkeit im Rahmen einer biologischen Fragestellung.

Diesbezüglich werden drei Klassen von ABPs definiert:<sup>[58,186]</sup>

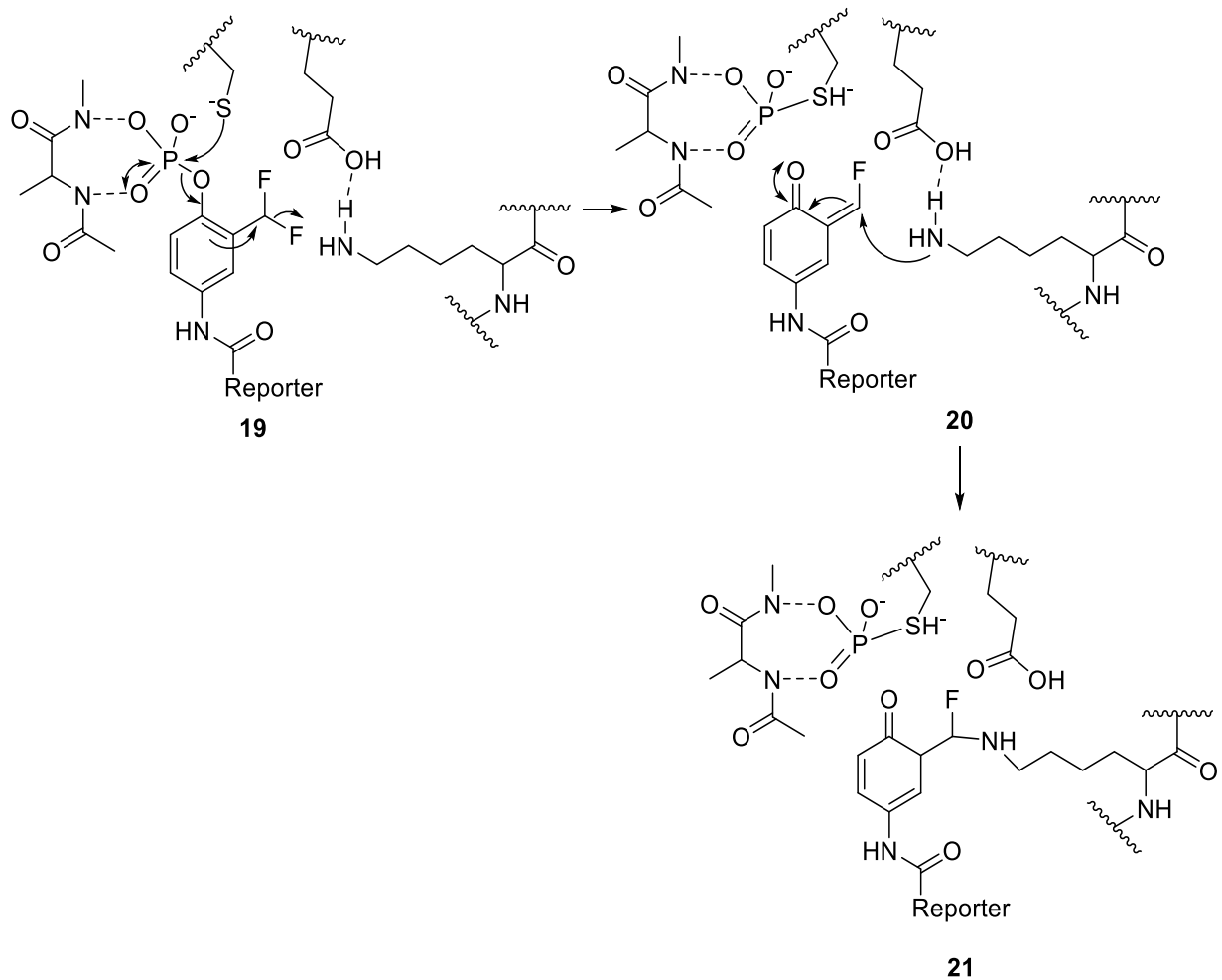
- Mechanismusbasierte ABPs
- Suizid-Substrat-ABPs
- Generell-alkylierende ABPs

Bei Mechanismus-basierten ABPs findet die Reaktion im aktiven Zentrum des Zielenzyms mit einem an der Katalyse beteiligten Nukleophil statt.<sup>[58]</sup> Diese Sonden sind spezifisch für bestimmte Enzyme bzw. Enzymklassen und ihr Design setzt genaue Kenntnisse bzgl. des katalytischen Reaktionsablaufs voraus. Sie bilden die Mehrheit der ABPs und basieren meist auf natürlich vorkommenden Enzyminhibitoren, welche einen kovalenten Wirkmechanismus besitzen.



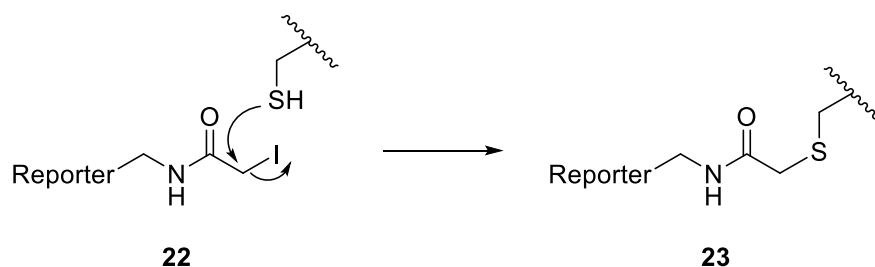
**Abbildung 2-8:** Wirkmechanismus einer Mechanismus-basierten ABP übernommen aus Jeffery *et al.*<sup>[186]</sup>

Suizid-Substrat-ABPs beinhalten ein maskiertes Elektrophil, welches erst durch die katalytische Einheit des Enzyms aktiviert werden muss.<sup>[187]</sup> Der freigesetzte „*Warhead*“ kann anschließend mit benachbarten Nukleophilen reagieren.



**Abbildung 2-9:** Wirkmechanismus einer Suizid-Substrat ABP, modifiziert nach Jeffery *et al.*<sup>[186]</sup>

Generell-alkylierende ABPs beinhalten unspezifische Alkylierungsgruppen, die aufgrund ihrer intrinsischen Reaktivität mit bestimmten Aminosäuren (z. B. Cystein) reagieren können. Diese Sonden besitzen in der Regel keine definierte Protein-Affinität und werden meist im Rahmen quantitativer MS-basierter Proteomanalysen eingesetzt.<sup>[188]</sup>



**Abbildung 2-10:** Wirkmechanismus einer generell alkylierenden ABP, übernommen aus Jeffery *et al.*<sup>[186]</sup>

### 2.3.2 Der Linker

Die Linkerregion verbindet die reaktive Gruppe mit der Reportereinheit. Der primäre Zweck des Linkers ist es, die reaktive Gruppe und die Reportereinheit räumlich voneinander zu trennen. Ferner dient die Linkerregion dazu, die physikochemischen Eigenschaften der Sonde entsprechend ihrer Anwendung zu modulieren. Alkyllinker erhöhen die Hydrophobizität der Sonde und können somit die Zellgängigkeit bzw. die zelluläre Aufnahme verbessern. Polare Linker hingegen verbessern die Wasserlöslichkeit. Des Weiteren kann die Linkerregion spezifische Elemente (wie z. B. eine spaltbare Bindung) beinhalten, welche dazu dienen, die Reinigung der Targetproteine zu erleichtern oder die Spezifität der Sonde auf bestimmte Enzyme zu erhöhen.<sup>[59,189]</sup>

### 2.3.3 Die Reportereinheit

Die Reportereinheit ist ein herausragendes Strukturelement, welches der schnellen Identifikation oder Reinigung der kovalent markierten Proteine dient. Hierfür werden in der Regel Fluoreszenz-Farbstoffe, Epitope zur Antikörperbindung bzw. Affinitätstags oder radioaktive Isotope eingesetzt.<sup>[58,59]</sup> Die Targetidentifizierung in einem ABPP-Experiment erfolgt ähnlich wie bei verbindungscentrierter chemischer Proteomik (vgl. 2.1) und beinhaltet daher meist einen Auftrennungsschritt durch Gelelektrophorese. Dafür sind fluoreszierende und radioaktive Markierungen von großem Vorteil gegenüber Affinitätstags, weil sie eine direkte Sichtbarmachung im Gel erlauben. Nichtsdestotrotz werden Affinitätstags häufig eingesetzt, weil sie zusätzlich die Möglichkeit bieten, die gebundenen Proteine vor elektrophoretischer Trennung durch *Pulldowns* oder Affinitätschromatographie anzureichern.

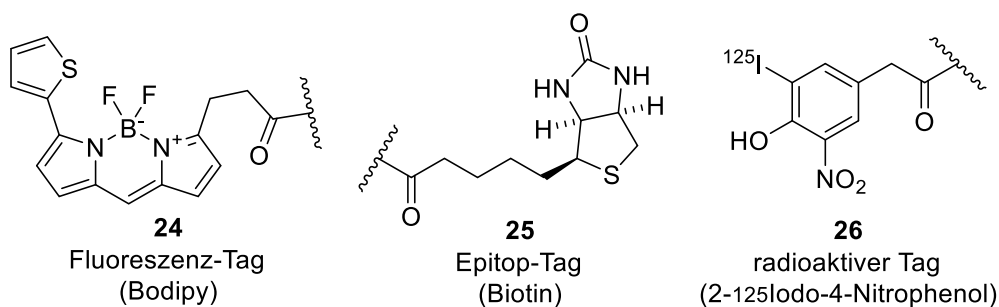


Abbildung 2-11: Strukturen häufig eingesetzter Reportereinheiten.

### 2.3.3.1 Zwei-Schritt ABPP

Reportertags sind sterisch anspruchsvoll und haben meist einen negativen Einfluss auf die Affinität der Sonde. Die Isotopenmarkierung bildet dabei eine Ausnahme, ist aber mit einem hohen experimentellen Aufwand verbunden.

Beim zwei-Schritt ABPP wird die Sonde mit einer spezifischen funktionellen Gruppe versehen, welche über eine bioorthogonale Konjugation funktionalisiert werden kann. Die eingebaute funktionelle Gruppe wird als „Minimalreporter“ bezeichnet und ist biochemisch inert, nicht natürlich vorkommend und sterisch wenig anspruchsvoll.

Häufig erfolgt die Funktionalisierung, nach kovalenter Markierung der Targetproteine, über eine Klick-Reaktion. Merkmale der Klick-Reaktionen sind, gemäß der Definition von Sharpless, eine ortsspezifische Umsetzung mit nahezu quantitativer Ausbeute, milde Reaktionsbedingungen, sowie die Verträglichkeit mit einer großen Bandbreite an funktionellen Gruppen.<sup>[190]</sup> Seit Einführung des Konzepts sind einige Reaktionen entwickelt worden, welche diese Kriterien erfüllen und im Rahmen der chemischen Proteomik angewendet werden können. Die prominentesten darunter sind folgende:

#### ▪ Staudinger-Ligation<sup>[191]</sup>

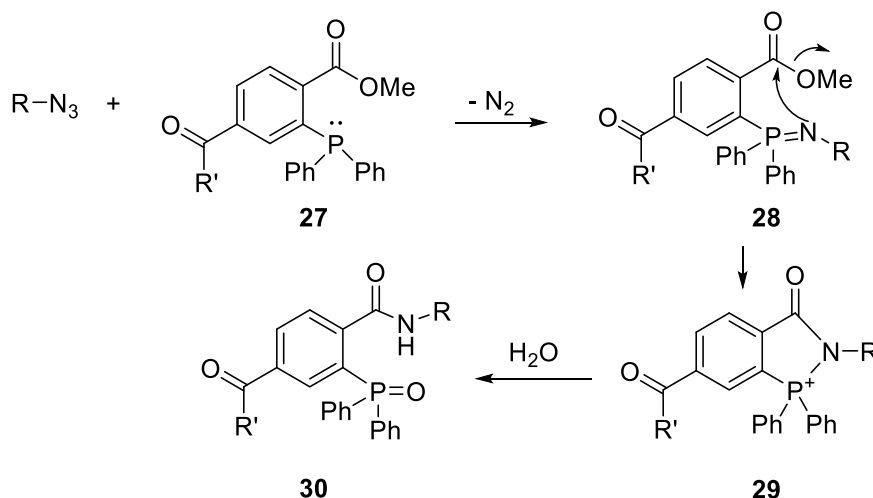
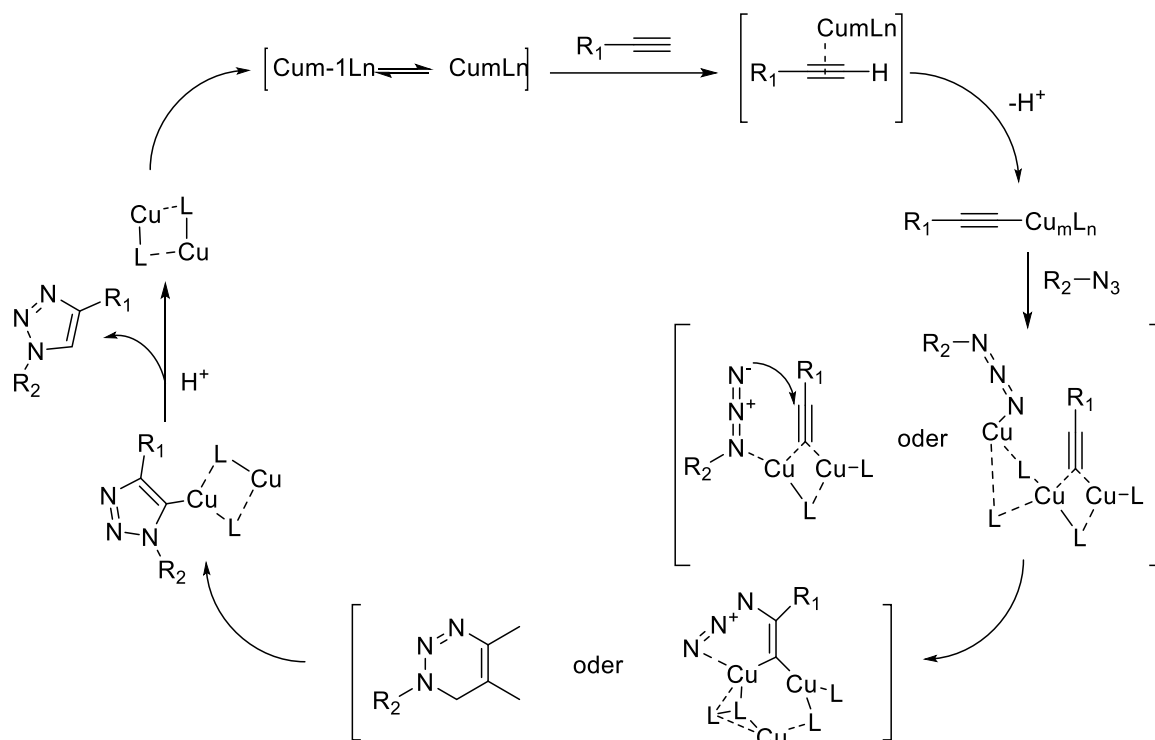


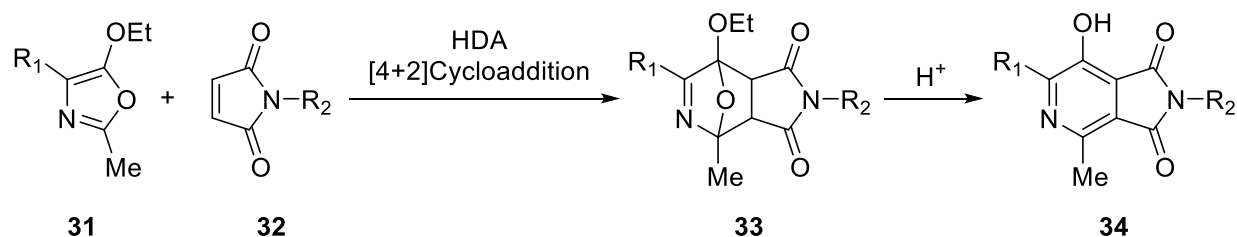
Abbildung 2-12: Reaktionsmechanismus der Staudinger-Ligation nach Van Berkel *et al.*<sup>[191]</sup>

▪ Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Huisgen [3+2]-Cycloaddition<sup>[192]</sup>



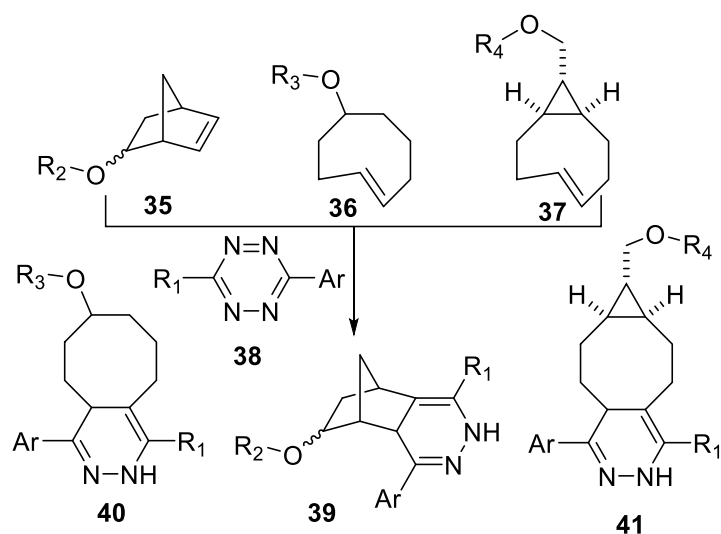
**Abbildung 2-13:** Angenommener Reaktionsmechanismus der Cu(I)-katalysierten [4+2] Cycloaddition zwischen einem organischen Azid und einem terminalen Alkin übernommen aus Meldal *et al.*<sup>[193]</sup>

▪ Diels-Alder Ligation nach Konrat'Eva<sup>[194]</sup>



**Abbildung 2-14:** Reaktionsmechanismus der Konrat'Eva Ligation zur bioorthogonalen Konjugation übernommen aus Jouanno *et al.*<sup>[195]</sup>

▪ **Tetrazin Ligation (Hetero-Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf)**<sup>[196]</sup>



**Abbildung 2-15:** Tetrazin Ligation zur bioorthogonalen Konjugation adaptiert nach Spicer *et al.*<sup>[197]</sup>

## 2.4 Affinitätsbasiertes Protein-Profilung

Um eine weitgehende Charakterisierung eines biologischen Bindungsphänomens zu ermöglichen greift die Strukturbiologie für gewöhnlich auf Röntgenkristallographie bzw. Hochleistungs-NMR zurück.<sup>[198]</sup> Als wesentliches Problem dabei müssen die zu untersuchenden Zielproteine meist heterolog produziert werden, damit sie in ausreichender Menge (Milligramm-Maßstab) zur Verfügung stehen. Zusätzlich sollten sie in nativer Konformation vorliegen, sodass die Interaktion unter möglichst physiologisch relevanten Bedingungen stattfinden kann. Dies gilt besonders für Transkriptionsfaktoren, große Multiprotein-Komplexe (wie z. B. das Ribosom), vesikuläre und Membranproteine sowie Proteine des Zytoskeletes. In letzteren Fällen ist der Einsatz von spektroskopischen Ansätzen oft nicht praktikabel, sodass affinitätsbasiertes Protein-Profilung die einzige Alternative darstellt.

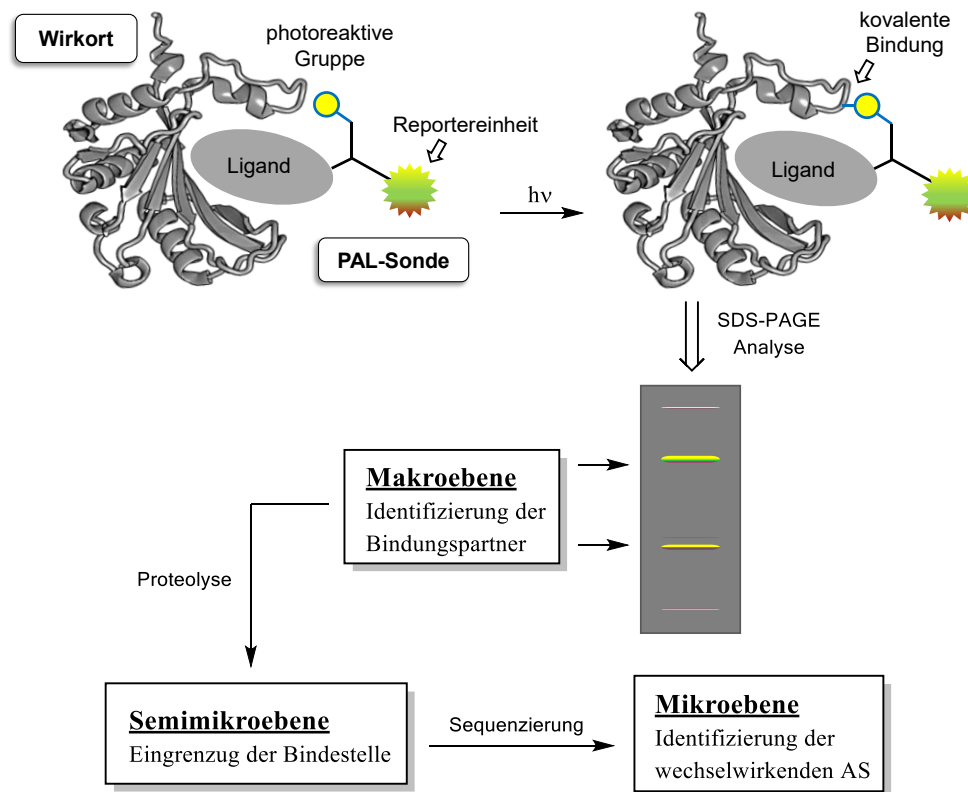
Das Grundprinzip des affinitätsbasiertes Protein-Profilings, auch Photoaffinitätsmarkierung (PAL) genannt, wurde bereits in Kapitel 1.3.3.1 definiert. Zur Durchführung von PAL wird der zu untersuchende Analyt mittels Einführens eines Photophors zu einer lichtaktivierbaren Sonde funktionalisiert, welche nach UV-Belichtung eine hochreaktive chemische Spezies bildet und irreversibel an die Bindungsstelle des biologischen Targets bindet.<sup>[54]</sup>



Der Hauptunterschied zwischen ABPP und PAL liegt in der Natur der reaktiven Gruppe. Ferner kann eine PAL-Sonde als „Sonderfall einer Suizid-Substrat-ABP“ (vgl. 2.3.1) betrachtet werden, da sie ähnlich wie eine Suizid-Substrat-ABP einen maskierten Gefechtskopf beinhaltet, welcher erst aktiviert werden muss.<sup>[199,200]</sup> Der Vorteil ist jedoch, dass die Aktivierung des *Warheads* keine katalytische Aktivität des Targetmoleküls voraussetzt, wodurch PAL-Sonden bei nahezu jeder biologischen Fragestellung eingesetzt werden können, ungeachtet der Funktion, Lokalisierung und sogar biologischen Stoffklasse des Wirkorts.

Zusätzlich erfolgt die Vernetzungsreaktion bei PAL nicht zwangsläufig am aktivem Zentrum des Zielmoleküls, sondern in räumlicher Nähe zur Bindestelle. Die Analyse der Markierungsprodukte gestattet daher nicht nur die Identifizierung der Bindungspartner, sondern kann, unter Umständen, sogar eine Charakterisierung des Bindungsmodus ermöglichen.<sup>[201]</sup> Demnach unterscheidet man bei einem PAL-Experiment zwischen drei möglichen „Untersuchungsebenen“, abhängig davon, inwieweit das Bindungsphänomen charakterisiert werden soll (siehe **Abbildung 2-16**).

Bei einer Untersuchung auf Makroebene werden die Markierungsprodukte über SDS-PAGE analysiert, um so die bindenden Proteine sowie die am Komplex beteiligten Untereinheiten zu identifizieren.<sup>[202]</sup> Auf Semimikroebene werden die spezifisch markierten Proteine zusätzlich proteolytisch verdaut bzw. chemisch abgebaut, um die Bindestelle näher einzugrenzen.<sup>[203,204]</sup> Noch aufschlussreicher ist eine PAL-Untersuchung auf Mikroebene; hier werden die selektierten Peptide isoliert und über MS/MS bzw. Edman-Degradation sequenziert, sodass die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäurereste identifiziert werden können.<sup>[205-207]</sup>



**Abbildung 2-16:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs eines Photoaffinitätsmarkierungsexperiments.

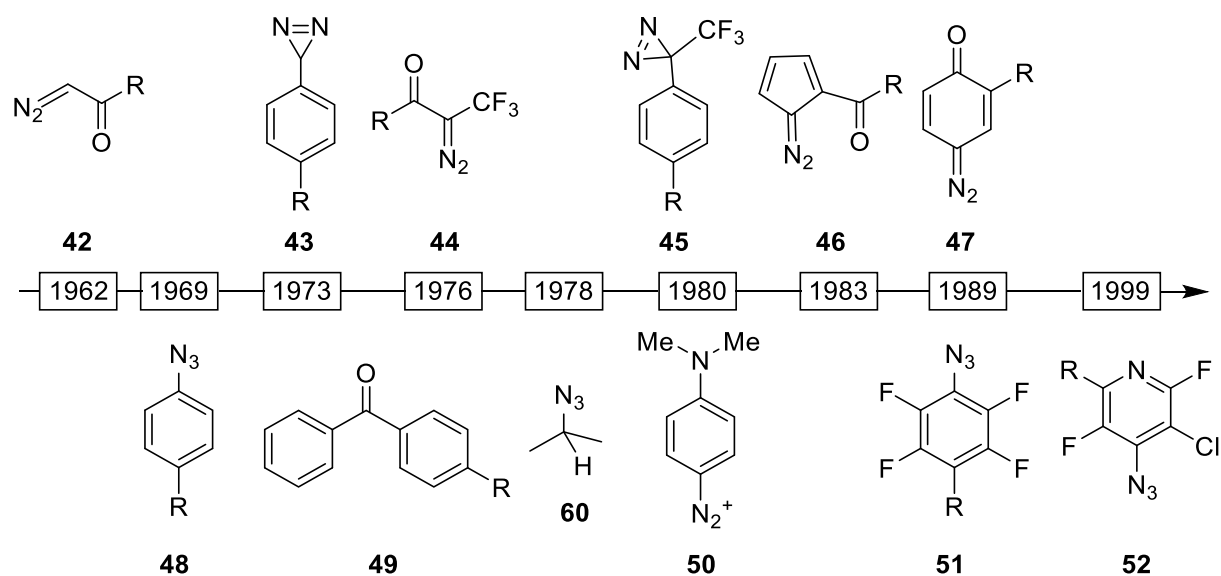
### 2.4.1 Aufbau einer Photoaffinitätssonde

Allgemein entspricht der Aufbau einer PAL-Sonde dem einer ABP (vgl. 2.3). Neben der unterschiedlichen Reaktivität des Gefechtskopfs (siehe 2.4.2) besteht ein weiterer signifikanter Unterschied darin, dass die Linkerregion für PAL-Sonden meist von höherer Bedeutung ist als für ABPs.<sup>[208]</sup> Sie beeinflusst nicht nur das biologische Affinitätsprofil und die physikochemischen Eigenschaften der Sonde, sondern ebenfalls die Effizienz der Photomarkierung. Diesbezüglich kann ein zu kurzer Linker zur Folge haben, dass die Sonde nach Photoaktivierung mit sich selbst reagiert. Wird dagegen ein zu langer Linker eingebaut, besteht die Gefahr, dass die Distanz zwischen der reaktiven Gruppe und dem Targetmolekül zu groß ist und die Sonde primär mit anderen Molekülen - meist Wasser - reagiert. Beim Design einer PAL-Sonde ist die Linkerregion daher oft eine der kritischsten Variablen.

## 2.4.2 Die photoreaktive Gruppe

Um eine effiziente Vernetzung zu erreichen, muss die reaktive Spezies dazu in der Lage sein, mit praktisch jeder funktionellen Gruppe (inkl. nichtaktivierte C-H-Bindungen) zu reagieren.<sup>[198,209]</sup> Die Halbwertszeit des freigesetzten Intermediats sollte außerdem kürzer als die Dissoziationsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Komplexes sein.<sup>[198]</sup> Als weiteres Kriterium sollte die Photolyse unter milden Bedingungen, d. h. nicht über zu kurzwelliges Licht erfolgen, da die Proteine sonst in einen elektronisch angeregten Zustand gelangen und somit beschädigt werden könnten.<sup>[54]</sup> Das Photophor sollte zudem biologisch inert sein und sterisch wenig anspruchsvoll, sodass die erhaltene PAL-Sonde über ein ähnliches Affinitätsprofil verfügt wie die Ausgangsverbindung. Des Weiteren muss der Gefechtskopf unter Lichtausschluss über eine ausreichende chemische Stabilität verfügen und nach Möglichkeit eine große Bandbreite an Synthesemethoden tolerieren, um ohne weiteres zur Implementierung der Sonde eingesetzt werden zu können.

Seit Einführung des PAL-Konzepts in den frühen 1960ern<sup>[51]</sup> ist eine Vielzahl von unterschiedlichen photoaktivierbaren Gruppen entwickelt worden, welche die oben genannten Anforderungen erfüllen.<sup>[51,52,56,210-219]</sup> Somit stehen beim Design einer PAL-Sonde grundsätzlich verschiedene Motive zur Verfügung (siehe **Abbildung 2-17**). Die darunter mit Abstand am häufigsten eingesetzten Gruppen sind: Arylazide,<sup>[218]</sup> Benzophenone<sup>[212]</sup> und 3H-Diazirine.<sup>[211]</sup> In den folgenden Abschnitten soll auf diese Funktionalitäten näher eingegangen werden



**Abbildung 2-17:** Beispiele funktioneller Gruppe, welche als PAL-, „Warheads“ eingesetzt wurden, adaptiert nach Vodovozova *et al.*<sup>[198]</sup>

### 2.4.3 Arylazide

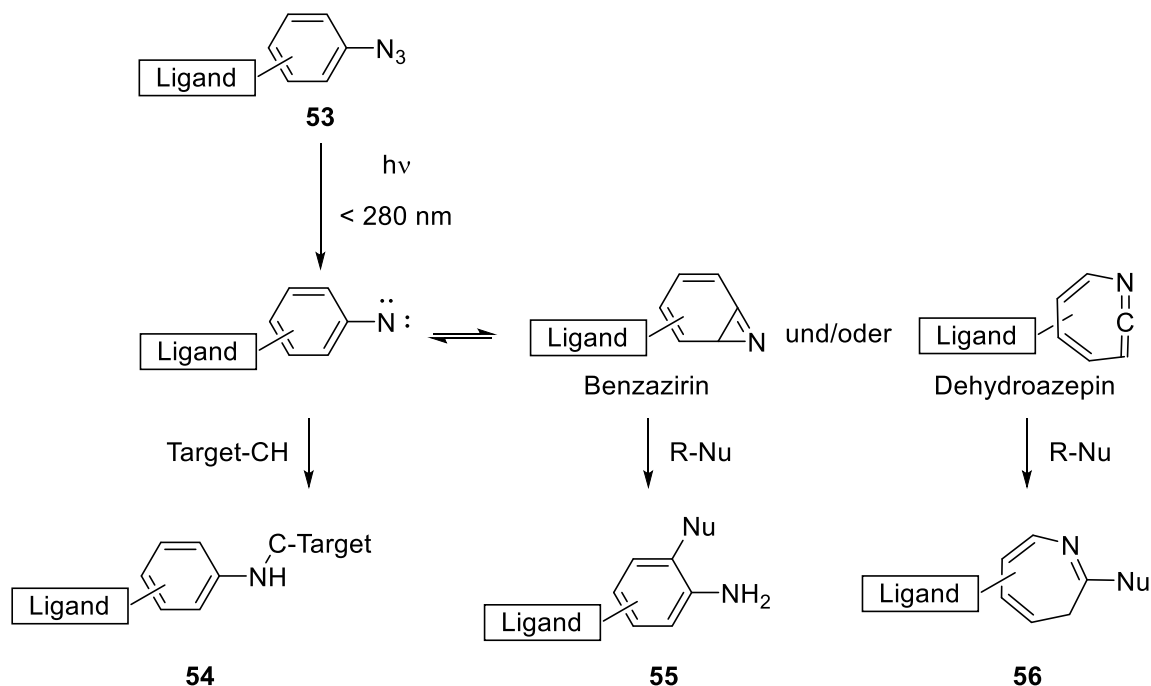
Durch die Absorption von UV-Strahlung gelangen Phenylazide in einen elektronisch angeregten Zustand, wodurch sie ein Stickstoffmolekül verlieren und hochreaktive Nitrene bilden.<sup>[220]</sup>

Nitrene sind Elektronenmangelverbindungen mit Sextett-Konfiguration. Sie treten in zwei unterschiedlichen Spinzuständen auf, abhängig davon, ob die freien Elektronen gepaart oder ungepaart sind. Bei der Photolyse von Arylaziden wird zuerst der Singulett-Spinzustand ( $S_1$ ) generiert, welcher anschließend in den Triplett-Zustand ( $T_1$ ) übergehen kann. Die C-H-Insertion führt zur Bildung einer neuen N-C-Bindung, wobei es erst zur Abstraktion eines Wasserstoffatoms kommt.<sup>[220]</sup>

Aufgrund ihres „zwitterionischen Charakters“ reagieren Singulett-Nitrene über einen konzertierten Mechanismus, während die Reaktion mit Triplett-Nitrenen angesichts ihres „diradikalischen Charakters“ zweistufig verläuft. Im letzteren Fall liegt daher die Wahrscheinlichkeit für die „unabhängige“ Abstraktion zweier H-Atome höher, wodurch der Übergang in den  $T_1$ -Zustand meist mit einem Verlust an Markierungseffizienz verbunden ist.<sup>[221]</sup>

Ein wesentliches Problem von unsubstituierten bzw. *ortho*-substituierten Phenyl-Nitrenen ist ihre erhöhte Neigung zu Umlagerungen. Sie bilden langlebige elektrophile Intermediate

wie Benzazirine und/oder cyclische Ketenimine, welche dann mit umliegenden Nucleophilen reagieren und positive Befunde vortäuschen können (siehe **Abbildung 2-18**).<sup>[53,222,223]</sup> Durch den Einsatz von perfluorierten Derivaten konnten diese Artefakte jedoch weitgehend minimiert werden.<sup>[219,222,224]</sup>



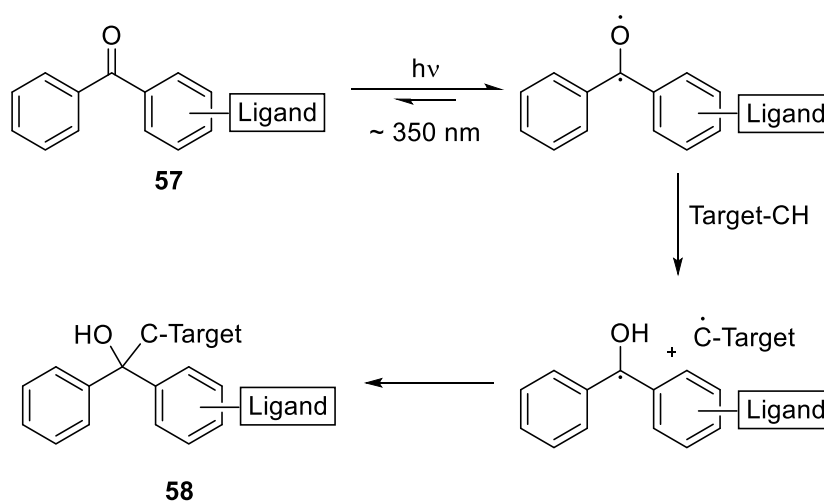
**Abbildung 2-18:** Phenylazid-Transformationen unter photolytischen Bedingungen, adaptiert nach Vodovozova *et al.*<sup>[198]</sup>

Als weiteren Nachteil erfordert der Einsatz von Phenylazid-basierten Photophoren die Anwendung von kurzen Anregungswellenlängen.<sup>[209]</sup> Die wenigsten Derivate lassen sich oberhalb von 300 nm anregen, wodurch eine Schädigung der Proteine meist nicht zu vermeiden ist. Zudem sind sie biologisch nicht inert und können von Thiolen reduziert werden.<sup>[225]</sup>

Nichtsdestotrotz gehören Arylazide zu den häufig eingesetzten photoreaktiven Gruppen.<sup>[54]</sup> Sie sind synthetisch leicht zugänglich und verfügen unter UV-Licht-Ausschluss über eine hohe chemische Stabilität. Darüber hinaus können sie in unterschiedlichen Substitutionsmustern kommerziell erworben werden und sind sterisch wenig anspruchsvoll.<sup>[53]</sup>

## 2.4.4 Benzophenone

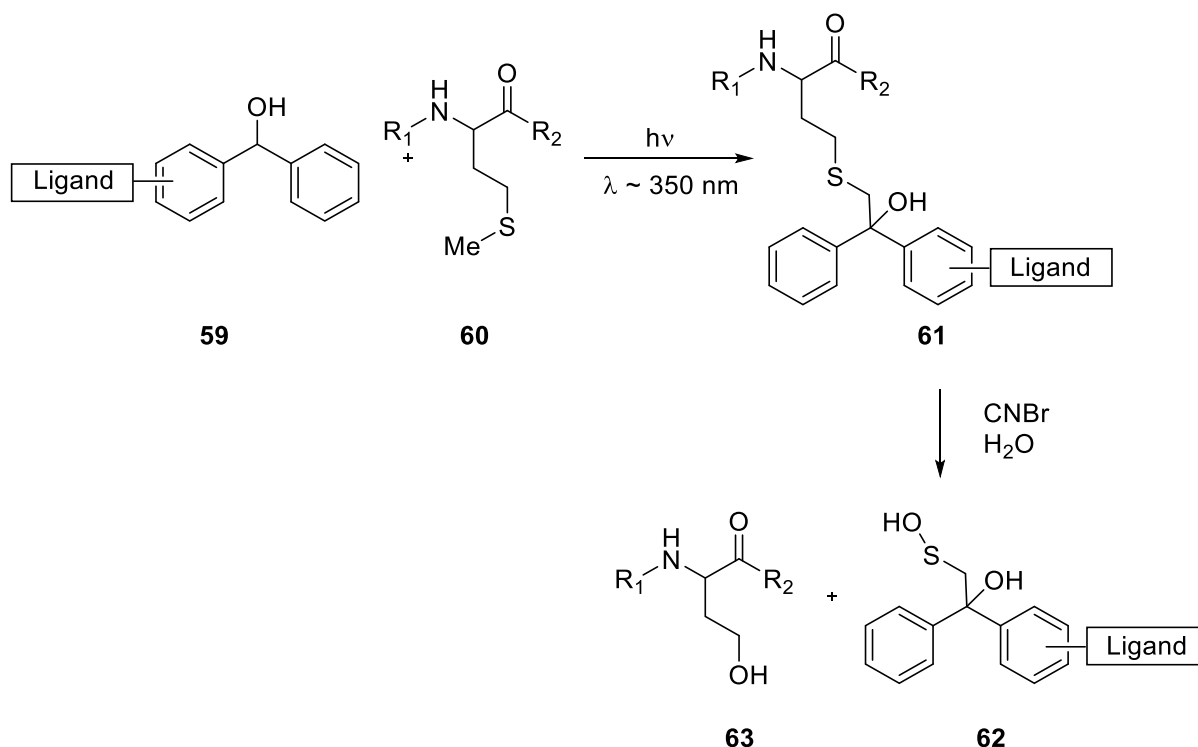
Benzophenone (Bp) werden bei Wellenlängen um 350 nm aktiviert und generieren reaktive Triplett-Diradikale, welche bevorzugt in nichtaktivierte C-H-Bindungen inserieren.<sup>[212]</sup> Der Mechanismus verläuft dabei über zwei konsekutive radikalische Reaktionen, wobei ein Wasserstoffatom vom Alkyloxyradikal erst abstrahiert und das verbleibende Ketylradikal anschließend über eine C-C-Bindung mit dem Zielmolekül verknüpft wird.<sup>[198]</sup>



**Abbildung 2-19:** Photolyse einer Benzophenon-basierten PAL-Sonde mit nachfolgender CH-Insertion adaptiert nach Vodovozova *et al.*<sup>[198]</sup>

Im Gegensatz zu Arylaziden und Diazirinen ist die Photolyse von Benzophenonen reversibel.<sup>[202,226]</sup> Das generierte Diradikal kann ohne Reaktionspartner zur Ausgangsverbindung zurückrelaxieren, sodass meist lange Belichtungszeiten (> 30 min) nötig sind, um die geringen Quantenausbeuten zu kompensieren.<sup>[227]</sup>

Als weitere Besonderheit zeigen Benzophenone eine gewisse Reaktionspräferenz für Methioninreste.<sup>[228-230]</sup> Die Insertion erfolgt in der Regel am  $\gamma$ - bzw.  $\epsilon$ -Kohlenstoff und führt zur Bildung eines tertiären Alkohols. Durch anschließende Behandlung mit Bromcyan kann die PAL-Sonde dann gezielt vom Target abspalten und die bioanalytische Untersuchung der Markierungsprodukte dadurch erleichtert werden.<sup>[231]</sup>



**Abbildung 2-20:** : Insertion von Benzophenon-basierter PAL-Sonde in Met-haltigem Target, mit nachfolgender CNBr-Spaltung, modifiziert Vodovozova *et al.*<sup>[198]</sup>

Der Hauptvorteil von Benzophenon-basierten Photophoren liegt in ihrer hohen chemischen Stabilität. Sie können ohne besondere Maßnahmen gehandhabt werden und sind synthetisch leicht zugänglich. Außerdem können sie kommerziell in verschiedenen Substitutionsmustern erhalten und sogar rekombinant als *p*-Benzoylpenylalaninreste in Proteinen exprimiert werden.<sup>[232,233]</sup> Zusätzlich weisen sie eine gute Reaktionsspezifität auf weil die Markierung „schrittweise“ über mehrere Anregung-Relaxationszyklen erfolgt.<sup>[202,226]</sup>

Ihr Hauptnachteil liegt in ihrer Größe: Von allen eingesetzten Gruppen sind Benzophenone sterisch am anspruchsvollsten. Dementsprechend bedeutet ihr Einsatz häufig einen signifikanten Verlust an Bindungsaffinität für die Sonde.<sup>[53]</sup> Darüber hinaus sind Benzophenone stark hydrophob und wirken sich daher negativ auf die Wasserlöslichkeit der Sonde aus. Auch bewirkt die längere Bestrahlungsdauer für ihre Anregung sowie die damit einhergehende Wärmeentwicklung oft eine Schädigung der Proteine, welche dann schwieriger zu analysieren sind.

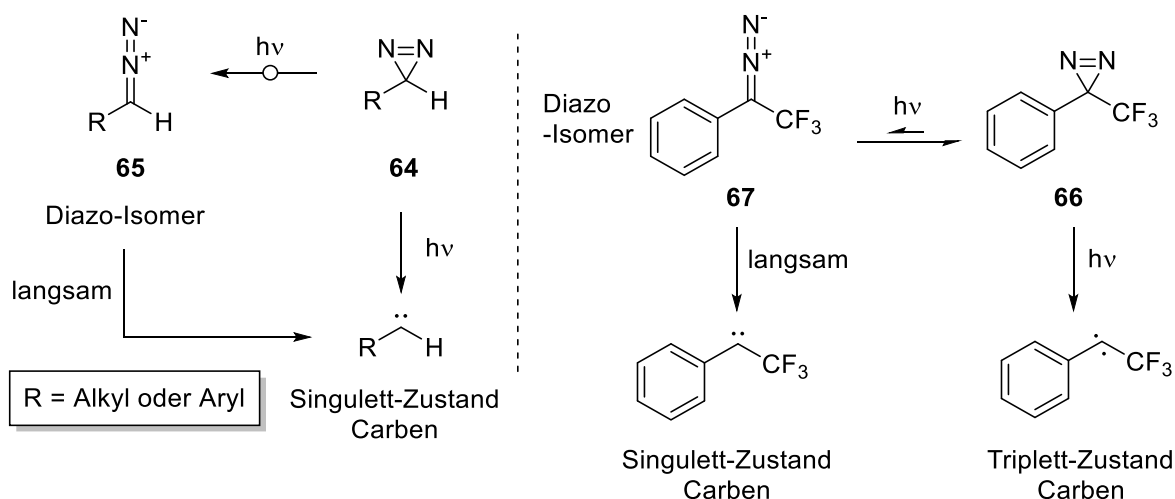
### 2.4.5 3H-Diazirine

Ähnlich der Photoaktivierung von Arylaziden gelangen Diazirine unter UV-Einwirkung in einen elektronisch angeregten Zustand, der zur Folge hat, dass ein Stickstoffmolekül abgespalten wird. Als reaktive Gruppe werden instabile Carbene generiert, welche schnell und effizient in eine Vielzahl von funktionellen Gruppen insertieren können.<sup>[209]</sup> Der Spin-Zustand der gebildeten Carbene hängt dabei überwiegend von den elektronischen Eigenschaften der am Diazirin-Kohlenstoff angebrachten Substituenten ab. Hierzu begünstigen elektronenschiebende Gruppen primär die Bildung von Singulett-Zustand-Carbenen, während elektronenziehende Substituenten eher den Triplett-Zustand stabilisieren.<sup>[234-236]</sup>

Singulett-Carbene können sowohl aus Alkyl- als auch Aryl-Diazirinen erzeugt werden und sind grundsätzlich reaktiver als Triplett-Carbene. Bei ihrer Generierung kommt es allerdings erhöht zu einer Photoisomerisierung des Diazirins, welches zur entsprechenden Diazoverbindung umlagert.<sup>[237]</sup> Zwar können die generierten Diazoverbindungen ebenfalls Carbene erzeugen, die dabei erzielten Quantenausbeuten sind jedoch deutlich geringer.<sup>[198,215]</sup> Folglich muss die Sonde länger belichtet werden, wodurch es vermehrt zu einer Schädigung der Proteine kommt.

Um dieses Problem zu minimieren werden in der Regel elektronenarme Aryl-Diazirine eingesetzt. Als besonders zuverlässig haben sich dabei die von Brunner *et al.* 1980 erstmals beschriebenen 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirine (Tfd) erwiesen.<sup>[238,239]</sup> Durch die Einführung der elektronenziehenden CF<sub>3</sub>-Gruppe werden primär Triplett-Zustand-Carbene generiert, wobei die Diazo-Isomerisierung weitgehend unterdrückt wird (**Abbildung 2-21**).





**Abbildung 2-21:** Links: Carben-Generierung aus 3-Phenyl-3*H*-diazirin. Unter photolytischen Bedingungen zerfallen elektronenreiche Diazirine zu Singulett-Zustand-Carbenen. Parallel, lagert ein Teil des angeregten Photophors zum Diazo-Isomer um. Letzteres kann durch zusätzliche Bestrahlung in das Carben überführt werden, benötigt dafür jedoch deutlich längere Belichtungszeiten. Rechts: Carben-Generierung aus 3-Phenyl-3-trifluormethyldiazirin (Tfd). Durch die Einführung der CF<sub>3</sub>-Gruppe wird Tfd in höheren Ausbeuten direkt in das Carben umgewandelt.

### 2.4.5.1 Vorteile der Diazirin-basierten Photophore

Insgesamt eignen sich Diazirine (und insbesondere 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirine) besonders gut als photoreaktive Gruppe. Sie sind erfolgreich eingesetzt worden, um diverse und vielschichtige biologische Bindungsphänomene zu untersuchen.<sup>[240]</sup> Im Vergleich zu Arylaziden und Benzophenonen zeichnen sie sich besonders durch hohe Anregungswellenlängen ( $\lambda < 350$  nm), kurze Belichtungszeiten, sowie eine höhere Reaktivität der generierten Intermediate aus.<sup>[211,241,242]</sup> Letztere haben außerdem zur Folge, dass die Markierung insgesamt spezifischer verläuft, da die freigesetzten Carbene mangels schneller Reaktion mit umliegenden Aminosäureresten von Wassermolekülen gequencht werden.

Von allen verwendeten photoreaktiven Gruppen sind Diazirine sterisch am wenigsten anspruchsvoll. Dies gilt besonders für aliphatische Diazirine, deren Einbau oftmals nahezu keinen Einfluss auf die Affinität der Sonde hat. Auch konnten Diazirin-basierte photoreaktive Aminosäureanaloge biosynthetisch in Proteine inkorporiert werden.<sup>[243]</sup> Aryl-Diazirine sind sterisch etwas anspruchsvoller, verfügen dafür über eine vergleichbare chemische Stabilität wie Benzophenone. Sie können problemlos über eine Vielzahl von

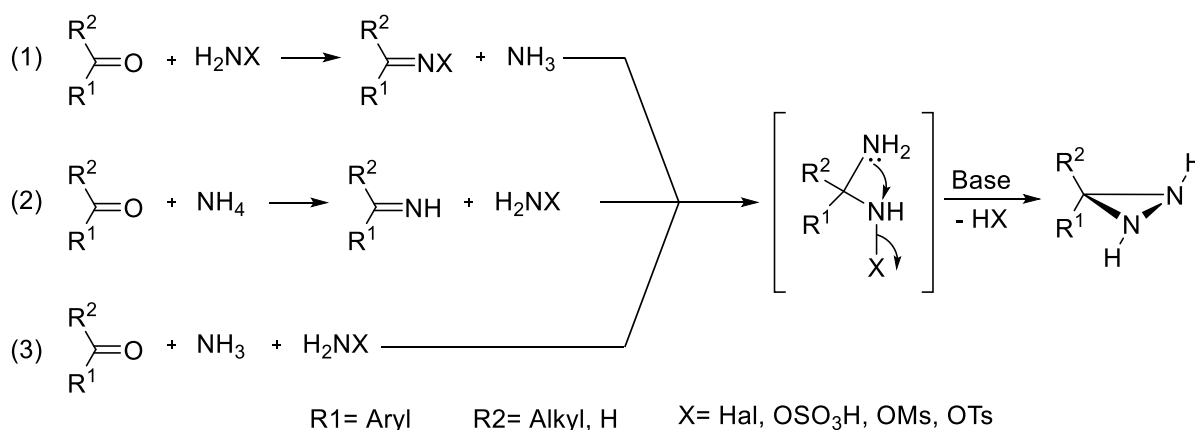
Synthesemethoden gezielt eingeführt werden können und sind sowohl unter sauren als auch basischen Bedingungen stabil.<sup>[244]</sup> Sie müssen jedoch über eine vergleichsweise aufwändige Synthese dargestellt werden.<sup>[209]</sup>

### 2.4.5.2 Synthetische Methoden zur Darstellung von Diazirinen

Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Diazirin-Synthesen, die sich jedoch grundlegend ähneln. Ausgehend von einem Keton wird ein 1,2-Diazacyclopropan (Diaziridin) hergestellt, welches anschließend oxidativ zum Diazirin überführt wird.

Die Darstellung des Diaziridins kann dabei über drei unterschiedliche Strategien erfolgen (siehe **Abbildung 2-22**):

- (1) Aus dem Keton wird zunächst das Oxim erzeugt, welches anschließend in den entsprechenden *O*-Tosyl- bzw. Mesylsulfonsäureester überführt und durch Einleitung von Ammoniak zum Diaziridin umgesetzt wird.
- (2) Mit Ammoniak wird aus dem Keton das Imin gebildet, das im Folgenden mit Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure (HOSA) bzw. einem Stickstoffhalogenid umgesetzt wird.
- (3) Über eine Eintopfreaktion werden Keton und Aminierungsreagenz (HOSA oder Stickstoffhalogenid) zusammen mit Ammoniak zum Diaziridin überführt.



**Abbildung 2-22:** Allgemeine synthetische Ansätze zur Darstellung von monocyclischen Aryl-Diazirinen adaptiert nach Makhovna *et al.*<sup>[244]</sup>

Von den möglichen Abläufen wird (1) am häufigsten eingesetzt. Zur Bildung des Oxims wird typischerweise Hydroxylaminhydrochlorid in einer ethanolischen Pyridinlösung eingesetzt und die Reaktionsmischung auf 60 bis 85 °C erhitzt. Die Sulfonierung erfolgt dann mit dem entsprechenden Sulfonsäurechlorid in Anwesenheit von Pyridin, DMAP

oder Triethylamin als Base. Anschließend wird der Sulfonsäureester mit Ammoniak behandelt, wobei letzteres nukleophil an das Oxim-Kohlenstoffatom addiert, und das erhaltene Halbaminal im Folgenden über eine intramolekulare  $S_N^i$  Cyclisierung das Diaziridin erzeugt.

Im letzten Schritt wird das Diaziridin zum Diazirin oxidiert, wobei folgende Oxidationsmittel verwendet werden können:

- Chrom(VI)-oxid in Aceton (Jones-Oxidation)
- Iod/Trimethylamin in Methanol
- Silber(I)-oxid bzw. -nitrat/Natriumhydroxid
- Oxalylchlorid/DMSO (Swern-Oxidation) oder Pivaloylchlorid/DMSO



---

### **3 Bekannte Targets des Thiostreptons**

## 3.1 Inhibierung des 70S Ribosoms

### 3.1.1 Struktureller Aufbau und Funktion des Ribosoms

Als einer der evolutionär ältesten Faktoren<sup>[245]</sup> übt das Ribosom die essenzielle Aufgabe der Protein-Translation aus. Hierzu wird die genetische Information - vermittelt durch eine Boten-RNA (mRNA) – am Ribosom abgelesen und in das entsprechende Polypeptid umgewandelt. Die Übersetzung erfolgt nach dem genetischen Code, welcher für jedes Triplet von drei aufeinanderfolgenden Nukleobasen - genannt Codon - jeweils eine Aminosäure festlegt.<sup>[246]</sup>

Das Ribosom ist ein Ribonukleoproteinkomplex, das zu etwa zwei Dritteln aus ribosomaler RNA (rRNA) und einem Drittel aus Proteinen besteht. Es gehört zu den größten und komplexesten molekularen Maschinerien, die in der Natur vorgefunden werden.<sup>[247]</sup> Selbst in den primitivsten Organismen umfasst das Ribosom mehr als fünfzig verschiedene Proteine und besitzt eine Masse von über zwei Millionen Dalton.<sup>[245]</sup>

Das Ribosom bildet granuläre Partikel mit einem Durchmesser von ca. 20 – 25 nm und setzt sich aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten zusammen.<sup>[248-250]</sup> Beide beinhalten sowohl Proteine als auch rRNAs, wobei letztere primär die katalytischen Aktivitäten tragen, während die ribosomalen Proteine hauptsächlich eine strukturelle Funktion erfüllen und für die richtige Positionierung der rRNAs sorgen.<sup>[251-253]</sup> Im Wesentlichen werden in der Natur vier Varianten des Ribosoms vorgefunden: eine für jede Domäne des Lebens, sowie eine mitochondriale Form. Ihre jeweilige Bezeichnung leitet sich von ihrem Sedimentationskoeffizienten ab (siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Ribosomaler Aufbau in den verschiedenen Domänen des Lebens adaptiert nach Poehlsgaard *et al.*<sup>[245]</sup>

Eigenschaften	Prokaryoten	Archaeen	Mitochondrien	Eukaryoten
Größe/Bezeichnung	70S	70S	55S	80S
<b>Kleine Untereinheit</b>				
Größe	30S	30S	28S	40S
Masse (Mda)	0.8	0.8	1.2	1.4
rRNAs	16S	16S	12S	18S
Anzahl an Proteinen	20	28	33	32
<b>Große Untereinheit</b>				
Größe	50S	50S	39S	60S
Masse (Mda)	1.6	1.6	2.4	2.6
rRNAs	23S, 5S	23S, 5S	16S	28S, 5.8S, 5S
Anzahl an Proteinen	34	40	52	46

### 3.1.2 Die Proteinbiosynthese in Prokaryoten

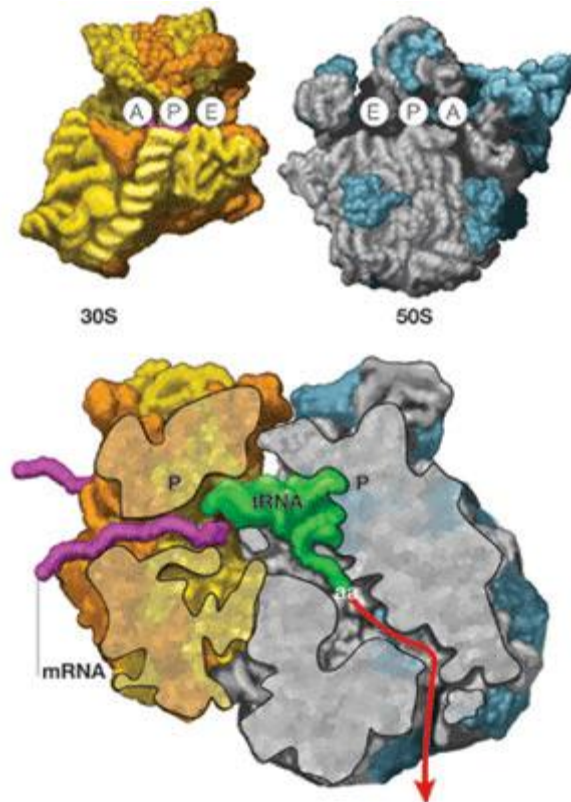
Aufgrund der frühen Erkenntnis, dass zahlreiche bakteriostatische und bakterizide Wirkstoffe gezielt die Protein-Biosynthese unterbinden,<sup>[254,255]</sup> geriet das bakterielle Ribosom ab den 1950er Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung. Mittels Einsatz von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und deren Weiterentwicklung durch die Einführung von Cryo-Fixierungsmethoden konnten erstmalig die Dimensionen des Komplexes, sowie die unterschiedlichen Schritte der Translation visualisiert werden.<sup>[256-260]</sup> Genauere biochemische Erkenntnisse hinsichtlich des katalytischen Ablaufs blieben jedoch bis zur Veröffentlichung der ersten Röntgenkristallstrukturen - welche erst zum Ende des vergangenen Jahrhunderts erfolgreich aufgelöst werden konnten<sup>[261-266]</sup> - aus.

Die folgenden Beschreibungen basieren auf der Röntgenkristallstruktur des 70S Ribosoms von *T. thermophilus*<sup>[267]</sup> und sind aus dem Übersichtsartikel von J. Poehlsgaard und S. Douthwaite<sup>[245]</sup> entnommen. Eine Zusammenfassende Illustration befindet sich unterhalb des Abschnitts (**Abbildung 3-1**).

Das prokaryotische Ribosom besteht aus einer großen 50S Untereinheit und einer kleinen 30S Untereinheit. Letztere beherbergt das sogenannte Dekodierungszentrum (*Decoding Center*, DC), das für die Entzifferung der auf der mRNA befindlichen Codons zuständig ist.

Jedes Codon vermittelt den Einbau einer Aminosäure, welche von einer spezifischen Transfer-RNA (tRNA) zum Ribosom transportiert wird. Transfer-RNAs sind kurze 73 bis 95 Nukleotide lange Nukleinsäure-Aminosäure-Hybride, die einerseits an ihrem 3'-Hydroxyl-CCA-Ende mit einer Codon-spezifischen Aminosäure verestert sind, andererseits ein zum Codon komplementäres Basentriplett - genannt Anticodon – tragen.<sup>[268]</sup> Die Proteinsynthese wird initiiert, wenn das Start-Codon (AUG, GUG, UUG) auf der Peptidyl-Stelle (P-Stelle) der kleinen Untereinheit positioniert wird, um mit der Initiator-tRNA - beladen mit Methionin - zu interagieren. Als Konsequenz assemblieren die kleine und große Untereinheit - wodurch der 70S Komplex gebildet wird - und die nächste Aminoacyl-tRNA kann an die Aminoacyl-Stelle (A-Stelle) andocken. Nach Überprüfung der korrekten Hybridisierung von Codon und Anti-Codon rotieren die Aminoacyl-Enden der tRNAs zum Peptidyl-Transferase Zentrum (*Peptidyl-Transferase Center, PTC*), wodurch die geladenen Aminosäuren zum Dipeptid reagieren können. Das Ribosom wandert anschließend um ein Codon weiter, sodass Letzteres sich nun an der A-Stelle befindet und der t-RNA-Dipeptid-Komplex von der A- in die P-Stelle verlagert wird. Parallel wird die deacylierte Initiator-tRNA über die *Exit*-Stelle (E-Stelle) abgeworfen und der nächste Elongationsschritt kann stattfinden. Der Zyklus wiederholt sich so lange bis ein terminierendes Codon (UAA, UAG, UGA) die A-Stelle erreicht, wobei statt passender Aminosäure ein Wassermolekül auf den C-Terminus des naszierenden Peptids übertragen und dieses freigesetzt wird. Neben den beschriebenen Komponenten sind sogenannte Protein-Faktoren an nahezu jedem Teilschritt der Translation beteiligt. Sie leiten die nötigen konformationellen Änderungen am Ribosom ein, sodass die katalytischen Aktivitäten synchron entfaltet werden können. Die meisten Protein-Faktoren sind GTPasen und ihre Funktion erfordert daher eine Energie-Ausgabe in Form von GTP-Hydrolyse.<sup>[269-272]</sup>



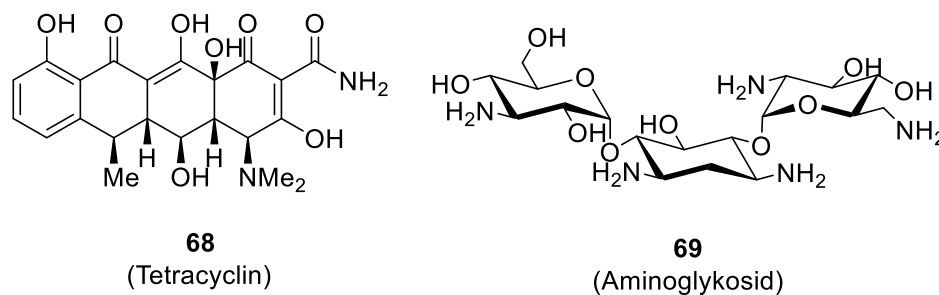


**Abbildung 3-1:** Schematische Darstellung der prokaryotischen Protein-Synthese, übernommen aus Poehlsgaard *et al.*<sup>[245]</sup> Im oberen Teil der Abbildung werden die RNA-Molekülrückgrate gelb und grau und die ribosomalen Proteine in blau und orange dargestellt. Im unteren Teil wird die mRNA in lila, die Initiator-rRNA in grün und die Wuchsrichtung des naszierenden Peptids durch einen roten Pfeil dargestellt.

### 3.1.3 Inhibierung der Proteinbiosynthese bei Prokaryoten

Die katalytischen Aktivitäten des Ribosoms sind im Wesentlichen in drei Regionen konzentriert: Am Dekodierungszentrum<sup>[273-277]</sup>, am Peptidyl-Transferase Zentrum<sup>[278-281]</sup> und am sogenannten GTPase-assoziierten Zentrum.<sup>[282-287]</sup> Alle drei sind besonders reich an ribosomaler RNA und blieben im Laufe der Evolution stark konserviert, sodass sie selbst in phylogenetisch weit entfernten Spezies einen hohen Grad an Homologie aufweisen.<sup>[245]</sup> Das Dekodierungszentrum ist Teil der A-Stelle und befindet sich am Terminus der Helix 44 der 16S rRNA. Nach Aufstellung der Aminoacyl-tRNA am DC - vermittelt durch den Elongationsfaktor Tu - überprüft letzteres die Komplementarität zwischen Codon und Anti-Codon. Bei erfolgreicher Hybridisierung werden Wasserstoffbrücken mit den universell konservierten Nukleotiden A1492, A1493 und G350<sup>[288,289]</sup> der 16S rRNA gebildet, welche zur Folge haben, dass das 3'-CCA-Ende der Aminoacyl-tRNA unter GTP-

Hydrolyse in optimale Lage zum Peptidyl-Transferase-Zentrum gebracht wird.<sup>[290-292]</sup> Antibiotika der Klassen der Tetracycline und Aminoglycoside (siehe **Abbildung 3-2**) können gezielt in diesem Prozess eingreifen. Sie binden an die Helix 44 der 16S rRNA nahe den Nukleotiden A1492 und A1493 und ermöglichen so die Rotation der Aminoacyl-tRNA zum PTC, trotz Fehlpaarung von Codon und Anti-Codon. Folglich werden vermehrt fehlerhafte Aminosäuren in das naszierende Peptid eingebaut und somit funktionsunfähige Proteine exprimiert.<sup>[276,293,294]</sup>



**Abbildung 3-2:** Strukturen der bekannten DC-Inhibitoren Doxycyclin (**68**) und Kanamycin B (**69**).

Das Peptidyl-Transferase Zentrum befindet sich in der großen 50S Untereinheit in der Domäne V der 23S rRNA und katalysiert die Aminolyse des Peptidyl-tRNA-Esters durch die  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA.<sup>[254,295]</sup> Da die Reaktion keine wesentliche Minderung der Aktivierungsenergie erfordert, ist die Katalyse primär Entropie-kontrolliert.<sup>[280]</sup> Zudem haben strukturbiologische Untersuchungen der 50S Untereinheit ergeben, dass sich keine ribosomalen Proteine in der unmittelbaren Umgebung des PTCs befinden,<sup>[296]</sup> sodass eine direkte katalytische Beteiligung durch letztere weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Das PTC umfasst an den Schnittflächen zur A- und P-Stelle der kleinen Untereinheit jeweils eine hydrophobe Spalte. Beide sind das Ergebnis unvollständiger  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Nukleotiden C75 und A76 des jeweiligen Aminoacyl-tRNA-Akzeptorarms und den Basen G2553 und G2583 der 23S rRNA.<sup>[297-299]</sup> Sie dienen der korrekten Positionierung sowie elektrostatischen Abschirmung der „Reaktanden“ und können gezielt von verschiedenen Antibiotikaklassen adressiert werden.<sup>[300-302]</sup>

Chloramphenicol (**70**), Blastidicin (**71**), Sparsomycin (**72**) und Anisomycin (**73**) binden selektiv an die hydrophobe Spalte der A-Stelle (siehe **Abbildung 3-3**).<sup>[278,281]</sup> Sie besitzen eine analoge Struktur zum 3'-CCA-Ende der Aminoacyl-tRNA und verfügen daher über einen kompetitiven Wirkmechanismus. Streptogramine wie z. B. Virginiamycin (**74**)<sup>[303]</sup>

(**Abbildung 3-3**) sind deutlich größere Moleküle. Sie besetzen die hydrophobe Tasche der P-Stelle und blockieren den Eingang zum sogenannten Peptid-Ausgangstunnel (*Nascent Peptide Exit Tunnel*, NPET).<sup>[304,305]</sup> Letzterer dient dazu, das entstehende Peptid nach außen zu entlassen und führt vom PTC an die Oberfläche der 50S-Rückseite.<sup>[306-308]</sup> Der NPET bildet einen Hohlraum durch die große Untereinheit mit einer Länge von ca. 100 Å und besitzt eine hochvariable Innenwand mit diversen Einengungen. Eine davon befindet sich oberhalb des PTC-Eingangs und geht auf einen Berührungspunkt der ribosomalen Proteine L4 und L22 mit den Domänen II und V der 23S rRNA zurück. Makrolid-Antibiotika und Lincosamide (siehe **Abbildung 3-3**) können selektiv an die L4/L22-„Einschnürung“ binden und so den NPET versperren.<sup>[309,310]</sup> Als Konsequenz kommt es nach einigen Elongationsrunden – meist nach sechs bis neun Runden- zum Erliegen der Proteinbiosynthese.

Eine weitere Klasse von Antibiotika, welche nahe dem PTC bindet, jedoch einen gänzlich verschiedenartigen Wirkmechanismus besitzt, stellen die sogenannten Oxazolidinone wie Lizenolid (**77**) dar.<sup>[311]</sup> Lizenolid bindet die 23S rRNA an die A-Stelle der großen Untereinheit und verhindert die Bildung des 70S Komplexes in der Initiationsphase.<sup>[312]</sup> Dadurch kann der erste Elongationsschritt nicht stattfinden und die Translation wird abgebrochen. Aufgrund dieses bisher einzigartigen Wirkmechanismus werden Kreuzresistenzen gegen andere Antibiotikaklassen selten beobachtet.

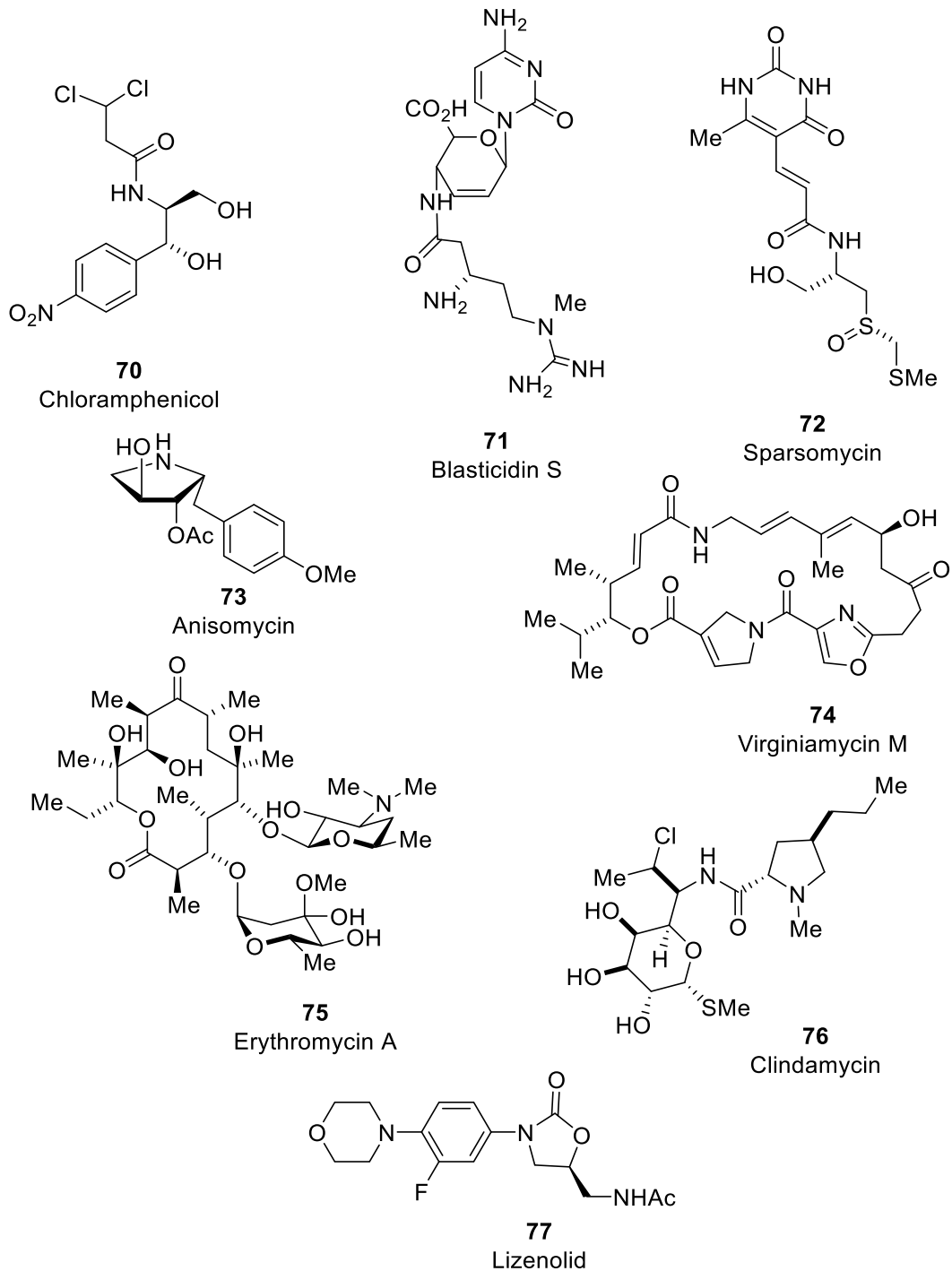
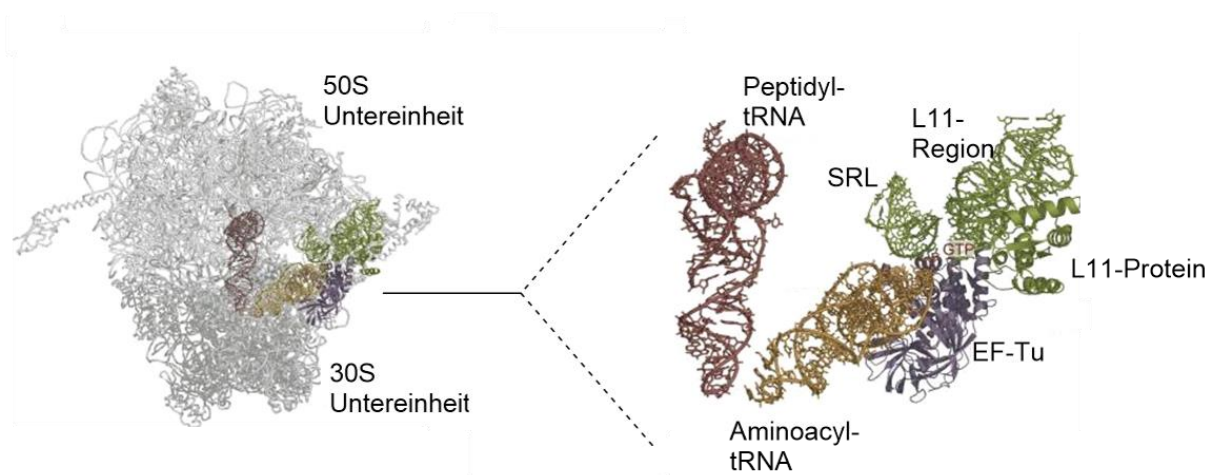


Abbildung 3-3: Struktur bekannter Antibiotika mit PTC-Inhibitionsmechanismus.

### 3.1.4 Inhibierung des GTPase-assozierten Zentrums

Das GTPase-assozierte Zentrum (*GTPase-associated Center*, GAC) ist in der großen Untereinheit des Ribosoms lokalisiert und für die Bindung und Stimulierung der GTPase-Aktivitäten der Translationsfaktoren IF2, EF-Tu, EF-G, EF-4 und RF-3

verantwortlich.<sup>[283,313-323]</sup> Verglichen mit dem DC und PTC zeichnet sich das GAC durch einen höheren Anteil an ribosomalen Proteinen aus,<sup>[107]</sup> wobei sich Letztere zu folgenden drei Regionen zusammensetzen: Die Sarcin-Rizin-Schleife (*Sarcine-Ricine-Loop*, SRL), welche in der Helix 95 (H95) der 23S rRNA lokalisiert ist; der L7/L12-Stiel (*Stalk*), bestehend aus dem Protein L10 sowie vier bis sechs Kopien des Heterodimers L7/L12; und die Stiel-Basis (*Stalk Base*), zusammengesetzt aus dem Protein L11 und seiner Bindungsstellen auf den Helices H43 und H44 der 23S rRNA.<sup>[324]</sup> Das zuletzt genannte Strukturelement bildet den Wirkort für die Thiopeptidantibiotika, welche die Bindungsstelle des EF-G besetzen und damit die GTP-abhängige Translokation des mRNA/Peptid-Komplexes unterbinden.<sup>[325-327]</sup>



**Abbildung 3-4:** Strukturmodell des GTPase-assoziierten Zentrums adaptiert nach Gonzalez *et al.*<sup>[320]</sup> Links: Ansicht des gesamten 70S-Komplexes (hellgrau). Das GAC wird in grün, die Peptidyl-tRNA in rot, die Aminoacyl-tRNA in gold und EF-Tu in violett dargestellt. Rechts: Vergrößerte Ansicht des GAC. Die verschiedenen Strukturelemente werden auf der Illustration angegeben.

### 3.1.5 Bindemodus von Thiostrepton am GAC

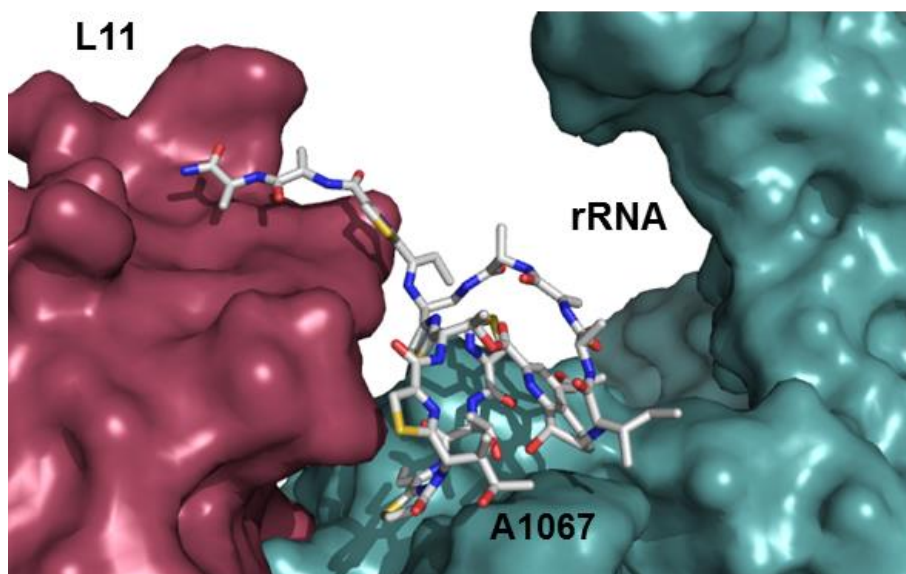
Folgende Beschreibungen basieren auf der 2008 von Harms *et al.* publizierten Röntgen-Kristallstruktur der 50S Untereinheit aus *D. radiodurans* in Komplex mit Thiostrepton (**7**)<sup>[132]</sup> (PDB:3cf5), sowie den von den Arbeitsgruppen Arndt und Kirschner 2012 durchgeführten *in silico* Modellierungsstudien des Thiostrepton/23S rRNA/Protein L11-Komplexes.<sup>[328]</sup>

Als Thiopeptid der Serie b mit einem 26-gliedrigen Grundgerüst (siehe **1.4.3**) bindet Thiostrepton (**7**) - mit einer Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich - an die Stielbasis des GAC und inhibiert damit den Elongationsschritt der Protein-Biosynthese.

Die Interaktion findet in einer hydrophoben Grube zwischen der N-terminalen Domäne (NTD) des Protein L11 und den Termini der Helices H43 und H44 der 23S rRNA statt. Auf diese Weise können die Translationsfaktoren EF-G und EF-4 nicht mehr andocken bzw. die für den Transport der Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle erforderlichen Konformationsänderungen am Protein-L11 nicht mehr ausgelöst werden. Interessanterweise ist das Bindungsphänomen kooperativer Natur, sodass Thiostrepton weder freies L11-Protein, noch 23S rRNA stark bindet. Beide zusammen bilden jedoch einen hochaffinen Wirkort.

Des Weiteren finden die Wechselwirkungen im Wesentlichen über den A-Ring statt, wobei die Thiazol(in)e des A-Rings entweder mit den Nukleotiden der 23S rRNA oder mit den aromatischen Seitenketten der L11 NTD über nichtoptimale  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen interagieren. Besonders wichtig für die Affinität sind die Interaktionen mit den Nukleotiden A1067 und A1095 der 23S rRNA. Mutationen an diesen Positionen bewirken einen drastischen Anstieg der Dissoziationskonstante und vermitteln eine Resistenz in *E. coli*, *T. thermophilus*, *H. halobium* und *H. cutirubrum*. Darüber hinaus codiert das Thiostrepton-Autoresistenzgen *tsr* - welches in den Produzentenstämmen *S. azureus*, *S. hawaiiensis* und *S. laurentii* vorgefunden wird – für eine spezifische 2'-O-Methylase des Nukleotids A1067 der 23S rRNA.

Als weniger ausschlaggebend für die Bindungsaffinität trägt der B-Ring zu ca. 26% der Gesamt-Kontaktfläche bei und erscheint im Wesentlichen Lösungsmittel-orientiert. Einzig seine Chinaldinsäure-Einheit nähert sich auf ca. 3.5 Å dem N1 von A1067. Eine noch unwesentlichere Rolle scheint die Dehydroalanin-Molekülseitenkette zu spielen. Diese trägt zu lediglich 14% der Gesamt-Kontaktfläche bei und befindet sich vollständig außerhalb der hydrophoben Spalte. Zwar zeigt die Kristallstruktur, dass die Dehydroalanin-Molekülseitenkette die  $\alpha$ -Helix 1 ( $\alpha$ 1) der NTD erreicht, die dabei etablierten Kontakte scheinen jedoch nicht von zentraler Bedeutung für das Bindungsphänomen zu sein, da unterschiedliche Bindungsstudien mit semisynthetischen Thiostreptonderivaten belegen konnten, dass die Abspaltung der Dehydroalanin-Molekülseitenkette insgesamt keinen drastischen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität des Moleküls auf die ribosomale Proteinbiosynthese haben.<sup>[329,330]</sup>



**Abbildung 3-5:** Kristallstruktur des GTPase-assoziierten Zentrums aus *D. radiodurans* in Komplex mit Thiostrepton (7) bei einer Auflösung von 3.3 – 3.7 Å (PDB:3cf5) generiert mit PyMol (Delano Scientific). Das L11-Protein wird in rot dargestellt, die 23S rRNA in cyan. Die Position des Nucleotids A1067 auf der 23S rRNA ist angegeben.

### 3.1.6 Induktion der TipA-Gene

#### 3.1.6.1 Multiple Wirkstoff-Resistenz

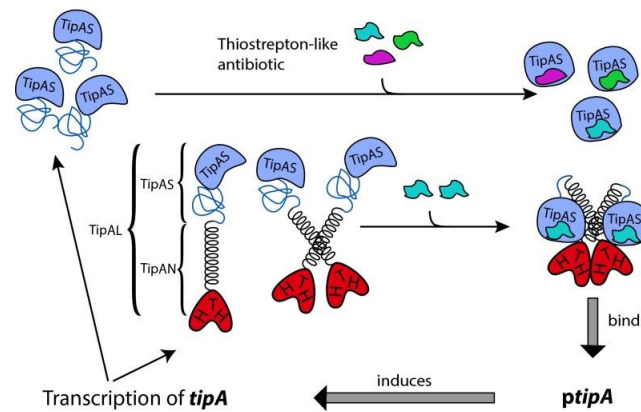
Der Begriff „*Multidrug Resistance*“ (MDR) umfasst diverse pro- und eukaryotische zelluläre Mechanismen, die eine natürliche Resistenz gegenüber einer Vielzahl chemisch und strukturell diverser Wirkstoffe vermitteln.<sup>[331,332]</sup> Die Substraterkennung erfolgt dabei polyspezifisch. Hierzu wird der Ligand über bestimmte Motive – meist heterozyklischer Natur – in einer großen hydrophoben Tasche erfasst und potenziell über diverse Bindungsmöglichkeiten aufgenommen.<sup>[333-335]</sup>

MDR-Systeme bilden meist sogenannte Effluxpumpen, die bestimmte zytotoxische Verbindungen, in der Regel unter ATP-Hydrolyse, aus der Zelle ausschleusen.<sup>[335,336]</sup> Bekannte Vertreter darunter sind die Membran-ATPasen MDR-1, ABC, RND, SMR und MFS.<sup>[337-342]</sup> Alternativ können cytosolische Proteine exprimiert werden, welche dazu in der Lage sind, die toxischen Substrate abzufangen und zu inaktivieren.<sup>[343-347]</sup> Ihr zelluläres Vorkommen unterliegt dabei einer Regulierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Letztere sind Multidomänen-Proteine, die das Substrat erkennen und über eine konservierte DNA-Bindedomäne die Transkription des MDR-Systems aktivieren.<sup>[348-351]</sup>

### 3.1.6.2 Die TipA Proteine

Die Thiostrepton-induzierten Proteine A wurden ursprünglich in *S. lividans* beschrieben<sup>[112]</sup> und vermitteln in diversen nicht-Produzentenstämmen der Actinomyzeten-Gattung eine schwache Resistenz gegen Thiostrepton (7) bzw. Thiostrepton-ähnliche Thiopeptide.<sup>[113,352,353]</sup> Sie werden den sogenannten MerR-Proteinen<sup>[354]</sup> zugeordnet, einer breiten Klasse von bakteriellen Stressantwort-regulierenden Transkriptionsfaktoren, welche als charakteristisches Merkmal eine konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne aufweisen. Zusätzlich besitzen zahlreiche MerR-Proteine eine C-terminale Liganden-Binderegion, deren strukturelle Beschaffenheit und Substrataffinität variabel und Subfamilien-spezifisch ist.<sup>[355,356]</sup> Thiopeptide sowie Thiostrepton, Nosiheptid, Micrococin P1 oder Promothiocin A induzieren die Expression des *tipA*-Gens, wobei aus demselben Leserahmen die Proteine TipAL (253 AS) und TipAS (144 AS) in einem Verhältnis eins zu zwanzig exprimiert werden.<sup>[352,357]</sup> TipAL und TipAS – letzteres entspricht der C-terminalen Region von TipAL – sind beide in der Lage mit Thiopeptiden zu interagieren, jedoch verfügt nur das vollständige Expressionsprodukt TipAL über eine N-terminale DNA-Bindedomäne. Durch die Interaktion mit einem Thiostrepton-ähnlichen Substrat dimerisiert TipAL und bindet an den *tipA*-Genpromoter (*p<sub>tipA</sub>*), wodurch es zur Rekrutierung der RNA-Polymerase und somit zur Expression der TipA Proteine kommt. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist dabei noch nicht völlig geklärt, jedoch wird angenommen, dass TipAL ähnlich anderen Vertretern der MerR-Proteine die Transkription durch DNA-Verwindung aktiviert.<sup>[355,356,358]</sup> Demnach kann die TipAL/TipAS-positive Rückkopplungsschleife als ein minimales autoreguliertes MDR-System betrachtet werden.





**Abbildung 3-6:** Schematische Darstellung des TipA-Resistenzmechanismus, übernommen aus Habazettl *et al.*<sup>[359]</sup> Thiostrepton und strukturverwandte Thiopeptide induzieren die Expression des tipA-Gens. Daraus resultierend werden die Proteine TipAL und TipAS synthetisiert. TipAS entspricht der C-terminalen Thiopeptid-Bindedomäne von TipAL, welches zusätzlich über eine N-terminale DNA-Bindedomäne verfügt. Durch die Bindung von Thiostrepton bzw. strukturverwandte Thiopeptide, dimertisiert TipAL und aktiviert über eine positive Rückkopplungsschleife die Expression des tipA-Gens, wodurch TipAL/AS in einem Verhältnis 1:20 exprimiert wird.

## 3.2 Inhibierung des 26S Proteasoms

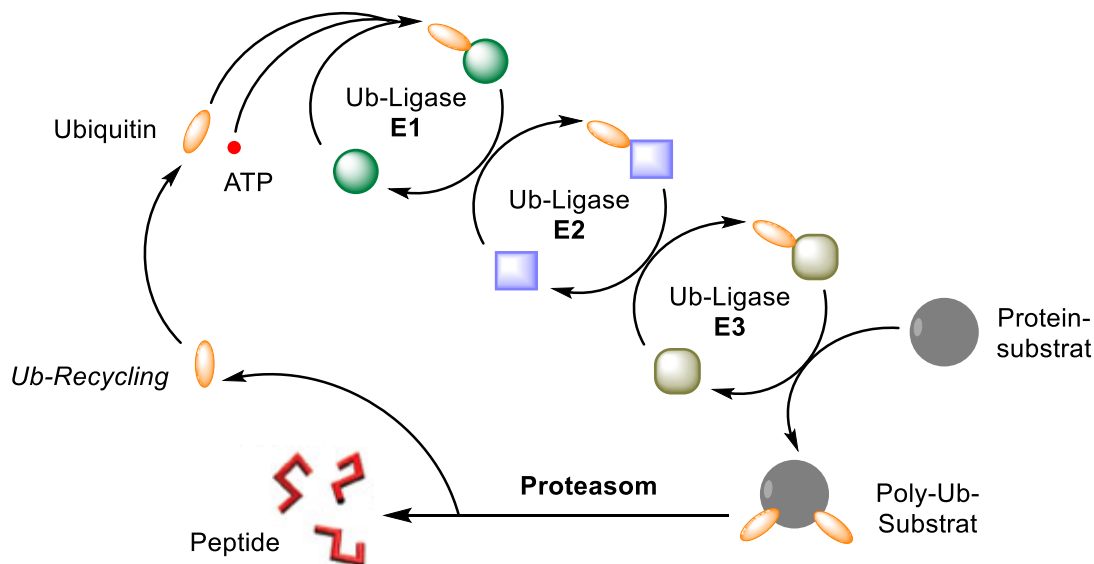
### 3.2.1 Biologische Bedeutung des Proteasoms

Die Aufrechterhaltung des Proteinhaushalts ist für die Überlebensfähigkeit der Zelle essenziell und steht in verschiedenen grundlegenden Zellfunktionen an zentraler Stelle.<sup>[360]</sup> In eukaryotischen Zellen ist die Hauptkomponente der nicht-lysosomalen Proteindegradation das Ubiquitin-Proteasom System (UPS), das für den Abbau von über 90% der Proteine im Zellkern und Zytoplasma verantwortlich ist.<sup>[361]</sup> Im Gegensatz zum Lysosom – welches Proteine primär katabolisiert<sup>[362]</sup> – bildet das Proteasom eine hochselektive und fein regulierte molekulare Maschinerie, welche neben dem Abbau von überschüssigen, falsch gefalteten bzw. zusammengesetzten oder funktionsunfähigen Proteinen,<sup>[363-365]</sup> eine Vielzahl sogenannter „kurzlebiger Proteine“ („*short lived Proteins*“) reguliert. Bei Letzteren handelt es sich meist um spezifische Transkriptions- bzw. Kernfaktoren, deren vorgesehene Wirkung in der Zelle zeitlich begrenzt werden muss.<sup>[366,367]</sup> Somit zählen zu den vom UPS-kontrollierten Prozessen u. a. der Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, die Transduktion extrazellulärer Signale, die Immunantwort (*Antigen Processing*), die metabolischen Übergänge und die Apoptose.

### 3.2.2 Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS)

Die Adressierung der zum Abbau bestimmten Proteine erfolgt durch eine spezifische und ATP-abhängige Markierung mit einem 76 Aminosäuren-langen und ca. 8.5 kDa-schweren globulären Protein, dem Ubiquitin (Ub).<sup>[368,369]</sup> Dieses wird über sein C-terminales Glycin durch eine Transpeptidbindung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des zu markierenden Proteins kovalent gebunden.<sup>[360]</sup> Mindestens vier Ub-Einheiten müssen kettenartig am Zielprotein gebunden sein (Polyubiquitinierung), um als Abbausignal zu wirken. Hierzu enthält Ubiquitin insgesamt sieben Lysine in seiner Sequenz (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), sodass die Verkettung durch weitere Transpeptidierungen der  $\epsilon$ -Amino-Seitenketten an der bereits gebundenen Ub-Einheit erfolgt. Verkettungen die den Abbau durch das UPS vermitteln, verlaufen in der Regel über die Lysine K48 oder K63.<sup>[370,371]</sup> Für andere Verbindungsmuster, sowie für die Mono- und Polymonoubiquitinierung sind eine Vielfalt unterschiedlicher zellulärer Adressierungen beschrieben worden.<sup>[372,373]</sup>

Die Ubiquitinierung durch eine konsekutive Kaskade von drei unterschiedlichen Ubiquitin-Ligasen (Ub-Ligasen, E1-E3) erkennt und markiert das zum Abbau bestimmte Protein.<sup>[374-376]</sup> Im ersten Schritt findet die „Aktivierung“ statt, in der das Ubiquitin unter ATP-Hydrolyse – über eine Thioesterbindung – an ein Cystein des E1-Enzyms gebunden wird. Im zweiten Schritt erfolgt die „Konjugation“, wobei das Ubiquitin von E1 über eine Thioumesterung auf das Enzym E2 übertragen wird. Abschließend wird das Ubiquitin von E2 auf das Ub-Ligase E3 transferiert und im Folgenden über eine Isotranspeptidbindung auf das Zielprotein übertragen. Letzterer Schritt ist im Wesentlichen für die Selektivität der Markierung verantwortlich, weil dafür eine spezifische Interaktion zwischen E3 und dem Substratprotein notwendig ist. Dementsprechend gelten E3-Ubiquitin-Ligasen als zentrale und hochspezifische Regulatoren. Es wird angenommen, dass das menschliche Genom mehr als 700 verschiedene E3 Ub-Ligasen kodiert,<sup>[377]</sup> die den Abbau einer Vielzahl wichtiger Transkriptionsfaktoren gezielt vermitteln.<sup>[378,379]</sup>



**Abbildung 3-7:** Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Die Ubiquitinierung der Substratproteine findet in einem drei-schrittigen Prozess statt und ist ATP-abhängig. Die daraus resultierenden polyubiquitinierten Proteine werden dann an das 26S Proteasom adressiert und abgebaut.

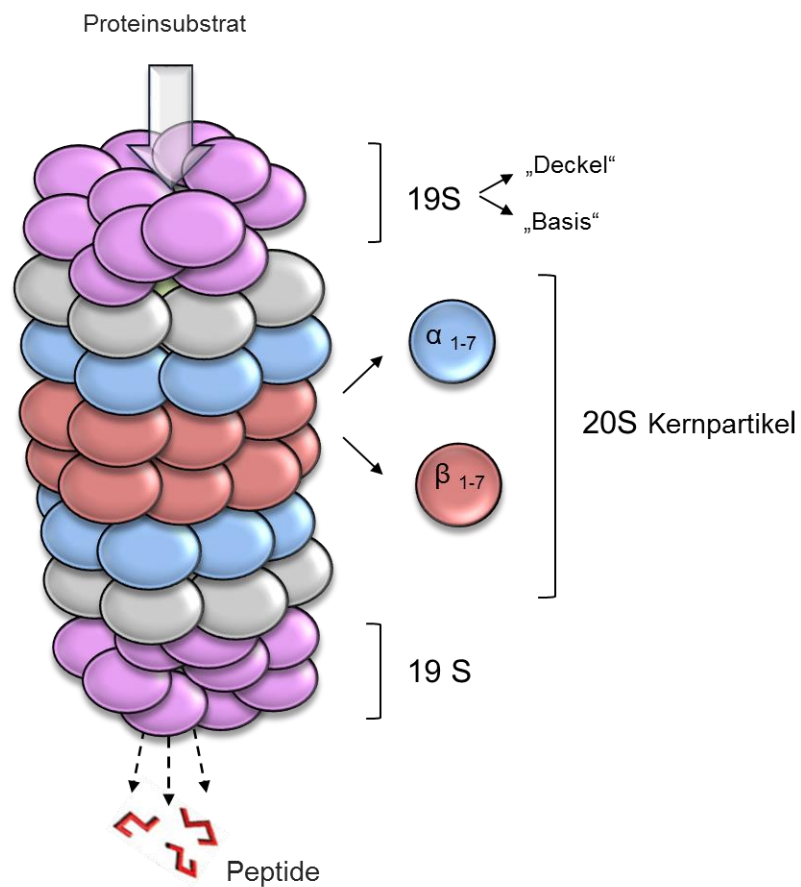
### 3.2.3 Strukturaufbau des Proteasomalen Komplexes

Die polyubiquitinierten Zielproteine werden vom 26S Proteasom erkannt und abgebaut. Dieses besteht aus einem 20S Kernpartikel, dessen Zugang an beiden Enden jeweils von einem regulatorischen 19S Komplex (*Cap*) abgeschirmt und reguliert wird.<sup>[368]</sup> Die gesamte Struktur setzt sich aus mehr als 60 Proteinen zusammen und hat eine zylindrische „fassähnliche“ (*Barrel*) Anordnung, mit einer Länge von ca. 16 nm und einem Molekulargewicht von ca. 2.5 MDa.<sup>[380]</sup>

Beide 19S Komplexe bilden klappenartige Strukturen, welche den Zugang der Öffnungen des 20S Kerns abdecken. Sie bestehen jeweils aus 19 Proteinen und verfügen über eine „Deckel-Komponente“ (*Lid*), die das abzubauen Protein anhand der Poly-Ub-Markierung erkennt, und einer „Basis-Komponente“ (*Base*), die das Protein unter ATP-Hydrolyse denaturiert und die sich ergebende Polypeptidkette in das Innere des Proteasoms – zu den proteolytisch aktiven Zentren – fädelt.<sup>[368,381,382]</sup>

Der 20S Kernpartikel hat ein Molekulargewicht von ca. 700 kDa und beinhaltet vier ringförmig arrangierte Heteroheptamere, die jeweils aus sieben  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten bestehen, deren Gesamtstöchiometrie  $\alpha_{1-7}(\beta_{1-7})_2\alpha_{1-7}$  entspricht.<sup>[381,383-385]</sup> Die Untereinheiten variieren leicht durch ihre Aminosäuresequenz, teilen aber einen gemeinsamen

strukturellen Aufbau, bestehend aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die unten und oben von helicalen Strukturen flankiert sind. Während die  $\alpha$ -Ringe überwiegend eine strukturgebende Funktion erfüllen, tragen die  $\beta$ -Ringe die Proteaseaktivitäten. Letztere sind auf sechs der vierzehn vorhandenen  $\beta$ -Einheiten verteilt und besitzen drei unterschiedliche Substratspezifitäten.<sup>[380]</sup> Nach Abbau durch das Proteasom, beträgt die Länge der erhaltenen Oligopeptide etwa acht bis zwölf Aminosäuren.<sup>[386]</sup>



**Abbildung 3-8:** Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms. Die regulatorischen 19S Komplexe (magenta und grau) erkennen, entfalten und speisen die polyubiquitinylierten Substratproteine in das Lumen des 20S Kernpartikels zu. Dieses bildet eine fassähnliche Struktur, bestehend aus vier ringförmigen Heteroheptameren der  $\alpha$ - (rot) und  $\beta$ -Untereinheiten (blau). Letztere Untereinheiten beinhalten die katalytischen Aktivitäten des Proteasoms und bauen die Substrate zu Octa- bzw. Dodecapetiden ab.

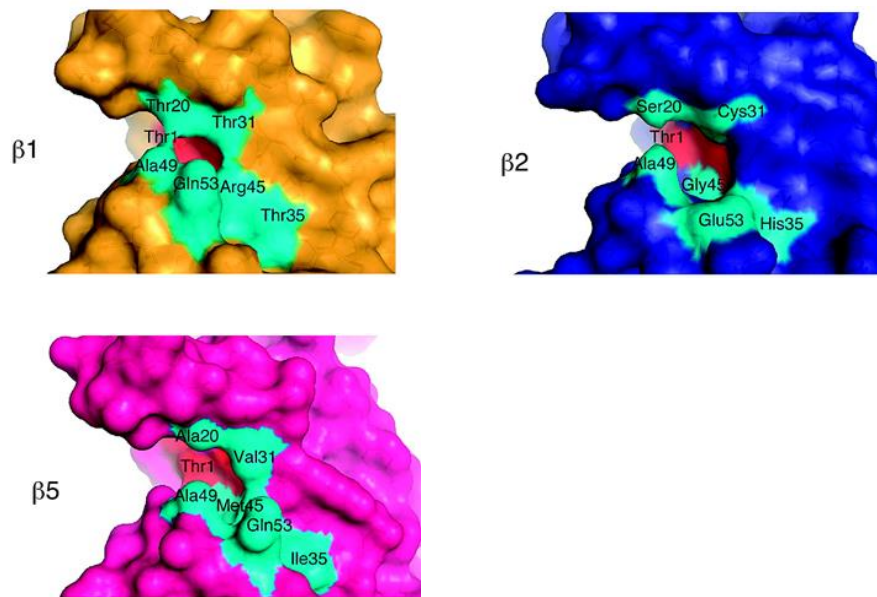
### 3.2.4 Substratspezifitäten und katalytische Aktivität des Proteasoms

Jedes  $\beta$ -Heteroheptamer beinhaltet drei proteolytisch aktive Zentren, sodass insgesamt sechs der vierzehn  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Kernpartikels aktiv sind.<sup>[380,384]</sup> Diese besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten und vermitteln entweder eine Caspase-, eine Trypsin- oder eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität.<sup>[387,388]</sup> Die Caspase-ähnliche oder Peptidylglutamylpeptid-hydrolytische (PGPH) Aktivität ist in der Untereinheit  $\beta 1$  lokalisiert und katalysiert die Spaltung nach sauren Aminosäureresten. Die Trypsin-ähnliche (*Trypsine-like*, T-L) Aktivität befindet sich in der  $\beta 2$ -Untereinheit und vermittelt die Spaltung nach basischen Aminosäuren. Die Chymotrypsin-ähnliche (*Chymotrypsine-like*, CT-L) Aktivität katalysiert die Spaltung nach hydrophoben Aminosäureresten und wird in der Untereinheit  $\beta 5$  beherbergt.

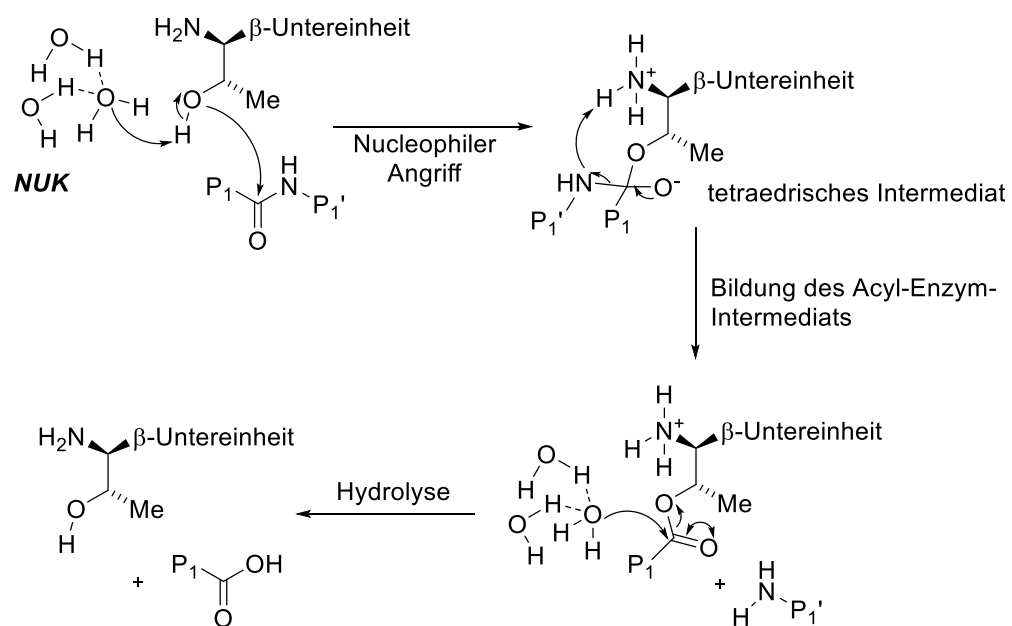
Die molekulare Erkennung der Substrate in den unterschiedlichen  $\beta$ -Einheiten hängt im Wesentlichen von den substratbindenden S1-, S2- und S3-Taschen ab.<sup>[380,384]</sup> Besonders wichtig dabei ist die Aminosäure in Position 45, welche in der S1-Tasche lokalisiert ist und mit dem P1-Aminosäurerest – eine Position vor der zu hydrolysierenden Peptidbindung – interagiert. In der S1-Tasche der Untereinheit  $\beta 1$  befindet sich an Position 45 ein Argininrest, der mit negativ geladenen Seitenketten von sauren P1-Aminosäuren wechselwirken kann. In der  $\beta 2$ -Einheit ist an dieser Stelle ein Glycin zu finden, das die Interaktion mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten ermöglicht. Die Untereinheit- $\beta 5$  weist ein Methionin auf, das an hydrophobe Seitenketten binden kann. Die S1-Substratbindetaschen der unterschiedlichen katalytisch aktiven  $\beta$ -Einheiten werden in **Abbildung 3-9-A** dargestellt.

Das aktive Zentrum aller Proteasom- $\beta$ -Einheiten gehört zu den Threoninproteasen, welche durch das Vorkommen eines N-terminalen nukleophilen Threonins charakterisiert sind. Letzteres greift über seine  $\gamma$ -Hydroxylgruppe die Carbonylfunktion der Peptidbindung an, wobei ein tetraedrisches Intermediat gebildet wird, das durch Rückbildung des Carbonylsystems den P1'-Aminosäurerest eliminiert.<sup>[389,390]</sup> Der erhaltene Ester wird anschließend von einem umliegenden Wassermolekül hydrolysiert, wodurch Thr1 wieder in seiner freien Form vorliegt und ein neuer katalytischer Zyklus beginnen kann. Der genaue Ablauf wird in **Abbildung 3-9-B** dargestellt.

A)



B)



**Abbildung 3-9:** A) Röntgen-Kristallstrukturen der Substratbindetaschen der  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-Untereinheiten des 20S Proteasoms von *S. cerevisiae* adaptiert nach Marques *et al.*<sup>[388]</sup> Die proteolytisch aktiven Zentren werden in rot dargestellt; die Position der katalytisch aktiven Aminosäurereste ist angegeben. B) Katalytischer Reaktionsablauf der Proteolyse an den verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms. Das aktive Zentrum besteht aus den Aminosäureresten Thr1, Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 und Ser169. In der Nähe des katalytischen Zentrums befindet sich ein Cluster aus Wassermolekülen (NUK), welcher an der Reaktion teilnimmt, indem er zur Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen der  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppe von Lys33 und der  $\gamma$ -OH-Gruppe von Thr1 beiträgt. Dadurch kann der pKa der  $\gamma$ -OH-Gruppe gesenkt und somit die Entstehung des reaktiveren Thr1-Alkoholats favorisiert werden.

### 3.2.5 Inhibitoren des 26S Proteasoms

In eukaryotischen Zellen bildet das UPS den „Hauptkontrollschalter“ für die Regulierung des Proteinhaushalts. Beeinträchtigungen seiner Aktivität haben folglich Konsequenzen für den Zellmetabolismus bzw. das Zellwachstum.<sup>[391]</sup> Besonders problematisch scheint dabei eine Überaktivität des Proteasoms zu sein, welche in der Destabilisierung essenzieller Regulatorproteinen resultiert und in engem Verhältnis mit diversen Krankheitsbildern in Verbindung steht. Ein progressiver Aktivitätsverlust wird dagegen meist als normaler alterungsbedingter Prozess betrachtet.<sup>[392]</sup> In diesem Kontext haben Inhibitoren des Proteasoms (PIs) in den letzten Jahren große Bedeutung in der Wirkstoffentwicklung erlangt. Drei davon sind bereits für die Anwendung in der Humanmedizin zugelassen.<sup>[391]</sup> Man unterscheidet prinzipiell zwei Klassen von PIs: Kovalente und nicht-kovalente Inhibitoren. Erstere bilden die Mehrheit der bekannten Verbindungen und sind in der Regel modular aufgebaut, wobei sie ein peptidisches Motiv zur Adressierung einer bestimmten Substrataffinität des Proteasoms beinhalten und mit einer elektrophilen Einheit (Gefechtskopf) mit dem katalytischen Zentrum reagieren.

Nicht kovalente PIs umfassen dagegen sehr diverse Strukturen. Sie können sowohl spezifische als auch unspezifische bzw. allosterisch wirkende Moleküle darstellen. Ihre Inhibition kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen, wobei sie entweder die Translokation/das Fortschreiten der Polypeptidsubstrate in die 20S-Kavität hindern, oder die Assemblierung der Kern- und regulatorischen Komponenten zum 26S Komplex stören.

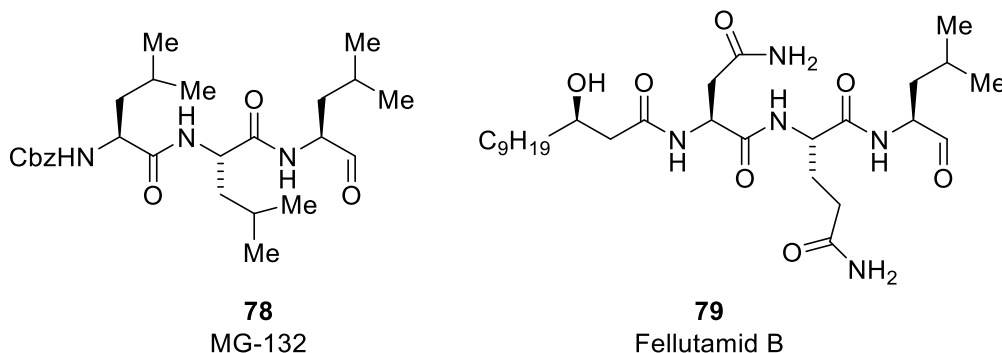
#### 3.2.5.1 Kovalente Proteasom-Inhibitoren

Kovalente Proteasom Inhibitoren (KPIs) werden, basierend auf der chemischen Natur ihres Gefechtskopfs, in sieben Subfamilien eingeteilt: Peptidaldehyde,<sup>[393,394]</sup> Peptidboronate,<sup>[393,395]</sup> Epoxyketone,<sup>[396,397]</sup> Ketoaldehyde,<sup>[398]</sup>  $\beta$ -Lactone,<sup>[399-401]</sup> Peptidvinylsulfone,<sup>[402]</sup> und Syrbactine.<sup>[403]</sup>

##### ▪ Peptidaldehyde

Peptidaldehyde sind sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs und waren die ersten literaturbekanntesten PIs. Sie reagieren reversibel-kovalent mit der Hydroxylfunktion des katalytisch aktiven Thr-Rests unter Bildung eines Halbacetals.<sup>[393,394]</sup> Neben Ihrer

proteasomalen Aktivität hemmen Peptidaldehyde ebenfalls Serin- bzw. Cystein-Proteasen,<sup>[404]</sup> und sind zudem unter physiologischen Bedingungen stark oxidationsempfindlich,<sup>[405]</sup> sodass sie zur physiologischen Anwendung in Semicarbazid-*Prodrugs* überführt werden. Prominente Vertreter der Peptidaldehyde sind MG-132 (**93**) und Fellutamid B (**94**).

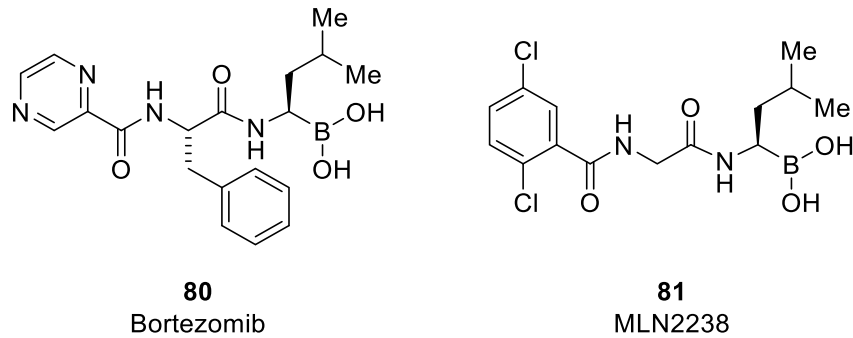


**Abbildung 3-10:** Strukturen der Peptidaldehyde MG-132 und Fellutamid B.

#### ▪ Peptidboronate

Peptidboronate reagieren im aktiven Zentrum unter Bildung eines tetraedrischen Borats. Die Reaktion ist reversibel, jedoch ist die Dissoziation gehemmt, da das anionische Addukt über eine Salzbrücke mit dem N-terminalen Ammonium stabilisiert wird.<sup>[393,395]</sup> Peptidboronate weisen daher eine deutlich höhere Selektivität als Peptidaldehyde auf, weil ihr Wirkmechanismus das Vorkommen eines katalytischen Threonins mit freiem N-Terminus voraussetzt, das physiologisch außer im Proteasom kaum auftritt. Als bekanntester Vertreter innerhalb dieser Klasse wurde 2003 Bortezomib (Vecalde®) als Wirkstoff zur Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen.<sup>[406]</sup> Bortezomib (**80**) zeigt eine hohe Selektivität für das Proteasom, verursacht jedoch in höherer Dosis periphere Neuropathien. Seine zu hohe Affinität für das Proteasom der Erythrozyten bewirkt zudem eine schlechte Gewebeverteilung des Wirkstoffs und eine sehr lange Halbwertszeit. Eine Minderung der unerwünschten Wechselwirkungen sowie eine verbesserte Halbwertszeit konnten mit dem Peptidboronat zweiter Generation MLN2238 (**81**) erreicht werden.<sup>[407]</sup>

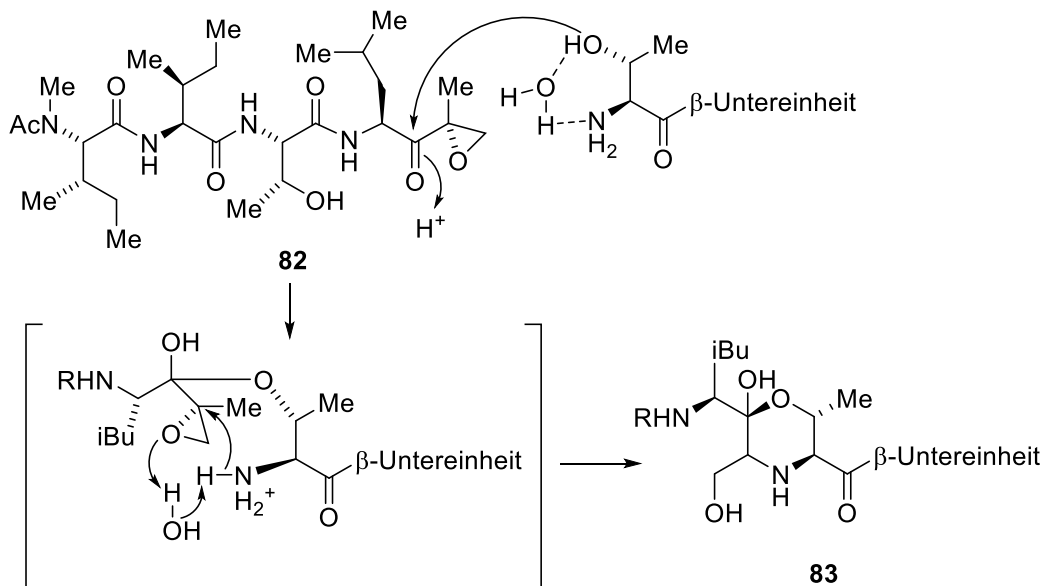




**Abbildung 3-11:** Strukturen der Peptidboronate Bortezomib und MLN2238.

### ▪ Epoxyketone

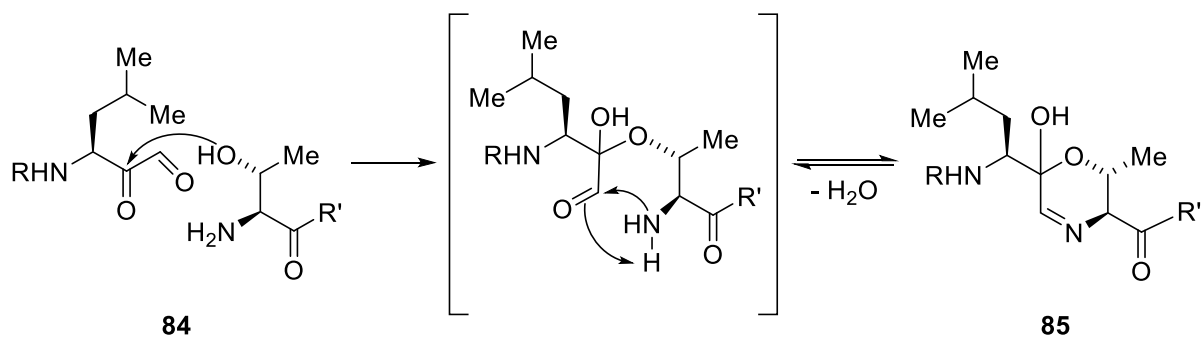
Als bekanntester Vertreter der Epoxyketone (**82**) wurde 1992 der Naturstoff Epoxomycin entdeckt. Der Inhibitionsmechanismus verläuft in zwei Schritten, wobei das Keton erst von der Hydroxylgruppe des katalytischen Thr-Rests nukleophil angegriffen und die Epoxid-Einheit im Anschluss von der N-terminalen Aminogruppe unter Bildung eines sechsgliedrigen Morpholinrings geöffnet wird.<sup>[396,397]</sup> Letzterer Schritt lässt die Umsetzung irreversibel werden und begründet die hohe Selektivität der Hemmung. Tatsächlich sind für diese PI-Klasse bis heute keine *Off-Targets* bekannt. Mit der Zulassung im Jahre 2012 des Epoxyketons Carfilzomib<sup>[408]</sup> zur Behandlung des multiplen Myeloms erfolgte eine erste Anwendung der Epoxyketone in der Humanmedizin.



**Abbildung 3-12:** Inhibitionsmechanismus des Peptidepoxyketons Epoxomycin adaptiert nach Kisselev *et al.*<sup>[391]</sup>

▪ **Ketoaldehyde**

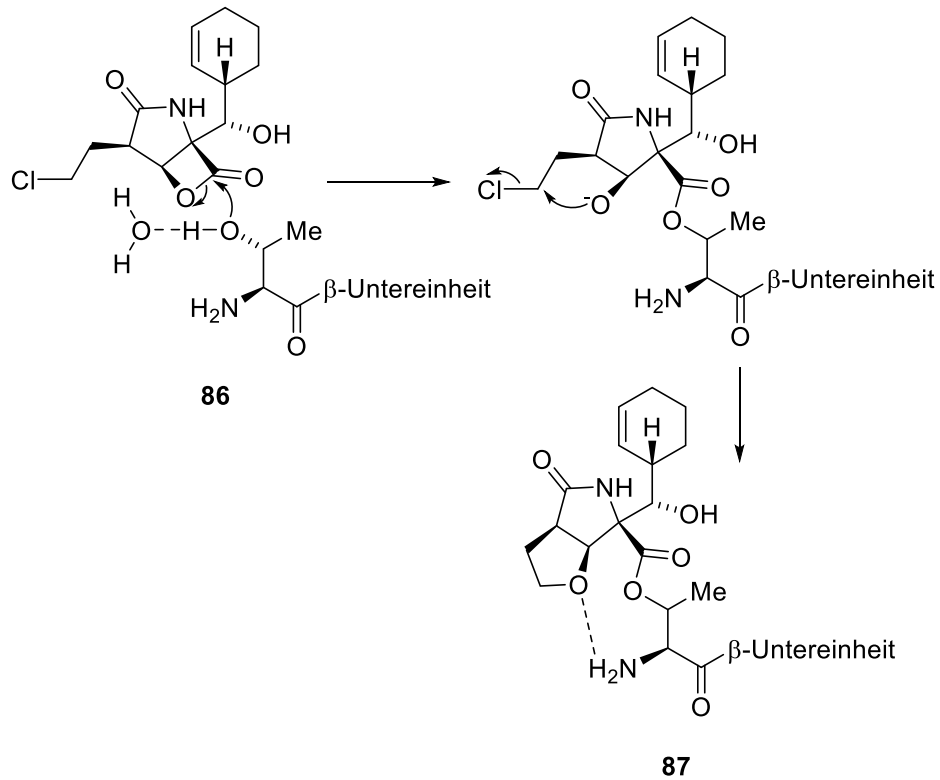
Ketoaldehyde wurden in den 1990er beschrieben<sup>[409]</sup> und besitzen einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Epoxyketone. Sie reagieren mit dem N-terminalen Threonin-Rest unter Bildung eines Dihydrooxazinrings und stellen daher sehr selektive Inhibitoren des Proteasoms dar.<sup>[398]</sup> Bis heute sind so gut wie keine *Off-Targets* für diese Klasse bekannt. Darüber hinaus besetzen sie eine besondere Nische innerhalb der PIs, da sie sehr potente, aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des gebildeten Imins, jedoch reversible Inhibitoren darstellen.



**Abbildung 3-13:** Allgemeiner Wirkmechanismus der Peptid-Ketoaldehyde adaptiert nach Kisselev *et al.*<sup>[391]</sup>

▪  **$\beta$ -Lactone**

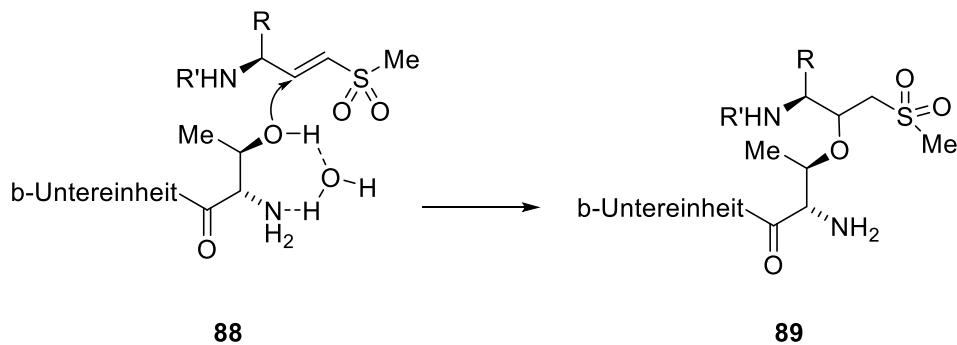
$\beta$ -Lactone hemmen die proteasomale Aktivität durch Veresterung des katalytischen Threonin-Rests.<sup>[399-401]</sup> Als prominentestes Mitglied innerhalb dieser Klasse befindet sich das aus dem marinen Mikroorganismus *Salinospora tropicalis*<sup>[410]</sup> isolierte Marizomib (auch Salinosporamid A genannt) gegenwärtig noch in der klinischen Testphase. Marizomib (**86**) verfügt über einen bisher einzigartigen Wirkmechanismus, wobei nach Öffnung des gespannten Lactonrings, eine Tetrahydrofuran-Einheit über eine intramolekulare nukleophile Verschiebung des Chlorids erhalten wird. Diese verhindert die Hydrolyse des gebildeten Esters durch elektrostatische Abschirmung mittels einer Wasserstoff-Brückenbindung mit dem terminalen Amin.<sup>[411]</sup>



**Abbildung 3-14:** Inhibitionsmechanismus des  $\beta$ -Lactons Salinosporamid A adaptiert nach Kisselev *et al.*<sup>[391]</sup>

#### ▪ Vinylsulfone

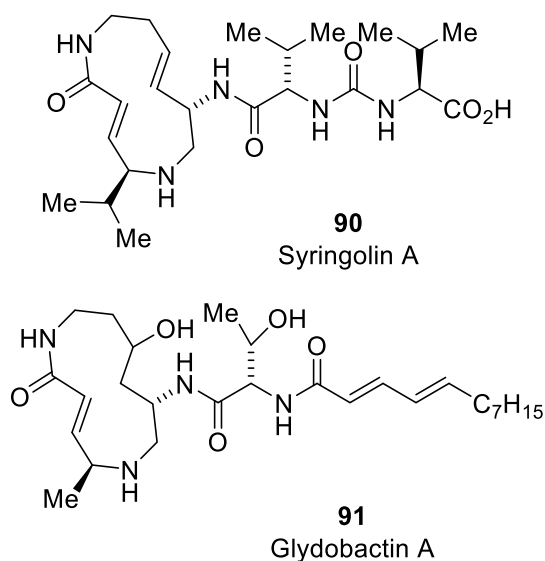
Synthetische Vinylsulfone zur Hemmung des Proteasoms wurde zum ersten Mal 1997 von Bogyo *et al.* beschrieben.<sup>[412]</sup> Die kovalente Bindung erfolgt über eine 1,4 – Michael-artige Addition der Hydroxylgruppe des katalytischen Threonin-Rests an die Doppelbindung der Vinylsulfon-Einheit.<sup>[402]</sup> Sie sind einfach zu synthetisieren, weisen jedoch keine große Selektivität für das Proteasom auf. Sie reagieren neben dem Proteasom insbesondere mit Cystein-Proteasen.



**Abbildung 3-15:** Allgemeiner Hemmmechanismus des Proteasoms durch Peptid-Vinyl Sulfone adaptiert nach Kisselev *et al.*<sup>[391]</sup>

▪ **Syrbactine**

Syrbactine bilden peptidisch verknüpfte 12-gliedrige Lactame. Das  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Amid innerhalb des Lactam-Rings geht eine 1,4-Michael-ähnliche Addition mit der Hydroxylgruppe des terminalen Threonin-Rests ein, wobei eine irreversible Ether-Bindung gebildet wird.<sup>[403]</sup> Somit verfügt diese PI-Klasse über einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Vinylsulfone, weist dabei jedoch eine höhere Selektivität für das Proteasom auf. Bekannte Vertreter innerhalb dieser Klasse sind die beiden Naturstoffe Syringolin A (**99**) und Glidobactin A (**100**).



**Abbildung 3-16:** Strukturen prominenter Syrbaactine.

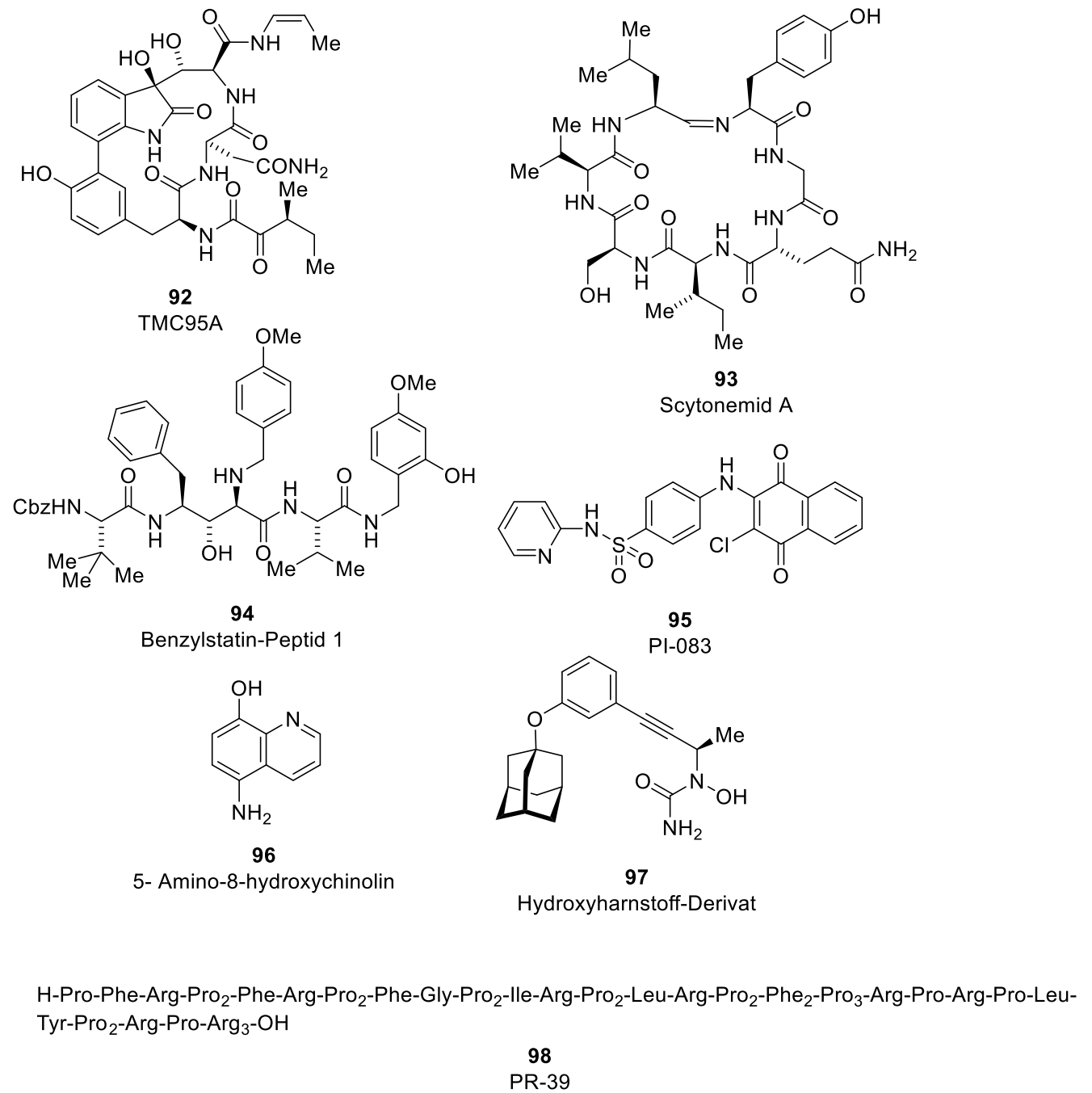
### 3.2.5.2 Nicht-kovalente Inhibitoren

Nicht-kovalente Proteasom-Inhibitoren (NKPIs) sind gegenwärtig nur wenige bekannt. Ihre inhibitorische Wirkung erfolgt meist durch sterische Abschirmung der aktiven Zentren, oder allosterisch, wobei sie sowohl am 20S Partikel, als auch an den 19S regulatorischen Einheiten binden können.

Innerhalb der ersten Klasse an NKPIs stellen TMC-95 (**92**)<sup>[413]</sup> und Scytonemid A (**93**) bzw. B<sup>[414]</sup> gespannte zyklische Peptide dar, deren Wirkmechanismus auf einer reversiblen Besetzung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten basiert. Das lineare Benzylstatin-Peptid CVT-659 (**94**)<sup>[415,416]</sup> – dessen Leitstruktur aus dem HIV-Protease-Inhibitor Ritonavir abgeleitet wurde – verfügt über einen ähnlichen Wirkmechanismus und steuert die Bindetaschen  $S_1$ ,  $S_2$  und  $S_3$  der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten an, sodass diese von

Substratpeptiden nicht mehr erreicht werden können. Als einzige bisher bekannte an den aktiven Zentren wirkende nicht-peptidische NKPIs wurden das Sulfonamid PI-083 (**95**)<sup>[417]</sup> sowie ein Zileuton-strukturverwandter Hydroxyharnstoff-Derivat<sup>[418]</sup> über Hochdurchsatz-*Screening* mittels *in vitro* Proteasom-Inhibierungsassay identifiziert. Letztere Verbindung zeigt eine spezifische Hemmung der CT-L Aktivität des Proteasoms im unteren nanomolaren Bereich ( $K_i = 30$  nM). Darüber hinaus konnte durch Röntgen-Kristallstrukturanalyse eine Besetzung der Substrat-Bindetaschen  $S_1$  und  $S_3$  der Untereinheit  $\beta_5$  über einen bis dahin unbekanntem Bindemodus nachgewiesen werden.

Allosterisch wirkende NKPIs umfassen strukturell sehr diverse Molekülklassen, sowie Peptide,<sup>[419]</sup> Polyphenole,<sup>[420]</sup> Hydroxychinoline,<sup>[421]</sup> Triterpenoide,<sup>[422]</sup> diverse elektrophile Naturstoffe<sup>[423]</sup> und Thiopeptide.<sup>[424]</sup> Bei einer Vielzahl dieser Verbindungen handelt es sich um unspezifische Hemmer des Proteasoms, welche erst bei höherer Konzentration aktiv sind. Neben den Thiopeptiden – deren Bindemodus in Abschnitt **3.2.6** näher diskutiert wird – zeigen 5-Amino-8-hydroxychinolin (**97**)<sup>[421]</sup> und das aus Schweinedarm isolierte 39 Aminosäure-lange antibiotisch wirkende Peptid PR-39 (**98**)<sup>[419]</sup> eine spezifische Wirkung. Ersteres Molekül bindet im inneren der 20S Kavität an die  $\alpha$ -Untereinheiten, und weist eine Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich auf. PR-39 bindet an die  $\alpha_7$ -Untereinheit des 20S Kernpartikels, wobei es die Interaktion mit den regulatorischen 19S „Deckelkomponenten“ und somit die Bildung des 26S Komplexes unterbindet. Interessanterweise verfügen beide Verbindungen über eine Aktivität in Bortezomib-resistenten Zelllinien.



**Abbildung 3-17:** Struktur bekannter nicht-kovalenter Proteasominhibitoren.

### 3.2.6 Bindemodus von Thiostrepton am 26S Proteasom

Hinweise auf Proteasom-hemmende Eigenschaften der Thiopeptide Siomycin A und Thiostrepton wurden von der Arbeitsgruppe Gartel berichtet.<sup>[104]</sup> Die Expressionsniveaus der Zellzyklus-Regulatorproteine Hdm2, p53, Mcl-1 und p21 stiegen nach Behandlung mit Siomycin A signifikant an, ähnlich dem von MG132 induzierten Phänotyp. Als weiteres Indiz wurde eine Unterregulierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und FoxM1 durch Siomycin A und Thiostrepton (7) festgestellt, welche ebenfalls mit einer Proteasom-inhibitorischen Wirkung korrelierte. *In vitro* wurde die hemmende Wirkung von Siomycin A und Thiostrepton (7) auf die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms gezeigt.

Eine unabhängige Bestätigung und ein Target-Nachweis *in allulo* gelang kurz darauf der Arbeitsgruppe Arndt.<sup>[96]</sup> Über Fluoreszenzmikroskopie konnte in BSC-1-Zellen die Colokalisation einer Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Thiostreptonsonde mit einem 20S Proteasom-selektiven Antikörper gezeigt werden. Des Weiteren wurde die gleiche Sonde in einer Fluoreszenzpolarisationsbindestudie an isolierten 20S Partikeln eingesetzt, wobei eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von  $1.75 \pm 0.35 \mu\text{M}$  gemessen werden konnte. Anschließend wurde die inhibitorische Wirkung von Thiostrepton (7) auf die verschiedenen katalytischen Aktivitäten des humanen 20S Proteasoms bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Thiostrepton (7) die Caspase-ähnliche ( $\text{IC}_{50} = 3.8 \pm 2.4 \mu\text{M}$ ), die Chymotrypsin-ähnliche ( $\text{IC}_{50} = 5.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$ ), jedoch nicht die Trypsin-ähnliche Aktivität hemmte.

Basierend auf den Röntgen-Kristallstrukturanalysen des Proteasoms von *S. cerevisiae*<sup>[384]</sup> (PDB: 1RYP) wurde der Durchmesser des 20S Partikels an den Schnittstellen zu den 19S regulatorischen Einheiten auf ca. 22.5 Å und im Inneren der Kavität auf ca. 16.7 Å geschätzt. Parallel zeigen die NMR-Strukturdaten<sup>[330]</sup> von Thiostrepton (7) eine Moleküllänge von ca. 26 Å und eine Breite von ca. 18.2 Å, sodass sowohl ein unkompetitiver, als auch ein spezifischer nicht-kovalenter Inhibitionsmechanismus – bei dem Thiostrepton (7) selektiv die katalytischen Aktivitäten der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 5$  unterbindet bzw. deren Zugang für Substratpeptide blockiert – sehr unwahrscheinlich erscheint. Aus diesem Grund wurde ein unspezifischer bzw. allosterischer Bindemodus vermutet, wobei die Wechselwirkung des Thiopeptids bevorzugt an der Außenseite des Kernpartikels eintreten sollte. Nicht erklärt wird damit jedoch, wieso die Hemmwirkung von Thiostrepton spezifisch auf die PGPH- und CT-L-Aktivitäten beschränkt bleibt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse publiziert,<sup>[425]</sup> welche einen alternativen Wirkmechanismus vorschlagen. Bei einem zellbasierten Hochdurchsatz-*Screening* wurde Thiostrepton (**7**) als Modulator der zellulären Stabilität von DIAP1 (*Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein 1*) identifiziert. DIAP1 gehört zu den E3-Ub-Ligasen, welche den proteasomalen Abbau proapoptotischer Faktoren vermittelt. Darüber hinaus unterliegt das zelluläre Vorkommen von DIAP1 einer negativen Kontrolle durch den IAP-Antagonisten Rpr, welcher DIAP1 bindet und dessen Selbst-Ubiquitylierung katalysiert. Erwartungsgemäß konnte Thiostrepton (**7**), aber auch MG-132 und Epoxomycin diesen Prozess selektiv unterbinden, wobei es zu einer Akkumulation des poly-Ub-DIAP1/Rpr-Komplexes kam. Im Unterschied zu MG132 und Epoxomycin, zeigten die Western Blot-Analysen des polyubiquitylierten Rpr nach Thiostrepton-Inkubation verschiedene Laufweitenverschiebungen, welche die Autoren als kovalente Thiostrepton-Rpr-Addukte interpretierten. Zudem konnte die Bildung dieser Addukte durch vorherige Zugabe eines *L*-Cystein-Exzesses verhindert werden, woraus geschlossen wurde, dass die Verknüpfung über eine 1,4 – *Sulfa*-Michael Addition zwischen dem Cystein in der Position 49 von Rpr und einem der Dehydroaminosäurereste des Thiostreptons erfolgt. Interessanterweise wiesen die Western Blot-Analysen anderer literaturbekannter Zielproteine des Thiostreptons (p53, Usp24, DIAP1) ähnliche elektrophoretische Migrationsmuster auf. Demzufolge überprüften die Autoren, ob der vermeintliche kovalente Bindemodus ebenfalls auf das Proteasom erweitert werden könne.

Die inhibitorische Wirkung von Thiostrepton (**7**) auf die verschiedenen katalytischen Aktivitäten des 20S Proteasoms wurde mittels enzymatischen Tests gemessen. Die Autoren konnten keine Beeinträchtigung der PGPH-, sondern lediglich der CT-L-Aktivität nachweisen. Darüber hinaus beobachteten sie eine Vervierfachung der T-L-Aktivität. Auch konnte keine der konstatierten Wirkungen auf das 26S Proteasom reproduziert werden.

Im Folgenden untersuchten die Autoren die Hemmwirkung von Thiostrepton auf das UPS. Dabei konnten anhand diverser Analysen folgende Schlüsse gezogen werden:

- Thiostrepton (**7**) inhibiert die Funktion des UPS, wobei es eine zehnfach geringere Aktivität als MG132 aufweist,
- Die vollständige Inhibition tritt erst nach vier Stunden ein (MG132 nach fünf Minuten) und ist irreversibel,



- Für die Inhibierung ist eine kovalente Interaktion von Thiostrepton mit Rpr bzw. einem Proteinsubstrat des UPS notwendig,
- Thiostrepton (7) bildet kovalente Rpt1-Rpr-Addukte.

Rpt-Einheiten sind in der 19S Basis lokalisiert und katalysieren den Translokationsschritt des Proteinabbaus. Folglich wurde von den Autoren ein kooperativer Inhibitionsmechanismus von Thiostrepton geschlossen, bei dem das Thiopeptid einige Substratproteine des UPS bindet, und diese anschließend kovalent an die Untereinheit Rpt1 verknüpft, wodurch die Translokation der abzubauenen Polypeptide an den Eingängen des 20S Kernpartikels sterisch gehindert wird.

Der vorgeschlagene Bindemodus erscheint grundsätzlich plausibel, da er mit der herrschenden Meinung einer unspezifischen bzw. allosterischen Hemmwirkung von Thiostrepton (7) auf das 26S Proteasom übereinstimmt. Bei genauerem Vergleich mit den literaturbekannten Daten werden allerdings einige Inkohärenzen sichtbar. Zum einen kann die Inhibierung des 20S Partikels damit nicht erklärt werden, da der aufgestellte Wirkmechanismus lediglich die Rpt-Untereinheiten der 19S regulatorischen Einheiten involviert, welche im isolierten 20S Proteasom fehlen. Darüber hinaus bleibt es weiterhin unklar, inwiefern die Hemmwirkung von Thiostrepton (7) sich spezifisch auf die CT-L- bzw. PGPH-Aktivität beschränkt. Ferner wird aus den veröffentlichten Ergebnissen nicht ersichtlich, wie die Thiostrepton-vermittelte kovalente Verknüpfung von Rpr an Rpt1 auf chemischer Ebene erfolgt. Eine strukturbiologische bzw. biochemische Bestätigung des vorgeschlagenen Bindemodus am isolierten 26S Proteasom steht ebenfalls aus.

### 3.3 Zytostatische und antineoplastische Wirkung von Thiostrepton

#### 3.3.1 Stabilisierung von Tumorsuppressoren

Die zytostatische und antineoplastische Wirkung von Thiostrepton (7) – aber auch von strukturverwandten Thiopeptiden – wird in mehreren Veröffentlichungen thematisiert.<sup>[100,103-105,122,426,427]</sup> Darin wurden diverse Zellzyklus-regulierende Zielproteine, sowie FOXM1, Hdm2, p53, Mcl-1, p21, Usp24, DIAP1, NPM und ARF identifiziert, deren Expressionsniveau von Thiostrepton (7) moduliert werden. Angesichts der hohen strukturellen Variabilität der genannten Zielproteine, sowie deren zum Teil antagonistischen Funktionen in der Regulierung des Zellzyklus, erscheint deren direkte Modulierung durch Thiostrepton (7) unwahrscheinlich. Dementsprechend scheint es plausibel anzunehmen, dass die Anti-Krebs Eigenschaften von Thiostrepton (7) aus seiner Proteasom-inhibierenden Wirkung resultieren.

Tumorzellen sind besonders stark vom reibungsfreien Fortgang des Zellzyklus abhängig.<sup>[428]</sup> Letzterer unterliegt einer engen Kontrolle durch sogenannte Tumorsuppressorproteine, welche bei zellulären Defekten das Anhalten der Zellteilung bzw. die Apoptose induzieren. Interessanterweise wird die Mehrzahl der bekannten peptidischen Tumorsuppressoren zum Abbau an das UPS adressiert, sodass eine Inhibition bzw. Verminderung der proteasomalen Aktivität ihren Abbau in der Zelle stark verringert.<sup>[428]</sup> Leider sind neben den Tumorsuppressoren auch zahlreiche Onkogene – welche in den meisten Krebsarten überexprimiert sind – Substrate des Proteasoms. Somit könnte eine Inhibition des UPS gleichermaßen dazu beitragen, ihren Abbau zu beeinträchtigen. Dessen ungeachtet besitzen fast alle bekannten Proteasominhibitoren Antikrebseigenschaften und verlangsamen die Metastasenbildung sowie die Angiogenese vieler Tumorarten.<sup>[428]</sup> Hierzu konnte gezeigt werden, dass der Peptidaldehyd MG132 ein Anhalten des Zellzyklus im Übergang zwischen den Phasen G<sub>1</sub> und S verursacht,<sup>[429]</sup> während das  $\beta$ -Lacton Lactacystin und das Peptidboronat Bortezomib jeweils die Bildung eines anormalen Mitosespindels und somit eine Hemmung der Metaphase<sup>[430]</sup> bzw. eine Blockade in der G<sub>2</sub>/M-Phase<sup>[431]</sup> zur Folge haben.

### 3.3.1.1 Inhibition der FoxM1-Genexpression

Die unterdrückende Wirkung von Thiostrepton (7) auf das *Forkhead box M1*-Protein (FOXM1) wurde ursprünglich von Bhat *et al.* berichtet.<sup>[104]</sup> FOXM1 gehört zur Familie der sogenannten *Forkhead box*-Transkriptionsfaktoren und ist in den meisten Krebsarten überexprimiert.<sup>[105]</sup> Über RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass FOXM1 für die Karzinogenese sowie die Metastasenbildung von essenzieller Bedeutung ist, weshalb es usuell als attraktives Target für die Entwicklung von Anti-Krebs Therapeutika gilt.

Das zelluläre Vorkommen von FOXM1 unterliegt einer Regulierung durch das Nucleophosmin NPM, welches FOXM1 bindet und dessen Transkription inhibiert.<sup>[426]</sup> Der Mechanismus ist dabei noch nicht völlig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass durch die Interaktion mit NPM FOXM1 nicht mehr an seinen Promotor binden und dessen Expression aktivieren kann (positive Rückkopplungsschleife). Ebenfalls bekannt ist, dass NPM vom UPS abgebaut wird, und demnach von Proteasom-Inhibitoren stabilisiert wird. Darauf basierend wurde die Hypothese aufgestellt, wonach die Thiostrepton-induzierte Unterregulierung von FOXM1 überwiegend auf der Proteasom-inhibitorischen Wirkung des Thiopeptids beruht,<sup>[432]</sup> wobei der UPS-abhängige Abbau von NPM unterbunden wird und dessen FOXM1-negativregulierende Funktion in der Zelle dadurch erhalten bleibt.

2011 wurde dagegen von der Arbeitsgruppe um Balasubramaian ein alternativer – und zum Teil kontrovers diskutierter – Wirkmechanismus vorgeschlagen.<sup>[105]</sup> Die Autoren schlossen aus einem *Pulldown*-Experiment mit einer biotinylierten Thiostreptonsonde auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Thiostrepton und FOXM1. Mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wurde anschließend die Bindungsaffinität gemessen, wobei eine Dissoziationskonstante im 10  $\mu\text{M}$ -Bereich bestimmt wurde. Des Weiteren wurde der Thiostrepton-FOXM1-Komplex einer CD-Spektroskopie-Analyse unterzogen, aus der die Autoren schlussfolgerten, dass die Bindung von Thiostrepton eine „Teildenaturierung“ diverser Strukturelemente von FOXM1 zur Folge hatte. Abschließend führten sie (in MCF-7 Zellen) eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit einem FOXM1-gerichteten Antikörper durch, wobei die Promotorsequenzen der *myc*-, *cdc25b*-, *ccnb1*- *xbp1*-, *greb1*- und *esr1*-Gene angereichert werden konnten. Interessanterweise führte eine vorheriger Behandlung der Zellen mit Thiostrepton zu einer signifikanten Reduktion der Menge an angereichertem Material. Damit begründeten die Autoren die Hypothese, dass

Thiostrepton (7) spezifisch an FOXM1 bindet und auf diese Weise die transkriptionsaktivierende Wirkung des Regulator-Proteins hemmt, wodurch es zu einer Unterregulierung der FOXM1-induzierten onkogenen Faktoren kommt.

Obwohl die veröffentlichten Ergebnisse eine direkte Interaktion zwischen Thiostrepton (7) und FOXM1 zu belegen scheinen, ist der vorgeschlagene Hemmmechanismus wenig stichhaltig. Zum einen kann dadurch nicht erklärt werden, weshalb alle bisher untersuchten Proteasom-Inhibitoren trotz hoher struktureller Diversität – sowohl untereinander als auch mit Thiostrepton – FOXM1 herabregulieren. Darüber hinaus konnte der FOXM1-Genpromotor nicht über das ChIP-Experiment angereicht werden. Dementsprechend ist es unklar, inwiefern Thiostrepton durch Bindung an FOXM1 die Expression desselben FOXM1 unterdrückt. Des Weiteren spricht die geringe Bindungsaffinität von Thiostrepton (7) für FOXM1 nicht für eine physiologische Relevanz des Bindungsphänomens, da die zelluläre Konzentration von FOXM1 – aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor – und die Löslichkeit von Thiostrepton (7) zu gering sind, um eine effektive Wechselwirkung zu gewährleisten.



---

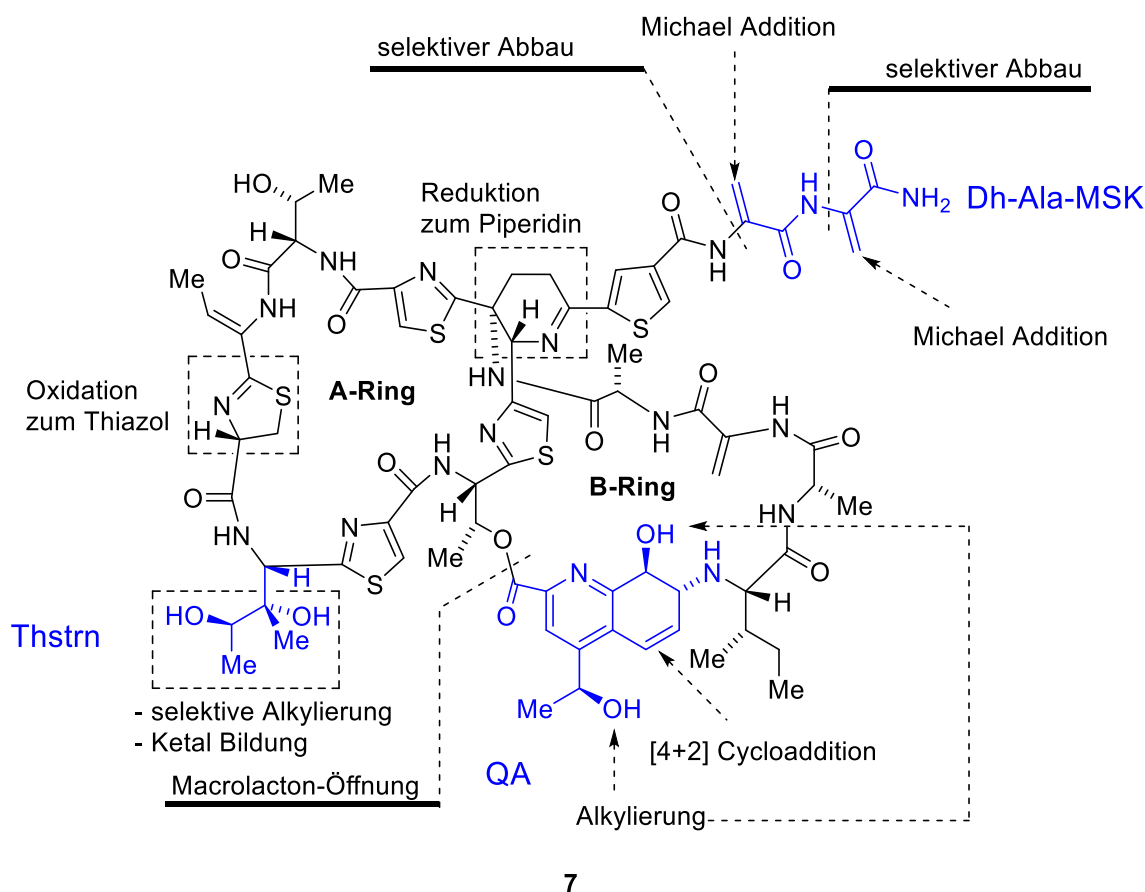
## 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Konzeptionelle Gedanken

### 4.1.1 Funktionalisierungsstrategie am Thiostrepton-Grundgerüst

Ziel dieser Arbeit war es, ein lichtinduzierbares affinitätsbasiertes Label zu entwickeln, welches sich zur Konjugation einer nach Möglichkeit großen Bandbreite an biologisch aktiven Molekülen eignet. Um die Anwendbarkeit des Labels zu überprüfen, sollte der Naturstoff Thiostrepton (**7**) mithilfe des entwickelten Systems zu einer photoreaktiven Sonde funktionalisiert werden. Als Grundvoraussetzung zur Validierung der dabei erhaltene Sonde sollte Letztere über eine nahezu identische biologische Aktivität verfügen, wie die Ausgangsverbindung. Folglich musste zunächst eine Implementierungsstrategie entwickelt werden, welche es erlaubte, den Naturstoff an einer für die Bindungsaffinität nicht relevante Position des Grundgerüsts einzuführen.

Ein möglicher Zugang zu Thiostrepton-Derivaten besteht in der Totalsynthese. Hierzu konnten bereits diverse Vertreter der Thiopeptid-Antibiotikaklasse – darunter auch Thiostrepton<sup>[129]</sup> – totalsynthetisch dargestellt werden.<sup>[433]</sup> Allerdings waren die dabei erhalten Gesamtausbeuten aufgrund der Größe und Komplexität der Moleküle sehr gering, sodass eine derartige Strategie im Rahmen dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen werden konnte. Demnach wurde ein semisynthetisches Vorgehen bevorzugt, bei dem das Photoaffinitätslabel selektiv an einer prädefinierten Position des Grundgerüsts eingeführt wird. Als Ausgangspunkt für die Aufstellung der Derivatisierungsstrategie wurden die von Schoof *et al.*<sup>[130]</sup> durchgeführten Struktur-Wirkbeziehungsuntersuchungen des Thiostreptons betrachtet. Damit konnten über semisynthetische Modifikation diverse Derivate des Naturstoffs sowie zwei Fluoreszenzfarbstoff-markierte und eine biotinylierte Sonde erhalten werden. Die daraus gewonnen Erkenntnisse hinsichtlich der chemischen Reaktivitäten der diversen Funktionalitäten des Moleküls wurden in **Schema 4-1** zusammengeführt.



7

**Schema 4-1:** Reaktivitätskarte von Thiostrepton (7) adaptiert nach Baringo et al.<sup>[434]</sup>

Anhand dieser Reaktivitätskarte erscheinen prinzipiell drei funktionelle Einheiten (blau), welche zur Einführung des Photolabels adressiert werden können: Die Dehydroalanin-Molekülseitenkette (Dh-Ala-MSK), der Thiostreptin-Rest (Thstrn) und die Chinaldinsäure-Einheit (QA).

Der Thiostreptin-Rest ist Teil des A-Rings und trägt bedeutend zur Bindungsaffinität des Thiostreptons am 70S Ribosom sowie am TipAS-Protein bei (siehe Kapitel 3.1.1.5, 3.2.1.8 und 3.2.2.2). Auch konnten Dockingstudien zeigen, dass bereits eine sterisch wenig anspruchsvolle Modifikation (Acetylierung) der  $\gamma$ -Hydroxyfunktion des Thstrn-Rests einen signifikanten Verlust der translationshemmenden Aktivität von Thiostrepton zur Folge hat.<sup>[130]</sup> Demnach erschien diese Position wenig geeignet für die Einführung des lichtaktivierbaren Labels.

Die Chinaldinsäure-Einheit kann über zwei unterschiedliche Strategien angesteuert werden: Einerseits beinhaltet sie ein endozyklisches Alken, welches selektiv über eine „inverse“ Diels-Alder Reaktion adressiert werden kann; andererseits trägt sie zwei sekundäre Alkoholfunktionen, welche für elektrophile Substitutionen in Frage kämen. Erstere



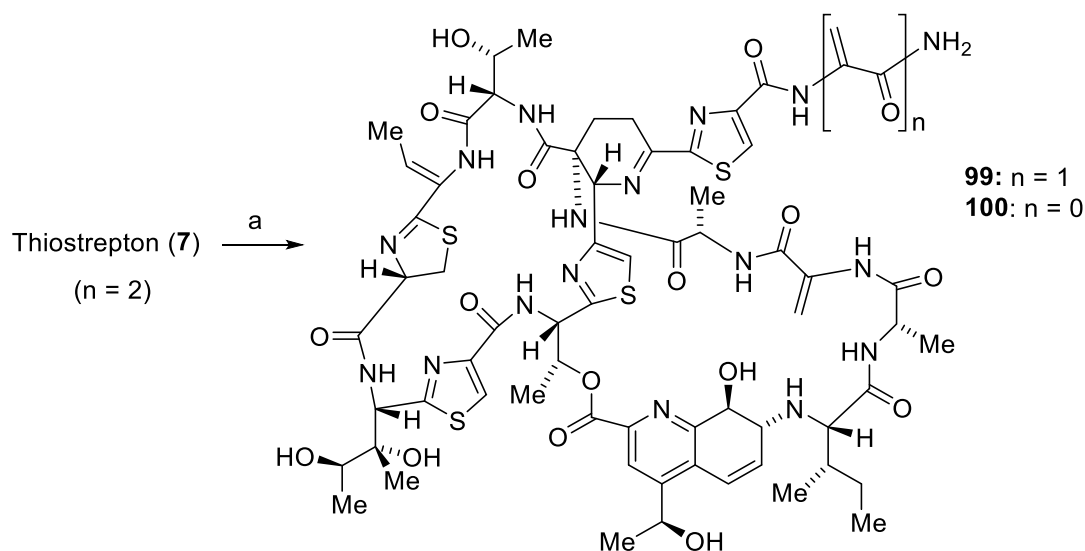
Vorgehensweise wurde kürzlich von Hegde *et al.* eingesetzt, um eine biotinylierte Thioistrepton-Sonde darzustellen.<sup>[105]</sup> Nach Umsetzung des Naturstoffs mit dem entsprechenden *Danishbefsky*-Dien erhielten die Autoren ein komplexes, nicht trennbares Produktgemisch, bei dem keine biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Folglich wurde diese Position nicht in Betracht gezogen.

Parallel konnte in unserer Arbeitsgruppe eine der beiden Hydroxyfunktionen der Chinaldinsäure-Einheit acyliert werden. Die Reaktion erfolgte durch Veresterung mit Pentinylsäureanhydrid – zur Installation eines terminalen Alkins – und ergab diverse Acylierungsprodukte, wobei sich das gewünschte QA-Pentinylsäureesterderivat in sehr geringen Mengen (ca. 1%) bildete (Dissertation V. Nasufovic, geplant 2019). Erste biologische Untersuchungen des Esters konnten einen Erhalt der antibakteriellen Wirkung zeigen (unpublizierte Daten) und suggerieren daher, dass die Chinaldinsäure-Einheit zur Einführung des Photophor-Reportertag-Konjugats prinzipiell geeignet sein könnte. Nichtsdestotrotz wurde von dieser Position abgesehen, da die Acylierungsreaktion eine zu geringe Selektivität zeigte.

Am geeignetsten unter den oben genannten funktionellen Einheiten erschien uns die Dehydroalanin-Molekülseitenkette. Zum einen trägt sie nur unwesentlich zur Bindungsaffinität des Naturstoffs an seinen verschiedenen Wirkorten bei (siehe **3.1.1.5**, **3.2.1.8** und **3.2.2.2**), sodass keine drastischen Aktivitätsverluste durch Funktionalisierung dieser Position zu erwarten sind. Zum anderen unterscheidet sie sich chemisch von den restlichen reaktiven Einheiten insofern, als dass sie elektrophile Eigenschaften aufweist und dadurch mit Nukleophilen selektiv umgesetzt werden kann. Hierzu konnten diverse Studien zeigen, dass die Dh-Ala-Reste der Molekülseitenkette als Michael-Akzeptoren fungieren.<sup>[96,129,329]</sup> Auch konnten durch 1,4 – Addition von Thiolen bzw. Aminen bereits diverse semisynthetische Derivate des Naturstoffs hergestellt werden, welche zum Großteil einen Erhalt der biologischen Aktivität zeigten.<sup>[96,105,329]</sup> Sonach sollte sich die Reaktivität der Dh-Ala-MSK gut für die Einführung des Photoaffinitätslabels eignen.

### 4.1.2 Selektive Reaktionsführung der Michael Addition

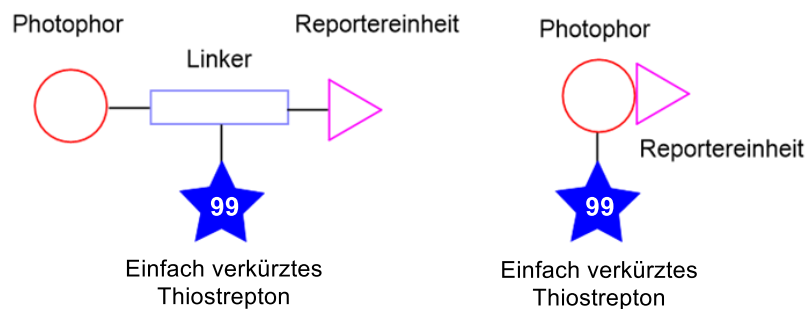
Die Dh-Ala-MSK beinhaltet zwei Dh-Ala-Reste, deren Reaktivität nicht differenziert werden kann. Bei der Umsetzung von Thiostrepton (7) über eine Michael Addition können demnach komplexe Reaktionsmischungen mit sowohl Mono- als auch Mehrfachadditionsprodukten erwartet werden.<sup>[130]</sup> Um dies zu unterbinden sollte daher die Komplexität der Dh-Ala-MSK reduziert werden, sodass lediglich das gewünschte Monoadditionsprodukt erhalten wird. Hierfür bietet sich das von Schoof *et al.* optimierte verfahren<sup>[96]</sup> an, wobei durch Behandlung des Thiostreptons (7) mit HNEt<sub>2</sub>, der endständige Dh-Ala-Rest selektiv abgebaut werden kann. Auf diese Weise wird der einfach verkürzte Naturstoff **99** erhalten, welcher anschließend als Ausgangsverbindung für die Implementierung mit dem lichtinduzierbaren Label eingesetzt werden kann.



**Schema 4-2:** Selektiver Abbau der Dehydroalanin-Molekülseitenkette von Thiostrepton 7. Bedingung: a) 10 Vol.-% HNEt<sub>2</sub> in CHCl<sub>3</sub>, 0°C → RT, 3 h, 40% Ausbeute.

### 4.1.3 Design der Photoaffinitätslabel

Zur Überführung des Naturstoffderivats **99** in eine Photoaffinitätsmarkierungsprobe sollte das Molekül einerseits mit einer photoreaktiven Gruppe, andererseits mit einer Reportereinheit versehen werden. Für die Implementierung wurden zwei unterschiedliche Strategien in Betracht gezogen. Zum einen sollten Photophor und Reportertag über einen multifunktionalen Linker verknüpft werden, sodass ein modular aufgebautes Photophor-Reportereinheit-Konjugat erhalten und zur Funktionalisierung des Naturstoffderivats eingesetzt werden kann. Zum anderen sollte ein linkerfreies Label konzipiert werden, welches Gefechtskopf und Reportereinheit innerhalb derselben funktionellen Einheit kombiniert und sich für die in **4.1.1** definierte Implementierungsstrategie am einfachverkürzten Thiostrepton (**99**) eignet. Der Hauptvorteil der linkerfreien gegenüber einer modularen Strategie besteht darin, dass das erhaltene Photoaffinitätslabel näher an der affinitätstragenden Einheit (**99**) zu liegen kommt, wodurch prinzipiell eine höhere Selektivität der Markierungsreaktionen zu erwarten ist. Darüber hinaus sollte das erhaltene System sterisch weniger anspruchsvoll sein als die modular aufgebaute Variante, sodass geringere Verluste hinsichtlich der biologischen Aktivität der Sonde zu erwarten sind.

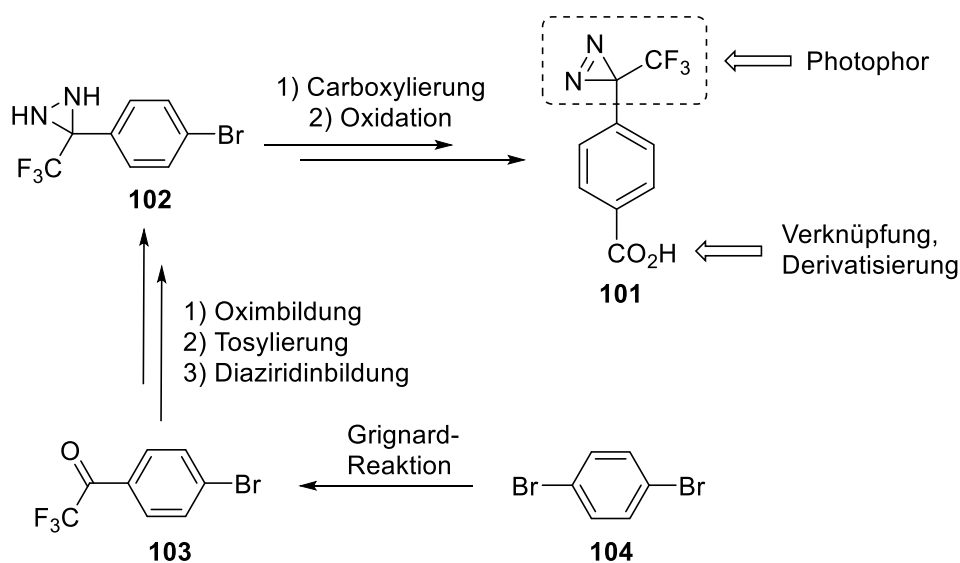


**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung der designten Photoaffinitätslabel. Links: Modular aufgebautes Photophor-Reportereinheit-Konjugat; rechts: Linkerfreies Photoaffinitätslabel.

#### 4.1.4 Auswahl des Photophors

Als Photophor sollte das von Nassal et al. 1983 eingeführte<sup>[435]</sup> *para*-carboxysubstituierte 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirin **101** dienen. Die Begründung dieser Wahl beruht einerseits auf den in Kapitel 2.4.5.1 erläuterten Vorteilen der 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirinen gegenüber Arylazid- und Benzophenon-basierten Photophoren; andererseits auf der vergleichsweise einfachen Verknüpfung – über beispielsweise eine Veresterung oder Amidierung – des *para*-Benzoessäurerests mit dem Linker.

Für die Darstellung der Zielverbindung **101** sollte der Ansatz von Bender *et al.*<sup>[436]</sup> verfolgt werden (Schema 4-3). In dieser siebenstufigen Synthese wird ausgehend von 1,4-Dibrombenzol über eine Grignard Reaktion 1-(4-Bromphenyl)-2,2,2-trifluoethanon **103** dargestellt, welches im Folgenden über drei Schritte (siehe 2.4.5.2) zum entsprechenden Diaziridin umgesetzt wird. Über eine elektrophile aromatische Substitution des Bromids mit CO<sub>2</sub> wird anschließend der *para*-Benzoessäurerest installiert. Die Darstellung des Diazirins **101** erfolgt abschließend durch Oxidation der Vorstufe.



**Schema 4-3:** Darstellung von 4-(3-(Trifluormethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoessäure **101** nach der Syntheseroute von Bender *et al.*<sup>[436]</sup>

#### 4.1.5 Auswahl der Reportereinheit

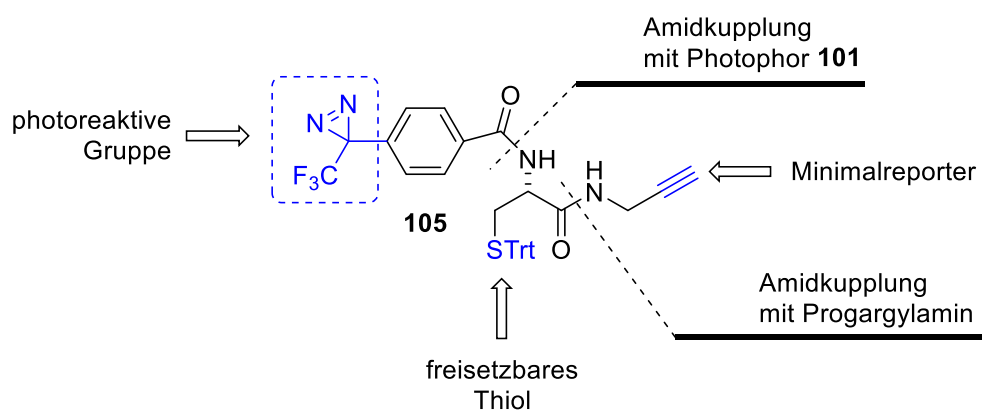
Angesichts der hohen strukturellen Komplexität und der ungünstigen physikochemischen Eigenschaften des Naturstoffs Thiostrepton (**7**) wurde prinzipiell von einem sterisch

anspruchsvollen Reportertag abgesehen. Stattdessen sollte ein terminales Alkin – als Minimalreporter (siehe Kapitel 2.3.3.1) – eingeführt werden, welches sich zur bioorthogonalen Konjugation *via* Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Huisgen's [4+2]-Cycloaddition (CuAAC) eignet. Hierzu sind diverse fluoreszierende bzw. biotinylierte Azide kommerziell verfügbar. Des Weiteren sollte die Implementierung des Minimalreporters am Linkersystem ohne weiteres über eine Amidkupplung mit Propargylamin erfolgen.

## 4.1.6 Design der Linkersysteme

### 4.1.6.1 Vereinfachter Linker

Aus den in Abschnitt 4.1.1, 4.1.4 und 4.1.5 formulierten Überlegungen ergab sich ein trifunktionaler Linker, welcher mit dem Minimalreporter Propargylamin und der photoreaktiven Einheit **101** funktionalisiert werden könnte. Darüber hinaus sollte das System über eine freie Thiolgruppe verfügen, sodass es sich zur Implementierung des einfach verkürzten Thiostreptons (**99**) durch *Sulfa*-Michael-Addition eignet. Als naheliegende und sterisch wenig anspruchsvolle Ausgangsverbindung bot sich die *S*-Tritylgeschützte Aminosäure Cystein an. Diese sollte über ihre  $\alpha$ -Aminogruppe mit dem Photophor **101**, und ihren Carbonsäurerest mit Propargylamin verknüpft werden, wobei letztere Funktionalisierungen mittels Amidkupplung erfolgen könnten. Durch Spaltung der Trityl-Schutzgruppe sollte im letzten Schritt das freie Thiol *in situ* generiert und das Photophor-Reportereinheit-Konjugat **105** anschließend mit dem Naturstoff-Derivat **99** umgesetzt werden.



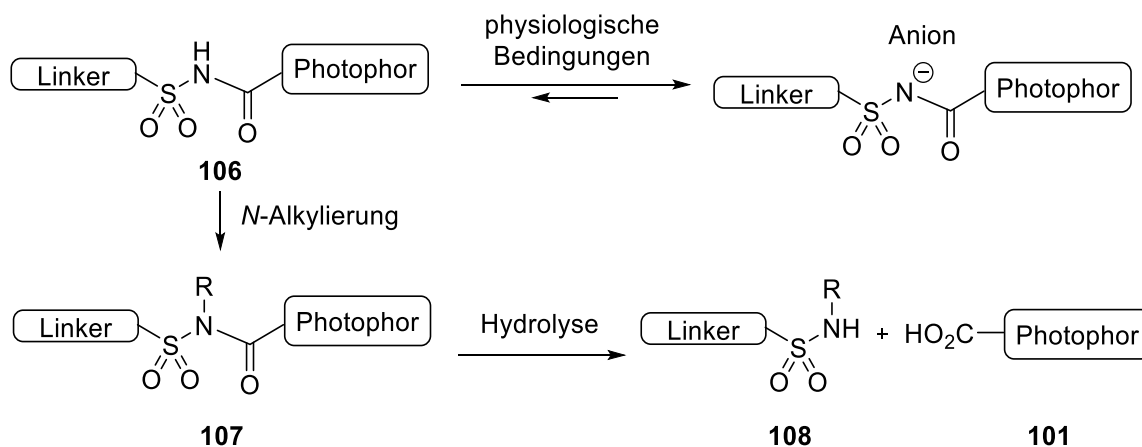
Schema 4-4: Design des Warhead-Reportertag-Konjugats **105**.

### 4.1.6.2 Spaltbarer Linker

Parallel zum oben genannten Linker sollte ein verändertes System entwickelt werden, welches eine gezielte Spaltung zwischen Photophor **101** und dem Cysteinrest ermöglicht.

Zweck dieser Modifikation war es, die Semimikro- bzw. Mikrountersuchung der markierten Proteine über MS/MS zu erleichtern (siehe Kapitel **2.4**).

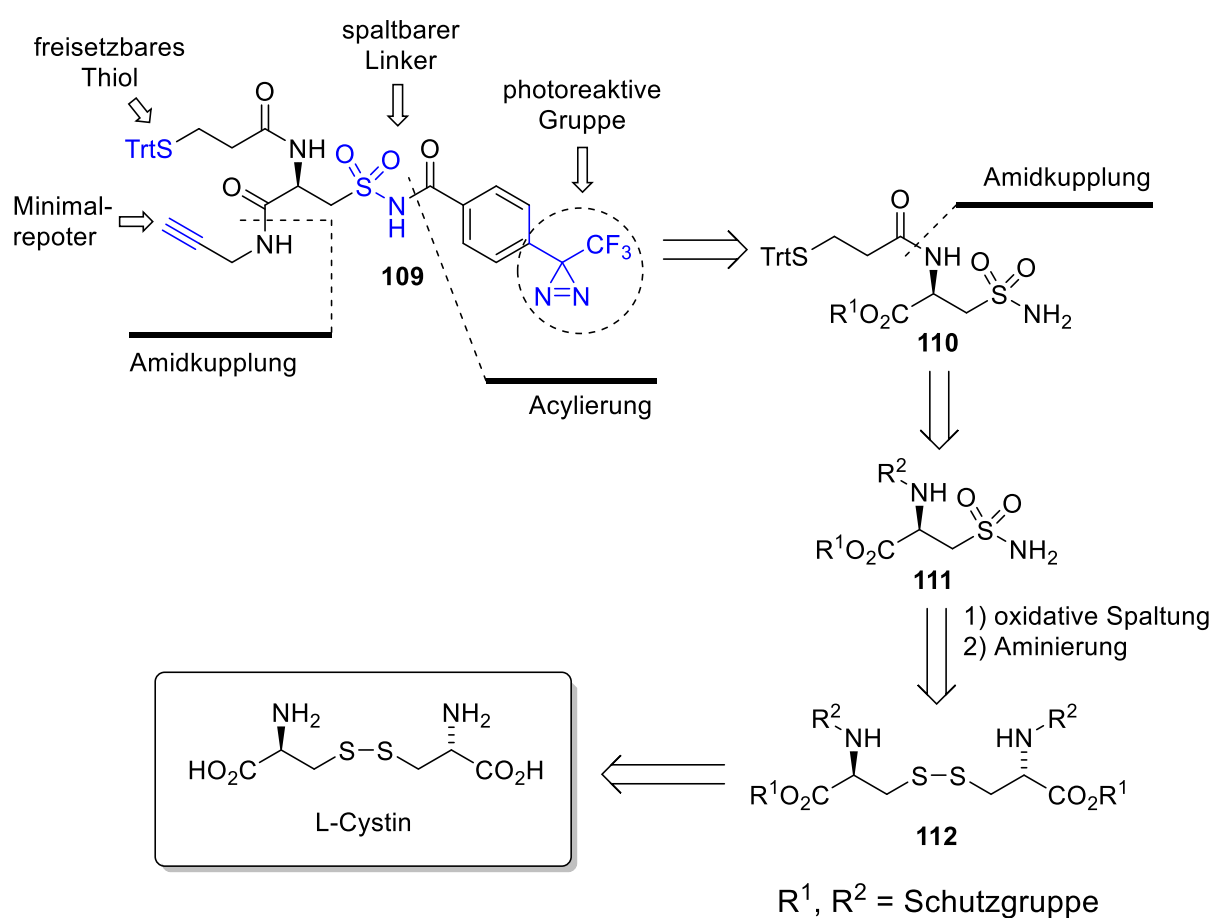
Daten der Gruppe Hatanaka<sup>[437]</sup> aufgreifend sollte zu diesen Zwecken eine *N*-Acylsulfonsäureamid-Verknüpfung untersucht werden. *N*-Acylsulfonsäureamide sind als Carbonsäure-Bioisotere bekannt und verfügen über einen dem Carboxylat-Anion ähnlichen p*K*<sub>s</sub>-Wert von 3–4. Demnach weisen sie unter physiologischen Bedingungen eine negative Ladung am Stickstoffatom auf, welche dazu genutzt werden könnte, diese Position selektiv zu alkylieren. Eine Behandlung der *N*-alkylierten Sonde unter leicht basischen Bedingungen sollte anschließend eine Hydrolyse des *N*-Alkyl-acylsulfonsäureamids (**107**) und somit eine selektive Spaltung zwischen Linker (**108**) und Photophor (**101**) ermöglichen (siehe **Schema 4-5**). Darüber hinaus sollte die Ionisierbarkeit dieser Funktionalität die Wasserlöslichkeit der Sonde und des Konjugats verbessern.



**Schema 4-5:** Spaltung von *N*-Alkylsulfonamiden unter physiologischen Bedingungen adaptiert nach Bongo *et al.*<sup>[437]</sup>

Klassisch werden Sulfonsäureamide aus einem Sulfonsäurechlorid und einem primären bzw. sekundären Amin dargestellt. Die Generierung des Sulfonsäurechlorids kann dabei prinzipiell durch Chlorsulfonierung eines Aromaten mit HSO<sub>3</sub>Cl,<sup>[438]</sup> Chlorierung einer Sulfonsäure mit SO<sub>2</sub>Cl<sup>[439]</sup> bzw. PCl<sub>5</sub>,<sup>[440]</sup> Umsetzung eines Diazoniumsalzes mit SO<sub>2</sub>,<sup>[441]</sup> Sulfochlorierung eines Alkans mit SO<sub>2</sub>/Cl<sub>2</sub> (Reed-Reaktion),<sup>[442]</sup> oder durch oxidative

Spaltung eines Disulfids mit  $\text{Cl}_2^{[443]}$  erfolgen. Letztere Methode wurde für die Synthese des spaltbaren Linkersystems **109** (Schema 4-6) gewählt, wobei die  $\alpha$ -Aminosäure *L*-Cystin als Ausgangsverbindung dienen sollte. Nach vollständiger Schützung des Disulfids sollte die Sulfonsäureamid-Funktionalität oxidativ installiert werden. Anschließend sollte die  $\alpha$ -Aminogruppe selektiv entschützt und mit *S*-Trityl-Mercaptopropionsäure – zur Einführung der Thiolfunktionalität – gekoppelt werden. Durch Verseifung des Carbonsäureesters mit nachfolgender Amidkupplung mit Propargylamin könnte im Weiteren das terminale Alkin installiert werden. Abschließend sollte die Verknüpfung mit dem Photophor **101** über eine Acylierung am Sulfonsäureamid-Rest erfolgen.



**Schema 4-6:** Retrosynthetische Überlegungen zur Synthese des spaltbaren *Warhead*-Reportertag-Konjugats **109**.

### 4.1.7 Linkerfreies Photoaffinitätslabel

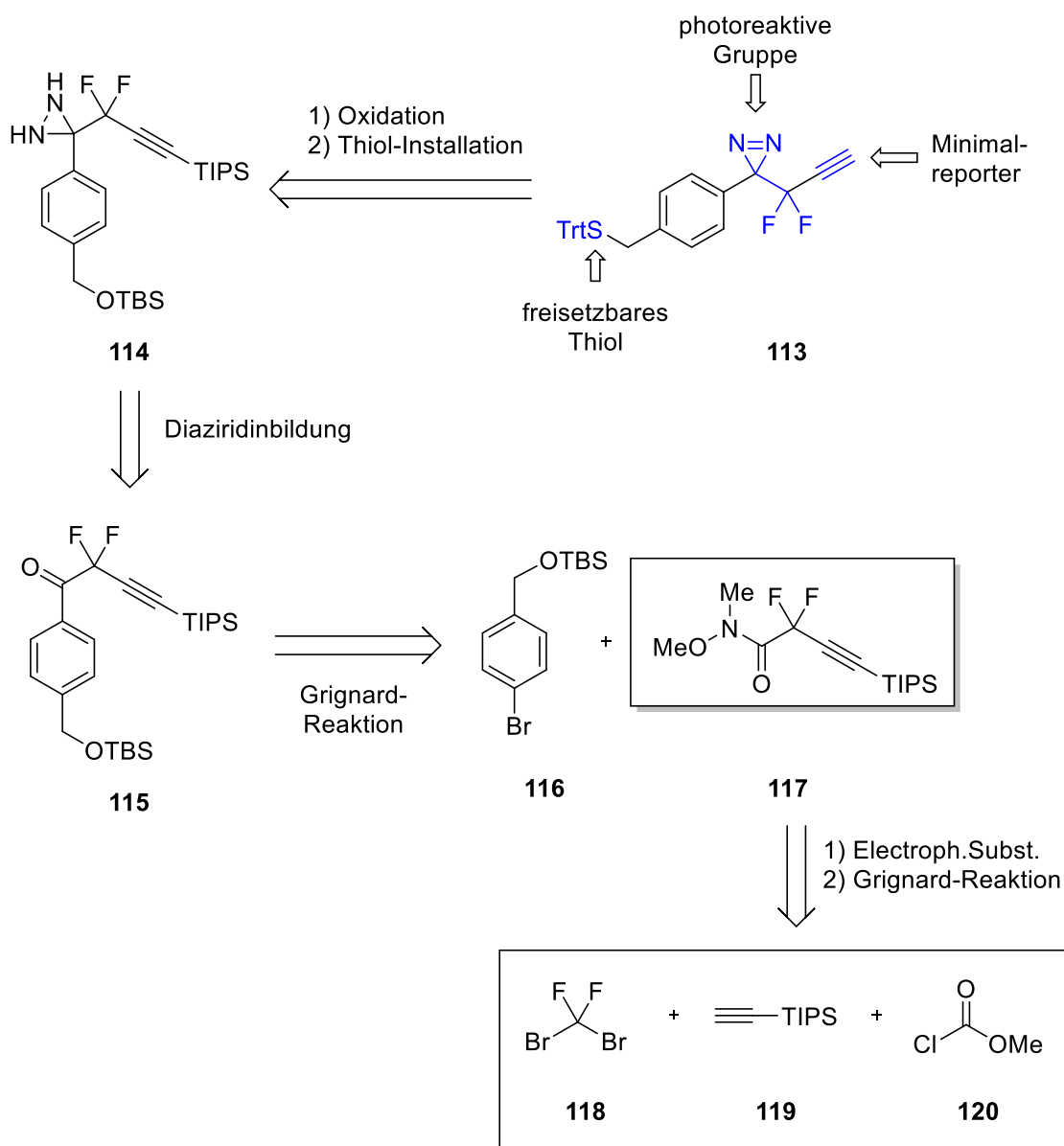
Für die Synthese eines linkerfreien Photoaffinitätslabels sollte ein 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirin-basiertes Photophor konzipiert werden, welches sich zur Funktionalisierung mit einem terminalen Alkin und einer Thiol-Gruppe eignet.

Letztere Funktionalität sollte dabei am Aryl-Grundgerüst installiert werden, wobei prinzipiell von einer Substitution in aromatischer Position abgesehen wurde, um die Darstellung eines Thiophenols zu vermeiden. Thiophenole sind gute Nukleophile und eignen sich allgemein hervorragend zur Addition an Michael-Akzeptoren.<sup>[444,445]</sup> Aufgrund ihres sauren Charakters ( $pK_s = 6.6$ <sup>[446]</sup>) sind sie allerdings gute Abgangsgruppen,<sup>[447]</sup> weshalb ein Thiophenol-basiertes Photoaffinitätslabel zu einer verminderten chemischen Stabilität der PAL-Sonde führen könnte. Des Weiteren könnte eine Substitution des Photophors in aromatischer Position zu einer Beeinträchtigung der photophysikalischen Eigenschaften des Gefechtskopfs führen. Auch wurde beim Design des linkerfreien Labels Wert darauf gelegt, die Thiol-Gruppe elektronisch von der Diazirin-Einheit zu entkoppeln. Demnach erschien eine Installation der Thiol-Funktion in benzylicher Position als besser geeignet. Zur Einführung des terminalen Alkins wurden zwei Strategien in Betracht gezogen. Zum einen könnte die Installation am Aryl-Grundgerüst erfolgen – beispielsweise über eine Sonogashira-Kupplung<sup>[448]</sup> – zum anderen über eine Funktionalisierung des Alkylrests in  $\alpha$ -Position zum Diazirin-Kohlenstoff. Für beide Ansätze konnten Literaturberichte<sup>[449,450]</sup> gefunden werden. Aufgrund der für die Installation der Thiol-Gruppe bereits genannten Gründe sollte jedoch der Minimalreporter von der Diazirin-Einheit elektronisch entkoppelt werden. Folglich wurde Letztere der beiden Strategien präferiert.

Aus diesen konzeptionellen Überlegungen ergab sich das in **Schema 4-7** dargestellte 3-*para*-Mercaptobenzyl-3-difluorpropargyldiazirin-Label **113**. Die Installation der Difluorpropargyl-Einheit am Aryl-Grundgerüst sollte dabei nach Literaturvorschrift<sup>[449]</sup> über fünf Schritte erfolgen, wobei ausgehend von mono-TIPS-Acetylen (**119**) mittels elektrophiler Substitution mit  $CF_2Br_2$  (**118**) zunächst 1,1,1-Difluorbrompropin generiert werden sollte. Über eine Grignard-Reaktion mit Chlorameisensäuremethylester (**120**) mit nachfolgender Lewis-sauren Aminolyse mit MeONHMe könnte anschließend Weinreb-Amid **117** hergestellt werden, welches mit dem Magnesiumorganyl aus *O*-TBS-geschütztem *p*-Brombenzylalkohol (**116**) zum funktionalisierten 2-Difluorpropargylacetophenon-



Grundgerüst (**115**) umgesetzt werden könnte. Die Darstellung von Diaziridin **114** sollte im Folgenden über drei Schritte (siehe 2.4.5.2) erfolgen. Nach Oxidation von **114** und Abspaltung der Silyl-Schutzgruppen könnte im letzten Schritt die Thiol-Funktionalität durch nukleophile Substitution der benzylichen Position installiert werden.



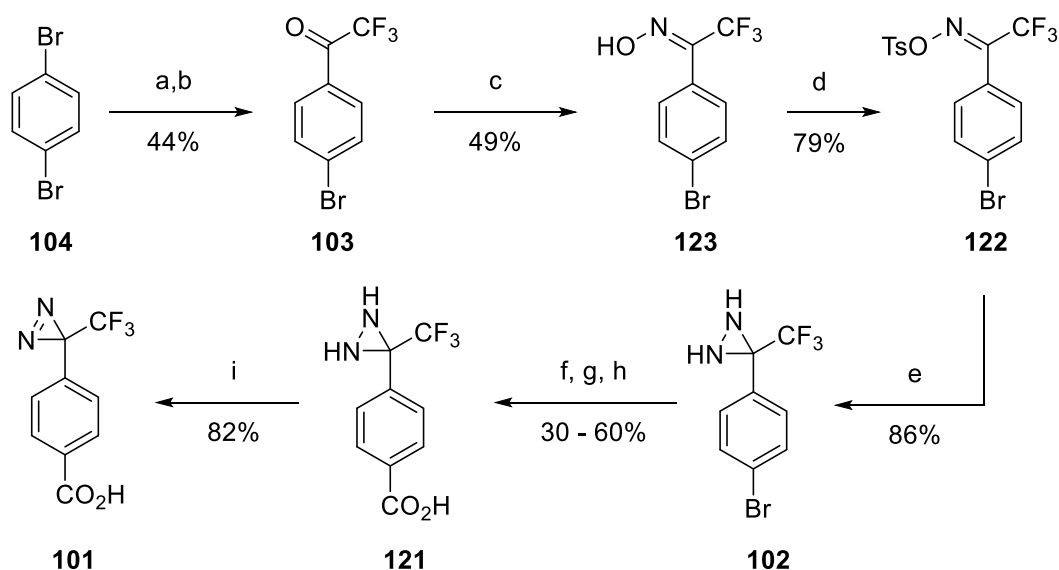
**Schema 4-7:** Retrosynthetische Überlegungen zur Darstellung des linkerfreien Photoaffinitätslabels **113**.

## 4.2 Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonden

### 4.2.1 Synthese des Carboxy-substituierten Photophors **101**

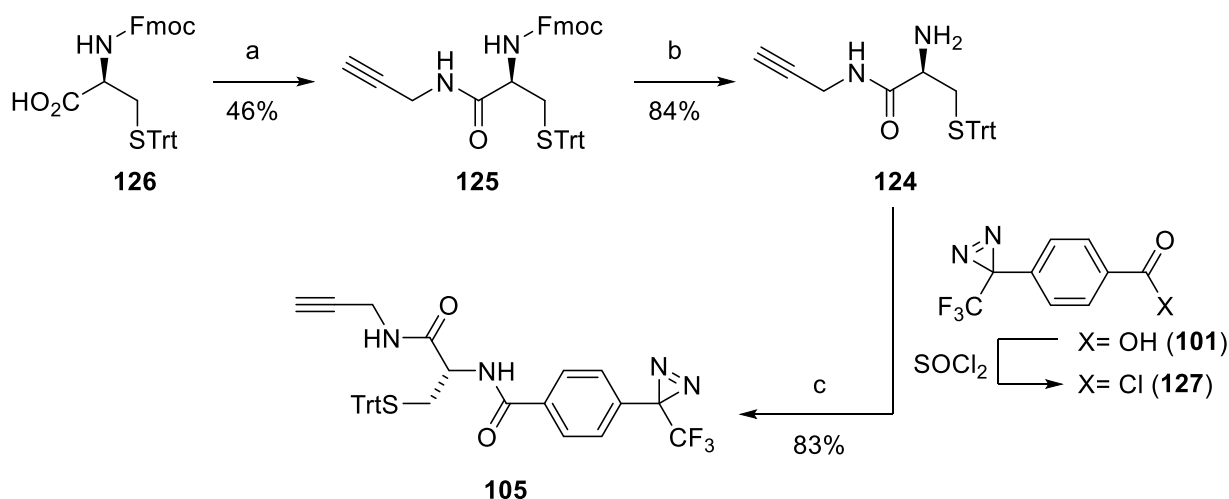
Gemäß der in **4.1.4** definierten Synthesestrategie wurde das *para*-carboxy-substituierte Photophor **101** nach Literaturvorschrift<sup>[436]</sup> hergestellt (**Schema 4-8**). Die Darstellung des 2-Trifluormethylacetophenon-Grundgerüsts **103** begann mit einer Grignard-Reaktion, wobei die Ausgangsverbindung 1,4-Dibrombenzol (**104**) mit Mg und I<sub>2</sub> in Et<sub>2</sub>O zum Magnesiumorganyl überführt und anschließend mit Trifluoressigsäureethylester versetzt wurde. Zur Vermeidung einer doppelten Metallierung des Dibromids wurde dabei nur 1 Äq. Mg eingesetzt, wodurch lediglich eine Ausbeute von 44% erzielt werden konnte. Die Installation der 1,2-Diazacyclopropen-Einheit (Diaziridin) erfolgte im Weiteren entsprechend dem in **2.4.5.2** beschriebenen Vorgehen, wobei Keton **103** mit NH<sub>2</sub>OH·HCl im Basischen zu Oxim **123** umgesetzt wurde, welches nach Sulfonierung mit TsCl und Einleitung von Ammoniak in das Diaziridin **102** überführt werden konnte. Die Ausbeute über drei Stufen betrug dabei 33%.

Die Einführung der Carboxyfunktion erfolgte durch Halogen-Metal-Austausch mit <sup>n</sup>BuLi, gefolgt von einer Umsetzung der Organolithiumverbindung mit CO<sub>2(g)</sub>. Hierzu wurde das Diaziridin **102** zuvor mit TMSOTf und NEt<sub>3</sub> zweifach *N*-geschützt. Die Abspaltung der TMS-Schutzgruppen erfolgte nach Umsetzung des Lithiumorganyls mit CO<sub>2(g)</sub> unter den Aufarbeitungsbedingungen, wodurch Carbonsäure **121** in 30 bis 60% Ausbeute erhalten werden konnte. Abschließend lieferte die Oxidation des Diaziridins **121** mit I<sub>2</sub> und NEt<sub>3</sub> die Zielverbindung **101** mit einer Ausbeute von 82%.



**Schema 4-8:** Synthese von 4-(3-(Trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure (**101**). Bedingungen: a) Mg, I<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O, RT, 3 h; b) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Et, Et<sub>2</sub>O, -78°C nach RT, 16 h, 44%; c) NH<sub>2</sub>OH·HCl, Py/EtOH (1:1), reflux, 2.5 h, 49%; d) TsCl, NEt<sub>3</sub>, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10°C nach RT, 3 h, 79%; e) NH<sub>3</sub>(l), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C, 4 h, dann -78°C nach RT, 16 h, 86%; f) TMSOTf, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78°C, 1 h, dann -78°C nach RT, 16 h; g) *n*BuLi, THF, -78°C, 1 h; h) CO<sub>2</sub>(g), -78°C, 16 h, 30-60%; i) I<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, MeOH, RT, 30 min, 82%.

#### 4.2.2 Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats **105**

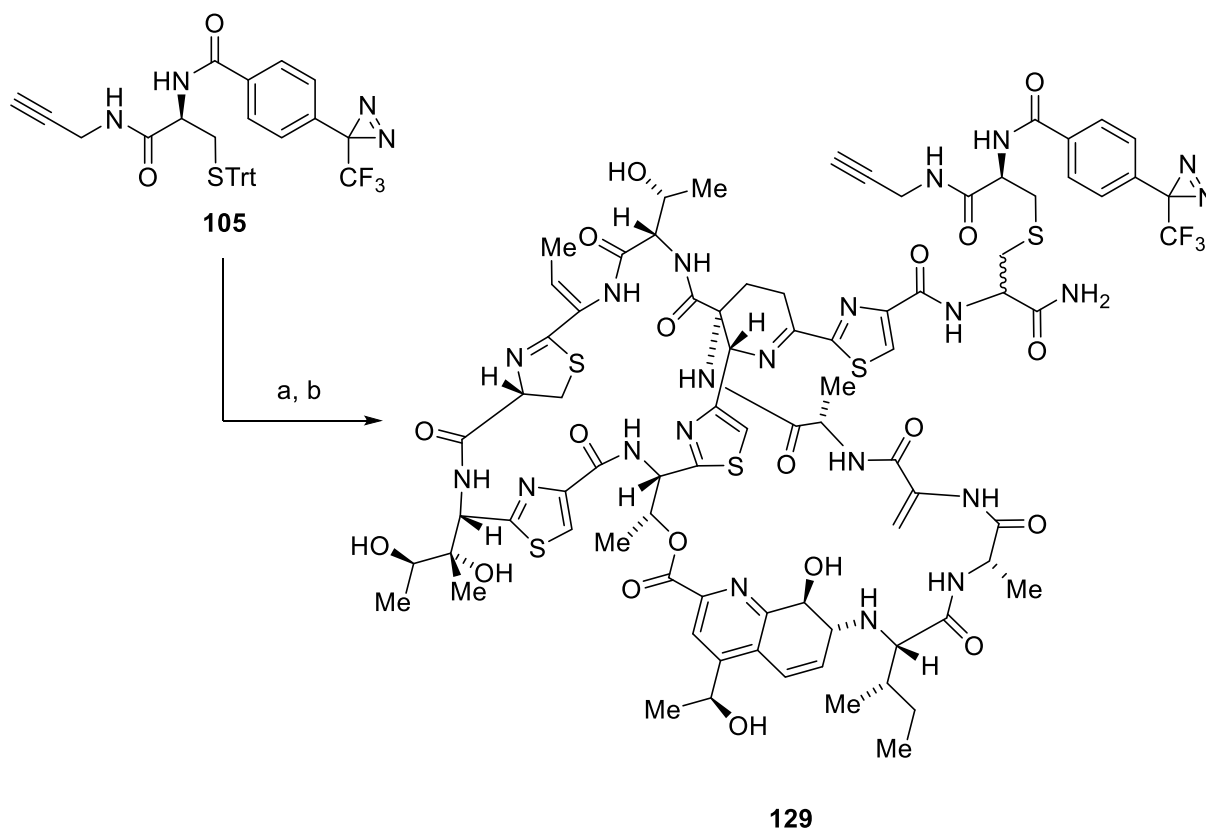


**Schema 4-9:** Synthese des Photophor-Reportertag-Konjugat **105**. Bedingungen: a) Propargylamin, EDC·HCl/HOBt, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1), 0°C nach RT, 16 h, 46%; b) Pip, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 1 h, 84%; c) **127**, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C nach RT, 22 h (Lichtausschluss), 83%.

Die Synthese des Warhead-Reportertag-Konjugats **105** ist in **Schema 4-9** dargestellt. Ausgehend von Fmoc-Cys(Trt)-OH (**126**) wurde Propargylamid **125** über eine EDC·HCl/HOBt vermittelte Amidkupplung in 48% Ausbeute erhalten. Nach Abspaltung

der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurden Amin **124** und Carbonsäurechlorid **127** – welches zuvor durch Reaktion des Photophors **101** mit  $\text{SOCl}_2$  synthetisiert wurde – zum vervollständigten Photoaffinitätslabel **105** mit einer Ausbeute von 69% (über drei Schritte) umgesetzt.

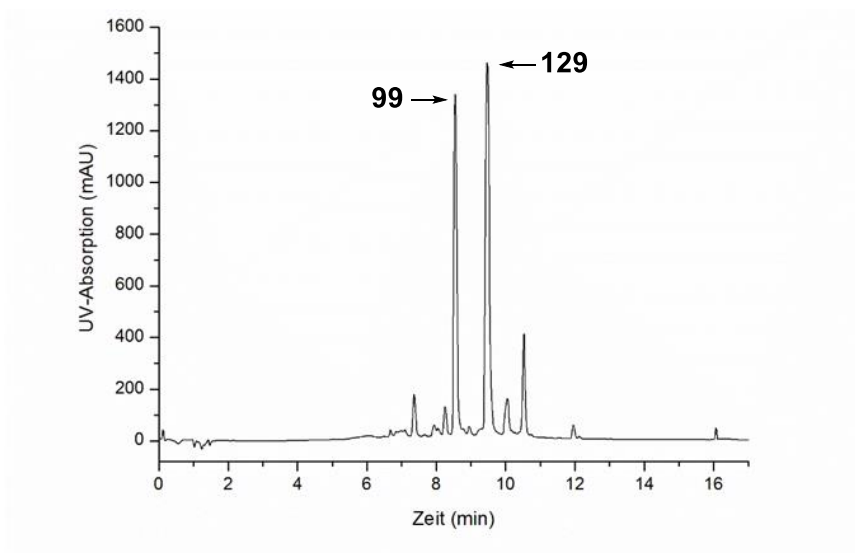
### 4.2.3 Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonde **129**



**Schema 4-10:** Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonde **129**. Bedingungen: a) TFA,  $\text{Et}_3\text{SiH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 30 min (Lichtausschluss); b) **99**, TFE/ $\text{H}_2\text{O}$  pH 9,  $\text{NEt}_3$ , RT, 22 h (Lichtausschluss), 32%.

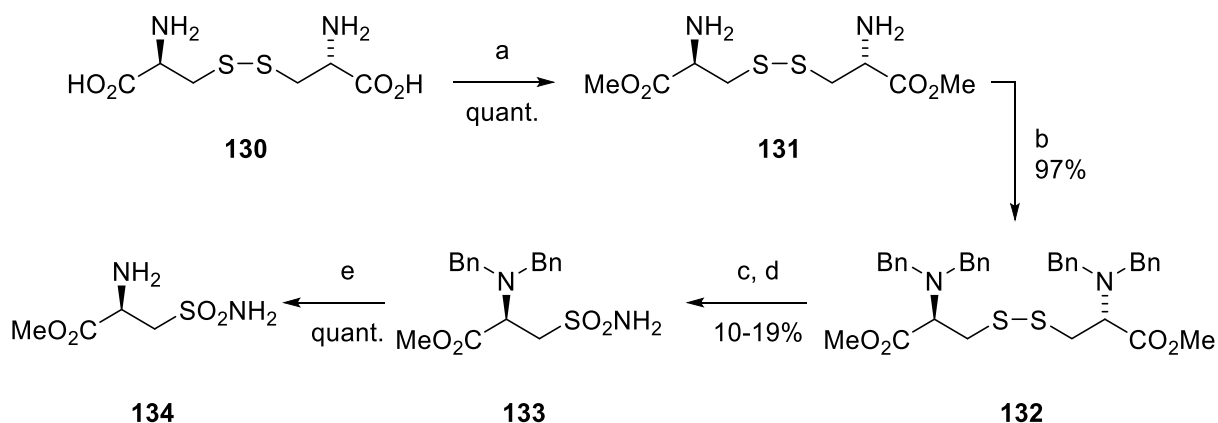
Die Michael-Addition des *Warhead*-Reportereinheit-Konjugats **105** am einfach verkürzten Thiostrepton **99** (**Schema 4-10**) gelang über eine Eintopfreaktion unter den Bedingungen von Schoof *et al.*,<sup>[96]</sup> wobei nach Tbt-Entschützung des Fragments **105** mit TFA und  $\text{Et}_3\text{SiH}$  als *Scavenger*, das Thiol **128** in einem Lösungsmittelgemisch aus TFE und Phosphatpuffer bei pH 9 mit dem Naturstoffderivat (**99**) – unter Lichtausschluss – umgesetzt wurde. Eine HPLC-Analyse der Reaktionsmischung ist in **Schema 4-11** dargestellt. Erwartungsgemäß wurde ohne Bildung nennenswerter Nebenprodukte das Monoadditionsprodukt **129** ( $t_{\text{R}} = 9.47$  min) erhalten, welches über präparative HPLC mit einer Ausbeute von 32% gereinigt

werden konnte. Nach Bestätigung der Summenformel durch MS-Analyse konnte die selektive Reaktionsführung der *Sulfa*-Michael-Addition an der Dh-Ala-Rest-Molekülseitenkette durch NMR-Spektroskopie anhand der Tieffeld-Verschiebung der  $\beta$ -Kohlenstoff-Protonensignale des Dh-Ala<sub>2</sub>-Rests nachgewiesen werden.



**Schema 4-11:** HPLC-Chromatogramm (C18 Isis, MeCN/H<sub>2</sub>O) der *Sulfa*-Michael Addition von Thiol **128** am einfach verkürzten Thiostrepton **99**. Das Signal mit einer Retentionszeit von 8,55 min (26,8% der Fläche) entspricht dem einfach verkürzten Naturstoff **99**; das Signal mit einer bei 9,47 min (39,2% der Fläche) korrespondiert mit der PAL-Sonde **129**.

## 4.2.4 Darstellung des Sulfonsäureamid-Linkersystems 134

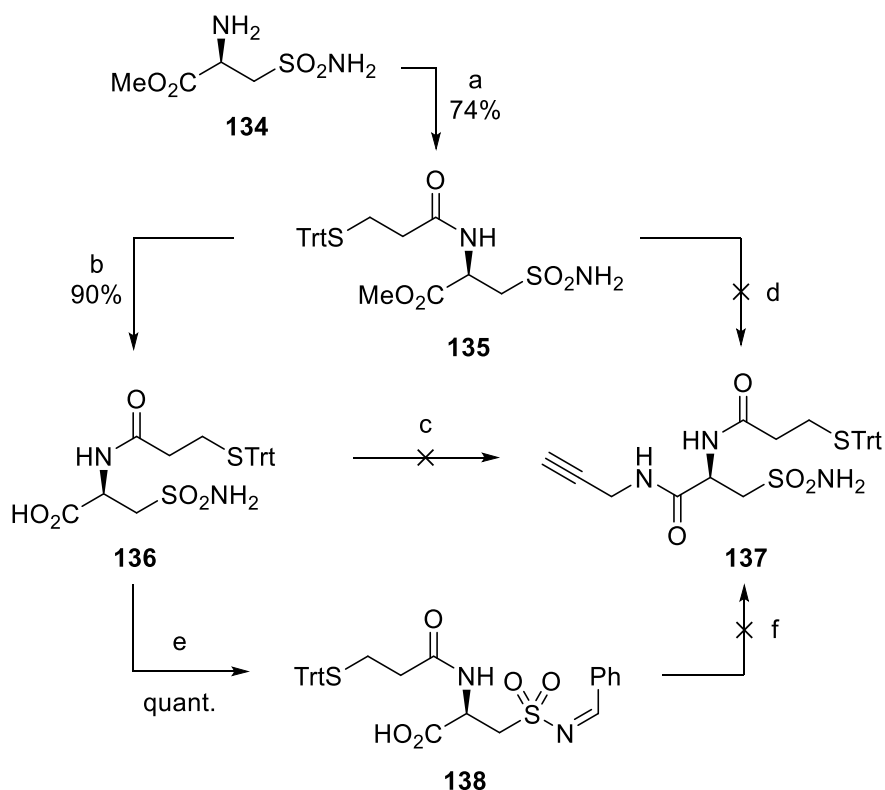


**Schema 4-12:** Synthese des Sulfonsäureamid-Methylesters **134**. Bedingungen: a)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH,  $0^\circ\text{C}$  nach RT, 30 min, dann reflux, 12 h, quant.; b) BnBr,  $\text{NaHCO}_3$ , TBAI, MeCN,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min, dann RT, 96 h, 97%; c) NCS, TBAC,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeCN,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min; d)  $\text{NH}_3(\text{g})$ , MeCN,  $0^\circ\text{C}$  nach RT, 3 h, 10-19%; e)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , MeOH, RT, 30 min bis 16 h, quant.

Die Installation der Sulfonsäureamid-Funktionalität sollte ausgehend von *L*-Cystin über eine oxidative Spaltung des Disulfids mit anschließender Aminierung der erzeugten Sulfonsäurechlorid-Spezies erfolgen (siehe 4.1.6.2). Hierfür wurde *L*-Cystin (**130**) zunächst mit  $\text{SOCl}_2$  und MeOH in quantitativer Ausbeute in den entsprechenden Dimethylester **131** überführt (**Schema 4-12**). Im nächsten Schritt sollten die Aminfunktionen mit einer zum Methylester orthogonalstehenden und oxidations- bzw. säureresistenten Gruppe geschützt werden. Zu diesem Zweck eignete sich die Benzyl-Schutzgruppe, welche unter optimierten Bedingungen ohne Bildung quaternärer Ammoniumsalze in 97% Ausbeute eingeführt werden konnte. Das erhaltene Tetrabenzyl-geschützte Disulfid **132** wurde im Folgenden über eine Eintopfreaktion nach der Methode von Hojat *et al.*<sup>[451]</sup> umgesetzt. Die Reaktion lieferte ein komplexes Produktgemisch, aus dem das Carboxy- und *N*-geschützte Sulfonsäureamid **133** unter Anfärben mit Ehrlichs Reagenz (DC Kontrolle) und mit lediglich einer Ausbeute von 10-19% isoliert werden konnte. Eine Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen erfolgte anschließend hydrogenolytisch in MeOH mit  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  als Katalysator, wobei Sulfonsäureamid-Methylester **134** in quantitativer Ausbeute dargestellt werden konnte.

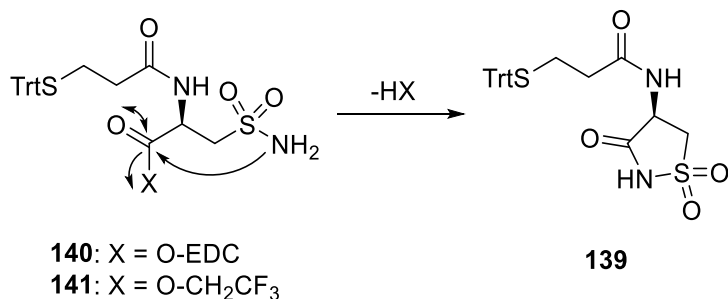
#### 4.2.5 Funktionalisierung des Linkersystems 134

Gemäß der in 4.1.6.2 genannten Synthesestrategie wurde die Thiolfunktionalität am Sulfonsäureamid-Linker **134** über eine EDC·HCl/HOBt vermittelte Verknüpfung mit *S*-Tributyl-Mercaptopropionsäure in 74% Ausbeute eingeführt (**Schema 4-13**). Das erhaltene Amid **135** wurde anschließend mit LiOH und H<sub>2</sub>O in THF mit 90 % Ausbeute in Carbonsäure **136** überführt. Im Folgenden sollte **136** über eine Carbodiimidkupplung mit Propargylamin zum Amid **137** umgesetzt werden. Letztere Transformation konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Auch konnte das gewünschte Produkt **137**, weder über eine direkte Umsetzung des Methylesters **135** mit Propargylamin und F<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>ONa,<sup>[452]</sup> noch durch vorherige Schützung von **136** zum Sulfonsäureimid, erhalten werden. Stattdessen wurde eine stark polare Verbindung (DC-Kontrolle) isoliert, bei welcher es sich – basierend auf einer <sup>1</sup>H-NMR-Strukturanalyse der gereinigten Substanz – wahrscheinlich um das zyklische Acylsulfonsäureamid **139** (**Schema 4-14**) handelt. Für die Bildung von **139** wird eine intramolekulare Cyclisierung des Sulfonsäureamids **136** bzw. **135** nach Aktivierung der Carboxygruppe mit EDC bzw. F<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>ONa vorgeschlagen.



**Schema 4-13:** Funktionalisierung des Sulfonsäureamid-Methylesters **134**. Bedingungen: a) TrtS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, EDC·HCl, HOBt, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (1:1), 0°C nach RT, 16 h, 74%; b)

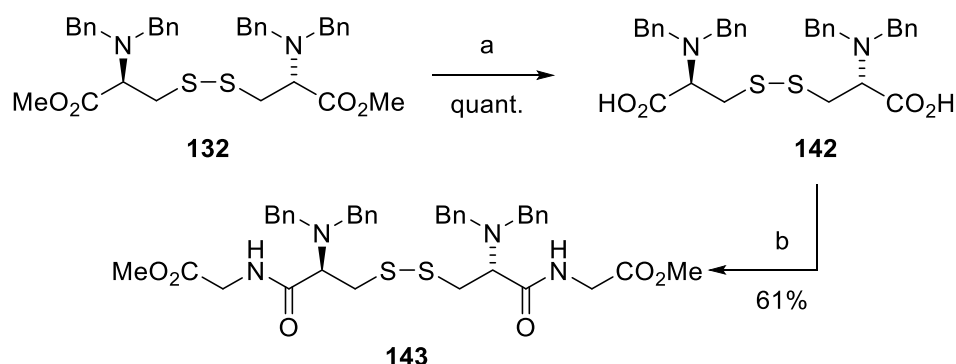
LiOH $\cdot$ 2H $_2$ O, THF/H $_2$ O (4:1), 0°C, 2h, 90%; c) Propargylamin, EDC-HCl, HOBt, NEt $_3$ , CH $_2$ Cl $_2$ /DMF (1:1), 0°C nach RT, 16 h; d) Propargylamin, F $_3$ CCH $_2$ ONa, H $_2$ O/CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH, RT, 22 h; e) PhCHO, RT, 12h, quant.; f) Propargylamin, EDC-HCl, HOBt, NEt $_3$ , CH $_2$ Cl $_2$ /DMF (1:1), 0°C nach RT, 16 h.



**Schema 4-14:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur Bildung des isolierten Produkts **139** durch 5-exo-trig-Cyclisierung von **136** bzw. **135** nach Aktivierung der Carboxyfunktion mit EDC oder F $_3$ CCH $_2$ ONa.

#### 4.2.6 Verlängerung des Sulfonsäureamid-Linkers

Zur Umgehung der zuvor erläuterten Problematik wurde ein alternatives Linkersystem konzipiert, welches durch stärkere räumliche Trennung zwischen der Sulfonsäureamid-Funktionalität und dem Carbonsäurerest die sehr schnelle intramolekulare Cyclisierung von **136** unterbinden sollte. Hierzu wurde ausgehend von Disulfid **132** Dicarbonsäure **142** erzeugt (99% Ausbeute), welche über eine anschließende Amidkupplung mit zwei Äq. Glycinmethylester in das Tetrabenzyl-geschützte Disulfid **143** mit einer Ausbeute von 61% überführt werden konnte (**Schema 4-15**).

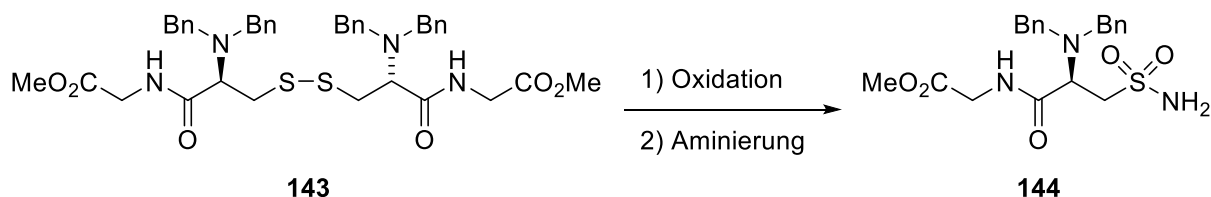


**Schema 4-15:** Synthese des Tetrabenzyl-geschützten Dialanyl-*L*-cystindimethylesters **143**. Bedingungen: a) LiOH $\cdot$ 2H $_2$ O, THF/H $_2$ O (4:1), 30°C, 12 h, quant.; b) H $_2$ NCHCO $_2$ CH $_3$ , EDC-HCl/HOBt, NEt $_3$ , CH $_2$ Cl $_2$ /DMF (1:1), 0°C nach RT, 22 h, 61%.



Im Weiteren sollte die Umsetzung von **143** zum entsprechenden Sulfonsäureamid optimiert werden. Hierfür wurden unterschiedliche Oxidationssysteme<sup>[453-455]</sup> – zur Generierung der Sulfonsäurechlorid-Spezies – mit  $\text{NH}_3$ ,  $\text{BnNH}_2$  oder  $\text{Bn}_2\text{NH}$  als Aminierungsreagenz kombiniert. Eine Übersicht der getesteten Bedingungen mit entsprechenden Ausbeuten ist in **Tabelle 4-1** dargestellt.

**Tabelle 4-1:** Optimierung der Sulfonsäureamid-Darstellung.

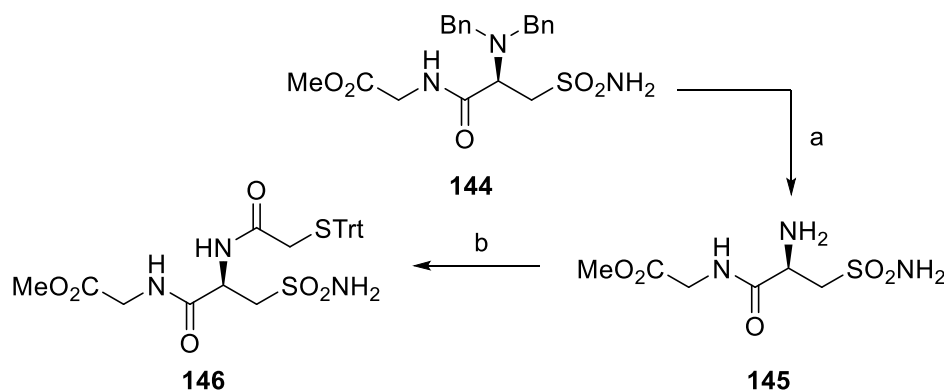


Eintrag	R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>	Oxidationsschritt (Äq.)	Aminierungsschritt (Äq.)	Beobachtungen
1	Bn, Bn	NCS (5), TBAC (6.6), H <sub>2</sub> O (5), MeCN, 0°C, 10 min	NH <sub>3</sub> (g), MeCN, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: 10-19%
2	Bn, Bn	<sup>t</sup> BuOCl (5), H <sub>2</sub> O (5), MeCN, 0°C, 30 min	NH <sub>3</sub> (g), MeCN, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: n. b. (Zersetzung)
3	Bn, Bn	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6), SOCl <sub>2</sub> (2), H <sub>2</sub> O (5), MeCN RT, 30 min	NH <sub>3</sub> (g), MeCN, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: n. b. (Zersetzung)
4	Bn, Bn	TMSCl (5), KNO <sub>3</sub> (5), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 50°C, 30 min	NH <sub>3</sub> (g), MeCN, RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: n. b. (Zersetzung)
5	Bn, Bn	NCS (5), TBAC (6.6), H <sub>2</sub> O (5), MeCN 0°C, 30 min	Bn <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> (20), DMAP (2), MeCN, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: n. b. (Zersetzung)
6	Bn, Bn	NCS (6), TBAC (6), H <sub>2</sub> O (5), MeCN, 0°C, 5 min	BnNH <sub>2</sub> (20), DMAP (2), MeCN, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: 49%
7	Bn, Bn	NCS (15), TBAC (18), PhMe/H <sub>2</sub> O (1:1) 0°C, 10 min	NH <sub>3</sub> (g), PhMe, 0°C nach RT, 2 h	· Umsetzung: 100% · Ausbeute: 24-37%

Die besten Ausbeuten lieferten Ansätze mit NCS/TBAC/H<sub>2</sub>O als Oxidationsmittel und BnNH<sub>2</sub> als Aminierungsreagenz (49% Ausbeute). Allerdings konnte das erhaltene Benzylsulfonsäureamid mittels anschließender katalytischer Hydrierung nicht zum gewünschten Produkt **144** überführt werden, wodurch Ammoniak als Aminierungsreagenz bevorzugt wurde. Eine Verbesserung der Ausbeuten konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn der

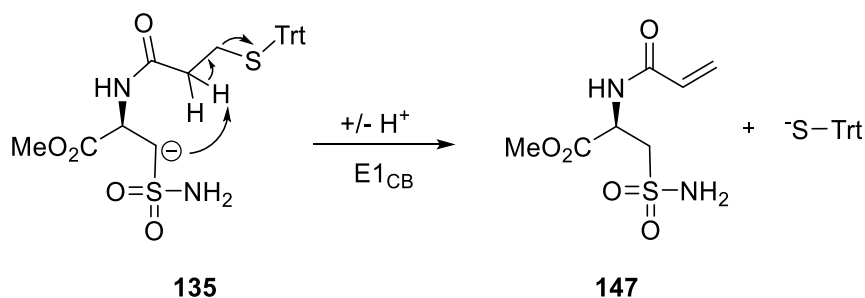
Oxidationsschritt in einem Zweiphasengemisch aus Toluol und H<sub>2</sub>O (1:1) durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnte ein erheblicher Teil der unerwünschten Oxidationsnebenprodukte wässrig extrahiert werden, sodass geringere Ausbeutenverluste durch anschließende Reinigungsschritte zu verzeichnen waren. Unter diesen Bedingungen konnte Sulfonsäureamid **144** mit bis zu 37% Ausbeute hergestellt werden, gegen lediglich 19% unter den in **4.2.4** eingesetzten Bedingungen.

#### 4.2.7 Funktionalisierung des verlängerten Sulfonsäureamid-Linkers **144**



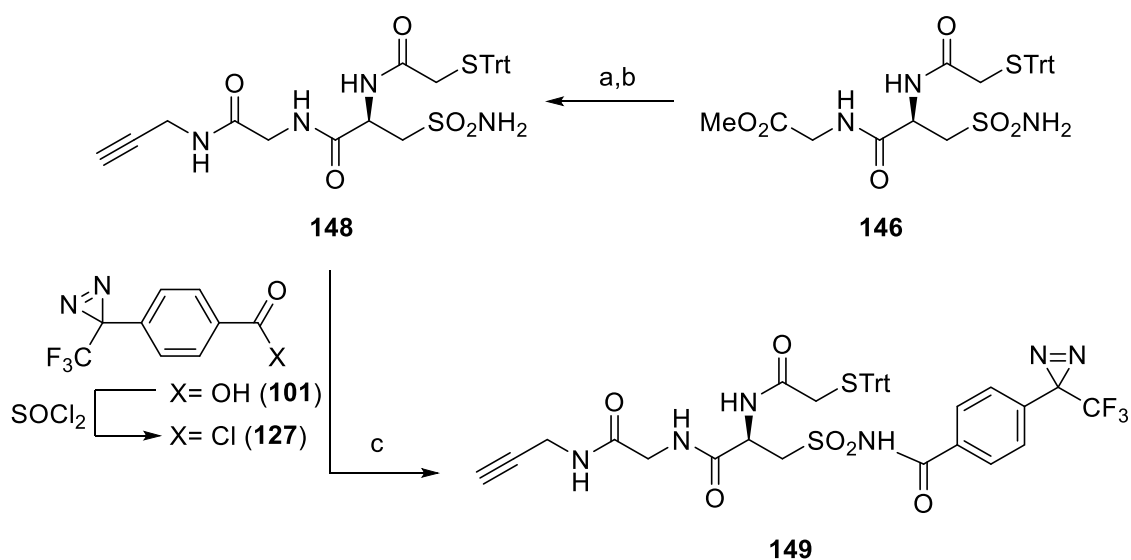
**Schema 4-16:** Einführung der Thiolfunktionalität am Sulfonsäureamid-Linkersystems **144**. Bedingungen: a) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH, RT, 30 min bis 16 h; b) TrtSCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, EDC·HCl/HOBt, NEt<sub>3</sub>, 0°C nach RT, 16 h, 65%.

Das Tetrabenzyl-geschütztes Disulfid **143** wurde unter optimierten Bedingungen zum entsprechenden Sulfonsäureamid **144** in 24-37% Ausbeute umgesetzt. Nach Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen durch katalytische Hydrierung mit H<sub>2</sub> und Pd(OH)<sub>2</sub>/C wurde das erhaltene Amin **145** mit – anstelle von *S*-Trityl-mercaptopropionsäure – *S*-Trityl-mercaptoessigsäure über eine EDC·HCl und HOBt vermittelte Kupplung mit 65% Ausbeute in Amid **146** überführt (**Schema 4-16**). Die abweichende Strategie zur Einführung der Thiolfunktionalität (siehe **4.1.6.2**) ergab sich aus der Beobachtung, dass für Amid **135** eine Labilität der *S*-Trt-mercaptopropyl-Einheit im Basischen gefunden wurde. Als Erklärung dafür wurde eine Eliminierung der *S*-Trt-Einheit als Abgangsgruppe postuliert, wodurch das reaktive Michael-Akzeptor-Nebenprodukt **147** erhalten wird (**Schema 4-13**).



**Schema 4-17:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur Bildung des Michael-Akzeptor-Nebenprodukts **147**.

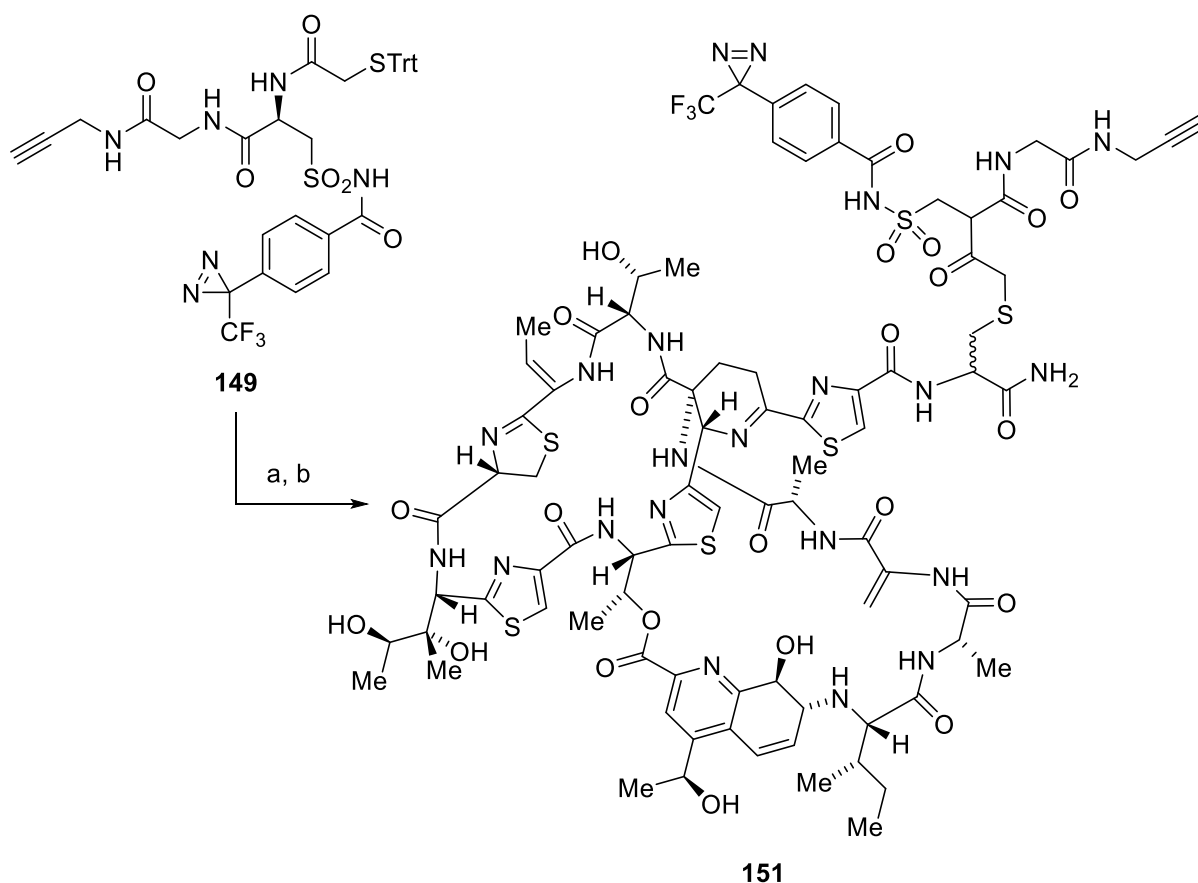
Nach Einbringung der Thiolfunktion wurde der Sulfonsäureamid-Linker **146** mit LiOH in THF/H<sub>2</sub>O verseift und über eine EDC-HCl/HOBt-vermittelte Amidkupplung mit Propargylamin in Alkin **148** überführt. Die Ausbeute über zwei Stufen betrug 58%. Die Installation des Photophors **101** an der Sulfonsäureamid-Einheit erfolgte im Anschluss durch Umsetzung von **148** mit Carbonsäurechlorid **127** und DMAP, wodurch das vollständige Photophor-Reportereinheit-Konjugat **149** in 53% Ausbeute dargestellt werden konnte.



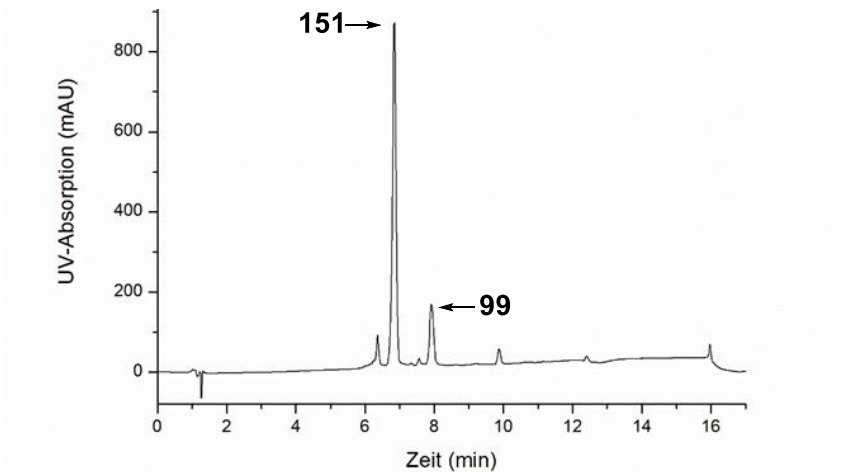
**Schema 4-18:** Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats **149**. Bedingungen: a) LiOH-H<sub>2</sub>O, THF/H<sub>2</sub>O (4:1), 0°C, 2h; b) Propargylamin, EDC-HCl/HOBt, NEt<sub>3</sub>, 0°C nach RT, 16 h, 58%; c) **127**, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C nach RT, 22 h (Lichtausschluss), 53%.

## 4.2.8 Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonde 151

Die Michael-Addition des Photophor-Reportertag-Konjugats **149** am einfach verkürzten Thiostrepton **99** (Schema 4-19) erfolgte nach *in situ* Entschützung der *S*-Trt-Gruppe mit TFA und Et<sub>3</sub>SiH unter den in 4.2.3 beschriebenen Bedingungen. Ähnlich der Implementierung von **99** mit Thiol **128** (siehe Schema 4-10) konnte die Bildung des Monoadditionsprodukts **151** ohne Entstehung von isomeren Nebenprodukten mittels HPLC-Analyse (Schema 4-20) verfolgt werden. Durch präparative HPLC wurde Thiostrepton-PAL-Sonde **151** mit einer Ausbeute von 43% isoliert. Nach Bestätigung der Summenformel durch MS-Analyse konnte die selektive Reaktionsführung der *Sulfa*-Michael-Addition durch <sup>1</sup>H-NMR anhand der Tieffeld-Verschiebung der  $\beta$ -Kohlenstoff-Protonensignale des Dh-Ala2-Rests nachgewiesen werden.



**Schema 4-19:** Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonde **151**. Bedingungen: a) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 30 min (Lichtausschluss); b) **99**, TFE/H<sub>2</sub>O pH 9, NEt<sub>3</sub>, RT, 22 h (Lichtausschluss), 43%.



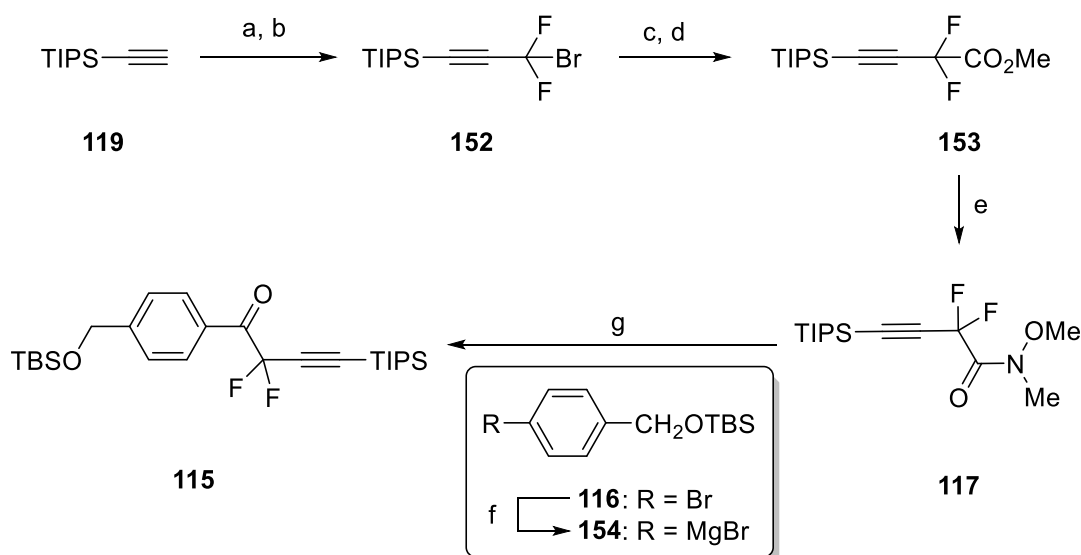
**Schema 4-20:** HPLC-Chromatogramm (C18 *Isis*, MeCN/H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA) der *Sulfa*-Michael Addition von Thiol **150** am einfach verkürzten Thiostrepton **99**. Das Signal mit einer Retentionszeit von 6.85 min (63% der Fläche) entspricht der PAL-Sonde **151**; das Signal mit einer bei 7.92 min (13% der Fläche) korrespondiert mit dem einfach verkürzten Naturstoff **99**.

## 4.2.9 Synthese des linkerfreien Photoaffinitätslabels

### 4.2.9.1 Aufbau des Difluorpropargylacetophenon-Grundgerüsts

Gemäß der in 4.1.7 definierten Synthesestrategie sollte zur Darstellung des Difluorpropargylacetophenon-Grundgerüsts **115** zunächst Weinreb-Amid **117** erzeugt werden (Schema 4-21). Hierzu wurde mono-TIPS-Acetylen (**119**) nach Deprotonierung mit  $n$ BuLi und anschließender Umsetzung mit  $\text{CF}_2\text{Br}_2$  in das Propargylbromid **152** mit 88% Ausbeute überführt. Über eine Grignard-Reaktion mit Chlorameisensäuremethylester konnte der Ester **153** in 94% Ausbeute (basierend auf zurückgewonnenem Ausgangsmaterial) erhalten werden. Die Umsetzung zum entsprechenden Weinreb-Amid **117** erfolgte unter Lewis-sauren Bedingungen mit  $\text{AlMe}_3$  und  $\text{MeONHMe}\cdot\text{HCl}$ , wobei Produkt **117** in 84% Ausbeute erhalten wurde.

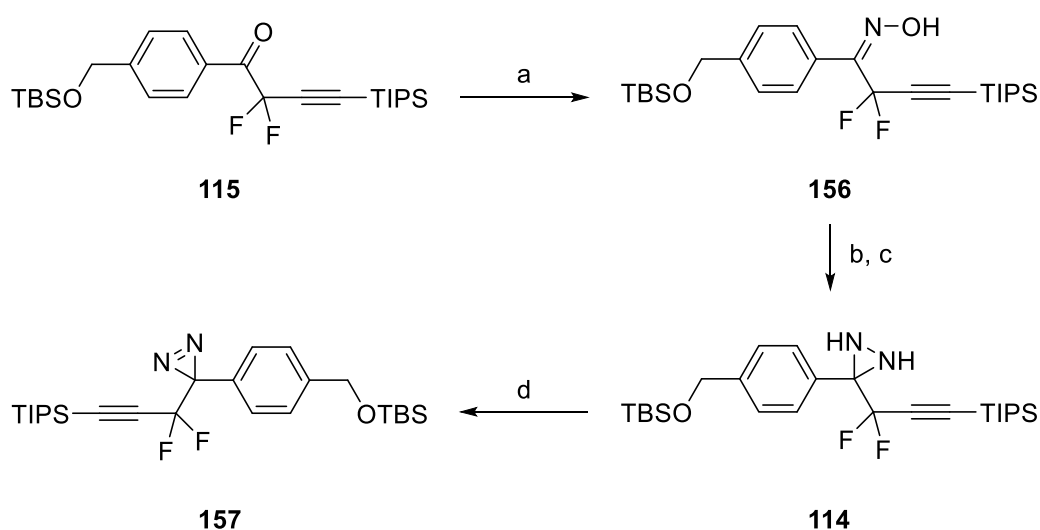
Parallel wurde der *O*-TBS-geschützte *p*-Brombenzylalkohol **116** aus dem ungeschützten Vorläufer **155** in 94% Ausbeute hergestellt. Durch anschließende Behandlung mit Mg und  $\text{I}_2$  in THF wurde **116** in das entsprechende Magnesiumorganyl (**154**) überführt im Folgenden mit **117** zum Keton **115** in 91% Ausbeute umgesetzt.



**Schema 4-21:** Synthese des Difluorpropargylacetophenon-Grundgerüsts **115**. Bedingungen: a)  $n$ BuLi, THF,  $-78^\circ\text{C}$ , 30 min; b)  $\text{CF}_2\text{Br}_2$ , THF,  $-100^\circ\text{C}$  nach RT, 16 h, 88%; c) Mg,  $\text{I}_2$ , THF, RT, 30 min; d)  $\text{ClCO}_2\text{Me}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , 5 h, 94% (b. r. s. m.); e)  $\text{MeHNOMe}$ ,  $\text{AlMe}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1.5 h, 84%; f) Mg,  $\text{I}_2$ , THF, RT, 16 h; g) **154**, THF,  $0^\circ\text{C}$ , 3 h, 91%.

### 4.2.9.2 Installation der Diazirin-Einheit

Ausgehend von Keton **115** wurde die Diazirin-Einheit über vier Schritte entsprechend dem in 4.2 beschriebenen Vorgehen eingebracht. Die Umsetzung von Keton **115** mit  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  in einem Lösungsmittelgemisch aus EtOH und Pyridin (1:1) lieferte im ersten Schritt das Oxim **156**, welches nach Sulfonierung mit TsCl und nachfolgender Behandlung mit Ammoniak in das Diaziridin **114** überführt wurde. Durch anschließende Oxidation von **114** mit  $\text{I}_2$  und  $\text{NEt}_3$  wurde das Diazirin **157** hergestellt, wobei die Ausbeute über vier Stufen 34% betrug.



**Schema 4-22:** Synthese des geschützten Diazirins **157**. Bedingungen: a)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , Py/EtOH (1:1), Reflux, 3 h, 73%; b) TsCl,  $\text{NEt}_3$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C}$  nach RT, 3h; c)  $\text{NH}_3(\text{g})$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$ , 4 h, dann  $-78^\circ\text{C}$  nach RT, 16 h, 53% (über 2 Schritte); d)  $\text{I}_2$ ,  $\text{NEt}_3$ , MeOH, RT, 1 h, 89%.

### 4.2.9.3 Optimierung der Thiol-Installation in benzylicher Position

Gemäß der in 4.1.7 aufgestellten retrosynthetischen Analyse zur Darstellung des vervollständigten linkerfreien Labels sollte Diazirin **157**, nach Abspaltung der Silylschutzgruppen, in das entsprechende Trityl-geschützte Thiol **113** überführt werden.

Zur Optimierung letzterer Umsetzung wurde *p*-Brombenzylalkohol (**116**) als Testsubstrat zum entsprechenden Benzylmercaptan umgesetzt. Für die Einführung der Thiol-Funktionalität wurden dabei Tritylmercaptan, Kaliumthioacetat und Thioharnstoff

eingesetzt. Die Aktivierung des Alkohols erfolgte vorherig durch Umsetzung zum entsprechenden Bromid über eine Appel-Reaktion,<sup>[456]</sup> Chlorierung mittels  $\text{SOCl}_2$  bzw. Oxalylchlorid, oder Sulfonierung mit  $\text{TsCl}$ . Eine Übersicht der getesteten Bedingungen mit entsprechenden Produktausbeuten ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 4-2:** Optimierung der Installation der Thiol-Funktionalität in benzylicher Position.

**155**                      **158:** R = Br  
**159:** R = Cl  
**160:** R = OTs

**161:** R = Trt  
**162:** R = Ac  
**163:** R = C(NH)NH<sub>2</sub>

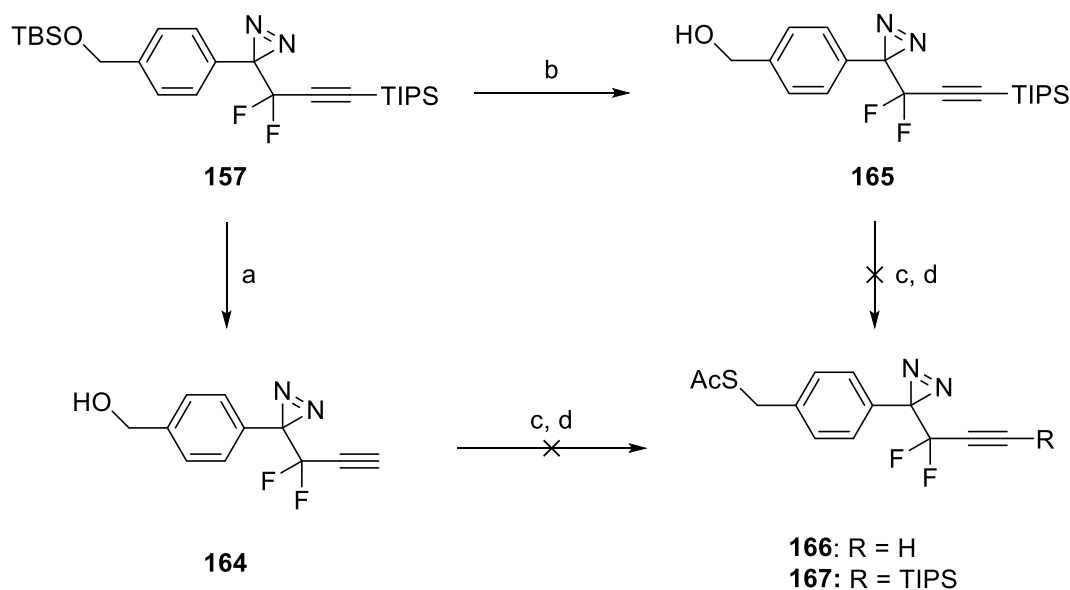
Eintrag	Aktivierungsschritt (Äq.)	Thiol-Installation (Äq.)	Beobachtungen
<b>1</b> <sup>[457]</sup>	$\text{CBr}_4$ (1.1), $\text{PPh}_3$ (1.05), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C, 1 h	TrtSH (1.5), LiOH (1.5), EtOH/H <sub>2</sub> O/THF/Et <sub>2</sub> O, (6:2:2:1), RT, 2 h	· Umsetzung: 57% · Ausbeute: 0% ( <b>161</b> )
<b>2</b>	$\text{SOCl}_2$ (1.5), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 16 h	KSAc (1.1), DMF, RT, 1 h	· Umsetzung: 89% · Ausbeute: 55% ( <b>162</b> )
<b>3</b>	$\text{Cl}(\text{CO})_2\text{Cl}$ (1.5), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -78°C, 2 h	KSAc (1.1), DMF, RT, 1 h	· Umsetzung: 60% · Ausbeute: 37% ( <b>162</b> )
<b>4</b>	$\text{TsCl}$ (2.5), $\text{NEt}_3$ (3.75), DMAP (0.45), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -10°C nach RT, 7 h	KSAc (1.1), DMF, RT, 1 h	· Umsetzung: quant. · Ausbeute: 93% ( <b>162</b> )
<b>5</b>	$\text{TsCl}$ (2.5), $\text{NEt}_3$ (3.75), DMAP (0.45), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -10°C nach RT, 7 h	Thioharnstoff (1.1), $\text{NEt}_3$ (1.8), DMF, RT, 1 h	· Umsetzung: quant · Ausbeute: 41% ( <b>163</b> )
<b>6</b>	$\text{TsCl}$ (2.5), $\text{NEt}_3$ (3.75), DMAP (0.45), $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -10°C nach RT, 7 h	TrtSH (1.5), LiOH (1.5), EtOH/H <sub>2</sub> O/THF/Et <sub>2</sub> O (6:2:2:1), RT, 2 h	· Umsetzung: quant. · Ausbeute: 0% ( <b>161</b> )

Unter keiner der getesteten Bedingungen führte der Einsatz von TrtSH (Einträge **1** und **6**) zum Erhalt des Benzylmercaptans **161**. Ansätze mit  $\text{H}_2\text{NC}(\text{NH}_2)\text{S}$  oder KSAc (Einträge **2**, **3**, **4** und **5**) lieferten dagegen die gewünschten Produkte **163** und **162**, wobei letzteres in deutlich höheren Ausbeuten dargestellt wurde. Auch konnte Thioester **162** in nahezu quantitativer Ausbeute (93%) hergestellt werden, wenn Benzylalkohol **155** vorherig zum Sulfonsäureester **160** aktiviert wurde (Eintrag **4**). Die anschließende Umsetzung von **162** zum entsprechenden Thiol erfolgte ohne weiteres durch Verseifung in  $\text{MeOH}$ <sup>[458]</sup> oder katalytische Deacylierung mit TBACN.<sup>[459]</sup> Folglich sollten sich die unter Eintrag **4**



beschriebenen Bedingungen gut für die Einführung der Thiolgruppe in Diazirin **157** eignen. Dazu wurde zunächst die *O*-TBS Schutzgruppe am Diazirin **157** entfernt. Diesbezüglich wurden zwei Ansätze verfolgt (**Schema 4-23**), wobei mit TBAF und AcOH in THF entweder das vollständig entschützte Diazirin **164** (96%), oder mit H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub> in wässriger MeCN-Lösung der selektiv entschützte Alkohol **165** (quant.) dargestellt wurden.

Eine anschließende Umsetzung von **164** und **165** unter den in 4.2.9.3 optimierten Bedingungen führte nicht zum gewünschten Thioester **166** bzw. **167**. Stattdessen wurde in beiden Fällen ein komplexes Produktgemisch erhalten, welches auf eine Zersetzung von **164** und **165** hindeutete. Auch wurden letztere Verbindungen einem Stabilitätstest mit KSAC – ohne vorherige Aktivierung des Alkohols – unterzogen, wobei die oben genannten Beobachtungen bestätigt werden konnten. Folglich wurde eine Labilität der Difluorpropargyl-Einheit unter nukleophilen bzw. reduktiven Bedingungen angenommen, weshalb eine neue Synthesestrategie aufgestellt wurde. Bei dieser sollte – ausgehend von Diazirin **164** – das Alkin vor Installation des Schwefelatoms funktionalisiert werden.

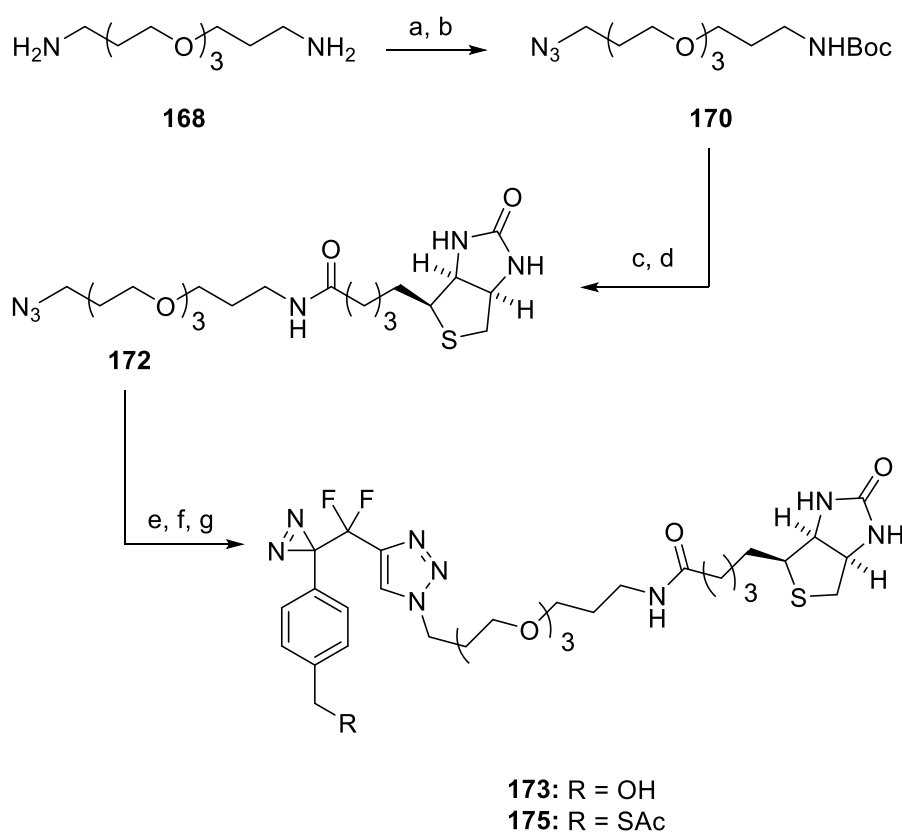


**Schema 4-23:** Versuchte Synthese der Thioester **166** und **167**. Bedingungen: a) TBAF, AcOH, THF, RT, 3 h, 96%; b) H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>, H<sub>2</sub>O, MeCN, 0°C, 40 min, 99%; c) TsCl, NEt<sub>3</sub>, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10°C nach RT, 7 h; d) KSAC, DMF, RT, 1 h, 88% (über 2 Schritte).

#### 4.2.9.4 Synthese des vervollständigten linkerfreien Photoaffinitätslabels 175

Zur Funktionalisierung des Minimalreporters über CuAAC wurde zunächst das Biotin-PEG-Azid **172** hergestellt (Schema 4-24). Die Synthese erfolgte ausgehend von Trioxadecandiamin (**168**) in drei Schritten, wobei nach mono-Boc-Schützung von **168** und Azid-Transfer nach den Bedingungen von Loos *et al.*,<sup>[460]</sup> Azid **170** (91% Ausbeute) hergestellt wurde. Eine Umsetzung von **170** mit Biotin-4-nitrophenylester,  $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$  und HOBT in DMF lieferte anschließend das gewünschte Amid **172** (35% Ausbeute).

Die Funktionalisierung von Diazirin **164** mit dem erhaltenen Biotin-PEG-Azid **172** erfolgte dann mittels CuI und  $\text{NEt}_3$  in THF, wobei Konjugat **173** in 93% Ausbeute erhalten wurde. Abschließend wurde **173** unter den in 4.2.9.3 optimierten Bedingungen umgesetzt und lieferte so das vervollständigte Photoaffinitätslabel **175** mit einer Ausbeute von 88%. Somit konnte die oben formulierte Annahme, nach welcher die Difluorpropargyl-Einheit unter nukleophilen Bedingungen labil ist, bestätigt werden.

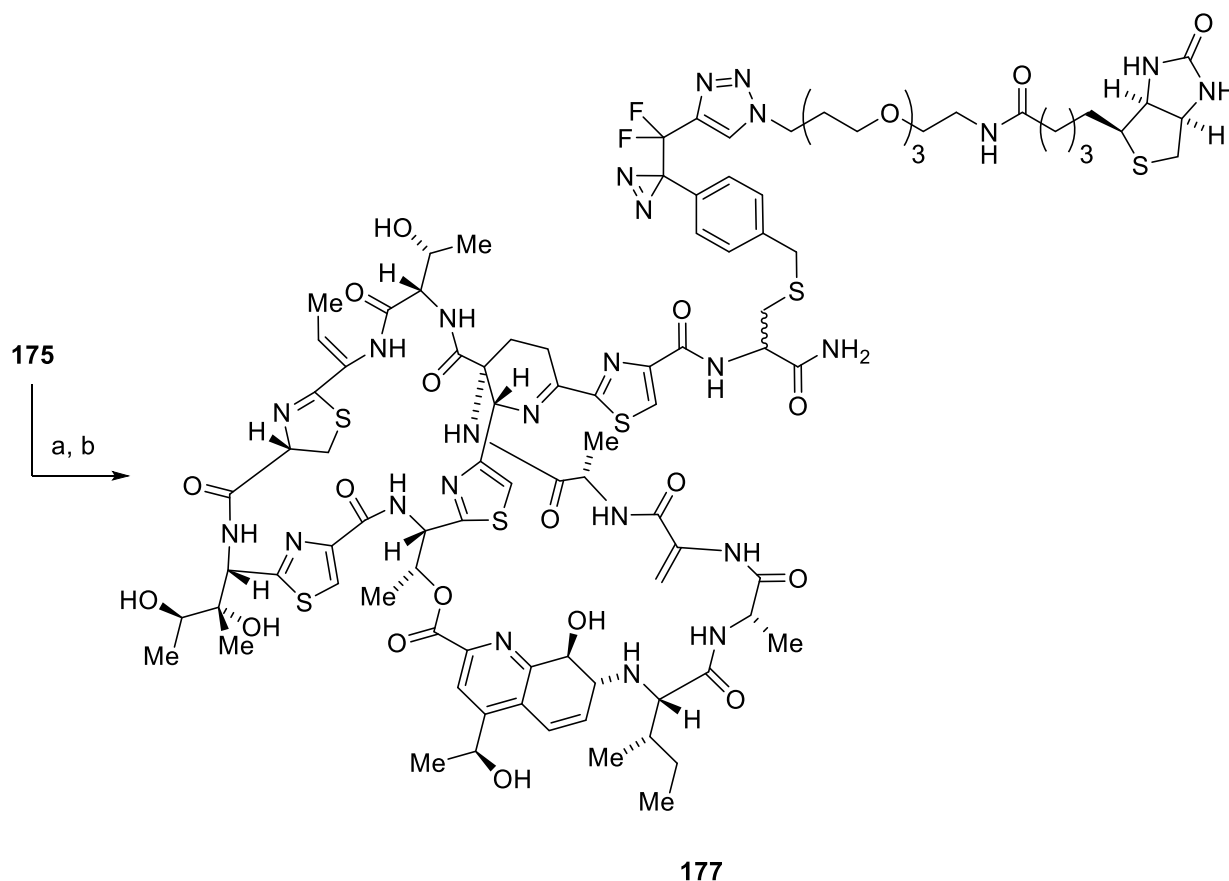


**Schema 4-24:** Synthese des Photoaffinitätslabels **175**. Bedingungen: a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  nach RT, 91%; b)  $\text{TfN}_3$ ,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (6:5:1),  $0^\circ\text{C}$  RT, 2 h, quant.; c)

TFA (25 Vol.-%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 30 min; d) Biotin-4-nitrophenylester, Pr<sub>2</sub>NEt, HOBt, DMF, RT, 16 h, 35% (über 2 Schritte); e) **164**, CuI, NEt<sub>3</sub>, THF, RT, 16 h, 93%; f) TsCl, NEt<sub>3</sub>, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10°C nach RT, 7 h; g) KSAC, DMF, RT, 1 h, 88% (über 2 Schritte).

#### 4.2.9.5 Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonde **177**

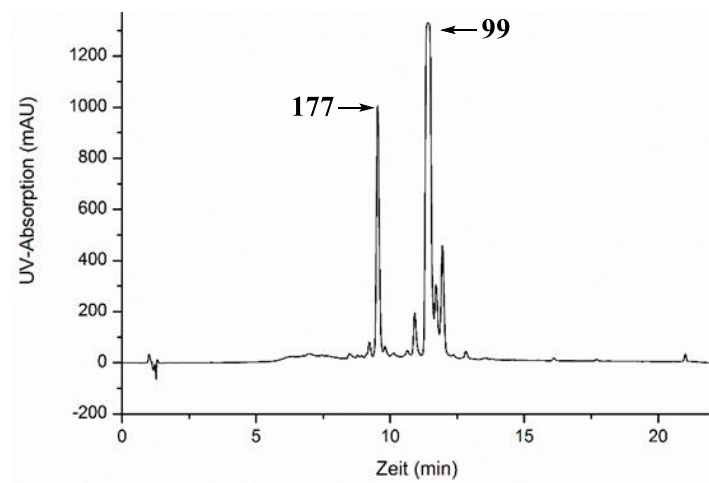
Die Ausstattung des einfach verkürzten Thiostreptons (**99**) mit dem linkerfreien Label **175** erfolgte über *Sulfa*-Michael Addition entsprechend den in 4.2.3 beschriebenen Bedingungen. Hierzu wurde **175** mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in einem Lösungsmittelgemisch aus H<sub>2</sub>O und MeOH zum entsprechenden Thiol (**176**) verseift und mit **99** unter Lichtausschluss in TFE/H<sub>2</sub>O bei pH 9 umgesetzt (**Schema 4-25**).



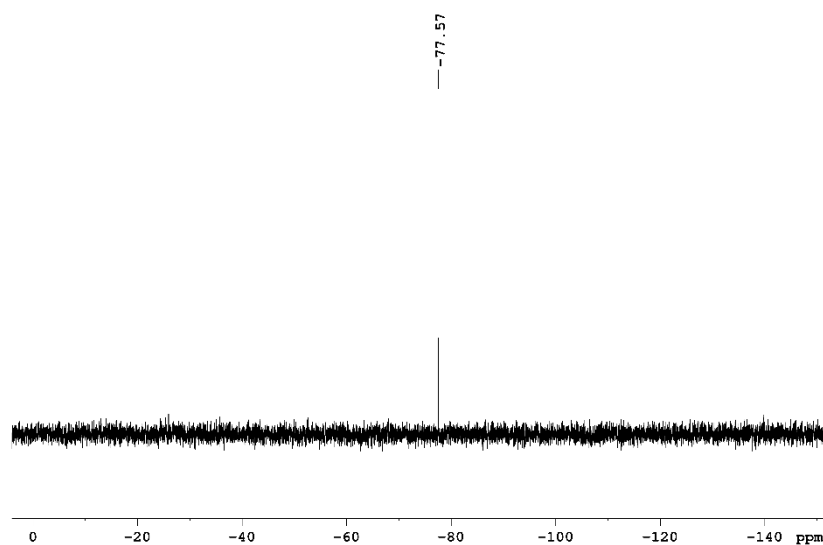
**Schema 4-25:** Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonde **177**. Bedingungen: a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O (3:1), RT, 3 h; **99**, TFE/H<sub>2</sub>O pH 9, NEt<sub>3</sub>, RT, 22 h (Lichtausschluss), 13% über 2 Schritte.

Ähnlich der Umsetzung von **99** mit den *Warhead*-Reportertag-Konjugaten **105** und **149**, konnte mittels HPLC-Analyse (**Schema 4-26**) die Bildung lediglich eines Monoadditionsprodukts ( $t_R = 9.53$  min) beobachtet werden. Die höhere Polarität der

Verbindung gegenüber dem einfach-verkürzten Naturstoff (**99**) korrelierte ebenfalls – aufgrund der Biotin-PEG-Einheit – mit den zu erwartenden physikochemischen Eigenschaften von Sonde **177**. Nach Reinigung der Verbindung durch präparative HPLC, wurde der erhaltene Reinstoff einer MS-Analyse unterzogen. Überraschenderweise konnte die erwartete Summenformel nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde eine Masse detektiert, welche mit der des einfach verkürzten Thiostreptons **99** korrelierte. Demnach wurde vermutet, dass die benzyliche Thioether-Verknüpfung in Sonde **177** unter den Ionisierungsbedingungen (ESI oder MALDI) nicht stabil war. Auch lieferten die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen des Reinstoffs **177** – aufgrund der zu geringen Menge an vorliegendem Material – keine aussagekräftigen Daten für eine eindeutige Signalzuordnung. Einzig die Präsenz eines Singulets bei  $-77$  ppm im Proton-entkoppelten  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (**Schema 4-27**) von **177** korrelierte eindeutig mit der postulierten Struktur der Sonde.



**Schema 4-26:** HPLC-Chromatogramm (C18 Isis, MeCN/H<sub>2</sub>O) der *Sulfa*-Michael Addition von Thiol **176** am einfach verkürzten Thiostrepton **99**. Das Signal mit einer Retentionszeit von 9.53 min (12% der Fläche) entspricht der Thiostrepton-PAL-Sonde **177**; das Signal bei 11.40 min (73% der Fläche) korrespondiert mit dem Naturstoff-Derivat **99**.



**Schema 4-27:** <sup>19</sup>F-NMR Spektrum (188.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>) der reinen Thiostrepton-PAL-Sonde **177**.

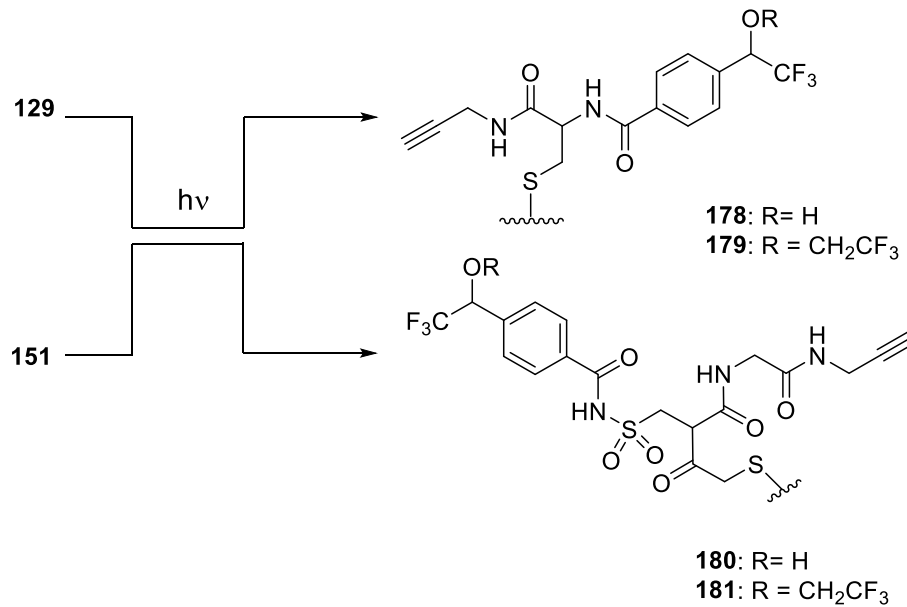
## 4.3 Untersuchung der hergestellten Photoaffinitätslabels

### 4.3.1 Photolysierbarkeitsuntersuchungen

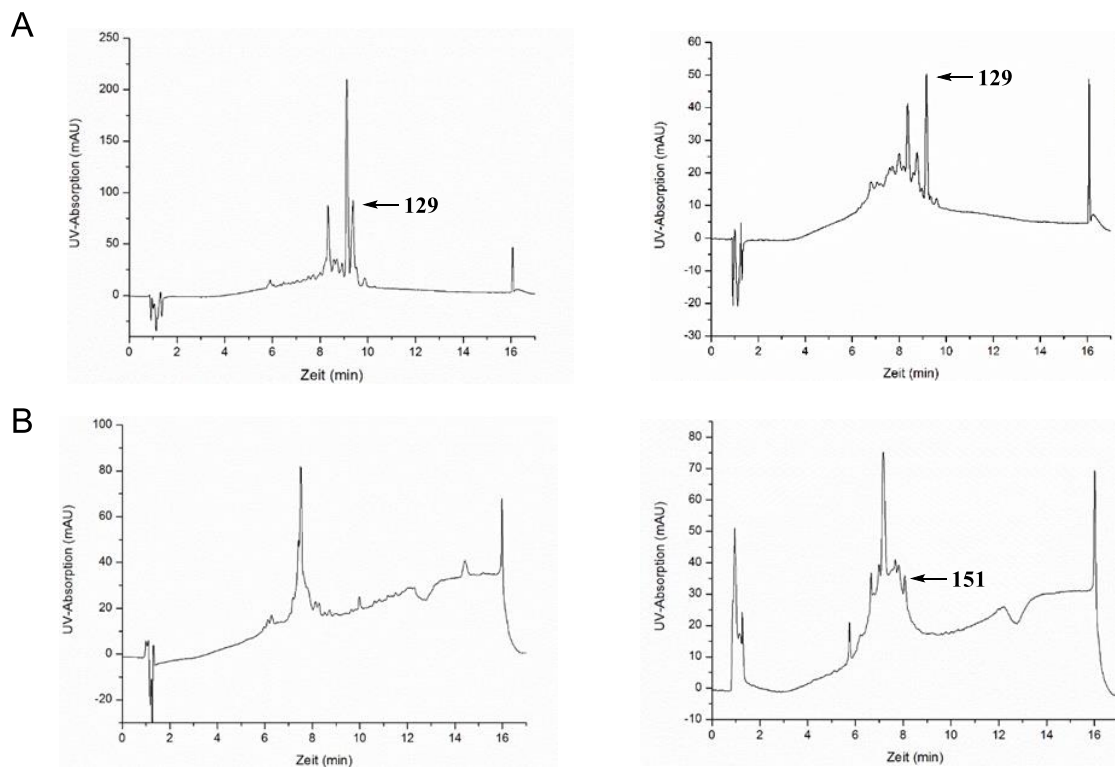
Nach Darstellung der Thiostrepton-PAL-Sonden **129**, **151** und **177** (4.2.3, 4.2.8 und 4.2.9.5) sollten zunächst zwei Fragen geklärt werden: erstens, ob die erhaltenen Naturstoffderivate unter UV-Einwirkung photolytisch labil sind, zweitens, ob sie noch über eine biologische Aktivität verfügen.

Diazirine photolysieren unter Bildung kurzlebiger Carbene, welche in nahezu jede funktionelle Gruppe insertieren können.<sup>[198,209,210,215]</sup> Zum Überprüfen der Photolysierbarkeit von **129**, **151** und **177** wurden diese in TFE bzw. PBS-Puffer bei pH 7.4 gelöst und über einen Zeitraum von 5-60 min mit UV-Licht (365 nm, 8 W) behandelt. Die erhaltenen Reaktionsmischungen wurden mittels HPLC-Analyse ausgewertet (**Schema 4-29**), wobei die Hauptprodukte gesammelt und anschließend einer MS-Untersuchung unterzogen wurden.

Die modular aufgebauten Thiostrepton-PAL-Sonden **129** und **151** zerfielen erwartungsgemäß bereits nach kurzer Zeit (fünf Minuten) unter Bildung der entsprechenden Alkohole **178** und **180** bzw. Trifluorethylether **179** und **181** (**Schema 4-28**). Auffällig war an dieser Stelle jedoch, dass die Photolyse von **151** sowohl in TFE als auch in PBS-Puffer deutlich glatter verlief als die von **129**. Letztere Verbindung konnte in TFE mit 22.5% Ausbeute und in PBS-Puffer mit lediglich 9.2% Ausbeute in das gewünschte Insertionsprodukt **179** bzw. **178** überführt werden. Demgegenüber konnte PAL-Sonde **151** unter gleichen Bedingungen mit jeweils 61.2% und 63.7% Ausbeute umgesetzt werden. Eine Erklärung für das abweichende Verhalten von **129** gegenüber **151** konnte nicht gefunden werden. Daher wurde angenommen, dass der Grund für die schlechte Photolysierbarkeit von **129** in ihrer Aggregationsneigung vorliegt. Tatsächlich zeigte Thiostrepton-PAL-Sonde **151** sowohl in TFE als auch in PBS-Puffer eine deutlich höhere Löslichkeit als **129**. Somit könnte letztere Verbindung in Lösung Aggregate gebildet haben, sodass die Diazirin-Einheit nach UV-Belichtung weniger Lösungsmittel-ausgesetzt ist und dadurch mit umliegenden Gruppen der Sonde reagiert.

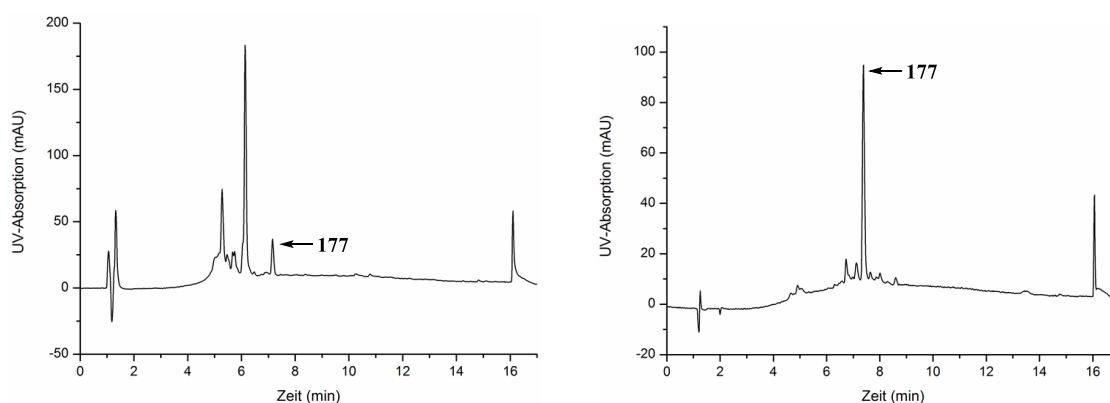


**Schema 4-28:** Photolyse der Thio streptomycin-PAL-Sonden **129** und **151** in TFE und PBS-Puffer bei pH 7.4 mit 5 Vol. % TFE.



**Schema 4-29:** HPLC-Chromatogramme (C18 *Isis*, MeCN/H<sub>2</sub>O) von PAL-Sonden **129** und **151** nach einstündiger UV-Belichtung (8 W) bei 365 nm in TFE und PBS-Puffer pH 7.4 mit 5 Vol.-% TFE. A) Photolyse von **129** in TFE und PBS-Puffer. Die Signale bei 9.12 min (22.5% Fläche) und 8.36 min (9.2% Fläche) wurden gesammelt und mittels MS-Analyse untersucht. B) Photolyse von **151** in TFE und PBS-Puffer. Die Signale bei 7.51 min (61.2% Fläche) und 7.17 min (63.7% Fläche) wurde gesammelt und über mittels MS-Analyse untersucht.

Die linkerfreie Thiostrepton-PAL-Sonde **177** zerfiel nach einer Stunde UV-Belichtung in TFE nahezu vollständig (**Schema 4-30-links**). Dementgegen führte die gleiche Behandlung in PBS-Puffer zu keiner signifikanten Veränderung des Chromatogramms (**Schema 4-30-rechst**). Hier wurde – aufgrund des leicht sauren Charakters von TFE<sup>[461]</sup> – eine pH-Abhängigkeit der Photolyse von **177** vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde das Experiment in unterschiedlichen gepufferten Lösungen (pH 4-12) wiederholt. Eine Korrelation konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden. Weiterhin konnte mittels MS-Untersuchung der in TFE gebildeten photolytischen Produkte von **177** nicht das entsprechende Trifluorethylether-Insertionsprodukt nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte einerseits eine Labilität des Insertionsprodukts unter Ionisierungsbedingungen (ESI), andererseits die Bildung unterschiedlicher reaktiver Spezies sein. Hierauf weisen Literaturbefunde<sup>[210]</sup> hin, dass benzyliche Thioether unter UV-Einwirkung labil sind und in Thiyl-Radikale zerfallen können. Demnach könnten bei der Bestrahlung von PAL-Sonde **177** sowohl die Diazirin-Einheit als auch die Thioether-Verknüpfung (zum Naturstoff-Grundgerüst) gespalten worden sein, weshalb die erwarteten Carben-Insertionsprodukte nicht detektiert werden konnten. Als alternative Erklärung könnte die nach Ausrüstung von **99** mit dem Photoaffinitätslabel **177** gebildete Thioether-Verknüpfung die photophysikalischen Eigenschaften des Diaziringefechtskopfs beeinträchtigt haben. Dessen ungeachtet suggerierten die vorliegenden Daten, dass PAL-Sonde **177** in wässrigen Medien photolytisch inaktiv war. Demnach wurde **177** nicht weiter untersucht.



**Schema 4-30:** HPLC-Chromatogramme (C18 *Isis*, MeCN/H<sub>2</sub>O) von PAL-Sonde **177** nach einstündiger UV-Belichtung (8 W) bei 365 nm in TFE und PBS-Puffer pH 7.4 mit 5 Vol.-% TFE. Links: Photolyse in TFE. Das Signal mit einer Retentionszeit von 6.13 min (73% Fläche) entspricht dem Hauptzersetzungsprodukt; das Signal bei 7.16 min korrespondiert mit der



Ausgangsverbindung **177**. Rechts: Photolyse in PBS-Puffer. Das Signal bei 7.39 min (91% Fläche) entspricht dem Ausgangsmolekül **177**.

## 4.3.2 Bioaktivitätsuntersuchungen

### 4.3.2.1 Agardiffusionstests

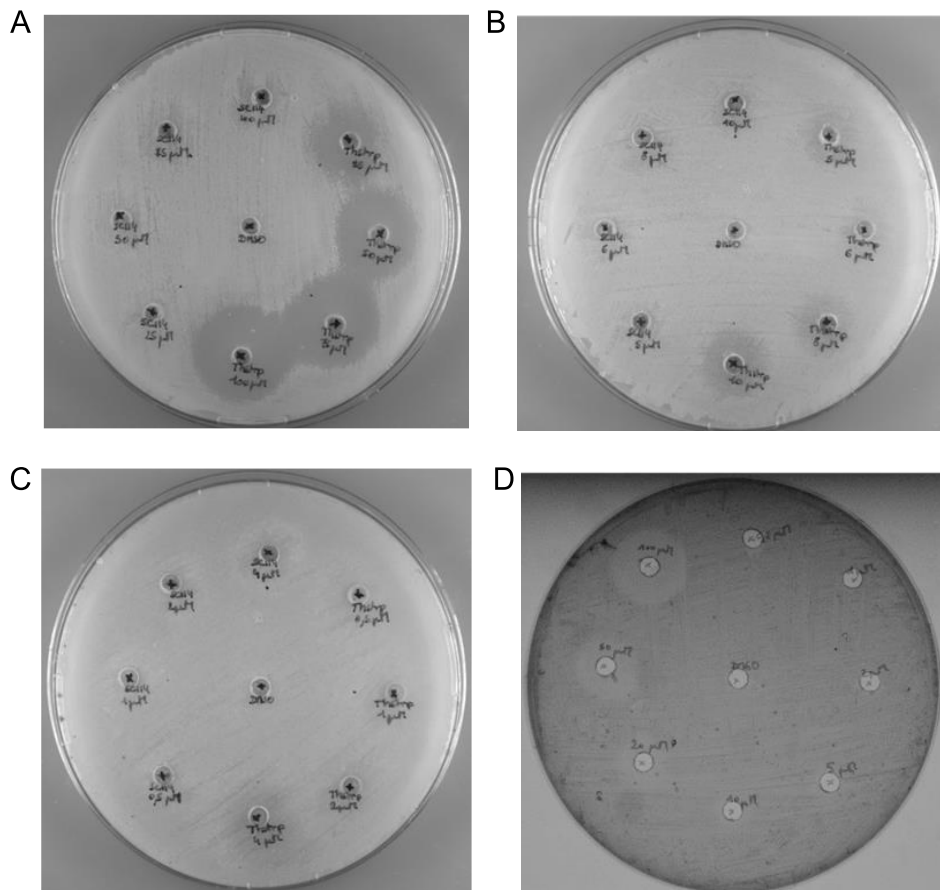
Zur Prüfung der antibiotischen Aktivität von Thiostrepton-PAL-Sonden **129** und **151** wurden zunächst Agardiffusionstests<sup>[462]</sup> mit *S. coelicolor* A3(2) durchgeführt. Hierzu wurden die Sporen des Gram-positiven Bakteriums in isotonischer Lösung suspendiert und auf AM-Agar-Medium in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Analyt **129** und **151** angezogen. Thiostrepton (**7**) diente dabei als Positivkontrolle und reines DMSO als Negativkontrolle.

Im Einklang mit den in der Literatur berichteten Daten<sup>[463]</sup> induzierte Kontrollanalyt Thiostrepton (**7**) einen Hemmhof bis hin zu einer Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$  (**Schema 4-31 A-C**). Für Thiostrepton-PAL-Sonde **151** konnte eine wachstumsinhibierende Wirkung mit einer minimalen Hemm-Konzentration von ca. 2  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (**Schema 4-31 D**), wodurch auf eine dem Ausgangsnaturstoff **15** vergleichbare antibiotische Aktivität geschlossen wurde. Überraschenderweise zeigte Sonde **129** keine Hemmwirkung. Sogar bei höheren Konzentrationen (50-100  $\mu\text{M}$ ) konnte lediglich eine geringe Ausdünnung des Bakterienrasens in der Nähe der Löcher vermerkt werden (**Schema 4-31 A**).

Der drastische Aktivitätsverlust – zumindest hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung – von **129** könnte zwei Gründe haben:

- (1) Der Aktivitätsverlust von **129** ist pharmakodynamisch bedingt und zeugt von einem Ausfall der Hemmwirkung der Sonde auf die Translationsaktivität des 70S Ribosoms;
- (2) Der Aktivitätsverlust ist physikochemisch bedingt und weist darauf hin, dass **129** nicht mehr durch das Agar-Medium diffundieren kann und/oder nicht mehr zellgängig ist.

Angesichts des chemisch und strukturell ähnlichen modularen Aufbaus von Thiostrepton-PAL-Sonden **129** und **151** (Kapitel 4.1.2, 4.1.5.1 und 4.1.5.2) erschien uns (1) prinzipiell wenig plausibel. Darüber hinaus korrelierte (2) besser mit der vermerkten schwachen Löslichkeit – sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln – von **129**, sowie mit der schlechten Photolysierbarkeit der Verbindung verglichen mit Sonde **151** (siehe 4.3.1).



**Schema 4-31:** Agardiffusionstests mit **7**, **129** und **151** auf AM-Agarplatten mit *S. coelicolor* A3(2). In die ausgestochenen Löcher wurden jeweils 50  $\mu$ l Analyt in DMSO gegeben. Die Analytkonzentrationen werden unterhalb der jeweiligen Löcher angegeben. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel ohne Thiopeptid. **A-C)** Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von PAL-Sonde **129** (bezeichnet als **SC114**) und Thiostrepton **7** (bezeichnet als **Thstrp**). **D)** Ermittlung der wachstumshemmenden Wirkung von PAL-Sonde **151**.

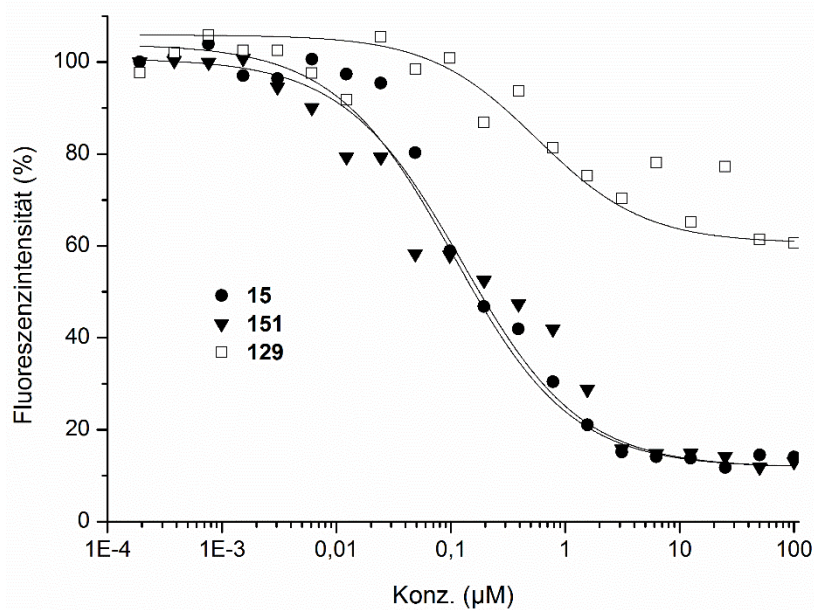
### 4.3.2.2 Gekoppelter *in vivo*

#### Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay

Um die Ergebnisse der Agardiffusionstests (vgl. 4.3.2.1) zu bestätigen, wurden die ribosomalhemmenden Aktivitäten von PAL-Sonden **129** und **151** mittels gekoppeltem *in vitro* Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay ermittelt. Letzterer basiert auf dem kommerziellen RTS 100 *E. coli* HY Kit (Roche®), der zur Untersuchung der inhibitorischen Aktivität von Thiopeptiden und Thiopeptidderivaten auf die bakterielle Proteinbiosynthese adaptiert worden war<sup>[464]</sup>. Die Verfolgung der Transkription-Translation erfolgt dabei quantitativ über Fluoreszenzspektroskopie und beruhte auf der Expression des im Zelllysate enthaltenen und fluoreszierenden GFP-Proteins aus dem T7-Promoterkontrollierten

pIVEX2.3d-Plasmid (Roche®). Die ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven für den Naturstoff **7** sowie für PAL-Sonden **129** und **151** sind in **Schema 4-32** dargestellt.

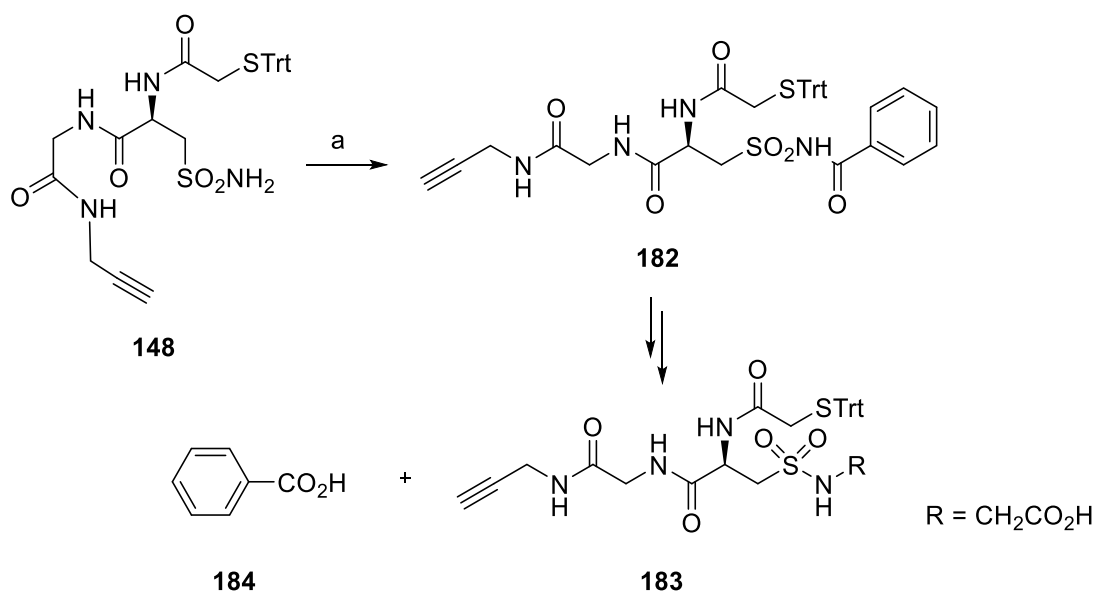
Wie zu erwarten induzierte Thiostrepton (**7**) eine starke Inhibition des *in vitro* Translationssystems. Eine mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $0.13 \mu\text{M}$  konnte für den Naturstoff bestimmt werden und stimmte in Rahmen des Fehlers mit den in der Literatur berichteten Daten<sup>[118]</sup> überein. Für Thiostrepton-PAL-Sonde **151** konnte eine äquivalente Inhibition mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.12 \mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Somit korrelierten die Daten mit den durch Hemmhofstest erhaltenen Ergebnissen (vgl. **4.3.2.1**). Thiostrepton- PAL-Sonde **129** zeigte keine Inhibition der Transkription-Translation. Selbst bei höheren Konzentrationen ( $>10 \mu\text{M}$ ) konnte lediglich eine 30%ige Senkung der Fluoreszenzintensität erzielt werden. Demnach legten die Ergebnisse einen vollständigen Aktivitätsverlust von **129** nach und korrelierten ebenfalls mit den Agardiffusionsassays dieser Verbindung. Folglich wurde diese Sonde (**129**) von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.



**Schema 4-32:** In vitro Transkriptions-Translations-Inhibitionstitrations mit Thiostrepton (**7**) sowie mit den PAL-Sonden **129** und **151**, angepasst an den Sigmoidalen Verlauf mittels eines Logistik-Kurvenfits. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Mittelwert der Negativkontrolle (TFE) normiert und sind in % angegeben.

### 4.3.3 Spaltbarkeitsuntersuchungen

Ziel der Sulfonsäureamid-Installation in Thiostrepton-Derivat **151** war es – neben Erhöhen der Wasserlöslichkeit der Sonde – eine selektive Spaltung der Verknüpfung zwischen Photophor-Einheit **101** und Linker-System **148** zu ermöglichen (Kapitel 4.1.5.2). Nach dem Bericht der Gruppe um Hatanaka<sup>[437]</sup> sollte die Spaltung unter leicht alkalischen Bedingungen über eine *N*-Alkylierung von **151** mit Iodessigsäure und anschließender Hydrolyse des erhaltenen Alkylsulfonsäureamids in wässriger Ammoniak-Lösung erfolgen. Ausgehend von diesen Grundüberlegungen wurde das Testsystem **182** durch *N*-Acylierung von Sulfonsäureamid **148** (siehe 4.2.7) mit Benzoesäurechlorid hergestellt und unter zuvor genannten Reaktionsbedingungen auf selektive Spaltbarkeit hin untersucht (**Schema 4-33**).



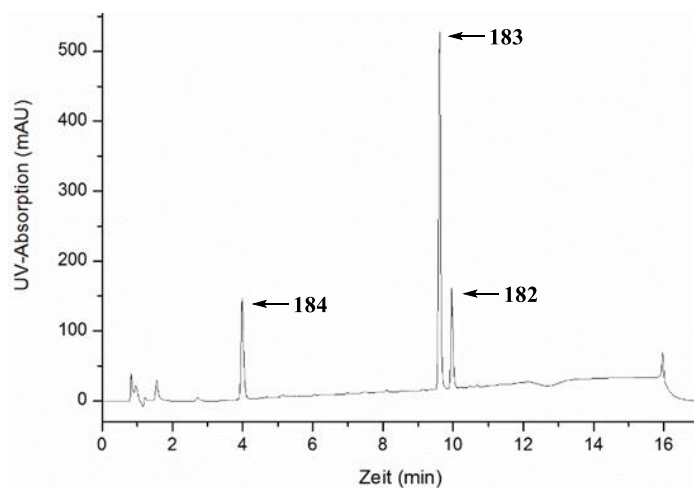
**Schema 4-33:** Synthese und selektive Spaltung des Sulfonsäureamid-Testsystems **182** nach der Methode von Bongo *et al.* Bedingungen: a)  $\text{PhCOCl}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  nach RT, 22 h, 73%.

Der Alkylierungsschritt sollte innerhalb von 10 min bei RT in einem Natriumborat-Puffer bei pH 8.8 erfolgen und die Hydrolyse durch anschließende Zugabe von 10 Äq.  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Parallel zu Iodessigsäure wurde ebenfalls Iodacetamid als Alkylierungsmittel eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Reaktion bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und zur Spaltung des dargestellten alkylierten Intermediats neben  $\text{NH}_4\text{OH}$  diverse Nukleophile wie  $\text{Et}_2\text{NH}$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ , Piperidin und Morpholin verwendet. Eine Übersicht der getesteten Bedingungen befindet sich in **Tabelle 4-3**.

**Tabelle 4-3:** Reaktionsbedingungen zur selektiven Spaltung des Sulfonsäureamid-Testsystems **182**.

Alkylierungsmittel	Temperatur (°C)	Nukleophil	Puffer (pH)
ICH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	RT	NH <sub>4</sub> OH	Borat 8.8
ICH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	37	Et <sub>2</sub> NH	
	50	NH <sub>2</sub> OH	
	80	Piperidin	
		Morpholin	

Überraschenderweise führte keine der eingesetzten Bedingungen zu einer selektiven Spaltung von **182**. Ansätze, welche bei RT, 37°C oder 50°C durchgeführt wurden, zeigten selbst bei längeren Reaktionszeiten (16 h) keine Umsetzung des Testsystems. Höhere Temperaturen (80°C) führten dagegen zu einer Zersetzung von **182**. Um dem entgegenzuwirken wurde der Borat-Puffer durch eine Phosphatlösung ersetzt und die Reaktionen unter stärker alkalischen Bedingungen (pH 9 bis 12) durchgeführt. Interessanterweise führte die neue Strategie zu einer vollständigen Umsetzung des Testsystems **182**, welches in zwei Produkte (HPLC-Kontrolle) zerfiel. Bereits nach einer Stunde bei pH 10.5 und 50°C konnte etwa ein 80%iger Umsatz erreicht werden (**Schema 4-34**). Darüber hinaus schien diese Spaltungsreaktion keinen vorherigen Alkylierungsschritt zu benötigen, da die Ergebnisse ohne Einsatz von ICH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H bzw. ICH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> reproduziert werden konnten. Folglich sollte durch Inkubation der mit PAL-Sonde **151** photomarkierten Proteine im Basischen (pH 10-11, 50°C) eine selektive Spaltung zwischen der vernetzten Photophor-Einheit (**101**) und dem Rest des Naturstoff-Derivats erzielt werden können.

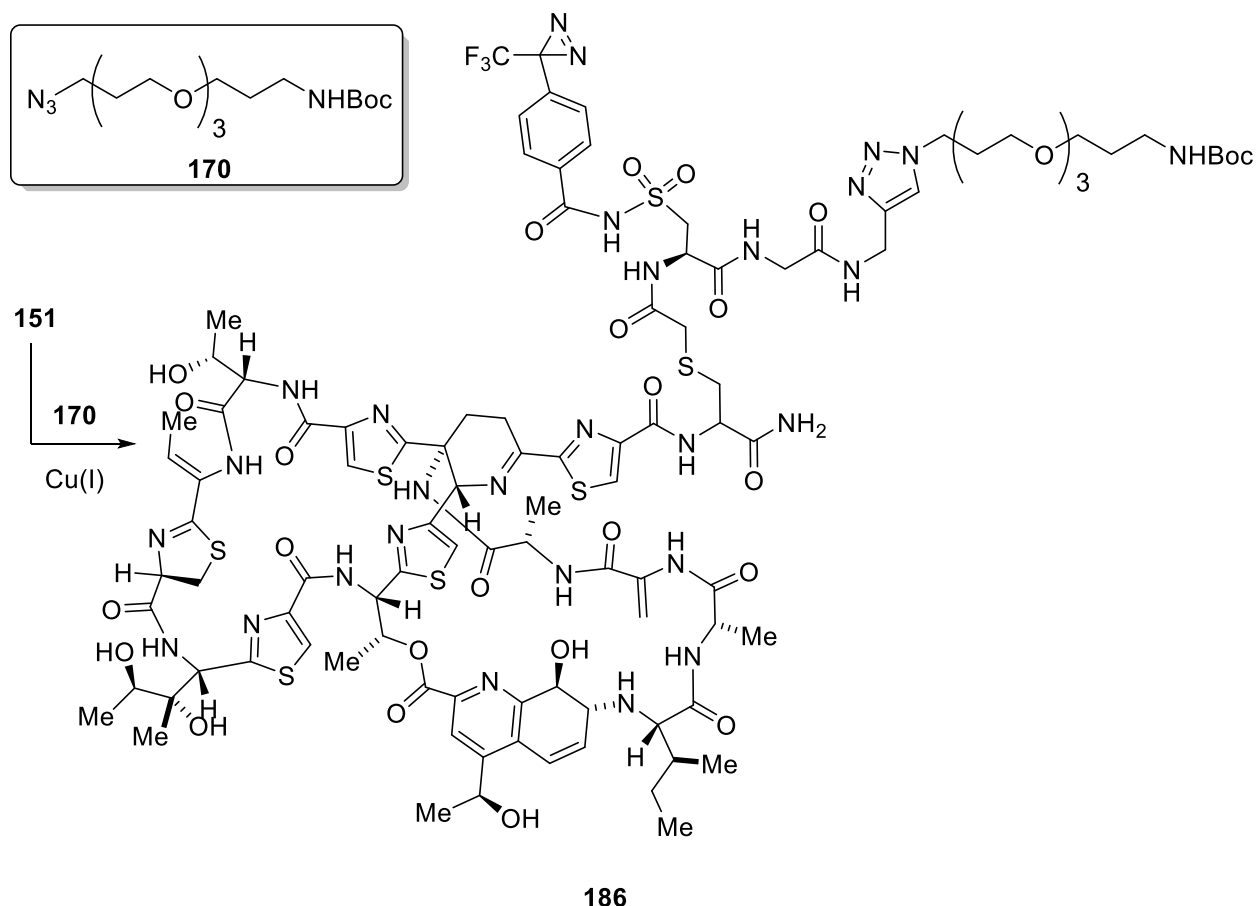


**Schema 4-34:** HPLC-Chromatogramm (C18 Isis, MeCN/H<sub>2</sub>O) von **182** nach einstündiger Behandlung in PBS-Puffer bei pH 10.5 und 50°C. Die Retentionszeit der Ausgangsverbindung beträgt 9.96 min, die der Spaltungsprodukte jeweils 9.61 min und 3.99 min.

#### 4.3.4 Bioorthogonale Konjugation von PAL-Sonde 151

Die bioorthogonale Konjugation von Thiostrepton-PAL-Sonde **151** über kupferkatalysierte Azin-Alkin [4+2] Cycloaddition (CuAAC) sollte in Anlehnung an die Methode von Rostovtsev *et al.*<sup>[465]</sup> durchgeführt werden, wobei Cu(I) aus CuSO<sub>4</sub> und Natriumascorbat *in situ* generiert wird. In der Literatur<sup>[466]</sup> war jedoch berichtet worden, dass Thiostrepton (**7**) bis zu vier Äq. Cu(II) komplexieren und dabei Abbaureaktionen eingehen kann, wodurch es zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Naturstoffs kommt. Um dem entgegenzuwirken sollte daher das eingesetzte Cu(II) möglichst schnell reduziert und gleichzeitig die Disproportionierung des erzeugten Cu(I) verhindert werden. Zu diesen Zwecken eigneten sich die Polytriazol-Cu(I)-Chelatliganden TBTA<sup>[467]</sup> und THPTA<sup>[468]</sup>. Zusätzlich wurden durch präventive Zugabe von EDTA eventuelle Cu(II)-Rückstände abgefangen.

Für Testreaktionen wurde PAL-Sonde **151** mit PEG-Azid **170** – welches vorherig gemäß der in 4.2.9.4 dargestellten Vorschrift hergestellt wurde – umgesetzt (**Schema 4-35**), wobei die Ansätze durch HPLC-Analyse ausgewertet wurden. Zur Bestätigung der Summenformel des gewünschten Triazolprodukts **186**, wurden zudem die erhaltenen HPLC-Produktsignale gesammelt und über MS-Analyse untersucht.



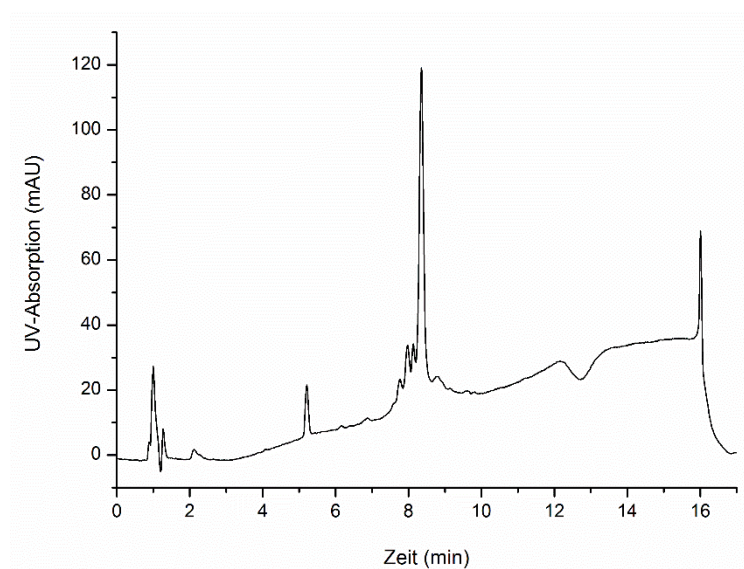
**Schema 4-35:** Umsetzung von Thioestrepton-PAL-Sonde **151** mit Test-Azid **170** über Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin [4+2] Cycloaddition.

Zur Optimierung der Reaktion wurde alternativ zu Natriumascorbat ebenfalls TCEP als Reduktionsmittel eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Reaktion in diversen Puffersystemen bzw. bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, wobei  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuBr}$  und  $\text{CuI}$  als Kupfer-Quelle verwendet wurden. In allen Ansätzen - ungeachtet der Oxidationsstufe der Kupfer-Quelle – kam neben einem Reduktionsmittel ebenfalls EDTA zum Einsatz. Eine Übersicht der kombinierten Parameter ist in **Tabelle 4-4** dargestellt.

Die besten Ausbeuten lieferten Ansätze in Phosphatpuffer pH 8.2 mit  $\text{CuBr}$  als Kupferquelle, Natriumascorbat als Reduktionsmittel und TBTA als Chelatligand. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von  $\text{CuBr}$  wurde letzteres, vor Zugabe in die Reaktionslösung, in einem Verhältnis 1:1 mit TBTA in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO und  $t\text{BuOH}$  (3:1) versetzt, wobei die Endkonzentration an  $t\text{BuOH}$  0.4 Vol.-% und die an DMSO 5 Vol.-% betrug. Unter diesen Bedingungen konnte bereits nach 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  eine quantitative Ausbeute erzielt werden (**Schema 4-36**).

**Tabelle 4-4:** Optimierung der CuAAC an Thiostrepton-PAL-Sonde **151**.

Azid (Äq.)	Cu(I)-Quelle (Äq.)	Reduktionsmittel (Äq.)	Cu(I)- Chelatligand	Puffer (pH)	Temp. (°C)	Zeit (h)
<b>159</b> (2)	CuSO <sub>4</sub> (4)	TCEP (4)	TBTA (4)	Phosphat 6-9	RT	1-16
	CuBr (4)	Natriumascorbat (4)	THPTA (4)	NH <sub>4</sub> OAc 6.8	37	
	CuI (4)			HEPES 7.5	50	
				Borat 8.2		
				MOPS 7.5		
				PIPES 6.8		
				TES 7.5		
			TEEA 7.0			

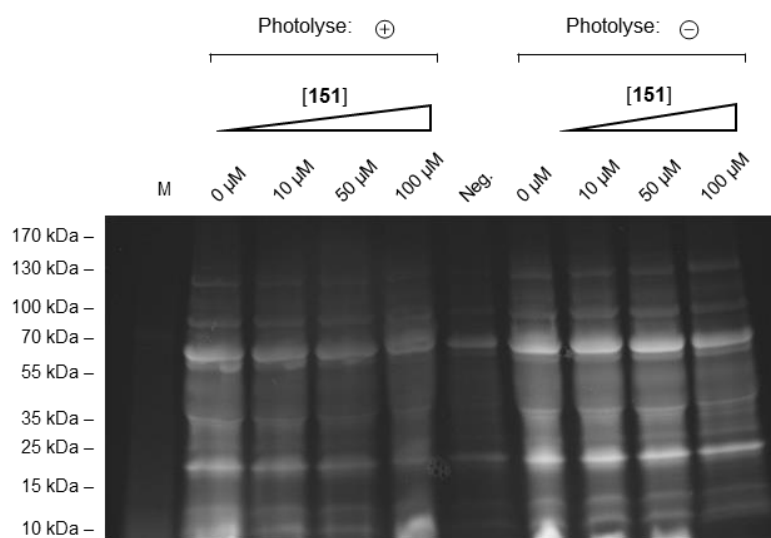


**Schema 4-36:** HPLC-Chromatogramm (C18 Isis, MeCN/H<sub>2</sub>O/TFA) nach dreistündiger Umsetzung von PAL-Sonde **151** mit PEG-Azid **170** über optimierte Bedingungen der CuAAC. Das Signal mit einer Retentionszeit von 8.35 min (83% Fläche) wurde gesammelt und mittels MS-Analyse als das gewünschte Triazolprodukt **186** bestätigt.



### 4.3.5 Photoaffinitäts-Markierungsexperimente

Anhand der vorangegangenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das lichtinduzierbare Thiostrepton-Derivat **151** über eine – in prokaryotischen Organismen – ähnliche biologische Aktivität verfügt wie der Ausgangsnaturstoff **7**. Im Weiteren sollte geprüft werden, ob **151** dazu in der Lage ist nach UV-Anregung bekannte Wirkorte des Thiopeptids zu markieren. Ausgehend von der Röntgenkristallstrukturanalyse der 50S Untereinheit aus *D. radiodurans* in Komplex mit **7**<sup>[132]</sup> sowie von den biochemischen Kenntnissen bzgl. der Thiopeptid-Binderegion (siehe **Kapitel 3.1**) wurde angenommen, dass **151** bevorzugt das L11-Protein markieren sollte. Als weitere Targets könnten auch die Translationsfaktoren IF2, EF-Tu, EF-G, EF-4 und RF-3 vermutet werden, die allesamt an das GTPase-assoziierte Zentrum binden (siehe **3.1.1.4**). Zur Validierung des Photoaffinitätslabels **149** sollte untersucht werden, ob die dargestellte Thiostrepton-PAL-Sonde **151** nach Photoaktivierung eine selektive Detektion dieser genannten potenziellen Zielproteine erlaubt. Hierfür wurde **151** in einem ersten Experiment in Zelllysaten des Gram-positiven Bakteriums *B. subtilis* inkubiert und zur Photolyse eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Die Detektion der kovalent markierten Proteine erfolgte anschließend, nach bioorthogonaler Konjugation mit *Azide-Fluor 488* (Sigma®) unter den in **4.3.4** optimierten Bedingungen. Ein exemplarisches Auftrennungsmuster der Zelllysate nach Fluoreszenzdokumentation ist in **Schema 4-37** dargestellt.

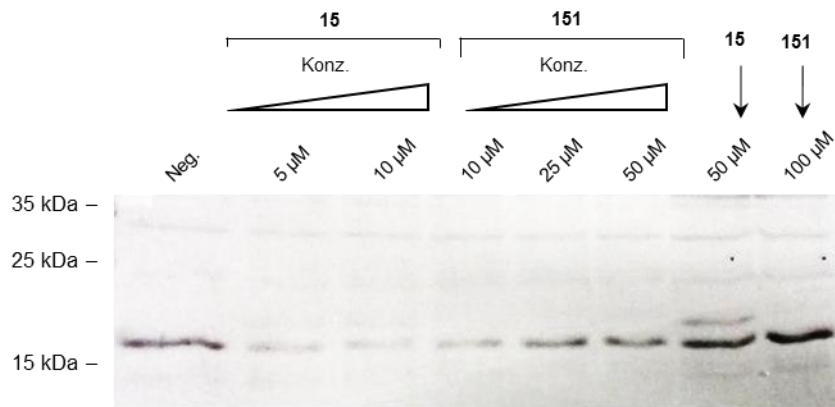


**Schema 4-37:** 15%iges SDS-PAGE Gel (Fluoreszenzdetektion) des Zelllysats von *B. subtilis* nach Photoaffinitätsmarkierung mit Thiostrepton-PAL-Sonde **151** und anschließender bioorthogonaler Konjugation mit *Azide-Fluor 488* (Sigma®). M: Marker; Neg.: Negativkontrolle (Lysis-Puffer).

Unter den fluoreszenzmarkierten Proteinen zeigten die Banden mit einem berechneten Molekulargewicht von 18.7 und 60.3 kDa eine deutlich verstärkte Intensität. Letztere könnten mit den erwarteten Massen der mit PAL-Sonde **151** modifizierten Proteine L11 und RF3 nach Konjugation mit Azide-Fluor 488 (Sigma®) korrelieren. Leider konnten die Banden ebenfalls ohne vorherige UV-Anregung der Sonde und sogar in Abwesenheit dieser in gleicher Intensität nachgewiesen werden. Folglich schien es sich bei den Fluoreszenzmarkierungen vorwiegend um Hintergrundreaktionen mit dem überschüssigen Reportertag zu handeln. Auch konnten diesbezüglich diverse Literaturberichte gefunden werden, welche darauf hinweisen, dass Azide – trotz allgemeiner Geltung als biologisch inert – mit einigen Biomolekülen reagieren.<sup>[189,469-471]</sup> Somit sollte zur Detektion der Markierungsprodukte eine alternative Strategie entwickelt werden.

Zu diesen Zwecken eignete sich der Ribosomchimärenstamm *E. coli* p*Ttb*L11Q29C.<sup>[464]</sup> Dieser exprimiert ein N-terminal His<sub>6</sub>-markiertes L11-Fusionsprotein, welches mithilfe eines Polyhistidin-Tag gerichteten Antikörpers spezifisch nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus enthält das Protein – anstelle des im Wildtyp vorkommenden Gln-Rests in Position 29 – eine durch Punktmutation eingeführte reaktive Cys-Einheit. Letztere kann, nach Interaktion des Thiostreptons (**7**) am Ribosom, eine nähe-induzierte kovalente Reaktion (*Proximity Induced Covalent Capture*, PICC) mit einem der Dehydroalanine der Molekülseitenkette des Thiopeptids eingehen.<sup>[106]</sup> Demnach führt die Inkubation von **7** im Zelllysate des *E. coli* p*Ttb*L11Q29C-Stamms zur Bildung eines kovalenten Thiopeptid-Protein L11-Adduktes, welches über Immunblot detektiert werden kann.

Auf Basis dieses spezifischen Detektionsverfahrens sollte im Weiteren überprüft werden, ob die Thiostrepton-PAL-Sonde **151** das Protein-L11 – nach UV-Anregung – selektiv markieren kann. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen von **151** (10-100 µM) im Zelllysate des Mutantenstamms inkubiert und unter UV-Licht photolysiert. Die erhaltenen Proben wurden anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht, wobei PICC-Ansätze mit Thiostrepton **7** als Positivkontrolle dienen (**Schema 4-38**).



**Schema 4-38:** Immunoblot ( $\alpha$ -His6-Antikörper) des Zelllysats von *E. coli* p*Ttb*L11Q29C nach Photoaffinitätsmarkierung mit der Thiostrepton-PAL-Sonde **151**. Als Positivkontrolle zur Detektion der Thiopeptid-L11-Addukte dienten PICC-Reaktionen mit Thiostrepton **7**. Neg.: Negativkontrolle (Lysispuffer).

Wie zu erwarten führte die Inkubation des Zelllysats mit **7** zur Bildung einer neuen Proteinbande, deren Laufweite einem Molekulargewicht von 17.9 kDa entsprach und somit in etwa mit der Masse des erwarteten L11-PICC-Adduktes übereinstimmte. Die Intensität der Bande korrelierte dabei ebenfalls mit der eingesetzten Konzentration an Thiostrepton **7**. Demgegenüber induzierte PAL-Sonde **151** nach UV-Anregung keine Veränderung des Blots. Selbst bei höheren Konzentrationen (bis 100  $\mu$ M) konnte lediglich die native L11-Bande detektiert werden. Somit suggerierten diese Ergebnisse, dass **151** – entgegen der Annahme – mit L11 nicht reagiert.

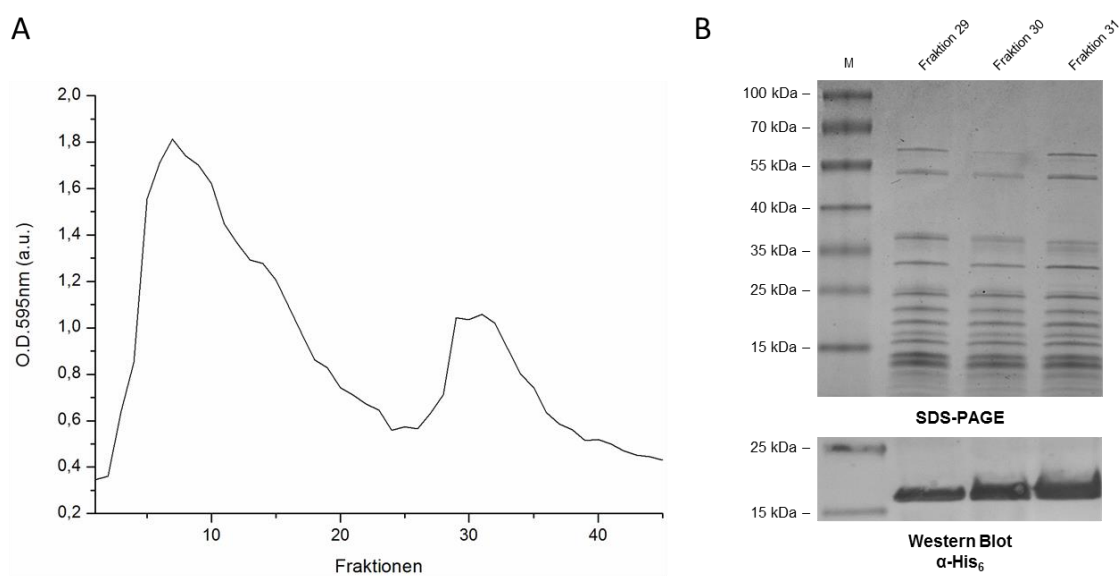
Da die Bioaktivitätsuntersuchungen von **151** (siehe 4.3.2) darauf hinwiesen, dass die Sonde translationshemmend wirkt und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit am Ribosom bindet, könnte dies zwei Ursachen haben:

- (1) Aufgrund der räumlichen Anordnung der Sonde an der ribosomalen Bindestelle reagiert das Photophor, nach UV-Anregung, mit umliegenden Wassermolekülen oder sich selbst;
- (2) Der Gefechtskopf ist räumlich zu weit von der ribosomalen Bindungsstelle entfernt und reagiert nach Photoaktivierung mit anderen ribosomalen Proteinen bzw. Translationsfaktoren oder mit der 23S rRNA.

Um letztere Hypothese zu prüfen sollte im Folgenden ein Detektionssystem entwickelt werden, welches eine Visualisierung der markierten Ribosomalproteine nach bioorthogonaler Konjugation ermöglicht, dabei jedoch die vermerkten CuAAC-induzierten Hintergrundreaktionen unterdrückt. Hierfür wurden zwei Ansätze verfolgt, wobei zum

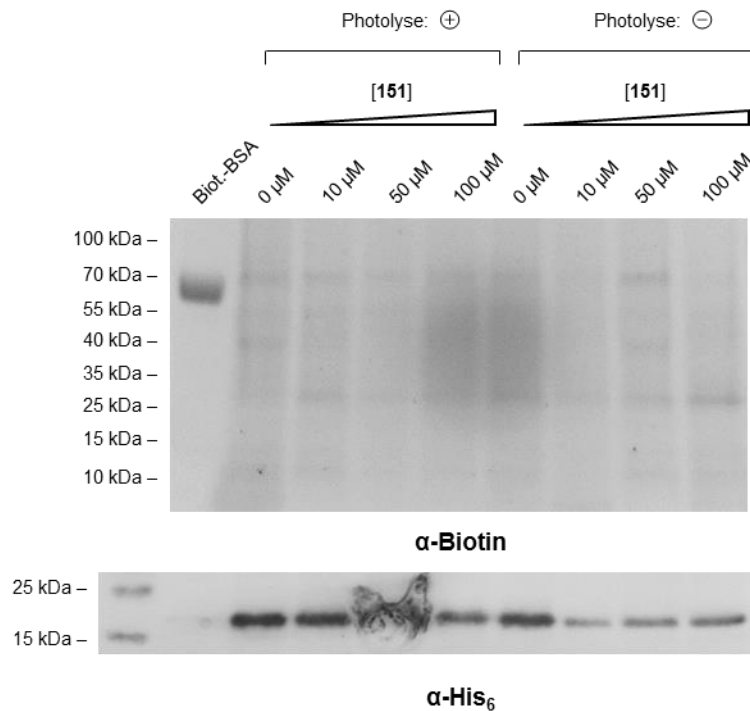
einen die Sonde **151** mit reinen Ribosomen – statt Zellysats – inkubiert wurde, zum anderen die Inkubation von **151** mit potenziellen Zielproteinen erst nach Funktionalisierung der Sonde über CuAAC erfolgte.

Die Ribosomreinigung erfolgte aus Flüssigkulturen des oben genannten *E. coli*-Mutantenstamms mittels Affinitätschromatographie in Anlehnung an die Methode von Maguire *et al.*<sup>[472]</sup> Die Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde dabei mittels SDS-PAGE kontrolliert, wobei die Präsenz des His<sub>6</sub>-markierten L11-Proteins durch Western Blot-Analyse ( $\alpha$ -His<sub>6</sub>) bestätigt wurde (**Schema 4-39**).



**Schema 4-39:** Präparative Ribosomreinigung aus *E. coli* p*Ttb*L11Q29C über Affinitätschromatographie nach der Methode von Maguire *et al.*<sup>[472]</sup>. A) Rekonstruiertes Chromatogramm *via* Bestimmung der Proteinkonzentration der eluierten Fraktionen mittels Bradford-Test. B) Reinheitskontrolle der affinitätsgereinigten Fraktionen 29, 30 und 31 mittels SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse ( $\alpha$ -His<sub>6</sub>). M: Marker.

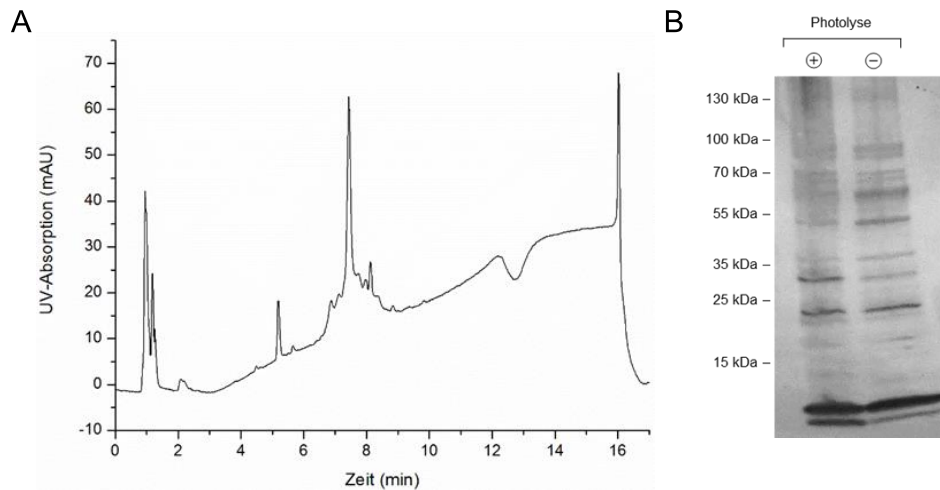
Zur Durchführung der Photoaffinitätsmarkierungsexperimente wurden verschiedene Konzentrationen der PAL-Sonde **151** mit den affinitätsgereinigten Ribosomen inkubiert und unter UV-Licht bestrahlt. Nach Austausch der Puffer-Lösung erfolgte die bioorthogonale Konjugation der Markierungsprodukte *via* CuAAC mit *Azide-PEG3-biotin conjugate* (Sigma®) unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Die dabei erhaltenen Proben wurden anschließend *via* Immunblot mit einem Biotin-gerichteten Antikörper untersucht, wobei Biotin-markiertes BSA (Sigma®) als positive Detektionskontrolle diente (**Schema 4-40**).



**Schema 4-40:** Immunoblots ( $\alpha$ -Biotin) affinitätsgereinigter Ribosomen aus *E. coli* pTthL11Q29C nach Photoaffinitätsmarkierung mit unterschiedlichen Konzentrationen der ThioStrepton-PAL-Sonde **151**. Als Detektionskontrolle diente Biotin-markiertes BSA (Sigma®). Das L11-Protein wurde parallel mit einem His<sub>6</sub>-gerichteten Antikörper nachgewiesen, um die ribosomale Ladung in den Taschen zu bestätigen.

Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen führte die Photolyse von PAL-Sonde **151** zu einer selektiven Markierung eines ribosomalen Proteins bzw. Translationsfaktors. Die erhaltenen Blots zeigten zwar einige schwache Banden (69.8, 39.9, 25.5 und 18.7 kDa), jedoch konnten diese ebenfalls ohne vorherige Photolyse der Sonde beobachtet werden und wurden daher als Artefakte interpretiert.

Parallel zu diesem Experiment wurde PAL-Sonde **151** in einem vorhergehenden Schritt mit *Azide-PEG3-biotin conjugate* (Sigma®) funktionalisiert und nach einstündiger Inkubation im Zellysate von *B. subtilis* unter UV-Licht photolysiert. Erstere Reaktion wurde dabei über HPLC-Analyse (**Schema 4-41-A**) verfolgt, wobei die Bildung des entsprechenden Biotin-PEG-Konjugats mittels MS-Untersuchung bestätigt wurde. Nach Auftrennung der Proben über SDS-PAGE erfolgte die Auswertung der PAL-Experimente durch Immunblot mit einem Biotin-gerichteten Antikörper (**Schema 4-41-B**)



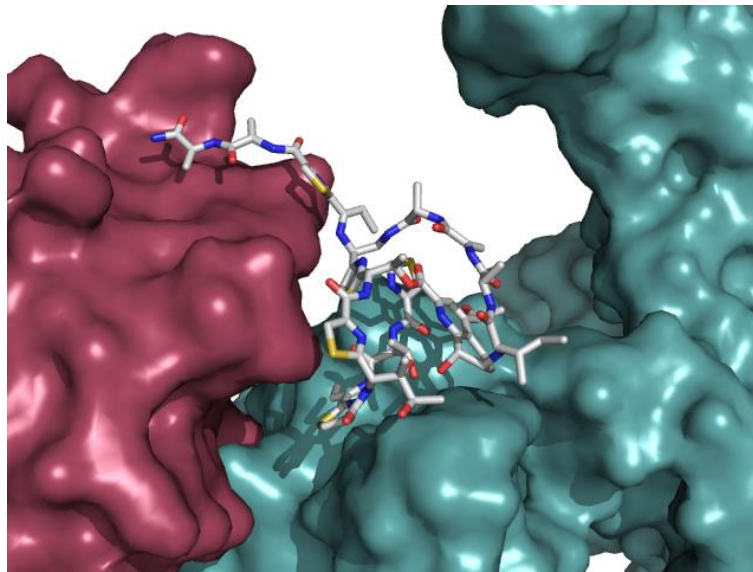
**Schema 4-41:** Photoaffinitätsmarkierung mit Thiostrepton-PAL-Sonde **151** nach CuAAC mit *Azide-PEG3-biotin conjugate* (Sigma®).

Neben der funktionalisierten Sonde und dem überschüssigen *Azide-PEG3-biotin conjugate* (Sigma®) zeigten die erhaltenen Blots insgesamt vier signifikante Biotin-markierte Banden, unter denen einzig eine photolytisch induziert zu sein schien. Die Laufweite letzterer Bande entsprach einem Molekulargewicht von 31.4 kDa und korrelierte mit keiner der erwarteten Massen für ein Ribosomprotein- bzw. Translationsfaktor-PAL-Sondenaddukt. Auch konnte das Ergebnis bei Wiederholen des Experiments nicht reproduziert werden, weshalb geschlossen wurde, dass es sich bei der vermerkten Bande um keine selektive PAL-Markierung der Sonde **151**, sondern ebenfalls um eine Hintergrundreaktion des überschüssigen Biotin-PEG-Reportertags handelt.

#### 4.3.6 Diskussion

Mittels Bioaktivitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Thiostrepton-PAL-Sonde **151** das Wachstum Gram-positiver Bakterien hemmt (4.3.2.1) und mit einer dem Naturstoff **7** vergleichbaren inhibitorischen Wirkung die Proteinbiosynthese *in vitro* unterbindet (4.3.2.2). Somit sollte davon ausgegangen werden, dass der Bindemodus von **151** am ribosomalen Wirkort im Wesentlichen dem von **7** entspricht. Letzteres bindet am GTPase-assoziierten Zentrum in einer hydrophoben Grube zwischen der 23S rRNA und dem Protein-L11, wobei für das Bindungsphänomen vorwiegend die Thiazol(in)e des A-Rings und – in geringerem Maße – die Chinaldinsäure-Einheit verantwortlich sind. Die Dehydroalanin-Molekülseitenkette spielt dagegen eine weitgehend unerheblichere Rolle

und interagiert außerhalb der GAC-Bindungstasche mit der N-terminalen Domäne des L11-Proteins.



**Abbildung 4-2:** Darstellung des Bindemodus von Thiostrepton **7** am GTPase-assoziierten Zentrum auf Basis der Röntgen-Kristallstruktur der 50S Untereinheit aus *D. radiodurans* in Komplex mit **7** (PDB: 3CF5)<sup>[132]</sup> generiert mit PyMol (Delano Scientific). Das L11-Protein wird in rot dargestellt, die 23S rRNA in grün.

Daher wurde angenommen, dass die photoreaktive Gruppe in Sonde **151**, ähnlich der Dh-Ala-MSK in **7**, mit dem L11-Protein wechselwirkt und nach UV-Anregung dieses selektiv markieren kann. Jedoch führte keines der realisierten PAL-Experimente mit **151** zu einer Detektion des Protein-L11. Ebenso konnten keine Hinweise auf eine kovalente Reaktion der Sonde mit einem anderen ribosomalen Protein bzw. GAC-bindenden Translationsfaktor gefunden werden. Somit stellt sich die Frage, ob die Annahme einer der Dh-Ala-MSK am ribosomalen Wirkort analogen räumlichen Anordnung der PAL-Einheit in Sonde **151** gerechtfertigt ist.

Beim Vergleich des Photoaffinitätslabels **149** mit der Dh-Ala-MSK fällt auf, dass sich die Moleküle sowohl strukturell als auch physikochemisch stark voneinander unterscheiden. Zum einen ist **149** deutlich größer als die Dh-Ala-MSK. Letztere weist zudem zwei trigonale  $sp^2$ -hybridisierte  $\alpha$ -Kohlenstoffatome auf, aus denen eine *quasi* planare Konformation des Peptidrückgrats resultiert. Demgegenüber sollte **149** prinzipiell über eine hohe konformationelle Flexibilität am ribosomalen Wirkort verfügen. Außerdem besitzt **149** in seiner Linkerregion eine unter physiologischen Bedingungen negativ geladene Sulfonsäureamid-Funktionalität, welche potenziell über elektrostatische Wechselwirkungen

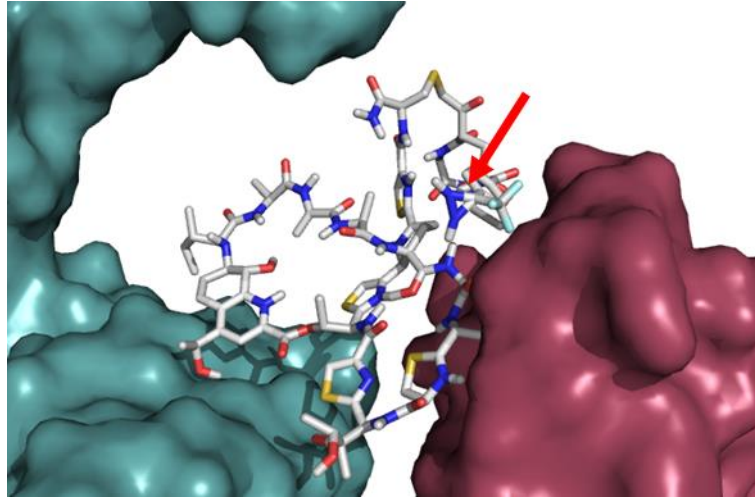
mit umliegenden Aminosäureresten bzw. Nukleotiden interagieren kann. Somit könnte **149** aufgrund der erläuterten physikochemischen Unterschiede zur Dh-Ala-MSK eine von dieser abweichende räumliche Anordnung am Ribosom aufweisen, sodass der Gefechtskopf – statt mit dem avisierten L11-Protein – mit der 23S rRNA bzw. mit umliegenden Wassermolekülen oder sogar dem Naturstoff-Grundgerüst der Sonde reagiert. Um dies zu prüfen sollte die Bindung der PAL-Sonde **151** am 70S Ribosom *in silico* modelliert werden. Hierfür wurde zunächst ein Energie-günstiges Molekülmodell von **151** generiert (Chem3D, CambridgeSoft), welches im Folgenden in die räumlichen Koordinaten des an der 50S ribosomalen Untereinheit von *D. radiodurans* gebundenen Thiostreptons **7** (PDB:3df5) angelegt wurde. Nach Konvertierung der Ligand- und Makromoleküldarstellungen in die entsprechenden pdbqt-Daten<sup>[473]</sup> erfolgte das „Docking“ über das Programm AutoDock-Vina<sup>[474]</sup> (PyrX, Scripps Research Institute Graphics Lab) mit einem iterativen lokalen und globalen Optimierungs-Algorithmus<sup>[475,476]</sup> implementiert mit einem Broyden-Fletcher–Goldfarb–Shanno-Verfahren.<sup>[477]</sup> Der potenzielle Bindungsbereich wurde dabei manuell definiert und entsprach einem Volumen von 120 Å x 60 Å x 110 Å, dessen Zentrum nahe dem Nukleotid A1067 der 23S rRNA positioniert wurde.

Insgesamt wurden neun Strukturvorschläge mit zulässigen Bindungsenergien von -5.1 bis -2.6 kcal.mol<sup>-1</sup>, jedoch relativ hohen quadratischen räumlichen Abweichungen (*RMSD lower bound*: 3.2-4.0 Å; *RMSD upper bound*: 5.5-12.5 Å) erhalten. Zur Auswertung der berechneten Bindemodi von **151**, wurden die räumlichen Koordinaten der jeweiligen Strukturvorschläge mit der zuvor genannten Röntgen-Kristallstrukturanalyse des Thiostreptons **7** an der ribosomalen 50S Untereinheit überlagert (PyMol, Delano Scientific) und auf topologische Abweichungen gegenüber dem Naturstoff untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Interaktionen der Thiazol(in)e des A Rings und der Chinaldinsäure-Einheit mit den Helices H43 und H44 der 23S rRNA gelegt.

Basierend auf diesen Kriterien wurde der in **Abbildung 4-3** dargestellte Strukturvorschlag ausgewählt. Obwohl einige der Interaktionen zwischen dem Naturstoff-Grundgerüst von **151** und der 23S rRNA signifikante Unterschiede zur experimentell aufgelösten Kristallstruktur von **7** in der 50S Untereinheit aufweisen, stimmt der vorgeschlagene Bindungsmodus im Wesentlichen mit dem von Thiostrepton **7** am GAC überein. Auch



finden die Wechselwirkungen primär zwischen dem A-Ring des Naturstoffs und den Nukleotiden A1067 und A1095 der 23S rRNA statt, wobei der B-Ring – mit Ausnahme der Chinaldinsäure-Einheit – überwiegend Lösungsmittel-ausgesetzt ist.



**Abbildung 4-3:** Darstellung des Bindemodus von Thiostrepton-PAL-Sonde **151** am GTPase-assoziierten Zentrum basierend auf einem in *silico Docking* von **151** in die Röntgen-Kristallstrukturanalyse des Komplexes zwischen **7** und der ribosomalen 50S Untereinheit aus *D. radiodurans* (PDB: 3CF5). Das L11-Protein wird in rot dargestellt, die 23S rRNA in grün. Die photoreaktive Diazirin-Einheit wird mit einem roten Pfeil markiert.

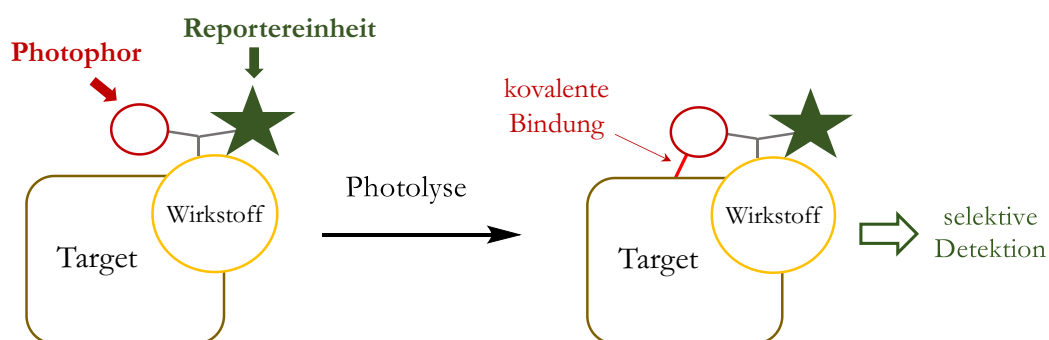
Interessanterweise zeigt das Modell eine Topologie des Photoaffinitätslabels **149**, welche sich signifikant von der in **Abbildung 4-2** dargestellten räumlichen Anordnung der Dh-Ala-MSK unterscheidet. Tatsächlich befindet sich der *Warhead* (angegeben mit einem roten Pfeil) in einer der Bindungstasche benachbarten Position, wobei er zum Thiopeptid-Grundgerüst orientiert vorliegt. Somit spricht der vorgeschlagene Bindungsmodus von **151** für die zuvor erläuterte Hypothese, nach welcher der *Warhead* nach UV-Anregung mit der affinitätstragenden Einheit der Sonde reagiert. Nichtsdestotrotz sind zur Validierung dieser Annahme weitere experimentelle Daten notwendig, wobei insbesondere die 23S rRNA als potenzielles PAL-Markierungsprodukt ausgeschlossen werden müsste.



## **5 Schlusswort**

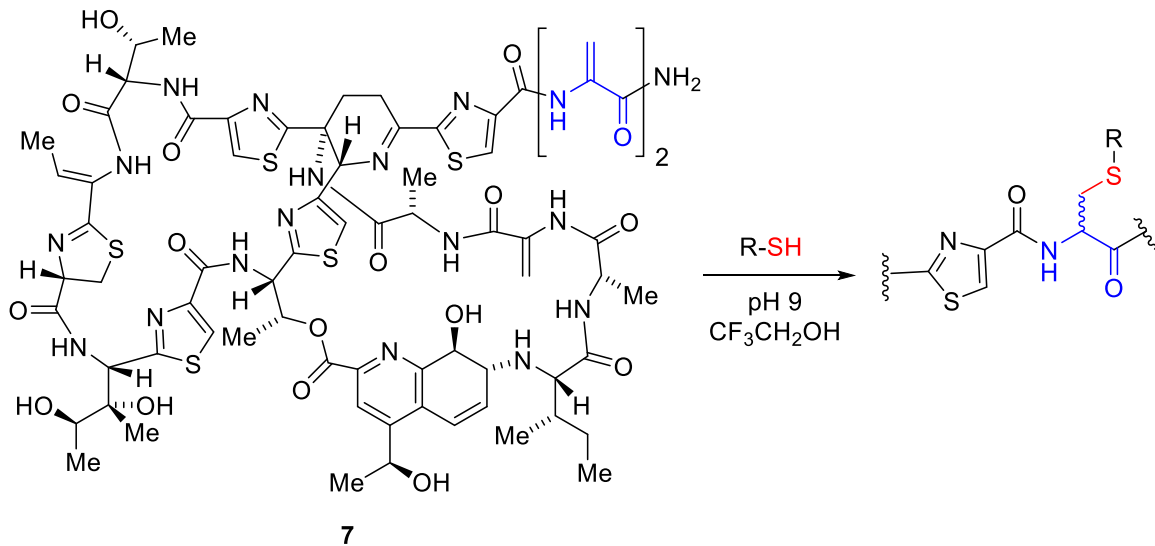
## 5.1 Zusammenfassung

Bei der Suche nach den zellulären Zielstrukturen einer biologisch aktiven Verbindung können unterschiedliche Ansätze verfolgt werden.<sup>[37,38,45,50]</sup> In der Photoaffinitätsmarkierung (PAL) wird der zu untersuchende Wirkstoff mit einer photoreaktiven Gruppe und einer Reportereinheit ausgestattet, wodurch eine lichtinduzierbare Sonde erhalten wird.<sup>[53,54,56]</sup> Diese ist dann in der Lage, mit wechselwirkenden Zielstrukturen kovalente Ligand-Protein-Komplexe zu bilden, welche über die Reportereinheit spezifisch detektiert werden können. Die Vernetzungsreaktion erfolgt dabei nach UV-Anregung, wobei das Photophor in ein hochreaktives Intermediat zerfällt, das in nahezu jede umliegende Gruppe insertieren kann.<sup>[198,209,220]</sup>



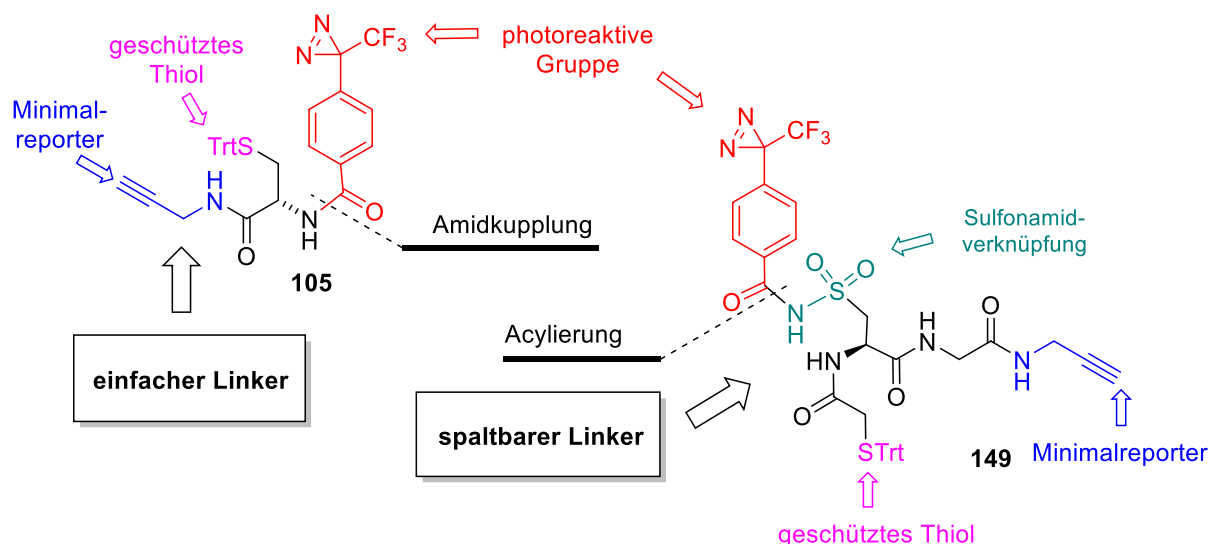
**Abbildung 5-1:** Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung (PAL).

In der vorliegenden Arbeit wurden multifunktionelle Photoaffinitätslabels entwickelt, welche semisynthetisch in ein breites Spektrum an biologisch aktiven Substanzen eingeführt werden können. Um die Anwendbarkeit der Verbindungen zu untersuchen wurde der Naturstoff Thiostrepton (siehe **Abbildung 5-2**) mithilfe der entwickelten Labels versehen und zur PAL-Sonde funktionalisiert. Thiostrepton ist der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter innerhalb der Thiopeptidantibiotika.<sup>[60,62-64]</sup> Ein wichtiges strukturelles Merkmal dieser Naturstoffklasse ist ihre hohe Abundanz an  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aminosäuren.<sup>[60]</sup> Letztere weisen elektrophile Eigenschaften auf und können als Michael-Akzeptoren fungieren.<sup>[96,129,329]</sup> Hier wurde diese Reaktivität selektiv adressiert, um die multifunktionellen Werkzeugverbindungen gezielt und effizient am Thiostrepton (**7**) anzubringen.



**Abbildung 5-2:** *Sulfa*-Michael Addition an der Dh-Ala-Molekülseitenkette von Thiostrepton (**15**).

Insgesamt wurden drei Photoaffinitätslabels hergestellt, welche jeweils eine photoreaktive Gruppe, eine Reportereinheit und ein geschütztes Thiol – für die zuvor genannte 1,4-Addition – aufwiesen. Die Kopplung der verschiedenen Elemente erfolgte dabei über zwei unterschiedliche Strategien, wobei Photophor und Reportereinheit entweder über einen multifunktionellen Linker verknüpft, oder linear innerhalb derselben funktionellen Einheit aufgebaut wurden. Für die Synthese der modular aufgebauten Labels wurden ein 3-Phenyl-3-trifluormethyldiazirin-Gefechtskopf (Tfd) und ein terminales Alkin als Minimalreporter über zwei unterschiedliche Linkersysteme kombiniert, wobei das Photophor einerseits über eine Amidbindung, andererseits über eine selektiv spaltbare *N*-Acylsulfonsäureamid-Funktionalität verknüpft wurde (**Abbildung 5-3**).



**Abbildung 5-3:** Struktur der modular aufgebauten multifunktionellen Konjugate **105** und **149**.

Über *Sulfa*-Michael-Addition konnten die hergestellten Konjugate selektiv und in guter Ausbeute am Thiostrepton installiert werden. Auch konnte bestätigt werden, dass die erhaltenen Naturstoffderivate unter UV-Einwirkung in hochreaktive Carbene zerfallen und über Kupfer induzierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition bioorthogonal umgesetzt werden können.

Vielversprechende biologische Ergebnisse lieferte das mit Label **149** funktionalisierte Thiostrepton-Derivat **151** (siehe **Abbildung 4-19**). Letztere Sonde zeigte eine dem Ausgangsnaturstoff nahezu identische biologische Aktivität und lieferte damit die Bestätigung für die Validität der entwickelten Implementierungsstrategie. Der Einbau der Sulfonsäureamid-Funktionalität erwies sich als besonders Gewinn bringend und verbesserte die Wasserlöslichkeit der Sonde signifikant. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem herausgefunden werden, dass *N*-Acylsulfonsäureamide unter milden basischen Bedingungen ohne vorherige *N*-Alkylierung selektiv hydrolysiert werden können.

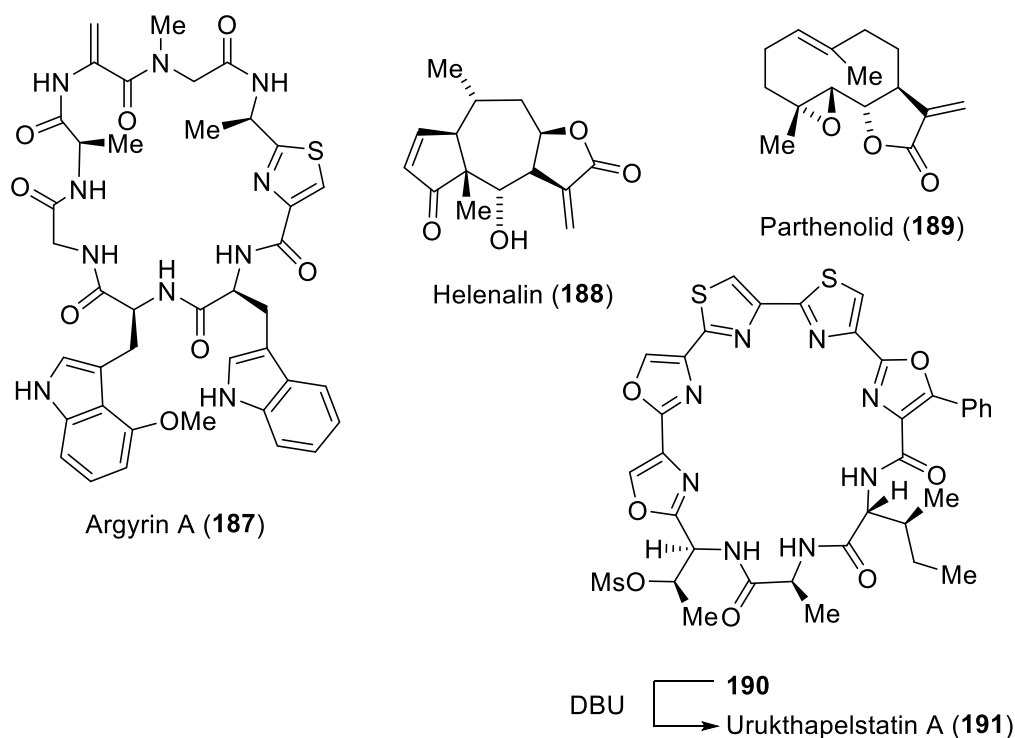
Insgesamt erfüllte das Thiostrepton-Derivat **151** alle Kriterien für einen Einsatz als PAL-Sonde. Die Anwendbarkeit des Systems zur selektiven Markierung bekannter Zielproteine des Naturstoffs konnte jedoch noch nicht bestätigt werden. Hierzu deuteten unterschiedliche experimentelle Daten darauf hin, dass PAL-Sonde **151** die Thiopeptid-Binderegion am Ribosom zwar ansteuert, der Gefechtskopf aus sterischen Gründen jedoch keine Proteine erreicht. Zur Validierung des Labels **149** sollten daher weitere Modellverbindungen untersucht werden.



## 5.2 Ausblick

Um die breite Anwendbarkeit des Photoaffinitätslabels **149** zu bestätigen sollte gezeigt werden, dass das System dazu in der Lage ist, bekannte Wirkorte biologisch aktiver Verbindungen zu markieren. Die Kalibration an Thiostrepton (**7**) ermöglichte zwar die Validierung der verschiedenen Funktionalitäten des Labels *in vitro*, jedoch nicht die Detektion bekannter Zielproteine des Naturstoffs. Um das Konzept vollständig zu belegen, sollten daher weitere Strukturen untersucht werden.

Als Modellverbindung eignet sich prinzipiell jedes Molekül, das über einen Michael-Akzeptor bzw. elektrophilen Angriffspunkt verfügt. Neben Thiopeptiden<sup>[60]</sup> kämen dafür u. a. Lantibiotika,<sup>[478,479]</sup> Microcystine,<sup>[480]</sup> diverse zyklische Peptide,<sup>[478]</sup> Sesquiterpenlactone<sup>[481]</sup> und Thiazol/Oxazol modifizierte Micrococcine<sup>[452,482]</sup> (TOMMs) in Frage. Ausgewählte Beispiele aus drei dieser Naturstoffklassen sind in **Abbildung 5-5** dargestellt.



**Abbildung 5-5:** Strukturen potenzieller Modellverbindungen für die Validierung des Photoaffinitätslabels **149**.

Argyrin A (**187**) ist ein zyklisches Octapeptid, welches aus *Myxobakterium Archangiumgephyra* isoliert wurde und antitumorale sowie immunsuppressive Eigenschaften aufweist.<sup>[482,483]</sup>



Die Dehydroalanin-Einheit innerhalb des Argyrin A-Grundgerüsts sollte sich gut für eine semisynthetische Einführung des Labels **149** über *Sulfa*-Michael-Addition eignen.

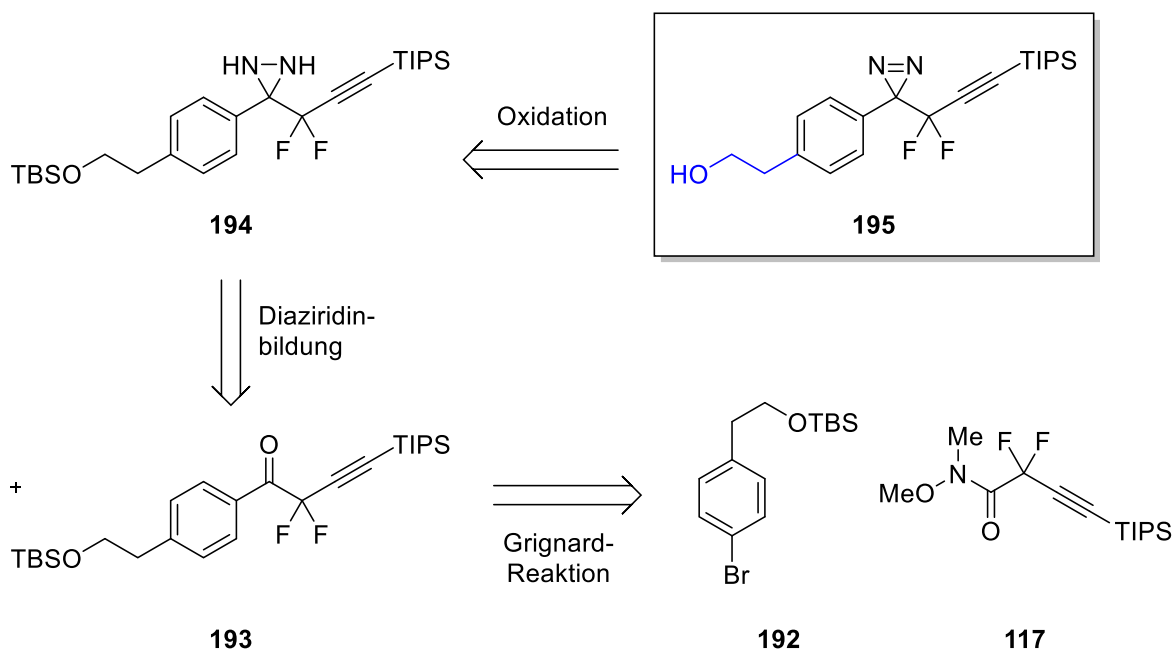
Helenalin<sup>[484]</sup> (**188**) und Parthenolid<sup>[485]</sup> (**189**) sind beide Vertreter der Sesquiterpenlactone, einer Klasse an biologisch aktiven pflanzlichen Sekundärmetaboliten zu denen mehr als 4000 Strukturen zugeteilt wurden.<sup>[481]</sup> Beide Naturstoffe besitzen Antitumor-Eigenschaften und weisen in ihrer Struktur ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Lacton-Motiv auf, welches über 1,4-Addition umgesetzt werden könnte. Ein Stereoisomer von Parthenolid wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe totalsynthetisch dargestellt,<sup>[486]</sup> sodass die grundlegenden Reaktivitäten dieses Moleküls weitgehend bekannt sind.

Urukthapelstatin A (**191**) ist ein makrozyklisches Sekundärmetabolit, welches 2007 aus *Merchercharimyces asporophorigenes* YM11-542 isoliert wurde.<sup>[487]</sup> Für das Molekül konnte eine besonders starke wachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen nachgewiesen werden, wobei der genau Wirkmechanismus noch weitgehend unbekannt ist.<sup>[487]</sup> Das makrozyklische Pentaazol-Grundgerüst von Urukthapelstatin A beinhaltet eine Dehydrobutyrin-Einheit, welche prinzipiell als elektrophilen Angriffspunkt fungieren kann, für eine Einführung des Labels **149** jedoch wahrscheinlich zu unreaktiv ist. Im vergangenen Jahr gelang unserer Arbeitsgruppe eine stereoselektive Totalsynthese von Urukthapelstatin A,<sup>[452]</sup> wobei die Bildung der Dehydrobutyrin-Einheit im letzten Schritt aus der Eliminierung der entsprechenden Mesylat-Vorstufe (**190**) erfolgte. An Letzterer Verbindung sollte Label **149** ohne weiteres addiert werden können.

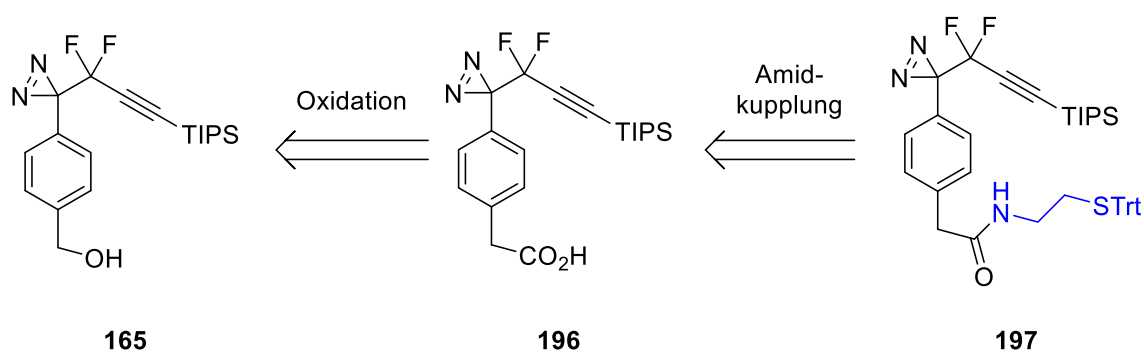
Das linkerfreie Photoaffinitätslabel **164** ist als breitanwendbare PAL-Werkzeugverbindung besonders vielsprechend, da es einerseits sterisch wenig anspruchsvoll, andererseits „postsynthetisch“ vielseitig modifizierbar ist. Zur Anwendung des Systems über *Sulfa*-Michael-Addition sollte allerdings von einer Installation der Thiolgruppe in benzylicher Position abgesehen werden. Benzyliche Thiole erzeugen nach Umsetzung über 1,4-Addition benzyliche Thioether, welche unter UV-Einwirkung in Thiyl-Radikale zerfallen und dadurch die photophysikalischen Eigenschaften des Photophors beeinträchtigen können. Um dies zu unterbinden sollte daher die Thiolfunktionalität durch mindestens ein weiteres Kohlenstoffatom vom Aryl-Grundgerüst getrennt werden. Synthetisch ließe sich das umsetzen, indem für den Aufbau des Difluorpropargylaryl-Grundgerüsts des Photophors, statt 4-Brombenzylalkohol, z. B. 4-Bromphenylethylalkohol (kommerziell verfügbar) eingesetzt wird. Ein Nachteil dieser Strategie ist jedoch, dass die Syntheseroute dadurch zu

einem relativ frühen Zeitpunkt modifiziert würde, wodurch ein Großteil der Syntheseschritte erneut optimiert werden müssten. Als Alternative könnte daher der benzyliche Alkohol zur Carbonsäure oxidiert werden und die Thiofunktionalität anschließend durch Amidkupplung – beispielsweise mit *S*-Trityl-Cysteamin – eingeführt werden. Eine Übersicht beider Optimierungsvorschläge ist **Abbildung 5-6** dargestellt.

### Strategie 1



### Strategie 2



**Abbildung 5-6:** Optimierungsvorschläge zur Installation der Thiofunktionalität am linkerfreien Photoaffinitätslabel.



---

## 6 Experimenteller Teil

## 6.1 Methoden

### 6.1.1 Geräte und Verfahren

### 6.1.2 Spektroskopie

**NMR-Spektroskopie:** NMR-Experimente wurden mit einem *Bruker Advance I 250*-, einem *Bruker Fourier 300*-, einem *Bruker Advance I 400*- und einem *Bruker Advance 600*-Spektrometer in deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt. Die Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel dienten dabei als interner Standard ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{H}} = 7.26$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 77.2$  ppm;  $\text{MeOH-}d_4$ :  $\delta_{\text{H}} = 3.31$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 49.0$  ppm;  $\text{DMSO-}d_6$ :  $\delta_{\text{H}} = 2.50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39.5$  ppm). Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in *parts per million* (ppm), die Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz angegeben. Nach Aufnahme von  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{19}\text{F}$ -Spektren erfolgte die Zuordnung der Signale meist durch zweidimensionale Experimente (COSY, DEPT 135,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC). Zur Bezeichnung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quint (Quintett), sex (Sextuplett) dd (Doppeldublett), m (Multiplet) und bs (breites Singulett).

### Massenspektrometrie

**LC-MS:** Die MS-Spektren wurden mit einem ESI-Quadrupol-MS (*Finnigan Mat LCQ*) gemessen. Die Trennung erfolgte mittels einer HPLC-Anlage der Firma *Shimadzu*. Das System bestand aus einer *LC-10 AT VP* Pumpe, einem *SIL 10 AD VP Autosampler*, einem *CTO-10 AC VP* Säulenofen und einem *SPD-10 A VP UV-Vis* Detektor. Als Trennsäule wurde eine *EC 125/4 Nucleodur C18 ISIS 3  $\mu\text{m}$*  Säule (*Macherey & Nagel*) eingesetzt. Als mobile Phase wurden  $\text{H}_2\text{O}$  (A) und MeCN (B) bei einer Flussrate von 1 mL/min eingesetzt. Folgende Trennungsmethode wurde verwendet: 10 Vol.-% B für 1 min; 10 Vol.-% bis 95 Vol.-% B in 10 min; 95 Vol.-% B für 9 min. Die Detektion erfolgte über UV-Vis Absorption (Monochromator, 254 nm) bzw. in einem Quadrupol nach ESI-Ionisierung im positiven Modus.

**GC-MS:** Das System bestand aus einer 6890 GC-Anlage der Firma *Hewlett Packard*, ausgestattet mit einem *Agilent 7683 Series Autosampler* und einem *HP 5973 Mass Selective EI-Quadrupol-Detektor*. Als Trennsäule wurde eine Kieselglas-Kapillare der Firma *SGE* (25 m Länge, 0.22  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser) verwendet, als Trägergas He mit einem Durchfluss von 1 mL/min.

**HRMS:** Hochaufgelöste MS-Spektren wurden mit einer ESI-TOF-Anlage *maXis Impact* (Bruker Daltonics, Bremen) aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte über Direktinjektion bzw. nach HPLC Trennung (*Thermo Scientific*). Als Trennsäule wurde eine *EC 150/3 Nucleodur C4 5  $\mu\text{m}$  Säule* (*Macherey & Nagel*) eingesetzt, wobei H<sub>2</sub>O (A) und MeCN (B) als Eluent dienen. Zur Kalibrierung im Massenbereich 100-1000 Da wurde eine Salzcluster-Lösung (Natriumformiat) eingesetzt. Für den Massenbereich 1000-3000 Da wurde ein kommerzielles Peptidgemisch (*ESI-L-Low Concentration Tuning Mix, Agilent*) verwendet.

**MALDI-TOF:** Die Spektren wurden mit einer *Voyager DE<sup>TM</sup>Pro Biospectrometry Workstation* (Applied Biosystems) aufgenommen. Die Proben wurden zur Ionisierung zunächst mit folgenden Matrices in einem 1 zu 1 Verhältnis gemischt:

**CHCA** ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure): 10 mg/mL in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1) mit 0.4 Vol.-% TFA

**DHAP** (2',5'-Dihydroxyacetophenon): 10 mg/mL in *i*-PrOH mit 1.5 mg/mL Diammoniumhydrogencitrat

**DHB** (2,5-Dihydroxybenzoesäure): 10 mg/mL in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1) mit 0.1 Vol.-% TFA

**SA** (Sinapinsäure): 10 mg/mL in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1) mit 0.4 Vol.-% TFA

Analytlösung (0.5  $\mu\text{L}$ ) und Matrix-Lösung (0.5  $\mu\text{L}$ ) wurden auf dem Probenträger aufgetragen und sanft mechanisch gemischt. Nach Verdunsten der Lösungsmittel erfolgte die Messung. Zur Kalibrierung wurde das *ProteoMass Peptide & Protein Maldi-MS Calibration Kit* der Firma *Sigma* eingesetzt.

**IR-Spektroskopie:** IR-Spektren wurden mit einem *Shimadzu IRAffinity-I* Spektrometer gemessen. Die Proben wurden direkt auf die Diamant-Messfläche der ATR-Einheit aufgetragen und gemessen. Öle wurden ohne Fixierung gemessen, Feststoff mittels

Anpressstempel fixiert oder als Lösung aufgetragen und nach Verdunsten des Lösungsmittels gemessen.

**UV-Vis Spektroskopie:** UV-Vis Absorptionsspektren wurden mit einem *Jasco V-630 Spectrophotometer* durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Quarz-Küvetten mit einer 1 cm Schichtdicke, wobei eingehende UV-Strahlung mittels einer Deuteriumlampe (190-350 nm) und eingehende Vis-Strahlung mit einer Halogenlampe (330-1100 nm) erzeugt wurden. Die Proben wurden die Anlage mit einem Peltier-Element temperiert.

**UV-Vis/Fluoreszenz-Plattenleser:** Die Messungen wurden mit einem *Tecan Infinite M200* Plattenleser durchgeführt. Absorptionsmessungen wurden in transparenten Mikrotiterplatten (96 well BRANDplates®, mit F-Boden) realisiert, Fluoreszenzmessungen in schwarzen 384-Loch Platten (*Optiplate 384 T, Black Opaque, PerkinElmer*).

### 6.1.3 Qualitative Analytik

**Schmelzpunktbestimmung:** Schmelzpunkte wurden an einem *Büchi Heizmikroskop B-545* in offenen Kapillaren bestimmt und sind unkorrigiert.

### 6.1.4 Mikrobiologische Arbeiten und Zellkultur

**Autoklav:** Die Dampfsterilisation von Nährmedien und biologischen Abfällen wurde bei 2 bar und 121 °C mit einem *DE-45 Autoklav* der Firma *Systec* durchgeführt. Zur Kontrolle des Autoklaviervorgangs wurde Autoklavierband (*Carl Roth*) eingesetzt.

**Sicherheitswerkbank:** Mikrobiologische Arbeiten und Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer *Thermo Scientific Safe 2020* Sicherheitswerkbank (Klasse II) realisiert. Die Desinfektion der Arbeitsfläche erfolgte durch UV-Belichtung (1 h) mittels UV-Strahlern, welche in den Seitenwänden eingebauten waren.

**Kompressionstiefkälte-Schrank:** Die Aufbewahrung von Zelllinien und Bakterienstämme als Glycerol-Lösungen erfolgte in einem HERAfreeze™ HFU T Serie -86 °C-Ultratiefkühlschrank der Firma *Thermo Scientific*.

**Schüttelinkubator:** Bakterien-Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyer-Glaskolben mit einem *MaxQ 436 HP*-Orbitalschüttler (*Thermo Scientific*) angezogen. Temperatur und Drehzahl wurden elektronisch geregelt.

**Brutschrank:** Die Anzucht von Bakteriellen Kulturen auf Festmedium wurde in einem *HERA THERM Incubator*-Schrank der Firma *Thermo Scientific* realisiert.

**Ultraschall-Homogenisator:** Die Zellen wurden mit einem *Sonopuls HD 2070 Ultrasonic homogenizer* (*Bandelin*) mit Mikrospitze ( $\varnothing$  3 mm) aufgebrochen. Die Prozedur erfolgte in einem Schutzgehäuse der Firma *Branson*, wobei die Proben im Eisbad auf 0 °C temperiert wurden.

### 6.1.5 Biochemische Arbeiten

**Zentrifugal-Vakuumkonzentrator:** Kleinere Flüssigkeitsmengen wurde in 1.5 mL Reaktionsgefäßen (*Eppendorf*) oder 2 mL HPLC-Glasgefäßen (*Macherey Nagel*) mit einer „Speed-Vac“ der Firma *Eppendorf* (*Concentrator 5301*) bei 1000 rpm eingengt.

**Zentrifuge:** Es wurde eine gekühlte *Eppendorf 5804 R* Zentrifuge verwendet, welche mit zwei Festwinkel-Rotoren ausgestattet war. Zur Zentrifugation von Mikrotiterplatten wurde der Zentrifugal-Vakuumkonzentrator eingesetzt, wobei die Vakuum-Funktion ausgestellt und der Festwinkel-Rotor gegen einen Ausschwing-Rotor getauscht wurde.

**Thermomixer:** Zum Schütteln (bis 1200 rpm) und Temperieren von 1.5 mL Reaktionsgefäßen wurde ein ThermoShaker TSC® der Firma *Biometra* eingesetzt.



**Gelelektrophorese:** Zur Auftrennung von Protein-Gemischen wurde eine *Mini-Protean Tetra Cell*-Elektrophoresekammer der Firma *BIO-RAD* bzw. ein *PÄQUIV.LAB Perfect Blue*-System mit jeweils zugehörigen Netzgeräten verwendet.

**Semidry Elektrotransfer-System:** Für den Elektrotransfer von Proteinen auf Membranfilter wurde ein *PerfectBlue Semi-Dry-Blotter* der Firma *PÄQUIV.LAB* verwendet. Das Western Blot-„*Sandwich*“ wurde auf der Plattenelektrode gelegt, wobei die Trägermembran anodenseitig und das Gel kathodenseitig lagen. Das Fixieren des Konstrukts erfolgte durch Festschrauben des Sicherheitsdeckels. Zum Anlegen der Stromspannung wurde ein *pÄquiv.POWER*-Netzgerät (*PÄQUIV.LAB*) verwendet.

**Geldokumentationskammer:** Elektrophorese-Gels und Western Blot-Trägermembranen in einem *BioDocAnalyse BDA Live*-System der Firma *Analytik Jena* dokumentiert. Zur Durchleuchtung der Gele wurde ein LED-Transilluminator eingesetzt. Die Kammer war zusätzlich mit obenliegenden UV-Lampen bei 254 nm und 365 nm ausgestattet. Die Erfassung erfolgte mittels einer CCD-Kamera.

## 6.1.6 Chromatographie

**Dünnschichtchromatographie:** Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf beschichteten Aluminium-Platten der Firma *Merck* (Kieselgel 60, F254). Die Platten waren mit zwei anorganischen Fluoreszenzindikatoren (BaS und Zn-Silikat mit Mn dotiert) beschichtet, die eine UV-Löschung durch Substanzen bei 254 bzw. 360 nm zeigen. Alternativ wurden die Platten zur Detektion mit folgenden Mischungen und anschließendem Erhitzen angefärbt.

**KMnO<sub>4</sub>-Lösung:** 1.5 g KMNO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 250 mg NaOH, 150 mL H<sub>2</sub>O

**Ninhydrin-Lösung:** 300 mg Ninhydrin, 100 mL EtOH, 2 mL AcOH

**Ellmans Reagenz:** 2 mM DTNB, 50 mM NaOAc in H<sub>2</sub>O

**Ehrlichs Reagenz:** 0.5 g DMABA in 200 mL *t*PrOH

**Säulenchromatographie:** Es wurde Kieselgel der Firma *Macherey & Nagel* (MN Kieselgel 60 M,  $\phi$  40 - 73  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einem Überdruck von 0.1 bis 1 bar mit einem Massenverhältnis zwischen stationärer Phase und Analyt von 100:1.

**Analytische HPLC (Umkehrphase):** Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Varian* verwendet. Das System bestand aus einer *Varian ProStar 230* Pumpe, einem *ProStar Model 410 Autosampler*, einem *Reodyne LabPro* Säulenwechsler und einem *ProStar 335 UV-Vis* Detektor (Photodiodenzeile). Als Trennsäule wurde eine *EC 125/4 Nucleodur C18 Isis 3  $\mu\text{m}$*  Säule eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden als HPLC-rein („HPLC grade“) kommerziell von *VWR* bezogen. Zur Trennung kamen folgende Methoden mit einer Flussrate von 1 mL/mL zum Einsatz:

**Methode A:**

A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 10 % für 1 min; 10 % bis 100 % in 10 min; 100 % für 3 min.

**Methode B:**

A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 10 % für 1 min; 10 % bis 95 % in 15 min; 95 % für 3 min.

**Methode C:**

A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 30 % für 1 min; 30 % bis 100 % in 8 min; 100 % für 7 min.

**Methode D:**

A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 % TFA, B:  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.1 % TFA: 10 % für 1 min; 10 % bis 95 % in 10 min; 95 % für 3 min.

**Methode E:**

A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 30 % für 1 min; 30 % bis 100 % in 7 min; 100 % für 10 min.

**Präparative HPLC (Umkehrphase):** Präparative HPLC-Trennungen wurden ebenfalls mit einer Anlage der Firma *Varian* durchgeführt. Das System bestand aus einer *Varian ProStar Solvent Delivery Module 215* Pumpe, einem *ProStar Model 701* Fraktionssammler, und einem *ProStar 340 UV-Vis* Detektor (Monochromator). Als stationäre Phase wurde eine *VP 250/21 Nucleodur C18 Gravity 5  $\mu\text{m}$*  Säule eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden als HPLC-rein („HPLC grade“) kommerziell von *VWR* bezogen, wobei  $\text{H}_2\text{O}$  (Reinstwasser, *Millipore Advantage milliQ*) vor Benutzung über einen Zeitraum von 20 min im Ultraschallbad entgast wurde. Die Trennungen erfolgten mit Flussraten von 10 bis 20 mL/mL.

## 6.2 Biochemische Materialien

Produkt	Bezugsquelle	Beschreibung
20 S Proteasom	<i>Enzo Life Sciences</i>	Gereinigt aus humanen Erythrozyten, 1 mg/mL in 20 mM TRIS-Puffer pH 7.2 mit 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN <sub>3</sub> mit 50 Vol.-% Glycerin
Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC	<i>Bachem</i>	Pulver, gefriergetrocknet
Ampicillin	<i>Carl Roth</i>	Natriumsalz
Biotin-markiertes BSA	<i>Sigma Aldrich</i>	Pulver, gefriergetrocknet, 6-8 mol Biotin pro mol BSA
Boc-Leu-Arg-Arg-AMC	<i>Biomol</i>	Pulver, gefriergetrocknet
Bortezomib	<i>Selleck</i>	Pulver, gefriergetrocknet
BSA	<i>Sigma Aldrich</i>	Pulver, gefriergetrocknet
Dialyse-Membran	<i>Spectra/ Por®</i>	Cellulose, 1 kDa MWCO, Vol./Länge 5.1 mL/cm
Epoxomycin	<i>Calbiochem</i>	Pulver, gefriergetrocknet
FBS (fetales Kälberserum)	<i>Sigma Aldrich</i>	steril-filtriert, < 20 mg/L Hemoglobin, < 10 EU/mL Endotoxin
Kanamycin	<i>Carl Roth</i>	Sulfatsalz
MG 132	<i>Sigma Aldrich</i>	Pulver, gefriergetrocknet
Primärantikörper $\alpha$ -Biotin	<i>Sigma Aldrich</i>	Epitope: Biotin, IgG, monoklonal, Maus (BN-34 Hybridom)
Primärantikörper $\alpha$ -His <sub>6</sub>	<i>Sigma Aldrich</i>	Epitope: His <sub>6</sub> , IgG, monoklonal, Maus (BALB/c Hybridom)

Proteinstandard PageRuler™	<i>Thermo Scientific</i>	10 Banden, 10-180 kDa
Proteinstandard PageRuler Plus™	<i>Thermo Scientific</i>	9 Banden, 10-250 kDa
Proteinstandard Precision Plus Protein Dual Color™	<i>Bio-Rad</i>	10 Banden (His <sub>6</sub> -markiert), 10- 250 kDa
Sekundäranikörper Immun- Star™ Goat α- Mouse(GAM)-HRP Conjugate	<i>Bio-Rad</i>	Epitope: IgG-Maus-schwere Kette, 0.8 mg/mL in 10 mM Phosphatpuffer, mit 250 mM NaCl, 15 mg/mL BSA, 0.01 Gew.-% Thimerosal, pH 7.6
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	<i>Biomol</i>	Pulver, gefriergetrocknet
SulfoLink™ Kupplungsharz	<i>Thermo Scientific</i>	Agarose-Körnchen mit 6 mol.-% Iodacetyl-Vernetzung, 50 Gew.-% Suspension in 10 mM EDTA, 0.05 Gew.-% NaN <sub>3</sub> mit 50 Vol.-% Glycerin
Thiostrepton	<i>Calbiochem</i>	Pulver, gefriergetrocknet
Trypsin-EDTA	<i>Sigma Aldrich</i>	0.25 Gew.-% Trypsin (Schwein), 0.02 Gew.-% Na <sub>2</sub> EDTA in Hanks Salzlösung mit Phenolrot, pH 7 -7.6, steril-filtriert

## 6.3 Pufferlösungen

### Ammonium-Acetatpuffer

20 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$   
pH 6.8

### Michael-Additionspuffer

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
pH 9

### PIPES-Puffer

20 mM PIPES  
pH 6.8

### TPB-Puffer

50 mM Tris  
11 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
1.12 mM EDTA  
pH 8

### Boratpuffer

20 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$   
pH 8.2

### MOPS-Puffer

20 mM MOPS  
pH 7.1

### Sulfonamid-

### Spaltungspuffer

0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$   
pH 10.5

### Triethylammonium-

### Acetatpuffer

20 mM  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$   
pH 7.0

### HEPES-Puffer

20 mM HEPES  
pH 7.5

### CuAAC-Puffer

20 mM  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
pH 8.2

### TES-Puffer

20 mM TES  
pH 7.5

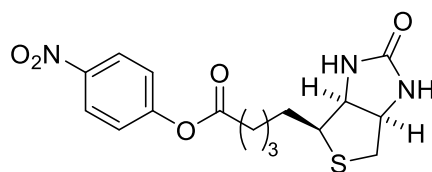
## 6.4 Reagenzien und Lösungsmittel

Alle Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros*, *Alfa-Aesar*, *Calbiotech*, *Carl Roth*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Merck*, *Novabiochem* oder *Sigma-Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

$\text{CuI}$  wurde zur Reinigung in siedender gesättigter  $\text{NaI}$ -Lösung für ca. 30 min unter Rückfluss gerührt. Danach wurde die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  (ca. 200 Vol.-%) versetzt und filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde dann sukzessiv mit  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\text{EtOAc}$  sowie  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend über Nacht im HV getrocknet.<sup>[488]</sup>

$\text{TsCl}$  wurde zur Reinigung aus Toluol/Petrolether bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  kristallisiert.

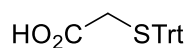
Wasserfreies  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde durch Destillation von  $\text{CaH}_2$  erhalten. THF und  $\text{Et}_2\text{O}$  wurden von blauem Natrium/Benzophenon bei Rückfluss entwässert und abdestilliert.  $\text{NEt}_3$  wurde über  $\text{BaO}$  destilliert.  $\text{MeOH}$  und  $\text{MeCN}$  wurden über aktiviertem  $3\text{ \AA}$  Molsieb entwässert. Wasserfreies Dimethylformamid wurde von *Sigma-Aldrich* bezogen und über  $3\text{ \AA}$  Molsieb gelagert.

**(+)-Biotin-4-nitrophenylester<sup>[489]</sup>****198**

(+)-Biotin (100 mg, 0.4 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei 50 °C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in 1.2 mL wasserfreiem DMF gelöst. Nach Zugabe von 4-Nitrophenol (56 mg, 0.4 mmol, 1 Äquiv.) und DCC (82.5 mg, 0.4 mmol, 1 Äquiv.) wurde die Lösung 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend über Kieselgel filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand mit Et<sub>2</sub>O (3 x 3 mL) gewaschen. Nach Umkristallisation aus H<sub>2</sub>O konnte das Produkt als kristalliner gelber Feststoff (68 mg, 0.186 mmol, 46.5% Ausbeute) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 8.31 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.07 Hz, Ar CH), 7.44 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 9.07 Hz, Ar CH), 4.50 (m, 1 H, -NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-), 4.35 (m, 1 H, -NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 3.47 (m, 1 H, -CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.25 (m, 1 H, -CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.95 (dd, 1 H, <sup>2</sup>J = 12.6 Hz, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, -NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 2.69 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, -O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.80 (m, 2H, -O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.63 (m, 2H, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.21 (m, 2H, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

Die NMR-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[489]</sup> überein.

**S-Triethylmercaptoessigsäure<sup>[490]</sup>****199**

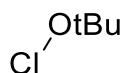
Mercaptoessigsäure (0.695 mL, 10 mmol) wurde bei 0 °C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in TFA (19.7 mL) gelöst. Nach 30 min wurde TrtOH (2.6 g, 10 mmol) unter Rühren hinzugegeben, wobei sich die Reaktionsmischung intensiv rot färbte. Nach 2 h (RT) wurde die Reaktionsmischung auf 0°C gekühlt. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 4N NaOH-Lösung der pH-Wert auf 10-11 eingestellt und die Lösung mit Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL) gewaschen.

Durch Zugabe von HCl 1N wurde dann auf pH 2-3 angesäuert und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Thioether **27** (2.97 g, 8.9 mmol, 89%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 9.59 (s, 1 H, TrtSCH<sub>2</sub>COOH), 7.28 (m, 15 H, Trt), 3.06 (s, 2 H, TrtSCH<sub>2</sub>COOH)

Die NMR-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[490]</sup> überein.

### *t*-Butylhypochlorid<sup>[491]</sup>



**200**

*t*-BuOH (9.4 mL, 0.1 M, 1 Äquiv.) wurde mit AcOH (6.9 mL, 0.12 M, 1.2 Äquiv.) versetzt und bei 0 °C gerührt. Nach 20 min wurden 57 mL einer 13 Gew.-% Lösung aus NaOCl (8.93 g, 0.12 M, 1.2 Äquiv.) in H<sub>2</sub>O hinzugegeben, wodurch sich die Reaktionsmischung augenblicklich intensiv gelb färbte. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit 10 Gew.-% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 10 mL) gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert und unter Inertgasatmosphäre gelagert.

## 6.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### **Darstellung und Titration von Magnesiumorganyleen zur Grignard-Reaktion (AV1):**

Das kommerziell bezogene Magnesium lag als Pulver vor und wurde über Nacht bei 120 °C getrocknet. Alle eingesetzten Glasgeräte wurden vor Benutzung sorgfältig ausgeheizt. Das Magnesium (2.5 Äquiv.) wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O oder THF (150 mg/mL) mit I<sub>2</sub> (0.025 Äquiv.) versetzt und bei RT intensiv gerührt. Die anfänglich klar-braune Lösung wurde allmählich trüb und wies nach ca. 30 min nur noch eine leicht gelbe Färbung auf. Ein Drittel des Bromids (3 bis 10 M-Lösung in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O bzw. THF) wurde dann vorsichtig hinzugegossen und die Reaktion unter starker Wärmeentwicklung initiiert. Häufig setzte die Reaktion nicht spontan ein. In diesem Falle

wurde der Inhalt des Kolbens mit einem Heißluftgebläse leicht erhitzt und die Bildungsreaktion so in Gang gebracht. Anschließend wurde das restliche Bromid hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, um eine möglichst quantitative Umsetzung zu erreichen. Der Kolbeninhalt wurde dann unter Inert-Bedingungen filtriert und die erhaltene graubraune metallische Lösung ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Zur Bestimmung der Konzentration an Magnesiumorganyl wurde die Methode von *Watson und Eastham*<sup>[492]</sup> eingesetzt. Hierfür wurde eine Lösung aus (+)-Menthol (1 M) und 1,10-Phenanthrolin (1.38 mM) in wasserfreiem THF unter Ar-Atmosphäre mit der Grignard-Verbindung versetzt, bis eine dunkelrote bis violette Färbung zu beobachten war.

**Synthese von Carbonsäureamiden mit EDC/HOBt und NEt<sub>3</sub> (AV2):** Die Carbonsäure wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.1 M) gelöst und bei 0 °C gerührt. Parallel wurde EDC·HCl (1.2 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.1 M) mit HOBt (1.1 Äquiv.) und NEt<sub>3</sub> (3.5 Äquiv.) unter Ar-Atmosphäre versetzt und 30 min bei 0 °C gerührt. Beide Lösungen wurden vereinigt und die erhaltene Mischung bei 0 °C weiter gerührt. Nach 30 min wurde das Amin (1.1 Äquiv.) in Form einer DMF-Lösung (0.1 M, wasserfrei) bei 0 °C langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt.

**Darstellung von Sulfonamiden aus Disulfiden (AV3)<sup>[451]</sup>:** Das Disulfid wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre mit 18 Äquiv. TBAC in einem 1 zu 1 Gemisch aus Toluol/H<sub>2</sub>O (0.1 M) gelöst und bei 0 °C gerührt. Nach 20 min wurde NCS (15 Äquiv.) portionsweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung (intensiv gelb) für 10 min bei 0 °C weitergerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Toluol (2 x 25 Vol.-% der Reaktionslösung) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mittels Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und ohne zusätzliche Reinigung umgesetzt. In die erhaltene Lösung wurde anschließend NH<sub>3(g)</sub> bei RT über einen Zeitraum von 30 min eingeleitet und die Reaktionsmischung für weitere 1.5 h gerührt.

**Sulfa-Michael-Addition (AV4)<sup>[96]</sup>:** Thiol und Michael-Akzeptor wurden unter Ar-Schutzgasatmosphäre jeweils im gleichen Volumen an TFE gelöst (15 mM). Die Michael-



Akzeptor-Lösung wurde anschließend mit Michael-Additionspuffer (vgl. **1.4**) im Verhältnis 1 zu 1 sowie 5.0 Äquiv.  $\text{NEt}_3$  versetzt. Nach Zugabe des Thiols in die Michael-Akzeptor-Lösung wurde die Reaktionsmischung bis zur vollständigen Umsetzung (16-22 h) bei RT gerührt.

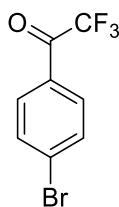
**Azidtransfer (AV5)**<sup>[460]</sup>:  $\text{NaN}_3$  (6 Äquiv. pro  $\text{NH}_2$ -Gruppe) wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in einem 1 zu 1 Gemisch aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (4 M) gelöst und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach 30 min wurde  $\text{Tf}_2\text{O}$  (3 Äquiv. pro  $\text{NH}_2$ -Gruppe) vorsichtig hinzugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  intensiv gerührt. Nach Zugabe von gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (200 Vol.-% der Reaktionslösung) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 100 Vol.-% der Reaktionslösung) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einem zusätzlichen Waschschriff mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (100 Vol.-% der Reaktionslösung) unterzogen und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Das Amin wurde mit  $\text{ZnSO}_4$  als Katalysator (0.02 mol.-%) und  $\text{NEt}_3$  (3.5 Äquiv.) unter Ar-Schutzgasatmosphäre in einem 5 zu 1 Gemisch aus  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (0.1 M) gelöst und bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach 20 min wurde die Lösung von  $\text{TfN}_3$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung bis zur vollständigen Umsetzung (ca. 2 h) bei RT gerührt.

**Kupfer katalysierte Huisgen 1,3 - dipolare Cycloaddition (AV6)**: Das Alkin wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem THF (25 mM) gelöst. Parallel wurde das Azid (1.2 Äquiv.) in wasserfreiem THF (12.5 mM) mit  $\text{CuI}$  (1.2 Äquiv.) und  $\text{NEt}_3$  (0.5 Äquiv.) unter Ar-Atmosphäre versetzt. Nach Vereinigung beider Lösungen wurde die erhaltene Reaktionsmischung über Nacht bei RT und unter Lichtausschluss gerührt.

## 6.6 Synthese des *para*-carboxysubstituierten 3-Aryl-3-trifluormethyldiazirin-Photophors nach Bender *et al.*<sup>[436]</sup>

### Synthese von 4-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon



**103**

1,4-Dibrombenzol (10 g, 42.4 mmol) wurde mit Magnesium (2.57 g, 106 mmol, 2.5 Äquiv.) und I<sub>2</sub> (53 mg, 0.424 mmol, 0.01 Äquiv.) in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (17 mL) nach **AV1** zur entsprechenden Grignard-Verbindung umgesetzt. Das Magnesiumorganyl wurde im Anschluss über eine Transfer-Kanüle bei -78 °C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre langsam in eine Lösung aus Trifluoressigsäureethylester (6.0 g, 42.4 mmol, 1.0 Äquiv.) in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (100 mL) überführt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Gesättigte NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (30 mL) wurde zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase 2 x mit Et<sub>2</sub>O (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden im Anschluss mit H<sub>2</sub>O (100 mL) gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Nach Vakuum-Destillation (Kugelrohr) des Rückstandes wurde Keton **103** (4.66 g, 18.4 mmol, 44%) als farbloser Feststoff erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.43 (*n*-Heptan/EtOAc, 3:1)

**Sdp.:** 38-41 °C (2.6·10<sup>-2</sup> mbar)

[Lit. Sdp.: 45-47°C (5.0·10<sup>-2</sup> mbar)]<sup>[436]</sup>

#### **<sup>1</sup>H-NMR:**

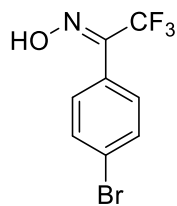
250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.92 ppm (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, Ar CH), 7.74-7.65 (m, 2H, Ar CH)

#### **<sup>13</sup>C-NMR:**

63 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 180 ppm (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.5 Hz, Ar-CO-CF<sub>3</sub>), 133.5 (Ar CH), 132.9 (Ar CH), 129.0 (Ar C<sub>quart</sub>), 116.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 291.1 Hz, Ar-CO-CF<sub>3</sub>)

170

## Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2,2,2-trifluor-*N*-hydroxyethanimin

**123**

Keton **103** (3.78 g, 14.9 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit NH<sub>2</sub>OH·HCl (1.04 g, 14.9 mmol, 1.0 Äquiv.) in einem wasserfreien Pyridin/EtOH-Gemisch (1:1, 16 mL) gelöst und bei 60 °C gerührt. Nach 2.5 h wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in H<sub>2</sub>O (50 mL) aufgenommen und mit Et<sub>2</sub>O (3x100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (*n*-Heptan/EtOAc 4:1) wurde Oxim **123** als hellgelber Feststoff (1.93 g, 7.2 mmol, 49% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:** 72-74 °C (Lit. 75-80 °C)<sup>[436]</sup>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.45 (*n*-Heptan/EtOAc 3:1)

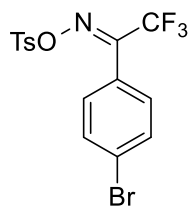
### **<sup>1</sup>H-NMR:**

250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 9.04 ppm (bs, 1H, OH-N=C-), 7.64 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, Ar CH), 7.43 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, Ar CH)

### **<sup>13</sup>C-NMR:**

63 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 147.2 ppm (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 32.8 Hz, -N=C-CF<sub>3</sub>), 132.3 (Ar CH), 130.7 (Ar CH), 125.8 (Ar C<sub>quart</sub>), 124.9 (Ar C<sub>quart</sub>), 120.71 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 274.8 Hz, -N=C-CF<sub>3</sub>)

**Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2,2,2-trifluor-N-[(4-toluolsulfonyl)oxy]ethanimin**



**122**

Oxim **123** (2.2 g, 8.2 mmol, 1 Äquiv.) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit NEt<sub>3</sub> (1.66 mL, 12.3 mmol, 1.5 Äquiv.) und DMAP (0.2 g, 1.64 mmol, 0.2 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14 mL) versetzt und die Lösung bei -10 °C gerührt. Nach 30 min wurde eine Lösung aus TsCl (1.71 g, 9.0 mmol, 1.1 Äquiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) langsam zugetropft, die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und 3 h gerührt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O (50 mL) und Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Nach Umkristallisation aus EtOH, wurde das Tosylat **121** als farbloser Feststoff (2.71 g, 6.42 mmol, 79% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:** 136 °C (Lit. 133-135 °C)<sup>[436]</sup>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.64 (Toluol)

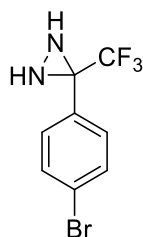
**<sup>1</sup>H-NMR:**

250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.89 ppm (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, Ar CH), 7.63 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, Ar CH), 7.39 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, Ar CH), 7.28 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, Ar CH), 2.48 (s, 3H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, H<sub>3</sub>C-Ar-SO<sub>2</sub>-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

63 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 153.4 ppm (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 34.0 Hz, -N=C-CF<sub>3</sub>), 146.7 (Ar C<sub>quart</sub>), 132.6 (Ar CH), 131.4 (Ar C<sub>quart</sub>), 130.3 (Ar CH), 129.6 (Ar CH), 126.9 (Ar C<sub>quart</sub>), 123.7 (Ar C<sub>quart</sub>), 119.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 274.8 Hz, -N=C-CF<sub>3</sub>)

## Synthese von 3-(4-Bromphenyl)-3-(trifluormethyl)diaziridin

**102**

Tosyloxim **122** (2.46 g, 5.82 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Rühren gelöst. Nach 30 min wurde  $\text{NH}_3(\text{g})$  über einen Zeitraum von 15 min in die Lösung eingeleitet und kondensiert (ca. 15 mL  $\text{NH}_3(\text{l})$ , 10.2 g, 0.6 mol, 103 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde dann 4 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und anschließend über Nacht auf RT erwärmt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) aufgenommen und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Diaziridin **102** wurde als hellgelber Feststoff (1.34 g, 5 mmol, 86% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:**  $49\text{-}51\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lit.  $47\text{-}48\text{ }^{\circ}\text{C}$ )<sup>[436]</sup>

**DC:**  $R_f = 0.21$  (Toluol)

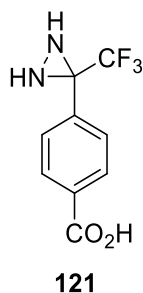
 **$^1\text{H-NMR}$ :**

250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 7.63 - 7.40$  ppm (m, Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 2.80 (d, 1H,  $^3J = 7.6$  Hz,  $-\underline{\text{NH}}$ ), 2.19 (d, 1H,  $^3J = 8.1$  Hz,  $-\underline{\text{NH}}$ )

 **$^{13}\text{C-NMR}$ :**

63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 132.4$  ppm (Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 131.1 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{quart}}$ ), 130.1 (Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 125.0 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{quart}}$ ), 123.6 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{quart}}$ ), 119.8 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 278.3$  Hz,  $-\underline{\text{CF}}_3$ ), 58.0 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.3$  Hz,  $-\underline{\text{C}}-\text{CF}_3$ )

### Synthese von 4-[3-(Trifluormethyl)diaziridin-3-yl]benzoesäure



#### TMS-Schützung

Zu einer Lösung aus Diaziridin **102** (1.34 g, 5 mmol, 1 Äquiv.) und NEt<sub>3</sub> (4.72 mL, 35 mmol, 7 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL) wurde bei -78 °C und unter Inertgasatmosphäre TMSOTf (1.98 mL, 11 mmol, 2.2 Äquiv.) langsam zugetropft. Nach 1 h wurde die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und über Nacht weitergerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand mittels Benzol (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden anschließend unter vermindertem Druck eingengt und erneut mittels n-Hexan (3 x 10 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels, wurde das *N*-geschützte Diaziridin (1.26 g, 3.07 mmol, 61% Ausbeute) als farbloser Feststoff erhalten und weiter umgesetzt.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.48 (n-Heptan/EtOAc, 2:1)

#### Einführung der Carboxylfunktion

Das TMS-geschützte Diaziridin wurde bei -78 °C nach Einrichten einer N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem THF (100 mL) unter Rühren gelöst. Nach 30 min wurde *n*BuLi (2.11 mL, 3.37 mmol, 1.1 Äquiv., 2.5 M in *n*-Hexan) hinzugegeben und die tiefrote Lösung 1 h bei -78 °C weitergerührt. Dann wurde CO<sub>2</sub>(g) aus Trockeneis entwickelt und über ein Trockenrohr (CaCl<sub>2</sub>) in die Reaktionsmischung eingeleitet. Nach 1.5 h war das Trockeneis vollständig verbraucht, worauf die Einleitung beendet und die Mischung über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt wurde. H<sub>2</sub>O (2.5 mL) wurde zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Et<sub>2</sub>O (200 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x 50 mL) extrahiert. Durch Zugabe von HCl 1N wurde dann auf pH 1 angesäuert und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert

und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HCO<sub>2</sub>H 90:9:1) wurde die Carbonsäure **121** als farbloser Feststoff (106 mg, 0.46 mmol, 15% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:** 169-170 °C (Lit. 181 °C)<sup>[436]</sup>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 6:1)

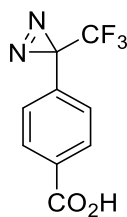
**<sup>1</sup>H-NMR:**

250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 11.42 ppm (s, 1H, -CO<sub>2</sub>H), 8.11 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, Ar CH), 7.78 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, Ar CH), 3.76 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, Ar -NH), 3.48 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, -NH)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

63 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>; δ = 166.7 ppm (-CO<sub>2</sub>H), 137.6 (Ar C<sub>quart</sub>), 132.5 (Ar C<sub>quart</sub>), 130.3 (Ar CH), 129.3 (Ar CH), 124.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 277.8 Hz, -CF<sub>3</sub>), 58.2 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.3 Hz, -C-CF<sub>3</sub>)

**Synthese von 4-[3-(Trifluormethyl)diazirin-3-yl]benzoesäure**



Diaziridin **121** (106 mg, 0.46 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit NEt<sub>3</sub> (0.37 mL, 2.74 mmol, 6 Äquiv.) in einem Braunglasgefäß unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in MeOH (15 mL) gelöst. Nach 5 min wurden 4.6 mL einer 0.12 M Lösung aus I<sub>2</sub> in MeOH (0.55 mmol, 1.2 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Et<sub>2</sub>O (30 mL) aufgenommen und mittels 1 M NaOH-Lösung (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden durch Zugabe von HCl 6 M auf pH 1 angesäuert und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL) erneut extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Nach Trocknen des Rückstands wurde Diazirin **101** als farbloser Feststoff (87 mg, 0.38 mmol, 82% Aubeute) erhalten.

**Schmp.:** 126 °C unter Zersetzung (Lit. 123 - 125 °C)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 6:1)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

250 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 8.03 ppm (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, Ar CH), 7.19 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, Ar CH)

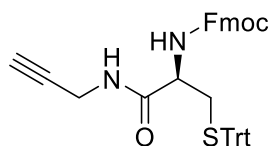
**<sup>13</sup>C-NMR:**

63 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 167.7 ppm (-CO<sub>2</sub>H), 133.5 (Ar C<sub>quart</sub>), 130.4 (Ar CH), 129.2 (Ar C<sub>quart</sub>), 126.5 (Ar CH), 122.1 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 277.8 Hz, -CF<sub>3</sub>), 28.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35.3 Hz, -C-CF<sub>3</sub>)



## 1.1 Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats 105

### Synthese von *S*-Trityl-*N*-Fmoc-*L*-(propargylamido)cystein



**125**

*S*-Trityl-*N*-Fmoc-*L*-Cystein (5 g, 7.77 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit Propargylamin (0.47 g, 8.54 mmol, 1.1 Äquiv.) über eine Carbodiimid-Kupplung nach **AV2** zum entsprechenden Amid umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (300 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 65:35) wurde Amid **125** als farbloser Feststoff (2.49 g, 4 mmol, 47% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.45 (PE/EtOAc 65:35)

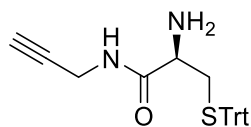
**HPLC:** t<sub>R</sub> = 16.52 min (Methode B)

#### **<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.74 – 7.05 ppm (m, 23H, Ph), 5.87 (s, 1H, H-C≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 4.83 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, -CH-NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-), 4.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, -NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-CH-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>), 4.11 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, -NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-CH-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>), 3.85 (m, 2H, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.68 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.57 (m, 2H, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 2.12 (m, 1H, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-)

#### **<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 169.7 ppm (-CH-NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-), 157.6 (-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH), 144.3, 143.7, 141.4 (Ph, C<sub>quat</sub>), 129.4, 128, 127, 124.9, 119.9 (Ph), 78.85 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 72.0 (CH-CH<sub>2</sub>-S-C(Ph)<sub>3</sub>), 66.9 (-NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-CH-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>), 54.0 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 47.1 (-NH-CO-O-CH<sub>2</sub>-CH-C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>), 33.8 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 29.3 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

Synthese von *S*-Trityl-*L*-(propargylamido)cystein**124**

Kupplungsprodukt **125** (311 mg, 0.5 mmol) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei RT in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) gelöst. Nach langsamen Hinzutropfen von Piperidin (1 mL, 20 Vol.-%) wurde die Mischung bei RT gerührt. Nach 1 h wurde die Reaktionsmischung mit 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Lösung pH 3 (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mittels 1 M NaOH-Lösung auf pH ~ 10.5 eingestellt und im Anschluss mit EtOAc (3x5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 197:3) wurde Amin **124** als farbloser Feststoff (169 mg, 0.42 mmol, 84% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.35 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 197:3)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 12.72 min (**Methode B**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

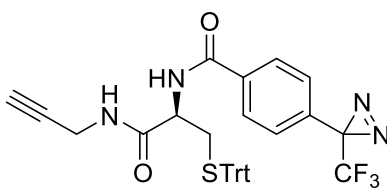
300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 7.41 – 7.09 ppm (m, 15H, Ar CH), 3.86 (m, 2H, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 2.93 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 2.57 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 12.7 Hz, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.1 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 172.6 ppm (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 144.6 (Ar C<sub>q</sub>), 129.6, 128.0, 126.8 (Ar CH), 79.5 (HC≡C-C-CH<sub>2</sub>-NH-), 71.4 (HC≡C-C-CH<sub>2</sub>-NH-), 67.0 (-CH<sub>2</sub>-S-C(Ph)<sub>3</sub>), 53.9 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 37.2 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 28.8 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-)

**HRMS (ESI):** für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 401.1682, gef.: 401.1684

**Synthese von *S*-Trityl-*L*-[*N*-prop-2-yn(*N'*-4-(3-(trifluormethyl)-3*H*-  
diazirin-3yl) benzoyl]cysteine**



**105**

**Umsetzung von 109 zum Carbonsäurechlorid**

Phenyldiazirin **101** (48 mg, 0.12 mmol) wurde unter N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre bei 0 °C in SOCl<sub>2</sub> (1 mL) gelöst und unter Lichtausschluss über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand mehrfach mit Toluol (3 x 3 mL) eingengt und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**Umsetzung mit Amin 124 zum Carbonsäureamid**

Der Rückstand wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) aufgenommen und mit DMAP (122 mg, 1 mmol, 1 Äquiv.) versetzt. Anschließend wurden 1 mL einer 0.1 M Lösung aus Amin **124** (23 mg, 0.1 mmol, 1 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 0 °C langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 22 h unter Rühren und Lichtausschluss auf RT erwärmt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in einer H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung pH 3 (10 mL) aufgenommen und mit Et<sub>2</sub>O (3x10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann mittels Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Reinigung mittels Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 3:1) wurde Amid **105** als leicht gelber Feststoff (51 mg, 0.083 mmol, 83%) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.36 (PE/EtOAc 3:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 9.83 min (Methode C)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.65 – 7.11 ppm (m, 19H, Ar CH), 6.74 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, -CH-NH-CO-Ph-), 6.29 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 4.18 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.86 (m, 2H, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.75 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 13.2 Hz,

$^3J = 7.1$  Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 2.57 (dd, 1H,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 5.9$  Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 2.12 (t, 1H,  $^4J = 2.5$  Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-)

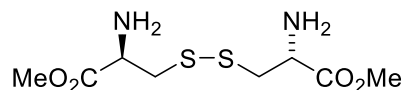
**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 169.6$  ppm (-CO-), 166.0 (-CO-), 144.2, 134.4, 132.7 (Ar C<sub>q</sub>), 129.5, 128.0, 127.6, 126.9, 126.5 (Ar CH), 121.8 (q,  $^1J = 274.0$  Hz, -C(N<sub>2</sub>)-CF<sub>3</sub>), 78.7 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-), 71.9 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-), 67.3(-CH<sub>2</sub>-S-C(Ph)<sub>3</sub>), 52.4 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 35.5 (HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-), 29.3 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 635.1699, gef.: 635.1719

## 6.7 Synthese des Photophor-Reportereinheit-Konjugats 149

### Synthese von *L*-Cystindimethylesterdihydrochlorid



**131**

Unter N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre wurde SOCl<sub>2</sub> (3.8 mL, 52 mmol, 2.5 Äquiv.) in wasserfreies MeOH (80 mL, 2 mol) getropft und die erhaltene Lösung für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde *L*-Cystin (5 g, 20.8 mmol) hinzugegeben, die Reaktionsmischung auf 75 °C erhitzt und für 12 h unter Rückfluss gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt, wobei zum Quenchen des entwickelten SO<sub>2</sub> eine Waschflasche mit einer wässrigen 1 M NaOH-Lösung zwischen Rotationsverdampfer und Membranpumpe geschaltet wurde. Der Rückstand wurde mehrfach mit Toluol (3 x 20 mL) eingengt und Diester **131** (7.01 g, 20.4 mmol, 98% Ausbeute) ohne weitere Reinigung als farbloser Feststoff (Hydrochlorid) erhalten.

**Schmp.:** 194 °C (Zersetzung)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub>, 95:4:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 0.60 min (**Methode A**)

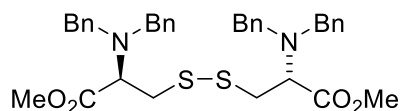
#### **<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>; δ = 4.47 (dd, 2H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.89 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-O-CO-), 3.42 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 15.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.9 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.30 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-)

#### **<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>, 167.9 ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH-), 52.6 (-CH-CO-O-CH<sub>3</sub>), 51.4 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 36.4 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**HRMS (ESI):** für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 269.0624, gef.: 269.0641

Synthese von *N,N,N',N'*-Tetrabenzyl-*L*-cystindimethylester**132**

Dimethylester **131** (6.76 g, 20 mmol, 1 Äquiv.) wurde in MeCN (200 mL) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit NaHCO<sub>3</sub> (13.44 g, 160 mmol, 8 Äquiv.) und TBAI (1.84 g, 5 mmol, 0.25 Äquiv.) versetzt und bei 0°C gerührt. Nach 30 min wurde BnBr (9.45 mL, 80 mmol, 4 Äquiv.) langsam in die Lösung getropft und die Reaktionsmischung für 4 Tage bei RT gerührt. Nach entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in EtOAc (50 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 100 mL) gewaschen. Die organische Lösung wurde mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und im Vakuum eingedampft. Eine Reinigung des Produktes erfolgte anschließend durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 85:15), wobei Tetrabenzyl-diamin **132** als farbloses Öl (12.17 g, 19.3 mmol, 97% Ausbeute) erhalten wurde.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (PE/EtOAc/HCOOH 35:14:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 19.67 min (**Methode B**)

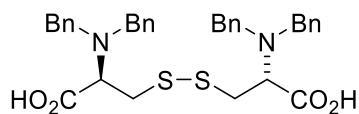
**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.49 - 7.22 ppm (m, 20H, Ar CH), 3.89 (d, 4H, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>Ph)<sub>2</sub>), 3.78 (s, 6H, -O-CO-CH<sub>3</sub>), 3.71 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, H<sub>3</sub>C-O-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.58 (d, 4H, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>Ph)<sub>2</sub>), 2.94 (d, 4H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 171.5 ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH-), 138.9 (Ar C<sub>q</sub>), 129.0, 128.3, 127.2 (Ar CH), 60.5 (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 54.8 (-CH-N(CH<sub>2</sub>Ph)<sub>2</sub>), 51.4 (-O-CO-CH<sub>3</sub>), 38.9 (-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**HRMS (ESI):** für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 629.2502, gef.: 629.2552

Synthese von *N,N,N',N'*-Tetrabenzyl-*L*-cystin**142**

Diester **132** (6 g, 9.5 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei 0°C unter Ar-Schutzgasatmosphäre in einem Gemisch aus THF (80 mL) und H<sub>2</sub>O (20 mL) gelöst. Nach 10 min wurde LiOH·2 H<sub>2</sub>O (3.4 g, 57 mmol, 6 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei 30°C über 12 h gerührt. Im Anschluss wurde das THF im Vakuum entfernt und die Lösung mit Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) gewaschen. Durch Zugabe von HCl 1N wurde dann bis pH 2-3 angesäuert und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert und nach Filtrieren im Vakuum eingengt, wobei die Disäure **142** ohne zusätzlichen Reinigungsschritt als farbloser Feststoff (5.6 g, 0.94 mmol, 99% Ausbeute) erhalten wurde.

**Schmp.:** T<sub>m</sub> > 240 °C (Zersetzung)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.31 (PE/EtOAc/HCO<sub>2</sub>H, 35:15:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 11.44 min (**Methode A**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

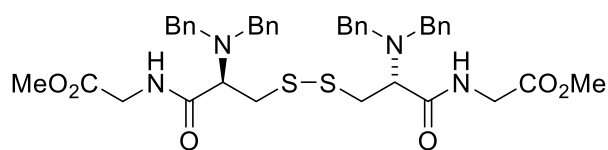
300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 10.0 ppm (s, 2H, -CH-CO-OH), 7.60-7.25 (m, 20H, Ar CH), 3.98 (d, 4H, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 3.89 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, HO-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 3.86 (d, 2H, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 3.17 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.04 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 13.8 Hz, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 175.1 (HO-CO-CH-), 137.6 (Ar C<sub>q</sub>), 129.2, 128.5, 127.6 (Ar CH), 60.7 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 54.9 (-CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 38.0 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**HRMS (ESI):** für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 601.2189, gef.: 601.2198

**Synthese von *N,N,N',N'*-Tetrabenzyl-*L*-bis-cystinyl(dimethoxycarbonyl)diamid**



**143**

**Darstellung von Glycinmethylester-Hydrochlorid**

Unter N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre wurde SOCl<sub>2</sub> (6.56 mL, 90 mmol, 1.5 Äquiv.) in wasserfreies MeOH (300 mL) getropft und die erhaltene Lösung für 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Glycin·HCl (6.6 g, 60 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben, die Reaktionsmischung auf 75 °C erhitzt und für 12 h unter Rückfluss gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Methylester nach mehrfachem Einengen mit Toluol (3 x 20 mL) als Hydrochlorid erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>; δ = 3.87 ppm (s, 2H, -CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>; δ = 167.5 ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-), 52.0 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 39.5 (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-)

**Amidkupplung**

Glycinmethylester (2 g, 16 mmol, 2 Äquiv.) wurde mit Disäure **142** (4.8 g, 8 mmol, 1 Äquiv.) über eine Carbodiimid-Kupplung nach **AV2** zum entsprechenden Diamid umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Nach Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 7:3) wurde das Kupplungsprodukt **143** (3.66 g, 5 mmol, 61%) als farbloses Öl erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.30 (PE/EtOAc, 13:7)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 12.19 min (Methode A)



**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  = 7.46 – 7.25 ppm (m, 20H, Ar CH), 7.24 (bs, 2H, -CH-CO-NH-CH<sub>2</sub>-), 4.16 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 18.4 Hz, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, -CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.88 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 18.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, -CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.78 (d, 4H, <sup>2</sup>J = 13.5 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 3.77 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.73 (d, 4H, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, -CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 3.65 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, -NH-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.34 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 3.05 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 13.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.9 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

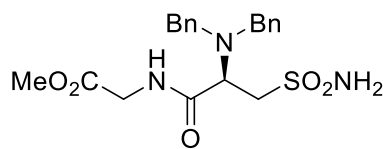
**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  = 171.8 ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 170.1 (-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH-), 138.6 (Ar Cq), 129.0, 128.5, 127.4 (Ar CH), 62.0 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-), 54.5 (-CH-N(CH<sub>2</sub>-Ph)<sub>2</sub>), 52.3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CO-O-CH<sub>3</sub>), 41.2 (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 35.5 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-S-)

**IR:**  $\nu$  = 3703, 3664, 2947, 2870, 1666, 1504, 1450, 1365, 1211, 1056, 1010, 748, 632 cm<sup>-1</sup>

**HRMS (ESI):** für [M+H]<sup>+</sup> ber.: 743.2932, gef.: 743.2940

### Synthese von *L,N,N*-Dibenzyl-3'-sulfamoylalanyl-glycinmethylester



**144**

Disulfid **143** (742 mg, 1 mmol) wurde nach **AV3** zum entsprechenden Sulfonamid umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (20 mL) aufgenommen und mittels EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und im Vakuum eingengt. Eine Reinigung des Produktes erfolgte anschließend mittels Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 65:35), wobei Sulfonsäureamid **144** als farbloser Feststoff (245 mg, 0.4 mmol, 20% Ausbeute) erhalten wurde.

**Schmp.:** T<sub>m</sub> = 98 °C

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.27 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub>, 99:1:2)

**HPLC:**  $t_R = 8.55$  min (**Methode A**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 7.66$  ppm (s, 1H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ), 7.51 – 7.21 (m, 10H, Ar  $\text{CH}$ ), 5.34 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{NH}_2$ ), 4.13 (dd, 1 H,  $^2J = 18.3$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 3.97 (m, 1H,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 3.91 (m, 1H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 3.89 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 3.78 (d, 2H,  $^2J = 18.3$  Hz,  $-\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ ), 3.76 (s, 3H,  $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ), 3.54 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 3.46 (d, 2H,  $^2J = 18.3$  Hz,  $-\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ )

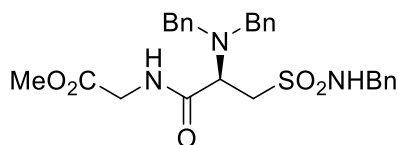
**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 172.1$  ppm ( $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}-$ ), 169.8 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ), 137.47 (Ar  $\text{C}_q$ ), 129.12, 128.75, 127.82 (Ar  $\text{CH}$ ), 59.3 ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 54.4 ( $-\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ ), 52.5 ( $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 50.4 ( $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{NH}_2$ ), 41.5 ( $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ )

**IR:**  $\nu = 3363, 3255, 2978, 1743, 1666, 1519, 1334, 1219, 1149, 972, 748, 694$   $\text{cm}^{-1}$

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ber.: 420.1588, gef.: 420.1594

**Synthese von *L-N,N,N'*-Tribenzyl-3'-sulfamoylalanyl-glycinmethylester**



**201**

Disulfid **143** (585 mg, 0.8 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit  $\text{BnNH}_2$  (1.74 mL, 16 mmol, 20 Äquiv.) und DMAP (19.5 mg, 0.16 mmol, 0.2 Äquiv.) nach **AV3** zum entsprechenden *N*-Benzylsulfonsäureamid umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (20 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc, 3:2) wurde Sulfonsäureamid **201** als farbloser Feststoff (197 mg, 0.38 mmol, 23.7% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:**  $T_m = 119$  °C

**DC:**  $R_f = 0.28$  (PE/EtOAc, 7:3)

**HPLC:**  $t_R = 10.23$  min (**Methode A**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

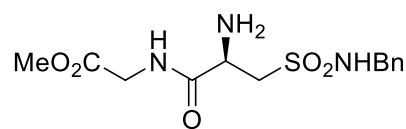
300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 7.47$  ppm (bs, 1H,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 7.42 - 7.29 (m, 15H, Ar  $\text{CH}$ ), 5.46 (t, 1H,  $^3J = 5.8$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$ ), 4.31 (dd, 2H,  $^2J = 17.4$  Hz,  $^3J = 2.9$  Hz,  $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ), 4.10 (dd, 1H,  $^2J = 17.4$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz,  $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{NH}-$ ), 3.94 (t, 1H,  $^3J = 4.5$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 3.90 (dd, 1H,  $^2J = 17.4$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz,  $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{NH}-$ ), 3.83 (d, 1H,  $^2J = 13.6$  Hz,  $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$ ), 3.75 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 3.74 (d, 2H,  $^2J = 13.2$  Hz,  $-\text{CH}-\text{N}-(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ ), 3.49 (d, 2H,  $^2J = 13.2$  Hz,  $-\text{CH}-\text{N}-(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ ), 3.36 (d, 1H,  $^2J = 13.6$  Hz,  $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 171.5$  ppm ( $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 169.9 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$ ), 137.6 (Ar  $\text{C}_q$ ), 136.9 (Ar  $\text{C}_q$ ), 129.0, 128.6, 128.1, 127.7 (Ar  $\text{CH}$ ), 58.9 ( $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 54.3 ( $-\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_2-\text{Ph})_2$ ), 52.3 ( $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 47.3 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ), 47.3 ( $-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$ ), 41.3 ( $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ )

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ber.: 510.205, gef.: 510.2066

**Synthese von *L-N*-Benzyl-3'-sulfamoylalanylglycinmethylester**



**202**

Sulfonsäureamid **201** (190 mg, 0.37 mmol, 1Äquiv.) wurde in MeOH (3.7 mL) mit  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (11 mg, 0.074 mmol, 0.2 Äquiv.) als Katalysator versetzt. Anschließend wurde  $\text{H}_2$  unter gelegentlichem Rühren in die Lösung eingeleitet. Nach 1 h wurde die Einleitung beendet und die Mischung unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) bei RT gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Kieselgur entfernt und die Reaktionsmischung im Vakuum eingengt. Nach zweifachem Waschen des

Rückstands mit PE/EtOAc (17:3) wurde Amin **202** ohne weiteren Reinigungsschritt als farbloses Öl (111 mg, 0.34 mmol, 94% Ausbeute) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.18$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 32:1)

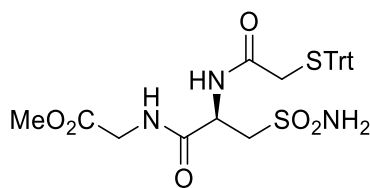
**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*4 (1:1);  $\delta = 7.32 - 7.17$  ppm (m, 5H, Ar CH), 4.16 (s, 2H, H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 3.91 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-Ph), 3.79 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J* = 8.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.3 Hz, CH<sub>2</sub>-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 3.59 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-), 3.44 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J* = 14.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.4 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH-), 3.12 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J* = 14.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*4 (1:1);  $\delta = 174.0$  ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-), 171.3 (-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH-), 138.0 (Ar C<sub>q</sub>), 129.2, 128.5, 128.3 (Ar CH), 56.1 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-), 52.8 (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-), 52.0 (-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 47.4 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 41.5 (-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH-CH<sub>2</sub>-Ph)

**Synthese von *S*-Trityl-2-mercaptoglycinyll-3-*L*-sulfamoylalanylglycinmethylester**



**146**

**Benzyl-Entschützung**

Sulfonsäureamid **144** (148 mg, 0.29 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei RT in MeOH (4 mL) mit Pd(OH)<sub>2</sub>/C (14 mg, 0.1 mmol, 0.3 Äquiv.) versetzt. Anschließend wurde H<sub>2</sub> unter gelegentlichem Rühren in die Lösung eingeleitet. Nach 1 h wurde die Einleitung beendet und die Mischung unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle) bei RT gerührt. Der Katalysator wurde dann durch Filtration über Kieselgur entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach zweifachem Waschen des Rückstands mit

PE/EtOAc (7:3) wurde das freie Amin **145** als farbloser Feststoff (70 mg, 0.29 mmol, 99% Ausbeute) erhalten.

**DC:** :  $R_f = 0.31$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 19:1)

### Umsetzung mit *S*-Tritylmercaptoessigsäure

Das Amin **145** (70 mg, 0.29 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit *S*-Tritylmercaptoessigsäure (96 mg, 0.29 mmol, 1 Äquiv.) nach **AV2** zum entsprechenden Carbonsäureamid überführt.

Nach Einengen der Reaktionslösung im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (20 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc, 2:3) wurde Amid **146** als farbloser Feststoff (106 mg, 0.19 mmol, 65%) erhalten werden.

**Schmp.:** 93 °C

**DC:**  $R_f = 0.27$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 24:1)

**HPLC:**  $t_R = 8.95$  min (**Methode A**)

### <sup>1</sup>H-NMR:

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 7.49 - 7.16$  (m, 15H, Ar CH), 5.65 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 4.78 (dd, 1H,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz, -NH-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 3.96 (d, 2H,  $^3J = 5.4$  Hz, -CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.70 (s, 3H, NH-CH<sub>2</sub>-CO-OCH<sub>3</sub>), 3.39 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.12 (s, 2H, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-)

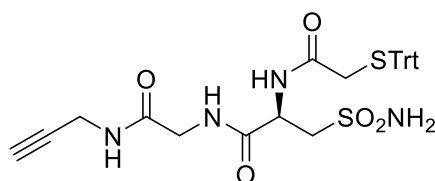
### <sup>13</sup>C-NMR:

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 170.4$  ppm (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH-), 169.4 (-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 169.0 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-), 143.8 (Ar C<sub>q</sub>), 129.5, 128.2, 127.1 (Ar CH), 67.9 (-CO-CH<sub>2</sub>-S-C(Ph)<sub>3</sub>), 55.8 (-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 52.6 (H<sub>3</sub>C-O-CO-CH<sub>2</sub>-), 49.4 (-NH-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 41.2 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 35.9 (NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-)

**IR:**  $\nu = 3302, 2160, 2029, 1975, 1743, 1651, 1519, 1334, 1219, 1149, 748, 702$  cm<sup>-1</sup>

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 578.1390, gef.: 578.1398

**Synthese von *L*-*S*-Tritylmercaptoglyciny-3'-  
sulfamoylalanyl-glycinypropargylamid**



**148**

### Methylester Verseifung

Ester **146** (100 mg, 0.18 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei 0°C unter Ar-Schutzgasatmosphäre in einem Gemisch aus THF (4 mL) und H<sub>2</sub>O (1 mL) gelöst. Nach 10 min wurde LiOH·2 H<sub>2</sub>O (21 mg, 54 mmol, 3 Äquiv.) zugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei 0°C gerührt. Das THF wurde anschließend im Vakuum entfernt und die verbleibende wässrige Lösung mit EtOAc (3 x 2 mL) gewaschen. Durch Zugabe von HCl 1N wurde dann bis pH 2-3 angesäuert und mit EtOAc (3 x 2 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Die Carbonsäure **147** wurde als farbloser Feststoff (86 mg, 0.16 mmol, 89%) erhalten und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

### Darstellung des Propargylamids

Carbonsäure **147** (86 mg, 0.16 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit Propargylamin (30 µL, 0.48 mmol, 3 Äquiv.) nach **AV2** zum entsprechenden Amid umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (20 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen, entwässert (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (EtOAc/MeOH, 65:1) wurde Propargylamid **148** als farbloser Feststoff (54 mg, 0.092 mmol, 58%) erhalten.

**Schmp.:** 106 °C

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.34 (EtOAc/MeOH, 197:3)

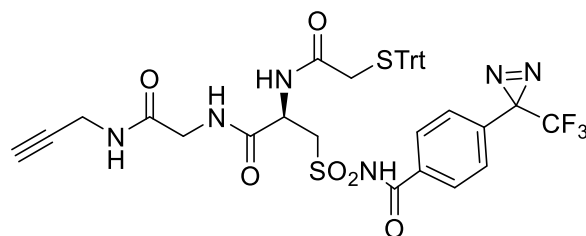
**HPLC:** t<sub>R</sub> = 8.57 min (**Methode A**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  = 7.48 - 7.17 (m, 15H, Ar CH), 4.61 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, -NH-CO-CH-CH<sub>2</sub>-), 3.94 (d, 2H, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.85 (s, 2H, -CO-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.46 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J* = 14.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.37 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J* = 14.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.07 (d, 2H, <sup>3</sup>*J* = 4.0 Hz, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-), 2.39 (t, 1H, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, -CO-NH-CH<sub>2</sub>-C≡CH)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 601.1550, gef.: 601.1562

**Synthese von *L*-*S*-Trityl-mercaptoglycinyll-3'-N'-[4''-(3'''-trifluormethyl)-3*H*-diazirinyllbenzyl]-sulfamoylalanylglycinyllpropargylamid**



**149**

**Umsetzung von 101 zum Carbonsäurechlorid**

Phenyldiazirin **101** (16 mg, 0.071 mmol, 1.5 Äquiv.) wurde unter N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre bei 0 °C in SOCl<sub>2</sub> (1 mL) gelöst und unter Lichtausschluss über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand mehrfach mit Toluol (3 x 3 mL) eingengt und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**Umsetzung mit Sulfonsäureamid 148 zum Sulfonylbenzamid**

Der Rückstand wurde bei 0 °C unter Ar-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) mit DMAP (1.1 mg, 9 μmol, 0.2 Äquiv.) und NEt<sub>3</sub> (57 μL, 0.4 mmol, 6 Äquiv.) versetzt. Im Anschluss wurden 1 mL einer 0.05 M Lösung aus Sulfonsäureamid **148** (27 mg, 0.047 mmol, 1 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 0 °C langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in einer H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung pH 3 (10 mL) aufgenommen und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt.

Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/HCO<sub>2</sub>H, 40:57:3) wurde Acylsulfonsäureamid **149** als leicht gelber Feststoff (19.7 mg, 0.025 mmol, 53% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.27 (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/HCO<sub>2</sub>H, 40:57:3)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 9.75 min (Methode A)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

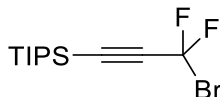
300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 10.55 ppm (s, 1H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-NH-CO-Ph-), 7.86 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, -CH-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 7.52 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 7.47 - 7.03 (m, 19H, Ar CH), 6.70 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 4.73 (q, 1H, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, -CO-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-), 3.80 (m, 6H, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-/-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-/-CO-CH-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-), 3.14 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 16.5 Hz, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-), 3.06 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 16.5 Hz, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-), 2.12 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, HC≡C-CH<sub>2</sub>-NH-CO-)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 813.1747, gef.: 813.1761



## 6.8 Synthese des linkerfreien Photoaffinitätslabels 175

### Synthese von 3-Triisopropylsilyl-1,1-difluorpropargyl-1-bromid<sup>[493]</sup>



**152**

TIPS-Acetylen (3.36 mL, 15 mmol, 1 Äquiv.) wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem THF (25 mL) gelöst und für 30 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde *n*BuLi (6.3 mL, 15.75 mmol, 1.05 Äquiv., 2.5 M in *n*-Hexan) langsam hinzutropft und die farblose Lösung bei -78 °C gerührt. Nach 30 min wurde die Reaktionsmischung mittels einer Transferkanüle in eine Lösung aus Dibromdifluormethan (2.05 mL, 22.5 mmol, 1.5 Äquiv.) in wasserfreiem THF (25 mL) bei -100 °C getropft und unter Ar-Atmosphäre über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Gesättigte NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (50 mL) wurde zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach fraktionierter Vakuum-Destillation des Rückstandes wurde das Alkin **152** (3.8 mL, 13.2 mmol, 88% Ausbeute) als farbloses Öl erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.92 (PE)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 11.59 min (**Methode E**)

#### **<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 1.01 ppm (m, 18H, -C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.00 (m, 3H, -C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

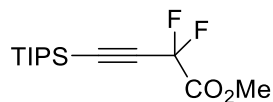
#### **<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 100.6 ppm (t, <sup>1</sup>J<sub>C→F</sub> = 289.5 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>), 97.2 (t, <sup>2</sup>J<sub>C→F</sub> = 37.5 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>), 95.1 (t, <sup>3</sup>J<sub>C→F</sub> = 4.9 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>), 18.3 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 10.8 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**GC-MS (E.I.):** für [M+•]<sup>+</sup> ber.: 310.0, gef.: 310.0

Die NMR- und MS-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[493]</sup> überein.

### Synthese von 3-Triisopropylsilyl-2,2-difluorbut-3-ynsäuremethylester<sup>[494]</sup>



**153**

Magnesium (2.34 g, 97.12 mmol, 8 Äquiv.) wurde in wasserfreiem THF (60 mL) unter Ar-Schutzgasatmosphäre mit Iod (0.25 g, 0.97 mmol, 0.08 Äquiv.) versetzt und für ca. 30 min bei RT gerührt bis eine Trübung der Lösung zu beobachten war. Dann wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und Methylchloroformiat (4.7 mL, 60 mmol, 5 Äquiv.) langsam hinzugegeben. Nach 5 min wurde Bromid **152** (3.5 mL, 12.14 mmol, 1 Äquiv.) addiert und die Mischung weiter bei 0 °C gerührt. Nach 5 h wurde die Reaktion mittels 10 Gew.-%iger HCl-Lösung (30 mL) gequenchet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Kieselgelchromatographie des Rückstandes (PE/EtOAc, 49:1) wurde Ester **153** als farbloses Öl (2.58 mL, 8.8 mmol, 72% Ausbeute bzw. 94% *b.r.s.m.*) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.41 (PE/EtOAc, 49:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 11.72 min (**Methode E**)

#### **<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 3.93 ppm (s, 3H, -C≡C-CF<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.1 (m, 18H, -C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.09 (m, 3H, -C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

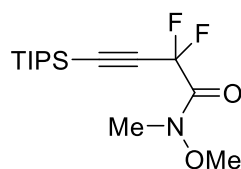
#### **<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 161.9 ppm (t, <sup>2</sup>J<sub>C→F</sub> = 34.3 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-CO-), 103.5 (t, <sup>1</sup>J<sub>C→F</sub> = 242.4 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 95.06 (t, <sup>2</sup>J<sub>C→F</sub> = 36.5 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 95.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>C→F</sub> = 5.3 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 53.9 (-C≡C-CF<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.3 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 10.8 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 313.1406, gef.: 313.1344

Die NMR- und MS-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[494]</sup> überein.

**Synthese von 3-Triisopropylsilyl-2,2-difluor-(*N,N*-methoxymethyl)  
butinsäureamid<sup>[494]</sup>**



**117**

MeHNOMe·HCl (0.65 g, 6.67 mmol, 1.05 Äquiv.) wurde in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) unter Ar-Schutzgasatmosphäre gelöst und für ca. 30 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde AlMe<sub>3</sub> (3.33 mL, 6.67 mmol, 1.05 Äquiv., 2 M in *n*-Hexan) langsam hinzuge tropft und die Lösung 1 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und 9 mL einer 0.7 M Lösung aus Ester **153** (1.85 g, 6.35 mmol, 1 Äquiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> langsam hinzuge tropft und bei 0 °C weitergerührt. Nach 1.5 h wurde die Reaktion mittels 10%iger HCl-Lösung (30 mL) gequenchet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mittels Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert und das Lösungsmittel im Vakuum destilliert. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc, 32:1) wurde Weinreb-Amid **117** als farbloses Öl (1.7 g, 5.31 mmol, 84% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.32 (PE/EtOAc, 32:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 8.87 min (**Methode E**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

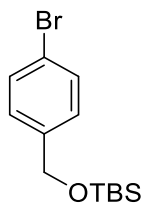
300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 3.74 ppm (s, 3H, -CF<sub>2</sub>-CO-NH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>), 3.27 (bs, 3H, -CF<sub>2</sub>-CO-NH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>), 1.13 - 1.06 (m, 21H, -C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 161 ppm (t, <sup>2</sup>J<sub>C→F</sub> = 29.8 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-C(=O)-), 104.5 (t, <sup>1</sup>J<sub>C→F</sub> = 240.9 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 95.7 (t, <sup>2</sup>J<sub>C→F</sub> = 29.8 Hz, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 93.6 (m, -C≡C-CF<sub>2</sub>-), 61.6, -CF<sub>2</sub>-CONH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>, 33.2 (-CF<sub>2</sub>-CONH(CH<sub>3</sub>)OCH<sub>3</sub>), 18.3 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 10.8 (-C≡C-Si-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**HRMS (ESI):** Zersetzung

Die NMR- Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[494]</sup> überein.

**Synthese von 4-tert-Butyldimethylsilyl-4-brombenzylalkohol****116**

4-Bromobenzylalkohol (3.74 g, 20 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit Imidazol (5.48 g, 80 mmol, 4 Äquiv.) in 200 mL DMF bei 0 °C unter Ar-Schutzgasatmosphäre gelöst. Nach 30 min wurde TBSCl (6.02 g, 40 mmol, 2 Äquiv.) portionsweise zur Lösung hinzugegeben und die Reaktionsmischung für über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (100 mL) aufgenommen und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Eine Reinigung des Produktes durch Kieselgelchromatographie (PE) lieferte den Silylether **116** als farbloses Öl (5.66 g, 18.8 mmol, 94% Ausbeute).

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.43 (PE)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 10.76 min (**Methode E**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.51 ppm (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.27 Hz, Ph-H), 7.27 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.27 Hz, Ph-H), 4.76 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-O-), 1.05 (s, 9H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.2 (s, 6H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)



**<sup>1</sup>H-NMR:**

300 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  = 8.18 ppm (d, 2H,  $^3J$  = 8.4 Hz, Ar CH), 7.47 (d, 2H,  $^3J$  = 8.4 Hz, Ar CH), 4.84 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.07 (m, 21 H, -CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.99 (s, 9H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 6H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

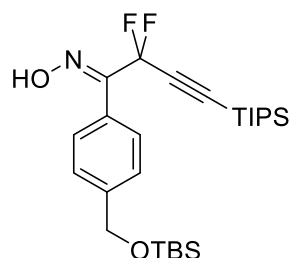
**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  = 184.1 ppm (t,  $^2J_{C,F}$  = 29.7 Hz, Ph-CO-CF<sub>2</sub>), 148.8 (Ar C-CO-CF<sub>2</sub>), 130.4 (t,  $^4J_{C,F}$  = 2 Hz, Ar-CH), 129.7 (Ar C-CH<sub>2</sub>-O-), 125.7 (Ar CH), 106.8 (t,  $^1J_{C,F}$  = 247.4 Hz, -CO-CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 98.1 (t,  $^3J_{C,F}$  = 5.2 Hz, -CO-CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 96.7 (t,  $^2J_{C,F}$  = 37.1 Hz, -CO-CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 64.8 (Ph-CH<sub>2</sub>-O-Si-), 25.8 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 10.9 ((-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), -5.4 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**IR:**  $\nu$  = 2947, 2862, 1712, 1612, 1465, 1257, 1165, 1080, 1002, 918, 840, 771, 671, 601 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 503.2584, gef.: 503.2577

**Synthese von *para*-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)phenyl-4-triisopropylsilyl-2,2-difluorbutyn-3-yn-1-oxim**



**156**

Keton **115** (550 mg, 1.14 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde unter Ar-Atmosphäre mit NH<sub>2</sub>OH·HCl (120 mg, 1.71 mmol, 1.5 Äquiv.) in einem wasserfreien Pyridin/EtOH-Gemisch (1:1, 24 mL) gelöst und bei 60 °C unter Rückfluss gerührt. Nach 3 h wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) aufgenommen und mit EtOAc (3x10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und im Vakuum eingengt. Eine Reinigung des Produktes durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc 19:1) ergab Oxim **156** als farblosen Feststoff (412 mg, 0.83 mmol, 73% Ausbeute).

**Schmp.:** 113 °C

**DC:**  $R_f = 0.34$  (PE/EtOAc, 19:1)

**HPLC:**  $t_R = 12.68$  min (**Methode E**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 9.89$  ppm (s, 1H, -Ph-C(CF<sub>2</sub>)=N-OH), 7.52 (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz, Ar CH), 7.43 (d, 2H,  $^3J = 8.3$  Hz, Ar CH), 4.81 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.04 (m, 21 H, -CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.00 (s, 9H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.16 (s, 6H, -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

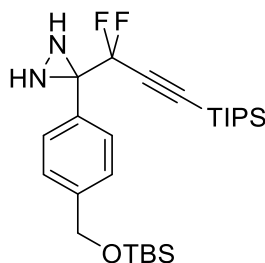
**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

62.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 152.09$  ppm (t,  $^2J_{\text{C,F}} = 30.63$  Hz, HO-N=C(Ar)-CF<sub>2</sub>), 143.5 (Ar C-C(CF<sub>2</sub>)=N-OH), 128.9 (Ar CH), 125.8 (Ar C<sub>quat.</sub>), 125.6 (Ar CH), 109.3 (t,  $^1J_{\text{C,F}} = 233.35$  Hz, -CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 96.72 (t,  $^2J_{\text{C,F}} = 37.88$  Hz, -CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 94.36 (t,  $^3J_{\text{C,F}} = 4.74$  Hz, -CF<sub>2</sub>-C $\equiv$ C-), 64.53 (Ph-CH<sub>2</sub>-O-Si-), 25.92 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.39 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.33 (-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 10.85 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), - 5.32 ((-C $\equiv$ C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>)

**IR:**  $\nu = 2947, 2862, 1465, 1373, 1257, 1172, 1095, 1002, 925, 833, 748, 663, 624$  cm<sup>-1</sup>

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ber.: 518.2693, gef.: 518.2695

**Synthese von 3-[4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxymethyl)phenyl]-3-(1,1-difluor-3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)diaziridin**



**114**

**Einführung der Tosyl-Abgangsgruppe**

Oxim **156** (400 mg, 0.8 mmol, 1 Äquiv.),  $\text{NEt}_3$  (0.162 mL, 1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) und DMAP (20 mg, 0.16 mmol, 0.2 Äquiv.) wurden in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.5 mL) unter Ar-

Atmosphäre gelöst und für 30 min bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Dann wurde eine Lösung aus TsCl (170 mg, 0.89 mmol, 1.1 Äquiv.) in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) langsam hinzuge tropft, die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und 3 h gerührt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) und Trennung der Phasen, wurde die wässrige Phase mittels  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

**HPLC:**  $t_{\text{R}} = 14.67$  min (**Methode B**)

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ber.: 672.2781, gef.: 672.2799

### Umsetzung zum Diaziridin

Das vorhergehende Rohprodukt wurde in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) aufgenommen und bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre gerührt. Nach 30 min wurde  $\text{NH}_3(\text{g})$  über einen Zeitraum von 15 min in die Lösung eingeleitet und kondensiert (ca. 15 mL  $\text{NH}_3(\text{l})$ , 10.2 g, 0.6 mol). Die Reaktionsmischung wurde dann 4 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und anschließend über Nacht auf RT erwärmt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) aufgenommen und mittels  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Reinigung mittels Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc/ $\text{NEt}_3$ , 35:15:1) wurde Diaziridin **114** als leichtgelbes Öl (210 mg, 0,424 mmol, 53% Ausbeute über 2 Schritte) erhalten.

**DC:**  $R_{\text{f}} = 0.29$  (PE/EtOAc/ $\text{NEt}_3$ , 35:15:1)

**HPLC:**  $t_{\text{R}} = 13.03$  min (**Methode E**)

### $^1\text{H-NMR}$ :

400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 7.62$  ppm (d, 2H,  $^3J = 8.08$  Hz, Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 7.36 (d, 2H,  $^3J = 8.1$  Hz, Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 4.77 (s, 2H,  $-\underline{\text{CH}}_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.88 (d, 1H,  $^3J = 8.6$  Hz,  $-\underline{\text{NH}}$ ), 2.22 (d, 1H,  $^3J = 8.6$  Hz,  $-\underline{\text{NH}}$ ), 1.09 (m, 21 H,  $-\text{CF}_2\text{-C}\equiv\text{C-Si}(\underline{\text{CH}}(\underline{\text{CH}}_3)_2)_3$ ), 0.97 (s, 9H,  $-\text{CH}_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$ ), 0.13 (s, 6H,  $-\text{CH}_2\text{-O-Si}(\underline{\text{CH}}_3)_2\text{-C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$ )



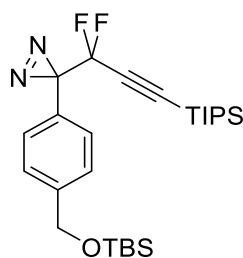
**<sup>13</sup>C-NMR:**

100 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  = 143.1 ppm (Ar C<sub>quat</sub>), 137.78 (Ar C<sub>quat</sub>), 128.75 (Ar CH), 125.78 (Ar CH), 112.24 (t,  $^1J_{C,F}$  = 237.7 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 95.65 (t,  $^2J_{C,F}$  = 38.5 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 93.98 (t,  $^3J_{C,F}$  = 4.9 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 64.49 (s, Ph-CH<sub>2</sub>-O-Si-), 60.47 (t,  $^2J_{C,F}$  = 31.9 Hz, Ar C(NH)<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-), 25.92 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.38 (-C≡C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 10.85 (-C≡C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), - 5.3 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**IR:**  $\nu$  = 2947, 2862, 1465, 1373, 1257, 1180, 1064, 1002, 941, 833, 779, 732, 671 cm<sup>-1</sup>

**HRMS (ESI):** Zersetzung

**Synthese von 3-[4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxymethyl)phenyl]-3-(1,1-difluor-3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-yl)diazirin**



**157**

Diaziridin **114** (200 mg, 0.4 mmol, 1 Äquiv.) wurde mit NEt<sub>3</sub> (0.33 mL, 2.4 mmol, 6 Äquiv.) in einem Braunglasgefäß unter Ar-Atmosphäre in MeOH (15 mL) gelöst. Nach 5 min wurden 5 mL einer 0.1 M Lösung aus I<sub>2</sub> in MeOH (0.485 mmol, 1.2 Äquiv.) hinzuge tropft und die Reaktionsmischung für 1 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Et<sub>2</sub>O (30 mL) aufgenommen und mittels 1 M NaOH-Lösung (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden durch Zugabe von HCl 6 M auf pH 1 angesäuert und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 20 mL) erneut extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden anschließend mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Nach Reinigung mittels Kieselgelchromatographie (PE/CHCl<sub>3</sub>, 9:1) wurde Diazirin **157** als farbloses Öl (176 mg, 0.357 mmol, 89% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.29 (PE/CHCl<sub>3</sub>, 9:1)

**HPLC:**  $t_R = 17.36$  min (**Methode E**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 7.34$  ppm (d, 2H,  $^3J = 8.54$  Hz, Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 7.28 (d, 2H,  $^3J = 8.34$  Hz, Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 4.76 (s, 2H,  $-\underline{\text{CH}}_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.07 (m, 21H,  $-\text{CF}_2\text{-C}\equiv\text{C-Si}(\underline{\text{CH}}(\underline{\text{CH}}_3)_2)_3$ ), 0.97 (s, 9H,  $-\text{CH}_2\text{-O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$ ), 0.12 (s, 6H,  $-\text{CH}_2\text{-O-Si}(\underline{\text{CH}}_3)_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ )

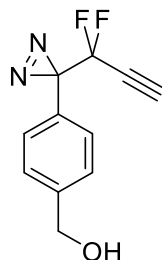
**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 142.69$  ppm (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{quat}}$ ), 129.53 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{quat}}$ ), 127.06 (Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 125.93 (Ar  $\underline{\text{CH}}$ ), 110.5 (t,  $^1J_{\text{C,F}} = 233.89$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{F}_2\text{-C}\equiv\text{C}-$ ), 96.67 (t,  $^3J_{\text{C,F}} = 5.15$  Hz,  $-\text{CF}_2\text{-C}\equiv\underline{\text{C}}$ -), 96.02 (t,  $^2J_{\text{C,F}} = 38.64$  Hz,  $-\text{CF}_2\text{-}\underline{\text{C}}\equiv\text{C}-$ ), 64.36 (s, Ar- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-Si}$ -), 31.56 (t,  $^2J_{\text{C,F}} = 36.13$  Hz, Ar  $\underline{\text{C}}(\text{N}_2)\text{-CF}_2$ -), 25.89 ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 18.29 ( $-\text{C}\equiv\text{C-Si}(\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2)_3$ ), 10.78 ( $-\text{C}\equiv\text{C-Si}(\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2)_3$ ), -5.32 ( $-\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ )

**IR:**  $\nu = 2947, 2862, 1465, 1381, 1257, 1072, 1002, 840, 663, 632$   $\text{cm}^{-1}$

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ber.: 515.2696, gef.: 515.2637

**Synthese von 4-[(1-Diazirinyl)-2,2-difluorbut-3-ynyl]benzylalkohol**



**164**

TBAF (0.76 mL, 0.76 mmol, 2.2 Äquiv., 1 M in THF) wurde mit AcOH (0.06 mL, 1.02 mmol, 3 Äquiv.) in THF (2 mL) versetzt und unter Ar-Atmosphäre bzw. Lichtausschluss bei RT gerührt. Nach 30 min wurden 0.68 mL einer 0.05 M Lösung aus Diazirin **157** (0.34 mmol, 1 Äquiv.) in THF hinzuge tropft und die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) gequencht und EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  entwässert, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach

Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 49:1) konnte Alkin **164** als farbloses Öl (73 mg, 0.33 mmol, 96% Ausbeute) erhalten werden.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.43 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 49:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 8.32 min (**Methode E**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.37 ppm (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.24 Hz, Ar CH), 7.27 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8.09 Hz, Ar CH), 4.69 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 2.98 (t, 1H, <sup>4</sup>J<sub>H,F</sub> = 5.17 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-H), 1.95 (bs, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>-OH)

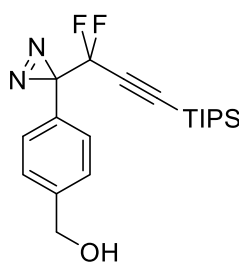
**<sup>13</sup>C-NMR:**

100 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 142.13 ppm (Ar C<sub>quat</sub>), 129.79 (Ar C<sub>quat</sub>), 127.31 (Ar CH), 126.95 (Ar CH), 110.44 (t, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 235.6 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-H), 80.17 (t, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 6.3 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-C-H), 73.85 (t, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 40.5 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-H), 64.56 (s, Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 31.27 (t, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 35 Hz, Ar C(N<sub>2</sub>)-CF<sub>2</sub>-)

**IR:** ν = 2947, 2870, 1465, 1388, 1311, 1180, 1149, 1049, 879, 802, 748, 678 cm<sup>-1</sup>

**HRMS (ESI):** Zersetzung

**Synthese von 4-(((1-Diaziriny)-2,2-difluorbut-3-yn)yl)benzylalkohol<sup>[495]</sup>**



**165**

Diazirin **157** (164 mg, 0.33 mmol, 1 Äquiv.) wurde unter Ar-Schutzgasatmosphäre in einem PP-Reaktionsgefäß mit MeCN (3 mL) versetzt und bei 0 °C gerührt. Nach 30 min wurden 20.6 µL einer 3.2 M Lösung aus H<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub> (0.066 mol, 0.2 Äquiv.) in H<sub>2</sub>O hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei 0 °C für 40 min weitergerührt. Die Reaktion wurde anschließend mit gesättigter KHCO<sub>3</sub>-Lösung (50 mL) versetzt und mit Et<sub>2</sub>O (3 x 3 mL)

extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Eine Reinigung des partiell-entschützten Diazirins **165** erfolgte dann durch Kieselgelchromatographie (PE/EtOAc, 4:1), wobei das Produkt als farbloses Öl (124 mg, 0.33 mmol, 99% Ausbeute) erhalten wurde.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.37 (PE/EtOAc, 4:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 9.36 min (**Methode E**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

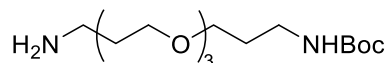
300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.33 - 7.26 ppm (m, 4H, Ar CH), 4.66 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 2.29 (bs, 1H, -Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 1.06 - 1.01 (m, 21H, -C≡C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

75 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 141.8 ppm (Ar C<sub>quat</sub>), 130.2 (Ar C<sub>quat</sub>), 127.3, 127.3 (Ar CH), 110.5 (t, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 236.6 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 97.0 (t, <sup>3</sup>J<sub>C,F</sub> = 5.0 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 95.8 (t, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 38.4 Hz, -CF<sub>2</sub>-C≡C-), 64.5 (Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 31.4 (t, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 36.0 Hz, Ar C(N<sub>2</sub>)-CF<sub>2</sub>-), 18.2 (-C≡C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 10.7 (-C≡C-Si(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>)

**IR:** ν = 3298, 2924, 2854, 1612, 1519, 1454, 1415, 1377, 1315, 1261, 1153, 1053, 1014, 914, 891, 798, 682, 628 cm<sup>-1</sup>

**Synthese von *N*-tert-butyl [3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl] carbamat<sup>[496]</sup>**



**169**

Zur einer Lösung aus 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamin (5.9 mL, 30 mmol, 10 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) wurde bei 0°C, unter Ar-Schutzgasatmosphäre, eine Lösung von Boc<sub>2</sub>O (0.65 g, 3 mmol, 1 Äquiv.) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) langsam zugetropft und die so erhaltene Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Nach Zugabe von ¼ gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (40 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mittels CHCl<sub>3</sub> (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden

anschließend mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung durch Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub>, 50:4:1) wurde mono-Boc-geschütztes Diamin **169** als leicht gelbes Öl (786 mg, 2.4 mmol, 91% Ausbeute) erhalten.

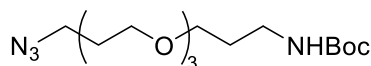
**DC:** R<sub>f</sub> = 0.18 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub> 50:4:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 8.45 min (**Methode A**)

**<sup>1</sup>H-NMR:** 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 5.11 ppm (bs, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 3.67 - 3.46 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-), 3.18 (dd, 2H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 2.83 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.77 (s, 2H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.74 (sex, 4H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 1.40 (s, 9H, -NH-CO-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

Die NMR- Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[496]</sup> überein.

### Synthese von *N*-tert-butyl[3-(2-(2-(3- azidopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl]carbamat



**170**

Boc-geschütztes Diamin **169** (737 mg, 2.33 mmol) wurde mit NaN<sub>3</sub> (1.016 g, 15.6 mmol) und Tf<sub>2</sub>O (1.3 mL, 7.8 mmol) gemäß **AV5** zum entsprechenden Azid überführt. Nach Einengen der Reaktionsmischung im Vakuum wurde der Rückstand in Natriumphosphat-Lösung (20 mL, 1 M, pH 4) aufgenommen und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknen des Rückstands wurde Azid **170** ohne zusätzliche Reinigung als hellgelbes Öl (833 mg, 2.4 mmol, 99% Ausbeute) erhalten und weiter umgesetzt.

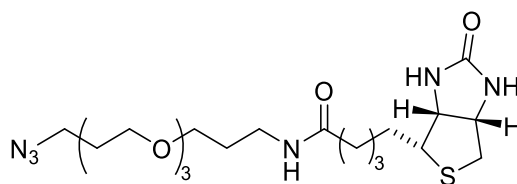
**DC:** R<sub>f</sub> = 0.38 (PE/EtOAc 7:3)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 10.59 min (**Methode B**)

**<sup>1</sup>H-NMR:** 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 4.98 ppm (bs, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 3.62 - 3.44 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-), 3.33 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 3.14 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.80 (quint, 4H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 1.70 (quint, 4H, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-) 1.37 (s, 9H, -NH-CO-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

Die NMR-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[496]</sup> überein.

### Synthese des Biotin-PEG-Azid-Click-Konjugats 172



**172**

Azid **170** (100 mg, 0,288 mmol, 1 Äquiv.) wurde bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.5 mL) mit TFA (1.5 mL, 25 Vol.-%) versetzt und die erhaltene intensiv gelbe Lösung für 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand mehrfach mit Toluol (3 x 2 mL) eingengt und dann in DMF (5 mL) aufgenommen. Anschließend wurden unter Ar-Schutzgasatmosphäre (+)-Biotin-4-nitrophenylester (53 mg, 0.144 mmol, 0.5 Äquiv.) *i*Pr<sub>2</sub>NEt (73 µL, 0.432 mmol, 3 Äquiv.) und HOBt (22 mg, 0.16 mmol, 1 Äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand durch Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 17:3) gereinigt, wodurch Biotin-PEG-Azid **172** als farbloser Feststoff (24 mg, 0.05 mmol, 35% Ausbeute) erhalten wurde.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.42 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 17:3)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 5.25 min (**Methode A**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 6.58 ppm (t, 1H, <sup>3</sup>J = 5.17 Hz, -NH-CO-NH-), 6.45 (s, 1H, -NH-CO-NH-), 5.67 (bs, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 4.50 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, -NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-), 4.31 (dd, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J = 2.9 Hz, -NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 3.66

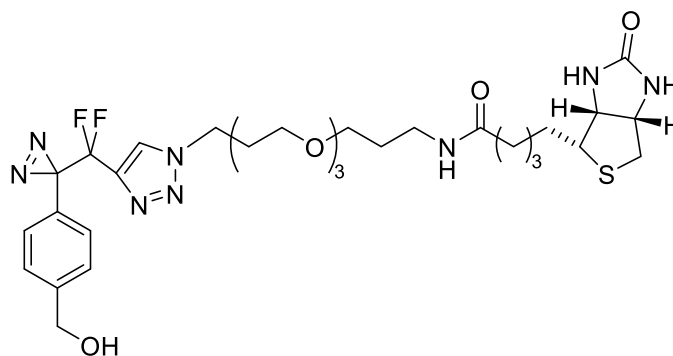
- 3.54 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 3.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.34 (q, 2H, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, -CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.15 (m, 1H, -NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>-S-), 2.91 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 12.9 Hz, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.75 (d, 2H, <sup>2</sup>J = 12.9 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.19 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.86 (quint, 2H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.78 (quint, 2H, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.75 - 1.62 (m, 4H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.44 (quint, 2H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

100 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 173.10 ppm (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 163.92 (-NH-CO-NH-), 70.52, 70.45, 70.30, 70.02, 67.89 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 61.81, 60.2 (-NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-/-NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>-S-), 55.66 (-CH-CH(CH<sub>2</sub>-S-), 48.44 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 40.54 (-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-), 37.77 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 36.07 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 29.11 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-), 28.93 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-), 28.26 (-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 28.14 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 25.71 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 495.2360, gef.: 495.2363

**Synthese des Biotin-PEG-funktionalisierten 3-difluordiazirinylnbenzylalkohols 173**



**173**

Diazirin **164** (5 mg, 0.023 mmol) wurde mit Biotin-PEG-Click Konjugat **172** (14 mg, 0.03 mmol) nach **AV6** zum 1,2,3- Triazol umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand durch Kieselgelchromatographie

(CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 17:3) gereinigt und Alkohol **179** als farbloses Öl (16 mg, 0.0214 mmol, 93% Ausbeute) erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,13 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 8.43 min (**Methode B**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

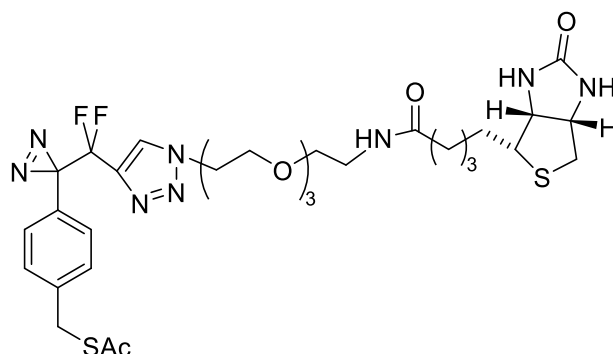
400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.95 ppm (s, 1H, -C=CH-N(CH<sub>2</sub>)-N=N-), 7.30 (dd, 2H, <sup>3</sup>J = 8.38 Hz, Ar CH), 7.16 (dd, 2H, <sup>3</sup>J = 8.10 Hz, Ar CH), 6.48 (m, 2H, -S-CH(CH<sub>2</sub>)-CH(CH)-NH-CO-/-S-CH<sub>2</sub>-CH(CH)-NH-CO-), 5.91 (bs, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 5.14 (bs, 1H, Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 4.64 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-OH), 4.52 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, -N=N-N(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 4.47 (bs, 1H, -NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-/-NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 4.28 (bs, 1H, -NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-/-NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 3.78 - 3.56 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 3.50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 3.32 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-), 3.26 (dd, 2H, <sup>2</sup>J = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, -CH-CH<sub>2</sub>-S-), 2.13 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 1.85 (m, 2H, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.74 - 1.55 (m, 6H, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-/-N=N-N(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 1.40 (m, 2H, -S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**<sup>13</sup>C-NMR:**

100 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 173.10 ppm (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 163.92 (-NH-CO-NH-), 70.52, 70.45, 70.30, 70.02, 67.89 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 61.81, 60.2 (-NH-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-/-NH-CH(CH)-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 55.66 (-CH-CH(CH<sub>2</sub>)-S-), 48.44 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 40.54 (-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-S-), 37.77 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 36.07 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-), 29.11 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-), 28.93 (-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-), 28.26 (-S-CH(CH)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 28.14 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 25.71 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-/-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**HRMS (ESI):** für [M+Na]<sup>+</sup> ber.: 717.2965, gef.: 717.2947



Synthese des vervollständigten linkerfreien Photoaffinitätslabels **175****175****Installation der Tosyl-Abgangsgruppe**

Click-Produkt **173** (14.7 mg, 0.0225 mmol, 1 Äquiv.), NEt<sub>3</sub> (11.4 µL, 0.0844 mmol, 3.75 Äquiv.) und DMAP (1.22 mg, 0.01 mmol, 0.45 Äquiv.) wurden in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) unter Ar-Atmosphäre gelöst und für 30 min bei -10 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus TsCl (10.72 mg, 0.0562 mmol, 2.5 Äquiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) langsam hinzugegeben, die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und 7 h gerührt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O (10 mL) und Trennung der Phasen, wurde die wässrige Phase mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

**Umsetzung zum Thioester**

Der Rückstand wurde in wasserfreiem DMF (5 mL) aufgenommen und unter Ar-Atmosphäre bei RT gerührt. Nach 5 min wurde eine Lösung aus KSAc (7.0 mg, 0.062 mmol, 2.75 Äquiv.) in DMF (1 mL) hinzugegeben und die Mischung 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt, der Rückstand in H<sub>2</sub>O (10 mL) aufgenommen und mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Nach Kieselgelchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) wurde Thioester **175** als hellgelber Feststoff (14.5 mg, 0,02 mmol, 88% Ausbeute über 2 Schritte) erhalten.

**DC:**  $R_f = 0,40$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9:1)

**HPLC:**  $t_R = 10.28$  min (**Methode B**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 8.02$  ppm (s, 1H,  $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{N}(\text{CH}_2)-\text{N}=\text{N}-$ ), 7.23 (m, 2H, Ar  $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 7.13 (m, 2H, Ar  $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 6.47 (t, 1H,  $^3J = 4.8$  Hz,  $-\underline{\text{H}}\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-$ ), 6.13 (bs, 1H,  $-\text{HN}-\text{CO}-\underline{\text{N}}\text{H}-$ ), 5.33 (bs, 1H,  $-\text{CH}_2-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 4.58 (t, 2H,  $^3J = 4.6$  Hz,  $-\text{C}=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$ ), 4.50 (m, 1H,  $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH})-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{S}-$ ), 4.32 (m, 1H,  $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH})-\text{CH}_2-\text{S}-$ ), 4.05 (s, 2H,  $-\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-$ ), 3.88 (t, 2H,  $^3J = 4.7$  Hz,  $-\text{CO}-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 3.69 - 3.35 (m, 12H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 3.14 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2)-\text{S}-$ ), 2.91 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-$ ), 2.74 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-$ ), 2.34 (s, 3H,  $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 2.21 (t, 2H,  $^3J = 6.9$  Hz,  $-\text{NH}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 1.68 (m, 4H,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-/-\text{S}-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 1.44 (m, 2H,  $-\text{S}-\text{CH}(\text{CH})-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$ )

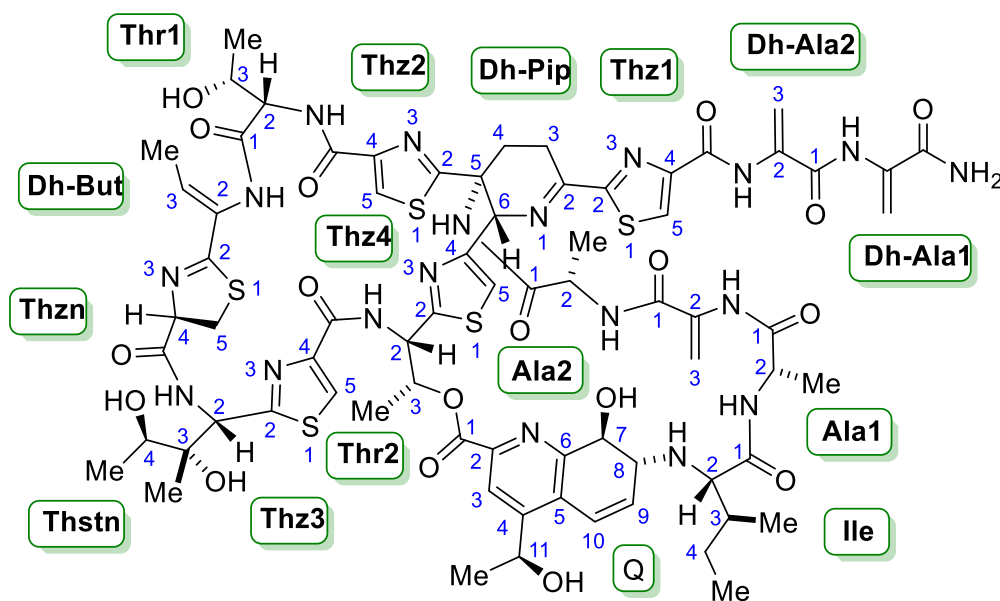
**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 194.86$  ppm ( $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}_3$ ), 173.20 ( $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{NH}-$ ), 163.66 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}_2-$ ), 138.74 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{q}}$ ), 130.50 (Ar  $\underline{\text{C}}_{\text{q}}$ ), 128.97 (Ar  $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 128.19 ( $-\text{CF}_2-\underline{\text{C}}(\text{N})=\text{CH}-$ ), 127.59 (Ar  $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 124.68 ( $-\text{CF}_2-\text{C}(\text{N})=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{N}(\text{CH}_2)-$ ), 115.45 (t,  $^1J_{\text{C}\rightarrow\text{F}} = 240.7$  Hz,  $-\text{C}(\text{N}_2)-\underline{\text{C}}\text{F}_2-\text{C}(\text{N})=\text{CH}-$ ), 70.53, 70.43, 70.40, 70.04, 69.92, 69.05 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 61.79 ( $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH})-\text{CH}_2-\text{S}-$ ), 60.20 ( $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH})-\text{CH}(\text{CH}_2)-\text{S}-$ ), 55.41 ( $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2)-\text{S}-$ ), 50.64 ( $-\text{N}=\text{N}-\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$ ), 40.52 ( $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH})-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-$ ), 39.12 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 35.91 ( $-\text{NH}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 32.86 ( $-\text{Ph}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-\text{CO}-$ ), 30.83 (t,  $^2J_{\text{C}\rightarrow\text{F}} = 33.7$  Hz,  $-\underline{\text{C}}(\text{N}_2)-\text{CF}_2-$ ), 30.33 ( $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 28.13 ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 25.51 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ber.: 747.2529, gef.: 747.2547

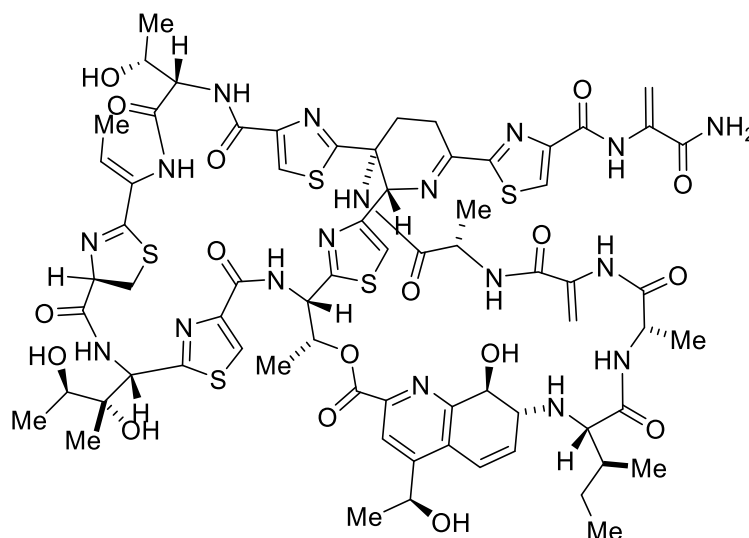
## 6.9 Synthese der Thiostrepton-PAL-Sonden

Die Synthese der im Rahem dieser Arbeit dargestellten Thiostrepton-PAL-Sonden erfolgte semisynthetisch ausgehend von einfach verkürztem Thiostrepton (**99**). Die verwendete Bezeichnung der Aminosäurereste und die Nummerierung der Atome sind in der nachfolgenden Abbildung angegeben.



15

**Abbildung 6-1:** Struktur des einfach verkürzten Thiostreptons **99**, welches als Ausgangsprodukt zur semisynthetischen Darstellung der PAL-Sonden eingesetzt wurde. Zur Bezeichnungen der verschiedenen Reste innerhalb des Grundgerüsts wurden folgende Abkürzungen verwendet: Ala: Alanin, Dh-Ala: Dehydroalanin, Dh-But: Dehydrobutyrin, Dh-Pip: Dehydropiperidin, Ile: Isoleucin, Q: Chinaldinsäure, Thr: Threonin, Thstn: Thiostreptin, Thz: Thiazol, Thzn: Thiazolin.

Synthese des einfach verkürzten Thiostreptons (**99**)<sup>[131]</sup>**107**

Thiostrepton (0.5 g, 0.3 mmol) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei RT in CHCl<sub>3</sub> (25 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Nach 30 min wurde HNEt<sub>2</sub> (2.5 mL, 10 Vol.-%) hinzugegeben und die Mischung 3 h bei RT gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in einem CHCl<sub>3</sub>/MeOH-Gemisch (9:1) aufgenommen. Nach Kieselgel-Filtration wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft, der erhaltene Rückstand anschließend in TFE gelöst und mittels präparativer HPLC (C18 ISIS-Säule, MeCN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Einfach verkürztes Thiostrepton **99** konnte nach Gefriertrocknung als farbloser Feststoff (198 mg, 0.12 mmol, 40 % Ausbeute) erhalten werden.

**Schmp.:** T<sub>m</sub> > 240 °C (Zersetzung)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.19 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 11.28 min (**Methode B**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 9.87 ppm (s, 1H, -NH-), 9.67 (s, 1H, -NH-), 8.63 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, -NH-), 8.48 (s, 1H, -NH-), 8.10 (s, 1H, Thz1-5), 7.99 (s, 1H, Thz3-5), 7.90 (s, 1H, Thz2-5), 7.87 (s, 1H, -NH-), 7.63 (s, 1H, -NH-), 7.38 (s, 1H, Thz4-5), 7.11 (s, 1H, Q-3), 6.99 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, -NH-), 6.91 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, -NH-), 6.70 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.7 Hz, Q-10), 6.43 (s, 1H, Dh-Ala1-3), 6.21 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 5.5 Hz, Q-9), 2.12

6.17 (q, 1H,  $^3J = 6.6$  Hz, Thr2-3), 6.03 (q, 1H,  $^3J = 6.9$  Hz, Dh-But-3), 5.64 (s, 1H, Dh-Ala2-3), 5.57 (s, 1H, Thr2-2), 5.56 (s, 1H, Thstn-2), 5.47 (s, 1H, Dh-Ala1-3'), 5.17 (s, 1H, Dh-Ala2-3'), 5.13 (m, 1H, Dh-Pip-6), 5.12 (m, 1H, Q-11), 4.80 (dd, 1H,  $^3J = 12.7$  Hz,  $^3J = 9.2$  Hz, Thzn-4), 4.54 (quint, 1H,  $^3J = 6.9$  Hz, Ala2-2), 4.22 (m, 2H, Thr1-2/Q-7), 3.87 (m, 1H, Dh-Pip-4), 3.63 (m, 1H, Ala1-2), 3.62 (m, 1H, Thstn-4), 3.44 (m, 1H, Thzn-5), 3.43 (m, 2H, Q-8), 3.27 (m, 1H, Dh-Pip-3), 2.99 (t, 1H,  $^3J = 12.2$  Hz, Thzn-5'), 2.79 (m, 1H, Ile-2), 2.78 (m, 1H, Ile-3), 2.71 (m, 1H, Dh-Pip-3'), 2.11 (t, 1H,  $^3J = 13.0$  Hz, Dh-Pip-4'), 1.53 (d, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, Thr2-Me), 1.42 (d, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, Dh-But-Me), 1.40 (m, 1H, Thr1-3), 1.23 (d, 3H,  $^3J = 6.4$  Hz, Ala2-Me), 1.19 (d, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, Q-Me), 1.12 (m, 3H, Ile-4), 1.11 (m, 3H, Thstn-4-Me), 0.98 (m, 3H, Thstn-3-Me), 0.97 (m, 3H, Ala1-Me), 0.92 (m, 1H, Ile-4'), 0.81 (d, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, Ile-3-Me), 0.69 (t, 3H,  $^3J = 7.4$  Hz, Ile-4-Me), 0.62 (d, 3H,  $^3J = 5.9$  Hz, Thr1-Me)

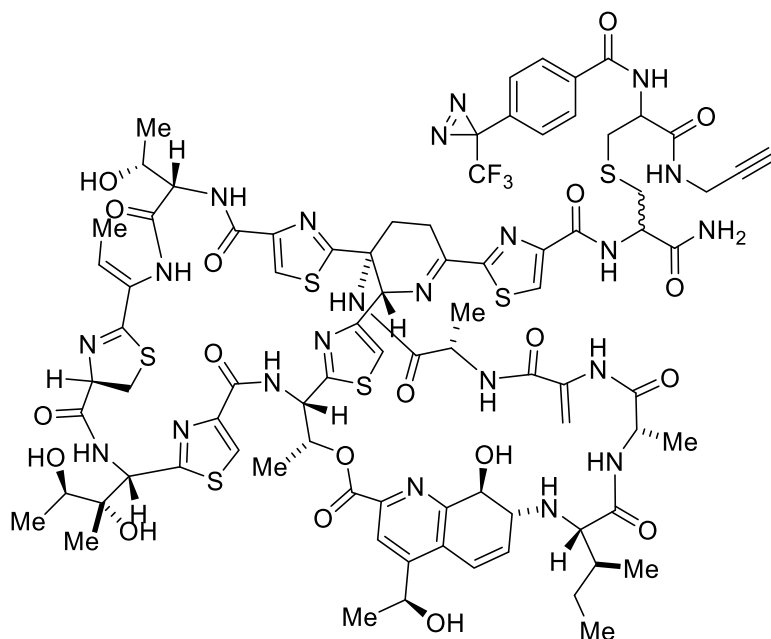
 **$^{13}\text{C-NMR}$ :**

200 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$  (4:1); 173.5 ppm, 173.4, 173.4, 172.0, 170.2, 169.9, 169.2, 168.4, 166.6, 166.4, 166.3, 165.7, 165.6, 162.9, 162.8, 162.3, 162.1, 161.9, 160.8, 159.8, 159.7, 157.3, 154.6, 153.6, 150.1, 146.3, 143.6, 133.4, 133.3 (Dh-But-3), 132.9, 132.3, 130.2 (Q-9), 128.6, 128.5, 127.5, 127.3 (Thz3-5), 125.8 (Thz1-5), 125.1 (Thz2-5), 123.3 (Q-10), 122.5 (Q-3), 118.4 (Thz4-5), 103.8 (Dh-Ala1-3), 103.5 (Dh-Ala2-3), 79.0 (Thzn-4), 72.1 (Thr2-3), 67.8 (Thr1-2), 67.6 (Q-7), 66.4 (Thr1-3), 65.3 (Ile-3), 64.6 (Dh-Pip-6/Q-11), 64.2 (Dh-Pip-6/Q-11), 58.9 (Q-8), 57.7, 57.4, 55.9, 55.7 (Thstn-2), 53.0 (Thr2-2), 51.9 (Ala2-2), 51.8, 49.6 (Ala1-2), 49.4 (Thstn-4), 49.1, 38.4, 34.8 (Thzn-5), 30.5, 29.5 (Thstn-3-Me), 29.2 (Dh-Pip-4), 24.1 (Dh-Pip-3), 23.5 (Ile-4), 22.7 (Q-Me), 22.5, 19.0 (Thstn-3-Me), 18.9 (Thr1-Me), 18.9 (Ala2-Me), 18.5 (Thr2-Me), 17.6, 16.0, 15.7 (Ile-3-Me), 15.4 (Dh-But-Me), 13.7, 11.5 (Ile-4-Me)

**HRMS (ESI):** für  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ber.: 1595.4782, gef.: 1595.4758

Die NMR- und MS-Daten stimmen mit den publizierten Werten<sup>[131]</sup> überein.

## Synthese von Thiostrepton-PAL-Sonde 129



129

**Triyl-Entschützung**

Triylthioether **105** (36 mg, 0.06 mmol, 1 Äquiv.) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.95 mL) unter Lichtausschluss und Ar-Schutzgasatmosphäre mit  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0.075 mmol) versetzt. Nach Zugabe von TFA (0.05 mL, 5 Vol.-%) trat augenblicklich eine dunkelgelbe bis orange Färbung auf. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zusätzlich mit Toluol (3 x 2 mL) zum Trocknen eingengt.

**Sulfa-Michael Addition**

Der Rückstand wurde in TFE (9 mL) aufgenommen und mit Thiostreptonderivat **99** (79 mg, 0.05 mmol) nach **AV4** zum *Sulfa*-Michael-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde das Rohprodukt über Kieselgel filtriert ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1) und durch präparative HPLC (C18 ISIS-Säule,  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ) gereinigt. Thiostrepton-PAL-Sonde **129** (38 mg, 0.0192 mmol, 32% Ausbeute über 2 Schritte) wurde als farbloser Feststoff erhalten werden.

**Schmp.:**  $T_m > 240\text{ }^\circ\text{C}$  (Zersetzung)

**DC:**  $R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1)

**HPLC:**  $t_R = 9.47$  min (**Methode A**)

**$^1\text{H-NMR}$ :**

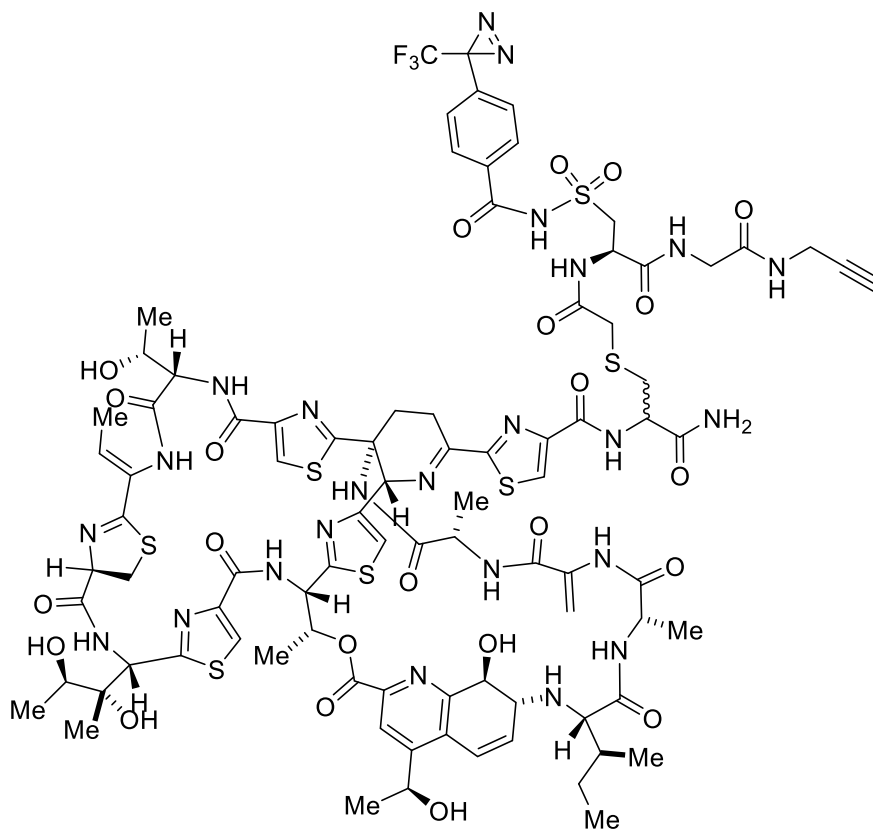
600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 9.83$ ppm (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.30 (m, 2H), 8.26 (s, 1H, Thz1-5), 8.24 (s, 1H, Thz3-5), 8.11 (m, 1H, Thz2-5), 7.87 (d, 2H,  $^3J = 8.8$  Hz, -CH-NH-CO-Ar CH), 7.80 (s, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.45 (m, 1H, Thz4-5), 7.39 (d, 1H,  $^3J = 7.7$  Hz), 7.30 (s, 1H, Q-3), 7.27 (d, 2H,  $^3J = 8.4$  Hz, -CH-NH-CO-Ar CH), 6.88 (m, 1H, Q-10), 6.81 (d, 1H,  $^3J = 7.4$  Hz), 6.37 (m, 1H, Thrt2-3), 6.30 (dd, 1H,  $^3J = 9.2$  Hz,  $^4J = 4.9$  Hz, Q-9), 6.18 (q, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz, Dh-But-3), 5.84 (d, 1H,  $^3J = 9.2$  Hz, Thr2-2), 5.77 (s, 1H, Dh-Ala2-3), 5.76 (m, 1H, Thstn2), 5.68 (bs, 1H), 5.62 (bs, 1H), 5.47 (m, 1H), 5.31 (m, 2H), 5.21 (s, 1H), 5.10 (s, 1H, Dh-Ala2-3'), 4.96 (m, 1H, Thzn-4), 4.75 (t, 1H,  $^3J = 6.7$  Hz, Ala2-2), 4.68 (d, 1H,  $^3J = 7.4$  Hz, Thr1-2), 4.45 (dd, 1H,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^4J = 3.4$  Hz, Q-7), 4.20 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.13 (d, 1H,  $^3J = 5.8$  Hz,  $\text{H}_2\text{N-CH}(\text{CO})\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-}$ ), 4.08 (m, 2H, Dh-Pip-4), 4.05 (m, 1H,  $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}$ ), 3.94 (m, 1H,  $\text{H}_2\text{N-CH}(\text{CO})\text{-CH}_2\text{-S-}$ ), 3.85 (t, 1H,  $^3J = 6.4$  Hz, Thstn-4), 3.80 (m, 1H, Ala1-2), 3.70 (m, 1H, Thzn-5), 3.68 (m, 1H,  $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-CO-CH-CH}_2\text{-}$ ), 3.62 (d, 1H,  $^3J = 5.1$  Hz, Q-8), 3.56 (m, 1H), 3.46-3.16 (m, 4H), 3.11 (m, 1H, Thzn-5'), 3.09 (m, 1H,  $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-CO-CH-CH}_2\text{-}$ ), 3.06 (m, 2H,  $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-CO-}$ ), 2.98 (d, 1H,  $^3J = 6.5$  Hz, Ile-2), 2.94 (m, 1H, Dh-Pip-3'), 2.29 (t, 1H,  $^4J = 2.5$  Hz,  $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-}$ ), 2.23 (m, 1H, Dh-Pip-4'), 1.83 (d, 3H,  $^3J = 6.4$  Hz, Thr2-Me), 1.61 (d, 3H,  $^3J = 7.5$  Hz, Dh-But-Me), 1.48 (d, 3H,  $^3J = 6.4$  Hz, Ala2-Me), 1.36 (d, 3H,  $^3J = 6.2$  Hz), 1.33 (d, 3H,  $^3J = 6.9$  Hz, Q-Me), 1.24 (m, 3H, Ile-4-Me), 1.18 (m, 6H, Thstn-3-Me/Ala1-Me), 1.07 (m, 1H, Thr1-3), 1.00 (d, 3H,  $^3J = 5.6$  Hz, Ile-3-Me), 0.94 (t, 3H,  $^3J = 7.3$  Hz, Ile-4-Me), 0.89 (d, 3H,  $^3J = 6.8$  Hz, Thr1-Me).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**

150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta = 174.8$  ppm, 172.95, 172.91, 172.4, 172.0, 171.6, 171.1, 170.2, 170.0, 169.8, 169.5, 169.0, 168.8, 168.1, 166.4, 166.3, 165.9, 165.6, 163.38, 163.34, 162.08, 162.0, 161.7, 161.5, 161.4, 161.09, 161.01, 157.68, 157.6, 154.3, 154.0, 150.5, 149.7, 149.6, 146.8, 143.4, 134.4, 133.0, 132.5, 132.2, 130.0, 128.8, 127.7, 127.6, 127.3, 126.7, 125.1, 125.0, 123.3, 122.7, 122.4, 120.9, 119.1, 117.8, 101.1, 79.1, 79.0, 72.1, 71.9, 71.8, 67.5, 67.09, 67.02, 66.7, 64.4, 64.3, 59.6, 57.3, 55.8, 55.7, 54.5, 53.9, 53.4, 52.4, 51.7, 50.9, 50.8, 48.8, 42.0, 40.8, 35.6, 33.5, 33.3, 31.9, 30.3, 30.2, 29.69, 29.66, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.5, 28.2, 26.1, 24.9, 22.6, 19.8, 19.58, 19.53, 19.4, 19.3, 19.0, 17.3, 16.1, 15.8, 15.6, 14.1, 13.7, 11.3.

HRMS (ESI): für  $[M+Na]^+$  ber.: 1987.5312, gef.: 1987.5314

## Synthese von Thiostrepton-PAL-Sonde 151



151

**Trityl-Entschützung**

*S*-Trityl-thioether **149** (11 mg, 0.014 mmol, 1 Äquiv.) wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.9 mL) unter  $\text{Ar}$ -Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss mit  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (2.7  $\mu\text{L}$ , 0.017 mmol) versetzt. Nach Zugabe von TFA (106  $\mu\text{L}$ , 5 Vol.-%) trat augenblicklich eine dunkelgelbe bis rote Färbung auf. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mehrfach mit Toluol (3 x 2 mL) zum Trocknen eingengt.

**Sulfa-Michael Addition**

Der Rückstand wurde in TFE (2.25 mL) aufgenommen und mit Thiostreptonderivat **99** (22 mg, 0.014 mmol) nach **AV4** zum *Sulfa*-Michael-Addukt überführt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde das Rohprodukt durch



Kieselgelchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH, 91:8:1) gereinigt und Thiostrepton-PAL-Sonde **151** als farbloser Feststoff (13 mg, 6.06 μmol, 43% Ausbeute) erhalten.

**Schmp.:** T<sub>m</sub> > 240 °C (Zersetzung)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HCOOH 93:5:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 7.93 min (Methode D)

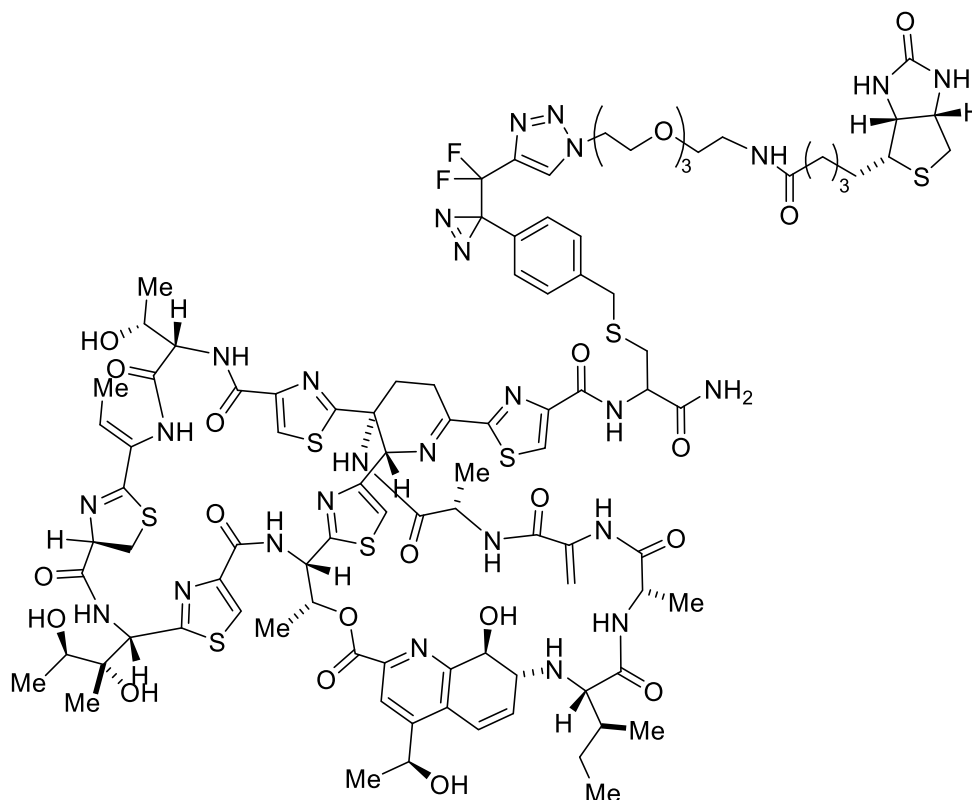
**<sup>1</sup>H-NMR:**

600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 9.64 ppm (s, 1H), 8.62 (m, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.06 (s, 1H, Thz1-5), 8.03 (s, 1H, Thz3-5), 7.99 (Thz2-5), 7.88 (s, 1H), 7.75 (m, 2H, -SO<sub>2</sub>NH-CO-Ar CH), 7.36 (s, 1H, Thz4-5), 7.09 (s, 1H), 7.05 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, Q-10), 6.92 (m, 1H), 6.67 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 6.19 (m, 1H, Thr2-3), 6.12 (q, 1H, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, Q-9), 6.02 (q, 1H, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, Dh-But-3), 5.62 (s, 1H, Thr2-2), 5.55 (m, 2H, Dh-Pip-6/Q-11), 5.15 (s, 1H), 5.34 (s, 1H, Dh-Ala2-3), 5.11 (m, 2H), 4.79 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.83 (d, 1H, J = 12.3 Hz), 3.70 (m, 1H, Dh-Pip-4), 3.61 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.41 (m, 1H, Q-8), 3.15 (d, 1 H, J = 10.4 Hz), 2.97 (m, 1H), 2.85 (m, 1H, Dh-Pip-3), 2.76 (m, 1H, Ile-3), 2.09 (s, 1H), 2.08 (m, 1H, Dh-Pip-4'), 1.51 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, Thr2-Me), 1.39 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, Dh-But-Me), 1.17 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 5.9, Ala2-Me), 1.08 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, Q-Me), 1.02 (m, 3H, Thstn-4-Me), 0.94 (m, 6H, Thstn-3-Me/Ala1-Me), 0.89 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, Thstn-3-Me), 0.79 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, Ile-3-Me), 0.66 (t, 3H, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, Ile-4-Me), 0.58 (m, 3H, Thr1-Me)<sup>13</sup>C-NMR (basierend auf HSQC-Daten):

150 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 178.1 ppm, 160.0, 155.3, 141.6, 132.8 (Dh-But-3), 130.4 (Thr2-3), 128.8 (-SO<sub>2</sub>NH-CO-Ar CH), 128.5 (-SO<sub>2</sub>NH-CO-Ar CH), 126.6 (Q-10), 126.2, 125.4 (Thz2-5), 123.2, 118.3 (Thz4-5), 78.8, 71.8, 67.4, 65.3 (Ile-3), 59.4 (Q-8), 55.7, 52.7, 51.6, 49.7 (Ala1-2/Thstn-4), 38.2, 29.7 (Thstn-4-Me), 28.7 (Dh-Pip-4), 19.0 (Thr2-Me), 18.0 (Ala2-Me), 15.8 (Q-Me), 15.6 (Dh-But-Me), 11.5 (Thr1-Me)

**HRMS (ESI):** für [M+2H]<sup>2+</sup> ber.: 1072.7846, gef.: 1072.7889

## Synthese von Thiostrepton-PAL-Sonde 177



177

**Thioester-Spaltung**

Thioester **175** (10 mg, 0.0133 mmol, 1 Äquiv.) wurde unter Ar-Atmosphäre in MeOH (1.6 mL) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus  $K_2CO_3$  (3.7 mg, 0.0266 mmol, 2 Äquiv.) in MeOH/ $H_2O$  (0.8 mL, 2:1) langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$ -Lösung (10 mL) aufgenommen und mit  $CHCl_3$  (3x5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Nach Trocknen im Vakuum wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**Sulfa-Michael Addition**

Der Rückstand wurde in TFE (1.6 mL) aufgenommen und mit Thiostreptonderivat **99** (25 mg, 0.016 mmol, 1.2 Äquiv.) nach **AV4** zum Sulfa-Michael-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde das Rohprodukt über Kieselgel

filtriert (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1) und durch präparative HPLC (C18 ISIS-Säule, MeCN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Thiostrepton-PAL-Sonde **177** wurde als farbloser Feststoff (5 mg, 2.16 µmol, 16.7% Ausbeute über 2 Schritte) erhalten.

**Schmp.:** T<sub>m</sub> > 240 °C (Zersetzung)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.35 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1)

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 9.53 min (**Methode B**)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = 9.97 ppm (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.27 (m, 4H), 8.14 (s, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.69 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.57 (m, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.32 (s, 2H), 7.16 (m, 1H), 6.92 (m, 2H), 6.75 (m, 2H), 6.38 (m, 2H), 6.32 (m, 2H), 6.15 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz), 5.98 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 5.77 (m, 1H), 5.74 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 5.44 (s, 1H), 5.35 (m, 2H), 5.22 (m, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.68 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.84 (m, 2H), 3.56 (m, 6 H), 2.94 (m, 2H), 1.72 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.63 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.43 (d, 3H, *J* = 6.4), 1.34 (t, 3H, *J* = 6.4 Hz), 1.26 (d, 3H, *J* = 7.9 Hz), 1.19 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.10 (m, 3H), 0.96 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.90 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz)

**<sup>19</sup>F-NMR (<sup>1</sup>H-entkoppelt):** 188.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1); δ = -77 ppm (s, -CF<sub>2</sub>-C(N)=CH-)

**HRMS (ESI):** Zersetzung

## 6.10 Biologische Arbeiten

### 6.10.1 Mikrobiologische Methoden

#### 6.10.1.1 Bakterienkulturen

##### *Bacillus subtilis*

Die Anzucht von *Bacillus subtilis* erfolgte in Flüssigkulturen. Der Typstamm (ATCC 6051) wurde als gefriergetrocknetes Zellpellet von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Bakterien wurden zunächst durch Zugabe von 0.5 mL Flüssigmedium (LB-Medium<sup>[497]</sup>) rehydratisiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde die Suspension zehnfach verdünnt und je 100 µL der erhaltenen Stammkultur auf LB-Agarplatten (Ø 90 mm) ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden anschließend über einen Zeitraum von 3 Tagen bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Im Folgenden wurden Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse entnommen und in LB-Nährlösung (400 bis 800 mL) über Nacht bei 30 °C unter starkem Schütteln (150 rpm) angezogen.

Alle verwendeten Nährmedien wurden vor ihrem Einsatz im Autoklaven sorgfältig dampfsterilisiert und die beschriebenen Arbeitsschritte in einer sterilen Werkbank durchgeführt, da keine Selektion durch Einsatz eines Antibiotikums möglich war.

##### **LB-Medium**

1 Gew.-% Trypton

0.5 Gew.-% Hefeextrakt

0.5 Gew.-% NaCl

pH 7.5

##### **LB-Agar-Medium**

1 Gew.-% Trypton

0.5 Gew.-% Hefeextrakt

0.5 Gew.-% NaCl

1.5 Gew.-% Agar

pH 7.5

### *Escherichia coli* pTthL11Q29C

Der Ribosomchimärenstamm *E. coli* pTthL11Q29C wurde von Dr. S. Baumann im Labor hergestellt und lag als Glycerolstock vor. Eine Beschreibung des Stamms sowie der eingesetzten Methoden zu dessen Herstellung finden sich in seiner Dissertation.<sup>[464]</sup> Kurz dargestellt wurde der *rplk*-ORF von *T. thermophilus* (kodierend für das ribosomale Protein L11) durch PCR amplifiziert, mittels *StuI/BamHI* Strategie in den Expressionsvektor pQE30 Xa (*Qiagen*) kloniert und in *E. coli* XL1 blue transformiert. Nach Selektieren der resistenten Kolonien auf LB-Agarplatten (+Amp) wurde das rekombinante pQE30 Xa-*rplk* Plasmid isoliert. Die Einführung der Punktmutation erfolgte dann durch *in vitro* Mutagenese und das erhaltene Mutantenplasmid, welches für ein N-terminal-His<sub>6</sub>-markiertes L11-Q29C-Fusionsprotein unter T5-Promoter-Kontrolle kodiert, wurde anschließend in den L11-defizienten *E. coli* Stamm BW25113  $\Delta rplk$  transformiert.

Die Anzucht von *E. coli* pTthL11Q29C erfolgte in LB-Medium mit 100  $\mu$ M Ampicillin und 100  $\mu$ M Kanamycin. Hierzu wurden Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse in die Nährlösung angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter starkem Schütteln (150 rpm) angezogen.

Alle verwendeten Nährmedien wurden vor ihrem Einsatz sorgfältig im Autoklaven dampfsterilisiert und alle Arbeitsschritte in der Nähe einer Flamme durchgeführt.

### ***Streptomyces coelicolor* A3(2)**

*Streptomyces coelicolor* wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Ermittlung der wachstumshemmenden Eigenschaften von synthetisierten Thiostrepton-PAL-Sonden verwendet. Die Festmedium-Kulturen (YT-Agar) wurden uns von Prof. Dr. E. Kothe zur Verfügung gestellt und von Dipl. Biol. S. Kastner zum Sporulieren auf MS-Agar-Medium<sup>[498]</sup> bei 30 °C angezogen. Nach 2 bis 4 Wochen wurden die weißen Sporent Teppiche mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens geerntet und im Anschluss für die Agardiffusionstests eingesetzt.

#### **YT-Agar-Medium**

0.8 Gew.-% Bakto Trypton  
1 Gew.-% Hefeextrakt  
0,5 Gew.-% NaCl  
1.5 Gew.-% Agar  
pH 7.0

#### **MS-Agar-Medium**

2 Gew.-% Mannitol  
2 Gew.-% Sojamehl  
2 Gew.-% Agar  
pH 7.5

### **Agardiffusionstest**

*S. coelicolor* A3(2) wurde zum Sporulieren auf MS-Agar-Medium angezogen. Die Sporen wurden mit einem sterilen Wattestäbchens geerntet und in 1 mL steriler isotonischen NaCl-Lösung (0.9 Gew.-%) resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend auf AM-Agar-Medium homogen verteilt und die Platten unter sterilem Luftstrom getrocknet. Mit dem breiten Ende einer sterilen 200 µL-Pipettenspitze (Eppendorf®) wurden dann 9 Löcher je Agar-Platte gestochen und mit 50 µL steriler Analyt-Lösung (in DMSO) gefüllt. Nach ca. 2 h waren die Lösungen innerhalb der Löcher vollständig in das Medium diffundiert, woraufhin die Platten verschlossen und für 1 Woche bei 30 °C inkubiert wurden. Zur Auswertung wurden die Platten in einer Dokumentationskammer unter Weißlicht abfotografiert. Die Analytverbindung-Lösungen wurden mit Konzentrationen von 0.5 bis 100 µM in DMSO angesetzt und vor ihrem Einsatz steril filtriert (0.22 µm). Als Negativkontrolle diente reines DMSO, als Positivkontrolle Thiostrepton (in DMSO).

**AM-Minimalmedium**

1 Gew.-% Glukose	0.02 Gew.-% MgSO <sub>4</sub>
0.05 Gew.-% L-Asn	0.001 Gew.-% FeSO <sub>4</sub>
0.05 Gew.-% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.8 Gew.-% Agar

**6.10.2 Eukaryotische Zellkulturen****HeLa -Zellen**

*Henrietta Lack's* Cervixkarzinom-Zellen<sup>[499]</sup> wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) *High Glucose* Medium supplementiert mit 1 Gew.-% FKS, 1x MEM nicht essentielle Aminosäuren,<sup>[500]</sup> 1 mM Natriumpyruvat, 50 µg/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin bei 37 °C mit 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Ansetzen einer frischen Kultur wurden die adhärent wachsenden Zellen mit steriler PBS-Lösung zweifach gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 1.5 mL einer 0.05 Gew.-% Trypsin-/0.02 Gew.-% EDTA-Lösung in PBS behandelt. Nach Resuspendieren der vereinzelt Zellen in 10 mL frischem Medium, wurden 0.5 mL der erhaltenen Suspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit 29.5 mL Medium versetzt und weiter kultiviert. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Nährmedien und Lösungen wurden kommerziell als steril-filtriert bezogen und vor ihrem Einsatz im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Zählung der Zellen erfolgte über Durchlichtmikroskopie mit einer Neubauer Zählkammer, wobei lebendige von toten Zellen mittels Trypanblaufärbung unterschieden wurden.

**MEM nicht essentielle Aminosäuren (*Sigma Aldrich*)**

0.089 Gew.-% L-Alanin
0.15 Gew.-% L-Asparagin
0.13 Gew.-% L-Asparaginsäure
0.147 Gew.-% L-Glutaminsäure
0.075 Gew.-% Glycin
0.115 Gew.-% L-Prolin
0.105 Gew.-% L-Serin

## 6.10.3 Proteinbiochemie

### 6.10.3.1 UV-Vis-Spektroskopie-Konzentrationsbestimmungen

Proteinlösungen absorbieren UV-Licht mit Absorptionsmaxima bei 200 und 280 nm. Dabei absorbiert die Peptidbindung bei 200 nm, während aromatische Aminosäuren vorwiegend für den Absorptionspeak bei 280 nm verantwortlich sind.

Die Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde über die UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren bestimmt. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt und gemittelt. Als Blindprobe diente ddH<sub>2</sub>O- bzw. Pufferlösung. Über das Lambert-Beersche Gesetz wurde unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten – welcher mit einer Verdünnungsreihe des zu quantifizierenden Proteins vorherig ermittelt wurde – die molare Konzentration bestimmt:

$$(1) \quad E_{\lambda} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot d$$

aus (1) folgt (2)  $c = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda} \cdot d}$

mit  $E_{\lambda}$ : Extinktion des Materials für das Licht der Wellenlänge  $\lambda$ ;  $I_1$ : Intensität des transmittierten Lichtes;  $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichtes;  $c$ : molare Konzentration;  $d$ : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers;  $\epsilon_{\lambda}$ : Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$

### 6.10.3.2 Bradford-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford *et al.*<sup>[501]</sup> eingesetzt. Diese beruht auf der Fähigkeit des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) im Sauren Komplexe mit kationischen und aromatischen Seitenketten von Proteinen zu bilden, wodurch eine Rotverschiebung im Absorptionsspektrum des Farbstoffs eintritt. Die ungebundene rote Form von CBBG zeigt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, während die blaue unprotonierte anionische Sulfonatform ein Maximum bei 595 nm mit stark erhöhtem Extinktionskoeffizienten aufweist.

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden sowohl mittels kommerzieller (*Sigma Aldrich*®) als auch selbst hergestellter Bradford-Lösung quantifiziert. In beiden Fällen



wurden zwischen 10 und 30  $\mu\text{L}$  Probe mit 120 bis 130  $\mu\text{L}$  Bradford-Lösung bei RT versetzt und nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Blindprobe diente  $\text{ddH}_2\text{O}$  bzw. Proteinpuffer. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde systematisch eine Kalibrierung mittels Verdünnungsreihe des Rinderserumalbumins (BSA) durchgeführt, wobei jede Messung mindestens dreifach vorgenommen wurde.

### **Bradford-Lösung**

0,05 Gew.-% CBBG

4,8 Vol.-% Ethanol

8,5 Vol.-%  $\text{H}_3\text{PO}_4$

### **6.10.3.3 Ellmans Test**

Nachweis und quantitative Bestimmung von freien Thiolgruppen in der Lösung wurden nach der Methode von Ellman *et al.*<sup>[502]</sup> durchgeführt. Diese beruht auf einer Austauschreaktion von Sulfhydrylgruppen mit 5,5'-Dithio-*bis*-2-nitrobenzoesäure (DTNB) unter leicht alkalischen Bedingungen, die zur Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure ( $\text{NTB}^{2-}$ ) führt.  $\text{NTB}^{2-}$  weist eine intensive gelbe Färbung auf und erlaubt so eine photometrische Bestimmung der Thiolgruppen bei 412 nm.

Zur Untersuchung von Thiol-haltigen Lösungen wurden je 10  $\mu\text{L}$  Probe mit 50  $\mu\text{L}$  DTNB-Stammlösung und 940  $\mu\text{L}$  100 mM Tris·HCl bei pH 8 versetzt und nach 5 min Inkubation (RT) die Absorption bei 412 nm gemessen. Jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt, wobei 10  $\mu\text{L}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  als Blindprobe dienten. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde parallel eine Standardreihe mittels Cystein·HCl durchgeführt. Als Extinktionskoeffizient wurde  $\epsilon_{412} = 14.15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  gemäß Literatur<sup>[503]</sup> verwendet.

### **DTNB-StammLösung**

2 mM DTNB

50 mM NaOAc

### 6.10.3.4 Natriumodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinen wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) in Anlehnung an Laemmli *et al.*<sup>[504]</sup> eingesetzt. Diese erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach Polypeptid-Kettenlänge bzw. Molekülmasse, indem die Proteine erst denaturiert werden und dann mittels ihrer elektrophoretischen Mobilität in einem Polyacrylamidgel, welches unter Stromspannung steht, getrennt werden. Zusätzlich kommt ein anionisches Tensid (SDS) zum Einsatz, das die Proteine gleichmäßig überdeckt, sodass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und ihre elektrophoretische Mobilität einzig von ihrer Kettenlänge abhängt. Längere Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten, während kurze Proteine schneller durch das Gel wandern. Insofern hängt die zurückgelegte Distanz des Proteins durch das Gel einzig von seiner Größe ab, welche proportional zum Logarithmus der Molekülmasse ist. Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in dieser Arbeit erfolgte mit kontinuierlichen und diskontinuierlichen Gelen. Bei der Auftrennung mittels kontinuierlicher Gele wurden 12-, 13- und 15 Gew.-%ige Gel eingesetzt. Bei diskontinuierlichen Gelsystemen wurde zusätzlich zu einem 15 Gew.-%igen Trenngel ein 5 Gew.-%iges Sammelgel eingegossen. Bei besonders anspruchsvollen Trennungen wurden ebenfalls kommerzielle Gradientengele (*Bio Rad*®) verwendet.

Eine Denaturierung erfolgte, indem die Proben 3:1 mit 4x Ladepuffer versetzt und das Gemisch 5 min bei 99 °C inkubiert wurde. Dann erfolgte die elektrophoretische Trennung in Elektrophoresekammern unter Standardbedingungen bei einer konstanten Stromstärke von 2-2.5 mA/cm. Darüber hinaus wurde in eine Spur jedes Gels ein Molekülmassenmarker-Gemisch aufgetragen, welches eine Schätzung der Molekülmasse der im Gel aufgetrennten Proteine erlaubte.

<b>4x Ladepuffer</b>	<b>10x Laufpuffer</b>	<b>“Lower Tris”</b>	<b>“Upper Tris”</b>
200 mM Tris·HCl	250 mM	1.5 M Tris·HCl	0.5 M Tris·HCl
8 Gew.-% SDS	Tris·HCl	0.4 Gew.-%	0.4 Gew.-% SDS
40 Vol.-% Glycerin	1.92 M Glycin	SDS	pH 6.8
50 mM Na <sub>2</sub> EDTA	1 Gew.-% SDS	pH 8.8	
0.6 M DTT			
0.08 Gew.-% Bromphenolblau			

### Gelpolymerisation

Zur Herstellung eines kontinuierlichen Gels wurden 2.6 mL „Lower Tris“ mit 2.4 bis 3.4 mL ddH<sub>2</sub>O und 4 bis 5 mL einer 30 Gew.-%igen Acrylamid/bis-Acrylamid-Lösung (29:1, *Sigma Aldrich*®) versetzt. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 µL TEMED und 100 µL einer 10 Gew.-%igen APS-Lösung die Polymerisationsreaktion initiiert.

Bei diskontinuierlichen Gelsystemen wurde erst ein 15 Gew.-%iges Trenngel hergestellt. Hierfür wurden 1.3 mL „Lower Tris“ mit 1.2 mL ddH<sub>2</sub>O und 2.5 mL einer 30 Gew.-%igen Acrylamid/bis-Acrylamid-Lösung (29:1, *Sigma Aldrich*®) versetzt und mittels Beigabe von 10 µL TEMED und 50 µL einer 10 Gew.-%igen APS-Lösung polymerisiert. Im Anschluss wurde über dem Trenngel ein Sammelgel gegossen. Hierfür wurden 234 µL „Upper Tris“, 1.2 mL ddH<sub>2</sub>O und 300 µL 30% Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1, *Sigma Aldrich*®) versetzt und anschließend mittels TEMED (5 µL) und APS (19 µL, 10 Gew.-%) polymerisiert.

### Gelfärbung

#### Coomassie-Färbung

Die Detektion von Proteinbanden in SDS-Page Gelen mittels Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250 (CBBR) wurde in Anlehnung an Neuhoff *et al.*<sup>[505]</sup> durchgeführt. Dabei wurden die zu analysierenden Gele erst mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und im Anschluss in einem verschließbaren Behälter mit Färbelösung unter leichtem Schütteln behandelt. Die Inkubationszeit betrug ca. 1 h bei RT. Kürzere Inkubationszeiten (ca. 15-20 min) konnten

erreicht werden, wenn die Färbelösung zuvor für ca. 1 min in der Mikrowelle bei maximaler Leistung (800 W) erhitzt wurde.

Zum Entfärben wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt und die Gele solange darin inkubiert, bis klare Proteinbanden zu erkennen waren. Auch hier konnte durch vorläufiges Erhitzen der Entfärbelösung die Inkubationszeit deutlich verkürzt werden. Zur Aufbewahrung wurden die Elektrophoresegele anschließend in einer 7.5 Vol.-%igen AcOH-Lösung überführt und konnten so bis zu 2 Wochen bei +4 °C gelagert werden.

#### **Färbelösung**

0.25 Gew.-% CBB R-250

40 Vol.-% Methanol

10 Vol.-% AcOH

#### **Entfärbelösung**

5 Vol.-% Methanol

7.5 Vol.-% AcOH

### **Silber-Färbung**

Die Silberfärbung von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach der Methode von Kerenyi und Gallyas.<sup>[506]</sup> Diese basiert auf einer Anlagerung von Silberionen an argyrophile Makromoleküle, welche dann ortsspezifisch zu Silberpartikel reduziert werden und so eine Detektion der Proteinbanden durch Kontrastierung ermöglichen. Dabei wird das Gel zunächst anhand einer Fixierungslösung (50 Vol.-% EtOH, 10 Vol.-% AcOH in ddH<sub>2</sub>O) fixiert, so dass die Diffusion der Proteine im Gel deutlich reduziert wird. Gleichzeitig wird dabei das Detergenz (SDS) entfernt. Nach mehrfachem Waschen wird ein schwaches Reduktionsmittel zugegeben und erlaubt so eine Sensibilisierung d. h. eine Verminderung der Hintergrundfärbung. Im Anschluss wird das Gel in der Silbernitratlösung inkubiert. Nach einer kurzen Wäsche (um überschüssiges Silber zu entfernen) wird das Gel entwickelt. Die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, erscheinen dunkelbraun bis schwarz.

Silberfärbungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels des kommerziellen *Proteo.Silver*<sup>TM</sup> *Silver Stain Kits* (*Sigma Aldrich*®) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Schritte wurden in zuvor sorgfältig gereinigten Kunststoffwannen durchgeführt. Zur Aufbewahrung der angefärbten Gele wurden diese in ddH<sub>2</sub>O überführt und konnten so bis zu 2 Wochen bei +4 °C gelagert werden.

### 6.10.3.5 Western Blot

Nach Separierung der Proteine durch SDS-PAGE, wurden die aufgetrennten Banden nach der Methode von Towbin *et al.*<sup>[507]</sup> auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und durch Immundetektion sichtbar gemacht. Hierfür wurden zunächst Sammel- und Trenngel mit Hilfe eines Skalpell getrennt und das Trenngel für ca. 10 min in Towbin-Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgte dann bei konstanter Stromspannung (10 V) über einen Zeitraum von 1.5 h mit einer Semidry-Blotkammer, wobei die Trägermembran (*Carl Roth, Roti® NC*, Bindungskapazität: 125-200 µg/cm<sup>2</sup>) anodenseitig und das Gel kathodenseitig gelegt waren. Nach dreifacher Wäsche mittels PBST-Lösung, wurde die Membran für 2 h blockiert und erneut 3 Mal mit PBST-Lösung gewaschen. Die blockierte Membran wurde anschließend mit einem Primärantikörper zur Detektion von His<sub>6</sub>- oder Biotin-markierten Proteinen (1 zu 1000 Verdünnung in PBST) über Nacht inkubiert. Ungebundener AK wurde im Folgenden durch 3 Waschschrte mit PBST-Lösung entfernt und die Membran für 2 h mit Sekundärantikörper (1 zu 1000 Verdünnung in PBST) inkubiert. Nach dreifacher Wäsche mit PBST-Lösung (3 x 10 min) wurden die markierten Banden mittels *Opti-4 CN™* Kit (*Bio Rad®*) gemäß Herstellerangaben nachgewiesen und die Membran in einer Dokumentationskammer abfotografiert.

#### 10x Towbinpuffer

250 mM Tris

1,92 M Glycin

10 Vol.-% MeOH

pH 8.3

#### 10x PBST-puffer

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 M NaCl

3 mM KCl

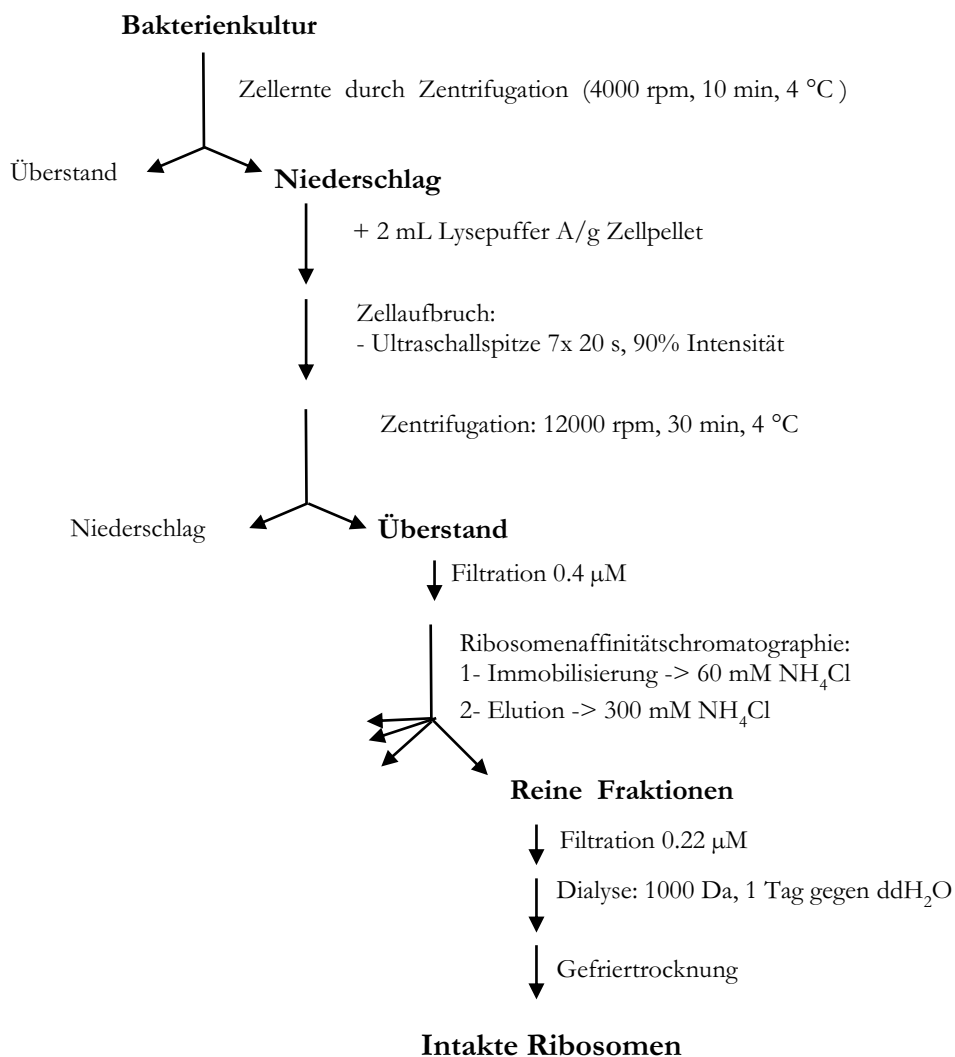
1 Vol.-% Tween-20

pH 7.4

## 6.10.4 Präparative Biochemie

### 6.10.4.1 Ribosomenreinigung

Die Reinigung intakter Ribosomen aus bakteriellen Kulturen erfolgte über eine Affinitätschromatographie bzw. eine Chromatographie durch hydrophobe Wechselwirkungen (HIC) nach der Methode von Maguire *et al.* [472].



**Abbildung 6-2:** Schematische Darstellung der Ribosomen-Reinigungsstrategie durch Affinitätschromatographie.

## Herstellung der stationären Phase

Das Sulfolink-Harz (*Thermo Scientific*) wurde als 50 Vol.-%ige Suspension in 10mM EDTA, 50 Vol.-% Glycerin und 0.05 Gew.-% NaN<sub>3</sub> kommerziell bezogen. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 1 min, 4 °C) wurde zunächst der Überstand verworfen und das Harz 1 zu 1 in Kupplungspuffer resuspendiert. Im Anschluss wurde erneut zentrifugiert (1000 rpm, 1 min, 4 °C) und der Überstand wiederholt verworfen und durch Kupplungspuffer ersetzt. Diese Prozedur wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt und diente der Äquilibration des Säulenmaterials. Eine Funktionalisierung des Harzes erfolgte dann durch Zugabe einer 50 mM Cystein·HCl-Lösung (in Kupplungspuffer). Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 45 min (15 min unter sanftem Schütteln gefolgt von 30 min ohne Schütteln) bei RT, wurde die Suspension luftblasenfrei in eine variable *ÄKTA*-kompatible Leersäule (*GE Healthcare*®) überführt und mit einer Peristaltikpumpe (*Pharmacia*®) mit mindestens 10 Säulenvolumina Reinstwasser gewaschen. Nach Gebrauch wurde das Säulenmaterial in 20 Vol.-% EtOH bei 4 °C gelagert um auf diese Weise bakterielle Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Überprüfung der Funktionalisierung des Harzes und Bestimmung der Kupplungseffizienz wurde eine quantitative Bestimmung der freien Thiolgruppen in der Cystein·HCl-Lösung vor und nach Kupplungsreaktion mit einem Ellmans Test vorgenommen.

## Ribosomenimmobilisierung und Elution

Die Bakterien-Flüssigkulturen wurden zunächst mittels Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden im Anschluss in Lysepuffer A (0,5 g Zellpellet/mL, 4 °C) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (5 x 20 s, 90 % Intensität) aufgebrochen. Das daraus entstandene Zelllysate wurde dann bei 4 °C 30 min bei 12000 rpm sedimentiert und der Überstand durch Filtration geklärt (0.4 µM Filter) und in ein sauberes Gefäß überführt.

Nach Äquilibration der Ribosomenaffinitätssäule mit ca. 10 Volumina Lysepuffer B, wurde das Zelllysate mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup> injiziert und die Ribosomen auf dem Säulenmaterial immobilisiert. Nach einer Waschphase von ca. 10 Volumina Lysepuffer B wurde eine Elution der Ribosomen durch Zugabe von Elutionspuffer durchgeführt.

Alle Fraktionen wurden mittels Bradford Assay auf ihren Proteingehalt untersucht und die Fraktionen von Interesse anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die ribosomenhaltigen Fraktionen wurden kombiniert und 3 Tage gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert (MWCO: 1000 Da). Zur Aufbewahrung wurde das Dialysat steril-filtriert (0.22 µm Filter), in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die ribosomale Konzentration der gereinigten Proben wurde UV-spektroskopisch ermittelt. Als Extinktionskoeffizienten wurde  $\epsilon_{260} = 4.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  gemäß Literatur<sup>[472]</sup> verwendet.

Kupplungspuffer	Lysepuffer A	Lysepuffer B	Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
5 mM Na <sub>2</sub> EDTA	10.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	10.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	10.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>
pH 8.5	0.5 mM Na <sub>2</sub> EDTA	0.5 mM Na <sub>2</sub> EDTA	0.5 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	100 mM NH <sub>4</sub> Cl	60 mM NH <sub>4</sub> Cl	300 mM NH <sub>4</sub> Cl
	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5

## 6.10.5 Assays

### 6.10.5.1 Gekoppelter in vitro Translations-Inhibitions-Assay

Dieser Assay basiert auf dem kommerziell erhältlichen *RTS 100 E. coli HY* Kit (Roche®) und wurde von Dr. S. Baumann zur Untersuchung der Aktivität von Thiopeptiden und Thiopeptidderivaten auf die Proteinbiosynthese adaptiert.<sup>[464]</sup> Die quantitative Verfolgung der Transkription-Translation erfolgte über Fluoreszenzspektrometrie und beruht auf der Expression des grünfluoreszierenden GFP-Proteins aus dem T7-promoterkontrollierten pIVEX2.3d-Plasmid (Roche®), welches im Kit enthalten ist. Nach Resuspendieren der zur Expression benötigten Kit-Komponenten (*E. coli*-Zelllysate, Aminosäuren-Gemisch, Reaktionsgemisch) in Rekonstitutionspuffer gemäß Herstellerangaben wurden zunächst 6 µL Translationspuffer in die gewünschten Löcher einer schwarzen 384-Loch Optiplatte (Perkin Elmer®) pipettiert. In das jeweils erste Loch einer Reihe wurden dann 6 µL einer 200 µM Lösung aus Thiostrepton bzw. Thiostreptonderivat in Translationspuffer pipettiert



und  $\mu\text{equiv.}$ uenziell 1 zu 1 in das horizontalbenachbarte Loch verdünnt. Die so erhaltenen Verdünnungsreihen wurden im Anschluss mit 2  $\mu\text{L}$  Translationsmix versetzt und die Platte für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{L}$  einer 0.05  $\mu\text{g},\mu\text{L}^{-1}$ -Lösung des Kontrollplamids (pIVEX2.3d, *Roche*) in ddH<sub>2</sub>O wurde die Platte für ca. 10 s bei 1000 rpm zentrifugiert und im Brutschrank bei 30 °C inkubiert. Nach 1.5 h wurde die Platte aus dem Brutschrank entfernt und über Nacht bei 4 °C gelagert, um eine Anreicherung des GFP-Proteins zu ermöglichen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit einem Plattenlesegerät, wobei die Emission bei 504 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 395 \text{ nm}$ ) gemessen und die ermittelten Werte gegen die Inhibitor-Konzentrationen aufgetragen wurden. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Plasmidzugabe und als Positivkontrolle Ansätze ohne Inhibitorzugabe. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) an den erhaltenen sigmoidalen Kurven abgelesen.

### Translationspuffer

20 mM Tris-HCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM NaCl

5 Vol.-% TFE

pH 7.4

### 6.10.5.2 Proteasom-Inhibierungs-Assay

Um die unterschiedlichen Proteaseaktivitäten selektiv zu untersuchen, wurden die 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) markierten Substratpeptiden **Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC**, **Boc-Leu-Arg-Arg-AMC** und **Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC** eingesetzt, welche nach proteolytischem Abbau AMC als Indikator-Fluoreszenzfarbstoff freisetzen.<sup>[508]</sup> Dadurch kann der Reaktionsverlauf fluoreszenzspektroskopisch verfolgt und die inhibitorische Wirkung von Analytverbindungen bestimmt werden.

Die Ansätze wurden in schwarzen 384-Loch Optiplates (*Perkin Elmer*®) realisiert. In das jeweils erste Loch einer Reihe wurden 50  $\mu\text{L}$ , in jedes weitere 25  $\mu\text{L}$  Inkubationspuffer mit 0.002 Vol.-% NP-40-Detergenz pipettiert. Des Weiteren wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Lösung aus humanen 20S Proteasom (*Calbiochem*®) in Inkubationspuffer pipettiert. Nach

Zugabe in die erste Kavität von 10 µL Analyt-Lösung (160 µM in DMSO), erfolgte die Verdünnung innerhalb einer Reihe durch seriell Pipettieren von 30 µL der erhaltenen Reaktionslösung in den benachbarten Ansatz. Die Platte wurde zum Sammeln der Probe 10 s bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 10 µL einer 250 µM Lösung aus AMC-Peptidsubstrat in Inkubationspuffer initiiert. Zur Verfolgung der Reaktion wurde die Fluoreszenzemission bei 460 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) bei 37 °C über einen Zeitraum von 5 h mithilfe eines Plattenlesegeräts im Fünfminutentakt verfolgt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Peptidsubstrat, als Positivkontrolle Ansätze ohne Inhibitorzugabe. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils in Triplikaten untersucht.

Zur Analyse wurden die gemessenen Emissionsintensitäten graphisch gegen die Zeit dargestellt. Der Initialumsatz wurde durch Ermittlung der Steigung im linearen Bereich der erhaltenen hyperbolischen Kurven mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\alpha = \frac{F(t_1) - F(t_0)}{\Delta t}$$

mit  $\alpha$  : lineare Steigung,  $F(t_1)$ : Fluoreszenzintensitäten am Zeitpunkt  $t_1$ ,  $F(t_0)$ : Fluoreszenzintensitäten am Zeitpunkt 0 und  $\Delta t$  die Zeitspanne zwischen  $t_1$  und  $t_0$ .

Die berechneten Initialumsätze innerhalb einer Verdünnungsreihe wurden im Folgenden halb-logarithmisch mittels Hill<sub>1</sub>-Fitting (*Origin*®) gegen die Analytkonzentration aufgetragen, wodurch eine sigmoidale Kurve erhalten und die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) des untersuchten Inhibitors ermittelt wurde.

### **Inkubationspuffer**

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

0.002 Vol.-% NP-40

pH 7.5

### 6.10.5.3 Proteasom-Inhibierungs-Assay in HeLa-Zellysat

Bei diesem Assay handelt es sich um eine Variante der in 6.10.5.2 beschriebenen Durchführung. Anstelle von reinen 20 S-Proteasomkomplexen wurden hier Zellysate der HeLa-Zelllinie eingesetzt. Hierfür wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst zweifach mit steriler PBS-Lösung gewaschen, durch Trypsinieren vereinzelt (vgl. 6.10.2) und in frischem Medium resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde im Folgenden kurz zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4 °C) und die geernteten Zellen in 2 mL Inkubationspuffer (vgl. 6.10.5.2) resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung (5 x 20 s, 90% Intensität) wurden die Zellen aufgebrochen und das erhaltene Zellysat fraktioniert (30 min, 12000 rpm, 4 °C). Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand durch Filtration geklärt (0.4 µM Filter). Nach Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford Assay (vgl. 1.11.3.2), wurde das geklärte Zellysat ohne weiteren Reinigungsschritt eingesetzt.

### 6.10.6 Aktivitätsbasierte Testierungen

#### 6.10.6.1 Proximity Induced Covalent Capture (PICC)

PICC-Reaktionen mit Thiostrepton in Zellysaten des *Tth*L11Q29C komplementierten *E. coli* rplk-Stamms wurden in dieser Arbeit als Kontrollexperimente zur Visualisierung von kovalenten Addukten des L11-Proteins mit Thiostrepton verwendet und wurden in Anlehnung an S. Baumann *et al.* durchgeführt.<sup>[106]</sup> Hierzu wurden die Flüssigkulturen zunächst mittels Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet und die Zellen nach Resuspendieren in PICC-Inkubationspuffer (0.5 mg/mL) durch Ultraschallbehandlung (5 x 20 s, 90% Intensität) aufgebrochen. Das Zellysat wurde sedimentiert (4 °C, 30 min, 12000 rpm), wobei der Niederschlag verworfen und der Überstand durch Filtration (0.4 µM) geklärt wurde. Nach Verdünnung des Zellysats mit der zehnfachen Menge PICC-Inkubationspuffer wurden 188 µL der erhaltenen Lösung (2 µg/µL Protein) mit 10 µL einer 1 mM Lösung aus Thiostrepton in TFE sowie 2 µL einer frisch angesetzten 200 mM Lösung aus TCEP in ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei RT inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mittels Zentrifugalfiltration (*Amicon*®, 3 KDa MWCO, 4 °C, 30 min,

12000 rpm) konzentriert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und über Westen Blot (Immundetektion  $\alpha$ -His<sub>6</sub>) analysiert.

### **PICC Inkubationspuffer**

20 mM Tris-HCl

5mM MgCl<sub>2</sub>

300 mM NaCl

pH 8

### **6.10.6.2 Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente in Zellysaten**

*E. coli* pT<sub>tbl</sub>L11Q29C oder *B. subtilis* wurde in Flüssigkulturen über Nacht entsprechend **6.10.1.1** angezogen. Die Bakterien wurden geerntet (5 min, 4000 rpm, 4 °C), in PAL-Lysepuffer (0.5 g/mL, 4 °C) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach Fraktionierung des Zellysats (30 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand filtriert (0.22  $\mu$ M Filter), dessen Proteinkonzentration durch Bradford Test bestimmt (**6.10.3.2**) und in PAL-Lysepuffer auf 2 mg/mL verdünnt.

Die PAL-Versuche wurden in 200  $\mu$ L Ansätzen durchgeführt, wobei die einzelnen Reaktionen 5 Vol.-% DMSO sowie 5, 10, 20 oder 50  $\mu$ M PAL-Sonde enthielten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter sanftem Schütteln (100 rpm) und Lichtausschluss. Zur Photolyse wurden die einzelnen Ansätze in Glasgefäße (2 mL-Probengefäß) überführt und über einen Zeitraum von 1 h mit UV-Licht (365 nm, 8 W, *Herolab GmbH*) bestrahlt. Danach wurden die Proben in 1.5 mL-Reaktionsgefäße transferiert und die Proteine durch Zugabe von 800  $\mu$ L vorgekühltes (-20 °C) Aceton präzipitiert. Nach 1 h bei -20 °C wurden die Proben für 20 min bei 21 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet, in 50  $\mu$ L einer 0.2 Gew.-% SDS in PBS-Lösung aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Nach Zugabe von 50  $\mu$ L 2x SDS-Laddepuffer (vgl. **6.10.3.4**) wurden die Proben 5 min bei 99 °C denaturiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und über Immunblot ( $\alpha$ -His<sub>6</sub>) untersucht.

<b>PAL-Lysepuffer</b>	<b>SDS-Resuspensionspuffer</b>
20 mM Tris-HCl,	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>	140 mM NaCl
0.5 mM Na <sub>2</sub> EDTA	0.2 Gew.-% SDS
pH 7.5	pH 7.4

### 6.10.6.3 Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit reinen L11Q29C- Chimärribosomen

*E. coli* pT<sub>th</sub>L11Q29C-Chimärribosomen wurden entsprechend 6.10.4.1 gereinigt. Durch Zentrifugalfiltrieren (*Amicon*®, 3 KDa MWCO, 4 °C, 30 min, 12000 rpm) wurde die Lösung entsalzt und der Filtrerrückstand im Verhältnis 9:1 mit 10x PAL-Lysepuffer versetzt. Nach Bestimmung der ribosomalen Konzentration, wurden je 200 µg reine 70S Ribosomen über Nacht mit Thiostrepton-PAL-Sonde (10-50 µM in DMSO) nach in 6.10.6.2 beschriebener Durchführung inkubiert und zur Photolyse mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt.

Die Proteine wurden im Folgenden durch Aceton-Präzipitation gefällt, zentrifugiert (20 min, 21000 rpm, 4 °C) und der Niederschlag in 50 µL PBS-Lösung mit 0.2 Gew.-% SDS im Ultraschallbad gelöst. Nach Zugabe von 50 µL 2x SDS-Ladepuffer wurden die Proben 5 min bei 99 °C thermisch denaturiert und durch SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot ( $\alpha$ -His<sub>6</sub>) analysiert.

### 6.10.6.4 Photoaffinitätsmarkierung mit nachfolgender Cu<sup>(I)</sup> katalysierter Azid-Alkyn Huisgen Cycloaddition

Die PAL-Versuche (50 µM Thiostrepton-PAL-Sonde) wurden in 200 µL Volumen gemäß der in 6.10.6.2 aufgeführter Beschreibung durchgeführt. Nach UV-Bestrahlung wurden die Proben zentrifugalfiltriert (*Amicon*®, 3 KDa MWCO, 4 °C, 30 min, 12000 rpm) und die verbleibende Lösungen in 1.5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Zu je 45 µL entsalzter PAL-Reaktionslösung wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

10 µL 10x CuAAC-Puffer  
35.5 µL ddH<sub>2</sub>O

2  $\mu\text{L}$  Azid-Lösung (*Azide-PEG3-Biotin Conjugate* bzw. *Azide-Fluor 488*, Sigma, 5 mM in DMSO Stammlösung)

2.5  $\mu\text{L}$  frisch angesetzte Natriumascorbat-Lösung (8 mM in ddH<sub>2</sub>O)

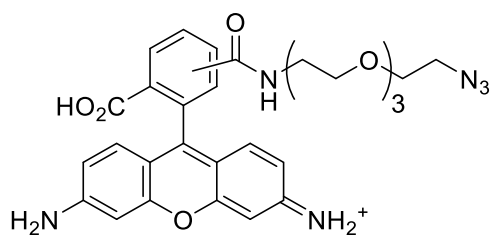
4  $\mu\text{L}$  Katalysator-Ligand-Komplex

Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C intensiv geschüttelt (1200 rpm) und nach 4 h mit 2  $\mu\text{L}$  einer 10 mM Lösung aus Na<sub>2</sub>EDTA in ddH<sub>2</sub>O gÄquiv.uencht. Nach Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  vorgekühltem (-20 °C) Aceton, wurden die Proteine präzipitiert und zum Entfernen von überschüssigem Azid-Reagenz mit MeOH gewaschen. Hierzu wurden die Niederschläge in 200  $\mu\text{L}$  vorgekühltem MeOH (-20 °C) aufgenommen, 5 min im Ultraschallbad gelöst und erneut 20 min zentrifugiert (21000 rpm, 4 °C). Die Protein-Pellets wurden dann unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und mittels 25  $\mu\text{L}$  SDS-Resuspensionspuffer gelöst (vgl. 6.10.6.2). Nach Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  2x SDS-Ladepuffer wurden die Proben 5 min bei 99 °C thermisch denaturiert und mittels SDS-PAGE getrennt. Die Visualisierung der mit *Azide-Fluor 488*-markierten Proteine erfolgte unmittelbar nach SDS-PAGE-Separierung in einer Dokumentationskammer unter UV-Licht (360 nm). Ansätze mit *Azide-PEG3-Biotin Conjugate*-Markierung wurden über Immunblot ( $\alpha$ -Biotin) analysiert.

#### 10x CuAAC-Puffer

200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 8.2



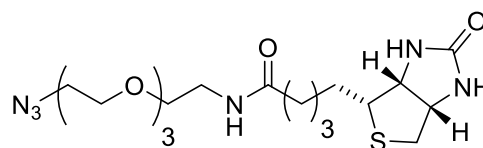
Azide-Fluor 488 ®  
(203)

#### Katalysator-Ligand-Komplex

5 mM CuI

5 mM TBTA

DMSO/*t*-BuOH (3:1)



Azide-PEG3-Biotin Conjugate®  
(204)

### 6.10.6.5 Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit vorheriger CuAAC

Zu einer gerührten Lösung aus 100  $\mu\text{M}$  Thiostrepton-PAL-Sonde in 1x CuAAC-Puffer wurden folgende Reagenzien zugegeben:

20  $\mu\text{L}$  *Azide-PEG3-Biotin Conjugate* (*Sigma*®), 5 mM in DMSO)

25  $\mu\text{L}$  Natriumascorbat-Lösung (8 mM in ddH<sub>2</sub>O, frisch angesetzt)

40  $\mu\text{L}$  Katalysator-Ligand-Komplex [CuI/TBTA (1:1), 5 mM in DMSO/*t*-BuOH (3:1)]

Die Ansätze wurden bei 37 °C in 1.5 mL-Gefäßen durchgeführt. Das Endvolumen betrug 500  $\mu\text{L}$  und der Reaktionsverlauf wurde über HPLC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz (nach ca. 3 h) wurde Na<sub>2</sub>EDTA (25  $\mu\text{L}$ , 20 mM in H<sub>2</sub>O) zugegeben und mittels Zentrifugalfiltrieren (*Amicon*®, 3 KDa MWCO, 4 °C, 30 min, 12000 rpm) entsalzt. Von der verbleibenden Lösung wurden jeweils 90  $\mu\text{L}$  mit dem gleichen Volumen an Zellysat bzw. gereinigter RibosomLösung, sowie 20  $\mu\text{L}$  10x PAL-Lysepuffer versetzt und unter UV-Licht (vgl. 6.10.6.2) photolysiert. Nach Fällung der Proteine durch Zugabe des vierfachen Volumens an Aceton (-20 °C) mit nachfolgender Zentrifugation (20 min, 21000 rpm, 4 °C) wurde der erhaltene Niederschlag unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und in 25  $\mu\text{L}$  SDS-Resuspensionspuffer gelöst. Die Proben wurden dann mit 25  $\mu\text{L}$  2x SDS-Ladepuffer versetzt, thermisch denaturiert (5 min, 99 °C) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von mit *Biotin*-markierten Banden erfolgte anschließend über Western Blot.





---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ABP	<i>Activity-based probe</i>
ABPP	<i>Activity-based protein-profiling</i>
AFBP	<i>Afinity-based protein-profiling</i>
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Äquiv.	stöchiometrisches Äquivalent
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bp	Benzophenon
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Bu	Butyl
CBB	<i>Coomassie brilliant blue</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CCCP	<i>Compound-centric chemical proteomics</i>
CD	Circulardichroismus
CETSA	<i>Cellular Thermal Shift Assay</i>
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
C <sub>q</sub>	quartäres Kohlenstoffatom
CT-L	<i>Chymotrypsin-like</i>
CuAAC	<i>Copper assisted azide-alkyne cycloaddition</i>
Da	Dalton
DARTS	<i>Drug Affinity Responsive Target Stability</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid

---

DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
Dh-Ala	Dehydroalanin
Dh-Ala-MSK	Dehydroalanin-Molekülseitenkette
DHAP	2',5'-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMABA	Dimethylaminobenzaldehyd
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
Et	Ethyl
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FOXM1	<i>Forkhead box M1-Protein</i>
GAC	GTPase-assoziiertes Zentrum
GC	<i>Gas chromatographys</i>
gef.	gefunden
Gew.	Gewicht
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-Ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSA	Hydroxylamin-O-sulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
<sup>t</sup> Bu	Isobutyl
IF	Initiationsfaktor
IgG	Immunglobulin G
<sup>i</sup> Pr	Isopropyl
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kann	Kanamycin
KPI	Kovalente Proteasominhibitor
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LBD	Ligand-Bindedomäne
LC	<i>Liquid chromatography</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
Me	Methyl
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MS	<i>Mannitol soya flour</i>
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular weight cutoff</i>
NCS	N-Chlorsuccinimid
NKPI	Nicht-kovalente Proteasominhibitor
Nle	Norleucin
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NP-40	Nonoxinol 40
NPET	<i>Nascent-Peptide Exit Tunnel</i>
NTD	N-terminale Domäne
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAL	<i>Photoaffinity labeling</i>

---

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	Phosphate buffered saline tween
PDB	<i>Protein data bank</i>
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PGPH	Peptidylglutamylpeptid-hydrolytische Aktivität
Ph	Phenyl
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PI	Proteasominhibitor
PICC	<i>Proximity induced covalent capture</i>
PIPES	Piperazin -N,N' -bis(2-ethansulfonsäure)
PP	Polypropylen
Pr	Propyl
PRSP	Penicillin-resistenter <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PTC	Peptidyltransferase-Zentrum
QA	Chinaldinsäure
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RF	<i>releasing factor</i>
RMSD	Quadratische räumliche Abweichung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SA	Sinapinsäure
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SPROX	<i>Stability of Proteins from Rates of Oxidation</i>
SRL	<i>Sarcine-Ricine-Loop</i>
Suc	Bernsteinsäure
TBAC	Tetrabutylammoniumchlorid
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid

TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBS	tert-Butyldimethylsilyl
TBTA	Tris(benzyltriazolymethyl)amine
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
Tf	Triflyl
TfD	3-Aryl-3-trifluormethyldiazirine
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	<i>tris</i> -[3-Hydroxypropyltriazolymethyl]amine
Thstrn	Thiostreptin
TipA	<i>Thiostrepton induced protein A</i>
TIPS	Triisopropylsilyl
T-L	<i>Trypsine-like</i>
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>Time of flight</i>
TPB	Tris-phosphatpuffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
Ts	Tosyl
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
Vol.	Volumen
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
wt	Wildtyp
Y3H	Hefe-drei-Hybrid System



---

## 8 Literaturverzeichnis



- 
- [1] A. Mullard, *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13*, 877-877.
- [2] H. Kubinyi, *BioFocus* **2001**, *59*, 1-15.
- [3] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
- [4] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [5] L. L. Silver, *Expert. Opin. Drug Discov.* **2008**, *3*, 487-500.
- [6] M. A. Fischbach, *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 520-527.
- [7] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [8] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670-3695.
- [9] D. J. Newman, L.-A. Giddings, *Phytochem. Rev.* **2014**, *13*, 123-137.
- [10] S. H. E. Kaufmann, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 373.
- [11] F. Sams-Dodd, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 139-147.
- [12] A. L. Hopkins, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682-690.
- [13] G. Giaever, *Nature* **2002**, *418*, 387-391.
- [14] A. M. Deutschbauer, *Genetics* **2005**, *169*, 1915-1925.
- [15] A. L. Hopkins, C. R. Groom, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727-730.
- [16] B. P. Zambrowicz, A. T. Sands, *Drug Discov. Today* **2004**, *3*, 198-207.
- [17] C. P. Austin, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 921-924.
- [18] B. P. Zambrowicz, A. T. Sands, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 38-51.
- [19] B. P. Zambrowicz, C. A. Turner, A. T. Sands, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, *3*, 563-570.
- [20] H. Kitano, *Mol. Syst. Biol.* **2007**, *3*, 137.
- [21] Y. Chen, *Nature* **2008**, *452*, 429-435.
- [22] S. L. Ooi, *Trends Genet.* **2006**, *22*, 56-63.
- [23] M. E. Hillenmeyer, *Science* **2008**, *320*, 362-365.
- [24] W. G. Kaelin, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 689-698.
- [25] A. W. Whitehurst, *Nature* **2007**, *446*, 815-819.
- [26] R. P. Lange, H. H. Locher, P. C. Wyss, R. L. Then, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3140-3154.
- [27] H. F. Ji, *Genome Biol.* **2007**, *8*, R176.
- [28] K. Park, D. Kim, *Proteins* **2008**, *71*, 960-971.

- [29] F. Lottspeich, *Angew.Chem.* **1999**, *111*, 2630–2647; *Angew.Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2476-2492.
- [30] P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-4021.
- [31] A. Görg, W. Weiss, M. J. Dunn, *Proteomics* **2004**, *4*, 3665-3685.
- [32] K. K. Kopec, D. Bozyczko-Coyne, M. Williams, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1133-1139.
- [33] C. Southan, *Proteomics* **2004**, *4*, 1712-1726.
- [34] S. I. Kim, H. Voshol, J. van Oostrum, T. G. Hastings, M. Cascio, M. J. Glucksman, *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 1317-1331.
- [35] R. B. Joanna Krysiak, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 43-84.
- [36] M. Schenone, V. Dancik, B. K. Wagner, P. A. Clemons, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 232-240.
- [37] M. J. Marton, J. L. DeRisi, H. A. Bennett, V. R. Iyer, M. R. Meyer, C. J. Roberts, R. Stoughton, J. Burchard, D. Slade, H. Dai, D. E. Bassett, L. H. Hartwell, P. O. Brown, S. H. Friend, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1293-1301.
- [38] D. W. Zaharevitz, R. Gussio, M. Leost, A. M. Senderowicz, T. Lahusen, C. Kunick, L. Meijer, E. A. Sausville, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566-2569.
- [39] Y. Feng, T. J. Mitchison, A. Bender, D. W. Young, J. A. Tallarico, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 567-578.
- [40] B. K. Wagner, P. A. Clemons, *Curr. Opin. Chem. Bio.* **2009**, *13*, 539-548.
- [41] V. J. Haupt, M. Schroeder, *Briefings in Bioinf.* **2011**, *12*, 312-326.
- [42] A. Koutsoukas, B. Simms, J. Kirchmair, P. J. Bond, A. V. Whitmore, S. Zimmer, M. P. Young, J. L. Jenkins, M. Glick, R. C. Glen, A. Bender, *J. Proteomics* **2011**, *74*, 2554-2574.
- [43] K. Stegmaier, K. N. Ross, S. A. Colavito, S. O'Malley, B. R. Stockwell, T. R. Golub, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 257-263.
- [44] H. Hieronymus, J. Lamb, K. N. Ross, X. P. Peng, C. Clement, A. Rodina, M. Nieto, J. Du, K. Stegmaier, S. M. Raj, K. N. Maloney, J. Clardy, W. C. Hahn, G. Chiosis, T. R. Golub, *Cancer Cell* **2006**, *10*, 321-330.
- [45] M. Boutros, J. Ahringer, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 554-566.
- [46] J. Moffat, D. A. Grueneberg, X. Yang, S. Y. Kim, A. M. Kloepfer, G. Hinkle, B. Piqani, T. M. Eisenhaure, B. Luo, J. K. Grenier, A. E. Carpenter, S. Y. Foo, S. A.

- Stewart, B. R. Stockwell, N. Hacohen, W. C. Hahn, E. S. Lander, D. M. Sabatini, D. E. Root, *Cell* **2006**, *124*, 1283-1298.
- [47] J. Wang, X. Zhou, P. L. Bradley, S.-F. Chang, N. Perrimon, S. T. C. Wong, *J. Biomol. Screening* **2008**, *13*, 29-39.
- [48] S. A. Wacker, B. R. Houghtaling, O. Elemento, T. M. Kapoor, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 235-237.
- [49] Z. A. Knight, K. M. Shokat, *Cell* **2007**, *128*, 425-430.
- [50] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616-624.
- [51] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, PC3006-PC3008.
- [52] G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles, *Nature* **1969**, *224*, 511-512.
- [53] Y. Sadakane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 209-218.
- [54] E. Smith, I. Collins, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 159-183.
- [55] F. S.A., *Tetrahedron* **1995**, 12479–12520.
- [56] K. Sakurai, S. Ozawa, R. Yamada, T. Yasui, S. Mizuno, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1399-1403.
- [57] A. M. Sadaghiani, S. H. L. Verhelst, M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 20-28.
- [58] S. P. Gygi, B. Rist, T. J. Griffin, J. Eng, R. Aebersold, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 47-54.
- [59] M. Smolka, H. Zhou, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 19-29.
- [60] X. Just-Baringo, F. Albericio, M. Álvarez, *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 317-351.
- [61] T. L. Su, *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473-481.
- [62] D. J. D. Vandeputte J., *Antibiot. Ann.* **1955**, *3*, 560–561.
- [63] W. M. J. Pagano J.F., Stout H.A., Donovan R., *Antibiot. Ann.* **1955**, *3*, 554–559.
- [64] J. W. P. Steinberg B.A., Suydam L.O., Soriano A., *Antibiot. Ann.* **1955**, *3*, 562–565.
- [65] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714.
- [66] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 2549-2553.
- [67] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141-147.
- [68] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327-4334.

- [69] R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946-5955.
- [70] K. Engelhardt, K. F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjærvik, G. Klinkenberg, H. Sletta, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4969-4976.
- [71] K. Engelhardt, K. F. Degnes, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7093-7101.
- [72] H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6900-6904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6770-6773.
- [73] C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153-164.
- [74] C. T. Walsh, M. G. Acker, A. A. Bowers, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27525-27531.
- [75] T. S. Young, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 13053-13058.
- [76] Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 855-864.
- [77] Y. Ding, Y. Yu, H. Pan, H. Guo, Y. Li, W. Liu, *Mol. BioSys.* **2010**, *6*, 1180-1185.
- [78] Y. Yu, H. Guo, Q. Zhang, L. Duan, Y. Ding, R. Liao, C. Lei, B. Shen, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16324-16326.
- [79] A. A. Bowers, C. T. Walsh, M. G. Acker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12182-12184.
- [80] Q. Zhang, Y. Li, D. Chen, Y. Yu, L. Duan, B. Shen, W. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 154-160.
- [81] M. Wei, J. Deng, S. Wang, N. Liu, Y. Chen, *Biotech. Lett.* **2011**, *33*, 585-591.
- [82] Q. Zhang, D. Chen, J. Lin, R. Liao, W. Tong, Z. Xu, W. Liu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21287-21294.
- [83] S. Pierre, A. Guillot, A. Benjdia, C. Sandström, P. Langella, O. Berteau, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 957-959.
- [84] L. Duan, S. Wang, R. Liao, W. Liu, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 443-448.
- [85] S. J. Malcolmson, T. S. Young, J. G. Ruby, P. Skewes-Cox, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 8483-8488.
- [86] D. R. Houck, L. C. Chen, P. J. Keller, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5800-5806.

- [87] U. Mocek, Z. Zeng, D. O'Hagan, P. Zhou, L. D. G. Fan, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7992-8001.
- [88] U. Mocek, A. R. Knaggs, R. Tsuchiya, T. Nguyen, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7557-7568.
- [89] N. D. Priestley, T. M. Smith, P. R. Shipley, H. G. Floss, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1135-1147.
- [90] L. W. Liao R., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 2852–2855.
- [91] B. Clough, M. Strath, P. Preiser, P. Denny, I. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 123-125.
- [92] B. Clough, K. Rangachari, M. Strath, P. R. Preiser, R. J. M. Iain Wilson, *Protist* **1999**, *150*, 189-195.
- [93] M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 17-23.
- [94] M. Schlitzer, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986.
- [95] C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181-191.
- [96] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H.-D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389–3393; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3317-3321.
- [97] N. Mizuhara, M. Kuroda, A. Ogita, T. Tanaka, Y. Usuki, K.-i. Fujita, *Bioor. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5300-5310.
- [98] U. Motoi, S. Furukawa, Abe F., M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, J. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, 590–596.
- [99] K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimipour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O'Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15042-15044.
- [100] S. K. Radhakrishnan, U. G. Bhat, D. E. Hughes, I.-C. Wang, R. H. Costa, A. L. Gartel, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9731-9735.
- [101] J. M.-M. Kwok, S. S. Myatt, C. M. Marson, R. C. Coombes, D. Constantinidou, E. W.-F. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2022-2032.
- [102] B. D. Bowling, N. Doudican, P. Manga, S. J. Orlow, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *63*, 37-43.
- [103] U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1851-1855.
- [104] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5592.

- [105] N. S. Hegde, D. A. Sanders, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 725-731.
- [106] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [107] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. T. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell*, *30*, 26-38.
- [108] J. D. Walter, M. Hunter, M. Cobb, G. Traeger, P. C. Spiegel, *Nucl. Acids Res.* **2012**, *40*, 360-370.
- [109] E. Selva, N. Montanini, S. Stella, A. Sofientini, L. Gastaldo, M. Denaro, *J. Antibiot.* **1997**, 22–26.
- [110] S. E. Heffron, F. Journak, *Biochem.* **2000**, *39*, 37-45.
- [111] A. Parmeggiani, P. Nissen, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4576-4581.
- [112] T. Murakami, T. G. Holt, C. J. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459-1466.
- [113] M. L. Chiu, M. Folcher, T. Katoh, A. M. Puglia, J. Vohradsky, B.-S. Yun, H. Seto, C. J. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20578-20586.
- [114] T. H. B. S. Yun, T. Kuzuyama, H. Seto, *J. Antibiot.* **2001**, 375–378.
- [115] H. T. Yun B.-S., Furihata K., Seto H., *J. Antibiot.* **1994**, 1541–1545.
- [116] B.-S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11659-11664.
- [117] H. T. Yun B.-S., Furihata K., Seto H., *J. Antibiot.* **1994**, 510–514.
- [118] G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778.
- [119] K. J., WO02066046, **2002**.
- [120] R. A. Bauer, J. M. Wurst, D. S. Tan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 308-314.
- [121] A. N. Koehler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 331-340.
- [122] A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2011**, *10*, 4341-4342.
- [123] S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 81-89.
- [124] H. Li, A. J. O'Donoghue, W. A. van der Linden, S. C. Xie, E. Yoo, I. T. Foe, L. Tilley, C. S. Craik, P. C. A. da Fonseca, M. Bogyo, *Nature* **2016**, *530*, 233-236.
- [125] M. Aoki, T. Ohtsuka, M. Yamada, Y. Ohba, H. Yoshizaki, H. Yasuno, T. Sano, J. Watanabe, K. Yokose, N. Roche, *J. Antibiot.* **1991**, 582–588.
- [126] Y. S. Sleight P., *J. Hypertens.* **2003**, 1599–1608.
- [127] P. S.S., *J. Invest. Med.* **2013**, 551–557.

- [128] M. Yamazaki, Y. Katayama, *Angiotensin Res.* **2013**, 116–120.
- [129] K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, S. H. Lee, M. Nevalainen, M. Bella, A. A. Estrada, C. Funke, F. J. Zécari, S. Bulat, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11159-11175.
- [130] S. Schoof, Technische Universität Dortmund, Dortmund, **2010**.
- [131] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245.
- [132] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.
- [133] M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *Nature* **1989**, *341*, 758-760.
- [134] M. Knockaert, N. Gray, E. Damiens, Y. T. Chang, P. Grellier, K. Grant, D. Fergusson, J. Mottram, M. Soete, J. F. Dubremetz, K. Le Roch, C. Doerig, P. G. Schultz, L. Meijer, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 411-422.
- [135] J. Lee, M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 118-126.
- [136] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *61*, 636-643.
- [137] D. Brehmer, K. Godl, B. Zech, J. Wissing, H. Daub, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 490-500.
- [138] J. Wissing, K. Godl, D. Brehmer, S. Blencke, M. Weber, P. Habenberger, M. Steingerlach, A. Missio, M. Cotten, S. Müller, H. Daub, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1181-1193.
- [139] M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1-8.
- [140] D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683-5690.
- [141] S. i. Sato, A. Murata, T. Shirakawa, M. Uesugi, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 616-623.
- [142] S.-E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 252-262.
- [143] Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 6591-6596.
- [144] T. D. Veenstra, S. Martinović, G. A. Anderson, L. Paša-Tolić, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 78-82.
- [145] T. T. Aye, S. Mohammed, H. W. P. van den Toorn, T. A. B. van Veen, M. A. G. van der Heyden, A. Scholten, A. J. R. Heck, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 1016-1028.
- [146] D. Brehmer, Z. Greff, K. Godl, S. Blencke, A. Kurtenbach, M. Weber, S. Müller, B. Klebl, M. Cotten, G. Kéri, J. Wissing, H. Daub, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 379-382.

- [147] C. F. Barbas, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7978-7982.
- [148] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391-410.
- [149] B. Van Dorst, J. Mehta, E. Rouah-Martin, V. Somers, W. De Coen, R. Blust, J. Robbens, *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1435-1440.
- [150] Y. Takakusagi, K. Takakusagi, F. Sugawara, K. Sakaguchi, *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 361-389.
- [151] W. van Wyngaardt, T. Malatji, C. Mashau, J. Fehrsen, F. Jordaan, D. Miltiadou, D. H. du Plessis, *BMC Biotech.* **2004**, *4*, 6-6.
- [152] F. Becker, K. Murthi, C. Smith, J. Come, N. Costa-Roldán, C. Kaufmann, U. Hanke, C. Degenhart, S. Baumann, W. Wallner, A. Huber, S. Dedier, S. Dill, D. Kinsman, M. Hediger, N. Bockovich, S. Meier-Ewert, A. F. Kluge, N. Kley, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 211-223.
- [153] S. Fields, O.-K. Song, *Nature* **1989**, *340*, 245-246.
- [154] N. Kley, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 599-608.
- [155] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 12817-12821.
- [156] M. Caligiuri, L. Molz, Q. Liu, F. Kaplan, J. P. Xu, J. Z. Majeti, R. Ramos-Kelsey, K. Murthi, S. Lievens, J. Tavernier, N. Kley, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 711-722.
- [157] A. Fontana, P. P. De Laureto, B. Spolaore, E. Frare, P. Picotti, M. Zambonin, *Acta Biochim. Pol.* **2004**, *51*, 299-321.
- [158] B. Lomenick, R. Hao, N. Jonai, R. M. Chin, M. Aghajan, S. Warburton, J. Wang, R. P. Wu, F. Gomez, J. A. Loo, J. A. Wohlschlegel, T. M. Vondriska, J. Pelletier, H. R. Herschman, J. Clardy, C. F. Clarke, J. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 21984-21989.
- [159] Y. Chang, J. P. Schleich, R. A. VerHeul, C. Park, *Protein Sci.* **2012**, *21*, 1280-1287.
- [160] G. M. West, L. Tang, M. C. Fitzgerald, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4175-4185.
- [161] G. M. West, C. L. Tucker, T. Xu, S. K. Park, X. Han, J. R. Yates, M. C. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 9078-9082.
- [162] P. D. DeArmond, Y. Xu, E. C. Strickland, K. G. Daniels, M. C. Fitzgerald, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4948-4958.
- [163] D. M. Molina, R. Jafari, M. Ignatushchenko, T. Seki, E. A. Larsson, C. Dan, L. Sreekumar, Y. Cao, P. Nordlund, *Science* **2013**, *341*, 84.



- [164] G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas, R. I. Gilmanshin, *Biopolymers* **1991**, *31*, 119-128.
- [165] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, F. R. Salemme, *J. Biomol. Screening* **2001**, *6*, 429-440.
- [166] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1363-1368.
- [167] E. Zeiler, A. List, F. Alte, M. Gersch, R. Wachtel, M. Poreba, M. Drag, M. Groll, S. A. Sieber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 11302-11307.
- [168] C. M. Pichler, J. Krysiak, R. Breinbauer, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3291-3303.
- [169] M. J. Niphakis, B. F. Cravatt, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 341-377.
- [170] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotech.* **2003**, *21*, 687-691.
- [171] W. Li, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9594-9595.
- [172] D. K. Nomura, J. Z. Long, S. Niessen, H. S. Hoover, S.-W. Ng, B. F. Cravatt, *Cell* **2010**, *140*, 49-61.
- [173] N. Jessani, M. Humphrey, W. H. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. R. Yates, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13756-13761.
- [174] W. P. Heal, E. W. Tate, in *Activity-Based Protein Profiling* (Hrsg.: A.S. Sieber), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, 115-135.
- [175] R. A. Bauer, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061-1073.
- [176] J. M. Krysiak, J. Kreuzer, P. Macheroux, A. Hermetter, S. A. Sieber, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7142-7147; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7035-7040.
- [177] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279-3301.
- [178] N. Sin, K. B. Kim, M. Elofsson, L. Meng, H. Auth, B. H. B. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283-2288.
- [179] M.-c. Yee, S. C. Fas, M. M. Stohlmeyer, T. J. Wandless, K. A. Cimprich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29053-29059.
- [180] B. H. B. Kwok, B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Elofsson, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 759-766.
- [181] P.-Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656-666.

- [182] I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13400-13409.
- [183] J. E. Wulff, S. B. Herzon, R. Siegrist, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4898-4899.
- [184] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6964-6972.
- [185] R. Orth, T. Bottcher, S. A. Sieber, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 8475-8477.
- [186] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 87-95.
- [187] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154-1169.
- [188] G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 81-95.
- [189] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [190] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [191] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8968-8989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.
- [192] S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Curr. Prot. Chem. Biol.* **2011**, *3*, 153-162.
- [193] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [194] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
- [195] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353-10366.
- [196] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [197] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2014**, *5*.
- [198] E. L. Vodovozova, *Biochem. (Moscow)* **2007**, *72*, 1-20.
- [199] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 828-835.
- [200] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradzsky, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 60-68.
- [201] D. J. Lapinsky, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6237-6247.
- [202] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64-77.
- [203] O. Jahn, K. Eckart, H. Tezval, J. Spiess, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1031-1036.

- [204] O. Jahn, B. Hofmann, O. Brauns, J. Spiess, K. Eckart, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *214*, 37-51.
- [205] J. Pérodin, M. Deraët, M. Auger-Messier, A. A. Boucard, L. Rihakova, M.-È. Beaulieu, P. Lavigne, J.-L. Parent, G. Guillemette, R. Leduc, E. Escher, *Biochem.* **2002**, *41*, 14348-14356.
- [206] Z. Ji, E. M. Hadac, R. M. Henne, S. A. Patel, T. P. Lybrand, L. J. Miller, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24393-24401.
- [207] O. Jahn, H. Tezval, J. Spiess, K. Eckart, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *228*, 527-540.
- [208] S.-Y. Han, S. H. Choi, M. H. Kim, W. G. Lee, S. H. Kim, Y. K. Min, B. T. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2915-2919.
- [209] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554-570.
- [210] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.
- [211] R. A. G. Smith, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072-5073.
- [212] R. E. GALARDY, L. C. CRAIG, M. P. PRINTZ, *Nature (London), New Biol.* **1973**, 127-128.
- [213] V. Chowdhry, R. Vaughan, F. H. Westheimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73*, 1406-1408.
- [214] W. Stoffel, C. Schreiber, H. Scheefers, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1978**, *359*, 923-931.
- [215] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- [216] M. P. Goeldner, C. G. Hirth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 6439-6442.
- [217] P. E. Nielsen, J. B. Hansen, T. Thomsen, O. Buchardt, *Experientia* **1983**, *39*, 1063-1072.
- [218] D. M. Kolpashchikov, A. L. Zakharenko, S. V. Dezhurov, N. I. Rechkunova, S. N. Khodyreva, S. Degtiarev, V. V. Litvak, O. I. Lavrik, *Bioorg. Khim.* **1999**, *25*, 129-136.
- [219] M. J. T. Young, M. S. Platz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2199-2202.
- [220] N. J. Turro, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1980**, *346*, 1-17.
- [221] N. P. Gritsan, T. Yuzawa, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5059-5060.
- [222] W. T. Borden, N. P. Gritsan, C. M. Hadad, W. L. Karney, C. R. Kemnitz, M. S. Platz, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 765-771.
- [223] P. P. Geurink, L. M. Prely, G. A. van der Marel, R. Bischoff, H. S. Overkleeft, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 85-113.

- [224] W. Lwowski, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1980**, *346*, 491-500.
- [225] J. V. Staros, H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568-572.
- [226] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochem.* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [227] G. C. Terstappen, C. Schlupen, R. Raggiaschi, G. Gaviraghi, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6*, 891-903.
- [228] A. Bisello, A. E. Adams, D. F. Mierke, M. Pellegrini, M. Rosenblatt, L. J. Suva, M. Chorev, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22498-22505.
- [229] D. Macdonald, D. F. Mierke, H. Li, M. Pellegrini, B. Sachais, J. E. Krause, S. E. Leeman, N. D. Boyd, *Biochem.* **2001**, *40*, 2530-2539.
- [230] V. Behar, A. Bisello, G. Bitan, M. Rosenblatt, M. Chorev, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9-17.
- [231] R. Kage, S. E. Leeman, J. E. Krause, C. E. Costello, N. D. Boyd, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25797-25800.
- [232] N. Hino, Y. Okazaki, T. Kobayashi, A. Hayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 201-206.
- [233] I. S. Farrell, R. Toroney, J. L. Hazen, R. A. Mehl, J. W. Chin, *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 377-384.
- [234] P. H. Mueller, N. G. Rondan, K. N. Houk, J. F. Harrison, D. Hooper, B. H. Willen, J. F. Liebman, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5049-5052.
- [235] J. M. Perez, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1982**, *78*, 3509-3518.
- [236] H. D. Roth, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4935-4936.
- [237] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.
- [238] B. Noller, L. Poisson, R. Maksimenka, O. Gobert, I. Fischer, J. M. Mestdagh, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3041-3050.
- [239] B. Noller, P. Hemberger, I. Fischer, C. Alcaraz, G. A. Garcia, H. Soldi-Lose, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 5384-5391.
- [240] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2513-2523.
- [241] H. Fuwa, K. Hiromoto, Y. Takahashi, S. Yokoshima, T. Kan, T. Fukuyama, T. Iwatsubo, T. Tomita, H. Natsugari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4184-4189.

- [242] H. Fuwa, Y. Takahashi, Y. Konno, N. Watanabe, H. Miyashita, M. Sasaki, H. Natsugari, T. Kan, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 408-418.
- [243] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261-268.
- [244] V. Y. P. Nina N. Makhova, and Vladimir V. Kuznetsov, *ARKIVOC* **2008**, 128-152.
- [245] J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 870-881.
- [246] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
- [247] Alberts B., *e. al.*, *The Molecular Biology of the Cell, Vol. fourth edition* (Hrsg.: G. Science), **2002**, 342.
- [248] A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, M. Yusupov, *Science* **2011**, *334*, 1524-1529.
- [249] J. Rabl, M. Leibundgut, S. F. Ataide, A. Haag, N. Ban, *Science* **2011**, *331*, 730-736.
- [250] S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, N. Ban, *Science* **2011**, *334*, 941-948.
- [251] H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, *256*, 1416-1419.
- [252] R. Green, C. Switzer, H. F. Noller, *Science* **1998**, *280*, 286-289.
- [253] B. Zhang, T. R. Cech, *Nature* **1997**, *390*, 96-100.
- [254] C. M. Spahn, C. D. Prescott, *J. Mol. Med.* **1996**, *74*, 423-439.
- [255] A. S. Mankin, *Mol. Biol.* **2001**, *35*, 509-520.
- [256] J. A. Lake, *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 131-139.
- [257] G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt, G. Stoffler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 4820-4824.
- [258] J. Frank, J. Sengupta, H. Gao, W. Li, M. Valle, A. Zavialov, M. Ehrenberg, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 959-962.
- [259] M. Valle, R. Gillet, S. Kaur, A. Henne, V. Ramakrishnan, J. Frank, *Science* **2003**, *300*, 127-130.
- [260] M. Valle, A. Zavialov, W. Li, S. M. Stagg, J. Sengupta, R. C. Nielsen, P. Nissen, S. C. Harvey, M. Ehrenberg, J. Frank, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 899-906.
- [261] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920-930.
- [262] P. B. Moore, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Bioch.* **2003**, *72*, 813-850.
- [263] A. Yonath, J. Mussig, H. G. Wittmann, *J. Cell. Biochem.* **1982**, *19*, 145-155.

- [264] S. Trakhanov, M. Yusupov, V. Shirokov, M. Garber, A. Mitschler, M. Ruff, J. C. Thierry, D. Moras, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 327-328.
- [265] K. von Bohlen, I. Makowski, H. A. Hansen, H. Bartels, Z. Berkovitch-Yellin, A. Zaytzev-Bashan, S. Meyer, C. Paulke, F. Franceschi, A. Yonath, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 11-15.
- [266] M. M. Yusupov, M. B. Garber, V. D. Vasiliev, A. S. Spirin, *Biochimie* **1991**, *73*, 887-897.
- [267] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, *292*, 883-896.
- [268] J. D. Robertus, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. Clark, A. Klug, *Nature* **1974**, *250*, 546-551.
- [269] N. Malys, J. E. G. McCarthy, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 991-1003.
- [270] F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Science* **2001**, *294*, 165-168.
- [271] S. Shoji, S. E. Walker, K. Fredrick, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 93-107.
- [272] A. Korostelev, J. Zhu, H. Asahara, H. F. Noller, *EMBO J.* **2010**, *29*, 2577-2585.
- [273] D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, *274*, 1367-1371.
- [274] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6437-6448.
- [275] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 340-348.
- [276] Q. Vicens, E. Westhof, *Structure (London, England : 1993)* **2001**, *9*, 647-658.
- [277] T. Hermann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 355-366.
- [278] J. L. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1061-1075.
- [279] N. Polacek, A. S. Mankin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *40*, 285-311.
- [280] M. Beringer, M. V. Rodnina, *Mol. Cell* **2007**, *26*, 311-321.
- [281] F. Schlunzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **2001**, *413*, 814-821.
- [282] M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenkov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9586-9590.
- [283] L. Brandi, S. Marzi, A. Fabbretti, C. Fleischer, W. E. Hill, C. O. Gualerzi, J. Stephen Lodmell, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 881-894.
- [284] W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943.

- [285] P. M. McNicholas, D. J. Najarian, P. A. Mann, D. Hesk, R. S. Hare, K. J. Shaw, T. A. Black, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1121-1126.
- [286] L. Belova, T. Tenson, L. Xiong, P. M. McNicholas, A. S. Mankin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3726-3731.
- [287] C. B. Kofoed, B. Vester, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3339-3342.
- [288] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *Science* **1999**, *285*, 1722-1725.
- [289] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, *292*, 897-902.
- [290] J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 259-266.
- [291] O. Piepenburg, T. Pape, J. A. Pleiss, W. Wintermeyer, O. C. Uhlenbeck, M. V. Rodnina, *Biochem.* **2000**, *39*, 1734-1738.
- [292] L. Cochella, R. Green, *Science* **2005**, *308*, 1178-1180.
- [293] Q. Vicens, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188.
- [294] D. Moazed, H. F. Noller, *Nature* **1987**, *327*, 389-394.
- [295] B. Vester, R. A. Garrett, *EMBO J.* **1988**, *7*, 3577-3587.
- [296] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905-920.
- [297] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920-930.
- [298] T. M. Schmeing, A. C. Seila, J. L. Hansen, B. Freeborn, J. K. Soukup, S. A. Scaringe, S. A. Strobel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 225-230.
- [299] J. L. Hansen, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11670-11675.
- [300] C. Coutsogeorgopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *129*, 214-217.
- [301] S. Kirillov, B. T. Porse, B. Vester, P. Woolley, R. A. Garrett, *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 223-233.
- [302] W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger, J. R. Warner, **1990**, 502-510.
- [303] T. A. Mukhtar, G. D. Wright, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 529-542.
- [304] D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **2005**, *121*, 257-270.
- [305] J. M. Harms, F. Schlunzen, P. Fucini, H. Bartels, A. Yonath, *BMC Biol.* **2004**, *2*, 4.
- [306] T. Tenson, M. Ehrenberg, *Cell* **2002**, *108*, 591-594.
- [307] H. Nakatogawa, A. Murakami, K. Ito, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 145-150.
- [308] F. Gong, C. Yanofsky, *Science* **2002**, *297*, 1864-1867.

- [309] M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 949-961.
- [310] B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 577-585.
- [311] D. M. Livermore, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51 Suppl 2*, ii9-16.
- [312] K. S. Long, B. Vester, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 603-612.
- [313] M. Grunberg-Manago, J. Dondon, M. Graffe, *FEBS Lett.* **1972**, *22*, 217-221.
- [314] R. Van Charldorp, H. A. Heus, P. H. Van Knippenberg, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 267-275.
- [315] N. Naaktgeboren, K. Roobol, J. Gubbens, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *70*, 39-47.
- [316] D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27-35.
- [317] K. H. Nierhaus, in *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**, 323-366.
- [318] N. M. Haste, W. Thienphrapa, D. N. Tran, S. Loesgen, P. Sun, S.-J. Nam, P. R. Jensen, W. Fenical, G. Sakoulas, V. Nizet, M. E. Hensler, *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 593-598.
- [319] P. Bhuta, S. Chládek, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *698*, 167-172.
- [320] R. L. Gonzalez, S. Chu, J. D. Puglisi, *RNA* **2007**, *13*, 2091-2097.
- [321] J. Gordon, *Biochem.* **1970**, *9*, 912-917.
- [322] S. C. Blanchard, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 275-276.
- [323] G. Liu, G. Song, D. Zhang, D. Zhang, Z. Li, Z. Lyu, J. Dong, J. Achenbach, W. Gong, X. S. Zhao, K. H. Nierhaus, Y. Qin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 817-824.
- [324] D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *40*, 243-267.
- [325] J. H. Highland, G. A. Howard, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 831-834.
- [326] B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391-404.
- [327] J. Thompson, E. Cundliffe, M. Stark, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *98*, 261-265.
- [328] A. Wolf, S. Baumann, H. D. Arndt, K. N. Kirschner, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 7194-7205.
- [329] A. Wolf, S. Schoof, S. Baumann, H. D. Arndt, K. N. Kirschner, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2014**, *28*, 1205-1215.



- [330] H. R. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. N. Kirschner, H. Schwalbe, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3366–3370; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3308-3312.
- [331] A. A. Neyfakh, *Mol. Microbiol.* **2002**, *44*, 1123-1130.
- [332] H. Nikaido, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119-146.
- [333] A. Seelig, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 252-261.
- [334] C. F. Higgins, *Nature* **2007**, *446*, 749-757.
- [335] D. A. Gutmann, A. Ward, I. L. Urbatsch, G. Chang, H. W. van Veen, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 36-42.
- [336] S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 671-701, table of contents.
- [337] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, M. M. Gottesman, *Oncogene* **2003**, *22*, 7468-7485.
- [338] R. J. Dawson, K. P. Locher, *Nature* **2006**, *443*, 180-185.
- [339] S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, G. Chang, *Science* **2009**, *323*, 1718-1722.
- [340] K. M. Pos, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 782-793.
- [341] H. Wade, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 489-496.
- [342] M. S. Jin, M. L. Oldham, Q. Zhang, J. Chen, *Nature* **2012**, *490*, 566-569.
- [343] J. Davies, *Science* **1994**, *264*, 375-382.
- [344] J. D. Hayes, C. R. Wolf, *Biochem. J.* **1990**, *272*, 281-295.
- [345] R. A. Nicholas, F. Ishino, W. Park, M. Matsushashi, J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 6394-6397.
- [346] S. L. Kelley, A. Basu, B. A. Teicher, M. P. Hacker, D. H. Hamer, J. S. Lazo, *Science* **1988**, *241*, 1813-1815.
- [347] I. T. Paulsen, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 446-451.
- [348] E. E. Zheleznova, P. N. Markham, A. A. Neyfakh, R. G. Brennan, *Cell* **1999**, *96*, 353-362.
- [349] E. E. Zheleznova, P. Markham, R. Edgar, E. Bibi, A. A. Neyfakh, R. G. Brennan, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 39-43.
- [350] M. A. Schumacher, M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, R. G. Brennan, *Science* **2001**, *294*, 2158-2163.

- [351] M. A. Schumacher, R. G. Brennan, *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 885-893.
- [352] J. D. Kahmann, H. J. Sass, M. G. Allan, H. Seto, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1824-1834.
- [353] T. Murakami, T. G. Holt, C. J. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459-1466.
- [354] M. L. Chiu, P. H. Viollier, T. Katoh, J. J. Ramsden, C. J. Thompson, *Biochem.* **2001**, *40*, 12950-12958.
- [355] K. J. Newberry, R. G. Brennan, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20356-20362.
- [356] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, J. L. Hobman, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 145-163.
- [357] D. J. Holmes, J. L. Caso, C. J. Thompson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3183-3191.
- [358] A. O. Summers, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3097-3101.
- [359] J. Habazettl, M. Allan, P. R. Jensen, H.-J. Sass, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E5498-E5507.
- [360] S. H. Lecker, A. L. Goldberg, W. E. Mitch, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 1807-1819.
- [361] K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, A. L. Goldberg, *Cell* **1994**, *78*, 761-771.
- [362] D. E. GOLL, V. F. THOMPSON, H. LI, W. WEI, J. CONG, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 731-801.
- [363] T. J. Jensen, M. A. Loo, S. Pind, D. B. Williams, A. L. Goldberg, J. R. Riordan, *Cell* **1995**, *83*, 129-135.
- [364] C. L. Ward, S. Omura, R. R. Kopito, *Cell* **1995**, *83*, 121-127.
- [365] B. Meusser, C. Hirsch, E. Jarosch, T. Sommer, *Nature cell biology* **2005**, *7*, 766-772.
- [366] M. Muratani, W. P. Tansey, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, *4*, 192-201.
- [367] J. R. Lipford, G. T. Smith, Y. Chi, R. J. Deshaies, *Nature* **2005**, *438*, 113-116.
- [368] M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373-428.
- [369] C. M. Pickart, *Cell* **2004**, *116*, 181-190.
- [370] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 761-807.
- [371] H. Barriere, C. Nemes, K. Du, G. L. Lukacs, *Mol. Biol. Cell.* **2007**, *18*, 3952-3965.
- [372] S. Polo, S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M. R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, P. P. Di Fiore, *Nature* **2002**, *416*, 451-455.
- [373] K. Flick, I. Ouni, J. A. Wohlschlegel, C. Capati, W. H. McDonald, J. R. Yates, P. Kaiser, *Nature cell biology* **2004**, *6*, 634-641.

- [374] A. L. Haas, I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10329-10337.
- [375] P. M. Handley, M. Mueckler, N. R. Siegel, A. Ciechanover, A. L. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 258-262.
- [376] S. Jentsch, *Ann. Rev. Gen.* **1992**, *26*, 179-207.
- [377] W. Li, M. H. Bengtson, A. Ulbrich, A. Matsuda, V. A. Reddy, A. Orth, S. K. Chanda, S. Batalov, C. A. P. Joazeiro, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1487.
- [378] P. K. Jackson, A. G. Eldridge, E. Freed, L. Fürstenthal, J. Y. Hsu, B. K. Kaiser, J. D. R. Reimann, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 429-439.
- [379] R. J. Ingham, G. Gish, T. Pawson, *Oncogene* **2004**, *23*, 1972-1984.
- [380] X. Huang, B. Luan, J. Wu, Y. Shi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 778-785.
- [381] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Ann. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 1015-1068.
- [382] N. Benaroudj, P. Zwickl, E. Seemüller, W. Baumeister, A. L. Goldberg, *Mol. Cell.* **2003**, *11*, 69-78.
- [383] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739-758.
- [384] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463-471.
- [385] M. Groll, M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, D. Finley, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1062-1067.
- [386] W. Baumeister, J. Walz, F. Zühl, E. Seemüller, *Cell* **1998**, *92*, 367-380.
- [387] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687-717.
- [388] A. J. Marques, R. Palanimurugan, A. C. Matias, P. C. Ramos, R. J. Dohmen, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1509-1536.
- [389] J. A. Brannigan, G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick, A. G. Murzin, *Nature* **1995**, *378*, 416-419.
- [390] O. D. Ekici, M. Paetzel, R. E. Dalbey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *17*, 2023-2037.
- [391] A. F. Kisselev, W. A. van der Linden, H. S. Overkleeft, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 99-115.
- [392] I. Saez, D. Vilchez, *Curr. Gen.* **2014**, *15*, 38-51.
- [393] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333-338.

- [394] S. Tsubuki, H. Kawasaki, Y. Saito, N. Miyashita, M. Inomata, S. Kawashima, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1993**, *196*, 1195-1201.
- [395] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure (London, England : 1993)* **2006**, *14*, 451-456.
- [396] L. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10403-10408.
- [397] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237-1238.
- [398] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 563–566; *Angew. Chem. Inter. Ed.* **2011**, *50*, 542-544.
- [399] A. Craiu, M. Gaczynska, T. Akopian, C. F. Gramm, G. Fenteany, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13437-13445.
- [400] G. Fenteany, R. Standaert, W. Lane, S. Choi, E. Corey, S. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726-731.
- [401] F. Soucy, L. Grenier, M. L. Behnke, A. T. Destree, T. A. McCormack, J. Adams, L. Plamondon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9967-9976.
- [402] M. Groll, T. Nazif, R. Huber, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 655-662.
- [403] M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, *452*, 755-758.
- [404] S. Tsubuki, Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito, S. Kawashima, *J. Biochem.* **1996**, *119*, 572-576.
- [405] K. Lindsten, V. Menendez-Benito, M. G. Masucci, N. P. Dantuma, *Nat. Biotech.* **2003**, *21*, 897-902.
- [406] P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, D. Irwin, E. A. Stadtmauer, T. Facon, J.-L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. F. San-Miguel, J. Bladé, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W. S. Dalton, A. L. Boral, D. L. Esseltine, J. B. Porter, D. Schenkein, K. C. Anderson, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2487-2498.
- [407] E. Kupperman, E. C. Lee, Y. Cao, B. Bannerman, M. Fitzgerald, A. Berger, J. Yu, Y. Yang, P. Hales, F. Bruzzese, J. Liu, J. Blank, K. Garcia, C. Tsu, L. Dick, P. Fleming, L. Yu, M. Manfredi, M. Rolfe, J. Bolen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1970-1980.

- [408] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molineaux, M. K. Bennett, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383-6391.
- [409] J. F. Lynas, P. Harriott, A. Healy, M. A. McKervey, B. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 373-378.
- [410] D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ovaa, C. Berkers, B. Nicholson, T. H. Chao, S. T. C. Neuteboom, P. Richardson, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Cancer Cell* **2005**, *8*, 407-419.
- [411] M. Groll, R. Huber, B. C. M. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136-5141.
- [412] M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6629-6634.
- [413] M. Groll, Y. Koguchi, R. Huber, J. Kohno, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 543-548.
- [414] A. Kronic, A. Vallat, S. Mo, D. D. Lantvit, S. M. Swanson, J. Orjala, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1927-1932.
- [415] P. André, M. Groettrup, P. Klenerman, R. de Giuli, B. L. Booth, V. Cerundolo, M. Bonneville, F. Jotereau, R. M. Zinkernagel, V. Lotteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13120-13124.
- [416] R. T. Lum, M. G. Nelson, A. Joly, A. G. Horsma, G. Lee, S. M. Meyer, M. M. Wick, S. R. Schow, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 209-214.
- [417] A. Kazi, H. Lawrence, W. C. Guida, M. L. McLaughlin, G. M. Springett, N. Berndt, R. M. Yip, S. M. Sebt, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1940-1951.
- [418] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 251-254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247-249.
- [419] M. Gaczynska, P. A. Osmulski, Y. Gao, M. J. Post, M. Simons, *Biochem.* **2003**, *42*, 8663-8670.
- [420] S. Nam, D. M. Smith, Q. P. Dou, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13322-13330.
- [421] X. Li, T. E. Wood, R. Sprangers, G. Jansen, N. E. Franke, X. Mao, X. Wang, Y. Zhang, S. E. Verbrugge, H. Adomat, Z. H. Li, S. Trudel, C. Chen, T. L. Religa, N. Jamal, H. Messner, J. Cloos, D. R. Rose, A. Navon, E. Guns, R. A. Batey, L. E. Kay, A. D. Schimmer, *J. Nat. Cancer Instit.* **2010**, *102*, 1069-1082.

- [422] R. E. Tiedemann, J. Schmidt, J. J. Keats, C.-X. Shi, Y. X. Zhu, S. E. Palmer, X. Mao, A. D. Schimmer, A. K. Stewart, *Blood* **2009**, *113*, 4027-4037.
- [423] J. L. a. Q. P. D. Huanjie Yang, *Curr. Drug Discovery Technol.* **2010**, *7*, 46 - 53.
- [424] B. Pandit, U. G. Bhat, A. L. Gartel, *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 43-47.
- [425] C. Sandu, N. Chandramouli, J. F. Glickman, H. Molina, C. L. Kuo, N. Kukushkin, A. L. Goldberg, H. Steller, *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 2181-2192.
- [426] B. Pandit, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2011**, *10*, 3827-3829.
- [427] M. Halasi, B. Pandit, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2014**, *13*, 3202-3206.
- [428] L. J. Crawford, B. Walker, A. E. Irvine, *J. Cell Comm. Sign.* **2011**, *5*, 101-110.
- [429] E. Gavilan, S. Giraldez, I. Sanchez-Aguayo, F. Romero, D. Ruano, P. Daza, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10027.
- [430] X. Tan, A. Peng, Y. Wang, Z. Tang, *Sci. China, Ser. C: Life Sci.* **2005**, *48*, 287-294.
- [431] Y. S. Hong, S. W. Hong, S. M. Kim, D. H. Jin, J. S. Shin, D. H. Yoon, K. P. Kim, J. L. Lee, D. S. Heo, J. S. Lee, T. W. Kim, *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 76-82.
- [432] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6593.
- [433] K. P. Wojtas, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2017**.
- [434] X. J. Baringo, Universitat de Barcelona, **2013**.
- [435] M. Nassal, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *1983*, 1510-1523.
- [436] T. Bender, M. Huss, H. Wieczorek, S. Grond, P. von Zezschwitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 3870-3878.
- [437] N. B. Bongo, T. Tomohiro, Y. Hatanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 80-82.
- [438] J. Maas, F. Baunack, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [439] X. Xiao, Z. Xu, Q.-D. Zeng, X.-B. Chen, W.-H. Ji, Y. Han, P. Wu, J. Ren, B.-B. Zeng, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 8351-8354.
- [440] I. Sellitto, B. L. Bourdonnec, K. Worm, A. Goodman, M. A. Savolainen, G.-H. Chu, C. W. Ajello, C. T. Saeui, L. K. Leister, J. A. Cassel, R. N. DeHaven, C. J. LaBuda, M. Koblish, P. J. Little, B. L. Brogdon, S. A. Smith, R. E. Dolle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 387-391.
- [441] J. Liu, H. Zhang, H. Yi, C. Liu, A. Lei, *Sci. China: Chem.* **2015**, *58*, 1323-1328.
- [442] Z. Wang, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.

- [443] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322-2330.
- [444] B. M. Trost, A. C. Lavoie, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5075-5090.
- [445] E. Emori, T. Arai, H. Sasai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4043-4044.
- [446] B. G. Cox, *Acids and Bases: Solvent Effects on Acid-base Strength*, Aufl., Oxford University Press, **2013**.
- [447] E. C. Johnson, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640-6646.
- [448] K. Sonogashira, *J. Organometal. Chem.* **2002**, *653*, 46-49.
- [449] N. S. Kumar, R. N. Young, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5388-5395.
- [450] T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, H. Aoyama, T. Ohmae, M. Endo, M. Suzuki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1289-1294.
- [451] H. Veisi, R. Ghorbani-Vaghei, S. Hemmati, J. Mahmoodi, *Synlett* **2011**, *2011*, 2315-2320.
- [452] S. Schwenk, C. Ronco, A. Oberheide, H.-D. Arndt, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 4795-4799.
- [453] G. K. S. Prakash, T. Mathew, C. Panja, G. A. Olah, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5847-5850.
- [454] K. Bahrami, M. M. Khodaei, M. Soheilizad, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9287-9291.
- [455] K. Qiu, R. Wang, *Synthesis* **2015**, *47*, 3186-3190.
- [456] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 810-820; *Angew. Chem. Inter. Ed.* **1975**, *14*, 801-811.
- [457] B. Kim, H. Park, L. A. Salvador, P. E. Serrano, J. C. Kwan, S. L. Zeller, Q.-Y. Chen, S. Ryu, Y. Liu, S. Byeon, H. Luesch, J. Hong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3728-3731.
- [458] N. Sawada, T. Itoh, N. Yasuda, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6595-6597.
- [459] B. T. Holmes, A. W. Snow, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12339-12342.
- [460] P. Loos, C. Ronco, M. Riedrich, H.-D. Arndt, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3290-3315.
- [461] B. Carre, J. Devynck, *Anal. Chim. Acta* **1981**, *131*, 141-147.
- [462] G. L. Furtado, A. A. Medeiros, *J. Clin. Microbiol.* **1980**, *12*, 550-553.
- [463] J. D. LEVIN, H. STANDER, J. F. PAGANO, *Antibiot. Chem.* **1960**, 422-429.
- [464] S. Baumann, Thesis, Technische Universität Dortmund, **2010**.

- [465] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2126–2135 *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [466] C. V. Kumar Chary, S. Rambhav, G. Venkateswerlu, *Biol. Metals* **1990**, *3*, 48-53.
- [467] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [468] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [469] A. A. Hunaiti, S. T. Abu-Orabi, M. A. Sahran, W. M. Owais, *Biochem. Med. Metab. Biol.* **1988**, *39*, 140-147.
- [470] M. W. Bowler, M. G. Montgomery, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8646-8649.
- [471] R. T. Zalogin, U. Pick *Algal Res.* **2014**, *3*, 17-23.
- [472] B. A. Maguire, L. M. Wondrack, L. G. Contillo, Z. Xu, *RNA* **2008**, *14*, 188-195.
- [473] J. Westbrook, Z. Feng, S. Jain, T. N. Bhat, N. Thanki, V. Ravichandran, G. L. Gilliland, W. Bluhm, H. Weissig, D. S. Greer, P. E. Bourne, H. M. Berman, *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 245-248.
- [474] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comp. Chem.* **2010**, *31*, 455-461.
- [475] J. Baxter, *J. Op. Res. Soc.* **1981**, *32*, 815-819.
- [476] A. R. C. Blum, M. Blesa, M. Sampels, *Hybrid Metaheuristics: An Emerging Approach to Optimization* Springer-Verlag, **2008**.
- [477] J. Nocedal, S. J. Wright, *Numerical optimization*, Berlin: Springer Series in Operations Research, Springer Verlag, **1999**.
- [478] D. Siodlak, *Amino Acids* **2015**, *47*, 1-17.
- [479] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633-684.
- [480] R. M. Dawson, *Toxicon* **1998**, *36*, 953-962.
- [481] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12780-12805.
- [482] L. Vollbrecht, H. Steinmetz, G. Hofle, L. Oberer, G. Rihs, G. Bovermann, P. von Matt, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 715-721.
- [483] F. Sasse, H. Steinmetz, T. Schupp, F. Petersen, K. Memmert, H. Hofmann, C. Heusser, V. Brinkmann, P. von Matt, G. Hofle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 543-551.



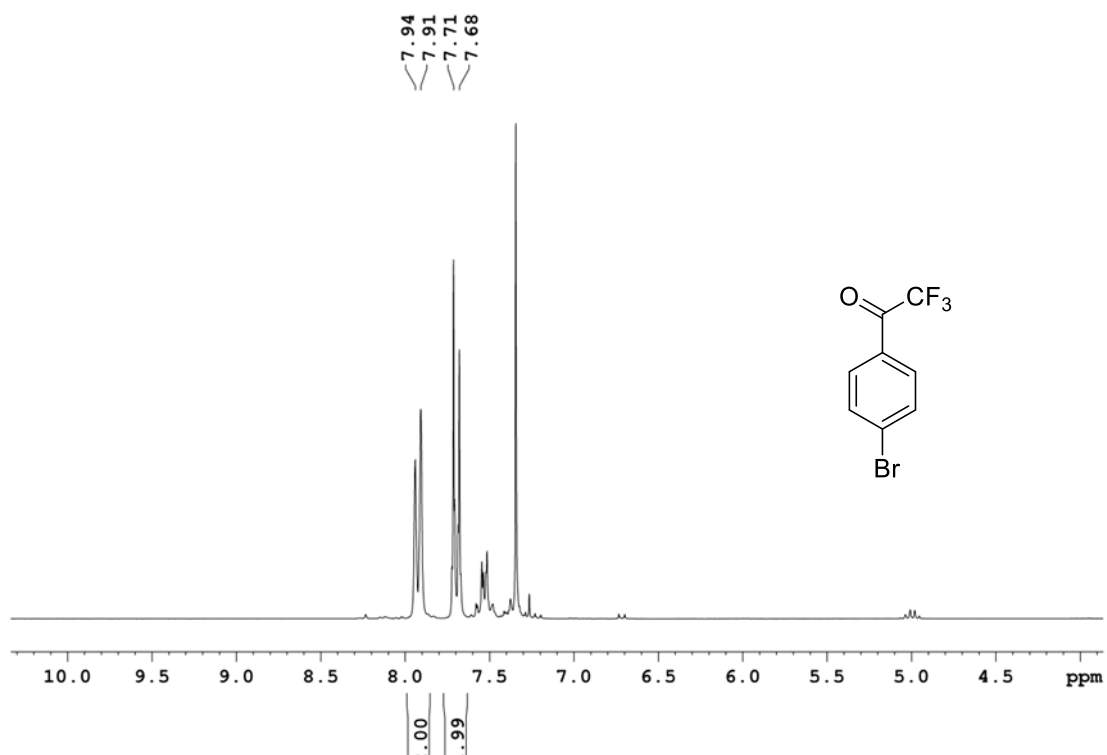
- [484] A. Jakobs, S. Steinmann, S. M. Henrich, T. J. Schmidt, K.-H. Klempnauer, *J. Biol. Chem.* **2016**.
- [485] S. J. Zunino, J. M. Ducore, D. H. Storms, *Cancer Lett.* **2007**, *254*, 119-127.
- [486] R. R. A. Freund, H.-D. Arndt, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 11009-11016.
- [487] Y. Matsuo, K. Kanoh, T. Yamori, H. Kasai, A. Katsuta, K. Adachi, K. Shin-ya, Y. Shizuri, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 251-255.
- [488] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, in *Purification of Laboratory Chemicals (Sixth Edition)*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **2009**, 445-576.
- [489] J. M. Becker, M. Wilchek, E. Katchalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1971**, *68*, 2604-2607.
- [490] G. K. T. Nguyen, Y. Cao, W. Wang, C. F. Liu, J. P. Tam, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15920–15924; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15694-15698.
- [491] G. Vincent, D. Karila, G. Khalil, P. Sancibrao, D. Gori, C. Kouklovsky, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 9358-9365.
- [492] S. C. Watson, J. F. Eastham, *J. Org. Chem.* **1967**, *9*, 165-168.
- [493] G. B. Hammond, *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 476-488.
- [494] S. Arimitsu, B. Fernández, C. del Pozo, S. Fustero, G. B. Hammond, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2656-2661.
- [495] A. S. Pilcher, P. DeShong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5130-5134.
- [496] P. Liu, A. Calderon, G. Konstantinidis, J. Hou, S. Voss, X. Chen, F. Li, S. Banerjee, J.-E. Hoffmann, C. Theiss, L. Dehmelt, Y.-W. Wu, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10213–10219 *Angew. Chem. Inter. Ed.* **2014**, *53*, 10049-10055.
- [497] K. Elbing, R. Brent, in *Curr. Prot. Mol. Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [498] G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Cullum, S. G. Oliver, *Appl. Microbiol. Biotech.* **1989**, *31*, 272-277.
- [499] W. F. Scherer, J. T. Syverton, G. O. Gey, *J. Exp. Med.* **1953**, *97*, 695-710.
- [500] D. Fassnacht, S. Ghaussy, N. Rössing, R. Pörtner, *Biotechn. Lett.* **1997**, *19*, 35-38.
- [501] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [502] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443-450.
- [503] H. B. Collier, *Anal. Biochem.* **1973**, *56*, 310-311.
- [504] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [505] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255-262.

- [506] L. Kerényi, F. Gallyas, *Clin. Chim. Acta* **1972**, *38*, 465-467.
- [507] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 4350-4354.
- [508] A. F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H. S. Overkleeft, E. Peterson, M. W. Pennington, H. L. Ploegh, N. A. Thornberry, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35869-35877.

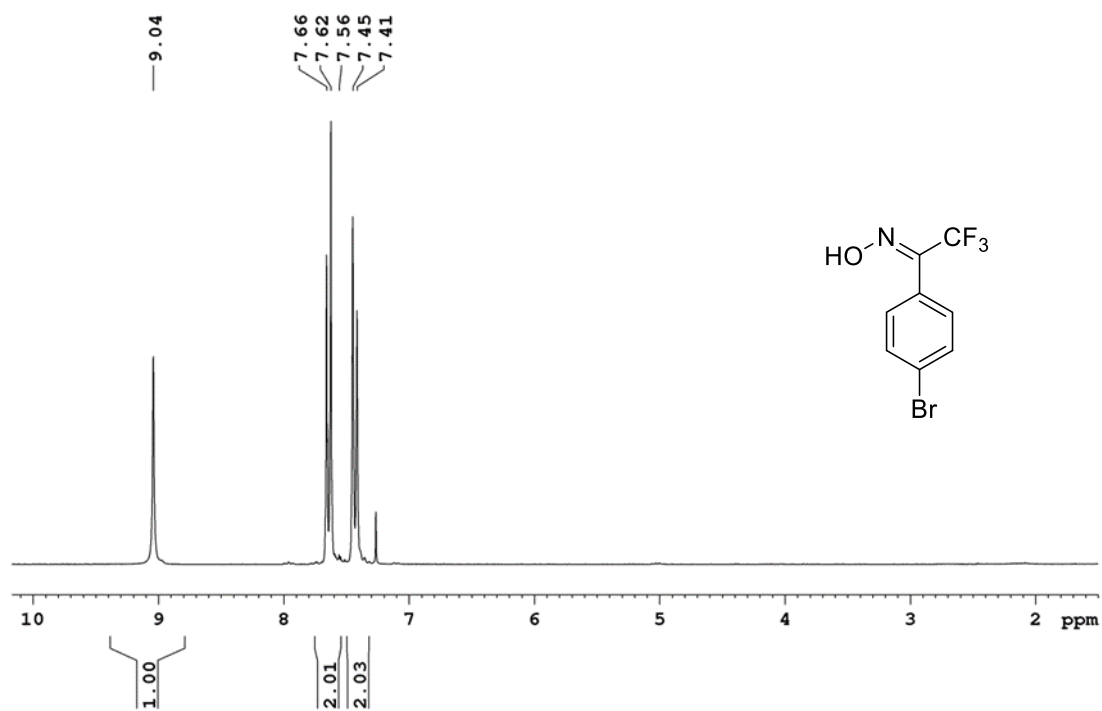


---

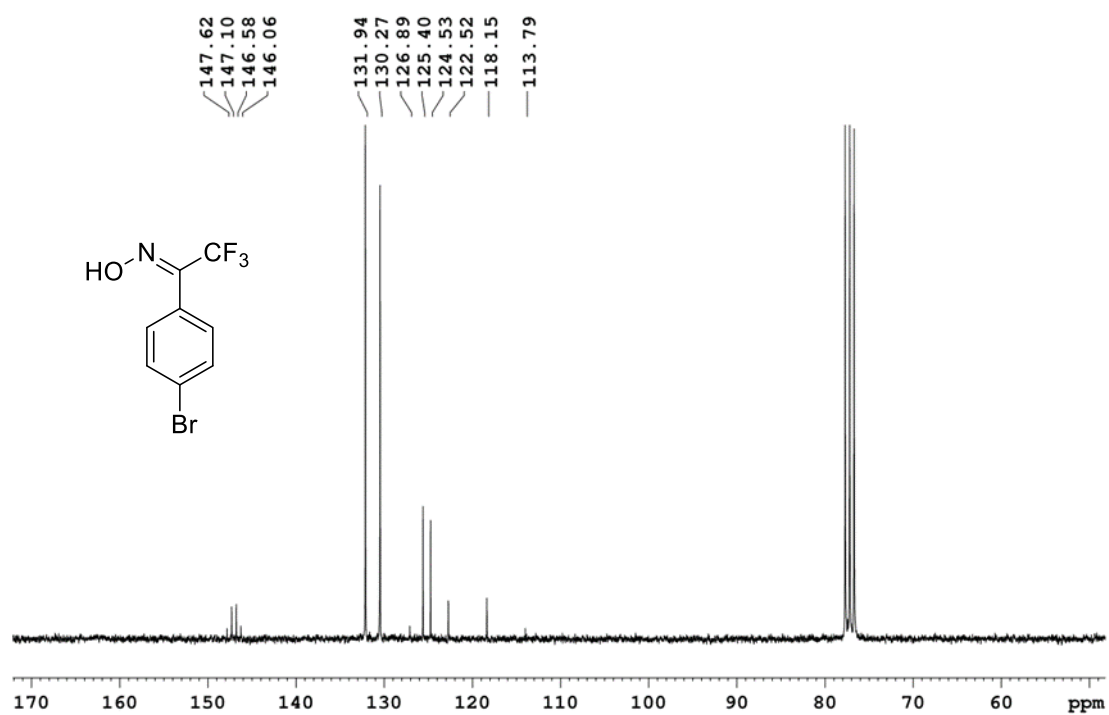
## 9 Anhang



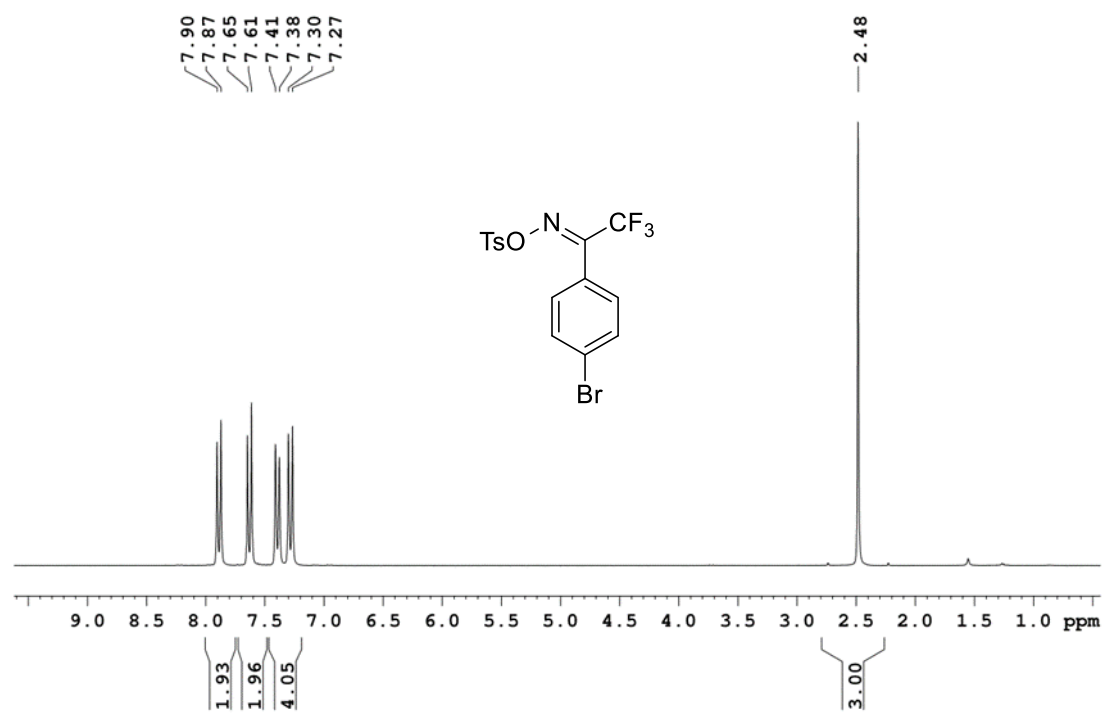
Anhang 1: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Keton **103** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



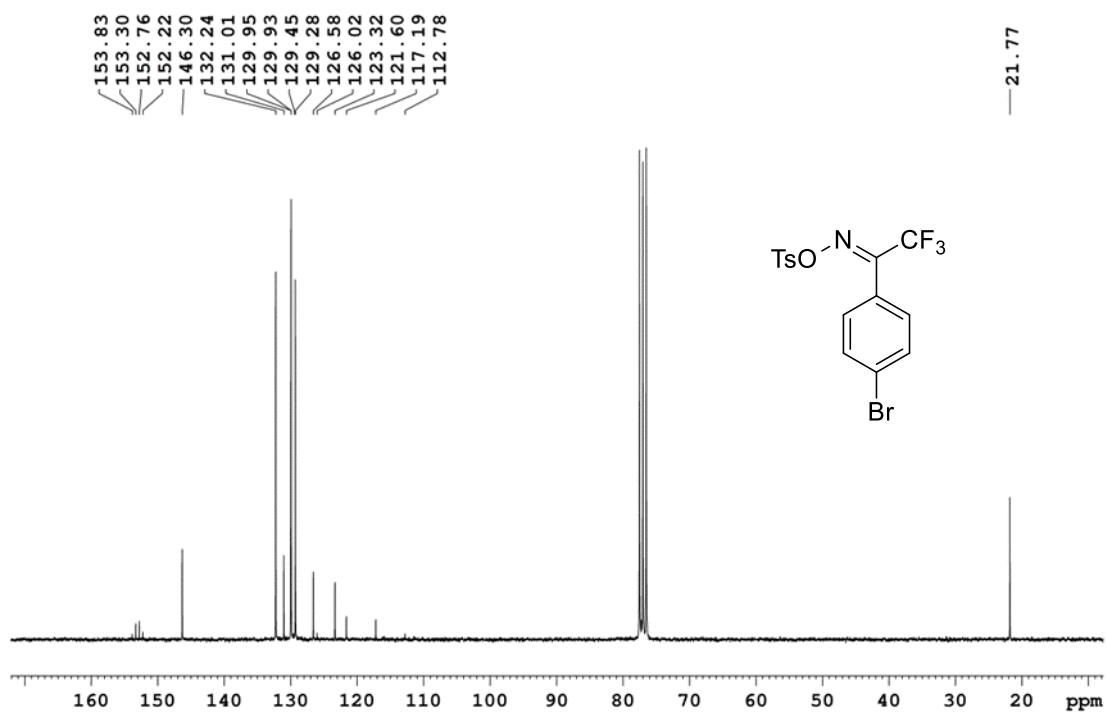
Anhang 2: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Oxim **123** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



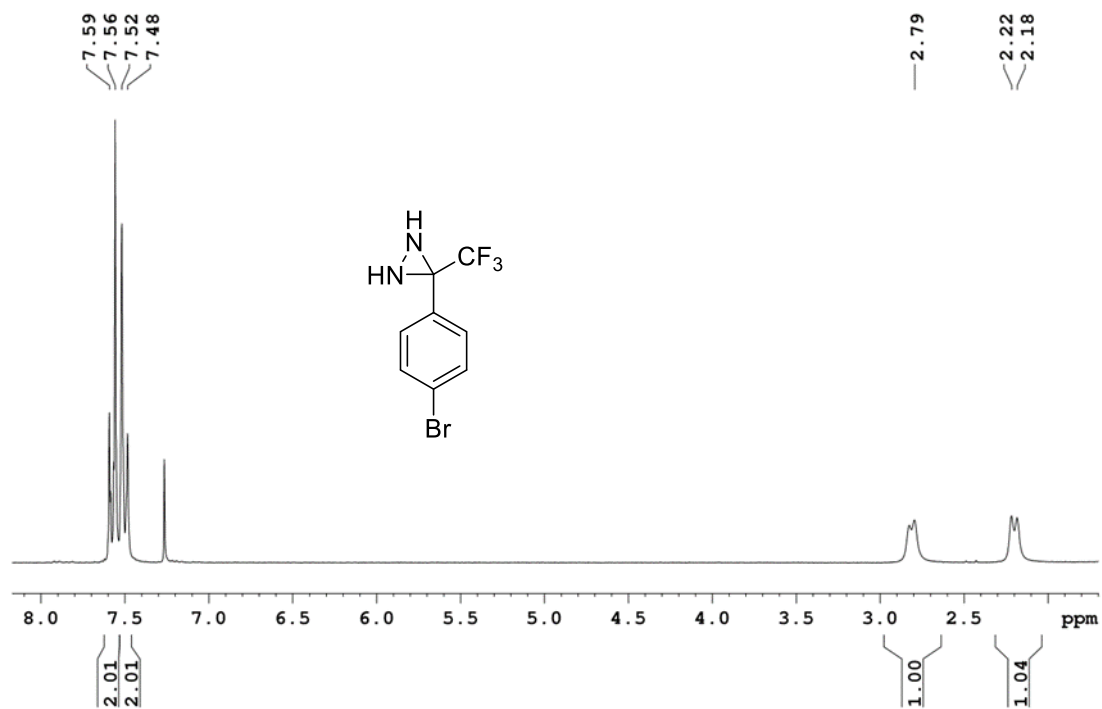
Anhang 3: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Oxim **123** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



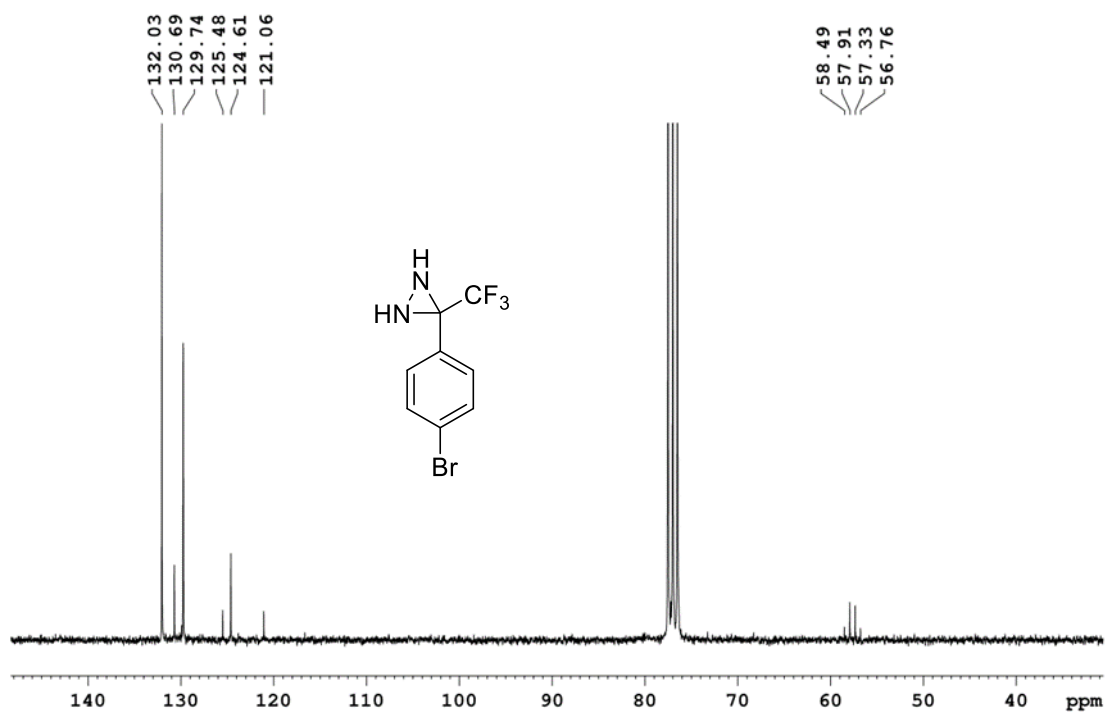
Anhang 4: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Tosylat **122** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



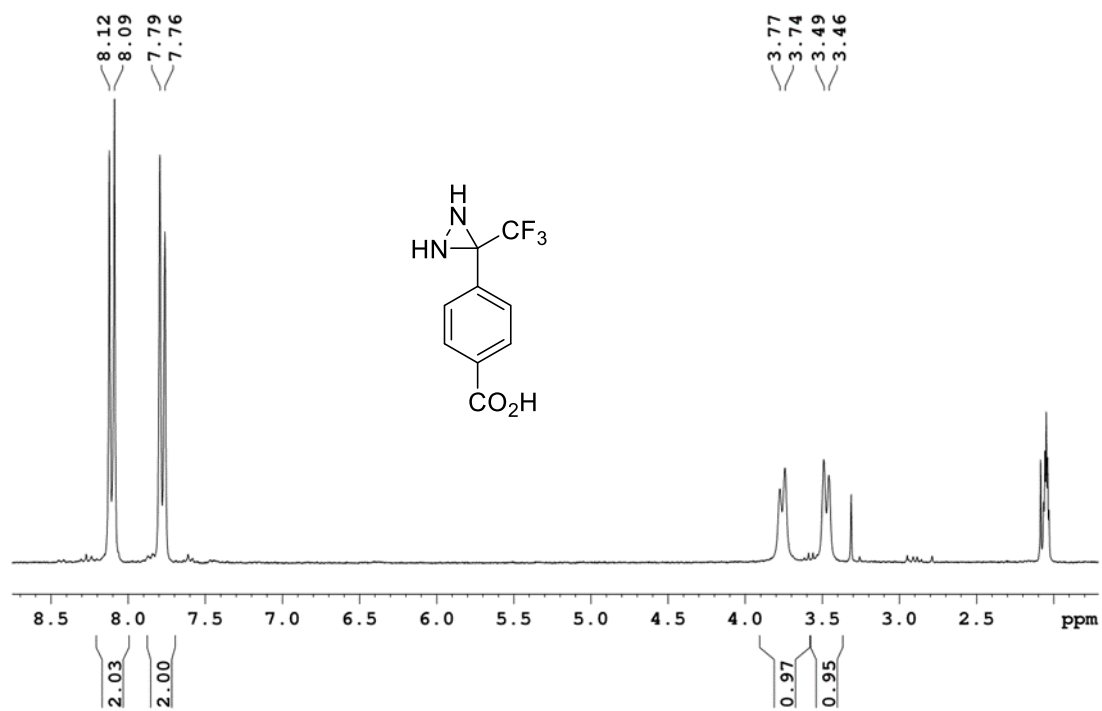
Anhang 5: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Tosylat **122** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Anhang 6: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Diaziridin **102** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

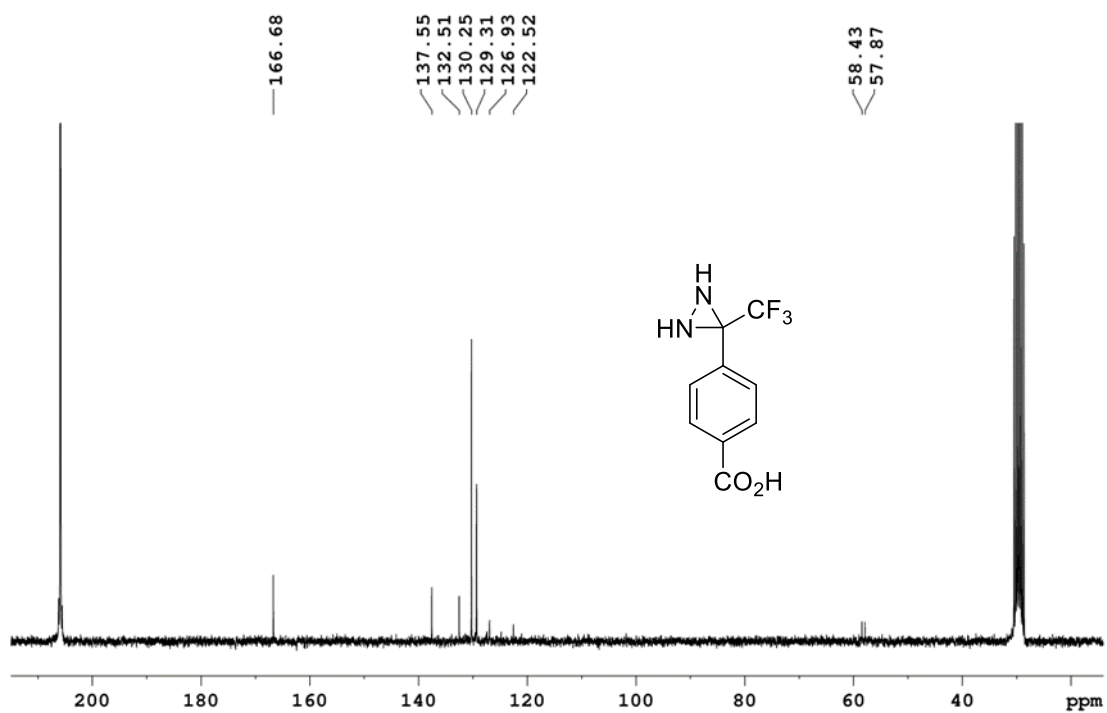


Anhang 7: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diaziridin **102** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

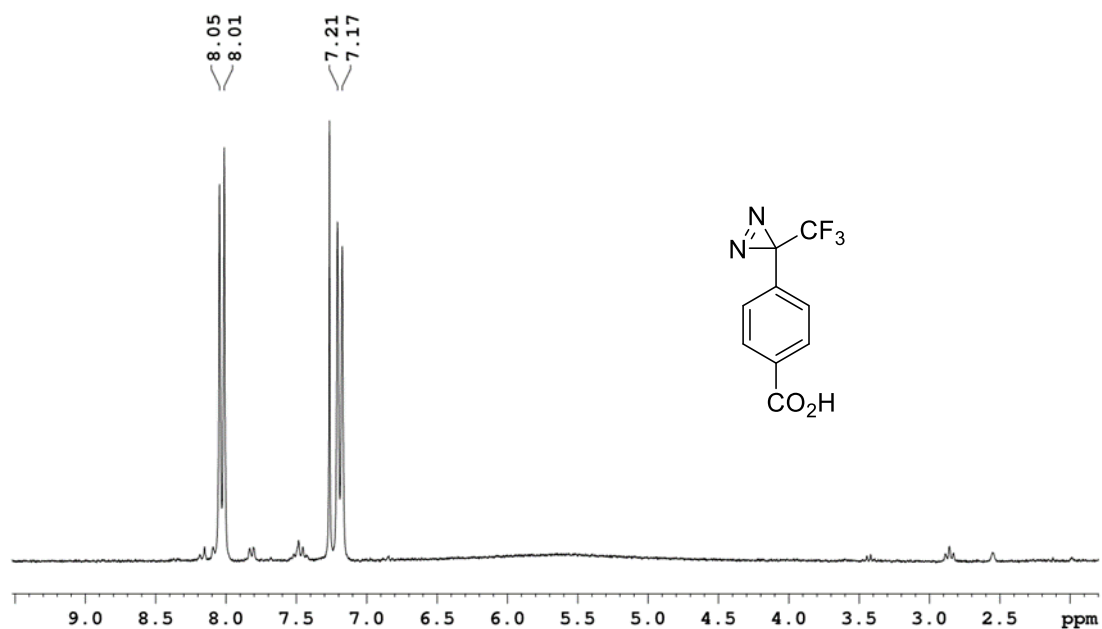


Anhang 8: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Carbonsäure **121** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

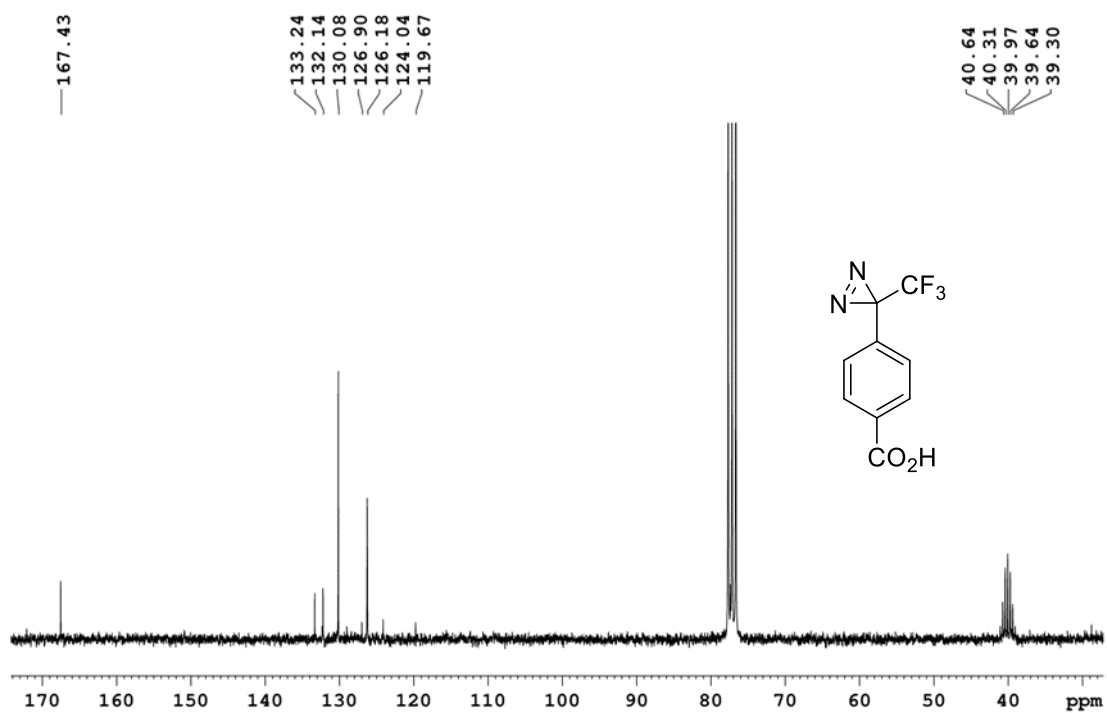




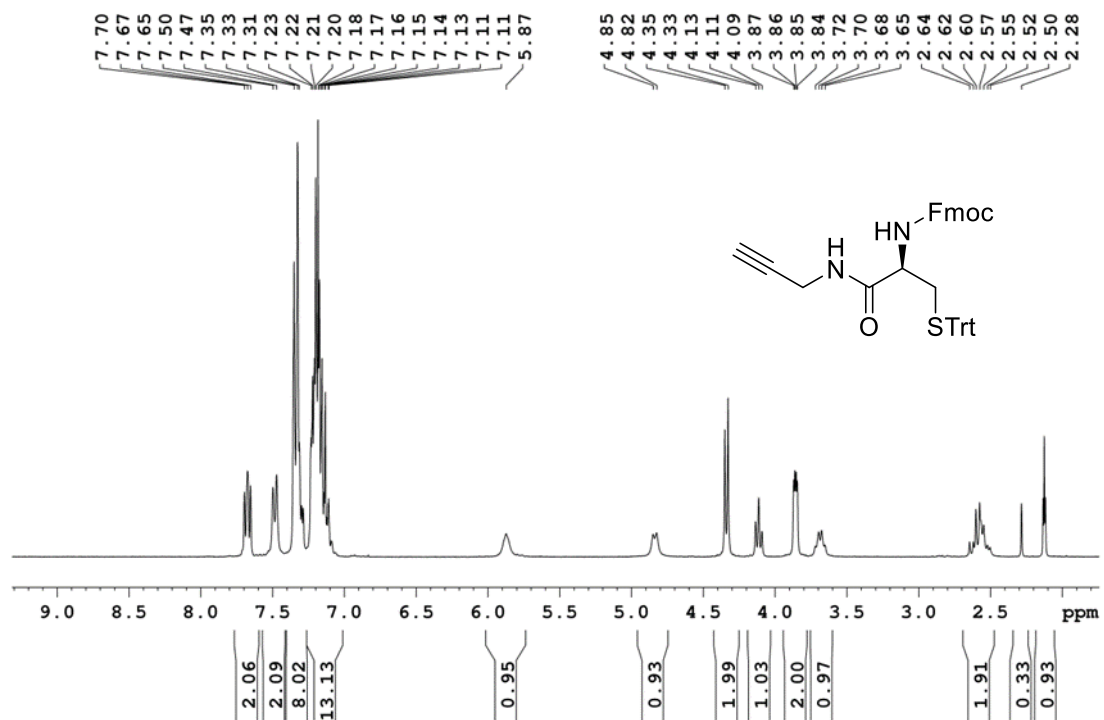
Anhang 9: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Carbonsäure **121** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



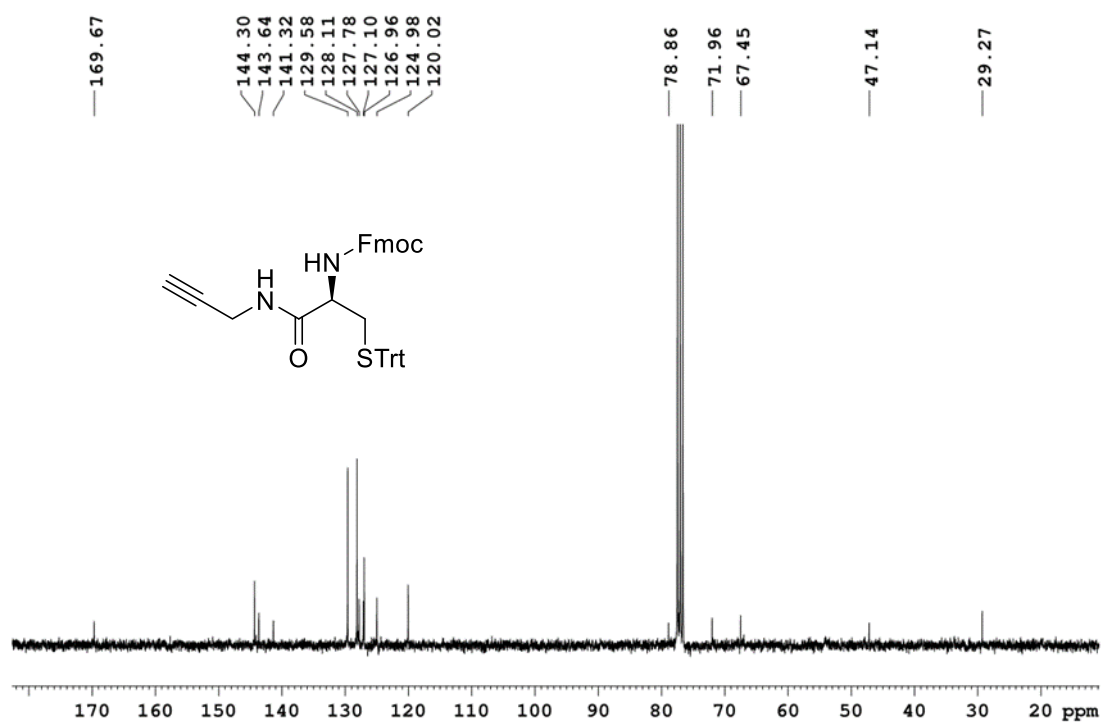
Anhang 10: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Diazirin **101** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



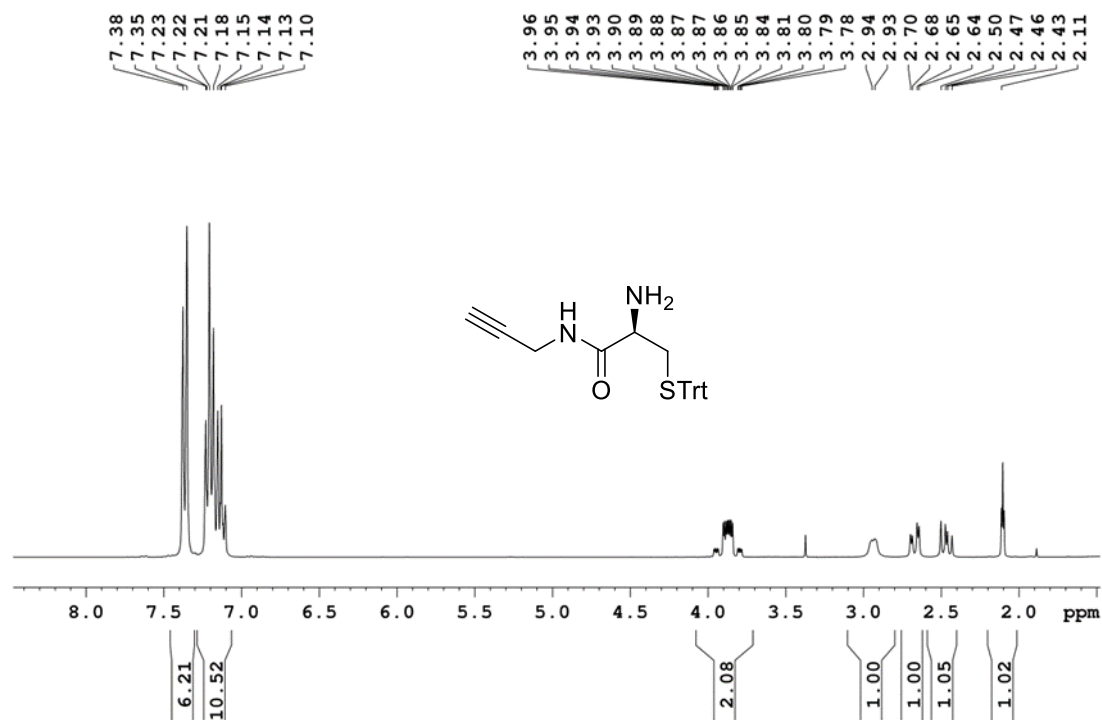
Anhang 11: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diazirin **101** (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



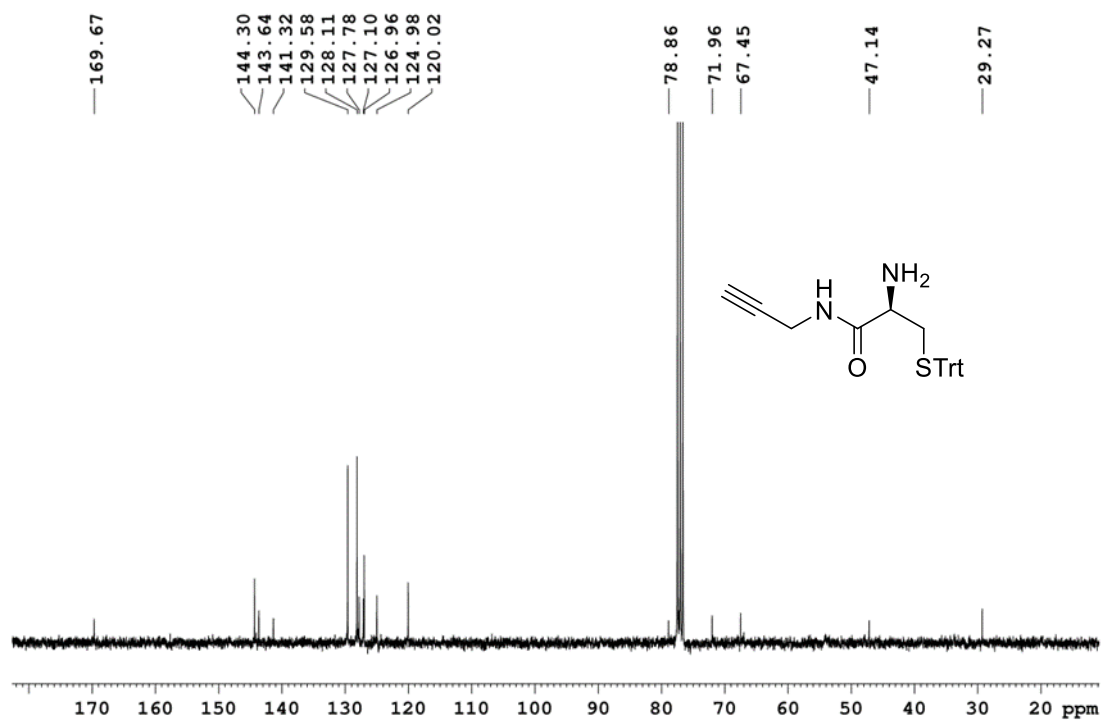
Anhang 12: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Amid **125** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



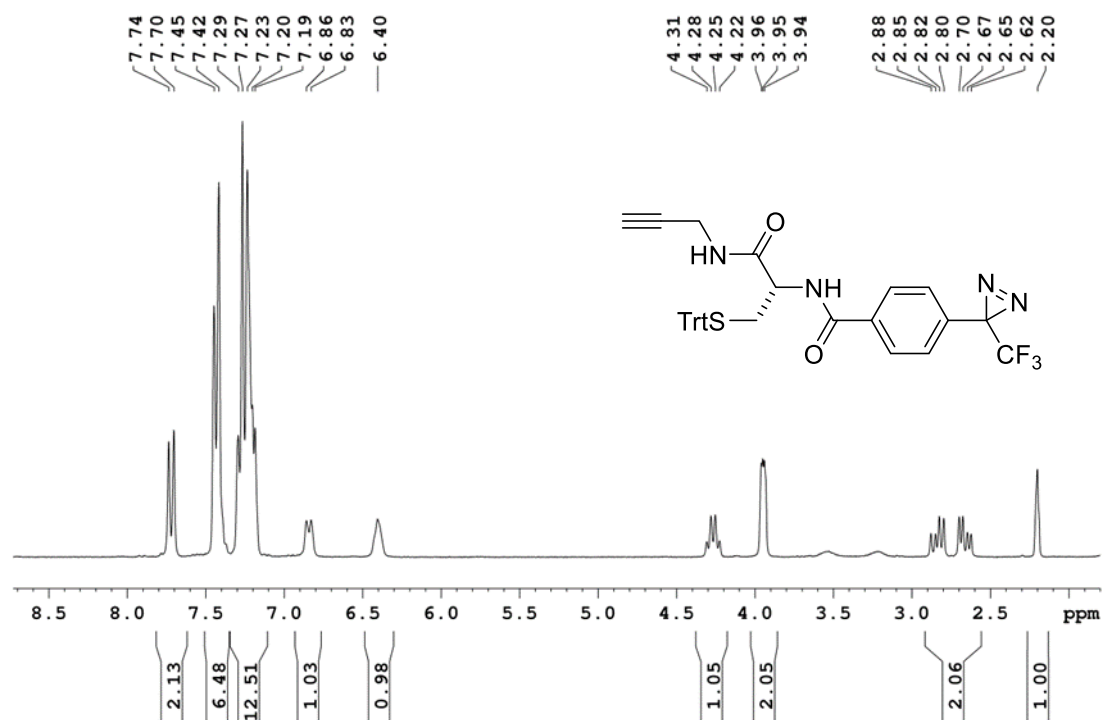
Anhang 13:  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum von Amid **125** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



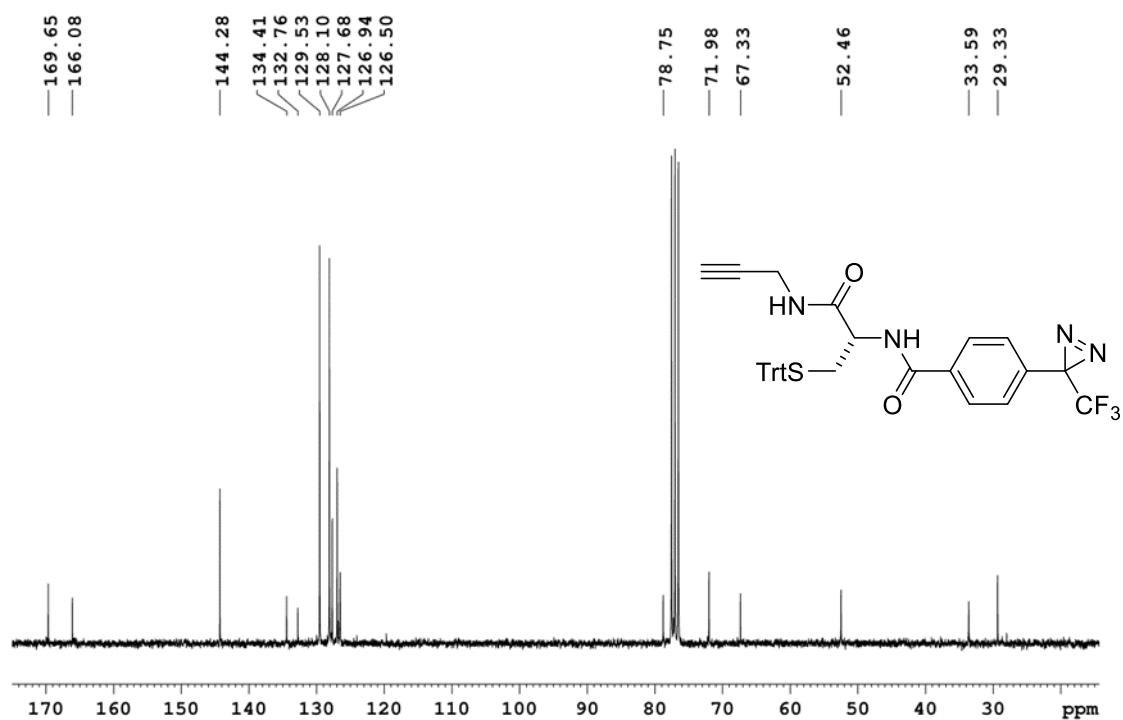
Anhang 14:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Amin **124** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$  (4:1)).



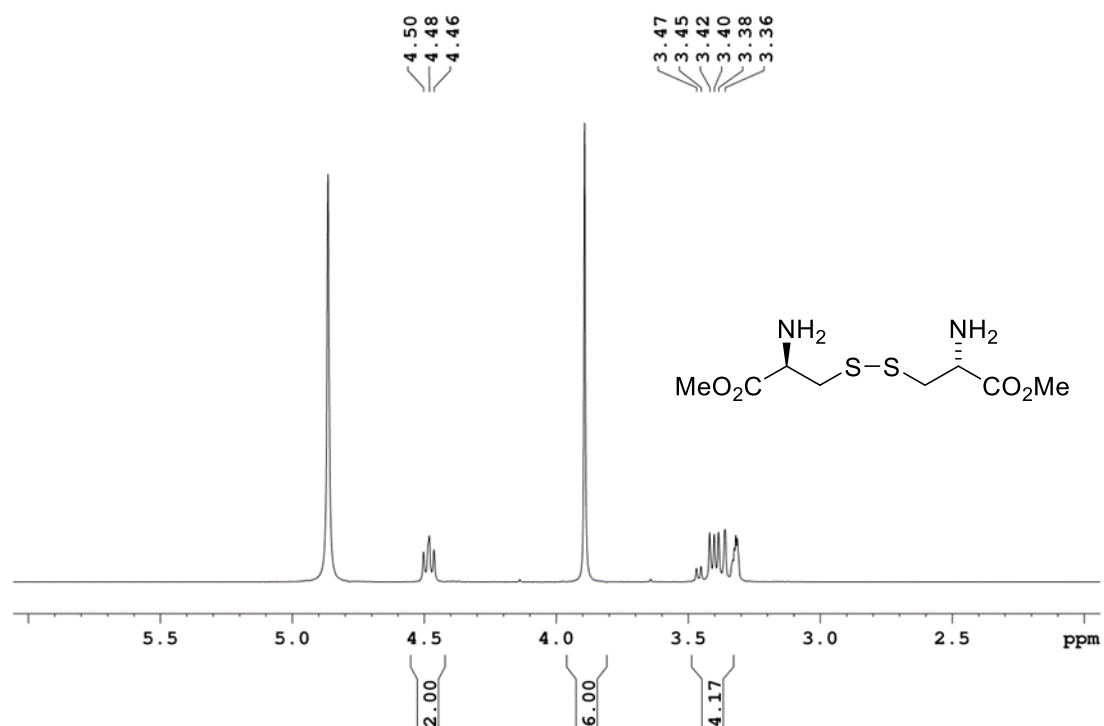
Anhang 15: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Amin 124 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOH-*d*<sub>4</sub> (4:1)).



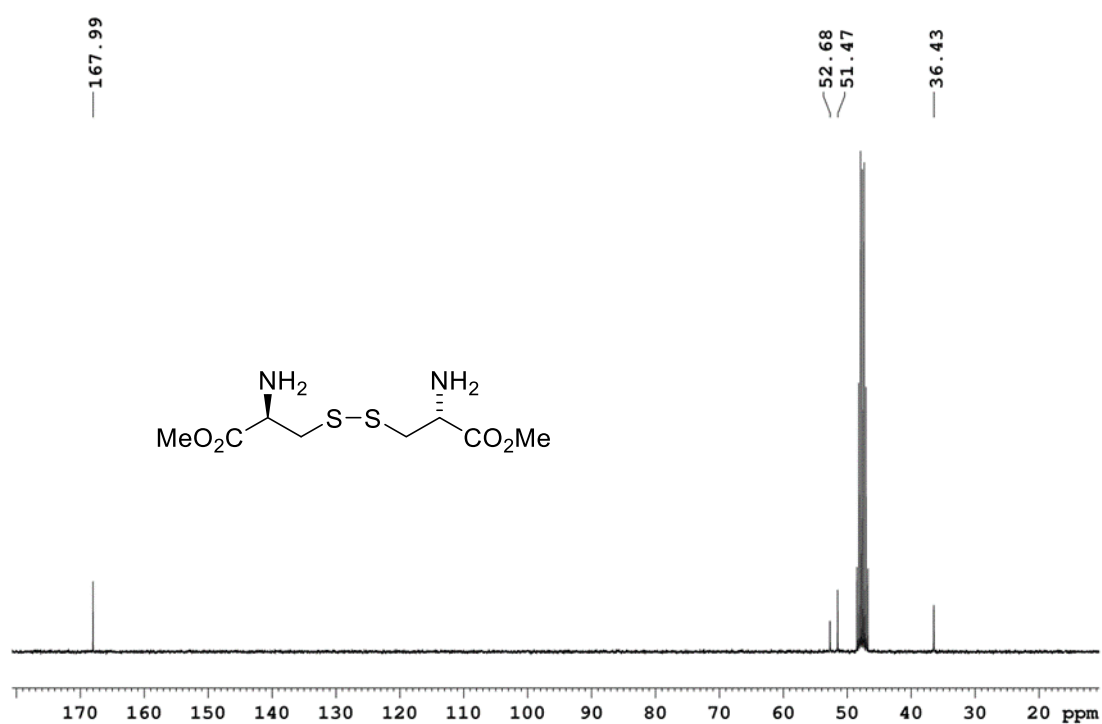
Anhang 16: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Amid 105 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



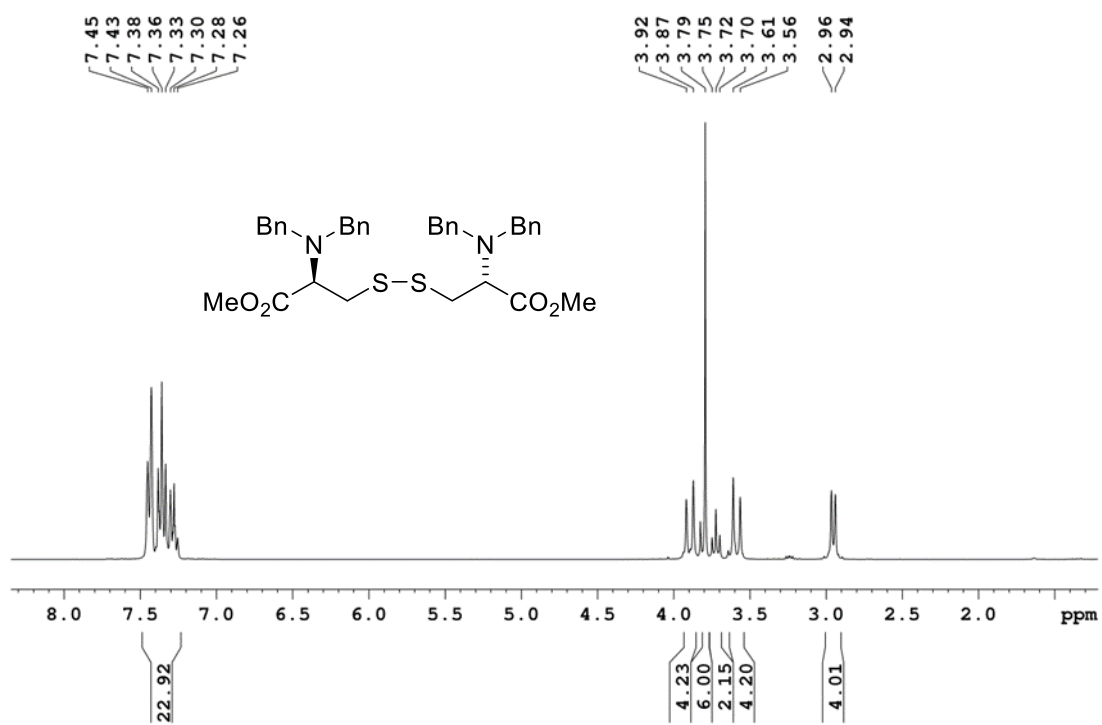
Anhang 17: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Amid **105** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



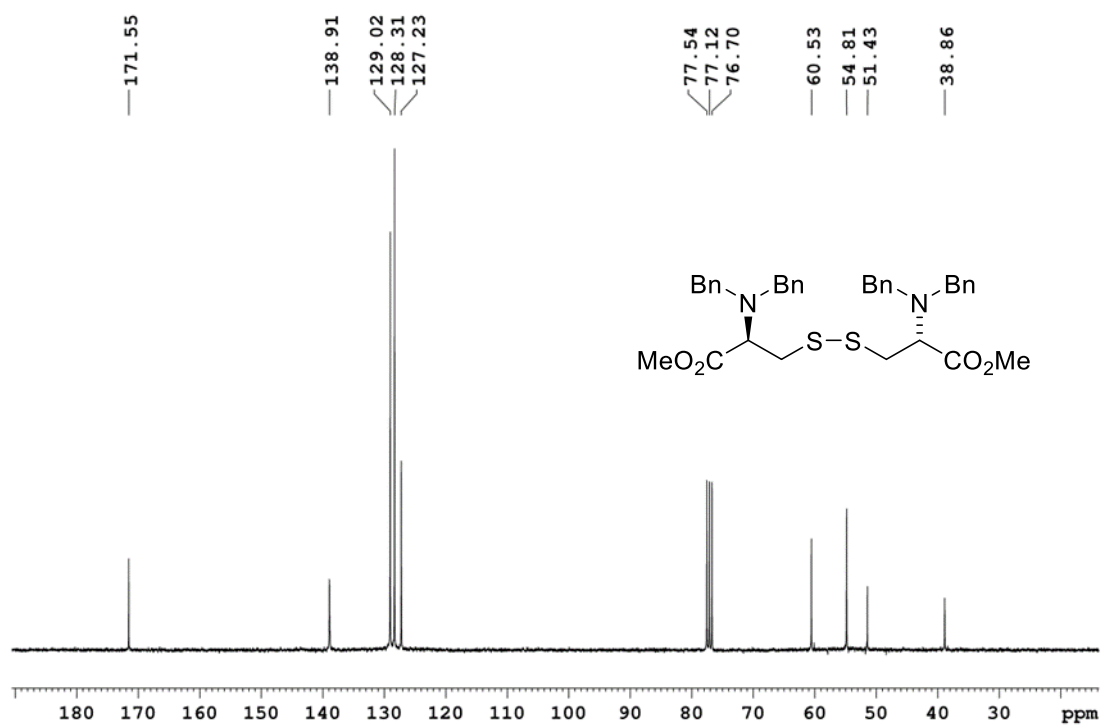
Anhang 18: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Diester **131** (300 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>).



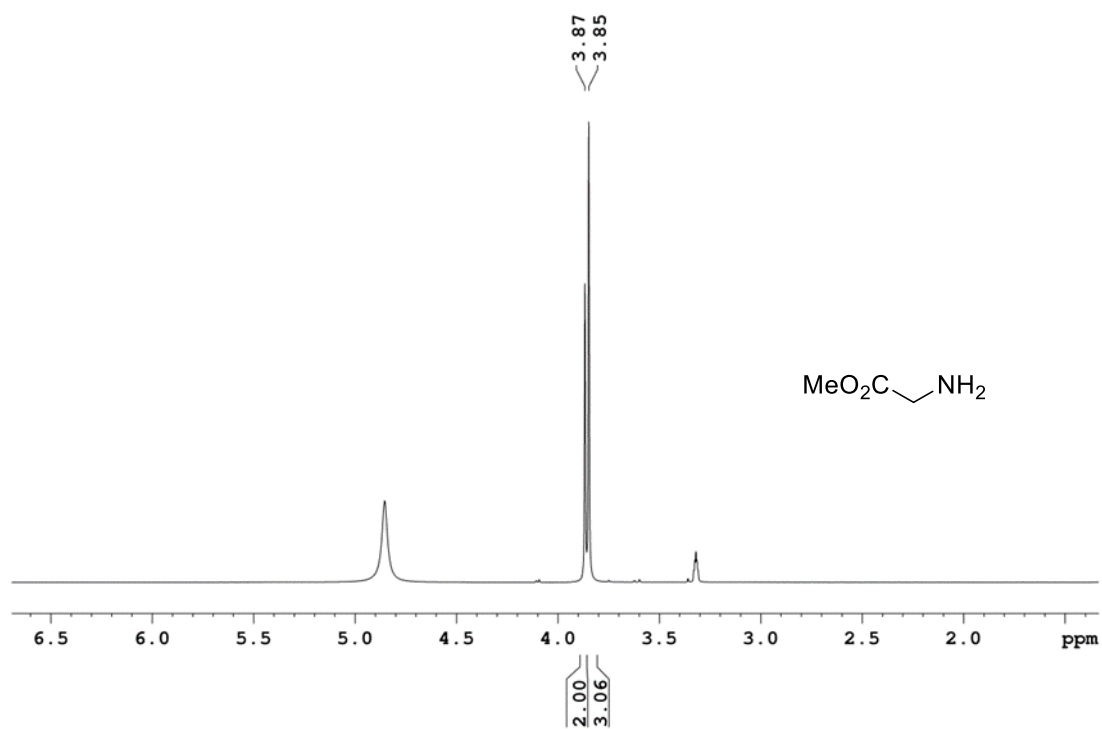
Anhang 19: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diester **131** (75 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>).



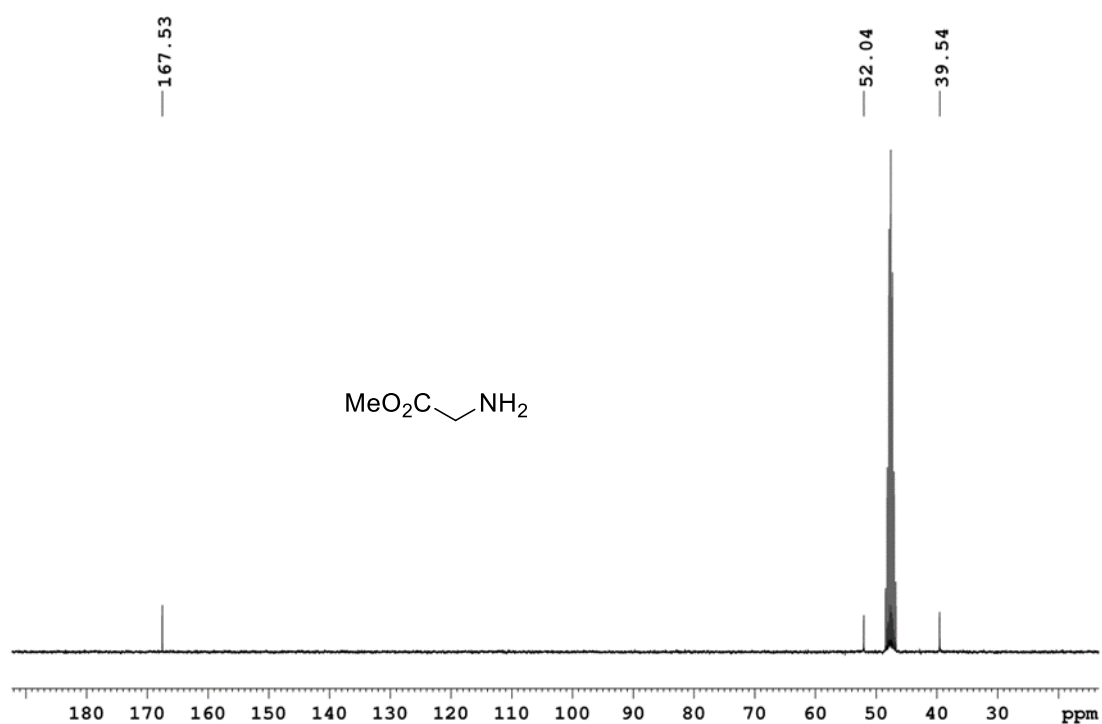
Anhang 20: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Benzylamin **132** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



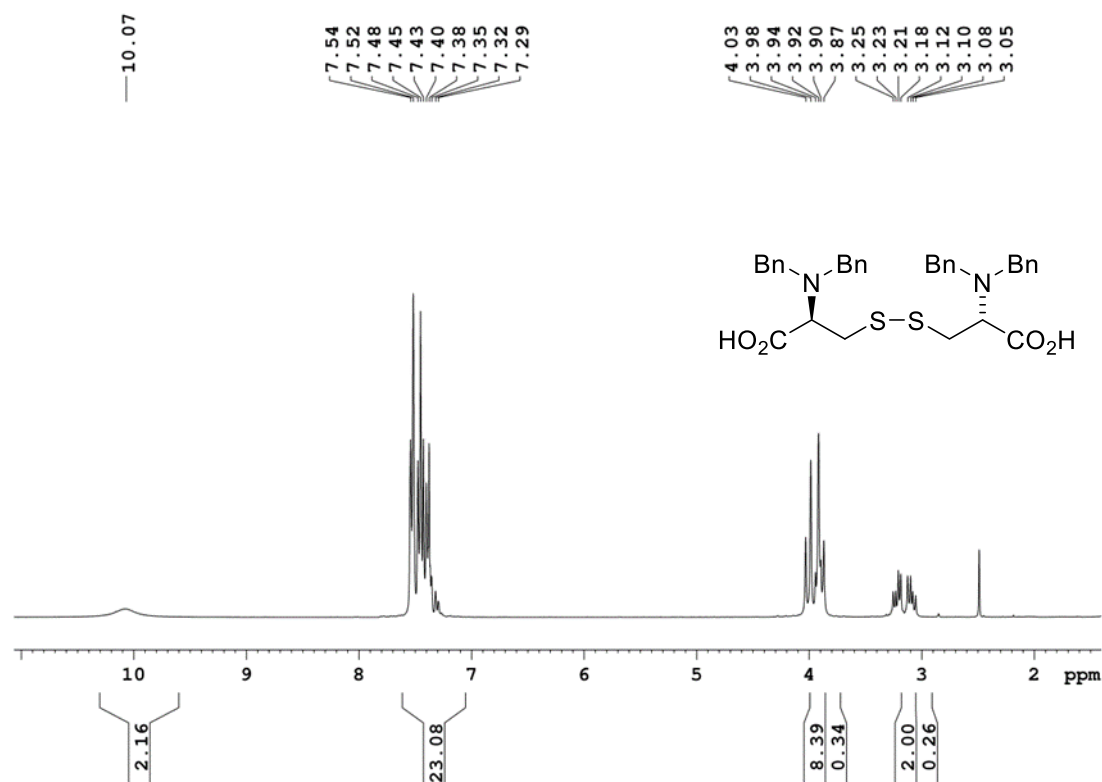
Anhang 21: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Benzylamin **132** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Anhang 22: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Glycinmethylester (300 MHz, MeOH-).

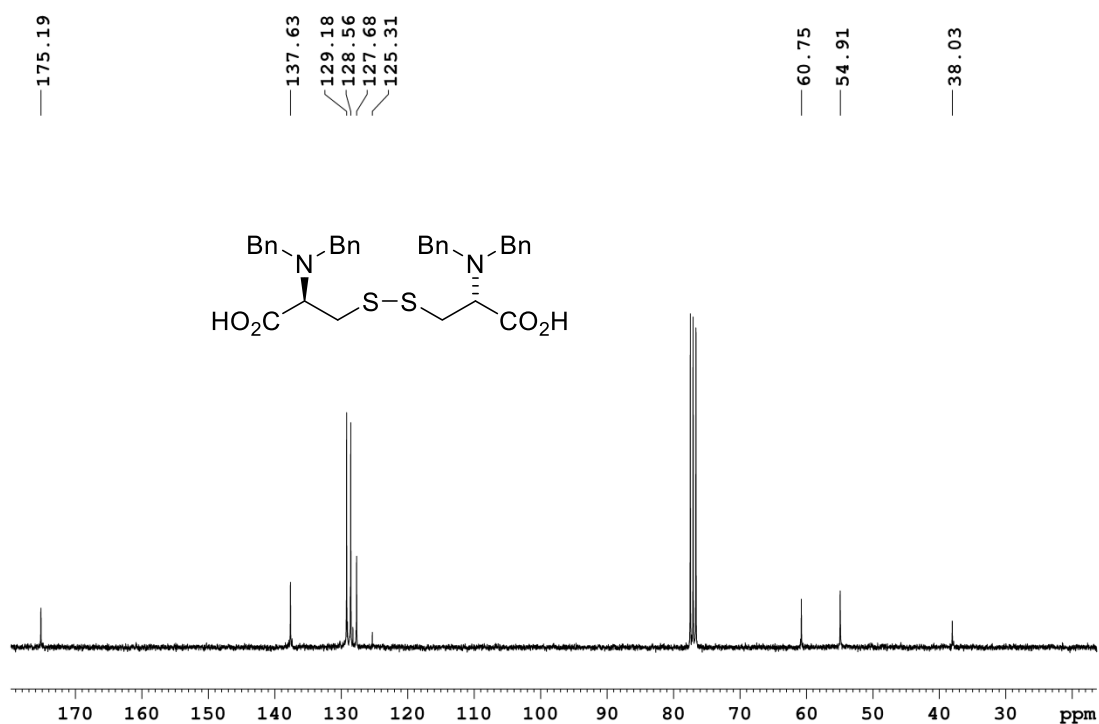


Anhang 23:  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Glycinmethylester (75 MHz, MeOH-).

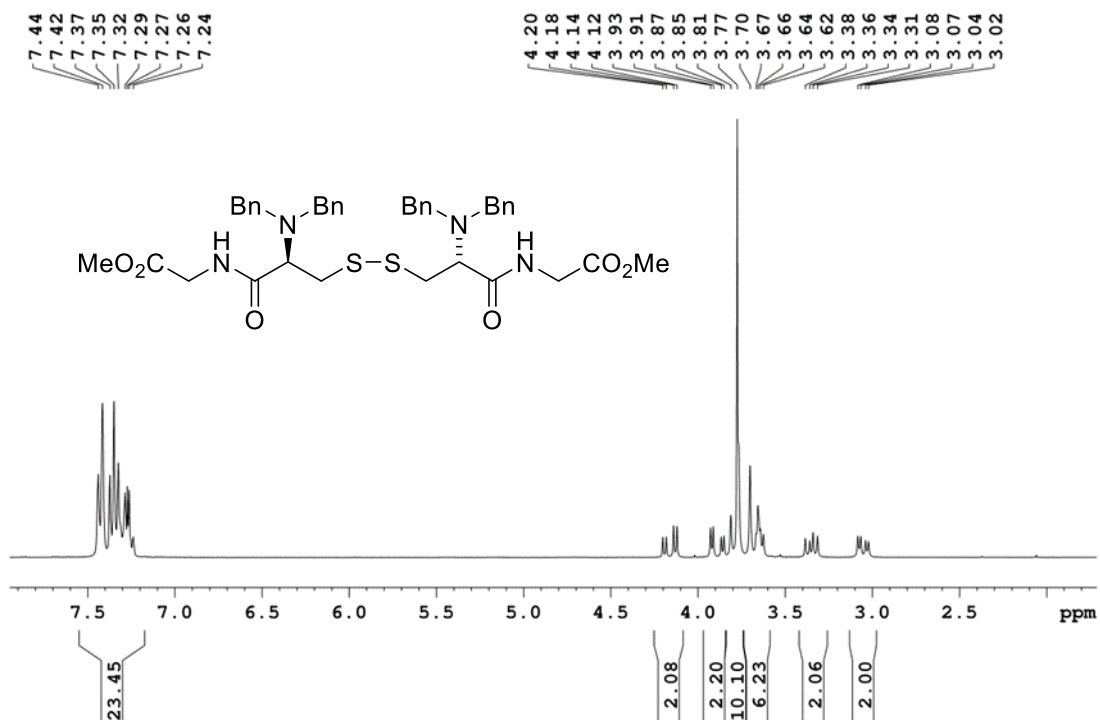


Anhang 24:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Disäure **142** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

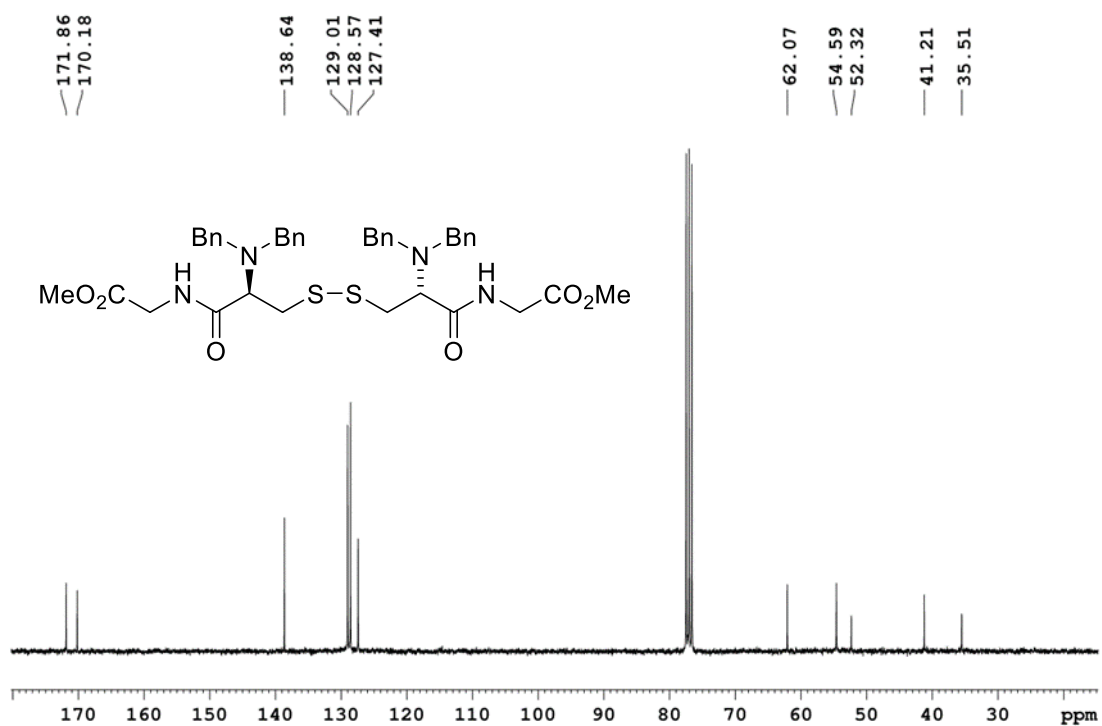




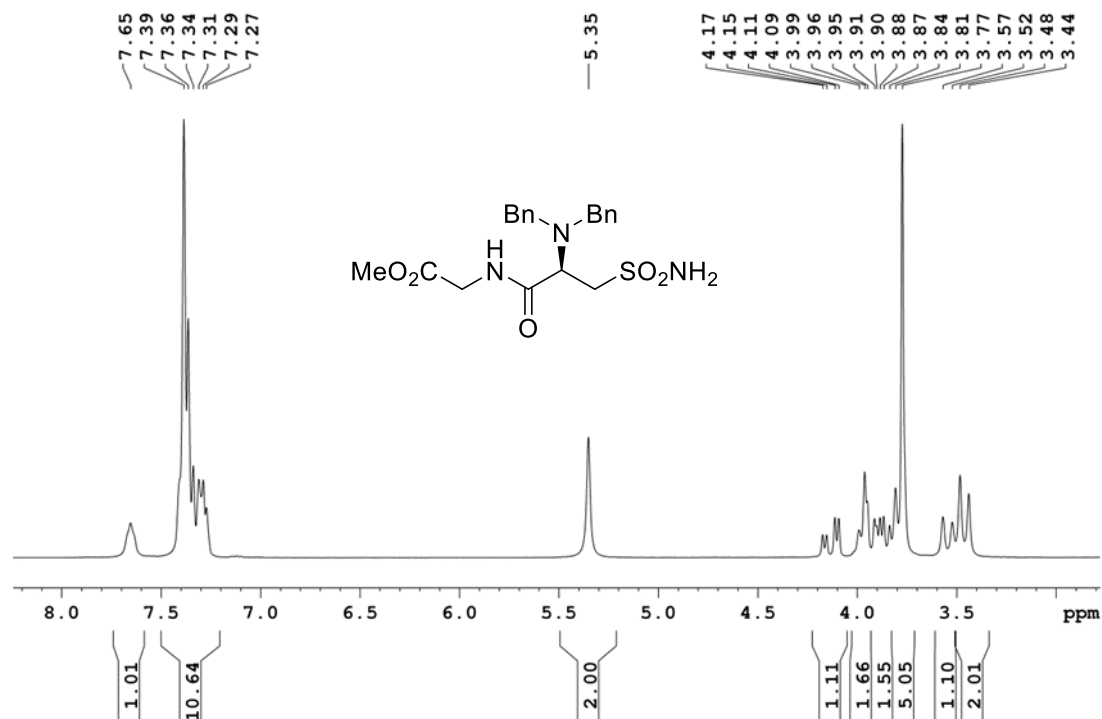
Anhang 25:  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Disäure 142 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



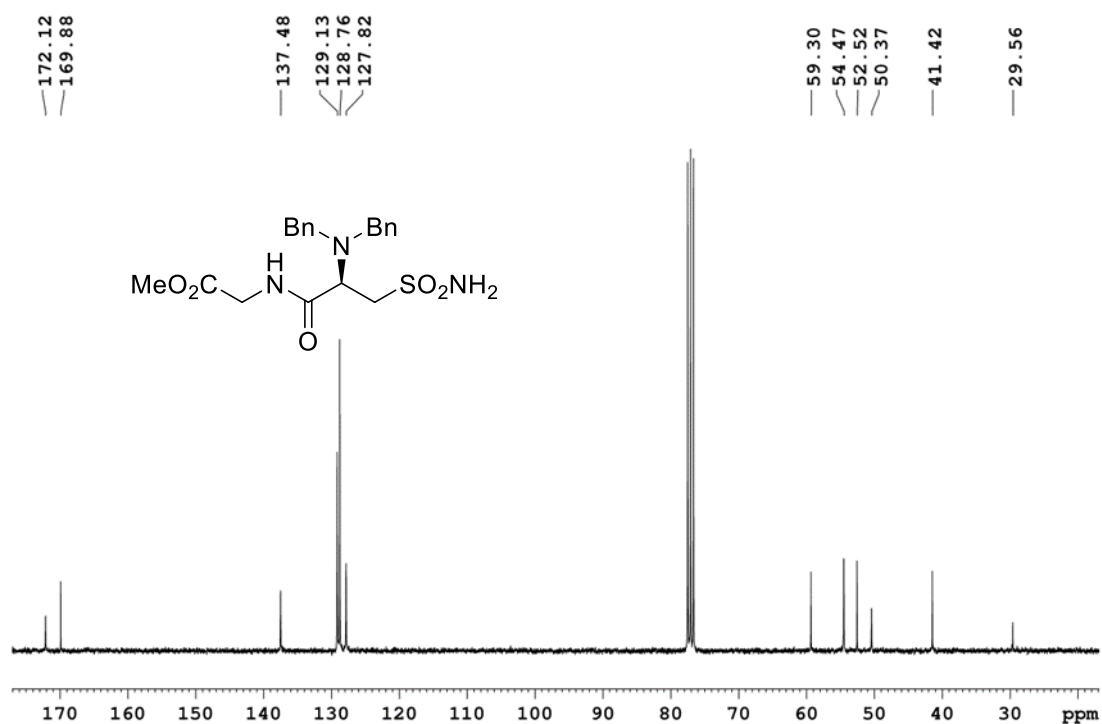
Anhang 26:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Diamid 143 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



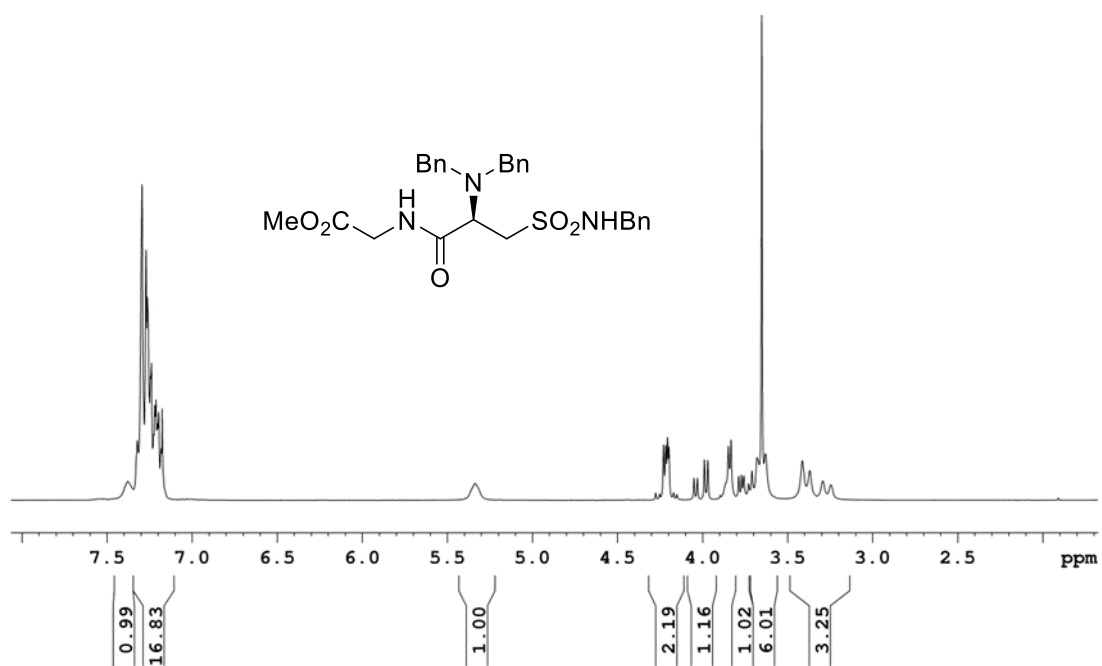
Anhang 27: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diamid **143** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



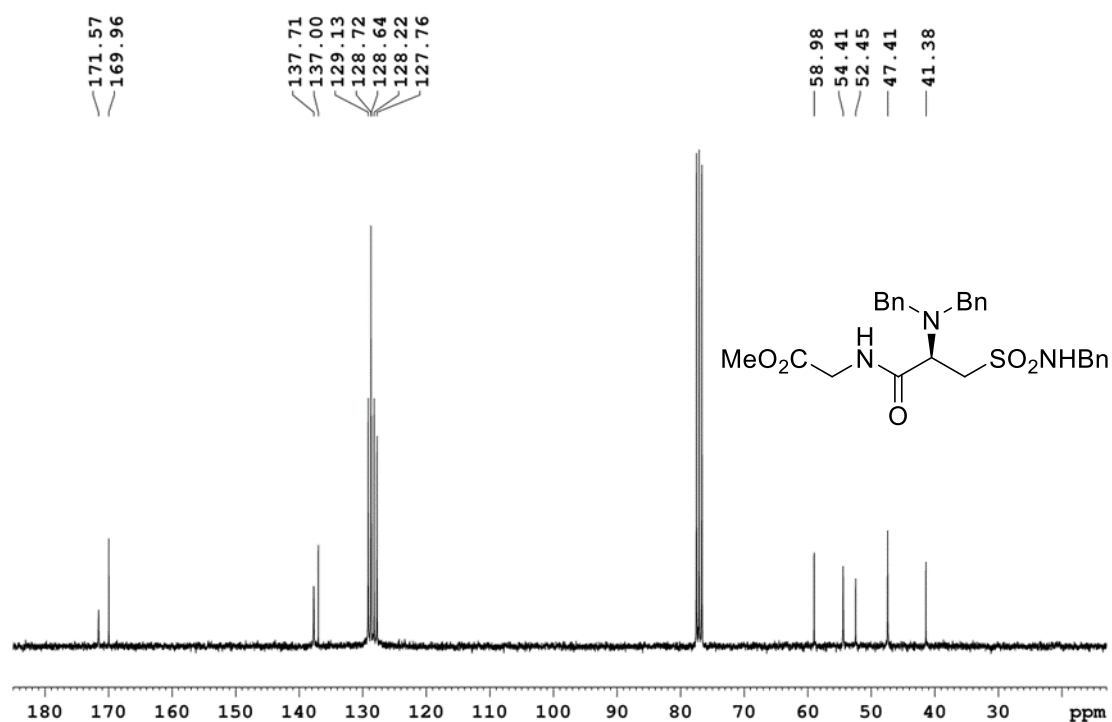
Anhang 28: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Sulfonsäureamid **144** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



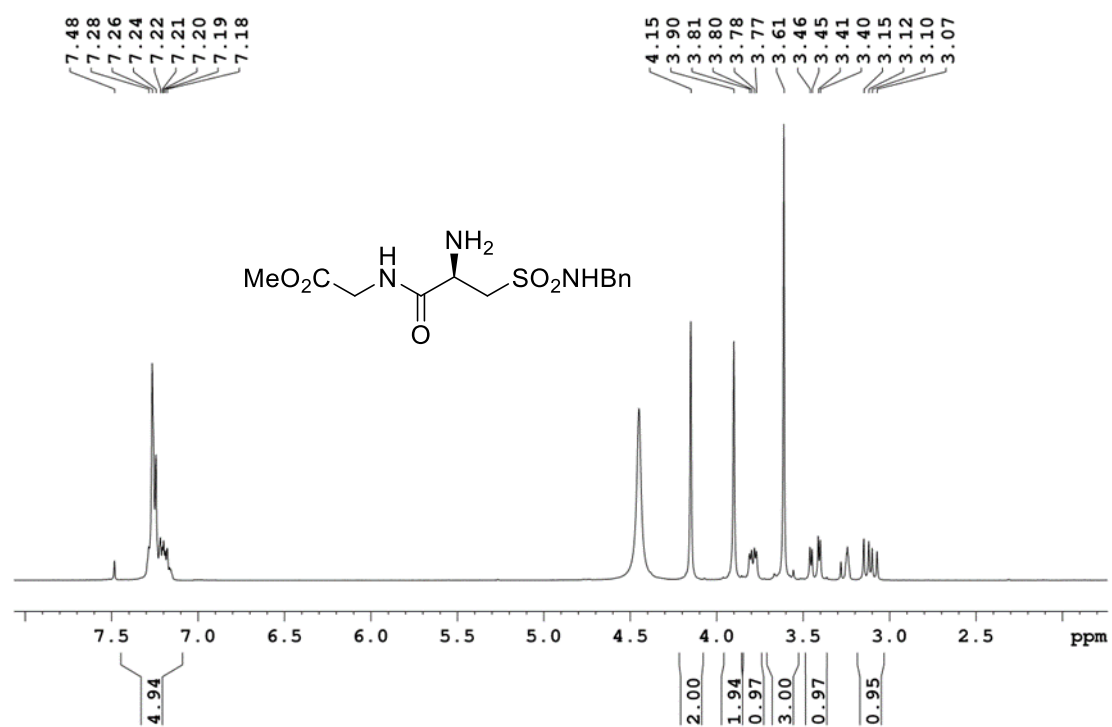
Anhang 29: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Sulfonsäureamid **144** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



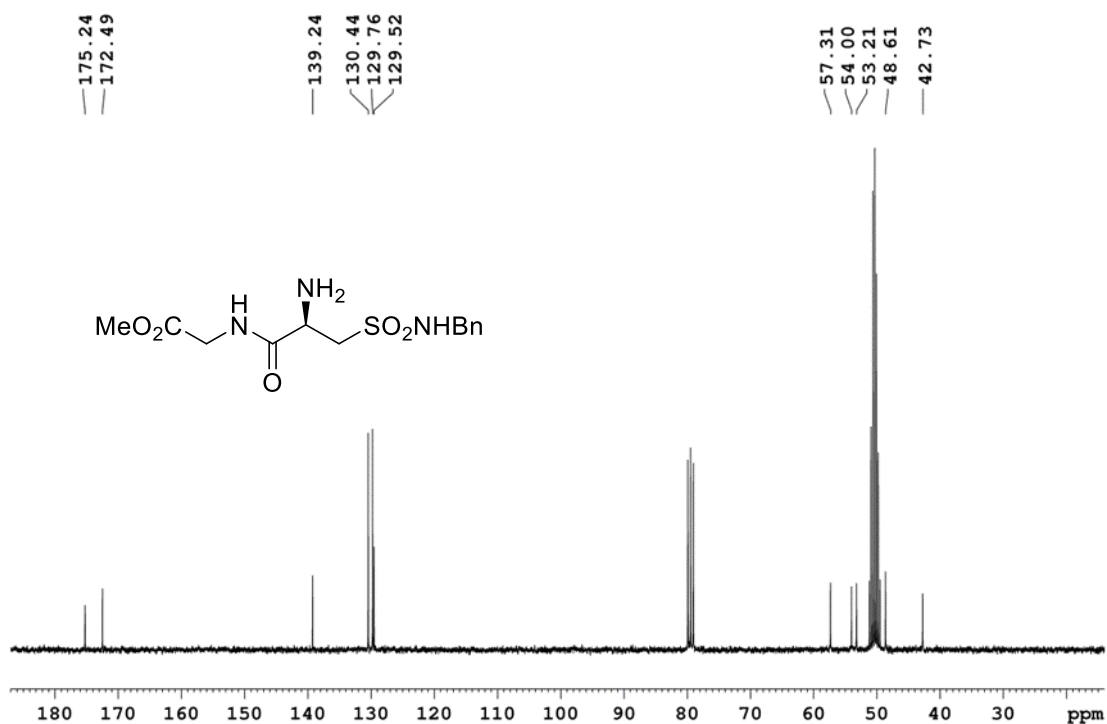
Anhang 30: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Sulfonsäureamid **201** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



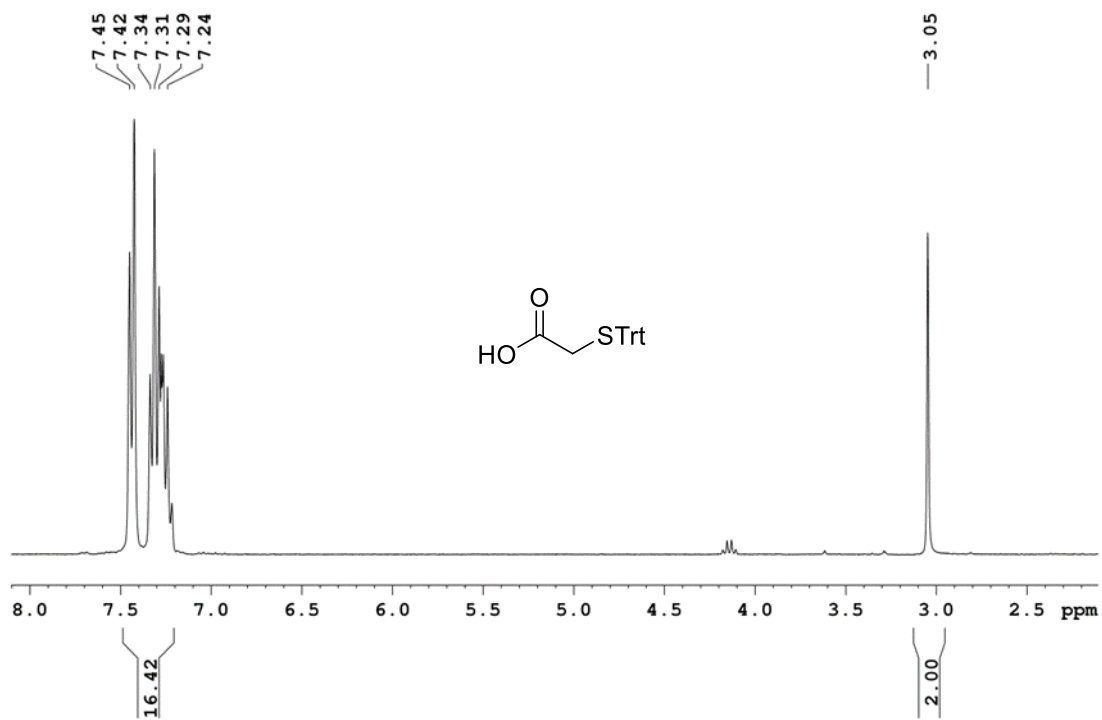
Anhang 31: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Sulfonsäureamid **201** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



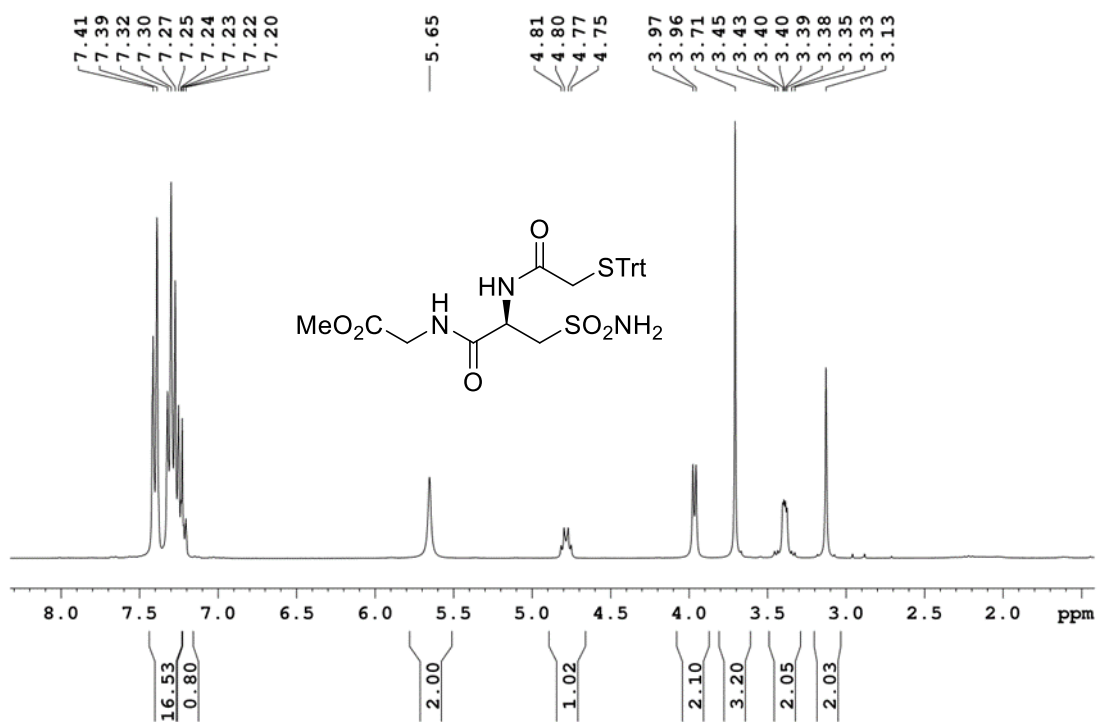
Anhang 32: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Amin **202** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*<sub>4</sub> (1:1)).



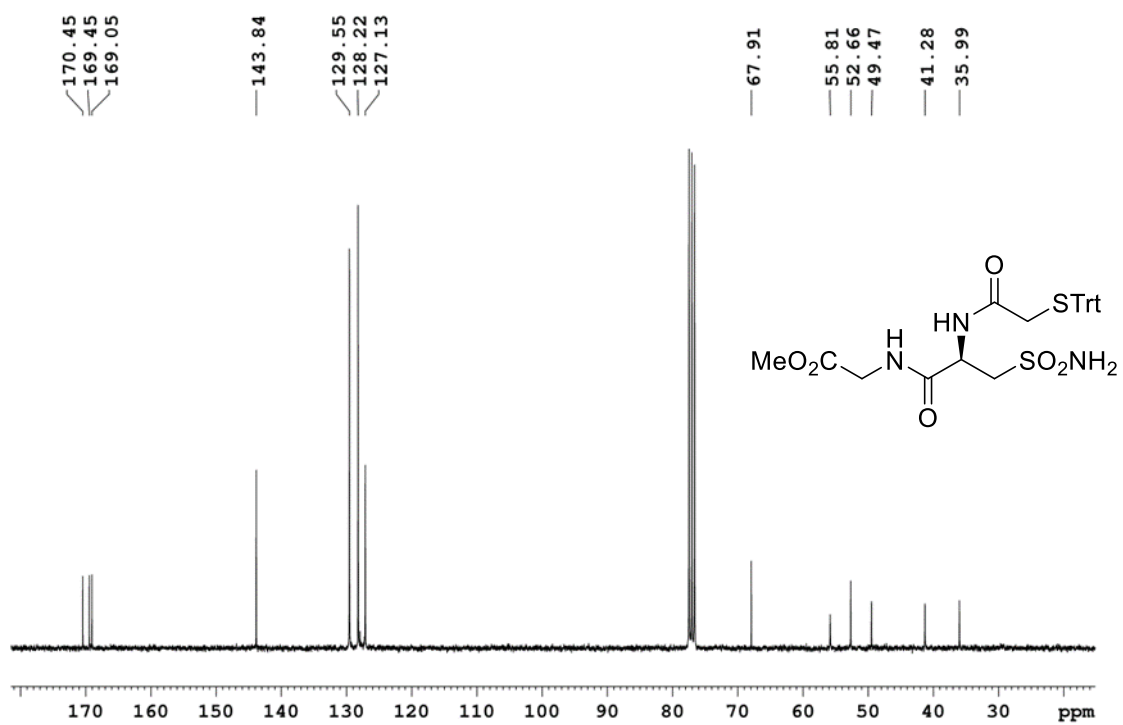
Anhang 33: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Amin **202** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*<sub>4</sub> (1:1)).



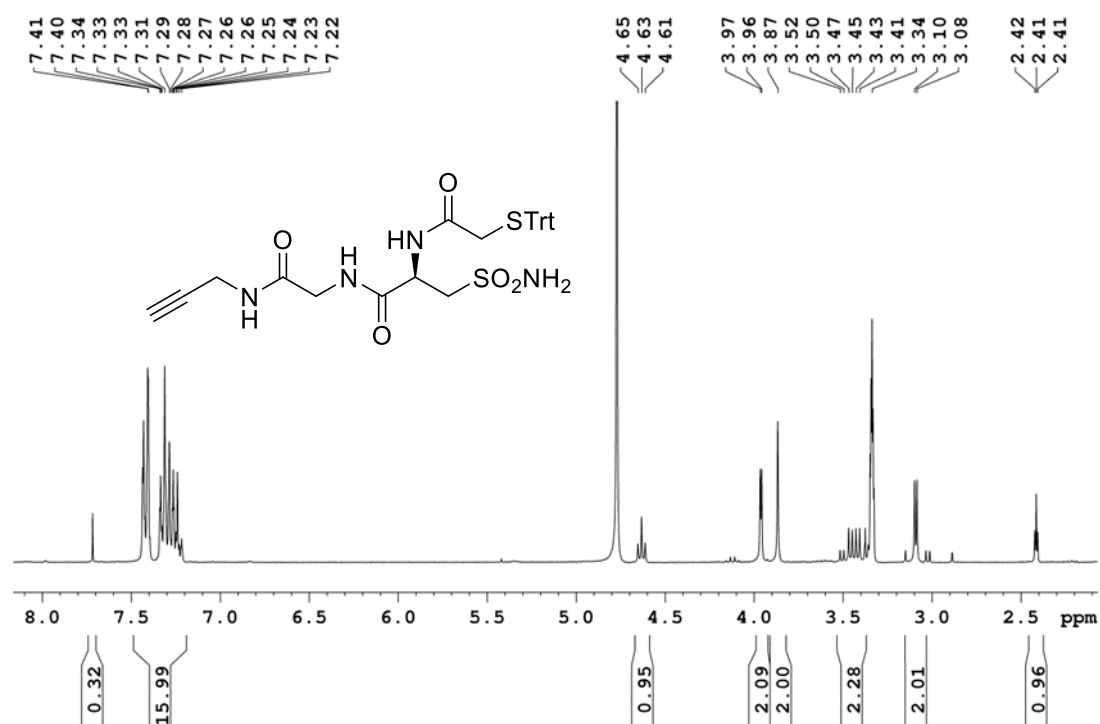
Anhang 34: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von *S*-Tryptlylmercaptoessigsäure **199** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



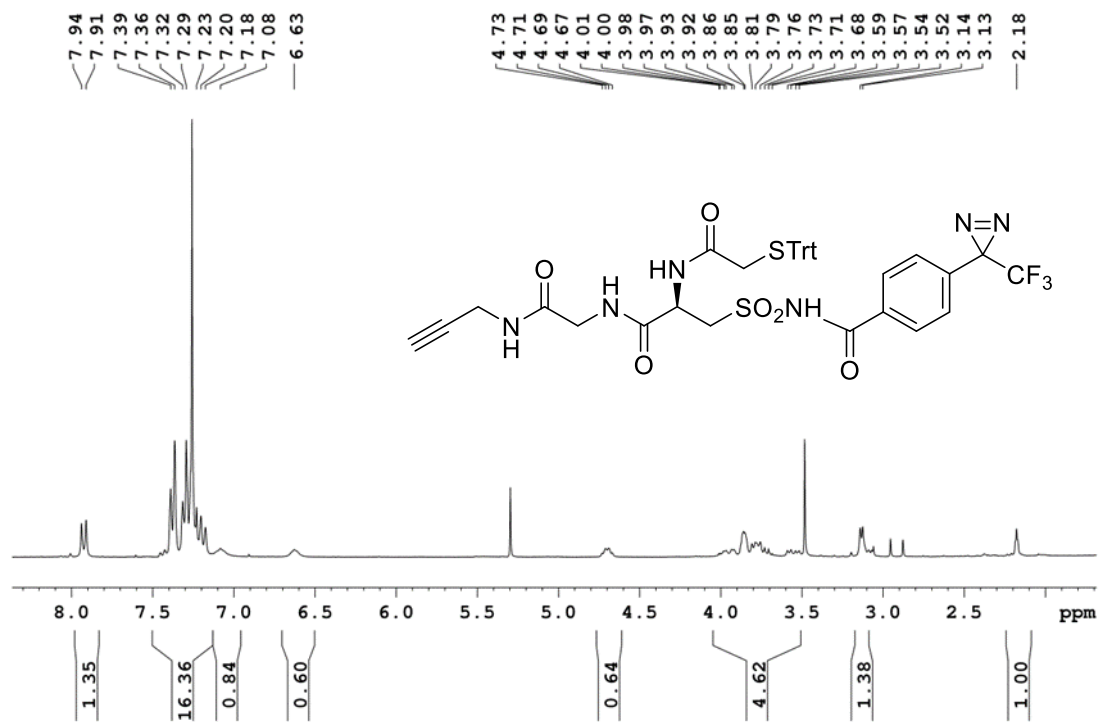
Anhang 35: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Amid 146 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



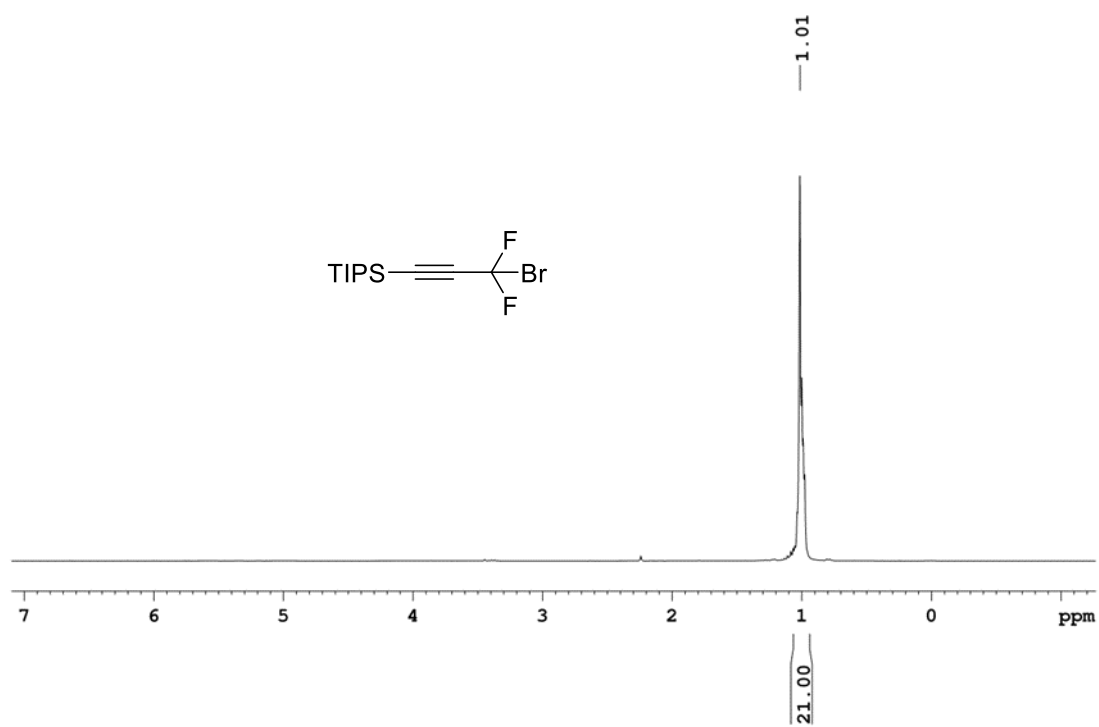
Anhang 36: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Amid 146 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



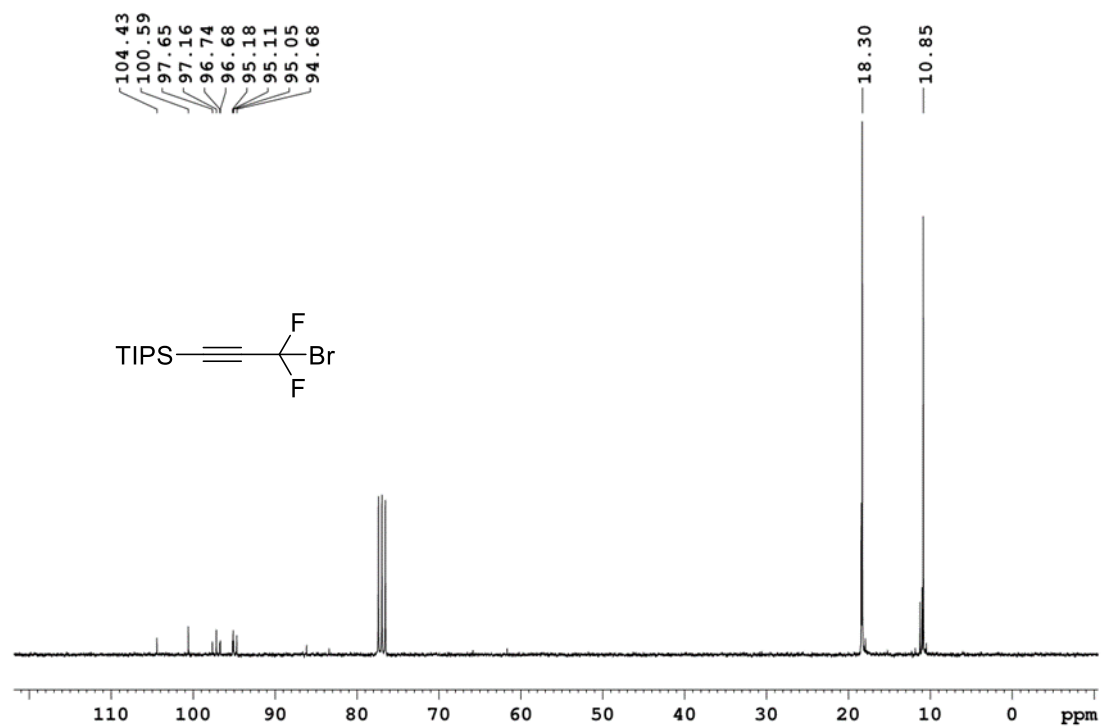
Anhang 37:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Propargylamid **148** (300 MHz,  $\text{MeOD-}d_4$ ).



Anhang 38:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Acylsulfonsäureamid **149** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

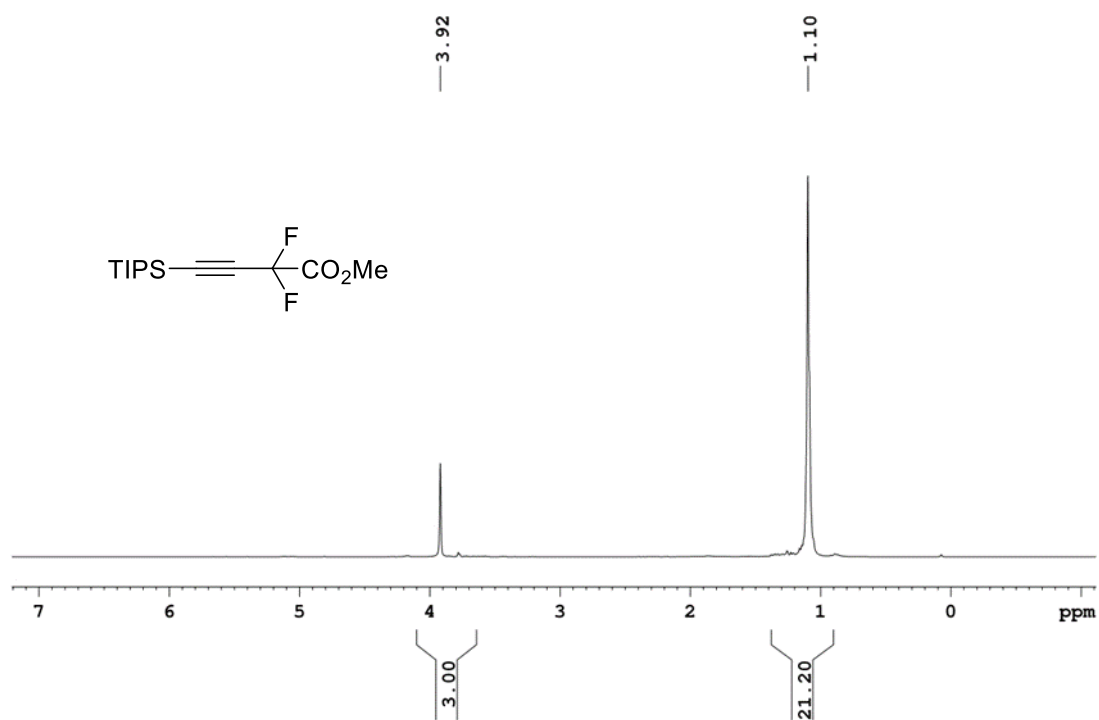


Anhang 39:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Propargylbromid **152** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

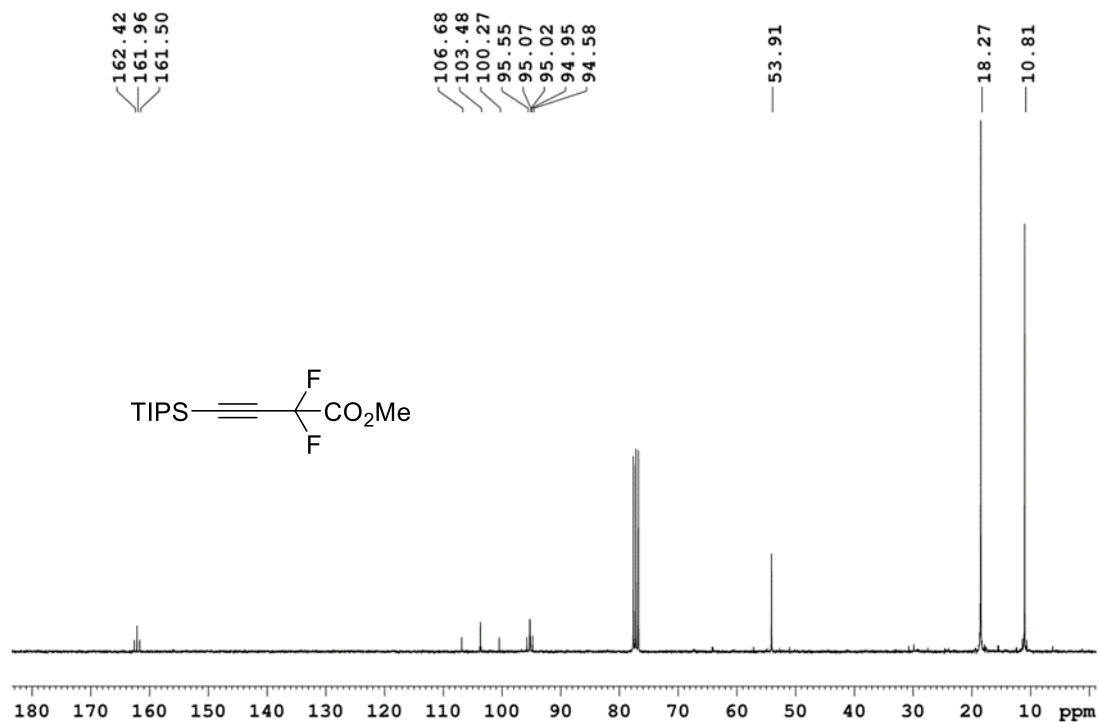


Anhang 40:  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum von Propargylbromid **152** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

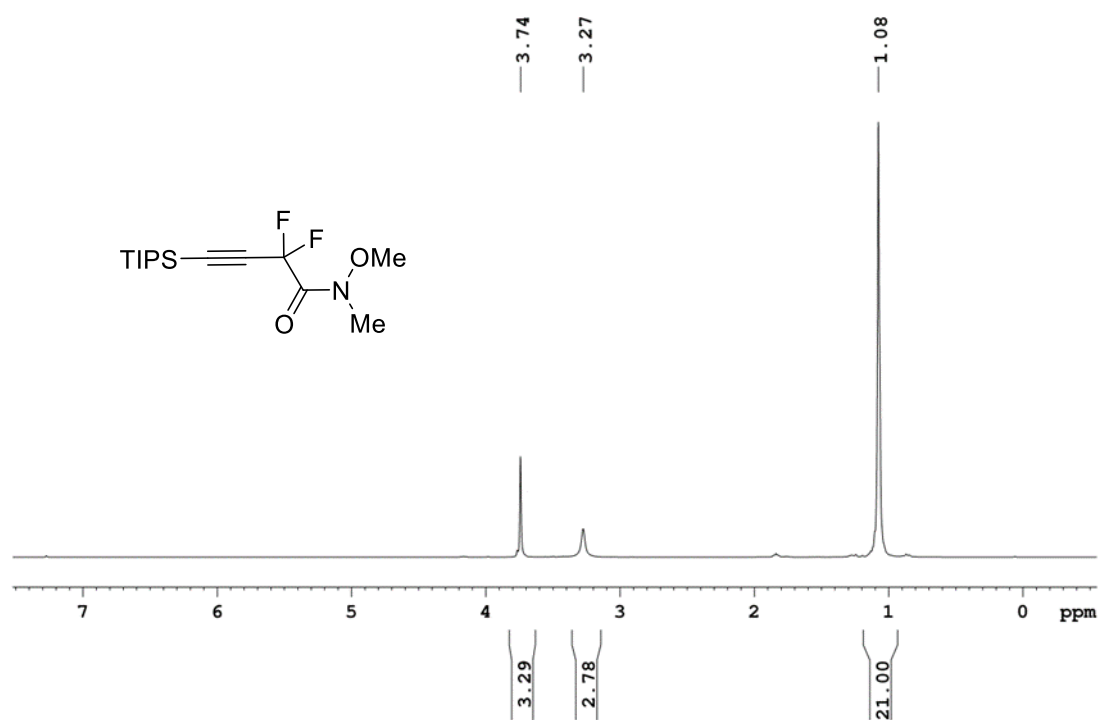




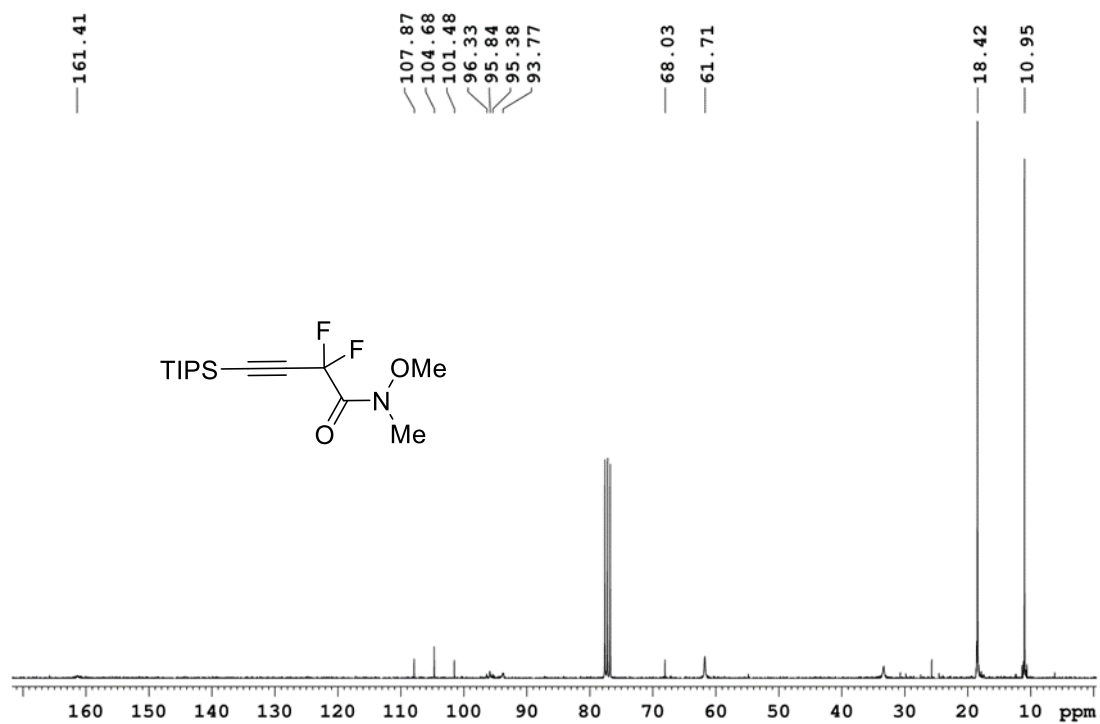
Anhang 41:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Ester **153** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



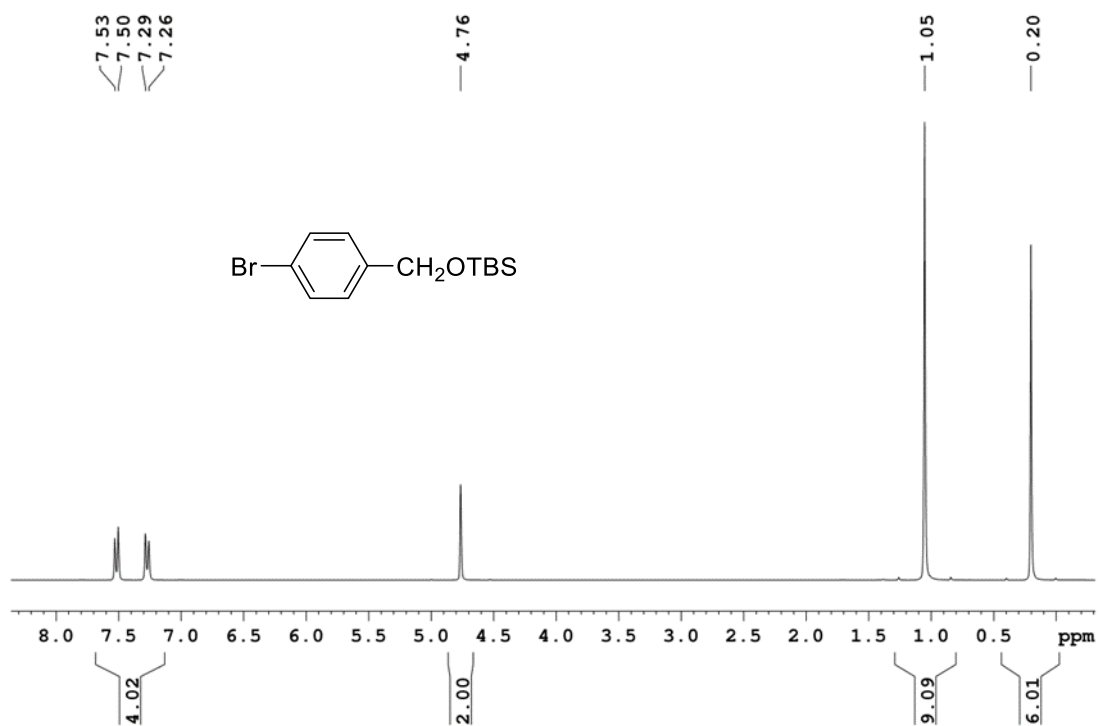
Anhang 42:  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum von Ester **153** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



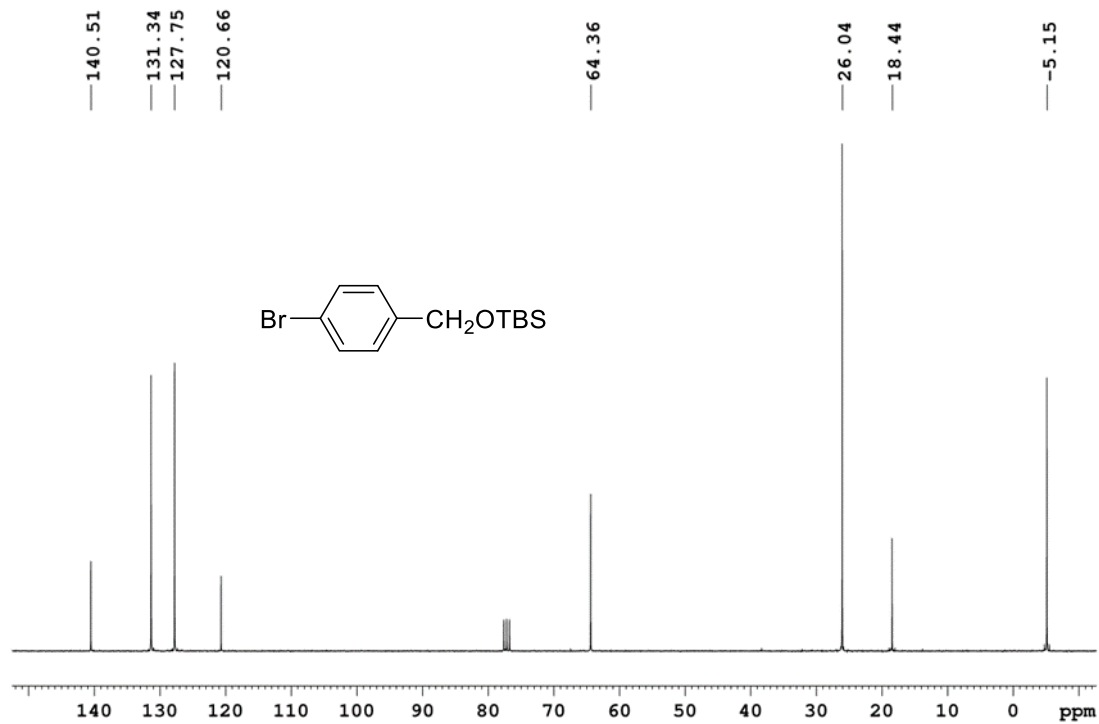
**Anhang 43:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Weinreb-Amid **117** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



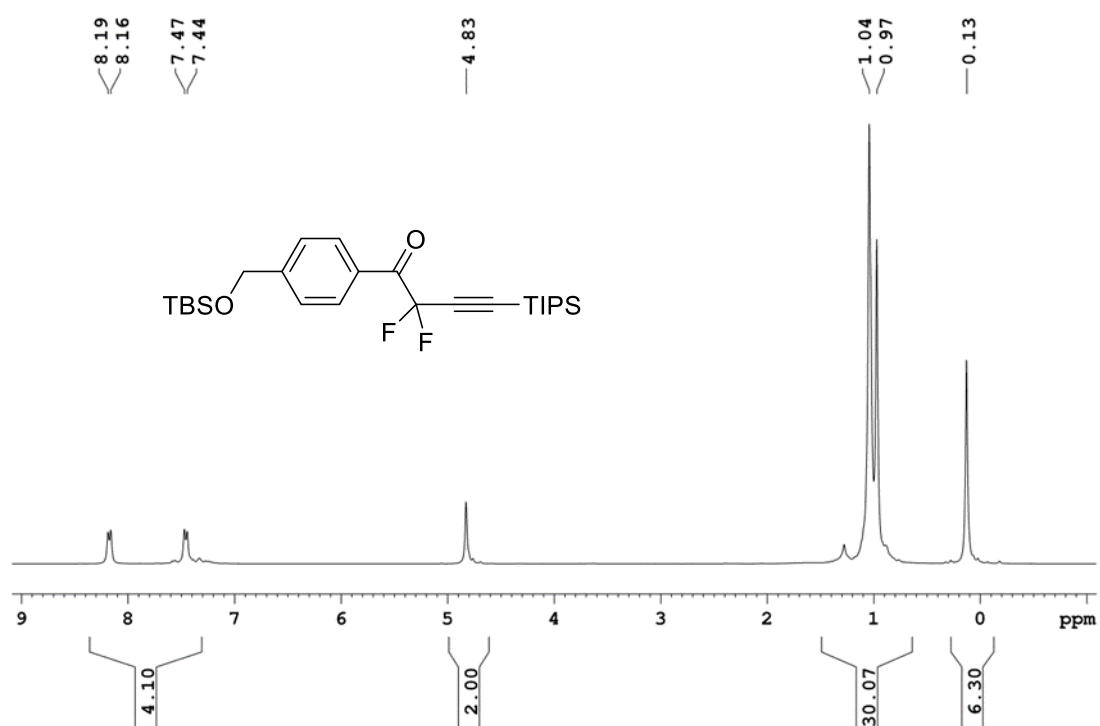
**Anhang 44:** <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Weinreb-Amid **117** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



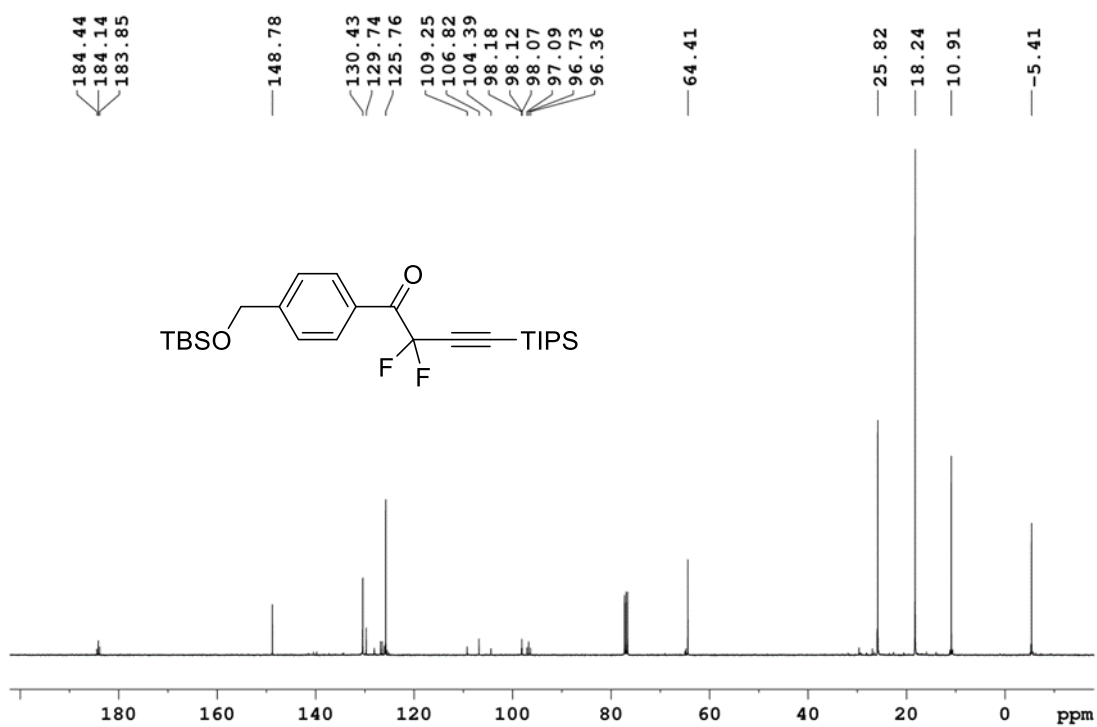
Anhang 45: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Silylether **116** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Anhang 46: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Silylether **116** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

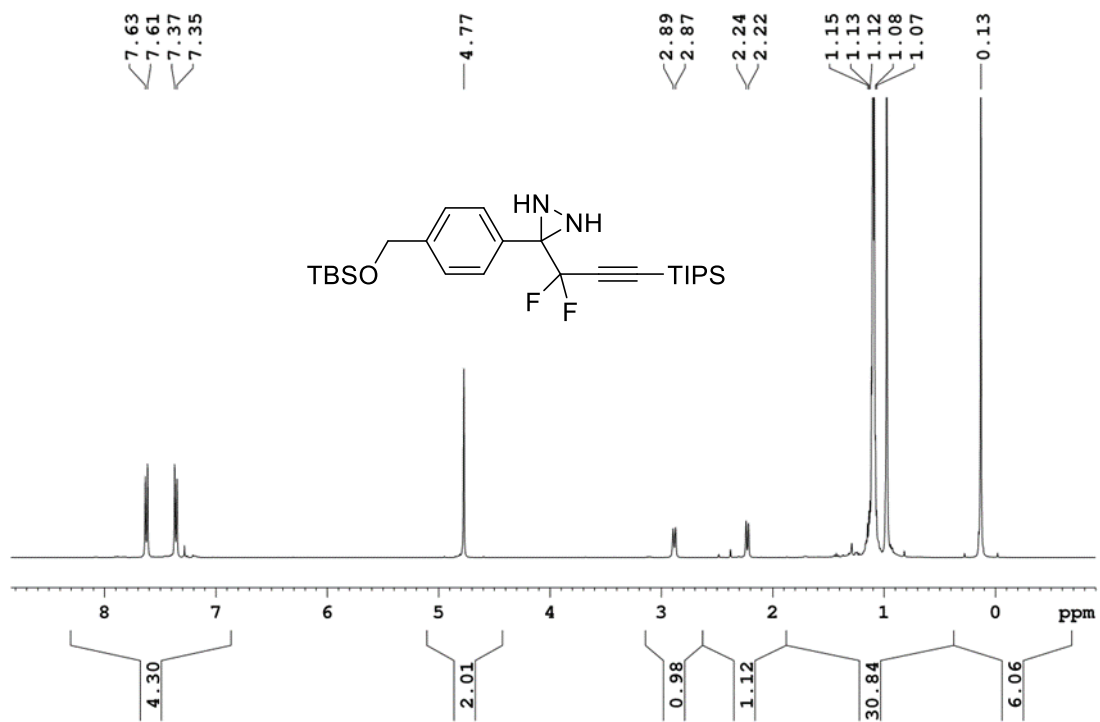


Anhang 47: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Keton **115** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

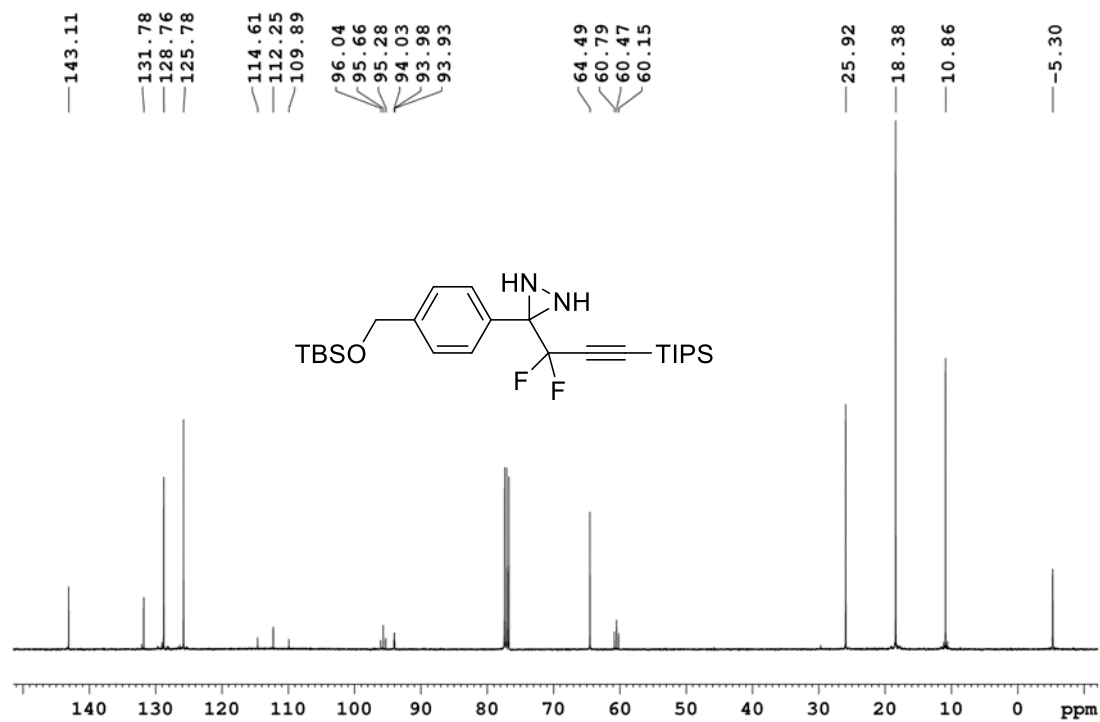


Anhang 48: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Keton **115** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

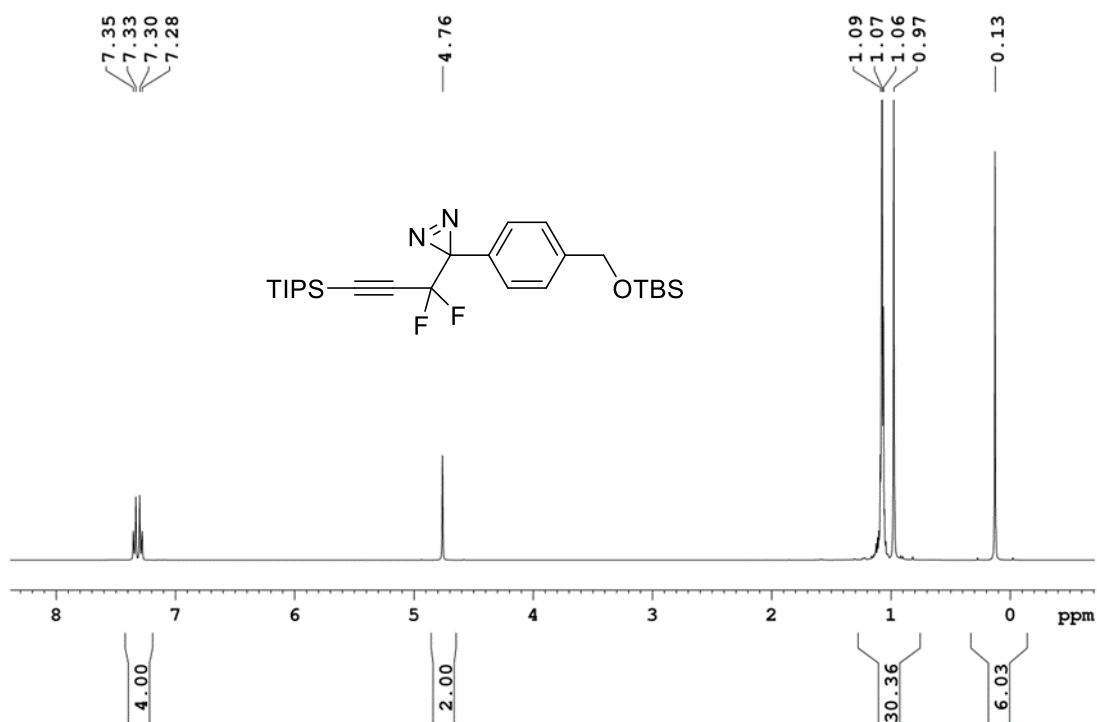




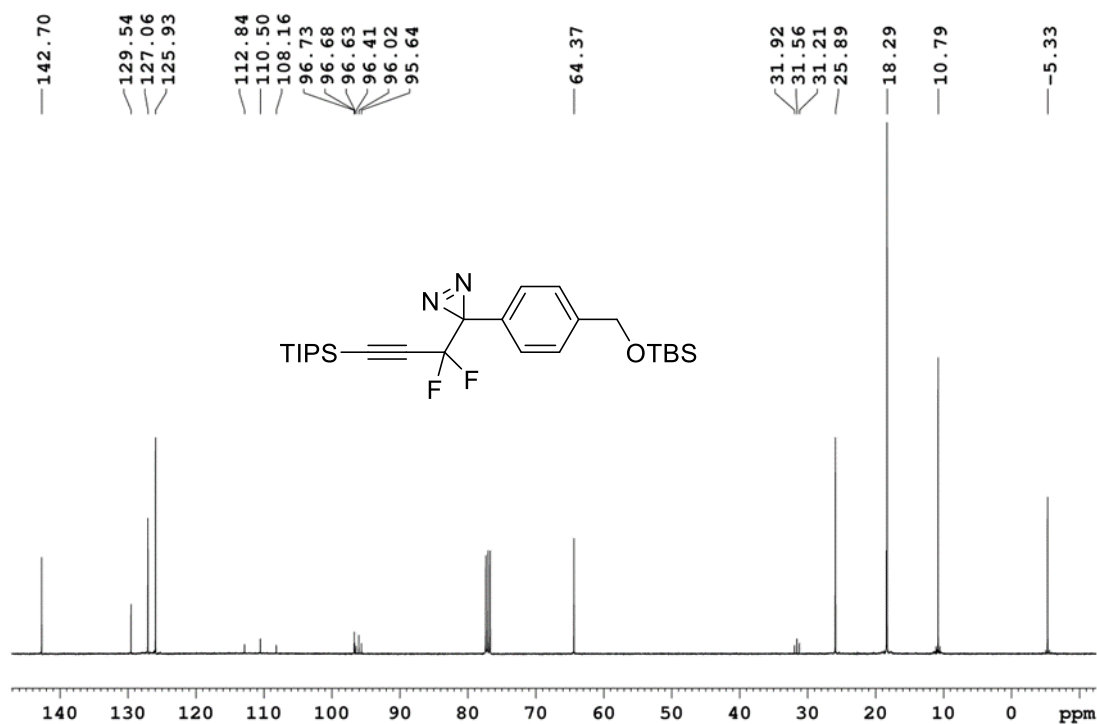
Anhang 51: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Diaziridin **114** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



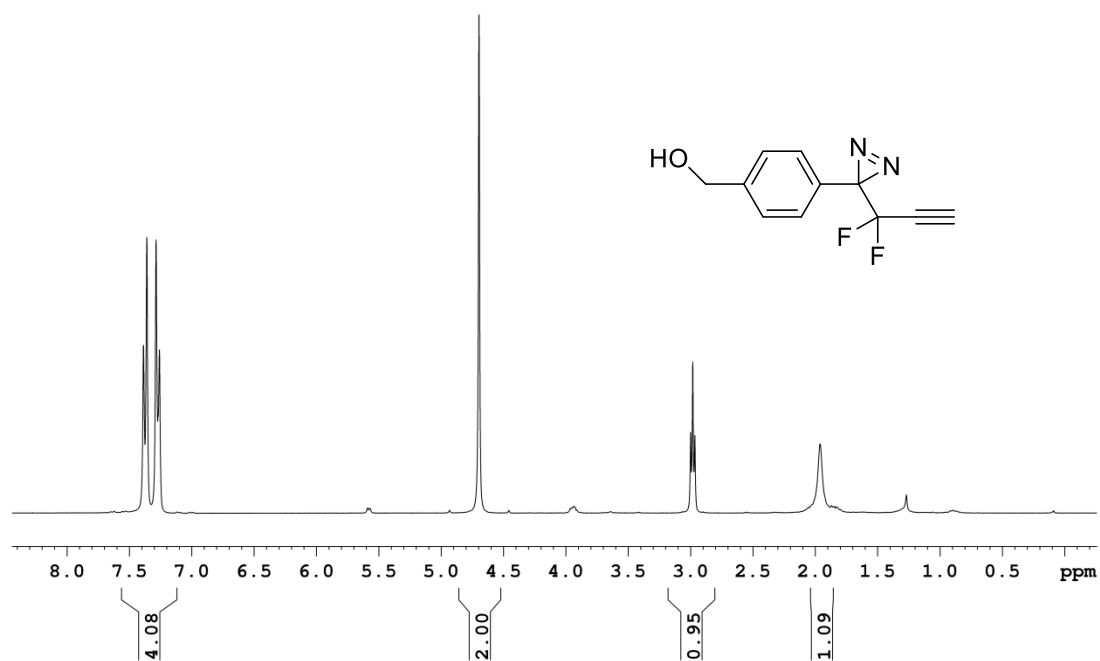
Anhang 52: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diaziridin **114** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



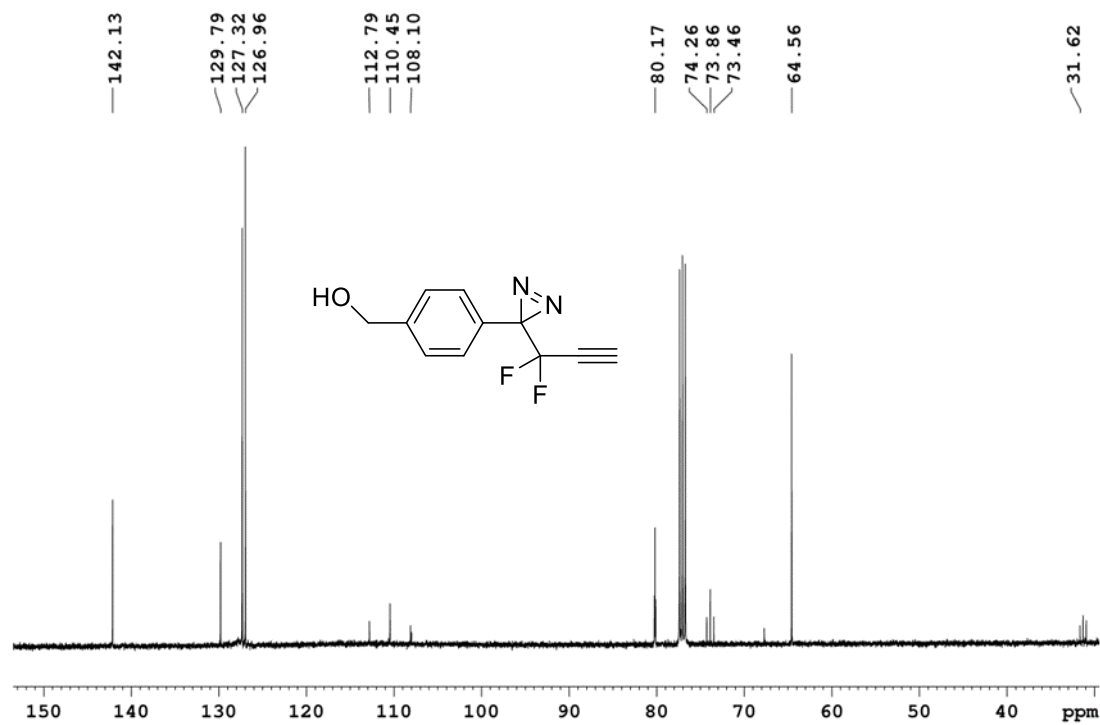
Anhang 53: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Diazirin **157** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Anhang 54: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Diazirin **157** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

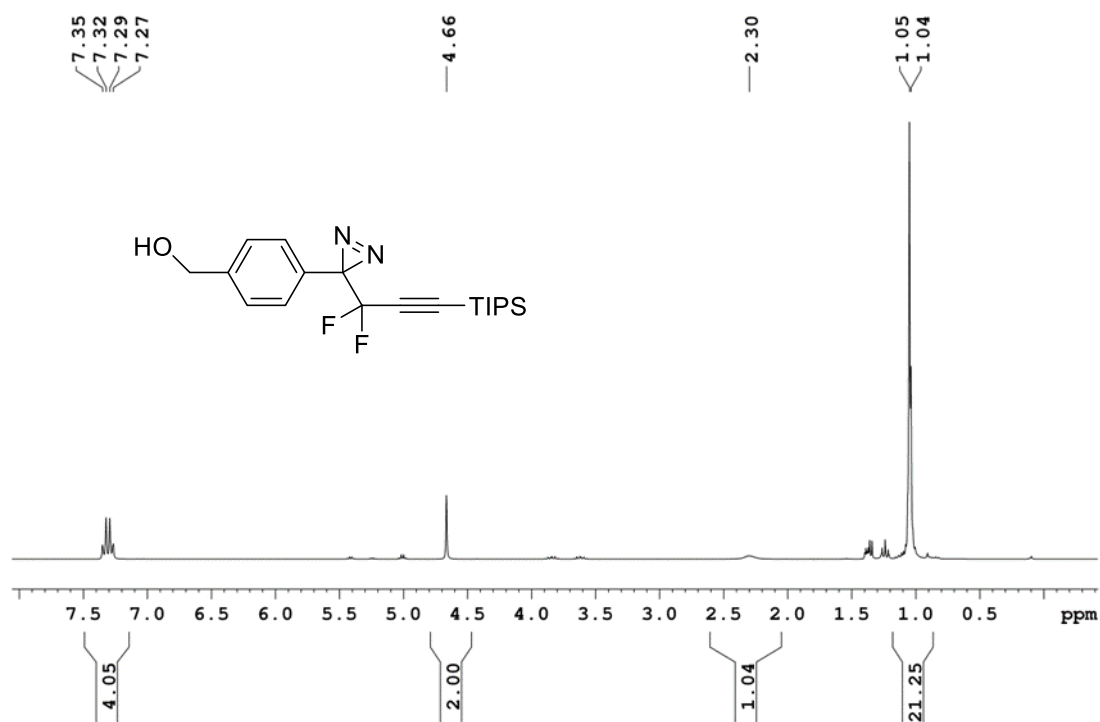


Anhang 55:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Alkin **164** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

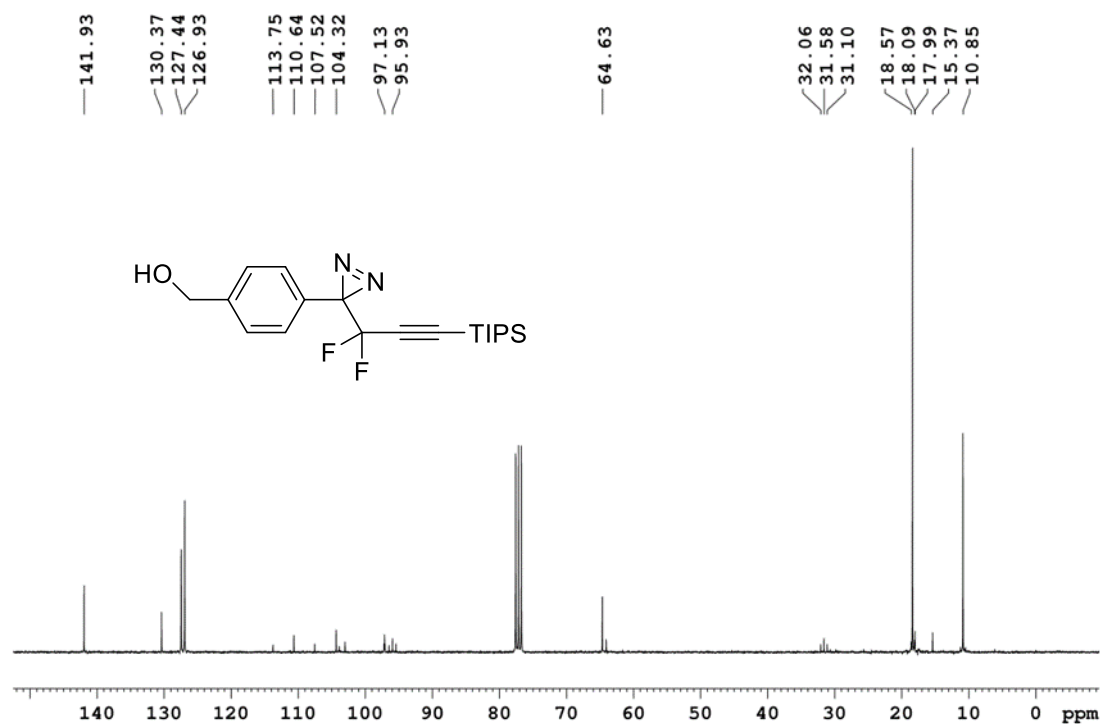


Anhang 56:  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum von Alkin **164** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

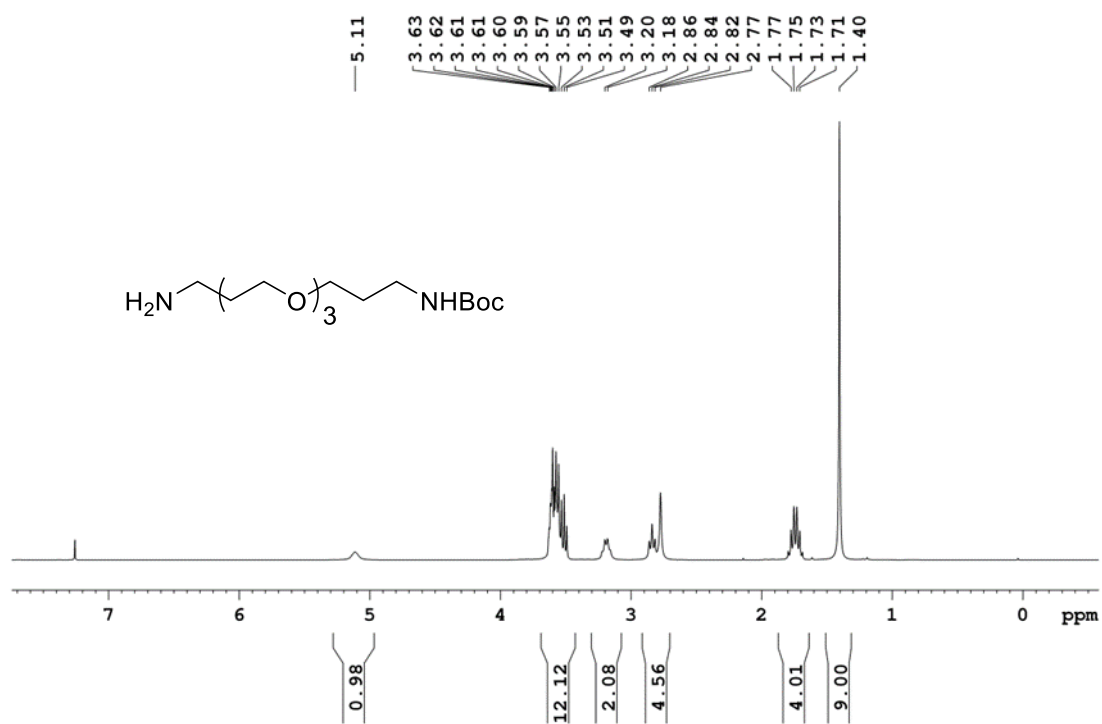




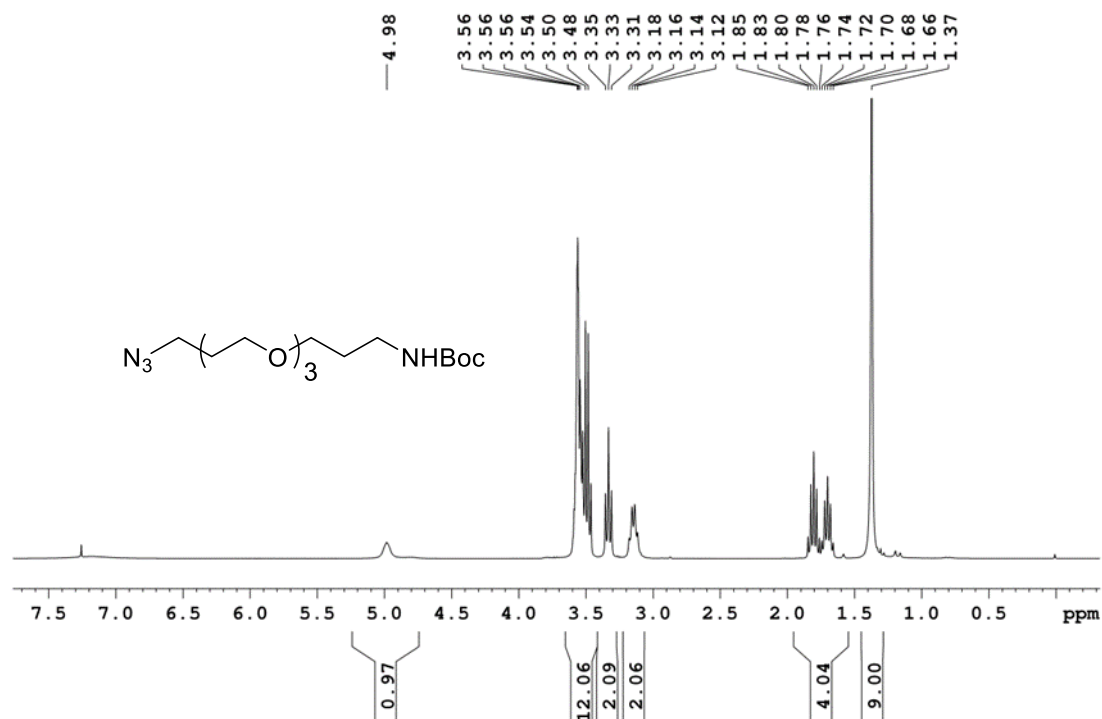
Anhang 57: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Alkohol **165** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



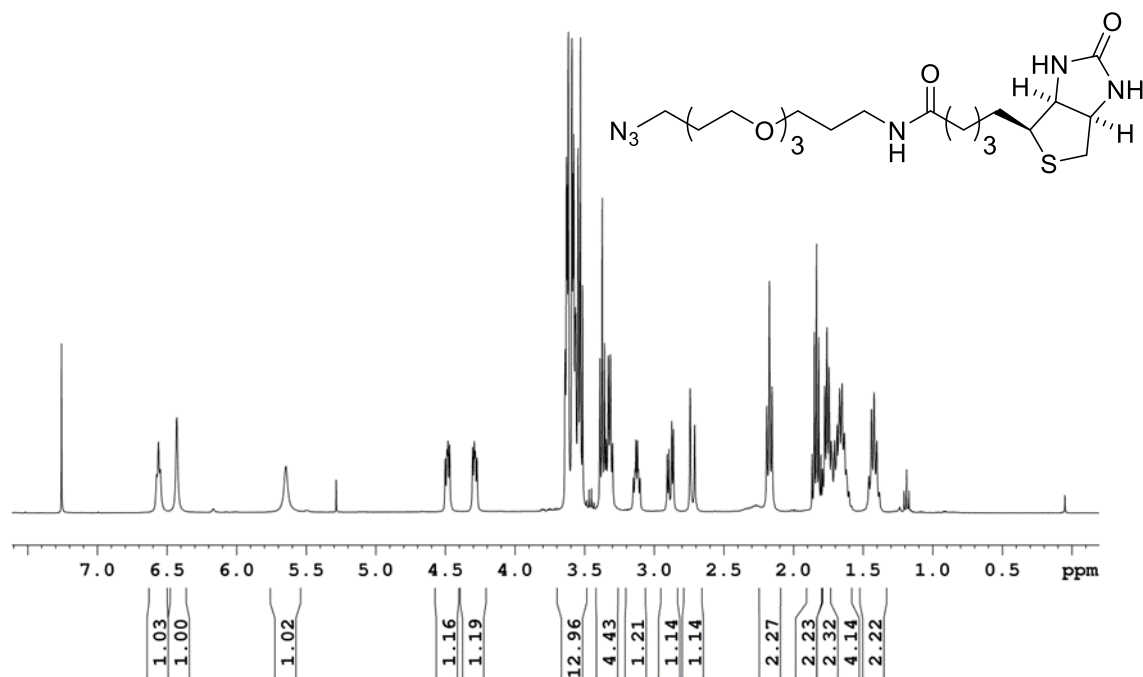
Anhang 58: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Alkohol **165** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



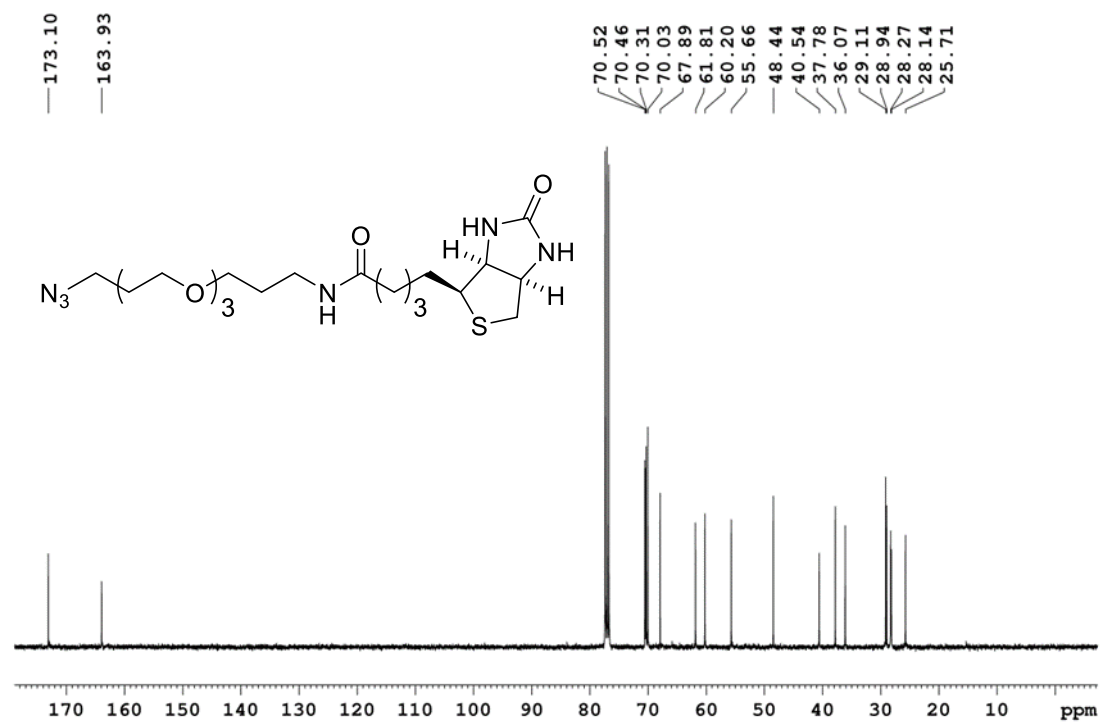
Anhang 59: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Amin 169 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



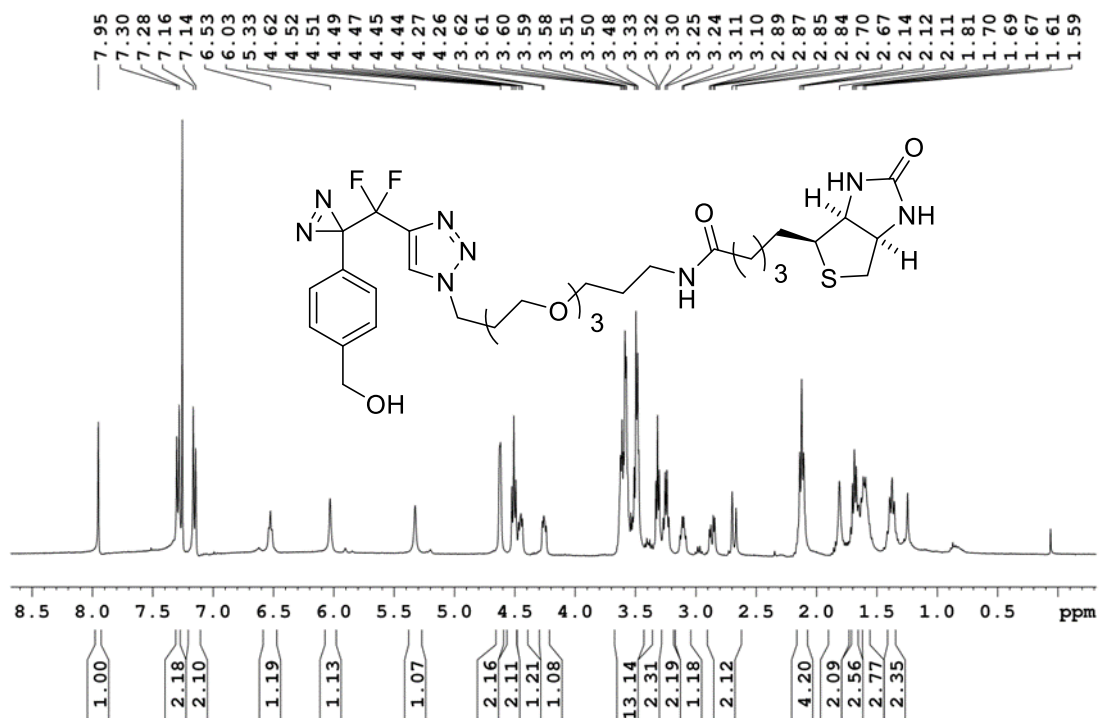
Anhang 60: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Azid 170 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



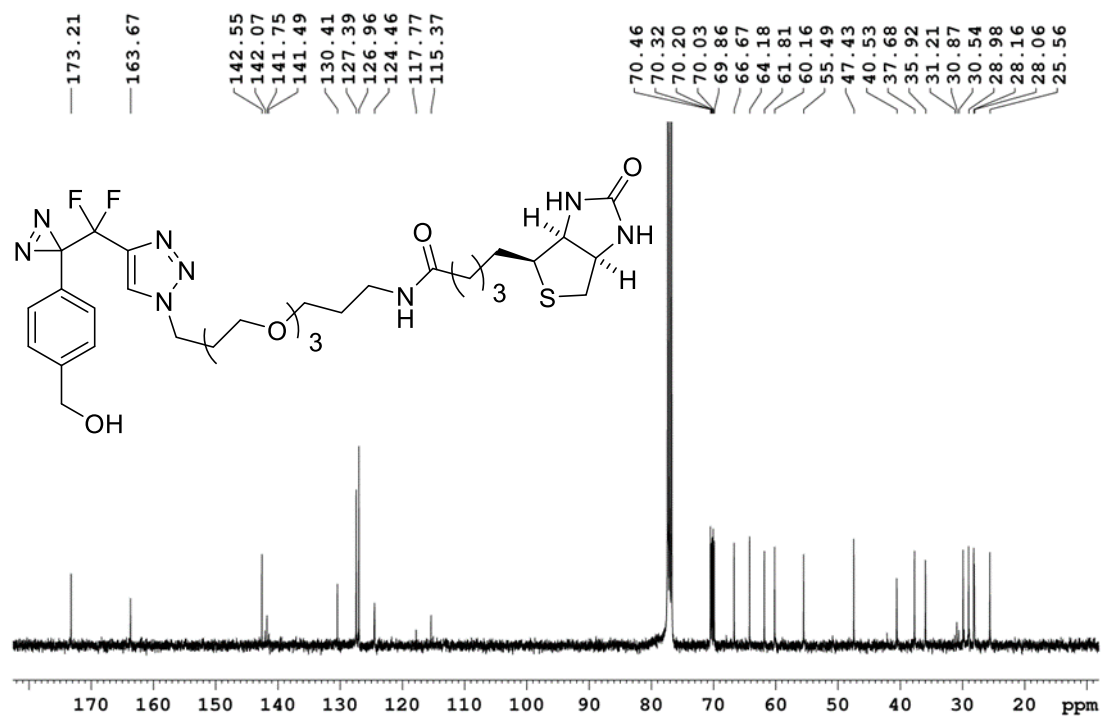
Anhang 61: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Biotin-PEG-Azid **172** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



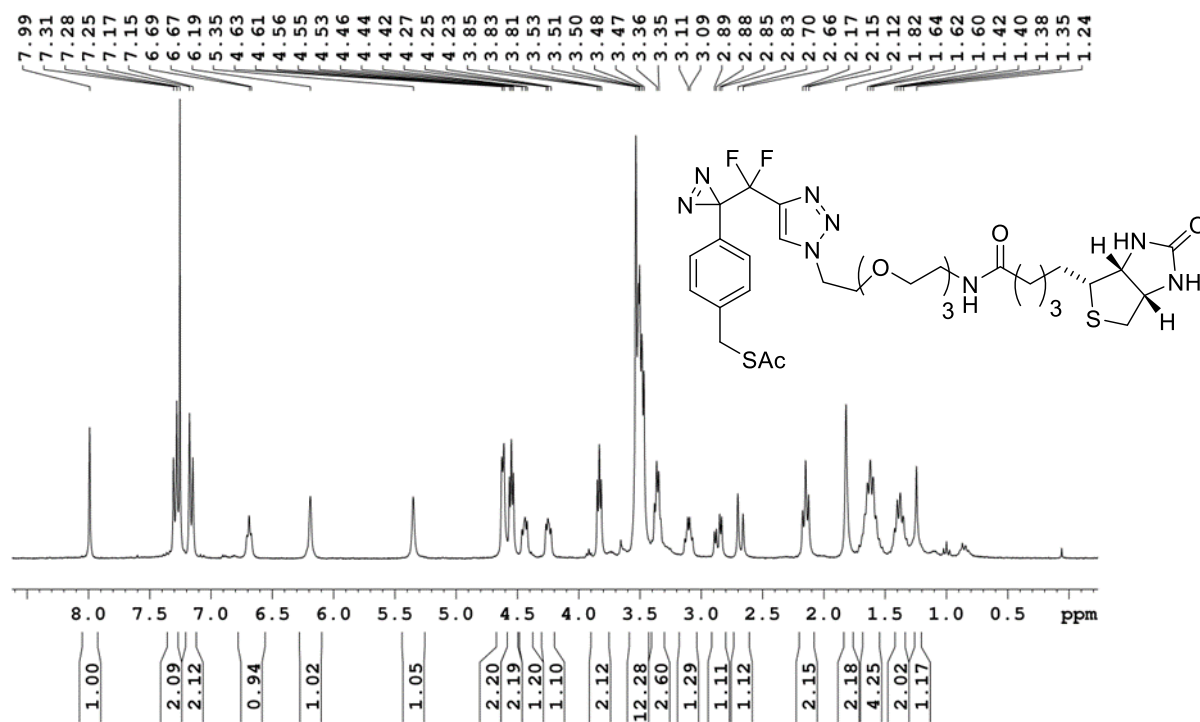
Anhang 62: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Biotin-PEG-Azid **172** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



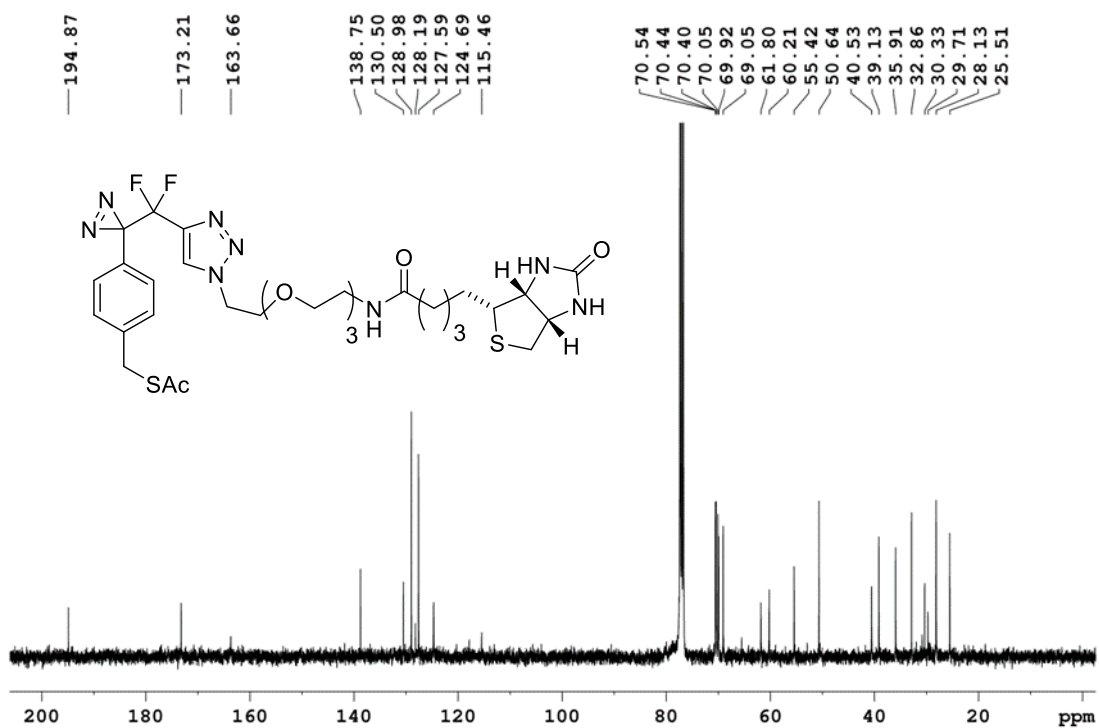
Anhang 63: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Alkohol **173** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



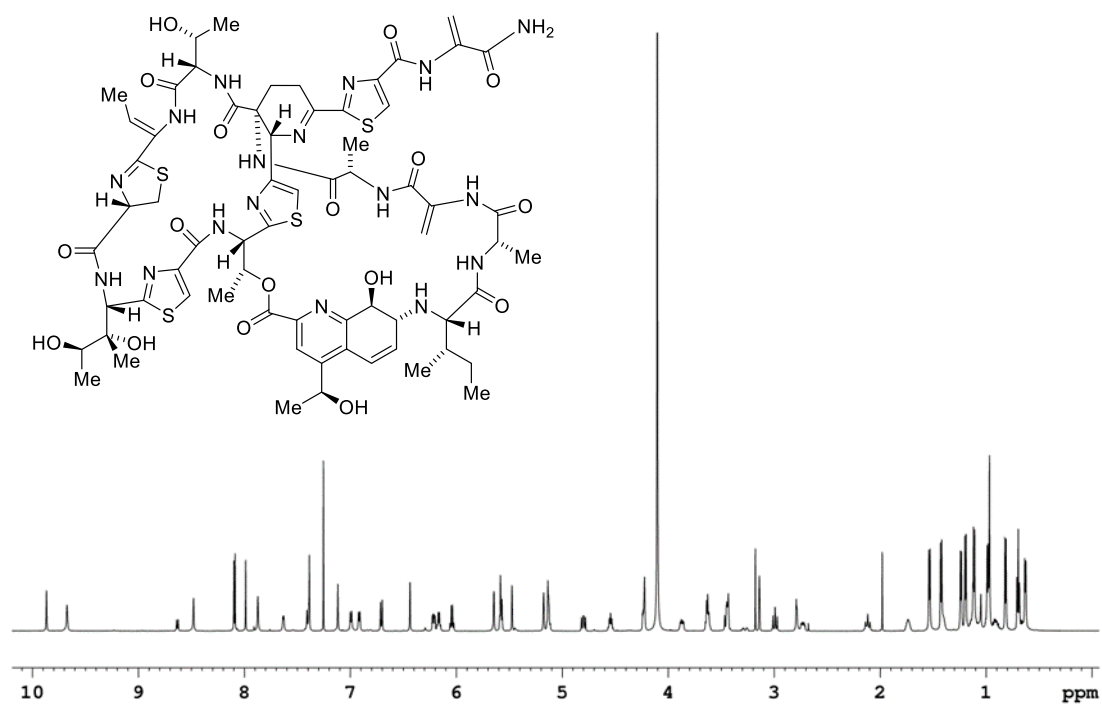
Anhang 64: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Alkohol **173** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



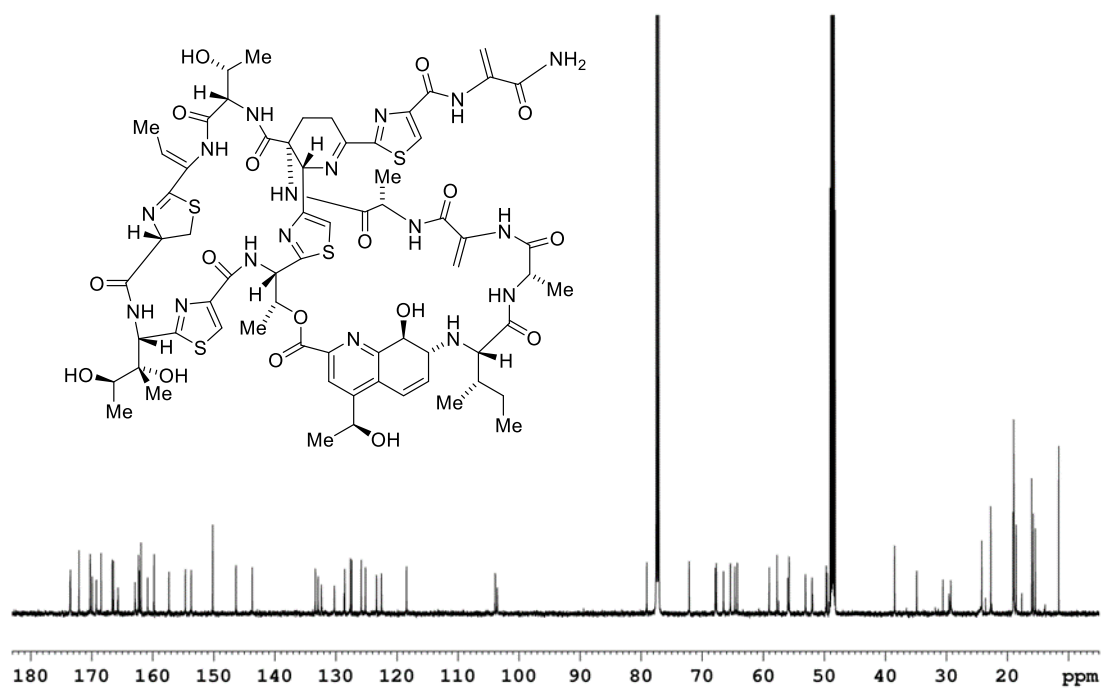
Anhang 65:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Thioester 175 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



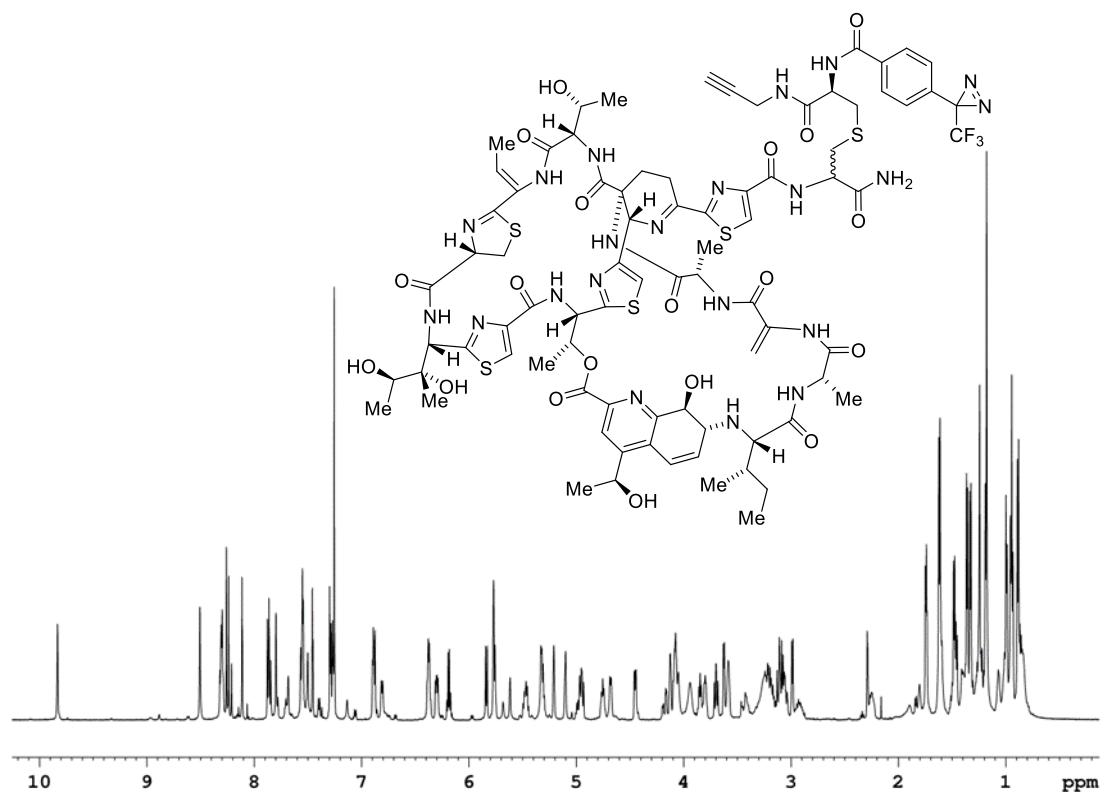
Anhang 66:  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Thioester 175 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



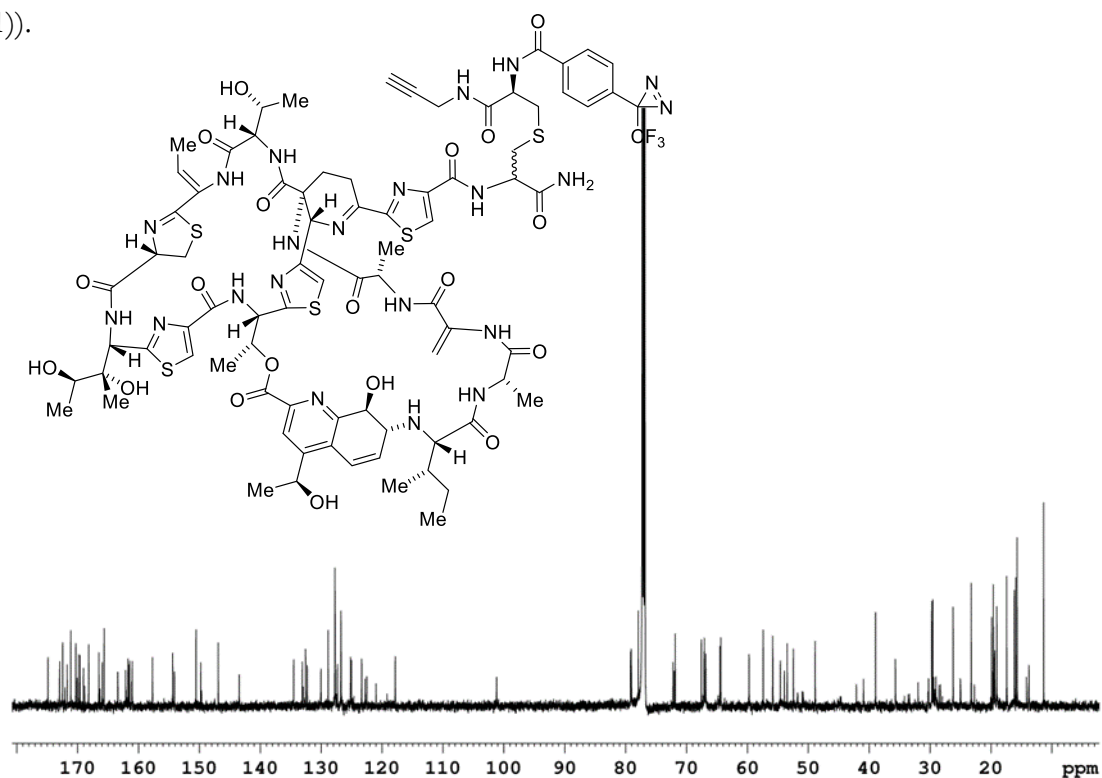
**Anhang 67:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Thiostrepton-Derivats **99** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).



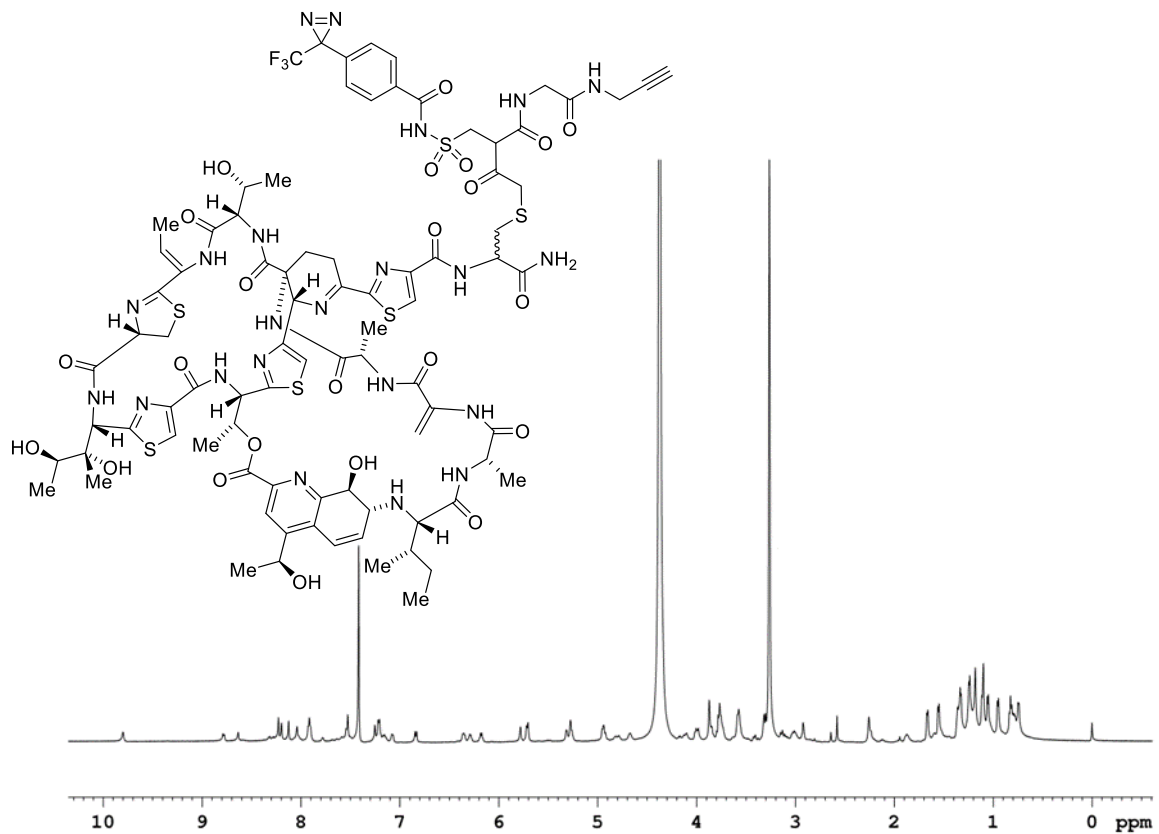
**Anhang 68:**  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum des Thiostrepton-Derivats **99** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).



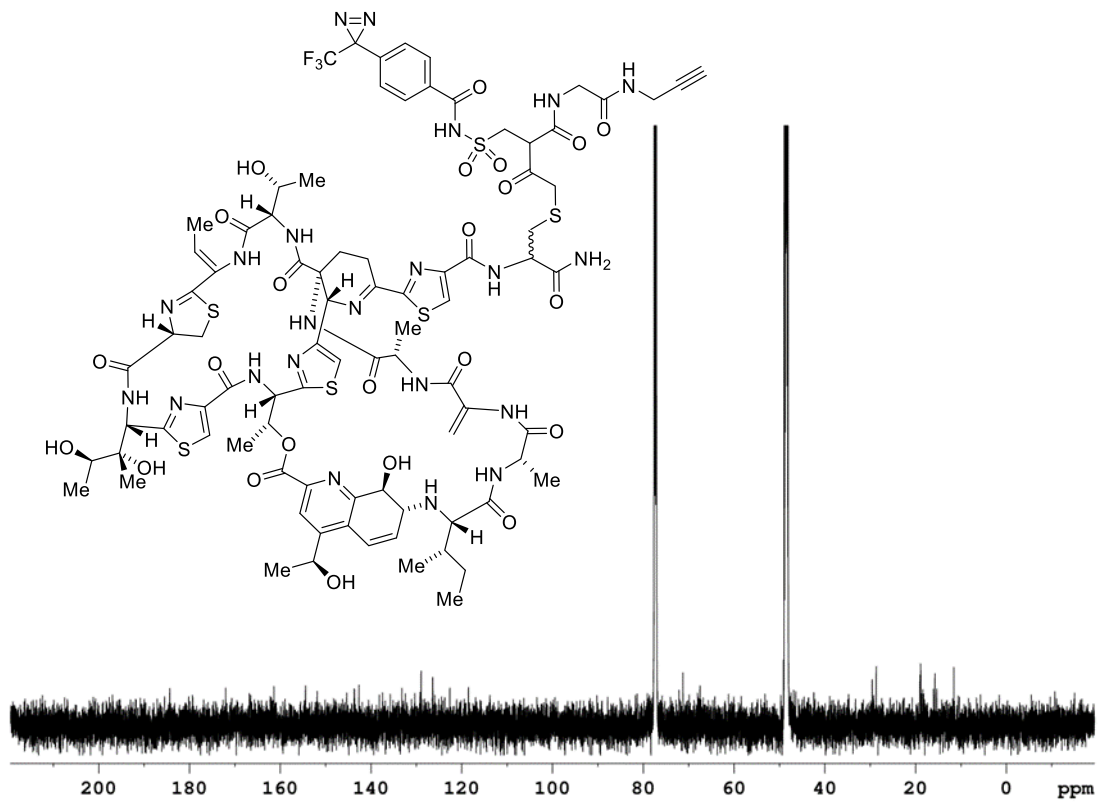
**Anhang 69:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **129** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).



**Anhang 70:**  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **129** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).

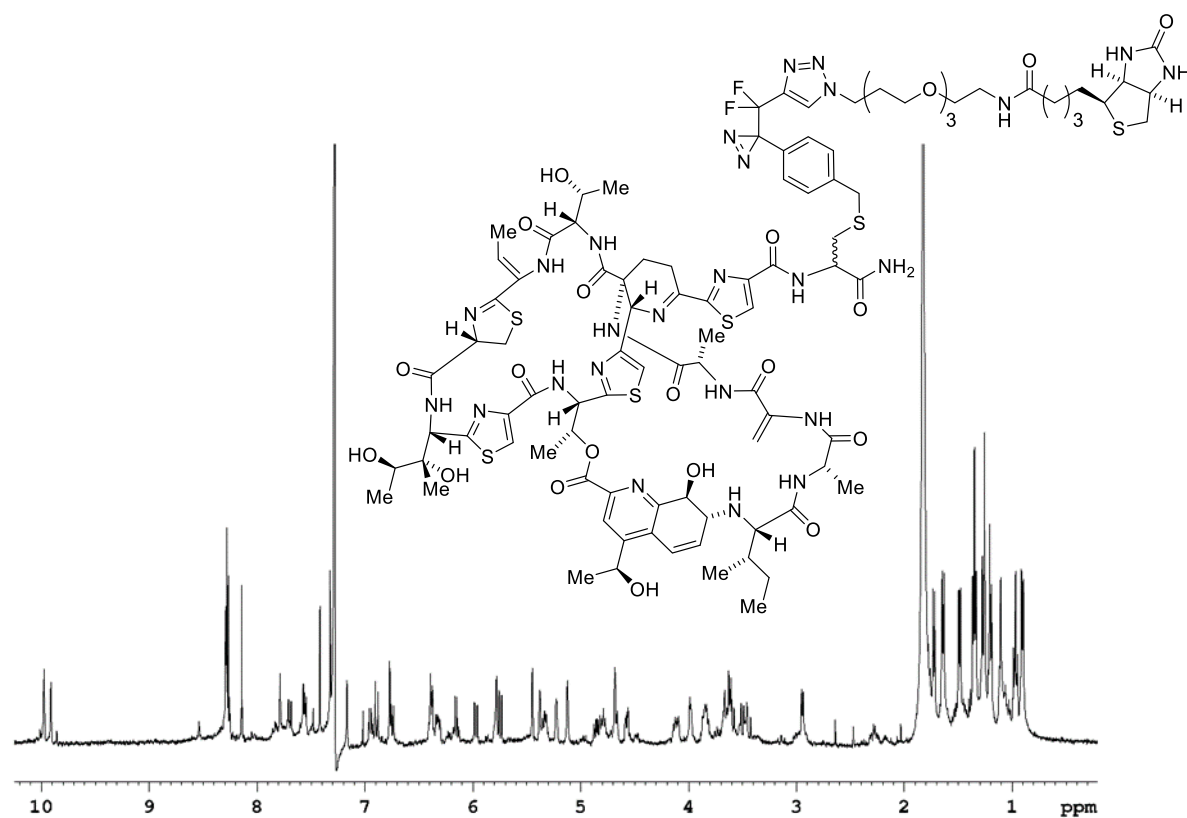


**Anhang 71:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **151** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*<sub>4</sub> (4:1)).

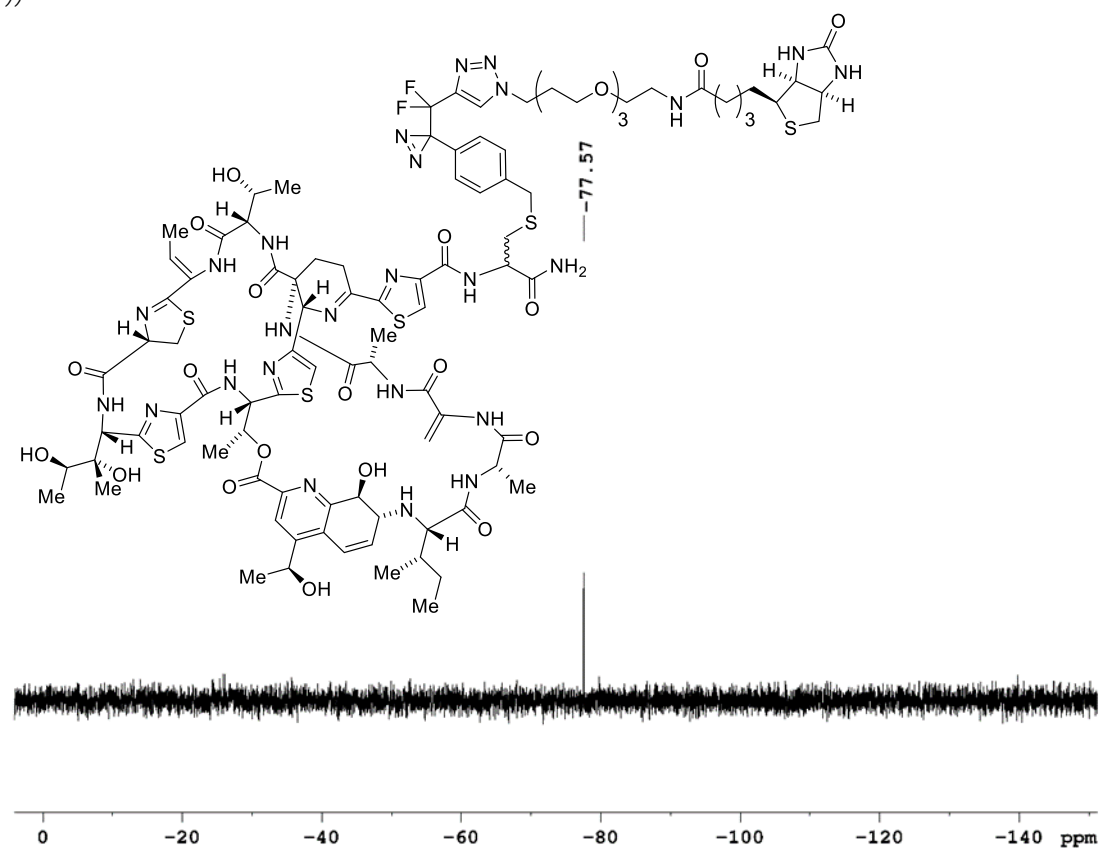


**Anhang 72:** <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **151** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD-*d*<sub>4</sub> (4:1)).





**Anhang 73:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **177** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).



**Anhang 74:** Proton-entkoppeltes  $^{19}\text{F-NMR}$  Spektrum von Thiostrepton-PAL-Sonde **177** (188.2 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD-}d_4$  (4:1)).



## 10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt für eine anspruchsvolle Aufgabenstellung, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die großen konzeptionellen Freiheiten beim Ausführen dieses Projektes, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowohl in Dortmund als auch in Jena. Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt gab mir die Möglichkeit, als Biochemiker synthetisch zu arbeiten und unterstützte mich auf diesem Weg mit Geduld, konstruktiver Kritik und steter Gesprächsbereitschaft. Ich habe in den vergangenen Jahren unter seiner Leitung sehr viel gelernt und bin ihm dafür sehr dankbar.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Georg Pohnert für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, sowie bei allen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihre Zeit und ihr Interesse an dieser Arbeit.

Den Kollegen im AK Arndt und im AK Vilotijević danke ich für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre, sowie für die große Hilfsbereitschaft im und außerhalb des Labors. Ein ganz besonderer Dank sei an dieser Stelle Dr. Cyril Ronco, Sebastian Schwenk, Dr. Kirtikumar Jadhav, Richard Nohl, Philip Wojtas und Dr. Patrick Loos ausgesprochen. Danke für eure Unterstützung im Labor, für die Geduld, wenn ich – mal wieder – vergessen hatte eine Chemikalie zurückzubringen und für die vielen lustigen Abende in Jena.

Für ihre tatkräftige Mitwirkung an diesem Projekt danke ich Angelika Güther, Dr. Cyril Ronco, Martina Sattler, Robert Freund, Louis Papa, Sara Madzgalla, Isabella Hoppler und Veselin Nasufovic.

Dr. Wolfgang Günther, Gabriele Sentis, Dr. Peter Bellstedt, Thomas Winkler und Chantsalma Berthold danke ich für ihre freundliche und engagierte Mithilfe in allen analytischen Belangen.

Ein besonderer Dank geht an meine Bürokollegen der vergangenen acht Monate Sebastian Schwenk und Philip Wojtas für ihre Unterstützung beim Schreiben dieser Doktorarbeit, sei es durch Korrekturlesen, durch „IT-Support“ (danke Sebastian für deine sehr große Hilfe bei den Docking-Studien!), oder durch ein Paar motivierende Worte.

Mein ganz spezieller Dank gilt natürlich meiner Familie: meinen Eltern, Abdelaziz und Nabiha, meinen Brüdern, Sami und Slim. Ob im Studium oder in der Promotion, ihr habt

mich immer unterstützt, mich mit liebenden Worten motiviert, wart für mich da, wenn ich nicht weiterwusste. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Tiefempfundenen Dank möchte ich ebenfalls meiner Schwiegerfamilie Sandy, Dietmar, Fred und Julia aussprechen. Ich danke euch dafür, dass ihr mich in eurem Kreis aufgenommen habt, für den Rückhalt und die konstante Unterstützung, die wir in den letzten Jahren von euch erfahren haben.

Liebe Lisa, ich danke dir von ganzem Herzen für deine wertvolle, unentbehrliche Unterstützung der letzten fünf Jahre. Du hast mir immer den Rücken freigehalten, auch wenn es bedeutete, dass du deine eigenen Ziele benachteiligen musstest. Ohne deinen starken Rückenwind, deine aufmunternden Worte und deine unermüdliche Unterstützung wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Habe vielen, vielen Dank.

## 11 Selbstständigkeitserklärung

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

Jena, den 8 März 2017.

Sabri Chihra

