

Synthese von Boronsäurederivaten als Modulatoren für Proteasen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Timon Mönig

geboren in Dortmund

Fakultät Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2008 bis Februar 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kaiser am Institut für Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 04.06.2014

Gutachter: Prof. Dr. M. Kaiser
Prof. Dr. C. Schmuck
Vorsitzender: Prof. Dr. S. Schlücker

Während dieser Arbeit sind folgende Publikationen erschienen, die teilweise Inhalte dieser Dissertation enthalten:

L. Trübstein, A. Tennstaedt, T. Mönig, T. Krojer, F. Canellas, M. Kaiser, T. Clausen, M. Ehrmann (2011) „Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HtrA1 activity” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 386.

J. Weski, M. Meltzer, L. Spaan, T. Mönig, J. Oeljeklaus, P. Hauske, L. Vouilleme, R. Volkmer, P. Boisguerin, D. Boyd, R. Huber, M. Kaiser, M. Ehrman (2012) Chemical biology approaches reveal conserved features of a C-terminal processing PDZ protease *ChemBioChem* 13, 402.

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	7
2.	<i>Theoretische Grundlagen</i>	9
2.1	Biologische Funktionen von Proteasen	9
2.2	Serinproteasen	12
2.2.1	HtrA Proteasen	13
2.3	Übersicht über verschiedene Vertreter der HtrA-Proteasefamilie und weitere, in dieser Dissertation bearbeitete Proteasen	15
2.3.1	DegS	15
2.3.2	DegP	16
2.3.3	HtrA1	18
2.3.4	Tsp-Protease	18
2.3.5	CPAF	19
2.4	Enzyminhibitoren	21
2.5	Peptidylboronsäuren als Proteaseinhibitoren	23
2.6	Synthese von Aminoboronsäuren	29
2.6.1	Synthese von α -Aminoboronsäuren über α -Haloboronsäureester	29
2.6.1.1	Geschichte und Entwicklung der Chemie der α -Haloboronsäureester	29
2.6.1.2	Synthese der α -Aminoboronsäuren	39
2.6.1.3	Weitere Anwendungen	40
2.6.2	Weitere Synthesen von α -Aminoboronsäuren	43
2.7	Festphasensynthese	45
3.	<i>Zielsetzung</i>	50
4.	<i>Ergebnisse</i>	53
4.1	C-terminal mit einer Aminoboronsäure modifizierte Peptide	53
4.1.1	Vorarbeiten	53
4.1.2	Synthese der Aminoboronsäuren	54
4.1.3	Peptidsynthese an der festen Phase	57
4.1.4	Kupplung der Aminoboronsäure	61
4.1.5	Bestimmung der DegP-Hemmwirkung	63
4.1.6	Inhibition von HtrA1	64
4.1.7	Cokristallisation von HtrA1 mit DPMFKL-BoroV	65
4.1.8	Neue rational-entworfenen Boronsäureinhibitoren	68
4.1.9	Testung der Peptidboronsäurenbibliothek auf DegP-Hemmung	72
4.1.10	Hemmung der Tsp-Protease	73
4.1.11	Hemmung von Elastase	74
4.1.12	Hemmung von DegS	75
4.1.13	Hemmung der CPAF-Protease	76

4.1.14	Neue Inhibitoren für CPAF	79
4.1.15	Boronsäureinhibitoren mit Fluorophoren	83
4.2	Entwicklung cyclischer Boronsäureester als neuartige Inhibitoren der Serinproteasen	85
4.2.1	Einleitung	85
4.2.2	Retrosynthese des anvisierten Boronsäureester-Cyclodepsipeptids	88
4.2.3	Synthese des Dipeptids	90
4.3	Kahalalide F	97
4.3.1	Einleitung	97
4.3.2	Synthese von Kahalalide F	98
4.3.3	Biologische Untersuchungen mit Kahalalide F	101
4.3.4	Synthese einer Rhodaminsonde von Kahalalide F	103
4.3.5	Biologische Aktivität der Rhodaminsonde von Kahalalide F	105
5.	Zusammenfassung und Ausblick	108
6.	Experimenteller Teil	114
6.1	Allgemeines	114
6.1.1	Reagenzien	114
6.1.2	Dünnschichtchromatographie	114
6.1.3	Präparative Säulenchromatographie	114
6.1.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gekoppelte Elektronen-sprayionisations-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	114
6.1.5	Präparative Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	115
6.1.6	Gefriertrocknung	115
6.1.7	Kernspinresonanzspektroskopie	116
6.2	Synthese der C-terminal mit einer Boronsäure modifizierten Peptide	117
6.2.1	Synthese des (+)-Pinandiolisopropylboronsäureesters 71	117
6.2.2	Synthese des (-)-Pinandiolisopropylboronsäureesters D-71	117
6.2.3	Synthese des (-)-Pinandiolbutylboronsäureesters 160	118
6.2.4	Synthese von BoroValinpinandiolester 90	118
6.2.5	Synthese von D-BoroValinpinandiolester 178	120
6.2.6	Synthese von D-BoroNorleucinpinandiolester 163	121
6.2.7	Beladung eines Chlorotrylchloridharzes	122
6.2.8	Bestimmung der Beladung des Harzes	122
6.2.9	Synthese der geschützten Peptide	123
6.2.10	Kupplung der Peptide mit den BoroAminosäuren	123
6.2.11	Synthese von Biman-CDPMFKL-BoroV (171)	126
6.3	Synthesen zur versuchten Darstellung cyclischer Boronsäureester	128
6.3.1	TIPS-Schützung von FmocThrOH	128
6.3.2	Kupplung von Fmoc-Thr(OTIPS)-OH mit D-BoroValin-pinandiolester	129
6.3.3	Spaltung des Acetonids in (S)-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolan-4-carbonsäuremethylester	130
6.3.4	Synthese von (2S,3R)-2,3-Dihydroxy-2-methylbutansäure-methylester (184)	130

6.3.5	Synthese von (<i>S</i>)-2,3-Dihydroxy-2,3-dimethylbutansäure-methylester (187)	131
6.3.6	Spaltung des Boronsäureesters von D-BoroValinpinandiolester	132
6.3.7	Synthese von Fmoc-D-BoroValinpinandiolester (194)	132
6.4	Kahalalide F und die Rhodaminsonde von Kahalalide F	134
6.4.1	Synthese von Kahalalide F (132)	134
6.4.2	Tosylierung von 5-(Boc-amino)-1-pentanol	136
6.4.3	Synthese von 1-Azidopentanammoniumchlorid (198)	137
6.4.4	Synthese von Rhodaminazid (199)	138
6.4.5	Click-Reaktion zwischen Rhodaminazid und 4-Ethynylbenzaldehyd	138
6.4.6	Synthese der Rhodaminsonde 202 von Kahalalide F	139
7.	<i>Literatur</i>	140
8.	<i>Anhang</i>	144
8.1	Abkürzungsverzeichnis	144
	Publikationsliste	149
	Lebenslauf	150
	Erklärung	151
	Danksagung	152

1. Einleitung

Die Naturwissenschaften befassen sich mit der Erforschung der belebten und unbelebten Materie (Abbildung 1). Die Physik beschäftigt sich mit allgemeinen Phänomenen der Materie und der Energie in Raum und Zeit. Sie beschreibt damit die Grundlagen vom Aufbau der Materie und deren Bewegung. Diese Grundlagen nutzt die Chemie, um die Wechselwirkungen der Elemente zu erforschen. Dazu gehört die Untersuchung des Aufbaus und der Eigenschaften von chemischen Stoffen. Die kleinste Einheit, mit der sich der Chemiker beschäftigt, ist das Element. Weiterhin behandelt die Chemie die Umwandlungen von Substanzen, die die Bindungsverhältnisse zwischen den Atomen ändern. Sie wird weiter in die organische, die anorganische und die physikalische Chemie unterteilt. Die organische Chemie beschäftigt sich mit den Kohlenstoffverbindungen. Die Anorganik behandelt das restliche Periodensystem, und die physikalische Chemie ist die Verbindung der Chemie zur Physik.

Die dritte Naturwissenschaft ist die Biologie. Der Biologe untersucht die belebte Materie, das Pflanzen- und das Tierreich. Es wird durchleuchtet, wie Lebewesen funktionieren. In der Zell- und Molekularbiologie erfolgt die Erforschung biologischer Phänomene auf molekularer Ebene.

Eine Verbindung zwischen Chemie und Biologie stellt die Biochemie dar. In diesem interdisziplinären Bereich werden die chemischen Reaktionen untersucht, die im Körper ablaufen. Diese Reaktionen sind sehr vielfältig. Dazu gehören unter anderem Reaktionen, die der Körper zur Energiegewinnung benötigt. Auch der Aufbau jeder einzelnen Zelle erfordert viele Reaktionen. Zum Beispiel müssen Proteine, Ribonukleinsäuren und viele andere Moleküle synthetisiert werden.

Eine weitere Verknüpfung von Chemie und Biologie stellt die chemische Biologie dar.^[1] Die Wissenschaftler untersuchen in diesem Fachgebiet biologische Fragestellungen mit Hilfe chemischer Werkzeuge. Es ist wichtig, Biochemie und chemische Biologie deutlich zu unterscheiden. Die chemische Biologie nutzt die chemische Synthese zur Erforschung der Molekularbiologie. So können z. B. bekannte Schlüssel-moleküle markiert werden, um sie anschließend im biologischen System zu verfolgen. Diese markierten Moleküle werden Sonden genannt. Es gibt vielfältige Möglichkeiten zur Markierung eines Moleküls, so können z. B. Fluorophore angebracht oder das Molekül radioaktiv, z. B. mit Tritium, markiert werden.^[2] ^[3] Diese Modifikationen erfolgen chemisch. Ein Fluorophor kann z. B. über eine

reaktive Gruppe, beispielsweise ein Amin, gekuppelt werden. Zur radioaktiven Markierung kann es erforderlich sein, eine Total- oder Teilsynthese des Moleküls mit radioaktiv markierten Bausteinen durchzuführen.

Ein weiterer Bereich, der Erkenntnisse aus dem Gebiet der chemischen Biologie nutzt, ist die Erforschung von Enzymen. Hierzu werden z. B. Substrate mit UV-spektroskopischen Bausteinen synthetisiert, die anschließend vom Enzym unter Freisetzung der UV-aktiven Gruppe abgebaut werden. Mittels eines solchen Ansatzes sind daher z. B. die enzymkinetischen Parameter bestimmbar. Ein Beispiel für diese Technik ist die Verwendung von *p*-Nitroanilin bestückten Substraten. *p*-Nitroanilin wird freigesetzt und die Lösung erhält eine charakteristische Gelbfärbung, die mittels Messung der UV-Absorption und der Anwendung des Lambert-Beer'schem Gesetzes quantifizierbar und zur Bestimmung von Enzymkonstanten verwendbar ist.^[4]

Es ist ebenfalls möglich, mit Hilfe der chemischen Biologie die Aufgaben eines Enzyms zu erforschen. So kann z. B. durch Gabe chemischer Inhibitoren ein Enzym ausgeschaltet werden, dass dann zu einem bestimmten Phänotyp führt. Dieses veränderte äußere Erscheinungsbild lässt sich dann auf das inhibierte Enzym zurückführen. Für diese Experimente werden potente Inhibitoren mit hoher Spezifität benötigt. Solche Modulatoren werden chemisch synthetisiert und durch kleine Veränderungen immer effektiver gemacht. Beispiele für derartige Inhibitoren sind Peptide, die am C-Terminus entweder ein Chlormethylketon oder eine Boronsäure tragen.^[5]

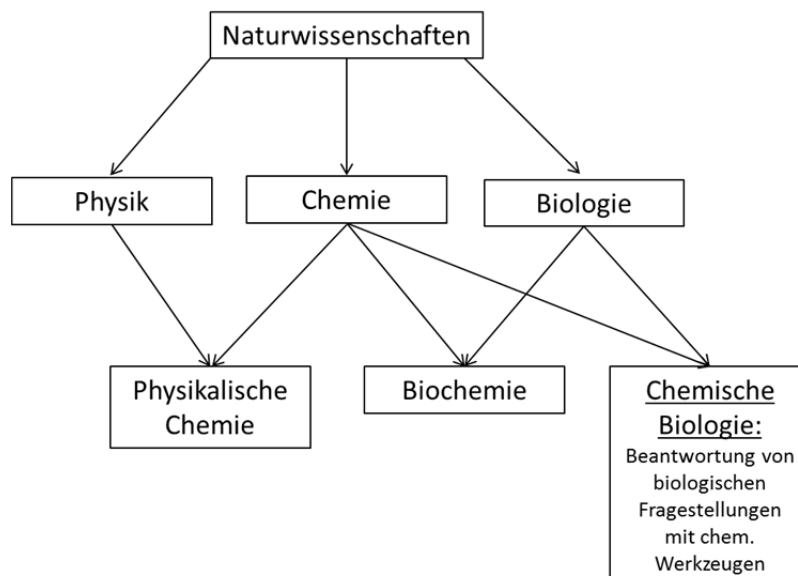


Abbildung 1: Eine Einordnung der chemischen Biologie in die Systematik der Naturwissenschaften.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Biologische Funktionen von Proteasen

Proteasen sind hydrolytische Enzyme, die die Amidbindungen in Peptiden oder Proteinen hydrolysieren. Durch bioinformatische Analysen der Genome von Maus und Mensch konnten ungefähr 500-600 Proteasen identifiziert werden.^[6, 7] Bei den Proteasen werden Endo- und Exoproteasen unterschieden.^[8] Während Endoproteasen die Peptidkette innerhalb der Aminosäuresequenz spalten, proteolysieren Exoproteasen einzelne Aminosäuren an den Enden der Peptide. Bei den Exopeptidasen können weiterhin Amino- und Carboxypeptidasen unterschieden werden, je nachdem an welcher Seite der Schnitt erfolgt.

Die Proteasen werden nach ihrem Mechanismus in verschiedene Unterfamilien unterteilt: Es gibt Serin-, Cystein- und Threoninproteasen, die zur Gruppe der nucleophilen Proteasen zusammengefasst werden können. Weitere Unterfamilien sind die Aspartat-, Metallo- und Glutamatproteasen.

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass die physiologische Aufgabe der Proteasen weitestgehend im Verdau von Proteinen zur Bereitstellung von Aminosäuren und somit im Rahmen der Ernährung liegt.^[9] Heutzutage sind jedoch viele weitere Aufgaben und Funktionen von Proteasen bekannt. So sind diese z. B. in der Kontrolle der Proteinmenge, der Proteinqualitätskontrolle und der regulatorischen Proteolyse involviert.

Die Kontrolle über die Menge an verschiedenen Proteinen in einer Zelle ist hochkomplex. Um die Konzentration eines Proteins in der Zelle zu regulieren, gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, die auch alle genutzt werden. Die Regulation kann sowohl auf der Seite des Aufbaus als auch auf der Seite des Abbaus der Proteine liegen. Gerät die Zusammenstellung der Proteine in der Zelle aus dem Gleichgewicht, können schwere Krankheiten auftreten. Zum Beispiel können bei zu hoher Konzentration die Proteine aggregieren, wodurch unter Umständen Krankheiten wie z. B. Alzheimer oder andere neurodegenerative Krankheiten auftreten können.^[10]

Die Proteinbiosynthese wird in Transkription und Translation aufgeteilt (Abbildung 2). In der Transkription wird die DNA in m-RNA umgeschrieben. Dieser Vorgang findet im Zellkern statt. Dazu sind verschiedene Enzyme erforderlich, z. B. Gyrasen, die die DNA entwinden oder die RNA-Polymerase, die die eigentliche Synthese der m-RNA durchführt. Die Transkription ist der erste Schritt, bei dem die Zelle die Möglichkeit hat, die Proteinkonzentration zu regulieren. Beispielsweise erfolgt eine Regulation mittels einer

Modulation und Editierung der hergestellten m-RNA (z. B. durch sogenanntes „Silencing“). Eine Kontrolle kann aber auch auf Proteinebene stattfinden. So gibt es z. B. Transkriptionsfaktoren, die erforderlich sind, dass die RNA-Polymerase an die DNA binden kann. Bei bakteriellen Transkriptionsfaktoren werden diese durch die sogenannten σ -Faktoren bzw. anti- σ -Faktoren reguliert. So hemmt die Präsenz eines anti- σ -Faktors die Transkription. Wird ein solcher Faktor jedoch geschnitten, kann die RNA-Polymerase binden und die DNA kann in m-RNA transkribiert werden.^[11]

Die synthetisierte m-RNA verlässt anschließend den Zellkern, um in Ribosomen in die primäre Peptidsequenz übersetzt zu werden. Dieser Vorgang wird Translation genannt. In der Zelle kommen RNA-Hydrolasen vor, die die RNA in ihre Bausteine spalten können. So wird hier ebenfalls die Menge an Protein reguliert, da nicht jede RNA übersetzt wird. Außerdem wird verhindert, dass die RNA zu oft übersetzt wird.

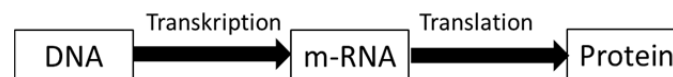


Abbildung 2: Zentrales Dogma der Molekularbiologie.

Nach der Translation ist das Protein in eukaryotischen Zellen gewöhnlich noch nicht vollständig gereift. Es gibt noch die Möglichkeit, die Aminosäurekette zu spleißen. Dabei werden Introns entfernt. Weiterhin können Signalsequenzen vorhanden sein, die sich verantwortlich zeigen, in welches Zellkompartiment das Protein nach der Biosynthese transportiert wird. Diese Möglichkeit wird z. B. genutzt, um die chlamydiale Protease CPAF aus der Zelle in die neue Wirtszelle zu dirigieren.^[12] Die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Phosphorylierungen, Farnesylierungen, Acetylierungen oder die Ausbildung von Disulfidbrücken sind wiederum streng reguliert.

Neben dem Aufbau ist auch der Abbau der Proteine durch verschiedene Proteasen ein wichtiger Faktor, die Konzentration an Proteinen im gewünschten und erforderlichen Bereich zu halten. Die Menge eines zellulären Proteins wird also durch das Verhältnis zwischen Biosynthese (und somit Resynthese) und dessen Abbau durch Proteasen reguliert.

Proteasen spielen jedoch nicht nur für die Regulation der Proteinmengen in lebenden Zellen eine wichtige Rolle. Ein weiteres Aufgabengebiet ist die sogenannte Proteinqualitätskontrolle. Für die Aufrechterhaltung der Integrität der Zelle ist es wichtig, dass die Proteine nicht nur in der richtigen Konzentration, sondern auch korrekt gefaltet vorliegen. Im wässrigen Medium, also in den Nicht-Membran bzw. Lipidregionen jeder Zelle, sind Proteine so gefaltet, dass sich die hydrophoben Anteile im Innern und die hydrophilen

Bereiche auf der Außenseite befinden. Kommt es nun durch Zellstress, wie z. B. erhöhte Temperatur, zur Denaturierung der Proteine und somit Änderungen der nativen Konformation der Proteine, befinden sich auf der Außenseite hydrophobe Bereiche. Diese könnten mit anderen fehlgefalteten Bezirken aggregieren und somit proteotoxischen Stress auslösen.

Um diese für Zellen problematische Situation zu lösen, verfügen alle Zellen über eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die für die Qualitätskontrolle der Proteine von Bedeutung sind.^[13] Ein wichtiger Faktor hierzu sind Chaperone, welche Proteine sind, die anderen Proteinen helfen, sich richtig zu falten.^[14] Sind diese jedoch nicht mehr in der Lage, das fehlgefaltete Protein innerhalb einer bestimmten Zeitspanne wieder in die native Form zurückzufalten, kann die Zelle die Gefahr mit Hilfe von Proteasen lösen, die das Protein hydrolysieren können. Es wird angenommen, dass die HtrA-Proteasen eine Proteinfamilie darstellen, in der zumindestens einige Vertreter in diesen Proteinabbauprozess involviert sind.

2.2 Serinproteasen

Die Serinproteasen sind eine Unterfamilie der Proteasen. Sie besitzen die EC-Nummer 3.4.21.^[7] Bekannte Beispiele für Serinproteasen sind die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin. Aber auch die Protease Thrombin, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt ist, gehört zu den Serinproteasen.

Für die Unterfamilie der Serinproteasen ist eine katalytische Triade charakteristisch, die aus den Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und das für diese Unterfamilie namensgebende Serin besteht.^[15] Diese Aminosäuren sind direkt an der Spaltung der Amidbindung beteiligt. Der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Serin ist der nucleophile Anteil der katalytischen Triade. Die beiden anderen Aminosäuren wirken als Säure-Base-Katalysatoren. Asparaginsäure liegt unter physiologischen Bedingungen als Aspartat vor. Diese negative Ladung erlaubt das Histidin so zu orientieren, dass es als Base das Proton der Hydroxylgruppe des Serins beim nucleophilen Angriff übernehmen kann. Als Intermediat bildet sich der Ester zwischen dem Serin und dem N-terminalen Ende des Proteins. Der C-Terminus wird in diesem Schritt freigesetzt. Auf dem Weg zu diesem Zwischenprodukt muss der tetraedrische Übergangszustand der Reaktion überwunden werden. Einen Beitrag hierzu liefert das sogenannte Oxyanionloch der Serinprotease, welches das Anion stabilisiert. Der nächste Schritt ist die Hydrolyse des Esters mit Hilfe eines Wassermoleküls. Diese wird wiederum durch eine gerichtete Interaktion der Asparaginsäure und des Histidins ermöglicht, welche den Angriff des Wassermoleküls orientiert und aktiviert. Nachdem der Ester hydrolysiert worden ist, steht das Enzym wieder für einen weiteren Spaltungsschritt zur Verfügung.

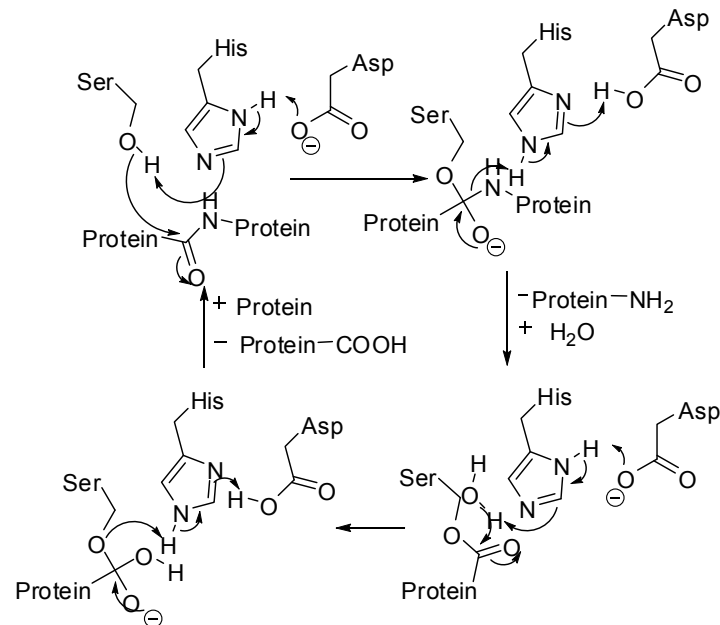


Abbildung 3: Mechanismus der katalytischen Triade.

2.2.1 HtrA Proteasen

HtrA Proteasen gehören wie alle Proteasen zur Enzymklasse der Hydrolasen bzw. Proteasen und spalten somit Amidbindungen in Proteinen. „Htr“ steht dabei für „high temperature requirement“. Laut MEROPS-Datenbank^[7] gehören die HtrA Proteasen zu den trypsinartigen Proteasen und sind in der Unterfamilie S1C eingruppiert. HtrA-Proteasen gehören somit zur Familie der Serinendopeptidasen.

Tabelle 1: Protease- und PDZ-Domänenorganisation einiger HtrA-Proteasen (angepasst nach^[16]).

Protein	Gattung	Anzahl Aminosäuren	Protease Domäne	PDZ-Domäne
DegS	<i>E. coli</i>	355		
DegP	<i>E. coli</i>	448		
DegQ	<i>E. coli</i>	428		
HtrA	<i>Synechocys</i>	452		
HhoA	<i>Synechocys</i>	360		
HhoB	<i>Synechocys</i>	391		
HtrA1	<i>H. sapiens</i>	458		
HtrA2	<i>H. sapiens</i>	458		
HtrA3	<i>H. sapiens</i>	436		
HtrA4	<i>H. sapiens</i>	445		
HtrA2	<i>D. rerero</i>	429		
YNM3	<i>S. cerevis.</i>	997		

Die Struktur der HtrA Proteasen besteht aus der trypsinartigen Proteasedomäne und einer oder mehreren PDZ-Domänen (Tabelle 1). Die PDZ-Domäne wurde zuerst in drei verschiedenen Proteinen gefunden: Das synaptische Protein PSD95, das *Septate junction-Protein Discs large* aus *Drosophila melanogaster* und das *Tight junction-Protein Zonula occludentes-1*.^[17] Von diesen drei Proteinen haben die PDZ-Domänen ihren Namen erhalten. PDZ-Domänen sind dazu in der Lage, C-Termini anderer Proteine zu binden, und somit Protein-Protein-Interaktionen zu etablieren.^[18]

2.3 Übersicht über verschiedene Vertreter der HtrA-Proteasefamilie und weitere, in dieser Dissertation bearbeitete Proteasen

2.3.1 DegS

Die DegS Protease aus *Escherichia coli* besteht aus einer Transmembrandomäne, einer Proteasedomäne und einer PDZ Domäne und liegt als Trimer vor. Dementsprechend handelt es sich um ein Membranprotein. DegS übernimmt dabei in Bakterien die Rolle eines Stress-Sensors (bei *E. coli* im Periplasma), welcher fehlgefaltete bzw. -lokalisierte Proteine erkennt und anschließend eine Stress-Signalkaskade auslöst. Die Erkennung fehlgefalteter Proteine erfolgt über die PDZ Domäne, welche die C-Termini solcher Proteine bindet, wodurch eine allosterische Aktivierung der Proteasedomäne erfolgt.^[19] Es besteht daher die Möglichkeit, mit kurzen hydrophoben Peptiden diesen Aktivierungsmechanismus zu imitieren und die Protease zu aktivieren.^[20] Das Enzym kann somit zwischen verschiedenen Zuständen, d. h. einem proteolytisch-aktiven bzw. inaktiven Zustand reversibel umschalten und zeigt somit mechanistisch große Unterschiede zu den „klassischen“ Trypsin-artigen Serinproteasen, welche irreversibel aktiviert werden.^[21]

Das einzige bekannte Substrat von DegS ist der anti- σ -Faktor RseA, welches an einer genau-definierten Stelle geschnitten wird (Abbildung 4). DegS ist also eine hochselektive Protease. Durch die Spaltung von RseA wird in Bakterien die sogenannte σ^E - Stressantwort ausgelöst, die essentiell zum bakteriellen Überleben unter Stressbedingungen ist und die Biosynthese einer Vielzahl von Stressfaktoren auslöst. Eines dieser synthetisierten Proteine ist eine weitere HtrA Protease, die den Namen DegP trägt.

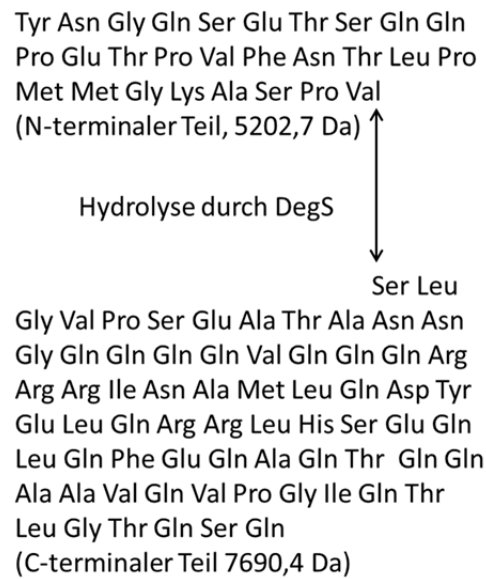


Abbildung 4: Ausschnitt aus der Sequenz von RseA mit der Schnittstelle von DegS.

2.3.2 DegP

Ein weiterer gut-untersuchter Vertreter der HtrA-Proteasen ist DegP und stammt ebenfalls aus *Escherichia coli*. Das Monomer dieser Protease besteht aus einer Proteasedomäne und zwei PDZ Domänen. DegP scheint in Bakterien verschiedene Funktionen zu übernehmen, die am besten verstandene ist jedoch deren Funktion als Proteinqualitätsfaktor, wofür auch die Biosynthese über die σ^E -Kaskade spricht. DegP verfügt über zwei verschiedene Proteinqualitätskontroll-Funktionen, die abhängig von der Temperatur sind.^[22] Bei niedrigen Temperaturen dient das Protein als Chaperon. Es unterstützt damit fehlgefaltete Proteine bei der Rückfaltung in die native Form. Bei höheren Temperaturen hingegen wirkt DegP als klassische Protease und baut mit relativ geringer Substratspezifität denaturierte Proteine ab.

DegP liegt in Zellen nicht als Monomer vor, sondern ist aus Trimereinheiten aufgebaut, welche sich dynamisch zu höheren Oligomeren zusammenlagern können. Man nimmt heute an, dass die Chaperonfunktion von DegP von einem hexameren Oligomer (d. h. einem Dimer aus zwei Trimeren) übernommen wird (Abbildung 5).^[23] Bei höheren Temperaturen bilden sich hingegen höhere Multimere mit 12-24 Untereinheiten aus (Abbildung 6). In diesen dienen (zumindestens einige) PDZ-Domänen als Verbrückungspunkte. Durch diese Umordnung zu größeren Proteinkomplexen ändert sich auch die Funktion des Proteins. DegP hat nun die Funktion einer Protease, die eine hohe Spezifität für ungefaltete Proteinbereiche hat, welche jedoch nur mit geringer Substratspezifität abgebaut werden. Die Selektivität für ungefaltete Proteine ist noch nicht ganz geklärt; man nimmt an, dass die Untereinheiten einen

„Käfig“ bilden, in dem die Proteolyzentren an der Innenseite liegen. Die „Gitter“ dieses Käfigs sind jedoch so eng, dass nur lineare, d. h. denaturierte Peptide in ihn eindringen können.

Durch die Fähigkeit, in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedliche Aufgaben zu übernehmen, kann das Enzym DegP einen wichtigen Beitrag zur Proteinqualitätskontrolle leisten. Bei niedrigen Temperaturen wird zunächst ökonomisch versucht, die vorhandenen Proteine zu erhalten und zurückzufalten. Bei höheren Temperaturen steigt die Zahl fehlgefalteter Proteine in der Zelle. Um zu verhindern, dass die Proteine aggregieren können, werden dann dementsprechend „härtere Maßnahmen ergriffen“ und die Proteine stattdessen abgebaut.

DegP ist eine deutlich weniger spezifische Protease als DegS. Während DegS nur das Substrat RseA besitzt, kann DegP viele Substrate schneiden. Durch genetische Überlagerungsexperimente zwischen DegS und DegP konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aktivitäten homologer Proteasen durch Austausch typischer Bereiche, wie PDZ-Domänen oder regulatorischer Schleifen, von einem Enzym zum anderen übertragen werden können. Zum Beispiel konnte durch die Einführung der Schleife L2 aus DegP in DegS dieses Enzym in eine unspezifische Protease umgewandelt werden.^[24]

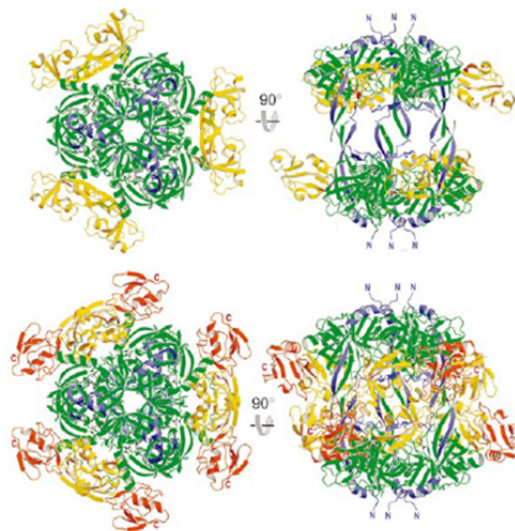


Abbildung 5: Struktur des DegP Hexamers von oben und von der Seite. Die Proteasedomäne ist in grün, PDZ1 in gelb und PDZ2 in rot abgebildet.^[23]

Abbildung 6: Struktur des DegP 24mers.^[25]

2.3.3 HtrA1

Die Protease HtrA1 ist ein Vertreter der humanen HtrA-Proteasen. Sie besteht aus einer N-terminalen Domäne unbekannter Funktion, einer Serinprotease-Domäne und einer C-terminalen PDZ-Domäne. Sie scheint in allen Zelltypen exprimiert zu werden, was für eine wichtige physiologische Funktion spricht, und eine Fehlregulation dieser Protease wird in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten wie z. B. Arthritis,^[26, 27] Krebs,^[28] zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie,^[29] Makuladegeneration^[30] und Alzheimer gebracht.^[31] Analog zu DegS kommt HtrA1 als Trimer vor. Die Protease verfügt des Weiteren über einige nennenswerte biochemische Besonderheiten: So ist sie z. B. in der Lage, β -Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen biochemisch abzubauen. Dementsprechend wird darüber spekuliert, ob eine Modulation dieser Protease eventuell einen Ansatz zur Behandlung von Alzheimer darstellen könnte.

2.3.4 Tsp-Protease

Die „tail specific“ (Tsp) Protease gehört nicht zu den HtrA Proteasen, teilt sich mit diesen jedoch die Kombination einer Trypsin-artigen Serinproteasedomäne und einer PDZ-Domäne. Laut MEROPS Datenbank gehört diese Protease aus *Escherichia coli* zum Clan Sk und zur Familie S41.^[7] Sie besteht aus 660 Aminosäuren und scheint, wiederum in Analogie zu einigen HtrA-Proteasen, bevorzugt ungefaltete Proteine mit hydrophobem C-Terminus zu schneiden.^[32] In der Tat ist die Bezeichnung der Protease als „tail specific protease“ auf diese Eigenschaft zurückzuführen. Ihre Aufgabe scheint analog zu den HtrA Proteasen im Bereich der Proteinqualitätskontrolle zu liegen.

Eine Besonderheit der Tsp-Protease besteht darin, dass sie sowohl den C-Terminus des Substrats über die PDZ-Domäne als auch den Bereich erkennt, in dem geschnitten werden

soll.^[33] Dabei liegt die Priorität auf der Erfassung des hydrophoben C-Terminus des Substrats durch die PDZ-Domäne. Dieser Sachverhalt wird durch die hohe Diversität der Aminosäuren im Bereich der Schnittstellen bekräftigt.

2.3.5 CPAF

Chlamydien gehören zu den gram-negativen Bakterien. Sie sind obligate intrazelluläre humane Pathogene, die verschiedene Krankheiten auslösen können. *Chlamydia trachomatis* verursacht sowohl schwere Infektionen der Augen als auch des Genitalbereiches. Unbehandelte Genitalinfektionen können zu schweren Komplikationen wie z. B. zu Entzündungen des Beckens, zu Eileiterschwangerschaften oder zur Unfruchtbarkeit führen.^[34] Weiterhin verursacht *Chlamydia pneumoniae* Atemwegserkrankungen.

Die verschiedenen Stämme besitzen eine hohe Ähnlichkeit im Genom und einen konservierten intrazellulären Wachstumszyklus.^[35] Infektiöse Partikel, die Elementarkörper genannt werden, können mittels induzierter Phagozytose in die Epithelzellen eindringen. In der mit den Elementarkörpern infizierten Vakuole, die den Namen Inklusion trägt, wandeln sich die Elementarkörper in retikuläre Körper um. Die Retikularkörper sind nicht mehr infektiös. Dafür ist diese Form metabolisch aktiv.

Ein wichtiger Virulenzfaktor der Chlamydien scheint dabei der „Chlamydiale Protease-like Activity Faktor“ (CPAF) zu sein. Diese Protease ist aus einem Dimer aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut, die durch autokatalytische Spaltung eines Zymogens entstehen.^[36]

Das Zymogen wird zunächst zwischen Met242 und Arg243 *trans*-autokatalytisch geschnitten. Die *trans*-Autokatalyse zeigt sich dabei durch eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Reaktion. Diese Spaltung bewirkt eine Homodimerisierung und die Formierung der katalytischen Dyade, die zusätzlich von einem Wassermolekül unterstützt wird. Der zweite *cis*-katalytische Schnitt findet zwischen Met264 und Val265 statt. Nach der letzten Spaltung zwischen Ser283 und Gly284 fehlt nur noch die Abspaltung der Signalsequenz (Aminosäuren 1-30), um das native und vollständig aktive Enzym zu erhalten.^[12]

Eine Reihe von Proteinen gehört zu den Substraten dieser Protease, die *in vitro* geschnitten werden, z. B. Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle,^[37] Keratin 8^[38] Vimentin und einige weitere Proteine.^[35] Allerdings zeigen neuere Arbeiten von Chen *et al.*, dass diese proteolytischen Spaltungen unter Umständen *in vivo* nicht auftreten, sondern eher „Artefakte“ der verwendeten Analysemethoden darstellen.^[39] Denn in den meisten Experimenten zur

Messung möglicher Substrate von CPAF wurden die Zellen vor der Analyse lysiert. Dabei wurde die Protease freigesetzt und konnte somit auch in Kontakt mit nicht-natürlichen Substraten kommen und diese somit proteolysieren. Wird die Zellyse jedoch unter denaturierenden Bedingungen oder in Gegenwart des bekannten CPAF-Inhibitors Lactacystein durchgeführt, bleiben viele vorher als Substrate beschriebene Proteine unverändert.

Unter Berücksichtigung dieser neuen Ergebnisse konnten Hou *et al.* vor kurzem ein erstes „reales“ *in vivo* Substrat identifizieren. Es handelt sich um das Protein OmcB (outer membrane complex proteins B).^[40] Dieser äußere Membrankomplex ist hoch konserviert bei verschiedenen CPAF-Spezies, wo er als Adhäsionsfaktor wirkt und für das erfolgreiche Eindringen der Chlamydien in die Wirtszelle verantwortlich ist.

2.4 Enzyminhibitoren

Enzyminhibitoren können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden.^[41] Für die Entwicklung von Proteaseinhibitoren sind jedoch drei Klassen von besonderem Interesse, welche hier kurz vorgestellt werden sollen.

So kennt man als „wichtigste“ Inhibitorenklasse die kompetitiven Inhibitoren, welche meistens reversibel wirken. Diese Inhibitoren binden wie ein Substrat an das aktive Zentrum des Enzyms (Abbildung 7). Das Ausmaß der Hemmung wird daher durch das Verhältnis der Bindungsstärke des Inhibitors und des konkurrierenden Substrats sowie der Konzentration von Substrat und Inhibitor bestimmt. Beispiele für derartige Inhibitoren sind Peptidboronsäuren oder -aldehyde, die reversible kovalente Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum einer Serinprotease eingehen können.

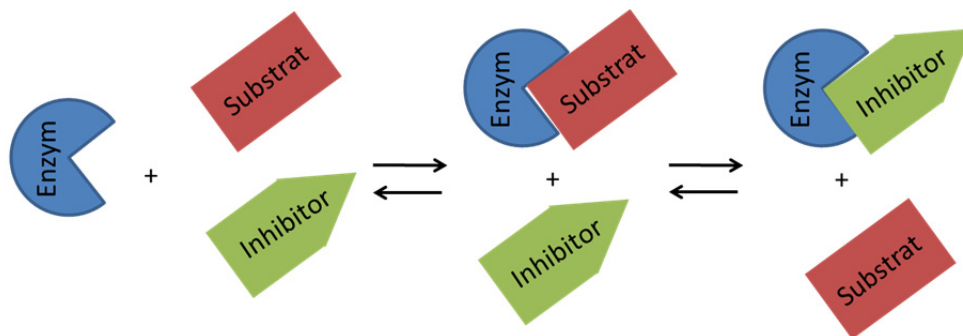


Abbildung 7: Schematische Wirkweise eines reversiblen, kompetitiven Inhibitors.

Die zweite Gruppe sind die nicht-kompetitiven, häufig irreversiblen Inhibitoren. Diese können z. B. eine reaktive Gruppe besitzen, die kovalent mit dem aktiven Zentrum des Peptids reagiert (Abbildung 8). Nach Bildung einer kovalenten Bindung stehen sie daher nicht mehr in Konkurrenz zu den Substraten, was die nicht-kompetitive Wirkungsweise erklärt. Eine medizinische Anwendung solch kovalent-wirkender Inhibitoren ist heutzutage jedoch selten geworden, da diese häufig aufgrund nicht-Enzym-spezifischer Reaktionen zu nicht-tolerierbaren Nebenwirkungen neigen. Beispiele für derartige Inhibitoren auf dem Gebiet der Proteasen sind Chloromethylketone, Moleküle mit Michaelssystemen oder β -Lactaminhibitoren, wie z. B. Penicillin (deren meisten Targets jedoch keine Proteasen sind).

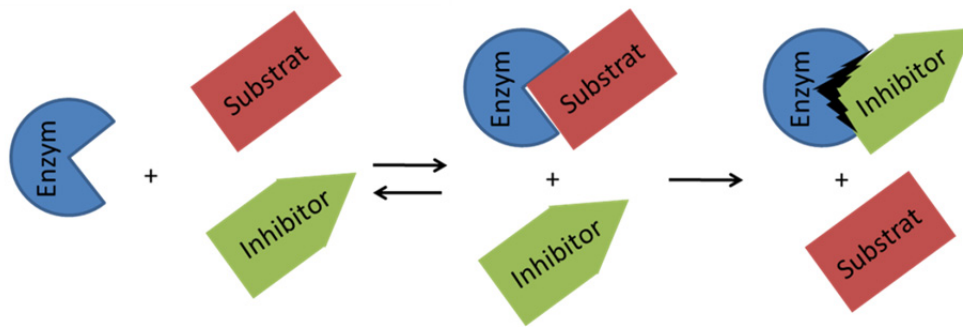


Abbildung 8: Schematische Wirkweise eines irreversiblen, kompetitiven Inhibitors.

Die dritte Gruppe der Enzymhemmer sind die allosterischen Inhibitoren. Sie wechselwirken nicht mit dem aktiven Zentrum, sondern mit einem anderen Bereich des Enzyms. Durch diese Interaktion kommt es zu einer sterischen Veränderung des Enzyms (Abbildung 9). Dadurch kann kein Enzym-Substrat-Komplex mehr gebildet werden. Allosterische Inhibitoren stehen daher nicht in Konkurrenz zu den Substraten und gehören somit zu den nicht-kompetitiven Inhibitoren. So können sie bei hoher Affinität in geringen Mengen eingesetzt werden. Die Entwicklung solcher Inhibitoren stellt sich jedoch häufig als schwierig heraus, da kein Substrat als Vorbild dienen kann. Besonders wichtig sind sie z. B. bei der Hemmung von Kinasen,^[42] aber auch auf dem Gebiet der Proteasen wird immer intensiver nach allosterischen Regulatoren gesucht.^[43]

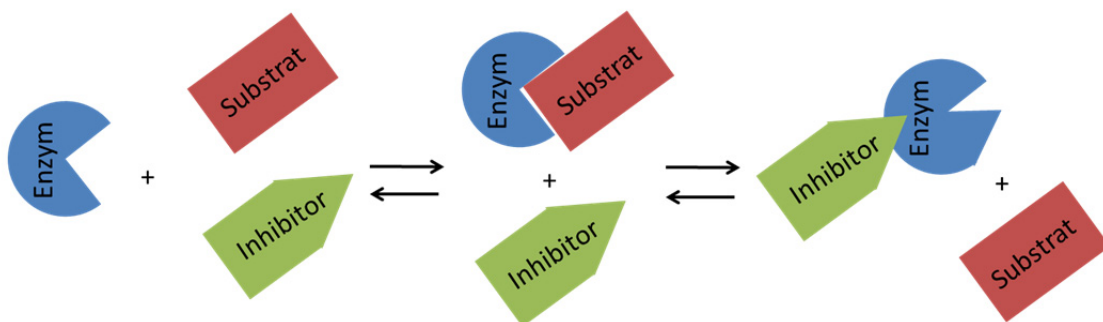


Abbildung 9: Schematische Wirkweise eines reversiblen, allosterischen Inhibitors.

2.5 Peptidylboronsäuren als Proteaseinhibitoren

Peptidylboronsäurederivate werden häufig als Inhibitoren für Serin- und Threoninproteasen verwendet. Die Hemmwirkung der Boronsäuren auf diese Enzyme basiert dabei auf den spezifischen Eigenschaften des Elementes Bor.

Bor ist ein Element der dritten Hauptgruppe und besitzt die Elektronenkonfiguration $1s^2 2s^2 2p^1$. Damit gehört Bor zu den Halbmetallen. Die Hauptoxidationszahl ist entsprechend der Hauptgruppe +3. Bor besitzt eine große Affinität zu Sauerstoff und damit zu den katalytisch-aktiven Hydroxylgruppen in Serin- bzw. Threoninproteasen. Des Weiteren bildet Bor starke Komplexe mit den Halogeniden. In beiden Fällen ist die entstehende Bindung stark polar. Das Element bildet jedoch keine B^{3+} -Kationen, weil dafür die Koordinationszahl zu gering ist. Bor tritt in der Natur in Form von Boraten auf. Die am meisten vorkommenden Mineralien sind Kernit ($Na_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$), Borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) und Borocalcit ($CaB_4O_7 \cdot 4H_2O$).^[44, 45]

Bor besitzt in kovalenten Verbindungen sp^2 hybridisierte Molekülorbitale. Damit ist die Struktur der Moleküle trigonal-planar. Mit drei Bindungen ist die Oktettregel jedoch nicht erfüllt, weshalb viele Borverbindungen starke Lewis-Säuren sind. Daher „nutzen“ Borverbindungen unterschiedliche Wege, um diesen Elektronenmangel auszugleichen, wie z. B. die Ausbildung von 3-Zentren-2-Elektronenbindungen oder die Anlagerung von Liganden. In der Tat gehört die Addition der katalytisch-aktiven Hydroxylgruppen der Serin- bzw. Threoninproteasen zu einer solchen Anlagerung eines Liganden, wodurch eine tetraedrisch-gebundene Anordnung entsteht.

Die Hemmwirkung von Boronsäuren basiert jedoch nicht allein auf der Anlagerung der Hydroxylgruppen. Diese Interaktion macht nur einen geringen Teil der Triebkraft der Wechselwirkung mit den Serin- und Threoninproteasen aus. Die überwiegende Triebkraft basiert darauf, dass die durch die Hydroxyladdition entstandenen Boronsäure-Serin- bzw. Threoninalkoholat-Komplexe als geeignete Übergangszustandsanaloga für die hydrolytische Spaltung von Carbonsäureestern und Amiden wirken.^[46] Übergangszustandsanaloga sind, wie der Name schon sagt, Mimetika des Übergangszustandes einer Enzymreaktion. Die katalytische Wirkung eines Enzyms basiert unter anderem darauf, dass Enzyme den Übergangszustand in einer zu katalysierenden Reaktion stärker binden als die Edukte bzw. Produkte und somit die Aktivierungsenergie der Reaktion herabsetzen. Dementsprechend bilden Übergangszustandsanaloga einen stabilen Komplex mit dem Enzym.

Die Kristallstruktur eines Enzyms mit einem Übergangszustandsanalogon wird häufig verwendet, um Rückschlüsse auf den Mechanismus der enzymatischen Reaktion zu

ermöglichen. Bei der Hydrolyse von Peptidbindungen ist der Übergangszustand am C-Atom tetraedrisch und somit sp^3 hybridisiert. Das Edukt, also die Amidbindung, ist planar, was einer sp^2 -Hybridisierung am Carbonylkohlenstoff entspricht. Genau dieser Wechsel tritt auch bei den Peptidylboronsäure-Inhibitoren auf. Die Boronsäure in ihrer ungebundenen Form ist am Bor ebenfalls sp^2 hybridisiert. Boronsäuren bilden jedoch mit der Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum der Protease bereitwillig Borate, die dann sp^3 hybridisiert sind.^[47] Die Bindung erfolgt dabei zwischen einem nichtbindenden Elektronenpaar des Sauerstoffs und dem leeren p-Orbital am Bor. Dabei handelt es sich um eine nicht-kovalente Verbindung, die trotzdem sehr stark ist.^[48] Bei den Serinproteasen bindet eine der beiden Hydroxylgruppen am Bor anschließend in das Oxyanionloch der Protease. Bei den N-terminalen Threoninproteasen hingegen erfolgt eine weitere Wechselwirkung zwischen der freien Aminogruppe am Threonin und dem Borat.

Die erste tieferegehende Analyse der Wechselwirkung einer Boronsäure mit einer Serinprotease wurde 1971 veröffentlicht.^[46] In dieser Studie wurde die Wechselwirkung von 2-Phenylethanboronsäure mit der Serinprotease Chymotrypsin untersucht (Abbildung 10). Dabei konnte gezeigt werden, dass 2-Phenylethanboronsäure in der Tat als Übergangszustandsanalogon (d. h. als Borat) am aktiven Zentrum der Protease gebunden ist, währenddessen die Benzylgruppe des Inhibitors in die Spezifitätstasche S1 der Protease ragt. Die S1-Tasche von Chymotrypsin ist dazu in der Lage, effizient große, stark hydrophobe Liganden wie z. B. der Benzylrest des Inhibitors zu binden.^[49]

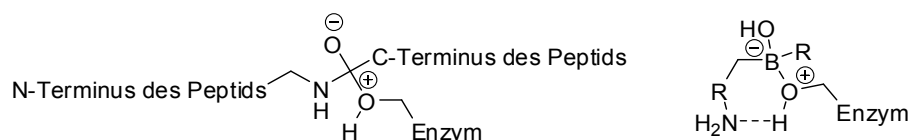


Abbildung 10: Übergangszustand bei der Spaltung eines Peptids und der analoge Komplex einer Protease mit einer Boronsäure (modifiziert nach ^[46]).

Eine weitere Serinprotease, an der Hemmstudien mit Peptidylboronsäuren durchgeführt wurden, ist z. B. Thrombin. Thrombin ist ein wichtiger Faktor in der Blutgerinnungskaskade, in welcher die Proteinolyse von verschiedenen Gerinnungsfaktoren eine große Bedeutung hat. Thrombin übernimmt dabei verschiedene Rollen, eine der wichtigsten ist jedoch die proteolytische Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin.^[50] Da eine gestörte Blutgerinnung zu schwerwiegenden Folgen führen kann (z. B. die Bildung von Blutgerinnseln, welche Schlaganfälle auslösen können), wurde schon frühzeitig nach möglichen Thrombininhibitoren gesucht. 1990 wurde hierzu von Kettner *et al.* eine kleine Bibliothek verschiedener Boronsäureinhibitoren publiziert.^[51] Als charakteristischen Baustein

enthalten alle Mitglieder dieser Gruppe von Inhibitoren die Aminosäuresequenz D-Phe-Pro-BoroArg. Dieser Kern ist entweder am N-Terminus acetyliert oder Boc-geschützt. Die Boronsäure liegt frei oder als Pinandiolester vor. Es konnten IC_{50} -Werte zwischen <1 pM bis 41 pM berechnet werden. 1995 wurde von Wityak *et al.* eine neue Synthese für diesen Thrombininhibitor veröffentlicht, der unter dem Namen DuP 714 (**1**, Abbildung 11) bekannt ist und die Sequenz Ac-D-Phe-Pro-BoroArg besitzt.^[52] Trotz der niedrigen IC_{50} -Werte sind derartige Inhibitoren aufgrund von Nebenwirkungen, insbesondere mit weiteren Proteasen, jedoch nicht als Medikament geeignet.

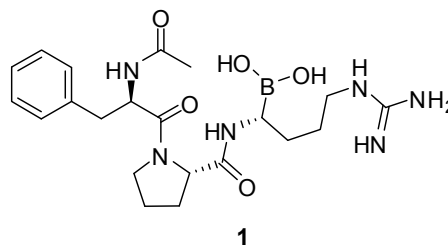


Abbildung 11: Struktur des Inhibitors DuP 714.

Dipeptidylproteasen (DPP) gehören ebenfalls zu den Serinproteasen. Es gibt neun Mitglieder dieser Unterklasse. Wie der Name vermuten lässt, hydrolysieren diese Enzyme die Peptidbindung am N-Terminus zwischen der vorletzten und der drittletzten Aminosäure. Als vorletzte Aminosäure besteht eine Spezifität für Alanin oder Prolin.^[53] Eine Besonderheit ist der inverse Aufbau der katalytischen Triade. Anstelle der gewöhnlichen Abfolge Serin, Histidin und Asparaginsäure sind bei den Dipeptidylproteasen Histidin und Asparaginsäure getauscht. Ein Mitglied der Unterklasse, DPP4, könnte als Zielmolekül zur Behandlung von Diabetes des Typs 2 dienen.^[54] In diesem Bereich laufen zahlreiche klinische Studien, die bereits gezeigt haben, dass niedermolekulare Inhibitoren für DPP4 den Zuckerspiegel im Blut senken können. Da DPP4 am C-Terminus von Prolin schneidet, werden als Inhibitoren häufig BoroProlin-modifizierte Peptide eingesetzt. Die kurzen Peptide Valin-BoroProlin oder Alanin-BoroProlin zeigen dabei K_i -Werte von 27 pM und 180 pM. Damit sind diese Inhibitoren um einen Faktor von 100-1000 effektiver als vorherige, in den klinischen Phasen befindliche Inhibitoren.^[55]

Mit Hilfe von Boronsäuren lässt sich ebenfalls das Proteasom inhibieren.^[56] Das Proteasom ist ein großer Proteasenkomplex, der eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen in der Zelle abbaut. Proteine, die in der Zelle nicht mehr benötigt werden, erhalten über eine kovalente Bindung einen oder mehrere Ubiquitin-Reste. Derart markiert, werden sie zum Proteasom geschleust, dort aufgrund ihrer Ubiquitinmarkierung als Substrate erkannt und

hydrolysiert.^[48] Das 26S-Proteasom besteht aus zwei Untereinheiten, dem 20S- und dem 19S-Proteasom. Es besitzt eine fassförmige Struktur (20S-Untereinheit) mit einem Deckel (19S-Proteasom).^[57] Das 20S-Proteasom beinhaltet verschiedene Untereinheiten, von denen drei verschiedene Proteaseaktivitäten zeigen. Die Untereinheit β 1 schneidet wie eine Caspase nach sauren Aminosäuren, β 2 spaltet Peptidbindungen analog zu Trypsin nach basischen Aminosäuren und β 5 proteolysiert Proteine C-terminal von hydrophoben Aminosäuren. Diese Aktivität entspricht der Spezifität von Chymotrypsin. Als Nucleophil dient in allen Untereinheiten die Hydroxylgruppe eines N-terminalen Threonins. Das Proteasom ist ein attraktives Target in der Krebstherapie.^[58] Der Boronsäureinhibitor Bortezomib (**2**, Abbildung 12) wurde von der FDA als Therapeutikum zur Behandlung des multiplen Myeloms 2003^[59] und von Mantelzelllymphomen 2006^[60] freigegeben. Die Inhibierung des Proteasoms bewirkt dabei vielfältige zelluläre Änderungen wie z. B. die Störung des NF- κ B-Signalwegs oder der Proteinqualitätskontrolle, wodurch in einigen Krebszellen-Typen eine selektive Apoptose ausgelöst wird. Eine neue Synthese des Wirkstoffs wurde 1998 veröffentlicht.^[61]

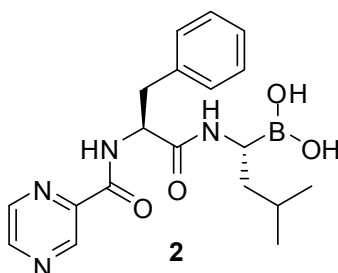


Abbildung 12: Struktur des zugelassenen Krebstherapeutikums und Proteasominhibitors Bortezomib.

Als Beispiel für eine neuere Anwendungsmöglichkeit soll hier jetzt noch einmal kurz die Entwicklung neuer Antibiotika auf der Basis von Boronsäuren angerissen werden. Die heutigen Therapien gegen bakterielle Infektionen basieren zu einem nicht unerheblichen Teil auf Penicillin-Derivaten. In der Tat war die Entwicklung von Penicillin ein Meilenstein in der Geschichte der medizinischen Chemie. Penicillin enthält einen β -Lactamring, der nucleophil von Transpeptidasen geöffnet werden kann. Dabei bildet sich eine kovalente Bindung aus. Durch die Inaktivierung der Transpeptidasen wird der Aufbau der Zellwand gehemmt. β -Lactamantibiotika gehören daher zu den am weitesten verbreiteten Medikamenten zur Bekämpfung bakterieller Infektionen.^[62]

Gegen die β -Lactamantibiotika entwickelten sich mittlerweile jedoch viele Resistenzen. Bakterielle β -Lactamasen können die Amidbindung des β -Lactamrings dieser Wirkstoffklasse hydrolysieren. Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, werden dabei in

vier Klassen (A, B, C, D) unterteilt. A, C und D gehören zu den Serin- und B zu den Metalloproteasen und werden als Lactamasen bezeichnet. Um der Ausbildung von Resistenzen entgegenzuwirken, ist es daher nützlich, geeignete, d. h. potente und selektive, Hemmstoffe dieser Enzyme zur Verfügung zu haben.^[63] Zunächst wurden zur Inhibierung der Lactamasen verschiedene β -Lactame entwickelt (zum Teil basierend auf Naturstoffen), die auch heute noch als Medikamente genutzt werden. Dazu zählen Clavulansäure und Sulbactam. Die Kombination eines solchen Inhibitors mit einem β -Lactamantibiotikum ergibt eine wertvolle Verbesserung bei der Bekämpfung von Resistenzen gegenüber dem reinen Antibiotikum. Nichtsdestoweniger hat eine solche Kombination auch Nachteile, so dass neue Inhibitoren dieser Enzymklasse immer noch notwendig sind. Zu diesem Zweck wurden daher auch Boronsäuren untersucht.^[64] Ness *et al.* veröffentlichten 2000 eine kleine Bibliothek an Boronsäure basierten Inhibitoren. Es konnten Inhibierungskonstanten zwischen 5,9 nM und 13 nM für die TEM-1 β -Lactamase erhalten werden (Abbildung 13).^[65] Als Seitenkette wurde ein Phenylacetamido-Rest verwendet, da dieser Rest auch in Penicillin G vorhanden ist, das sich als ein exzellentes Substrat der Klasse A- β -Lactamasen herausgestellt hat.

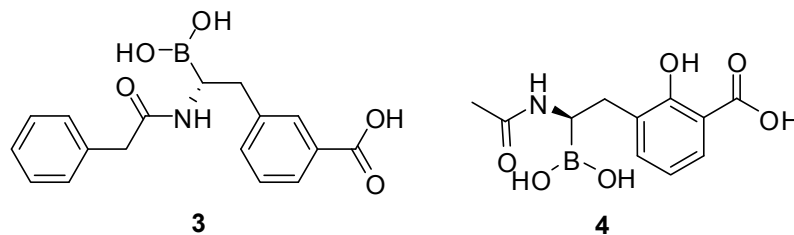


Abbildung 13: Struktur von Boronsäureinhibitoren der TEM-1 β -Lactamase.

Neben den Penicillinen gehören die Cephalosporine, die ursprünglich aus dem Schimmelpilz *Acromonium chrysogenum* stammen, zu den β -Lactamantibiotika. Die Wirkung der Cephalosporine beruht ebenfalls auf der Hemmung des Aufbaus der Zellwand. Vom Aufbau dieser Wirkstoffe wurde von Morandi *et al.* die Struktur verschiedener Boronsäureinhibitoren abgeleitet.^[66] Das rationale Design der Inhibitoren startete dabei von achiralem BoroGlycin **6** (Abbildung 14), das mit einem 2-(Thiophen-2-yl)acetyl-Rest modifiziert wurde. Diese Boronsäure inhibiert die β -Lactamase AmpC mit einem K_i -Wert von 0,32 μ M. Durch die Einführung einer *m*-Carboxylphenylgruppe wurde der K_i -Wert auf 1 nM verbessert. Mit diesem Inhibitor wurde anschließend das Enzym kokristallisiert und die Kristallstruktur in der aktiven Form der β -Lactamase gelöst. Weitere Versuche, den Inhibitor durch die neuen Kenntnisse zu optimieren, die durch die Struktur vorhanden waren, führten jedoch zu keinen besseren Inhibitoren.

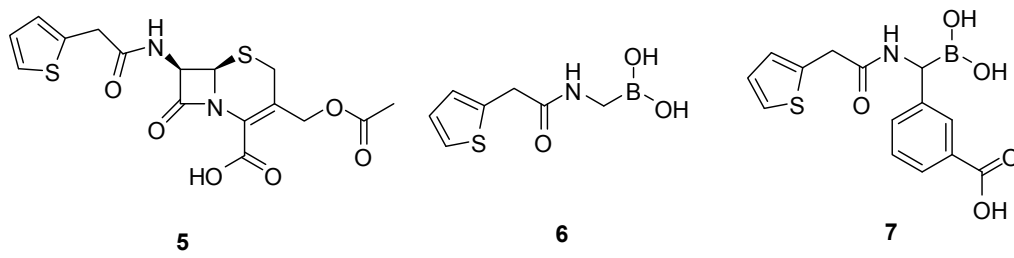


Abbildung 14: Cephalothin und abgeleitete Boronsäureinhibitoren für die β -Lactamase.

2.6 Synthese von Aminoboronsäuren

2.6.1 Synthese von α -Aminoboronsäuren über α -Haloboronsäureester

2.6.1.1 Geschichte und Entwicklung der Chemie der α -Haloboronsäureester

Die erste Borverbindung mit einem α -Haloalkylrest wurde im Jahre 1957 von Goubeau *et al.* veröffentlicht.^[67] In einer radikalischen Reaktion wurde in der Gasphase Bortrifluorid mit Diazomethan umgesetzt (Abbildung 15). Das erhaltene Produkt Difluoro(fluoromethyl)boran (**10**) ist jedoch bei Temperaturen über 20 °C instabil. Die ersten α -Haloboronsäureester wurden zwei Jahre später ebenfalls radikalisch präpariert. Tetrachlormethan wurde mit Dibutylvinylboronat und Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) als Radikalstarter umgesetzt. Dies führte zu Additionsprodukten (z. B. **12**) von Tetrachlormethan an die Doppelbindung. Die Reaktion war ebenfalls mit Bromtrichlormethan erfolgreich.^[68]

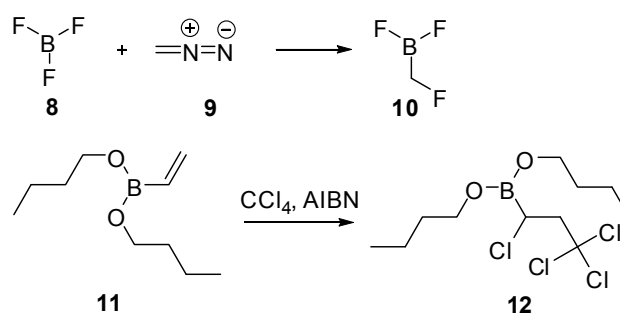
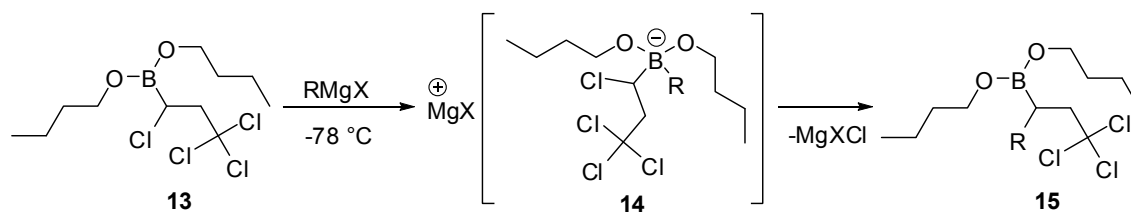


Abbildung 15: Die ersten Synthesen von α -halogenierten Bororganen wurden mittels Radikalreaktionen durchgeführt.

1966 wurden von Pasto *et al.* die ersten α -Haloborverbindungen als Intermediate bei der Hydroborierung von Vinylhalogeniden vorgestellt. Die Produkte waren jedoch hochreaktiv und zeigten entweder eine Rückreaktion oder es gab einen Austausch zwischen dem Halogenid mit einem Alkylrest am Bor.^[69]

Jedoch konnte in einer späteren Arbeit gezeigt werden, dass diese reaktiven Intermediate in Reaktionen als Edukte eingesetzt werden können. So gelang z. B. die Durchführung einer Grignardaddition an diesen Systemen (Abbildung 16). Dabei verläuft die Reaktion über die Bildung eines Boratkomplexes, gefolgt von einer nucleophilen Substitution, bei der das Halogenid durch den Alkylrest ersetzt wird. Als Produkte können dann sekundäre Alkylboronsäureester **15** isoliert werden.^[70]

Abbildung 16: Grignardaddition an α -Haloboronsäureester.

Die Synthese von β -Bromoboronen konnte durch die radikalische Addition von Bromwasserstoff an Vinylboronat erreicht werden (Abbildung 17). Durch eine Bromierung mit elementarem Brom von Dibutylethylenboronat (**11**) war es dabei möglich, Dibutyl- α,β -dibromoethylboronat (**16**) herzustellen.^[71] Anschließend wurde das Produkt mit Natriumbutanoat umgesetzt, wobei jedoch keine Umlagerung des Alkoxyrests beobachtet werden konnte; stattdessen trat eine Eliminierung von Vinylbromid (**20**) auf.

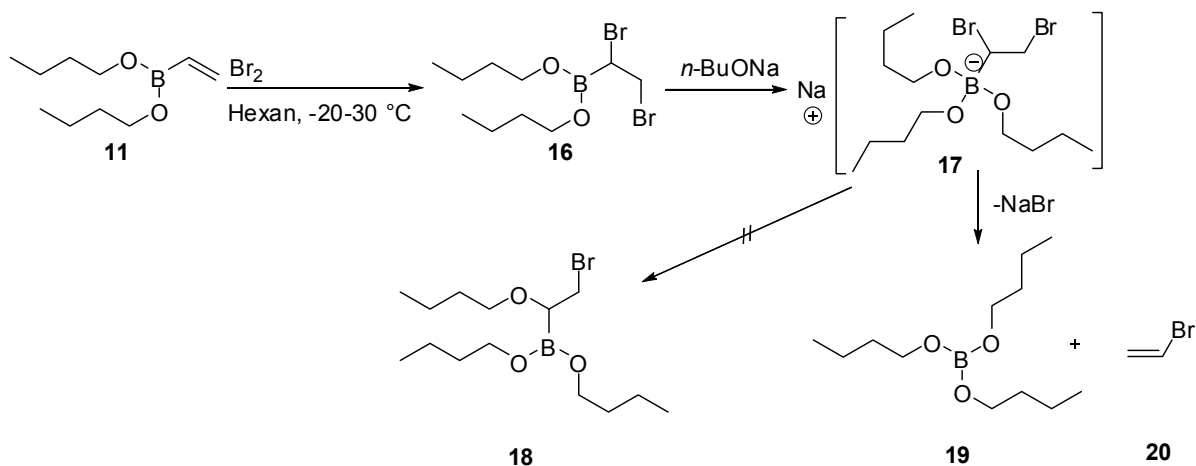


Abbildung 17: Bromierung von Dibutylethylenboronat und anschließende Umsetzung mit Natriumbutanoat.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, α -Haloboronsäureester durch ionische Addition von Halogenwasserstoff an 2-(1-Alkenyl)boronsäureester **21** (Abbildung 18) zu synthetisieren. Bei der Addition von Iodwasserstoff an Dipropylvinylboronat wurde eine Mischung im Verhältnis von 3:2 von α -Iod- und β -Iodboronsäureester erhalten.^[72] Der analoge α -Bromboronsäureester **22**, der durch Addition von Bromwasserstoff gewonnen werden konnte, wurde weiterhin auf seine chemische Reaktivität untersucht. Beispielsweise konnte der Bromboronsäureester mit Natriumiodid in den entsprechenden Iodboronsäureester **23** umgewandelt werden. Außerdem reagierte das Edukt mit Alkoholen unter Eliminierung von HBr zum α -Alkoxyboronsäureester **24**.

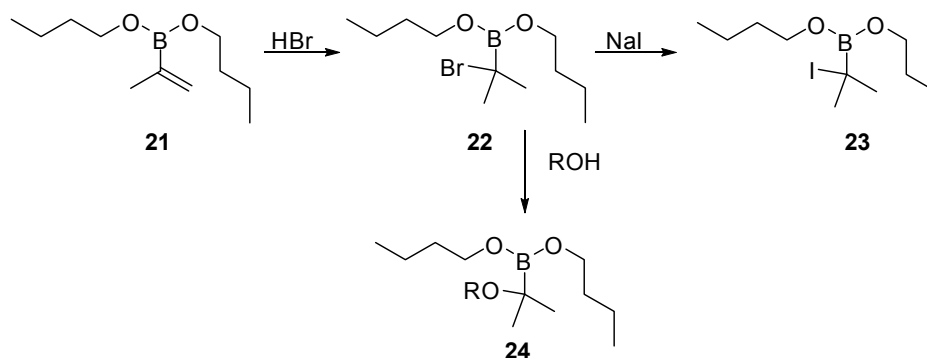


Abbildung 18: Ionische Addition von HBr an 2-(1-Propylen)dibutylboronsäureester und Folgereaktionen.

Viele der bisher gezeigten Synthesen wurden anschließend auf cyclische Boronsäureester übertragen. Diese Reaktionen brachten oft bessere Ausbeuten, weil die Handhabung cyclischer Boronsäureester aufgrund ihrer höheren Stabilität einfacher ist, denn aufgrund des Chelateffektes sind cyclische Boronsäureester im Allgemeinen stabiler als ein Ester mit zwei nicht verbrückten Alkoholen.

Die Darstellung von α -Chlorboronsäureestern durch Hydroborierung erfordert spezielle Edukte. Da es sich bei der Hydroborierung um eine Reaktion handelt, die das anti-Markovnikovprodukt bildet, sind stark substituierte Reste erforderlich. Ein typisches Beispiel von Pasto *et al.* ist in Abbildung 19 gezeigt.^[73]

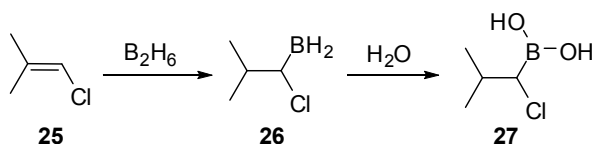


Abbildung 19: Hydroborierung von 1-Chlor-2-methyl-propen.

α -Haloboronsäureester können auch durch Substitution von Halogeniden an Kohlenstoffen mit Metallorganen synthetisiert werden. Zum Beispiel kann Tetrachlorkohlenstoff (**28**) mit mehreren Äquivalenten Chlordimethylboronsäureester (**29**) umgesetzt werden (Abbildung 20). Dazu wird elementares Lithium gebraucht. Im ersten Schritt der Reaktion erfolgt ein Halogen-Metall-Austausch am Tetrachlorkohlenstoff, danach findet eine Metathese unter Abspaltung von Lithiumchlorid statt. Um ein stabiles Produkt zu erhalten, wird zum Schluss der Dimethyl- durch einen Pinakolester **31** ersetzt.^[74] Die analoge Reaktion ist auch mit Chloroform möglich.

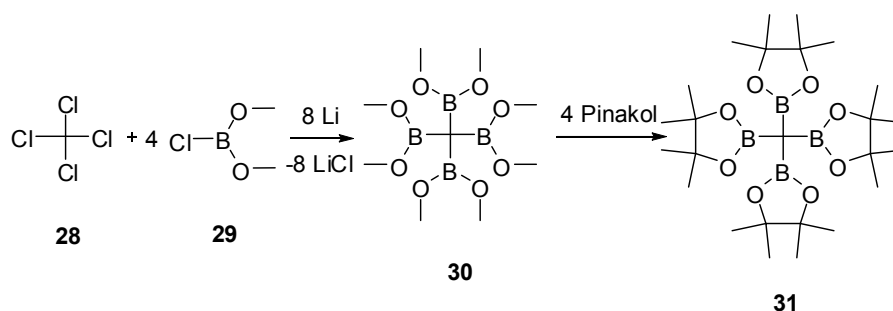
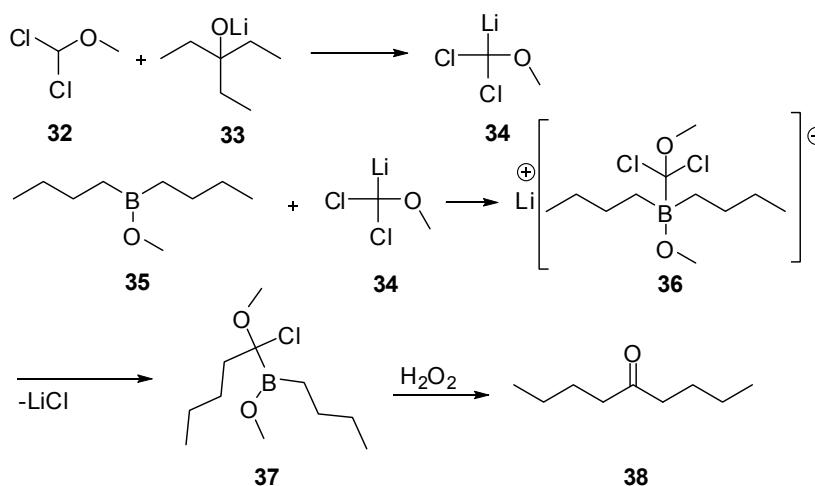


Abbildung 20: Umsetzung von Tetrachlorkohlenstoff mit Chlordimethylboronsäureester und Lithium.

Eine heute weit verbreitete Methode zur Synthese von α -Haloboronsäureestern ist die Insertion eines Kohlenstoffs in eine bestehende Bor-Kohlenstoff-Bindung. Als erstes wurde eine solche Reaktion von Carlsen *et al.* berichtet, der hierzu Borinsäureester **35** verwendete.^[75] Bei dieser Reaktion wurden beide Butylgruppen auf den Kohlenstoff übertragen. Eine anschließende oxidative Hydrolyse mit Wasserstoffperoxid ergab dann das entsprechende Keton **38**.

Abbildung 21: Ketonsynthese aus einer Borinsäure nach Carlsen *et al.*.^[62]

Die erste Insertion in eine Bor-Kohlenstoff-Bindung bei einem Boronsäureester wurde 1980 von Matteson *et al.* veröffentlicht.^[76] In dieser Synthese wurde Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium (**40**) durch Lithierung von (Chlormethyl)trimethylsilan (**39**) mit ^{sec}BuLi hergestellt und mit dem Ester **41** aus *n*-Butylboronsäure und Ethylenglycol umgesetzt (Abbildung 22). Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium (**40**) ist dabei durch den α -Effekt des Siliciums besonders stabilisiert (der α -Effekt bewirkt, dass in Nachbarschaft zu einem Siliciumatom Anionen besonders stabil sind). Im ersten Schritt der Insertion wird dann ein Boratkomplex gebildet, der letztendlich durch eine Umlagerung unter Abspaltung von

Lithiumchlorid zum Produkt **42** führt. Die Bildung des Salzes sorgt dafür, dass die Reaktion insgesamt exotherm verläuft.

Durch diese Reaktion wird somit ein C-1-Fragment in die Bor-Kohlenstoff-Bindung inseriert. Nach Abspaltung der Kohlenstoffkette ist diese daher um ein Kohlenstoffatom länger. So ist es möglich, diese Methode allgemein zur Synthese größerer Moleküle zu verwenden.

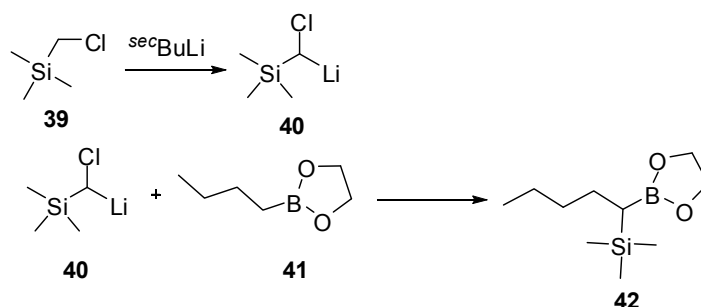
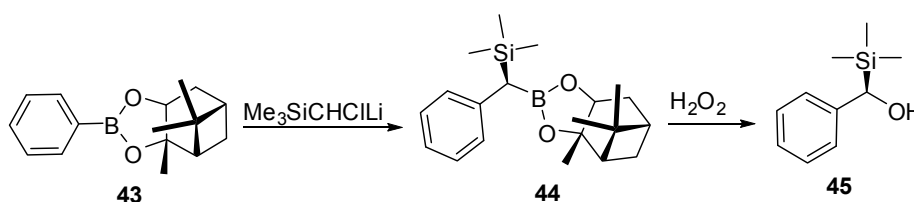


Abbildung 22: Erste publizierte Insertion eines Carbanions in eine Bor-Kohlenstoff-Bindung eines Boronsäureesters.

Bei der Insertion entsteht somit ein Stereozentrum. Für die asymmetrische, organische Synthese ist es somit entscheidend, die Stereochemie der Reaktion beeinflussen zu können. Es gibt mehrere Möglichkeiten, Reaktionen stereoselektiv ablaufen zu lassen, wie z. B. enantioselektive Katalysen oder Synthesen mit Hilfe von Auxiliaren. Als besonders geeignet hierzu haben sich für die Insertionen die Verwendung chiraler Diol-Auxiliare herausgestellt, welche mit der Boronsäure verestert werden können. Besonders häufig wird hierzu (+)- und (-)-Pinandiol verwendet.^[77] Die chiralen Auxiliare können aus den entsprechenden bicyclischen Monoterpenen (+)- und (-)-Pinen durch Dihydroxylierung mit Osmiumtetroxid synthetisiert werden.^[78, 79] Die Insertion des C₁-Fragments Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium in einen Phenylboronsäurepinandiolester **43** wurde 1983 von Tsai *et al.* publiziert (Abbildung 23).^[80]



Diastereomerenverhältnis: 73:27

Abbildung 23: Enantioselektive Insertion mit Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium.

Die Trimethylsilylgruppe bietet jedoch nicht viele Möglichkeiten, diese Boronsäurester für die Synthese komplexerer Moleküle zu verwenden. Die Silicium-Kohlenstoff-Bindung ähnelt stark reinen Kohlenstoffbindungen und ist somit sehr stabil und schwierig in andere funktionelle Gruppen zu transferieren. So kann sie z. B. mit starken Säuren gespalten werden; in dieser Reaktion wird die Silylgruppe jedoch durch ein Proton ersetzt, wodurch das Stereozentrum wieder verloren geht. Durch eine Reaktion mit Iodchlorid ist es hingegen möglich, die Silylgruppe durch ein Iodatomelektrophil zu substituieren.^[81]

Um eine Methylengruppe in eine Bor-Kohlenstoff-Bindung zu insertieren, wird als entsprechendes Reagenz (Chlormethyl)lithium (**47**) benötigt. Es lässt sich mittels eines Halogen-Metall-Austauschs von Chloriodmethan (**46**) *in situ* darstellen, und anschließend analog zum Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium für Insertionen verwenden (Abbildung 24).^[82] Während Insertionen häufig Temperaturen von $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ benötigen, können diese Reaktionen bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder sogar leicht höheren Temperaturen durchgeführt werden.

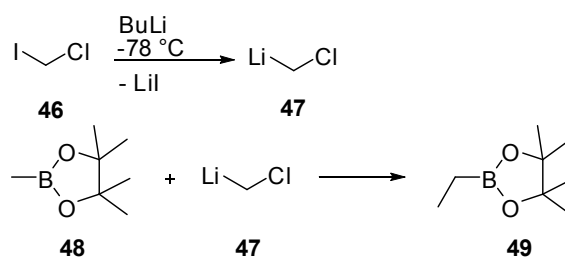


Abbildung 24: Darstellung von (Chlormethyl)lithium aus Chloriodmethan und die Insertion des Reagenzes in den Methylboronsäurepinakolester.

Die Verlängerung der Kohlenstoffkette kann auch zur Vergrößerung von cyclischen Borinsäureestern **50** verwendet werden. Wird anstelle von (Chlormethyl)lithium (Dichlor(methoxy)methyl)lithium (**34**) eingesetzt, kann der Borinester zum Schluss sauer in das entsprechende Keton **52** überführt werden (Abbildung 25).

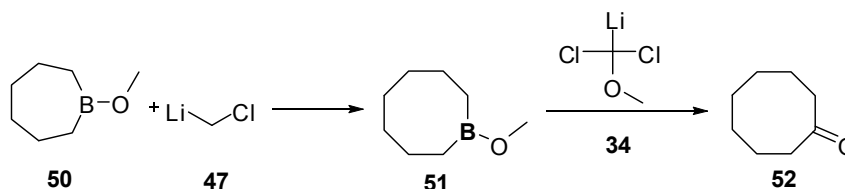


Abbildung 25: Synthese von Cyclooctanon über mehrere Insertionen aus 1-Methoxyborepan.

Der nächste entscheidende Schritt ist die Verwendung von (Dichlormethyl)lithium (**54**) für die Insertion in die Bor-Kohlenstoff-Bindung. Mit diesem Reagenz wird ein CHCl_2 -

Fragment in das Molekül eingebaut (Abbildung 26). Die erste derartige Synthese wurde von Köbrich *et al.* 1967 veröffentlicht.^[83]

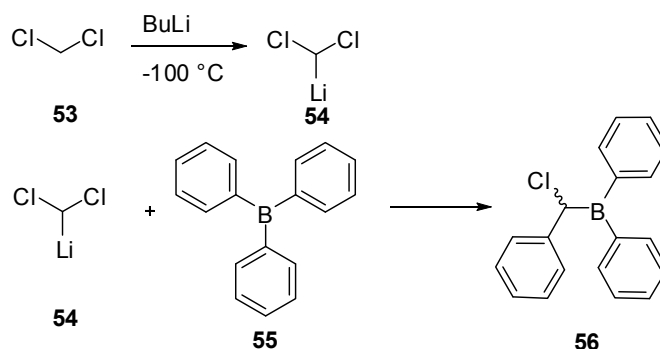


Abbildung 26: Insertion von (Dichlormethyl)lithium in die Bor-Kohlenstoffbindung von Triphenylboran.

Diese Methode kann in der organischen Synthese zur Darstellung von Aldehyden genutzt werden (Abbildung 27). Dafür wird (Dichlormethyl)lithium (54) mit Trimethylborat (57) umgesetzt. Anschließend wird das Produkt in einen stabileren Isopropylester 59 umgewandelt. Im nächsten Schritt wird ein Lithiumorganyl 60 an den Boronsäureester 59 addiert. Nach der Bildung des Boratkomplexes und unter Eliminierung von Lithiumchlorid lagert der Rest um. Die Bor-Kohlenstoff-Bindung wird anschließend oxidativ gespalten. Das hieraus entstehende Produkt 61, das am insertierten Kohlenstoff sowohl eine Hydroxylgruppe als auch ein Chlor trägt, ist instabil und lagert somit zum erwünschten Aldehyd 62 um. Die Synthese ist damit geeignet, um aus einem Lithiumorganyl einen um einen Kohlenstoff verlängerten Aldehyd zu synthetisieren.^[84]

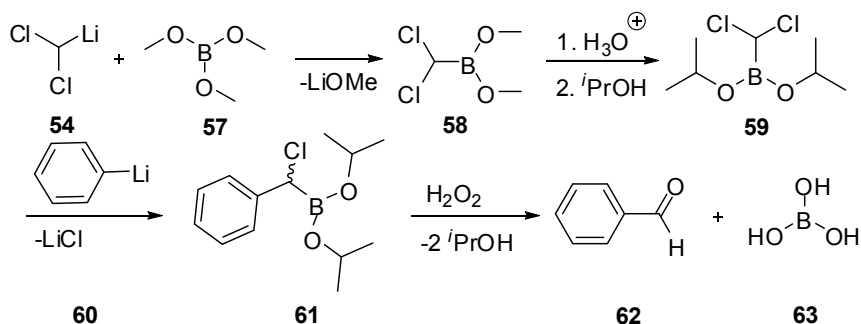


Abbildung 27: Synthese von Benzaldehyd aus Phenyllithium.

Wie bereits dargestellt, ist es möglich, mit Pinandiolester die Stereochemie bei der Insertion von Trimethylsilyl(chlormethyl)lithium in eine Bor-Kohlenstoff-Bindung zu kontrollieren. Diese stereoselektive Kontrolle kann auch bei der analogen Insertion mit (Dichlormethyl)lithium eingesetzt werden. Die dabei am häufigsten verwendeten enantiomeren Auxiliare sind zum einen (+)-(1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-Pinandiol und zum anderen (-)-

(1*R*,2*R*,3*S*,5*R*)-Pinandiol. Zur Vereinfachung wurde zunächst nur von (+)- und (-)-Pinandiol gesprochen. Jedoch ist die Drehung der Rotationsebene des Lichts bei diesem Molekül abhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Das (+)-Enantiomer dreht die Rotationsachse in Toluol nach rechts und in Methanol nach links. Daher wird heutzutage eine spezielle Nomenklatur verwendet, bei der (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*) zu (*s*) und (1*R*,2*R*,3*S*,5*R*) zu (*r*) wird.^[85]

Ein Beispiel für eine stereoselektive Synthese durch Insertion von (Dichlormethyl)lithium (**54**) unter Verwendung von (*s*)-Pinandiol als chiralem Auxiliar ist die Darstellung von (*S*)-(-)-1-Phenylethanol (**67**) (Abbildung 28). Die Synthese geht von (*s*)-Pinandiolphenylboronat (**43**) aus, das im ersten Schritt mit (Dichlormethyl)lithium (**54**) umgesetzt wird, wodurch ein α -Chloroboronsäureester **64** entsteht. Das Chlorid wird anschließend mittels Grignard-Addition ersetzt. Oxidative Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid führt zum gewünschten Produkt **67**. Erste Versuche, die Synthese stereoselektiv durchzuführen, schlugen jedoch fehl. Das Chloridion, das bei der Synthese frei wurde, konnte während der Insertion am Stereozentrum vorhandenes Chlor nucleophil substituieren. So bildete sich ein Racemat. Durch eine zügige Einführung der Methylgruppe konnte das Produkt am Ende mit einem Enantiomerenüberschuss von 93-96 % erhalten werden.^[77]

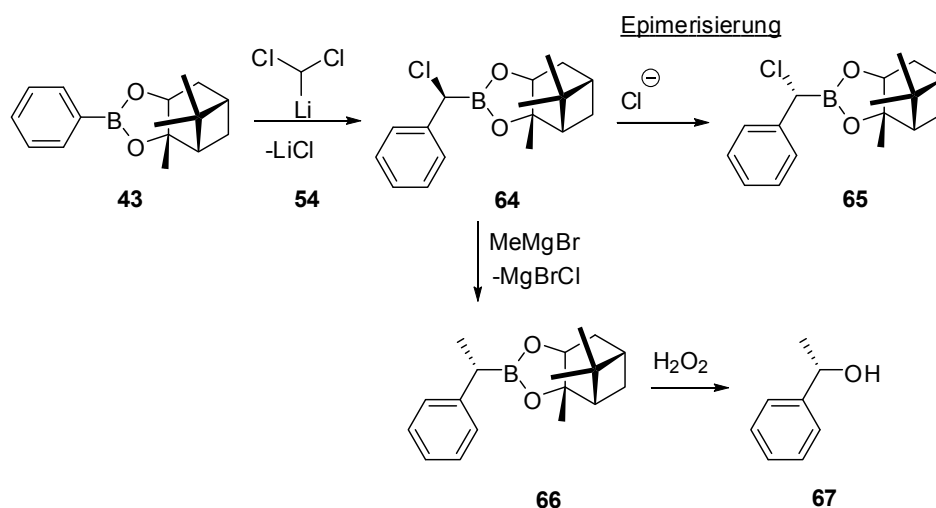


Abbildung 28: Synthese von (*S*)-(-)-1-Phenylethanol.

Das Problem der Epimerisierung durch frei werdendes Chlorid wurde weiter untersucht und es konnte für die Reaktion mittels kinetischer Experimente eine Kinetik erster Ordnung in Bezug auf die Konzentration der Chloridionen bestimmt werden.^[86] Eine Reduktion dieser unerwünschten Nebenreaktion konnte durch Zugabe geringer Mengen ionisierender Lösungsmittel wie Wasser oder Dimethylsulfoxid erreicht werden. Man nimmt

an, dass die zugegebenen Wassermoleküle dabei eine Hydrathülle um das Chloridion bilden, wodurch die Nucleophilie des Ions stark abnimmt. Einen ähnlichen Effekt erwartet man auch bei der Verwendung von Dimethylsulfoxid. Effizienter erwies sich jedoch die Zugabe von ausgewählten Metallkationen, welche mit Chloridionen einen stabilen Komplex bilden. Als Komplexbildner für die Chloridionen wird meistens Zink(II)chlorid verwendet, welches mit den abzufangenden Chloridionen Komplexe wie z. B. $\text{Li}[\text{ZnCl}_3]$ oder $\text{Li}_2[\text{ZnCl}_4]$ bildet. So wird ebenfalls die Nucleophilie der Chloridionen stark gesenkt. Die kinetischen Daten wurden im Folgenden durch den praktischen Einsatz von Zinkchlorid in Insertionsreaktionen deutlich bestätigt. Durch die Zugabe des Salzes kann die Epimerisierung nahezu vollständig verhindert werden, so dass Diastereomerenverhältnisse von 99 % erreicht wurden (Abbildung 29).

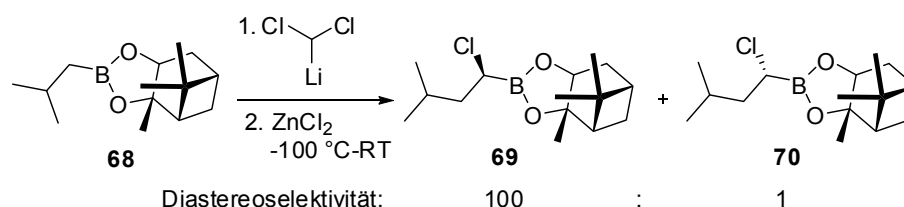
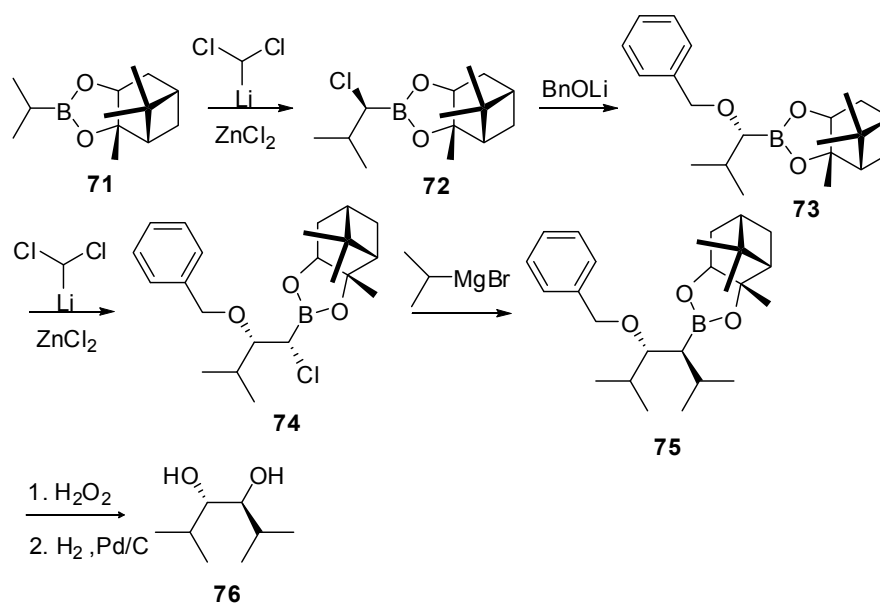


Abbildung 29: Vermeidung der Epimerisierung von α -Chlorboronsäureestern durch Zugabe von Zinkchlorid.

Neben Pinandiol gibt es weitere chirale Auxiliare, die für die hier beschriebenen stereoselektiven Insertionen verwendet werden können. So wurde z. B. Diacetonmannitol von Matteson *et al.* getestet, allerdings mit nur wenig Erfolg.^[87] Die Produkte waren abhängig von den verwendeten Boronsäureestern häufig racemisch oder es gab nur schwache Diastereoselektivitäten. Auch die Verwendung von Weinsäureestern ist häufig wenig erfolgreich. Dagegen erwies sich 1,2-Diisopropylethandiol (**76**, DIPED), ein C_2 -symmetrisches chirales Auxiliar, als gut geeignet, da es in Wasser stabile Boronsäureester bildet und hohe Diastereoselektivitäten liefert. Interessanterweise kann dieses Auxiliar auch mittels der hier beschriebenen Matteson-Chemie (Abbildung 30) oder alternativ von Weinsäure ausgehend synthetisiert werden (Abbildung 31).

Abbildung 30: Synthese von DIPED nach Matteson.^[85]

Die Literatur-beschriebene Synthese von DIPED aus Dimethyltartrat (**77**) beginnt mit der Schützung des Diols mit einer Ketalgruppe.^[88] Anschließend wurden die Methylester durch doppelte Addition von Methylmagnesiumbromid in die tertiären Alkohole umgewandelt, die mit Hilfe von Trimethylchlorsilan acetyliert wurden. Das acetylierte Produkt **80** wurde anschließend einer Pyrolyse unterworfen, um die Acetatgruppen zu eliminieren. Für die folgende Hydrierung der Doppelbindungen mit Wasserstoff wurde Rhodium auf Aluminium als heterogener Katalysator verwendet. Die abschließende saure Hydrolyse der Acetalschutzgruppe lieferte dann das einsatzfähige Auxiliar **76** mit hoher Diastereoselektivität.^[89]

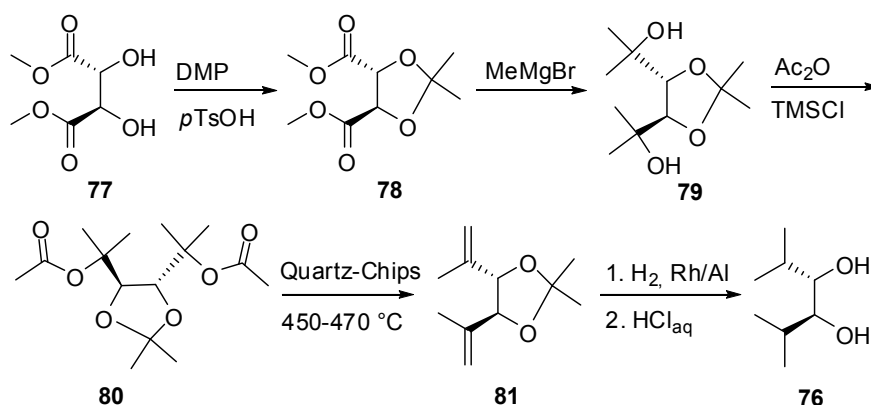


Abbildung 31: Synthese von DIPED aus Dimethyltartrat.

Ein weiteres viel verwendetes chirales Diol ist Dicyclohexylethandiol. Dieses Auxiliar wurde z. B. in der Totalsynthese von Mycinolid V verwendet.^[90] In dieser Synthese wird ein Benzylalkohol-Derivat **85** aus einem Dichlormethylboronsäureester **82** hergestellt (Abbildung

32). Im ersten Schritt wurde hierzu mit Methylolithium stereoselektiv eine Methylgruppe nucleophil in das Molekül integriert. Danach wurde das zweite Chlorid mit *E*-Prop-1-enyllithium substituiert. Derartige Boronsäureester können stereoselektiv mit Aldehyden umgesetzt werden, wobei der Alkylrest nucleophil an den Aldehyd addiert. Der dargestellte Alkohol **85** konnte mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % erhalten werden.

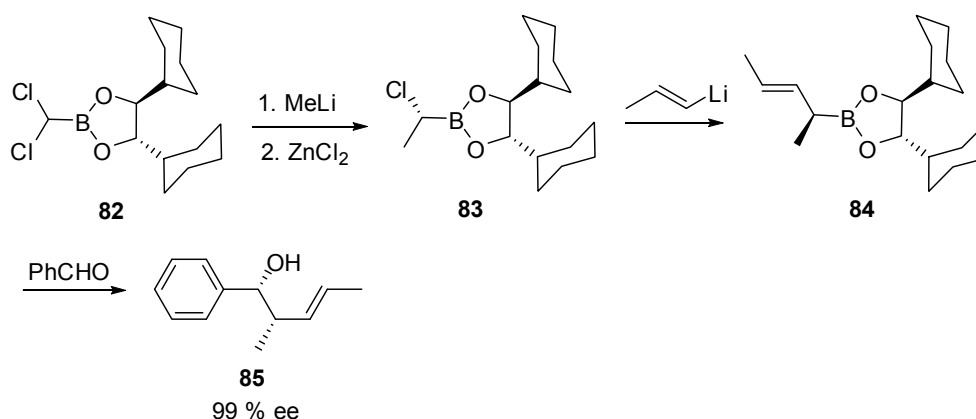


Abbildung 32: Synthese eines Bausteins der Totalsynthese von Mycinolid V.

2.6.1.2 Synthese der α -Aminoboronsäuren

Aminoboronsäuren als Bausteine wichtiger Enzyminhibitoren besitzen im Vergleich zu den „normalen“ Aminosäuren an Stelle der Carbonsäure eine Boronsäure. Die Synthese der α -Aminoboronsäuren ist eine wichtige Anwendung der hier vorgestellten Chemie, die vor allem auf den Arbeiten von Matteson *et al.* beruht. Beispielhaft soll die stereoselektive Synthese der Aminoboronsäuren am Beispiel von L-BoroValin (**91**) erläutert werden. Als Ausgangsmaterial für diese Aminoboronsäure wird normalerweise Isopropylboronsäure (**86**) verwendet, welches im ersten Schritt der Synthese mit (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-Pinandiol (**87**) verestert wird (Abbildung 33). Nach der Insertion eines CHCl-Fragments wird das Chlorid dann nucleophil mit Lithiumhexamethyldisilazan substituiert. Nach der unter trockenen Bedingungen durchgeführten aciden Abspaltung der Trimethylsilylgruppen mit Chlorwasserstoff in Dioxan, kann mit Bortrichlorid der Pinandiolester **90** gespalten werden, so dass das Hydrochloridsalz des BoroValins (**91**) isoliert werden kann.^[91]

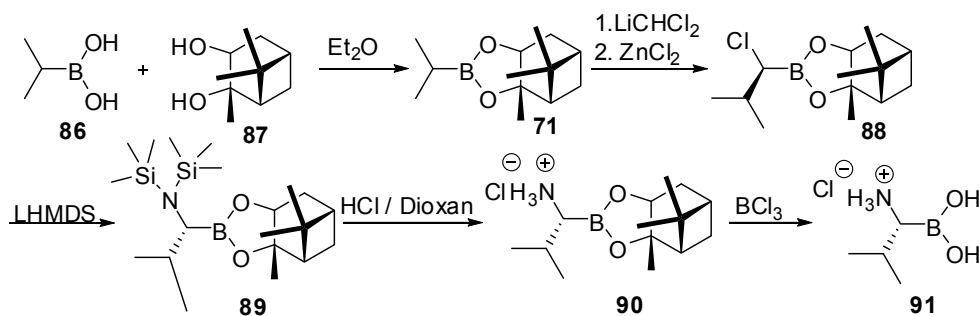


Abbildung 33: Synthese der Aminoboronsäure BoroValin.

2.6.1.3 Weitere Anwendungen

Neben der Synthese von Aminoboronsäuren gibt es eine ganze Reihe weiterer Verwendungsmöglichkeiten von α -Haloboronsäureestern in der organischen Synthese, wovon einige beispielhaft hier vorgestellt werden sollen. Die stereoselektive Verlängerung von Kohlenstoffketten bietet eine große Zahl an Einsatzmöglichkeiten. Das Halogenid am α -C-Atom kann in der Synthese durch verschiedene Nucleophile unter Inversion des Stereozentrums substituiert werden. So können durch Kohlenstoffnucleophile wie Magnesium- oder Lithiumorganyle C-C-Bindungen geknüpft, aber auch andere Nucleophile wie Azide oder Alkohole verwendet werden. Die „Unterstützung“ des Bors bei nucleophilen Substitutionen erlaubt dabei auch die Verwendung schwacher Nucleophile.

Bor kommt nur selten in Naturstoffen vor. Daher sind die Produkte dieser hier vorgestellten Chemie häufig Synthesebausteine, die vielseitig weiterverwendet werden können. Boronsäuren und Boronsäureester können z. B. als wertvolle Edukte für Palladium-katalysierte Suzuki-Kupplungen benutzt werden.^[92] Außerdem sind chirale Allyladditionen an Aldehyde und Ketone bekannt, die von Brown *et al.* entwickelt wurden.^[93] Die gebräuchlichste Anwendung derartiger Boronsäureester ist die oxidative Spaltung mit Hydroperoxid zur Synthese von Alkoholen.

Es gibt einige Beispiele für Totalsynthesen, in denen die Stereoselektivität auf der Synthese von stereoreinen α -Haloboronsäureestern beruht. Als Beispiel kann die Synthese des Naturstoffes (3*S*,4*S*)-4-Methyl-3-heptanol (97) herangezogen werden. Dieses Molekül ist ein Insektenpheromon des Borkenkäfers *Scolytus multistriatus*. Die Literatur-beschriebene Synthese verwendet dabei als Startmaterial (s)-Pinandiolpropylboronat (92). Nach der Reaktion mit (Dichlormethyl)lithium wurde das Chlorid mit Methylmagnesiumbromid substituiert. Es folgte eine erneute Insertion eines CHCl-Fragments und eine weitere Grignard-Reaktion mit Ethylmagnesiumbromid. Die oxidative Spaltung der Kohlenstoff-Bor-

Bindung lieferte schlussendlich den gewünschten Alkohol **97** in einer Gesamtausbeute von 58-63 %.^[94]

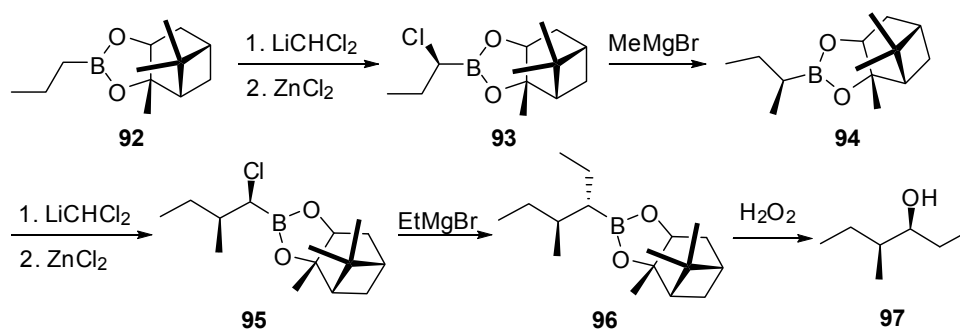


Abbildung 34: Synthese des Insektenpheromons (3S,4S)-4-Methyl-3-heptanol.

Ein weiteres Beispiel für die Verwendung der Matteson-Chemie ist eine Synthese von L-Ribose (**109**), die in Abbildung 35 gezeigt wird.^[95] In dieser Synthese wurde als Reagenz zur Insertion (Dibrommethyl)lithium (**100**) verwendet. Dieses Reagenz lässt sich nicht analog zu dem üblicherweise angewandten Reagenz (Dichlormethyl)lithium durch Deprotonierung von Dibrommethan (**98**) mit Butyllithium darstellen. Daher wurde Lithiumdiisopropylamid (**99**) verwendet. Auch die letzte Insertion in der Reaktionssequenz stellte sich als schwierig heraus. Der direkte Weg zum Produkt wäre die Insertion eines weiteren CHBr-Fragments gewesen. Nach oxidativer Spaltung der Kohlenstoff-Bor-Bindung sollte das Kohlenstoffatom C₁ sowohl eine Hydroxylgruppe als auch das Brom tragen. Solche Verbindungen sind jedoch instabil und lagern gewöhnlich zum entsprechenden Aldehyd um. Diese Reaktion brachte jedoch nur sehr geringe Ausbeuten, so dass der Umweg über die zusätzliche Swern-Oxidation gewählt wurde.

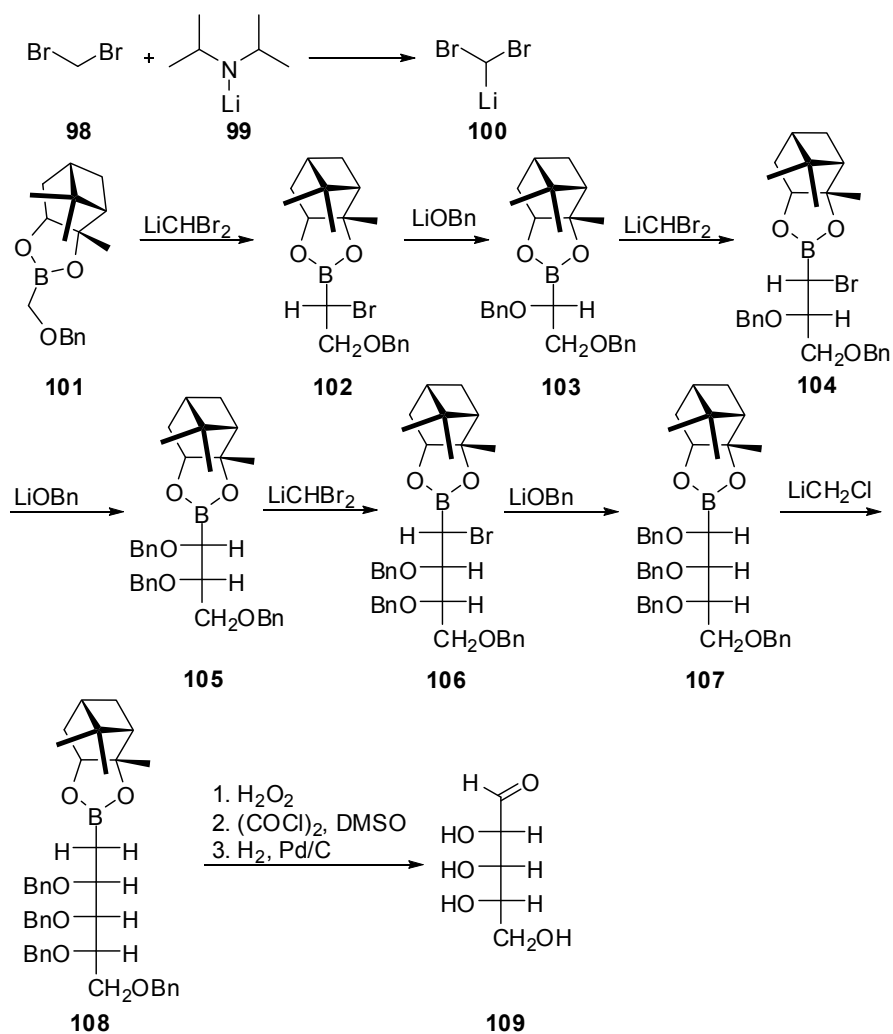


Abbildung 35: Boronsäureester-vermittelte Synthese von L-Ribose.

Eine weitere vielseitige Anwendung besteht in der enantioselektiven Synthese von Aminosäuren.^[96] Proteinogene Aminosäuren werden im Normalfall in der heutigen Zeit nicht synthetisiert, jedoch werden für verschiedene biologische Anwendungen modifizierte Aminosäuren benötigt. So gibt es Naturstoffe, die derartige Aminosäuren enthalten. Beispielhaft soll an dieser Stelle die Synthese von L-Phenylalanin (**114**) gezeigt werden (Abbildung 36). Als Edukt für eine solche Boronsäure-basierte Synthese wurde Pinandiolbenzylboronsäureester (**110**) verwendet. Der erste Schritt dieser Synthese war dann die klassische Insertion eines CHCl -Fragments in die Bor-Kohlenstoff-Bindung. Das Chlorid wurde anschließend nucleophil mit einem Azid substituiert. Um Epimerisierungen zu vermeiden, wurde ein 50facher Überschuss an Natriumazid, als Phasentransferkatalysator Methyltrioctylammoniumchlorid und als Lösungsmittel ein Gemisch aus Wasser und Dichlormethan verwendet. Es folgte eine weitere Insertion mit (Dichlormethyl)lithium. Die anschließende Spaltung der Bor-Kohlenstoff-Bindung mit Natriumchlorit lieferte die freie Carbonsäure, deren N-Terminus zum Schluss vom Azid zum Amin mit Wasserstoff und

Palladium auf Aktivkohle reduziert wurde, um dann die erwünschte Aminosäure L-Phenylalanin (**114**) zu erhalten.

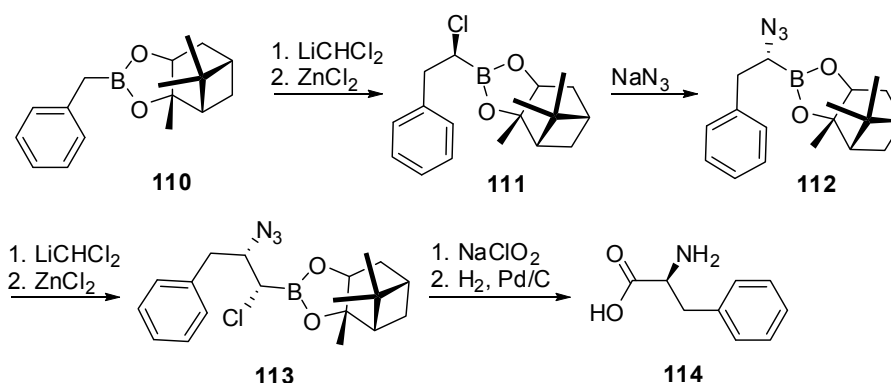
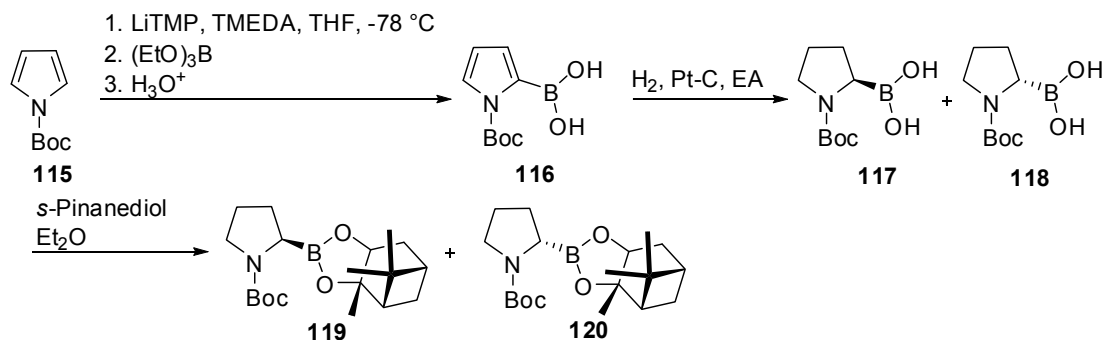


Abbildung 36: Synthese von L-Phenylalanin.

2.6.2 Weitere Synthesen von α -Aminoboronsäuren

Aufgrund des steigenden Interesses an Aminoboronsäuren für verschiedene biologische Anwendungen wurden in den letzten Jahren weitere Synthesen von Aminoboronsäuren entwickelt, die als Alternativen zur klassischen Matteson-Chemie dienen können. Einige dieser Synthesen sollen hier nun beispielhaft vorgestellt werden.

1996 veröffentlichten Coutts *et al.* eine stereoselektive Synthese von BoroProlin (Abbildung 37).^[55] Im ersten Schritt wurde hierzu Boc-geschütztes Pyrrol (**115**) lithiiert. Das Lithiumorganyl wurde anschließend mit Triethylboran umgesetzt. Eine saure hydrolytische Aufarbeitung gefolgt von einer heterogenen Reduktion der Doppelbindungen lieferte dann racemisches Boc-geschütztes BoroProlin (**117**, **118**). Zur Trennung der Enantiomere wurde das Racemat anschließend mit *s*-Pinandiol umgesetzt, wodurch eine Trennung der diastomeren Boronsäureester (**119**, **120**) mittels Umkristallisation möglich wurde.^[97] Als Edukt der Synthese konnte ebenfalls Boc-geschütztes Pyrollidin verwendet werden. Als Lithierungsreagenz wurde dann jedoch $^{sec}\text{BuLi}$ benötigt. Die Hydrierung der Doppelbindungen entfiel jedoch in dieser Reaktionssequenz.



Diastereomere mittels Umkristallisation trennbar

Abbildung 37: Synthese von BoroProlin mittels Lithiierung.

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von α -Aminoboronsäuren ist eine Übergangsmetall-katalysierte Addition von Bis(pinacolato)diboron (**122**) an CN-Doppelbindungen.^[98] Diese Reaktion erfordert jedoch eine notwendige Spaltung der bei der Reaktion auch entstehenden NB-Bindungen unter Erhalt der gewünschten CB-Bindung.^[99]

Nichtsdestotrotz wurde diese Reaktion in den letzten Jahren weiterentwickelt und Beenen *et al.* konnten vor kurzer Zeit eine enantioselektive Variante berichten (Abbildung 38).^[100] Bei dieser Methode wurde Bis(pinacolato)diboron (**122**) an ein *N*-^tButansulfinylaldimin-Derivat (**121**) (mit dem Sulfinylrest als chirales Auxiliar) stereoselektiv addiert. Das chirale Auxiliar konnte nach der Reaktion dann mit 4 M Chlorwasserstoff in Dioxan abgespalten werden. Exemplarisch wird in Abbildung 38 die Synthese von BoroPhenylalanin nach dieser Methode gezeigt. Der verwendete Kupferkatalysator (**125**) wurde dabei ursprünglich von Laitar *et al.* für die Diborierung von Aldehyden entwickelt.^[101]

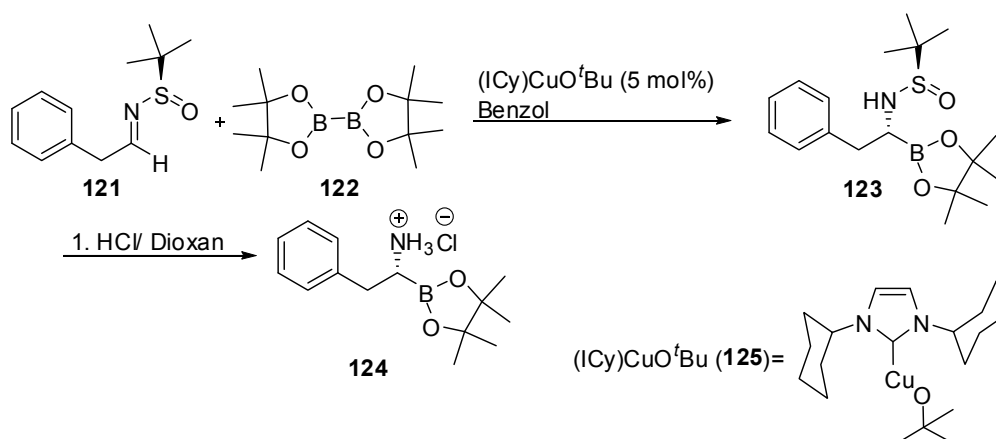


Abbildung 38: Synthese von BoroPhenylalanin nach Beenen *et al.*.^[100]

2.7 Festphasensynthese

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, wie α -Aminoboronsäuren synthetisiert werden können. Die Aminoboronsäuren können zur Darstellung selektiver Inhibitoren für Proteasen mit kurzen Peptiden gekuppelt werden. Für die Synthese dieser Peptide ist die Festphasensynthese prädestiniert, deren Grundzüge in diesem Kapitel kurz beschrieben werden sollen.

Die Anfänge der chemischen Synthese an der festen Phase gehen auf das Jahr 1963 zurück. Merrifield veröffentlichte in diesem Jahr die erste Synthese eines Tetrapeptids an einer festen Phase, welche auch heutzutage meistens ein Polystyrolharz ist.^[102, 103] Der große Vorteil einer Festphasenpeptidsynthese ist dabei die Möglichkeit, die Aufarbeitung einzelner Reaktionsschritte durch ein Waschen des Harzes durchzuführen, wodurch alle Reagenzien und nicht am Harz befindliche Nebenprodukte entfernt werden können. Diese Methodik ist im Vergleich zu säulenchromatographischen Aufreinigungen der einzelnen Stufen bei der Synthese längerer Peptide deutlich effizienter und auch mit weniger Ausbeuteverlust verbunden. Des Weiteren erlaubt ein solcher Ansatz die einfache Verwendung von Reagenzüberschüssen, wodurch die Ausbeuten in den einzelnen Kupplungs- bzw. Entschützungsritten signifikant erhöht werden.

Bei der Festphasensynthese wird auf einen polymeren Träger (häufig auch Harz genannt) über einen sogenannten Linker eine erste Aminosäure kovalent gekuppelt. Fast immer wird die Aminosäure dabei über den C-Terminus mit der festen Phase verbunden. Die Aminosäure ist hingegen am N-Terminus mit einer Schutzgruppe versehen, die sowohl zum Linker als auch zu eventuellen permanenten Schutzgruppen auf den Seitenketten orthogonal ist. Wenn die erste Aminosäure am Harz verankert ist, wird anschließend die N-terminale, transiente Schutzgruppe der Aminogruppe gespalten, ohne dass der Linker oder die Schutzgruppe auf der Seitenkette beeinflusst wird. Nach einem weiteren Waschschrift kann die nächste Aminosäure gekuppelt werden. So kann das erwünschte Peptid durch alternierende Kupplungs- und Entschützungsritte schnell und zuverlässig am Harz aufgebaut werden. Ist das Peptid am Harz vollständig assembliert, wird es dann mittels einer Abspaltung zeitgleich vom Harz abgespalten und die permanenten Schutzgruppen werden entfernt. Das synthetisierte Peptid kann nun mittels verschiedener chromatographischer Methoden, wie z. B. präparativer HPLC, aufgereinigt werden. Abbildung 39 zeigt schematisch den Aufbau eines Peptids an der festen Phase.

Um bei längeren Sequenzen nicht zu viele Verunreinigungen zu bekommen, ist es sehr wichtig, dass die Reaktionen am Harz mit nahezu optimaler Ausbeute durchgeführt werden.

Dafür werden erhöhte Mengen an Reagenzien eingesetzt. Standardmäßig werden hierzu z. B. vier Äquivalente der Aminosäuren und der Kupplungsreagenzien verwendet.

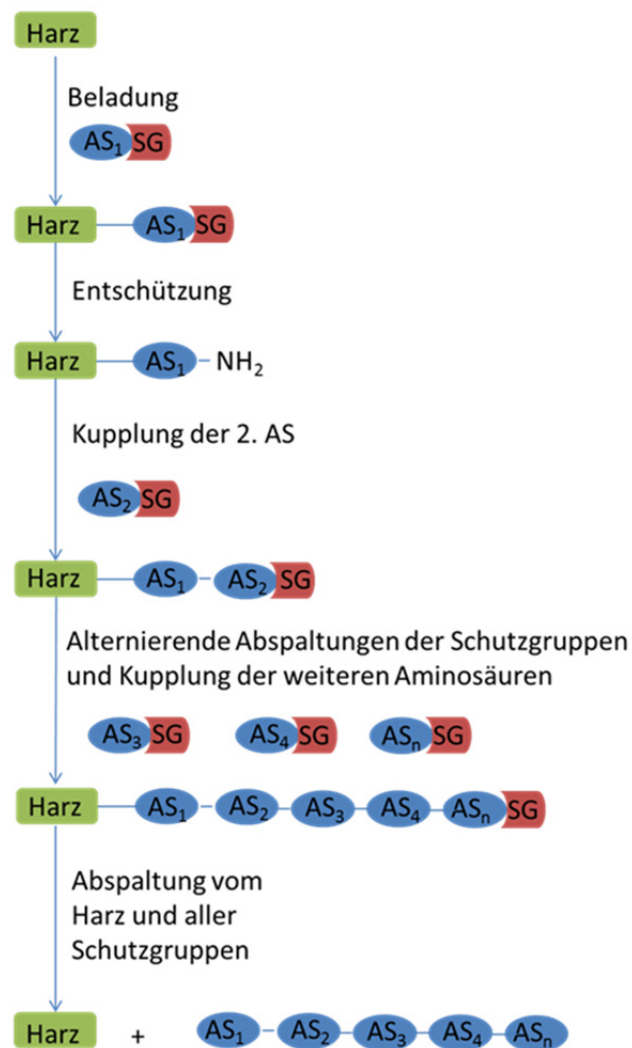


Abbildung 39: Schema der Peptidsynthese an der festen Phase.

Bei der Peptidsynthese an der festen Phase wird meistens ein Polystyrolharz als fester Träger verwendet. Das Harz wurde dabei aus Styrol und 1 % Divinylbenzol durch Suspensionscopolymerisation gewonnen. In verschiedenen Lösungsmitteln verhält sich ein solches Polymer unterschiedlich. In Dichlormethan oder in Dimethylformamid quillt das Harz stark auf, das heißt, das Volumen des Harzes vergrößert sich und das Lösemittel kann das Harz komplett durchdringen. Dieses Verhalten ähnelt einem Schwamm. Währenddessen zieht sich das Harz in Methanol stark zusammen. Dieser Wechsel kann beim Waschen genutzt werden, da ein Effekt erzielt wird, der vergleichbar mit dem Auswringen eines Schwammes ist.

Die Kupplung zweier Aminosäuren führt dann zur Bildung einer Amidbindung. Hierzu werden Kupplungsreagenzien verwendet, die die Säurefunktion aktivieren. Dazu muss die Hydroxylgruppe in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt werden. Das einfachste Mittel zur Aktivierung einer Carbonsäure ist die Synthese des Säurechlorids. Säurechloride können z. B. durch die Umsetzung der Säure mit Oxalylchlorid erhalten werden. Sie sind jedoch zum einen wasserempfindlich, zum anderen neigen sie zur Racemisierung am α -C-Atom. Unter den basischen Kupplungsbedingungen kann sich somit leicht das Enolat bilden, das dann von beiden Seiten wieder protoniert werden kann. Die Folge ist die Ausbildung von Racematen. Daher sind Säurechloride nicht besonders gut zur Synthese von Peptiden geeignet.

Heutzutage gibt es eine ganze Reihe von verschiedenen Aktivierungsreagenzien. Abbildung 40 zeigt beispielhaft die Strukturen einiger dieser Chemikalien. Als erste Gruppe sind die Carbodiimide zu nennen. Der zentrale Kohlenstoff in diesen Verbindungen ist extrem elektrophil und somit für die Säure angreifbar. Wird nun der Carboxylkohlenstoff der Säurefunktion durch z. B. das Amin der zu kuppelnden Aminosäure angegriffen, wird die Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten. Dabei wird das Carbodiimid als sehr stabiles Harnstoffderivat abgespalten. Die Ausbildung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung ist der energetisch entscheidende Faktor, der die Reaktion auf die Produktseite führt. In der Festphasensynthese wird dabei am häufigsten Diisopropylcarbodiimid (DIC) verwendet. Analog findet Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) Verwendung. Für Synthesen in Lösung wird häufig auch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC, **126**) benutzt, weil sowohl das Reagenz als auch das entstehende Harnstoffderivat am Stickstoff protonierbar sind, und dadurch wässrig extrahiert werden können. Die aus der Säure und den Carbodiimiden gebildeten Aktivester sind ebenfalls empfindlich für Epimerisierungen. Dieses Problem wird durch die Zugabe von Hydroxybenzotriazol (HOBt, **127**) weitestgehend gelöst. Diese Chemikalie reagiert sehr schnell mit dem Aktivester und bildet einen Ester, der nicht mehr racemisiert. Außerdem besitzt HOBt einen schwach sauren Charakter, und vermindert so zusätzlich die Gefahr von Racemisierungen. Es gibt weitere Reagenzien, die aus einem Addukt aus HOBt und einem Harnstoffvorläufer bestehen, wie z. B. *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, **128**). Der Angriff der Säure auf den elektrophilen Kohlenstoff setzt HOBt frei, das dann mit dem Aktivester reagieren kann. Dabei entsteht dann wieder ein Harnstoffderivat.

Eine weitere sehr energiereiche Bindung, deren Ausbildung für die Darstellung von Aktivestern genutzt werden kann, ist eine Phosphor-Sauerstoff-Doppelbindung. Die hier

angewandten Kupplungsreagenzien sind Phosphoniumanaloge der bereits vorgestellten Reagenzien. Häufig verwendet wird z. B. (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP). Der Nachteil dieses Reagenzes ist die Bildung von hochgiftigem Hexamethylphosphorsäuretriamid als Nebenprodukt. Daher wurde das Reagenz modifiziert und die Isopropylaminreste durch Pyrrolidinreste ersetzt. Das entsprechende Reagenz ist unter der Bezeichnung (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, **129**) bekannt.

Im Gegensatz zu den racemisierungsanfälligen Säurechloriden sind Säurefluoride stabil und stellen somit eine wertvolle Alternative zu den bisher vorgestellten Kupplungsreagenzien dar. Als Reagenz wird für die Darstellung von Säurefluoriden Fluoro-*N,N,N',N'*-bis(tetramethylen)formamidiniumhexafluorophosphat (BTFFH, **130**) verwendet.

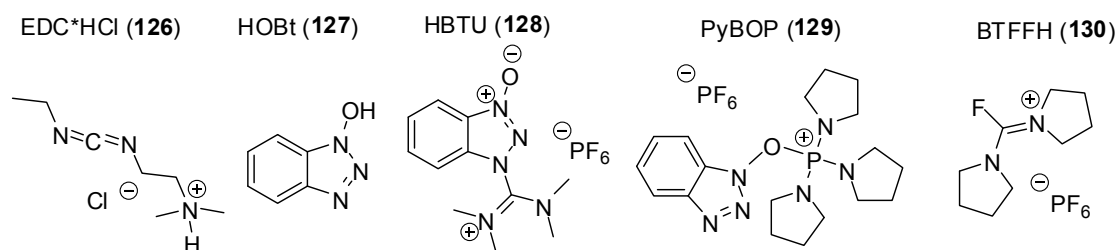


Abbildung 40: Verschiedene in der Festphasenpeptidsynthese verwendete Kupplungsreagenzien.

Die Verbindung zwischen fester Phase und der ersten Aminosäure übernimmt der Linker. An dieses Molekül werden daher hohe gegensätzliche Ansprüche gestellt. Auf der einen Seite muss der Linker jegliche Reaktionsbedingungen, die für die Synthese des Moleküls am Harz erforderlich sind, überstehen, auf der anderen Seite muss das Molekül aber auch unter möglichst milden Bedingungen vom Harz abgespalten werden können. Der erste von Merrifield entwickelte Linker war der Benzyllinker. Dazu wurde das Polystyrolharz mit Chlor(methoxy)methan in Gegenwart von Zinkchlorid oder einer anderen Lewisäure, wie z. B. Zinntetrachlorid, funktionalisiert. Zur Beladung eines solchen Linkers mit einer Aminosäure wird daher häufig ein Cäsiumsalz der Aminosäure verwendet, wodurch die Aminosäure als Benzylester verankert wird. Die basischen Bedingungen während der Kupplung der Aminosäuren werden problemlos toleriert, genauso wie die mäßig stark sauren Bedingungen zur Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) des N-Terminus, die mittels Trifluoressigsäure-Behandlung erfolgt. Zur Abspaltung des Peptids vom Harz sind jedoch harsche Bedingungen erforderlich. So wird das Peptid zum Beispiel durch Einsatz von Flusssäure vom Harz abgespalten. Erste Verbesserungen konnten durch die Verwendung von

Nitrogruppen am Aromaten erreicht werden. Nitrogruppen sind starke Elektronakzeptoren, die das Kation stabilisieren, das bei der Spaltung des Linkers entsteht.

Eine wichtige Verbesserung war die Entwicklung der Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe und ihre Verwendung in der Peptidsynthese.^[104, 105] Die Fmoc-Gruppe wird während des Aufbaus des Peptids durch sekundäre Amine, häufig Piperidin, abgespalten. Durch die Verwendung der Fmoc-Gruppe ist es des Weiteren möglich, deutlich milder abspaltbare Linker zu verwenden. Ein solcher, heute immer noch im Gebrauch befindlicher Linker wurde z. B. von Wang *et al.* entwickelt.^[106] Dieser benötigt zur Abspaltung des Peptids keine Flusssäure mehr, sondern nur Trifluoressigsäure. Bei der Abspaltung vom Harz werden gleichzeitig die Schutzgruppen auf den Seitenketten entfernt. Daher ist diese Methode immer noch gebräuchlich für die Synthese unmodifizierter Peptide.

Es gibt jedoch auch Synthesen, für die die Schutzgruppen auf den Seitenketten möglichst bei der Abspaltung vom Harz erhalten bleiben sollen. Dies ist z. B. bei der Darstellung cyclischer Peptide erforderlich. Aber auch nachträgliche andere Modifikationen in Lösung können es erforderlich machen, das Peptid unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom Harz zu lösen. Für diese Synthesen wurde der 2-Chlorotriptylchloridlinker entwickelt. Dieser ist unter milden aciden Bedingungen spaltbar, z. B. mit einer Mischung aus 20 % Essigsäure und 20 % Trifluorethanol in Dichlormethan. Unter diesen Bedingungen bleiben die Schutzgruppen von Standard-Fmoc-Aminosäurebausteinen auf den Seitenketten unbeeinflusst.^[107]

Neben Peptiden können heutzutage jedoch auch andere chemische Produkte an der festen Phase synthetisiert werden. Zum Beispiel kann Desoxyribonukleinsäure (DNA) ebenfalls an der festen Phase hergestellt werden. DNA besteht aus Nukleotiden, die miteinander verknüpft werden müssen. Heutzutage wird für diese Aufgabe das Phosphoramidit-Verfahren benutzt, das von Caruthers publiziert wurde.^[108, 109, 110]

Neben der Synthese von Peptiden und von Oligonukleotiden werden an der festen Phase auch weitere Biopolymere assembliert. So ist die Entwicklung von geeigneten Methoden zur Darstellung von Kohlenhydraten an fester Phase zurzeit ein aktuelles Themengebiet der organischen Synthese.^[111] Neben Biopolymeren werden des Weiteren auch organische Synthesen an der festen Phase durchgeführt.^[112, 113, 114] Dieser manchmal als SPOS (solid phase organic synthesis) bezeichnete Syntheseansatz soll die effiziente Synthese komplexer Moleküle ermöglichen. Die Entwicklung geeigneter Synthesemethoden bzw. von Synthesen ist ein weiteres, hochaktuelles Themengebiet der wissenschaftlichen Forschung.

3. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Synthese von Boronsäure-basierten Inhibitoren ausgewählter Serinproteasen, nämlich der HtrA-Proteasen DegP und HtrA1, der Tsp-Protease und der CPAF-Protease. Wie einige Beispiele aus der Literatur zeigen (siehe theoretischer Grundlagenteil dieser Arbeit), ermöglicht die Kombination eines Peptides mit einer C-terminalen Aminoboronsäure die Darstellung von hochwirksamen und spezifischen Inhibitoren. Dabei zeigt insbesondere das Beispiel Bortezomib, dass solche peptidischen Boronsäureinhibitoren sogar als Medikamente eingesetzt werden können. Bortezomib ist als Therapeutikum zur Behandlung sowohl des multiplen Myeloms als auch von Mantelzelllymphomen zugelassen.^[59, 60] Auch die humane Protease HtrA1 wird mit mehreren schwerwiegenden Krankheiten wie z. B. Arthritis,^[26] Krebs^[28] und Alzheimer^[31] in Verbindung gebracht. Sollten sich diese Krankheiten durch den Einsatz von effizienten Inhibitoren, z. B. auf Basis der hier beschriebenen Peptidboronsäuren lindern oder sogar heilen lassen, wäre dies ein wichtiger Schritt in der Medizinforschung.

Jedoch können peptidische Boronsäuren nicht nur als Medikamente eingesetzt, sondern auch als chemische Hilfsmittel zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften und biologischen Funktion ausgewählter Proteasen verwendet werden. Durch einen solchen chemisch-biologischen Ansatz können z. B. die Aufgaben und die Netzwerke, in die die Protease eingebunden ist, aufgeklärt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten Peptidboronsäuren für verschiedene Serinproteasen entwickelt werden. Ausgangspunkt war dabei die rationale Entwicklung eines Peptidboronsäureinhibitors für die HtrA-Protease DegP aus einer in Vorarbeiten aufgefundenen Substratsequenz. Da Peptidboronsäuren prinzipiell eine Vielzahl von Proteasen hemmen können, sollte in einem zweiten Schritt die Spezifität dieser Verbindung bestimmt werden und evaluiert werden, ob Derivate dieser Peptidboronsäure auch als HtrA1- bzw. Tsp-Inhibitoren eingesetzt werden können.

Weiterhin sollten dann – aufbauend auf den im vorherigen Teil synthetisierten Peptidboronsäureinhibitoren und ergänzt durch weitere, rational-entworfene Derivate - Inhibitoren für die CPAF-Protease entwickelt werden. Wie bereits im theoretischen Grundlagenteil erläutert, rufen Chlamydien mehrere schwere Folgeerkrankungen wie z. B. Entzündungen des Beckens, Unfruchtbarkeit oder Erblindungen hervor.^[34] Die Protease CPAF gilt als wichtiger Virulenzfaktor dieser Bakterien, dabei ist ihre genaue Rolle im

Krankheitsmechanismus jedoch nicht vollständig verstanden. Zwar wurden in der Vergangenheit aufgrund von *in vitro*-Untersuchungen eine Reihe von CPAF-Substraten aufgefunden, inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, dass diese Substrate *in vivo* hingegen keine biologische Relevanz haben.^[39] Zur Aufklärung „realer“ *in vivo* Substrate und damit der biologischen Funktion der CPAF-Protease könnten Inhibitoren äußerst hilfreich sein. Bisher sind jedoch nur zwei CPAF-Inhibitoren bekannt: Dies ist einerseits Omuralide, ein jedoch nur sehr schwacher CPAF-Inhibitor, der darüber hinaus als Haupttarget das Proteasom adressiert und somit für tiefere biologische Studien ungeeignet ist. Andererseits konnte ein Peptid beschrieben werden, das einem Teil des Zymogens entspricht, jedoch nur eine geringe Bioverfügbarkeit zeigt.^[36] Daher sollten im Rahmen dieser Dissertation selektivere Inhibitoren als chemische Hilfsmittel zur Aufklärung der Biologie dieser Protease entwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten dann strukturell neuartige Boronsäure-basierende Inhibitoren entwickelt werden. Hierzu sollten erstmals macrocyclische Boronsäureester synthetisiert werden. Ein solcher cyclischer Boronsäureinhibitor sollte auf der Basis kanonischer Peptidinhibitoren wie z. B. den Ahp-Cyclodepsipeptiden entwickelt werden, welche potente Inhibitoren von Serinproteasen darstellen, d. h. es sollten „Boronsäureester-Mimetika“ dieser Verbindungen dargestellt werden.^[115] Ein solcher cyclischer Peptidboronsäureinhibitor sollte es ermöglichen, im Gegensatz zu den bisherigen Peptidboronsäureinhibitoren auch die S1'-S3'-Substratbindetaschen zu adressieren und somit eine höhere Hemmpotenz als auch -selektivität zu erhalten. Als Beispielzielstruktur sollte dabei ein Inhibitor **131** basierend auf der Sequenz von RseA synthetisiert werden (Abbildung 41). RseA ist das einzige bekannte Substrat der Protease DegS aus *E. coli*.^[21] Dies ist lohnenswert, da DegS eine hochselektive Protease ist, welche mit „klassischen“ RseA-abgeleiteten Peptidboronsäureinhibitoren bisher kaum gehemmt werden konnte.

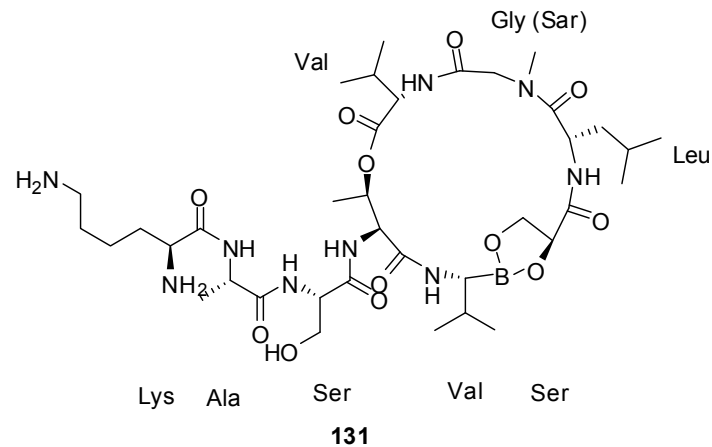


Abbildung 41: Struktur des geplanten cyclischen Boronsäureesters, abgeleitet aus der RseA-Spaltsequenz. Die Aminosäuren Leu und Gly (Sar) entsprechen dabei den Positionen P2' und P3'.

In einem Nebenprojekt soll es um den Naturstoff Kahalalide F (**132**, Abbildung 42) gehen. Dieses Cyclodepsipeptid wurde aus der Meeresschnecke *Elysia rufescens* isoliert.^[116] Der Naturstoff zeigt eine starke Zytotoxizität. Eine Totalsynthese wurde 2001 von Àngel López-Macià *et al.* publiziert.^[117] Die Aufgabe bestand darin, das Molekül und eine fluoreszierende Sonde darzustellen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hemmo Meyer sollen die Proben anschließend biologisch evaluiert werden.

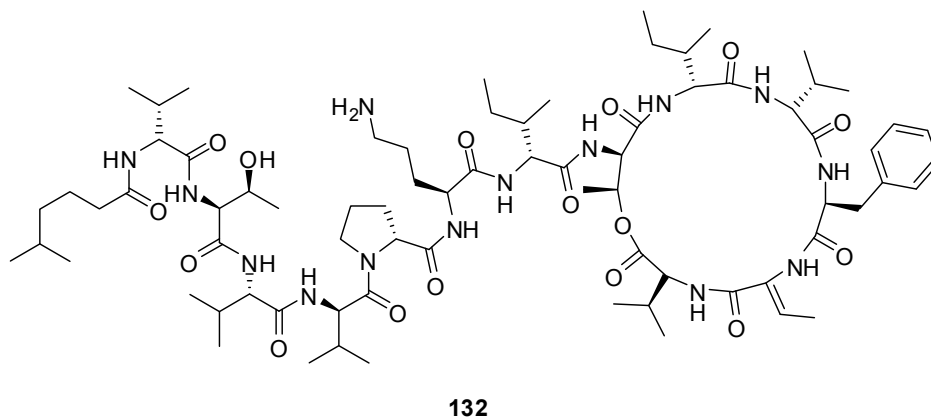


Abbildung 42: Struktur von Kahalalide F.

4. Ergebnisse

4.1 C-terminal mit einer Aminoboronsäure modifizierte Peptide

4.1.1 Vorarbeiten

Die zu entwickelnden Aminoboronsäure-modifizierten Peptide sind aus zwei Teilen aufgebaut (Abbildung 43): Der C-terminale Teil ist eine Aminoboronsäureeinheit, welche kovalent mit dem aktiven Zentrum der Serinprotease wechselwirken kann. Der N-terminale Teil ist ein kurzes, zumeist aus sechs Aminosäuren bestehendes Peptid.

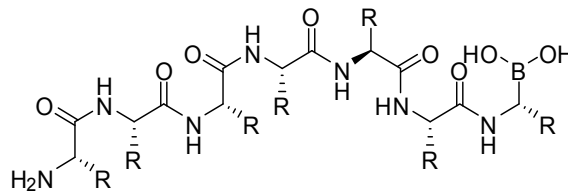


Abbildung 43: Schematischer Aufbau der Aminoboronsäure-modifizierten peptidischen Inhibitoren; R steht für verschiedene Reste der Aminosäuren.

In einem ersten Schritt soll ein geeigneter Peptidboronsäureinhibitor für DegP, einer HtrA-Protease aus *E. coli*, entworfen und synthetisiert werden. Hierzu wurden auf Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Kaiser zurückgegriffen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Ehrmann (UDE) als auch der Arbeitsgruppe Clausen (IMP Wien) wurde in diesen Vorstudien ein Kompletterverdau des bekannten Substrats Citratsynthase (EC 2.3.3.1) mit DegP durchgeführt.^[118] Die durch die DegP-Proteolyse entstandenen Peptidsequenzen wurden über LC-MS identifiziert. Anschließend wurden aus diesen Sequenzen photometrische Substrate für DegP-Aktivitätstest entwickelt, indem diese Spaltsequenzen am C-Terminus mit *para*-Nitroanilin modifiziert wurden.^[4] Die anschließende Testung dieser Substrate in der AG Ehrmann zeigte, dass das modifizierte Peptid SPMFKGV-pNA ein geeignetes DegP-Substrat darstellt. Weitergehende Optimierungen zeigten dann, dass das Substrat DPMFKLV-pNA, welches gegenüber dem vorherigen Substrat an zwei Positionen verändert wurde, einen sogar besseren DegP-Substratumsatz zeigte.

In einem ersten Schritt wurden daher aus diesen Sequenzen peptidische Inhibitoren entwickelt, welche C-terminal mit einem Chloromethylketon-, „Warhead“ modifiziert waren. In der Tat zeigten die entsprechenden Inhibitoren gute Hemmeigenschaften. So bewirkte eine Zugabe von 0,5 mM SPMFKGV-CMK eine Reduktion der spezifischen proteolytischen

Aktivität von DegP auf 3 %.^[4] Allerdings wirken Chloromethylketone als irreversible Inhibitoren, da sie das aktive Zentrum des Enzyms kovalent unter Ausbildung einer unter physiologischen Bedingungen stabilen Bindung modifizieren. Deswegen sollten nun im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden Peptidboronsäure-Analoga synthetisiert werden, welche trotz ihres kovalenten Wirkmechanismus als reversible Inhibitoren wirken und aufgrund ihrer Eigenschaft als starke Lewisäuren stabile tetraedrische Komplexe mit dem aktiven Serin der Protease bilden. Die Darstellung der hierzu benötigten Peptidboronsäuren mit der Sequenz SPMFKG-BoroVal bzw. DPMFKL-BoroVal verläuft dabei in zwei Schritten: Zuerst wird das entsprechende Aminoboronsäure-Analogon synthetisiert. Anschließend erfolgt die Kupplung mit der N-terminalen Peptidsequenz.

4.1.2 Synthese der Aminoboronsäuren

Zur Darstellung der beabsichtigten Peptidboronsäuren ist dementsprechend zuerst die Synthese eines BoroValin-Analogons notwendig. Obwohl in der Literatur mehrere Synthesewege zur Darstellung von Aminoboronsäuren beschrieben sind, wird in den meisten Synthesen auf die Arbeiten von Donald Matteson zurückgegriffen.^[91] In dieser Methode wird eine kommerziell-erhältliche Boronsäure zuerst mit einem Diol, das als chirales Auxiliär genutzt wird, verestert. Dementsprechend musste für das mittels der Matteson-Methode herzustellende BoroValin Isopropylboronsäure (**86**) verestert werden. Als entsprechendes chirales Diol wurde (1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-Pinandiol (**87**) gewählt, da sich dieses Auxiliär bei vielen Synthesen als besonders geeignet herausgestellt hat. So bildet dieses chirale Auxiliär unter anderem sehr stabile Boronsäureester. Wie bei jedem chiralen Auxiliär definiert dabei die Stereochemie des Auxiliärs die räumliche Anordnung in der resultierenden Aminoboronsäure, die einer natürlichen L-Konfiguration einer Aminosäure entsprechen soll. Aufgrund der niedrigeren Priorität des Bors im Vergleich zum Kohlenstoff ist dabei zu beachten, dass nach der CIP-Regel *S*-Aminosäuren dementsprechend in *R*-Aminoboronsäuren überführt werden.

Die Veresterung zwischen Isopropylboronsäure und Pinandiol verlief dabei schnell unter gleichzeitiger Wasserbildung ab, so dass die Reaktion innerhalb von einer Stunde beendet war. Das entstandene Wasser wurde mit Hilfe von Natriumsulfat entfernt und das Produkt konnte anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Das Produkt **71** konnte als eine farblose Flüssigkeit, die bei hohem Vakuum flüchtig ist, in einer Ausbeute von 70,6 % erhalten werden (Abbildung 44).

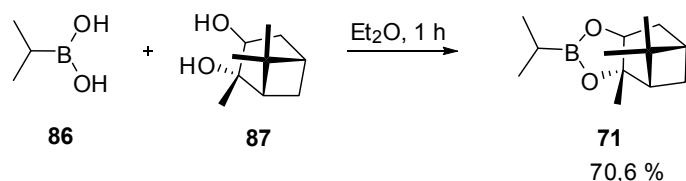


Abbildung 44: Synthese des Isopropylboronsäurepinandiolesters.

Der Isopropylboronsäureester **71** wurde nun in einer Matteson-Homologisierung umgesetzt (Abbildung 45). In diesem Schritt wird dementsprechend das spätere C_α-Atom der Aminoboronsäure stereoselektiv in die Kohlenstoff-Bor-Bindung inseriert. Das entsprechende Kohlenstoffatom wird dabei zuerst als LiCHCl₂-Fragment eingesetzt, welches in einem zweiten Schritt LiCl eliminiert und damit die inserierte CHCl-Gruppierung erzeugt. Als Reagenz für den ersten Schritt wurde dabei LiCHCl₂ verwendet, welches durch Deprotonierung von Dichlormethan mit *n*-BuLi *in situ* dargestellt werden konnte. Das Lithiumorganyl ist dabei nur bei sehr niedrigen Temperaturen von ca. -100 °C stabil. In der Tat schlugen anfängliche Versuche der Reaktionsdurchführung bei -78 °C fehl. Dabei lässt sich eine erfolgreiche Insertion bereits optisch erkennen: bei einer „erfolgreichen“ Insertion bleibt die Reaktionslösung nahezu farblos. Eine fehlgeschlagene Insertion, wie z. B. bei einer Reaktionsführung bei -78 °C geht mit einer deutlichen Gelb- bis Braunfärbung der Reaktionslösung einher, welche vermutlich durch die Zersetzung des LiCHCl₂-Reagenzes auftritt. Mechanistisch addiert das nucleophile Lithiumorganyl zuerst an das elektrophile Boratom, wodurch ein negativ-geladener Boratkomplex entsteht. Unter Eliminierung von Lithiumchlorid lagert dieser Boratkomplex dann zu einem neutralen Boronsäureester um. Das Pinandiol wirkt dabei während der Insertion als chirales Auxiliar, so dass die gesamte Reaktionssequenz stereoselektiv abläuft. Zu der Reaktion wurde als Additiv ZnCl₂ hinzugegeben, da dieses Salz die entstehenden Chloridionen komplexiert, so dass sie nicht erneut als Nucleophile am inserierten Boronsäureester angreifen und somit eine Epimerisierung des chiralen Zentrums auslösen können. Das resultierende Produkt der Reaktion war somit der stereoreine α-Chloroboronsäureester **88**. Diese Substanz ist ausreichend wasserstabil und konnte somit wässrig aufgearbeitet werden. Das Produkt war ausreichend rein, um auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichten zu können, welche des Weiteren durch die annähernd identischen R_F-Werte des Produktes **88** und Eduktes **71** in unterschiedlichen Laufmittelgemischen sich als sehr herausfordernd herausgestellt hätte. Daher wurde das Rohprodukt der Insertion ohne weitere Aufreinigung für die nächste Stufe verwendet.

In der nächsten Reaktion wurde der α -Chloroboronsäureester **88** in einer nucleophilen Substitution mit Lithiumhexamethyldisilazan (LHMDS) umgesetzt. Diese Reaktion verlief erneut stereospezifisch; es handelt sich um eine „klassische“ S_N2 -Reaktion und verlief somit unter Inversion des Stereozentrums. Das eingesetzte Reagenz Lithiumhexamethyldisilazan ist ein schwaches Nucleophil, das im Normalfall nicht mit Alkylhalogeniden reagieren würde. Diese Reaktion verläuft daher analog zur Insertionsreaktion über den Boratkomplex, gefolgt von einer Umlagerung zum gewünschten Produkt **89**.

Das entstandene Produkt **89** ist empfindlich gegenüber Wasser und anderen polaren oder nucleophilen Lösungsmitteln wie z. B. Methanol und somit können bereits diese Reagenzien zur Abspaltung der Silylgruppen eingesetzt werden. Im Normalfall erfolgt die Abspaltung jedoch durch Zugabe von Säure. Nach der sauren Aufarbeitung befinden sich in der Reaktionsmischung dann das eigentliche Produkt neben vielen weiteren Substanzen wie z. B. noch nicht umgesetztem Boronsäureester **71**, Lithiumchlorid aus der eigentlichen Insertionsreaktion und Abbauprodukte von überschüssigem LHMDS und den abgespaltenen Silylgruppen. Da weder die solvolyseempfindliche Silyl-Zwischenstufe noch das finale Produkt, nämlich der BoroValin-Pinandiolester **90** säulen-chromatographisch aufgereinigt werden konnten, müssen die Verunreinigungen auf anderem Wege entfernt werden. Die Reaktionsmischung der nucleophilen LHMDS-Substitution wurde daher zur Trockne aufkonzentriert. Der Rückstand wurde anschließend in trockenem Hexan aufgenommen. Der gewünschte Silylaminboronsäureester **89** sowie eventuell noch vorhandener α -Chloroboronsäureester **88** bzw. Boronsäureester **71** waren in diesem Lösemittel löslich, während die bei der Reaktionsabfolge anfallenden bzw. zugesetzten Salze (z. B. LiCl) anschließend abfiltriert werden konnten. Dabei musste aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Trimethylsilylgruppen unter Wasserausschluss gearbeitet werden. Das Filtrat wurde anschließend bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ mit Chlorwasserstofflösung in Dioxan behandelt. Dabei wurden die Silyl-Aminschutzgruppen abgespalten und das Hydrogenchloridsalz des Amino-boronsäureesters **90** fällt aus. Demgegenüber bleibt der α -Chloroboronsäureester **88** bzw. der Boronsäureester **71** in Lösung, so dass durch Zentrifugation das gewünschte Produkt **90** in einer Ausbeute von 60 % und mit hoher Reinheit gewonnen werden konnte. Zu beachten ist, dass aufgrund der Instabilität von Boronsäureestern in Gegenwart von Aminen eine Isolierung des Hydrogenchloridsalzes zwingend notwendig war. Daher ist auch eine anschließende säulenchromatographische Reinigung dieses Produktes, z. B. mit Mischungen von Methanol und Dichlormethan als Eluenten sehr schwierig. Da das isolierte Produkt **90** ausreichend rein

war, wurde dieses daher ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt, d. h. der Kupplung mit den Peptidsequenzen, eingesetzt.

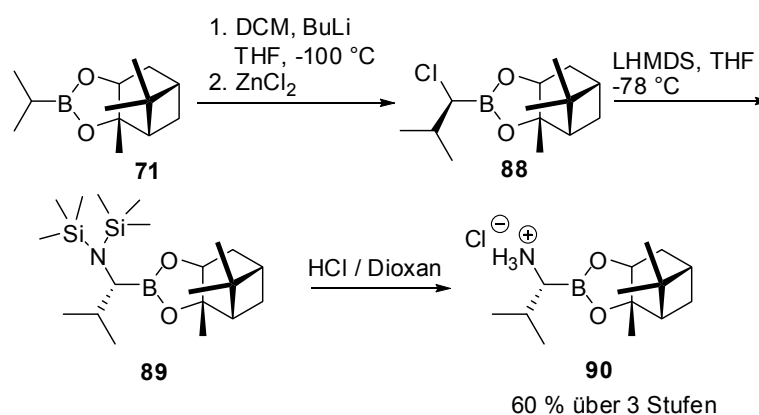


Abbildung 45: Synthese des BoroVal-Synthesebausteines.

4.1.3 Peptidsynthese an der festen Phase

Die Synthese der Peptide wurde an der festen Phase durchgeführt. Als feste Phase fand ein Polystyrolharz **133** Verwendung, das mit 2-Chlorotrytylchloridgruppen als Linkereinheiten modifiziert war. Dieser Linker erlaubt eine Abspaltung unter schwach sauren Bedingungen. Klassische Abspalllösungen sind z. B. eine Mischung aus 20 % Essigsäure und 20 % Trifluorethanol in Dichlormethan. Der Chlorsubstituent am Trytyllinker wirkt dabei durch Mesomerieeffekte als Elektronendonator, so dass die positive Ladung des bei der Abspaltung entstehenden Trytylkations besser stabilisiert werden kann. Darüberhinaus bewirkt er durch seinen sterischen Anspruch eine Stabilisierung des sp^2 -koordinierten Trytylkations gegenüber dem sp^3 -koordinierten Triphenylmethanintermediates. Unter diesen mild-aciden Abspaltbedingungen sind die normalerweise in der Fmoc-Peptidsynthese verwendeten Seitenkettenschutzgruppen stabil, so dass sie bei der Abspaltung nicht entschützt werden. Dementsprechend kann eine Kupplung mit einem voll geschützten Peptidbaustein erfolgen, so dass bei der Kupplung mit dem Aminoboronsäureester keine unerwünschten Nebenreaktionen auftreten können. Auf den Seitenketten werden z. B. Boc-, Trityl- oder *O*'Bu-Schutzgruppen verwendet, die nur mit stärkeren Säuren, wie z. B. Trifluoressigsäure, abgespalten werden können.

An der festen Phase werden Peptide vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Daher wurde für die Zielsequenz SPMFKG-BoroV das Harz mit der Aminosäure Fmoc-Glycin beladen, währenddessen für die Zielsequenz DPMFKL-BoroV Fmoc-Leucin verwendet wurde. Für die Erstbeladung wurde hierzu die gewünschte Fmoc-Aminosäure in trockenem Dichlormethan

gelöst. Anschließend wurde als milde, nicht nucleophile Base Ethyldiisopropylamin zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde dann dem Harz **133** zugefügt. Dabei wurde unter trockenen Bedingungen und Schutzgasatmosphäre gearbeitet, um die Ausbeuten der Beladungen zu erhöhen, da insbesondere Wasser oder andere nucleophile Lösungsmittel wie z. B. Alkohole ebenfalls mit dem Linker reagieren und somit Ausbeuteverluste bei der Beladung verursachen würden. Das Harz wurde zwischen zwei und 16 h geschüttelt. Nachdem die überschüssigen Reagenzien durch Waschen entfernt worden waren, wurden noch nicht abreagierte Chlorotriylchlorid-Linker durch Schütteln mit einer Lösung von Methanol und Ethyldiisopropylamin in Dichlormethan abgesättigt. Dieser Schritt verhindert, dass bei den weiteren Kupplungsschritten andere Aminosäuren direkt auf das Harz kuppeln können, was zu C-terminal verkürzten Produkten führen würde. Anschließend wurde das Harz erneut gründlich gewaschen und getrocknet. Nachfolgend wurde die Beladung bestimmt. Dafür wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin entschützt. Das entstehende Fmoc-Piperidin-Addukt (1-((9H-Fluoren-9-yl)methyl)piperidin) verfügt über ein charakteristisches UV-Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 301 nm. Die Bestimmung der Beladung kann daher bei bekannter Einwaage an Harz und Volumen der Abspaltung über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet werden. Je nach Reaktionsansatz konnten Beladungen zwischen 0,5 und 0,7 mmol/g erhalten werden.

Die weiteren Aminosäuren wurden gewöhnlich mit Hilfe eines Peptidsynthesizers auf das beladene Harz gekuppelt. Dazu wurde alternierend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die nächste Aminosäure gekuppelt. Die Fmoc-Gruppe wurde mit einer 20 prozentigen Lösung des sekundären Amins Piperidin in Dimethylformamid abgespalten. Mechanistisch wird zuerst das 9H der Fluorenylgruppe abstrahiert. Im entstandenen Anion besitzt damit auch der mittlere Ring aromatischen Charakter. Unter Eliminierung von Kohlenstoffdioxid wird das Amin freigesetzt, und aus dem aromatischen Teil der Schutzgruppe wird Dibenzofulven. Dieses Molekül wird anschließend von Piperidin abgefangen.

Zur Kupplung einer weiteren Aminosäure auf das entschützte Amin musste nun zuerst die Säuregruppe der Aminosäure aktiviert werden. Als Aktivierungsreagenzien wurden an der festen Phase Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexa-fluorophosphat (HBTU, (**128**), Abbildung 40) verwendet. Durch die Aktivierung wird das Proton am C_α der Aminosäure acider. In Gegenwart der Base, die für die Kupplung erforderlich ist, besteht die Gefahr einer Racemisierung durch Bildung des Enols und anschließende Protonierung von der anderen Seite. Daher wurde hier als Base meist Ethyldiisopropylamin, seltener Triethylamin, verwendet. Ethyldiisopropylamin ist eine

mildere Base als Triethylamin. Zusätzlich wurde bei der Reaktion 1-Hydroxybenzotriazol zugegeben, um im Falle einer Aktivierung mit DIC die Bildung eines HOBt-Aktivesters zu ermöglichen bzw. im Falle von einer HBTU-Aktivierung zu beschleunigen.

Wie bereits erwähnt, wurde nun alternierend die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die nächste Aminosäure geschützt gekuppelt. Für die erste Sequenz, SPMFKG-BoroV, wurden daher nacheinander Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Met-OH und Fmoc-Pro-OH verwendet. Die letzte Aminosäure Serin wurde N-terminal Boc-geschützt und an der Seitenkette ^tBu-geschützt eingesetzt. Diese wurde gewählt, um nach der Kupplung mit dem Aminoboronsäurebaustein eine zeitgleiche Entschützung aller permanenten Schutzgruppen zu ermöglichen. Demgegenüber hätte eine Fmoc-Gruppe einen zusätzlichen Abspaltungsschritt benötigt. Außerdem entstehen bei der Abspaltung von Boc-Gruppen nur flüchtige Substanzen, während bei der Fmoc-Gruppe ein Dibenzofulven-Piperidin-Addukt entsteht, welches zusätzlich bei der Aufreinigung entfernt werden muss. Das synthetisierte, vollgeschützte Hexapeptid Boc-Ser(O^tBu)-Pro-Met-Phe-Lys(Boc)-Gly-OH bzw. Boc-Asp(^tBu)-Pro-Met-Phe-Lys(Boc)-Leu-OH (**140**) wurde anschließend mit einer Lösung aus 20 % Essigsäure und 20 % Trifluorethanol in Dichlormethan vom Harz abgespalten (Abbildung 46). Die Abspatlösung wurde dann unter vermindertem Druck mit Cyclohexan coevaporiert. Cyclohexan bildet mit Essigsäure ein Azeotrop. So wird verhindert, dass das Peptid konzentrierter Essigsäure ausgesetzt wird. Der Rückstand wurde anschließend ohne weitere Reinigung direkt für die Kupplung mit dem BoroValin-Baustein **90** eingesetzt.

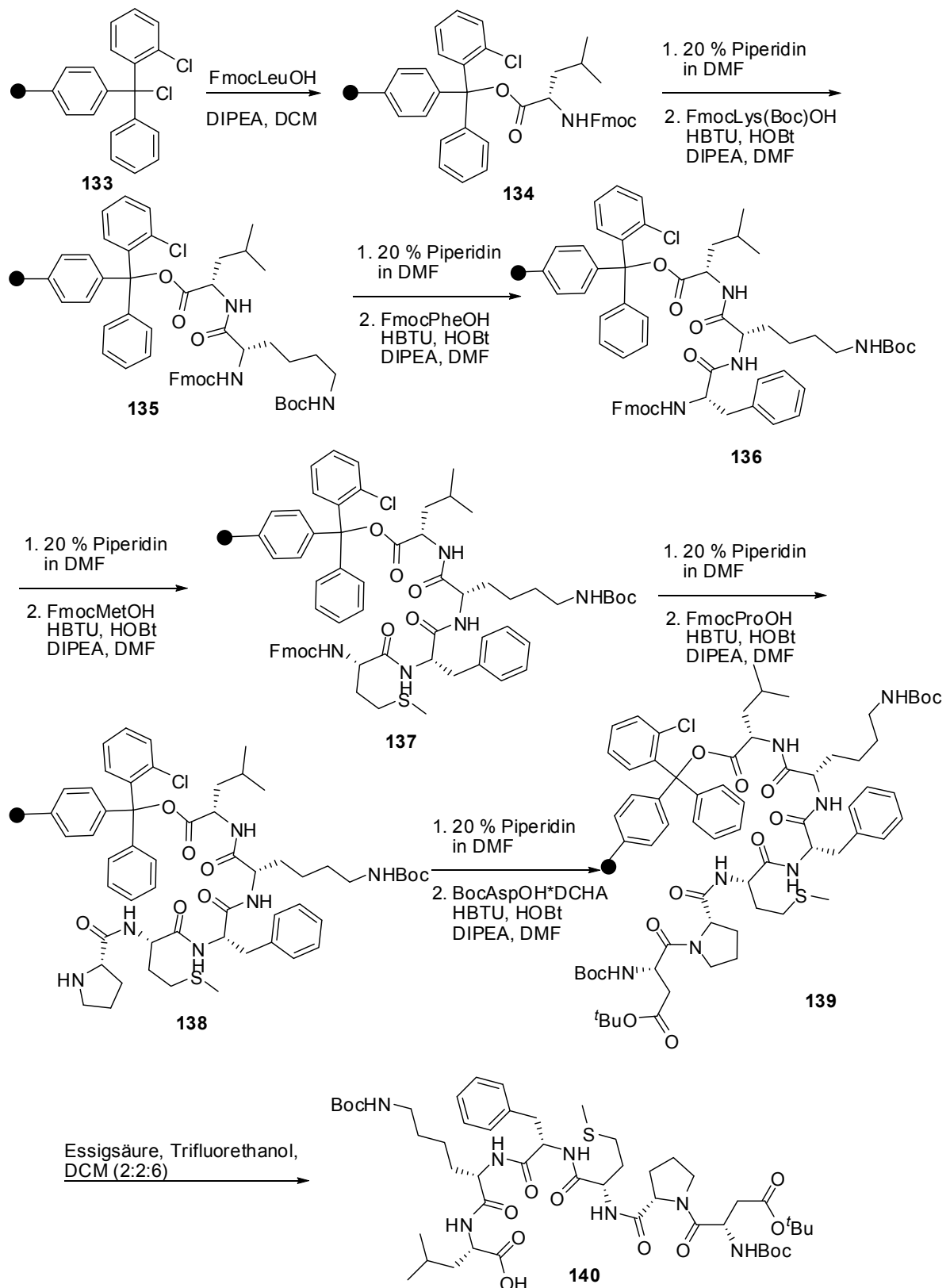


Abbildung 46: Fmoc-basierte Peptidfestphasensynthese eines Seitenketten- und N-terminal geschützten Peptids der Sequenz DPMFKL. Als Harz wurde ein Chlorotriptylchlorid-modifiziertes Polystyrolharz verwendet. Das entsprechende SPMFKG-Derivat wurde analog dargestellt.

4.1.4 Kupplung der Aminoboronsäure

Der nächste Schritt in der Synthese der Peptidboronsäure war die Kupplung des Aminoboronsäure-Bausteins mit den beiden Festphasen-synthetisierten, geeignet-geschützten Peptiden (Abbildung 47). Zur Verknüpfung der Carbonsäure des Peptids mit dem Aminoboronsäurepinandiolester waren wieder Aktivierungsreagenzien erforderlich. Eines der am häufigsten zur Bildung von Peptidbindungen in Lösung eingesetzten Kupplungsreagenzien ist EDC*HCl ((126), Abbildung 40). Der große Vorteil dieses Reagenzes besteht darin, dass sowohl unreactiertes EDC als auch das bei der Reaktion entstehende Harnstoffderivat gut wasserlöslich sind und deshalb durch wässriges Aufarbeiten leicht vom Reaktionsprodukt getrennt werden können. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden erste Kupplungsversuche mit diesem Reagenz durchgeführt, die jedoch fehlschlagen. Bessere Ergebnisse wurden durch die Verwendung von PyBOP ((129), Abbildung 40) erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass die besten Ausbeuten für diese Kupplung bei Verwendung des Kupplungsreagenzes BTFFH ((130), Abbildung 40) erreicht werden konnten. Dieses Reagenz bildet *in situ* ein Säurefluorid der Carbonsäure. Dabei kommt es zu keiner Racemisierung, so dass die Zugabe von HOBT im Gegensatz zu den Kupplungen mit EDC*HCl oder PyBOP nicht erforderlich ist. Jedoch ist zu beachten, dass bei der Nutzung von BTFFH unter trockenen Bedingungen gearbeitet werden muss, da ansonsten das Säurefluorid hydrolysiert wird. Bei diesen Kupplungen ist außerdem zu berücksichtigen, dass ausreichend Base verwendet wird, da der Aminoboronsäurester als HCl-Salz eingesetzt wird. Zusätzlich muss das Peptid vor der Kupplung frei von Essigsäure sein, da sonst die Essigsäure mit dem Amin des BoroValinpinandiolesters **90** reagieren würde. Die Reaktionszeit für die Kupplungen betrug zwischen drei und 17 h. Als Lösungsmittel wurde dabei eine 1:1-Mischung aus Dimethylformamid und Dichlormethan verwendet.

Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel zunächst unter vermindertem Druck entfernt, um Produktverluste bei der anschließenden wässrigen Aufarbeitung durch eine Verteilung von Dimethylformamid in der organischen und wässrigen Phase zu vermeiden. Die organische Phase wurde danach zur Trockne aufkonzentriert. Der das Reaktionsprodukt-enthaltene Rückstand wurden dann im nächsten Schritt mit einem TFA: Ethandithiol: Wasser: Triisopropylsilan-(95:2:2:1)-Abpaltcocktail behandelt, wodurch die permanenten Schutzgruppen der Aminosäuren und gleichzeitig der Boronsäurepinandiolester gespalten wurden. Ethandithiol wurde zugesetzt, um Oxidationen am Methionin während der Abspaltung zu vermeiden. Als Scavenger wurde zusätzlich Triisopropylsilan zugesetzt, um Nebenreaktionen zu verhindern. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurde dann

unter Eiskühlung das Peptid mit Diethylether gefällt. Dies war möglich, da die Aminogruppen unter den sauren Bedingungen protoniert vorlagen und das Reaktionsprodukt daher nicht in Diethylether löslich war. Unpolare Verunreinigungen blieben dagegen in Lösung und konnten so abgetrennt werden. Es entstand ein milchig-weißer Niederschlag, der mittels Zentrifugation isoliert werden konnte. Das Rohprodukt wurde dann über eine präparative HPLC aufgereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden dann vereinigt, eingeeengt und abschließend lyophilisiert. Die Ausbeuten für die Kupplungen betragen für den Inhibitor DPMFKL-BoroV (**142**) 31,5 % und für SPMFKG-BoroV (**143**) 22 %. Die Ausbeuten sind dabei auf die Menge an erhaltenem Rohpeptid nach der Abspaltung vom Harz bezogen.

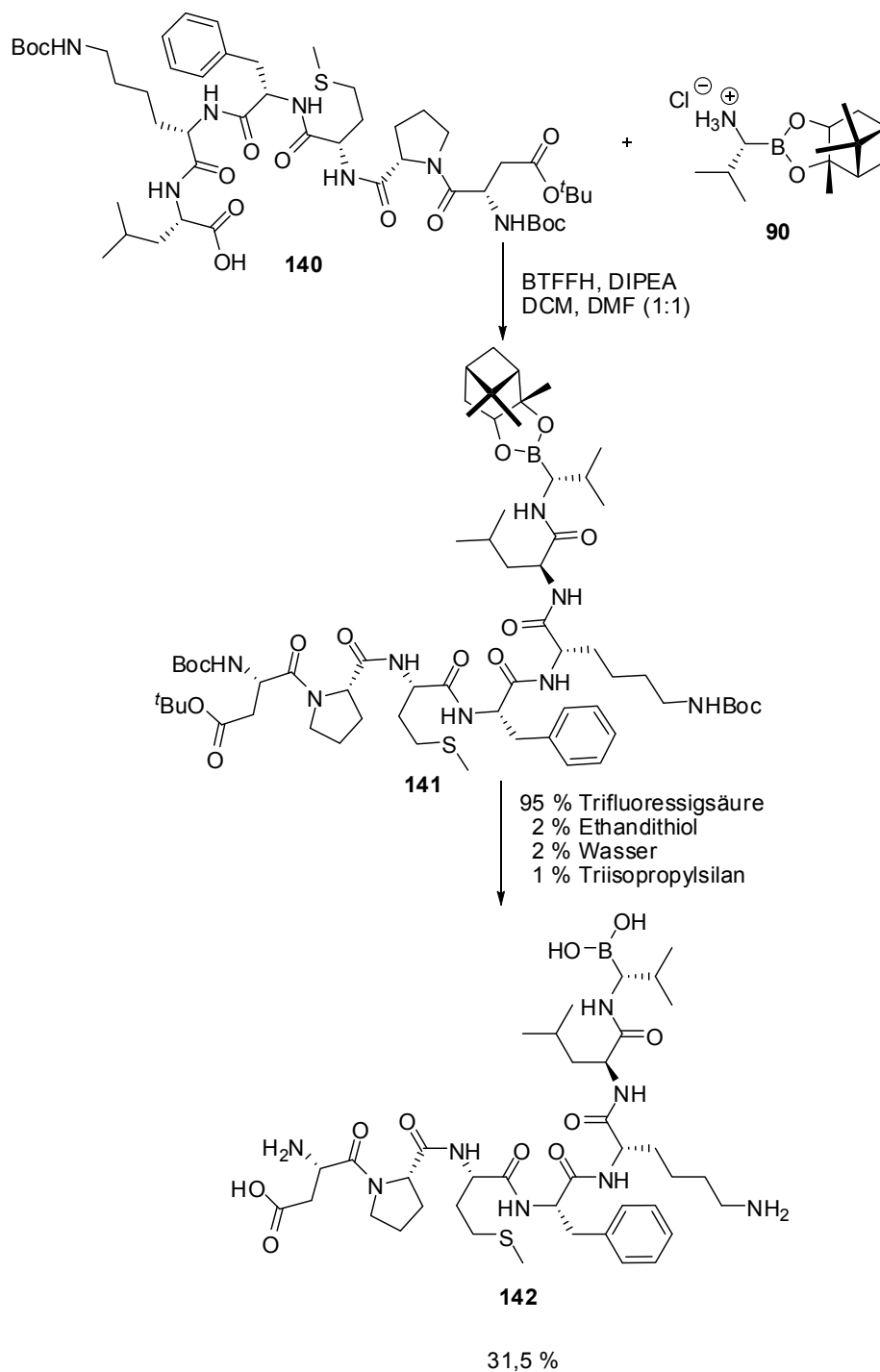


Abbildung 47: Synthese von DPMFKL-BoroV in Lösung.

4.1.5 Bestimmung der DegP-Hemmwirkung

Die beiden synthetisierten Inhibitoren wurden anschließend in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ehrmann auf ihre Hemmwirkung gegenüber der HtrA Protease DegP aus *E. coli* getestet. Dabei zeigte sich, dass beide Inhibitoren potente Hemmstoffe von DegP darstellen. Zur Bestimmung der Inhibition wurde ein quantifizierbarer Enzymassay durchgeführt, bei dem das Substrat SPMFKGV-pNA verwendet wurde und die DegP-

vermittelte Abspaltung von *p*-Nitroanilin bei 405 nm UV-spektrophotometrisch verfolgt wurde. Der Enzymassay zeigte anschließend, dass der Inhibitor SPMFKG-BoroV (**143**) DegP mit einem IC_{50} -Wert von $23 \pm 3 \mu\text{M}$ hemmte. Das Chlormethylketon mit derselben Peptidsequenz, SPMFKGV-CMK, zeigte demgegenüber in dem gleichen Assay einen IC_{50} -Wert von $75 \pm 8 \mu\text{M}$.^[119] Daraus kann gefolgert werden, dass zumindest in diesem Fall auf einer Boronsäure-basierende Inhibitoren potenter hemmen (um einen Faktor von ca. 3) als entsprechende Chlormethylketone.

Für den Inhibitor DPMFKL-BoroV (**142**) konnte ein IC_{50} -Wert von $0,28 \pm 0,03 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Dieser außerordentlich potente Wert zeigt, dass die „Verbesserungen“ in der Sequenz, die sich auch bereits bei den Substraten gezeigt haben, auch für die Inhibitoren bestätigt werden. Dieses mit einer Aminoboronsäure modifizierte Peptid hemmt damit ca. 80fach potenter als der Inhibitor mit der ursprünglichen Sequenz und stellt damit ein nützliches chemisches Werkzeug zur weiteren biochemischen Charakterisierung der HtrA-Protease DegP dar.

4.1.6 Inhibition von HtrA1

Neben der HtrA Protease DegP wurden die synthetisierten Inhibitoren in der Arbeitsgruppe von Prof. Ehrmann ebenfalls auf ihre Hemmwirkung gegenüber der humanen HtrA1 Protease getestet. In einem ersten Versuch wurde hierzu β -Casein ($160 \mu\text{M}$), ein bekanntes Substrat von HtrA1, ohne bzw. in Gegenwart von DPMFKL-BoroV (**142**) verdaut. Für diesen Versuch wurde HtrA1 ($25 \mu\text{M}$) mit unterschiedlichen Mengen DPMFKL-BoroV (**142**) inkubiert und anschließend wurde β -Casein ($160 \mu\text{M}$) zugeben. Bei einer Inhibitorkonzentration von $250 \mu\text{M}$ konnte mittels SDS-PAGE Inhibierung nachgewiesen werden, die bei einer Konzentration von $1050 \mu\text{M}$ vollständig wurde. Abbauprodukte vom Casein konnten nicht nachgewiesen werden.^[120]

Weiterhin wurde wie für DegP ein HtrA1-Enzymassay mit dem Inhibitor DPMFKL-BoroV (**142**) durchgeführt. Für diesen Assay wurde das Substrat VFNTLPMMGKASPV-pNA verwendet. Dabei konnte ein IC_{50} -Wert von $2,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ bzw. ein K_i -Wert von $1,42 \pm 0,17$ bestimmt werden.

4.1.7 Cokristallisation von HtrA1 mit DPMFKL-BoroV

Aufgrund der beobachteten potenten Hemmung des Enzyms HtrA1 wurde anschließend eine Co-Kristallstruktur des Enzyms mit dem Inhibitor DPMFKL-BoroV (**142**) angefertigt, da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Inhibitor-gebundene Struktur von HtrA1 bekannt war (eine Struktur von HtrA1 war bereits in der AG Ehrmann (UDE) bzw. AG Clausen (IMP Wien) angefertigt, jedoch noch nicht publiziert worden). Eine solche Co-Kristallstruktur ist von wissenschaftlichem Interesse, da HtrA1 wie bisher alle bekannten HtrA-Proteasen abhängig von externen Faktoren verschiedene Konformationen einnehmen kann. In Abbildung 48 ist die erhaltene Co-Kristallstruktur dargestellt, welche mit einer HtrA1-Mutante erhalten wurde, in welcher die N-terminalen Domänen deletiert wurden. Zu sehen sind die drei Proteasedomänen, währenddessen die PDZ-Domänen ungeordnet und daher in der Röntgenstruktur nicht sichtbar sind. Ein Vergleich der aktiven Konformation, welche durch Bindung des Inhibitors DPMFKL-BoroV (**142**) „eingefroren“ wurde, mit der inaktiven, d. h. freien HtrA1-Protease, zeigt dabei, dass HtrA1 im Gegensatz zu den bisher strukturell und mechanistisch untersuchten HtrA-Proteasen über einen alternativen Aktivierungsmechanismus verfügt, den man am besten mit einem „induced fit“-Modell beschreiben kann. So bewirkt die Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum eine Umlagerung des für die Aktivierung von HtrA-Proteasen kritischen L3-Loops. Bei anderen HtrA-Proteasen wie z. B. DegP oder DegS wird diese Umlagerung durch eine Bindung an die PDZ-Domäne induziert. Die Untersuchung mit Hilfe des im Rahmen dieser Dissertation hergestellten Inhibitors ermöglichte somit neue Einblicke in die biochemische Regulation der HtrA-Protease HtrA1.

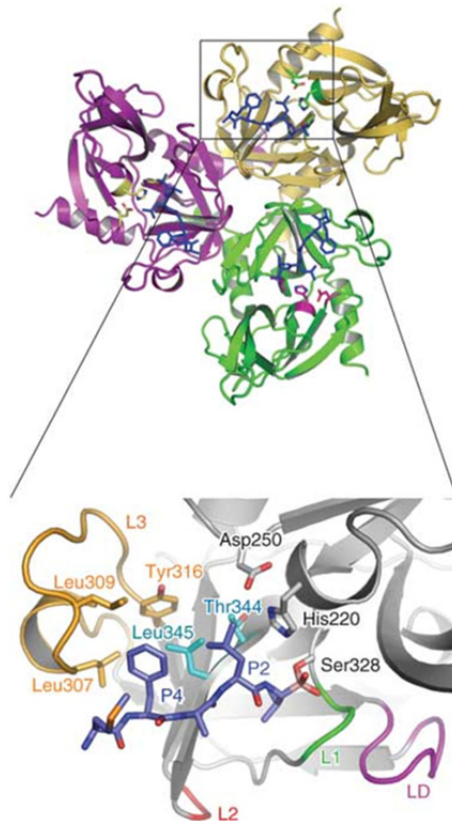


Abbildung 48: Co-Kristallstruktur von HtrA1 mit dem Inhibitor DPMFKL-BoroV (**142**).

Eine tiefere Analyse des Bindungsmechanismus der Boronsäure an das aktive Zentrum von HtrA1 zeigt, dass die enzymatisch-aktive Hydroxylgruppe des Serins den erwarteten, stabilen tetraedrischen Boronatkomplex ausbildet, d. h. als ein Übergangszustandsanalogon wirkt (Abbildung 49). Ein solcher tetraedrischer Übergangszustand tritt während der Hydrolyse der Peptidbindung auf und wird durch eine Stabilisierung der negativen Ladung im sogenannten Oxyanionloch der Protease stabilisiert.

In der Kristallstruktur konnte der Inhibitor deutlich beobachtet werden, obwohl vermutlich aufgrund geringer Wechselwirkungen in einigen Bindetaschen die Elektronendichte nicht für alle Aminosäurereste komplett aufgefunden werden konnte. Nichtsdestotrotz zeigte die Röntgenstruktur deutlich, dass der hydrophobe Isopropylrest des BoroValins in die S1-Tasche bindet, die aus den Seitenketten von Lys346 und Ile323 gebildet wird. Der Leucin-Rest bindet in die S2-Tasche. Hier gibt es hydrophobe Wechselwirkungen mit Thr344 und Leu345. Die Seitenkette des Lysins konnte anhand der Elektronendichte nicht identifiziert werden. Das Phenylalanin bindet über hydrophobe Interaktionen mit mehreren Aminosäuren der Protease. So sind Van-der-Waals Wechselwirkungen mit Leu307, Leu309 und Leu345 möglich. Zusätzlich können schwache π - π -Wechselwirkungen zu Tyr316 und Phe353 auftreten. Während Methionin der Tasche S5 zugeordnet werden kann, ist den Aminosäuren Prolin und Asparaginsäure

keine feste Position zuzuordnen. Nicht in der Kristallstruktur erkennbare Aminosäuren oder Seitenketten deuten auf eine hohe Dynamik dieser Bereiche des Inhibitors hin. Dies ist ein Hinweis auf schwache Wechselwirkungen zwischen den entsprechenden Aminosäuren des Inhibitors und dem Enzym. Außerdem konnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen des Peptids mit dem Hauptstrang von HtrA1 festgestellt werden, wiederum den Erwartungen gemäß, da Proteasen ihre Substrate im Allgemeinen über eine Ausbildung eines β -Faltblattes binden.

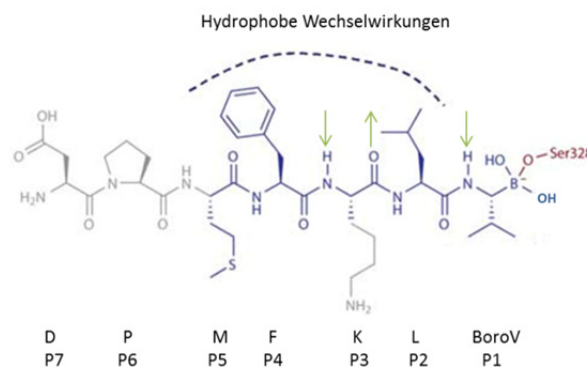


Abbildung 49: Schematisches Bindungsschema des Boronsäureinhibitors **142** an HtrA1.

Wasserstoffbrückenbindungen mit Rückgrat-Amidbindungen der HtrA1-Protease sind durch grüne Pfeile gekennzeichnet. Teile des Inhibitors, die nicht exakt über die Elektronendichte identifiziert werden können, sind schwächer gezeichnet.

Im Vergleich zur HtrA1-Struktur ohne gebundenen Inhibitor erscheinen insbesondere vier molekulare Änderungen von besonderer Bedeutung:

- So nehmen die Aminosäurereste der katalytischen Triade in der aktiven Form eine Stellung zueinander ein, die eine effektive Katalyse der Proteolyse ermöglicht. Zur katalytischen Triade gehören die Aminosäuren His220, Asp250 und Ser328.
- Durch die Bindung wird das aktive Zentrum „korrekt“ ausgebildet. Diese Ausbildung geht mit einem Übergang von einer ungeordneten zu einer geordneten Struktur einher, welcher sich besonders in der Stabilisierung einiger Loop-Regionen äußert. Ein solcher Unordnung→Ordnungsübergang ist typisch für die Aktivierung einer Trypsinartigen Serinprotease (zu denen auch die HtrA1-Proteasen gehören).
- Durch die Bindung wird das Oxyanionloch gebildet, das das Oxyanion des Boronatkomplexes aufnimmt.
- Die stärkste Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Protease erfolgt in der S1-Tasche (d. h. zwischen dem Valinrest und der Protease). In der Tat weiß man aus biochemischen Verdaustudien, dass HtrA1 eine nur geringe Proteolyse selektivität

zeigt, die hauptsächlich durch die S1-Tasche bestimmt wird, währenddessen die Taschen S2-Sn nur einen geringeren Einfluss zeigen.

4.1.8 Neue rational-entworfenene Boronsäureinhibitoren

Basierend auf den Ergebnissen der Strukturaufklärung sollte im folgenden Teil durch rationales Design (mittels einer „visual inspection“ der Bindungsstruktur) eine kleine Bibliothek von weiteren, bzgl. ihrer Hemmeigenschaften optimierten Boronsäureinhibitoren synthetisiert werden. Dazu wurde die aktive Struktur von HtrA1 mit Hilfe des Programms PyMOL visualisiert (Abbildung 50). So war es möglich, Vorhersagen zu treffen, welche Aminosäuren des Inhibitors besonders geeignet zur Verbesserung der Bindungseigenschaften sein sollten. Anschließend sollten diese verschiedenen Modifikationen experimentell validiert werden. Da aus der Struktur und den biochemischen Verdauexperimenten Valin an der Stelle P1 sich als „beste“ Aminosäure herauskristallisiert hatte, wurde BoroValin an dieser Position P1 in allen Derivaten beibehalten. An Position P2 wurde Leucin in einigen Derivaten durch die großen und ungeladenen Aminosäuren Tyrosin und Glutamin ersetzt. Für P4 konnten, wie bereits erwähnt, hydrophobe Wechselwirkungen mit der Protease beobachtet werden. Daher wurde in einigen Testsubstanzen die Aminosäure Phenylalamin gegen eine weitere mit hydrophobem Rest, nämlich Isoleucin, ausgewechselt. Alternativ wurde in einigen Derivaten Lysin an P3 durch eine andere basische Aminosäure, nämlich Arginin, ersetzt. Ergänzend wurden Änderungen in einigen Derivaten an der Position P5 vorgenommen, in welchen Methionin gegen Tyrosin ausgetauscht wurde. Die Positionen P6 und P7 konnten in der Struktur nicht wiedergefunden werden, so dass hier Wert auf eine gute Löslichkeit in wässrigem Medium gelegt wurde. So wurde z. B. Prolin durch Arginin ersetzt.

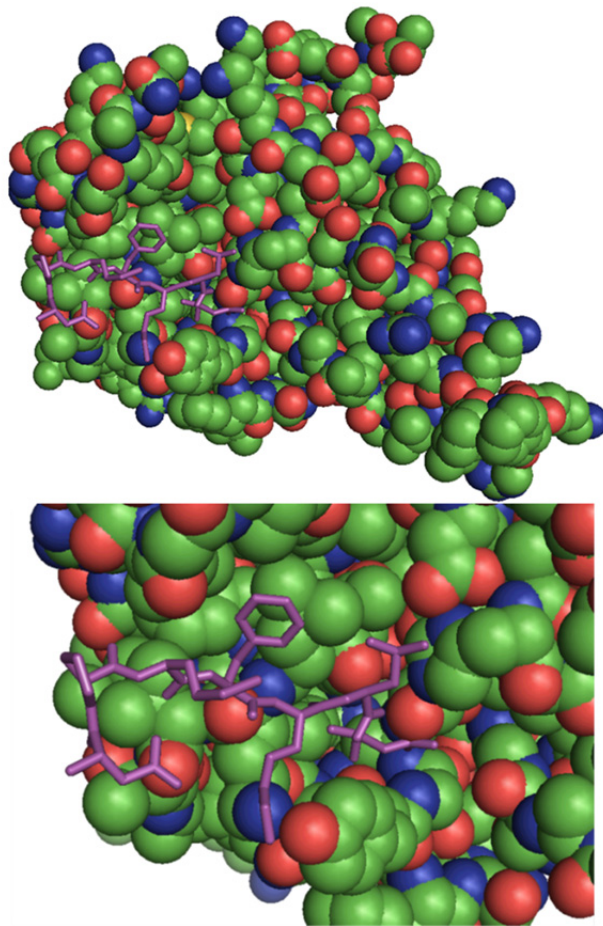


Abbildung 50: Struktur des HtrA1 Monomers mit gebundenem Inhibitor DPMFKL-boroV (**142**). Während in der obigen Abbildung das komplette Monomer abgebildet wurde, zeigt der untere Teil eine Vergrößerung im Bereich des Inhibitors.

Diese modifizierten Inhibitoren wurden analog zur bereits beschriebenen Methode der Darstellung von SPMFKG-BoroV (**143**) bzw. DPMFKL-BoroV (**142**) synthetisiert, das heißt ein in Lösung dargestellter Boro-Valin-Baustein **90** wurde in Lösung mit einer aus einer Festphasenpeptidsynthese erhaltenen, geschützten Peptidsequenz gekuppelt, entschützt und mittels HPLC aufgereinigt. Mittels dieser Methode konnten die gewünschten Peptidboronsäuren **144-156** dann in Ausbeuten zwischen 1,6 % und 30,2 % erhalten werden. Anschließend wurden sie in Enzymassays getestet. Unerwarteterweise wurden hierbei IC_{50} -Werte gemessen, die sich zum Großteil im gleichen Rahmen wie der des Vergleichsinhibitors DPMFKL-BoroV (**142**) bewegten. Als bester Inhibitor stellte sich die Sequenz DRMIKQ-BoroV (**144**) heraus. Es wurde ein IC_{50} -Wert von $0,5 \mu\text{M}$ erhalten, d. h. der Inhibitor hemmte um einen Faktor fünf besser als die Ausgangssubstanz DPMFKL-BoroV (**142**). Obwohl also erstmals ein submikromolarer HtrA1-Inhibitor aufgefunden werden konnte, konnten mittels diesem Design keine Peptidboronsäuren-Inhibitoren mit vergleichbarer Potenz wie andere, aus der Literatur^[121] bekannte Peptidboronsäureinhibitoren für Serinproteasen wie z. B. Chymotrypsin oder Elastase erreicht werden, welche oftmals im unteren nanomolaren Bereich

hemmen. Die erhaltenen IC₅₀-Hemmwerte aller synthetisierten Peptidboronsäureinhibitoren sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: IC₅₀- und K_i-Werte für HtrA1.

Peptid	IC ₅₀ /μM	K _i /μM
DRMIKQ-BoroV (144)	0,5	0.29
DRYIRY-BoroV (145)	0,8	0.41
DRMIKY-BoroV (146)	0,8	0.43
DRYIKY-BoroV (147)	0,9	0,50
DRMIRY-BoroV (148)	1,0	0,55
DPMFKL-BoroV (142)	2,6	1,42
DRYMRY-BoroV (149)	2,7	1,48
DRMMRY-BoroV (150)	3,5	1,89
DRYMRQ-BoroV (151)	3,8	2,10
DRMMRQ-BoroV (152)	8,5	4,65
DRYMKQ-BoroV (153)	8,8	4,79
DRMIRQ-BoroV (154)	9,0	4,92
DRMMKQ-BoroV (155)	16,4	8,96
DRYIKQ-BoroV (156)	>500	-

Es fällt auf, dass Veränderungen an der P4-Position einen großen Einfluss auf die Hemmeigenschaften zu haben scheinen, da durch Austausch dieser Position aus dem besten Inhibitor DRMIKQ-BoroV (144) zum Inhibitor DRMMKQ-BoroV (155) ein Aktivitätsunterschied von einem Faktor von ca. 30 beobachtet werden kann. Mit Hilfe eines einfachen Modellings unter Verwendung des Programms PyMOL wurde daher in einem nächsten Schritt versucht, die Ergebnisse mittels eines Bindemodells besser zu deuten (Abbildung 51). Diese Modelling-Studien zeigten z. B., dass der Einbau von Isoleucin an P4 zu einer Verringerung des Abstandes zu Leu345 auf ca. 2 Å führt und somit deutlich gegenüber den 3,8 Å, welche mit Phenylalanin im ursprünglichen Inhibitor beobachtet wurden, reduziert wurde. Dies spricht dafür, dass die für die Bindung wichtigen hydrophoben Wechselwirkungen besonders effizient ausgebildet werden können. Demgegenüber vergrößert sich der Abstand zu Leu307 und Leu309 auf 3,8 Å im Vergleich zu 3,4 Å mit Phenylalanin. Hier werden die Wechselwirkungen also schwächer, nichtsdestotrotz scheint der Einbau von Isoleucin gegenüber Phenylalanin zu einer insgesamt besseren Okkupation der S4-Tasche zu führen. Wird hingegen in den Inhibitor an P4 ein Methionin eingebaut, wird eine Entfernung

von 3,2 Å zu Leu345 beobachtet. Die Distanz zu Leu307 beträgt 3,1 Å. Zusätzlich könnte die Wechselwirkung mit Phe353 verstärkt werden. Da die experimentell-gewonnenen Daten eindeutig eine bessere Interaktion von Isoleucin als Methionin belegen, erscheint der Einfluss der Wechselwirkung mit Leu345 als maßgebender als die Wechselwirkungen mit den anderen Aminosäure-Resten in der stark-hydrophoben S4-Tasche. Eine genauere Analyse wäre hier jedoch wünschenswert und könnte zum Beispiel über eine Cokristallstruktur der Inhibitoren und HtrA1 erfolgen.

Die genaue Lage der Lysinseitenkette in der Tasche S3 war aus der Kristallstruktur nicht genau zu bestimmen. Es konnte jedoch eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Aminogruppe und Tyr302 festgestellt werden. Wird das Lysin in PyMOL gegen Arginin mutiert, verkürzt sich die Distanz von 3,2 Å auf 2,3 Å. Bei den IC_{50} -Werten konnte hier jedoch praktisch keine Verbesserung erzielt werden.

An P2 wurde die ursprüngliche Aminosäure Leucin gegen Tyrosin oder Glutamin getauscht. Mit Leucin konnten in der Cokristallstruktur hydrophobe Wechselwirkungen mit Thr344 und Leu345 nachgewiesen werden. Die Distanzen betragen 3,6 Å und 3,7 Å. Mit Glutamin sind diese hydrophoben Interaktionen so nicht möglich. Dafür können die schwachen Wechselwirkungen möglicherweise durch stärkere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylgruppe des Glutamins und den Hydroxylgruppen von Thr344 und Tyr326 ersetzt werden. Die Gruppen liegen 5,9 Å und 6,7 Å auseinander. Der Einbau von Tyrosin anstelle von Leucin deutete die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung von 4,9 Å zwischen der Hydroxylgruppe des Tyrosins und der Asparaginsäure der katalytischen Triade Asp250 an. Zusätzlich kann es zu π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten des Tyrosins und dem Histidin His220, welches wiederum zur katalytischen Triade gehört, kommen. Der Abstand beträgt 3,8 Å. Die Entfernung von 3,9 Å und 4,9 Å zwischen dem Tyrosin und Leu345 und Thr344 ermöglicht dazu Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Zusammengefasst sollte Tyrosin die deutlich bessere Wahl gegenüber Glutamin an P2 sein. Diese These wird durch die ermittelten IC_{50} -Werte weitestgehend bestätigt, auch wenn der beste synthetisierte Inhibitor Glutamin an Position P2 enthält. Die Ergebnisse deuten somit an, dass der Einbau eines Tyrosins an Position P2 im besten Inhibitor einen noch potenteren HtrA1-Hemmstoff liefern sollte.

Für das Methionin an P5 können keine externen Wechselwirkungen zu HtrA1 beobachtet werden. Interessanterweise führte auch der Einbau eines Tyrosins (welches in einem Modelling die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zu Glu308 offenbarte) zu keinen Änderungen in den IC_{50} -Werten. Dies lässt den Schluss zu, dass die

Wechselwirkungen zwischen P5 und der S5-Tasche insgesamt relativ schwach sind und an dieser Position keine nennenswerte Optimierung der Hemmwerte zu erreichen sind.

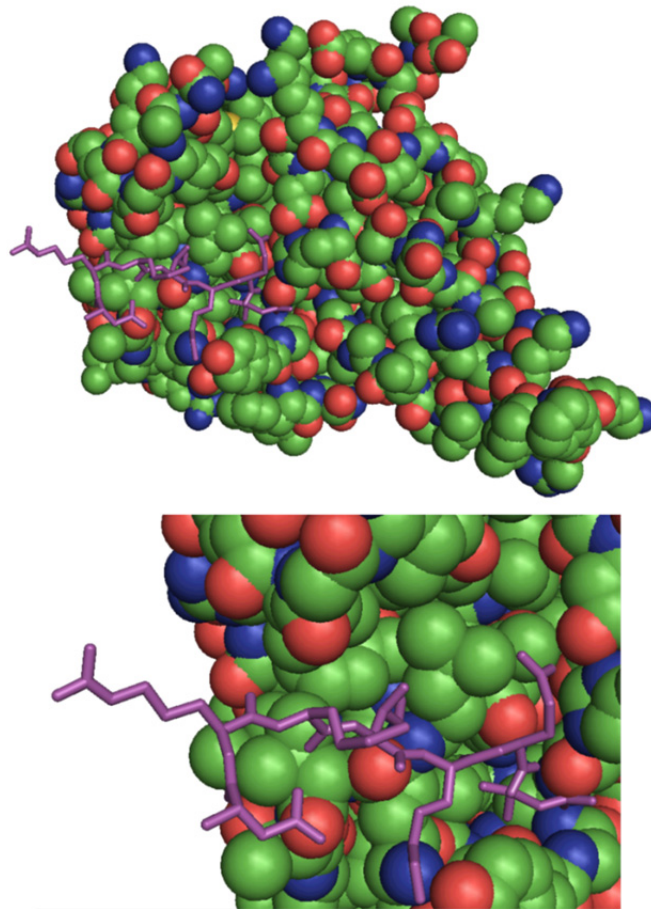


Abbildung 51: Modell des HtrA1 Monomers mit gebundenem, bestem Inhibitor DRMIKQ-boroV (**144**). Während oben das komplette Monomer abgebildet ist, zeigt der untere Teil eine Vergrößerung im Bereich des Inhibitors.

4.1.9 Testung der Peptidboronsäurenbibliothek auf DegP-Hemmung

Im nächsten Schritt wurde diese synthetisierte Substanzbibliothek auf die HtrA-Protease DegP aus *E. coli* getestet. Dabei konnte keine Verbesserung der Hemmung gegenüber der Ausgangssubstanz DPMFKL-BoroV (**142**) ermittelt werden. Die IC_{50} -Werte liegen im gleichen Bereich wie die besten Inhibitoren für HtrA1. Dieses Ergebnis ist aber auch nicht verwunderlich, da die Modifikationen unter Berücksichtigung der Struktur von HtrA1 ausgewählt worden sind. Für DegP konnte im Gegensatz zu HtrA1 eine klare Präferenz für Tyrosin gegenüber Glutamin an der Position P2 beobachtet werden. Des Weiteren scheinen an Position P3 beide basischen Aminosäuren, d. h. Lysin oder Arginin, äquivalent zu sein, da sie zu gleichen Hemmwerten führen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: IC₅₀- und K_i-Werte für DegP.

Peptid	IC ₅₀ /μM	K _i / μM
DPMFKL-BoroV (142)	0,3	0,17
DRYIRY-BoroV (145)	0,3	0,17
DRMIKY-BoroV (146)	0,4	0,21
DRYMRY-BoroV (149)	0,4	-
DRMIRY-BoroV (148)	0,5	-
DRMMRY-BoroV (150)	0,7	-
DRYIKY-BoroV (147)	1,3	0,73
DRMMRQ-BoroV (152)	4,9	-
DRYMRQ-BoroV (151)	12,0	6,53
DRMIKQ-BoroV (144)	18,6	10,13
DRYMKQ-BoroV (153)	32,5	17,70
DRMIRQ-BoroV (154)	45,2	24,66
DRMMKQ-BoroV (155)	38,9	21,22
DRYIKQ-BoroV (156)	>500	-

Sowohl Für DegP als auch für HtrA1 konnte keine Hemmung durch DRYIKQ-BoroV (156) gemessen werden. Die Gründe wurden jedoch nicht weiter untersucht.

4.1.10 Hemmung der Tsp-Protease

Im nächsten Teil wurden die peptidischen Boronsäureinhibitoren auf ihre Wirkung gegen die Protease Tsp getestet. Dazu wurde erneut ein Aktivitätstest durchgeführt. Als Substrat wurde in diesem Falle DPMFKLV-pNA verwendet. Die Ergebnisse des Assays sind in Tabelle 4 aufgeführt. Wie schon für DegP erwies sich DPMFKL-BoroV (142) als bester Inhibitor. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen für diese Protease, dass Inhibitoren, die an P2 Tyrosin enthalten, deutlich effektiver sind als Inhibitoren mit einem Glutamin. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit der Literaturaussage, dass ein hydrophober C-Terminus wichtig für die Erkennung durch Tsp ist. An den weiteren Positionen sind keine eindeutigen Tendenzen vorhanden, welche Aminosäure die bessere inhibitorische Wirkung erzielt. Da keine Kristallstruktur für die Tsp-Protease vorliegt, kann hier auch nicht untersucht werden, welche möglichen Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym möglich sind. In der Literatur^[122] findet man als Tsp-Inhibitor das Peptid GRGYALAA. Dieses Peptid ist ein

kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von 31 μM . Damit inhibieren die Boronsäure-modifizierten Peptide um einen Faktor von 100 effektiver als der rein-peptidische Inhibitor.

Tabelle 4: Spezifische Aktivitäten, IC_{50} - und K_i -Werte für die Tsp-Protease.

Peptid	Spezifische Aktivität / $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$	$K_i/\mu\text{M}$
DPMFKL-BoroV (142)	0,3	0,5	0,27
DRMIRY-BoroV (148)	1,0	0,3	0,18
DRYIRY-BoroV (145)	1,2	n. b.	n. b.
DRYMRY-BoroV (149)	1,7	n. b.	n. b.
DRMIKY-BoroV (146)	2,1	0,3	0,19
DRMMRY-BoroV (150)	2,1	n. b.	n. b.
DRYIKY-BoroV (147)	2,3	n. b.	n. b.
DRYMRQ-BoroV (151)	2,6	n. b.	n. b.
DRMMKQ-BoroV (155)	2,8	n. b.	n. b.
DRYMKQ-BoroV (153)	4,0	n. b.	n. b.
DRMIKQ-BoroV (144)	4,4	0,8	0,43
DRMIRQ-BoroV (154)	6,3	1,8	1,0

4.1.11 Hemmung von Elastase

Als nächstes wurde die Bibliothek der Boronsäureinhibitoren auf das Enzym Elastase getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Insgesamt zeigten sich hier für alle getesteten Proteasen die geringsten IC_{50} -Werte. Der beste Inhibitor ist auch für Elastase DPMFKL-BoroV (142) mit einem IC_{50} -Wert von 0,06 μM . Ohne die Inhibitoren speziell für Elastase anzupassen, sind ähnlich effektive Inhibitoren synthetisiert worden, wie sie in der Literatur bekannt sind.^[121] Die Unterschiede innerhalb der Substanzbibliothek sind jedoch sehr klein. Dies lässt sich durch die bekannte P1-spezifische Spaltspezifität von Elastase erklären. Elastase spaltet C-terminal nach kleinen hydrophoben Aminosäuren wie z. B. Valin, währenddessen die Substitutionen an den Positionen P2-Pn nur eine geringe Rolle spielen. Dementsprechend lassen sich hier keine tiefgehenden Aussagen über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Aminosäuren an den verschiedenen Positionen machen.

Tabelle 5: IC₅₀-Werte für Elastase.

Peptid	IC ₅₀ /μM
DPMFKL-BoroV (142)	0,06
DRMIKQ-BoroV(144)	0,1
DRYIKY-BoroV(147)	0,42
DRMMRQ-BoroV(152)	0,48
DRMIKY-BoroV(146)	0,49
DRYMRQ-BoroV(151)	0,5
DRYMRY-BoroV(149)	0,55
DRMIRQ-BoroV(154)	0,56
DRMMRY-BoroV(150)	0,6
DRYIRY-BoroV(145)	0,63
DRMIRY-BoroV(148)	0,67
DRMMKQ-BoroV(155)	1,4
DRYMKQ-BoroV(153)	1,5
DRYIKQ-BoroV(156)	>400

4.1.12 Hemmung von DegS

Einige Inhibitoren wurden ebenfalls auf ihre Hemmwirkung bezüglich der Protease DegS aus *E. coli* getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt worden.

Tabelle 6: IC₅₀-Werte für DegS.

Peptid	IC ₅₀ /μM
DRYMRY-BoroV (149)	1,5
DPMFKL-BoroV (142)	1,8
DRMIKY-BoroV (146)	2,4
DRMIRY-BoroV (148)	3,4
DRYMRQ-BoroV (151)	3,5
DRYIRY-BoroV (145)	4,0
DRYIKY-BoroV (147)	4,4
DRMIRQ-BoroV (154)	6,0
DRMIKQ-BoroV (144)	7,4
DRMMKQ-BoroV (155)	16,2
DRYMKQ-BoroV (153)	19,4

Für diese Protease sind die IC₅₀-Werte relativ schwach. Dies spricht für eine hohe Selektivität der Protease, die in *E. coli* als regulierende Protease wirkt. In der Tat ist bekannt, dass DegS eine extrem-hohe Substratspezifität zeigt und in *E.coli* nur ein Substrat, RseA, an einer genau-definierten Stelle schneidet. Nichtsdestotrotz zeigen die Inhibitoren eine um den Faktor 10-varierende Hemmaktivität, welche darauf schließen lässt, dass durch Optimierung der Sequenz in der Tat verbesserte DegS-Inhibitoren erhaltbar sein sollten. So könnte z. B. der Einbau eines Prolin an P2 einen großen Einfluss auf die Hemmung nehmen, da RseA an dieser Stelle über eine Prolineinheit verfügt.

Um für die Protease DegS einen besseren Inhibitor darzustellen, wurde der Inhibitor MGKASP-BoroV (157) synthetisiert, der genau der Sequenz aus RseA entspricht. Die Ausbeute für diesen Inhibitor beträgt 5,5 %. Überraschenderweise zeigt dieser Inhibitor keine Aktivität gegenüber DegS.

4.1.13 Hemmung der CPAF-Protease

In Kooperation mit mehreren Gruppen an der Universität von Kalifornien in Irvine wurde die Inhibitorbibliothek auf die Protease CPAF aus *Chlamydia trachomatis* getestet. Diese Serinprotease ist ein wichtiger Virulenzfaktor für das intrazellulär-lebende Bakterium. Die mit Aminoboronsäuren am C-Terminus modifizierten Peptide wurden hierzu in einem *in vitro* Test auf ihre Hemmwirkung überprüft. Als Test wurde ein gel-basierter Assay verwendet (Abbildung 52). In diesem wurde die Spaltung des CPAF-Substrates p65 nach Zugabe

einzelner Inhibitoren verfolgt. Für die Durchführung des Assays wurden Zellen zuerst mit Chlamydien infiziert, aufgeschlossen und das Zelllysate, welches somit die Protease CPAF enthält, mit den einzelnen Inhibitoren versetzt. Anschließend wurde nicht-infiziertes Zelllysate, das das Protein p65 enthielt, als Substrat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die CPAF-vermittelte Hydrolyse von p65 mittels eines quantitativen Western-Blots beurteilt. Zur Normierung wurde auf dem Gel zeitgleich ungespaltenes Substrat als interner Referenzwert aufgetragen. Weitere Kontrollen waren Substrat mit der CPAF-Protease ohne Inhibitor (Spur 2, Abbildung 52) und DMSO (Spur 3, Abbildung 52), welches als Lösungsmittel für die Boronsäureinhibitoren benutzt wurde. Da es keine Veränderungen im Vergleich zu Spur zwei gab, kann man daraus schließen, dass Dimethylsulfoxid in den benutzten Mengen das Enzym nicht beeinträchtigt hat. In den weiteren Spuren wurden nun DMSO-Lösungen der Inhibitoren in einer Konzentration von 1 μM , 10 μM und 50 μM zugegeben. Bei 50 μM (Abbildung 52) zeigten bis auf den Inhibitor MGKASP-BoroV (**157**) alle Inhibitoren eine deutlich zu erkennende Wirkung. Bei 10 μM (Abbildung 53) zeigte sich ein differentielles Bild. Der beste Inhibitor hatte die Sequenz DRYIRY-BoroV (**145**). Bei den Peptidboronsäuren DRYMKQ-BoroV (**153**), DRMIKQ-BoroV (**144**), DRYMRQ-BoroV (**151**), DRYIKY-BoroV (**147**), DRMIRY-BoroV (**148**), DRYMRY-BoroV (**149**) und DRMMRY-BoroV (**150**) war die inhibitorische Wirkung weiterhin im Rahmen der Genauigkeit des Western Blots deutlich erhalten. Bei den Peptiden DRMMKQ-BoroV (**155**) und DPMFKL-BoroV (**142**) waren leichte Spuren des Spaltprodukts erkennbar. Dieses Spaltprodukt war bei DRMIKY-BoroV (**146**) und DRMMRQ-BoroV (**152**) deutlicher wahrzunehmen. Bei 1 μM Inhibitorkonzentration (Abbildung 54) wurde das Substrat vollständig geschnitten. Aufgrund der Ergebnisse und vor dem Hintergrund, dass die CPAF-Protease *in vitro* eine Reihe von Substraten verdaut, die keine homologen Aminosäuresequenzen besitzen, ist es schwierig, eine Aussage zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen zu treffen. Eine leichte Bevorzugung von Tyrosin an P5 gegenüber Methionin lässt sich vermuten. Bei beiden Sequenzen, die stärkere Spaltproduktbanden zeigen, wird durch einen Austausch von Tyrosin in Methionin vollständige Inhibition erreicht. Tyrosin ist größer und ermöglicht so mehr hydrophobe Wechselwirkungen als Methionin. Die gelöste Kristallstruktur der aktiven Protease zeigt, dass der Kontakt zwischen dem aktiven Zentrum und dem Substrat vor allem durch hydrophobe Interaktionen zustande kommt.^[36]

Aus der Kristallstruktur lässt sich für P1 eine Bevorzugung für hydrophobe Aminosäuren vermuten. Dies trifft auf BoroValin zu. Die Positionen P2, P3 und P4 scheinen keine starken Wechselwirkungen mit der Protease auszubilden. Dies erklärt, warum an diesen

keine Spezifität zu beobachten ist. An P5 kann es hingegen zu starken hydrophoben Interaktionen kommen.

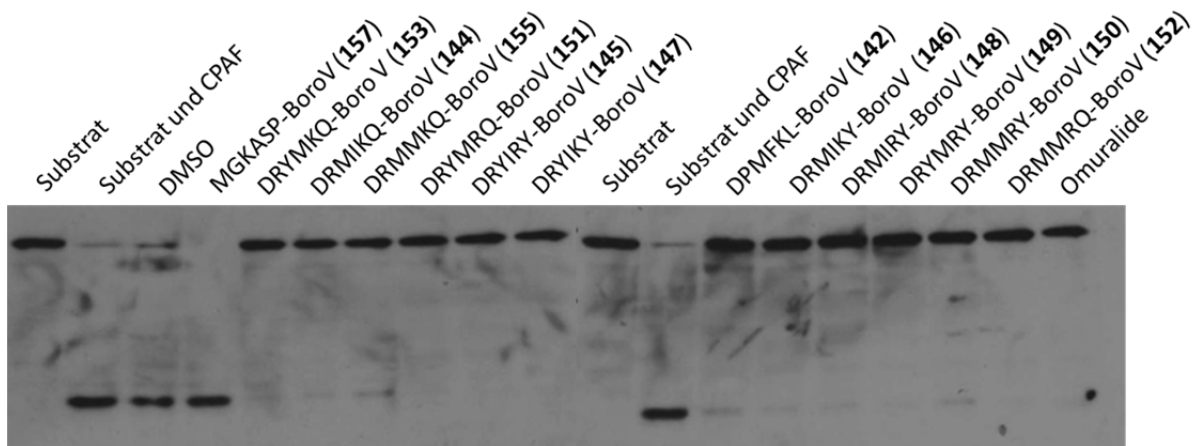


Abbildung 52: Western Blot bei 50 µM InhibitorKonzentration.

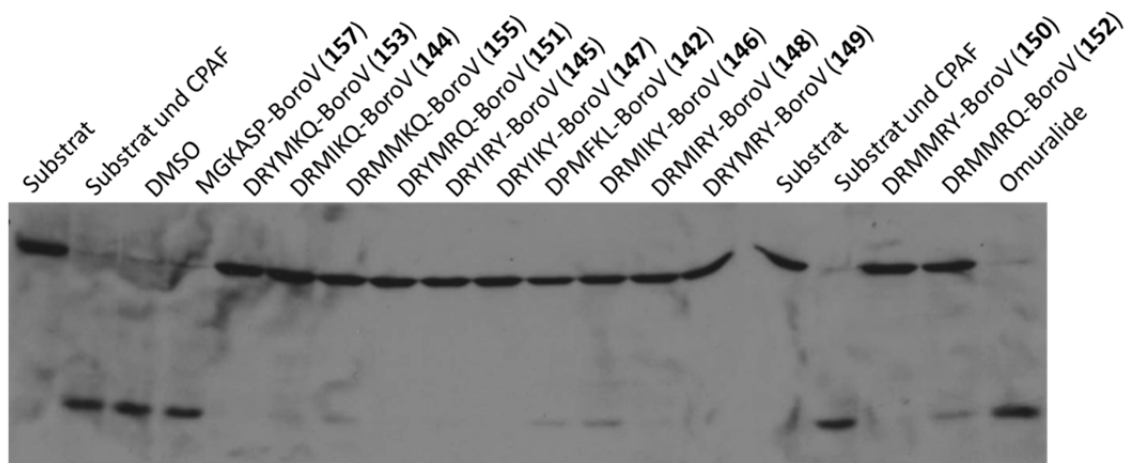


Abbildung 53: Western Blot bei 10 µM InhibitorKonzentration.

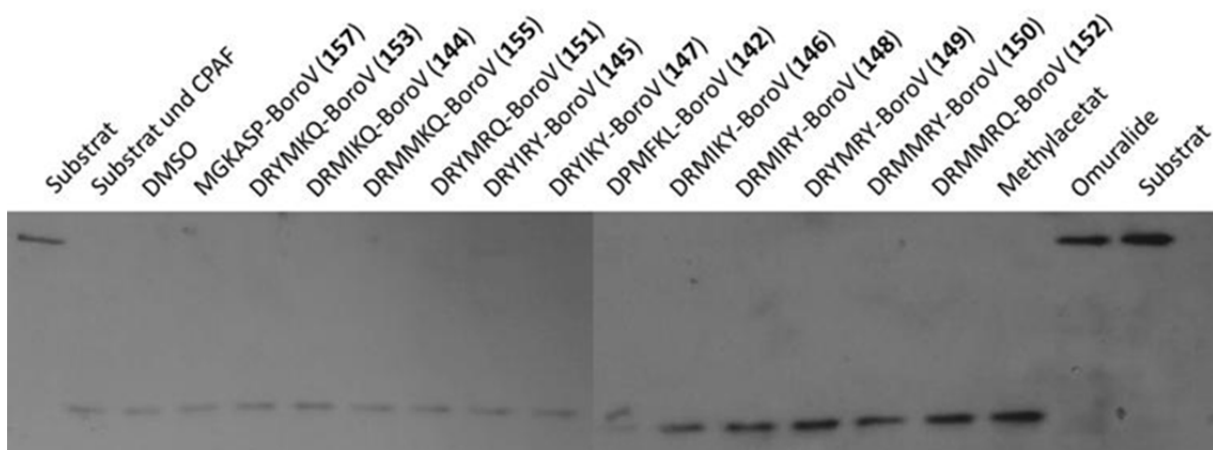


Abbildung 54: Western Blot bei 1 µM InhibitorKonzentration.

4.1.14 Neue Inhibitoren für CPAF

Die aktive Protease CPAF ist ein Homodimer eines Heterodimers, welches durch Autoproteolyse eines Zymogens entsteht. Die Zymogensequenz enthält am N-Terminus ein Signalpeptid, das dafür sorgt, dass das Peptid über den Sec-abhängigen Sekretionsweg durch die innere Membran in das Cytosol der befallenen Wirtszelle gebracht wird.^[12] Das Signalpeptid wird dabei proteolysiert. Während der Reifung zur aktiven Protease wird das Zymogen mehrmals geschnitten.^[36] In einem *trans*-autokatalytischem Schritt wird nach kurzfristiger konzentrationsabhängiger Dimerisierung zweier CPAF-Zymogene das Zymogen zuerst zwischen Met243 und Arg244 geschnitten. Durch eine anschließende Konformationsänderung kann sich die katalytische Triade, welche aus den Aminosäuren Ser499, His105 und Glu558 besteht, vollständig ausbilden. Dies erlaubt nun die Durchführung zweier weiterer Proteolysen, wodurch zwei zusätzliche Segmente entfernt werden. Dazu wird zunächst zwischen Met264 und Val265 und anschließend zwischen Ser283 und Gly284 geschnitten.

Um einen spezifischeren Inhibitor für CPAF zu entwickeln, wurde deshalb ein Peptidboronsäure-Substratanalogon synthetisiert, das auf der Substratstruktur des zweiten Proteolyse-Ereignisses, d. h. dem Met264-Schnitt beruht. Da die Synthese eines BoroMet-Analogons aufgrund der Methylthioether-Gruppierung nicht ohne größeren Aufwand möglich ist, wurde bei der Synthese auf ein „klassisches“ Methionin-Mimetikum, nämlich die Aminosäure Norleucin, zurückgegriffen und ein BoroNorleucin-Derivat hergestellt. Da das Ziel war, mit Hilfe der Boronsäurepeptide nicht nur eine starke Inhibierung von CPAF, sondern auch eine mögliche Selektivität gegenüber dem Proteasom zu erreichen, wurde BoroNorleucin in der D-Konfiguration synthetisiert, da die Kristallstruktur eine solche Modifikation zu erlauben scheint, das Proteasom jedoch D-Aminosäuren in P1-Position nur sehr geringfügig umsetzen kann.

Die Synthese des D-BoroNorleucinpinandiolesters (**163**) beginnt mit der Veresterung von *n*-Butylboronsäure (**158**) mit (1*R*,2*R*,3*S*,5*R*)-(-)-Pinandiol (**159**). Der Boronsäureester **160** konnte in guter Ausbeute von 92,2 % erhalten werden. Zur Darstellung des Hydrochlorid-Salzes des D-BoroNorleucinpinandiolesters (**163**) wurden anschließend die analogen Schritte der BoroValin-Synthese durchgeführt, wodurch dieses nach den drei Stufen Insertion, nucleophile Substitution und Abspaltung der TMS-Schutzgruppen in 33,5% Ausbeute erhalten werden konnte (Abbildung 55).

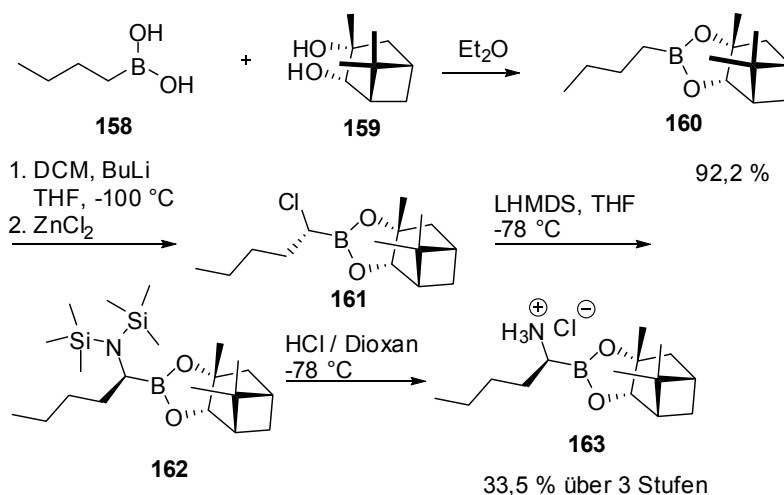


Abbildung 55: Synthese von D-BoroNorleucin.

Die Aminosäuresequenz für den vom Zymogen abstammenden Inhibitor beträgt Ser-Leu-Phe-Tyr-Ser-Pro-D-BoroNorleucin. Das entspricht den Aminosäuren 258 bis 264 der Zymogensequenz, inklusive dem Austausch von Methionin durch Norleucin. Die Synthese dieses Inhibitors **164** erfolgte ebenfalls analog der bereits beschriebenen Syntheseroute und konnte in einer Ausbeute von 23,7 % abgeschlossen werden. Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung der CPAF-Inhibitoren war eine weitere Sequenzoptimierung des potentesten Inhibitors DRYIRY-BoroV (**145**). Als erste Modifikation wurde BoroValin durch D-BoroNorleucin ersetzt. Der entsprechende Inhibitor DRYIRY-D-BoroNorleucin (**165**) konnte in mäßiger Ausbeute von 6,5 % synthetisiert werden. In einem zweiten Optimierungsversuch wurde Isoleucin an P4 durch Tryptophan ersetzt. Zusätzlich wurde bei zwei zusätzlichen Inhibitoren L-BoroValin durch D-BoroValin ersetzt. Der Grund dafür war der Versuch, wie bereits bei der Synthese von BoroNorleucin erläutert, die Selektivität gegenüber dem Proteasom zu erhöhen. In diesem Fall wurde bei der Synthese der Boronsäure DRYWRY-D-BoroV (**166**) eine Ausbeute von 33,3 % erzielt. In einem dritten Ansatz wurde an P5 Tyrosin durch Phenylalanin ausgetauscht. Der entsprechende Inhibitor DRFIRY-D-BoroV (**167**) konnte in einer Ausbeute von 22,6 % gewonnen werden. In einem letzten Schritt wurden alle drei Modifikationen in einem Peptid durchgeführt; das sich aus diesen Substitutionen ergebene Peptid DRFWRY-D-BoroNorleucin (**168**) konnte in einer Ausbeute von 16,0 % erhalten werden.

Die neusynthetisierten Peptidboronsäuren wurden wiederum an der „University of California“ getestet. Die Tests erfolgten analog zu den bereits beschriebenen Untersuchungen der ursprünglichen Inhibitoren. Die quantitativen Western Blots sind in Abbildung 56 dargestellt. Als Negativkontrolle wurde nicht-infiziertes Zelllysate, also Substrat, verwendet. Zusätzlich wurden zu allen Proben äquivalente Mengen von Erk 1/2 als Ladungskontrolle

zugesetzt. Dies zeigt die Bande bei 43 kDa. Die Positivkontrolle bestand aus Substrat und infiziertem Zelllysate als Quelle für die Protease CPAF. Für den besten ursprünglichen Inhibitor DRYIRY-BoroV (**145**), für den einzigen literaturbekannten Inhibitor Omuralide und für die neusynthetisierten Inhibitoren wurden konzentrationsabhängige Untersuchungen durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM eingesetzt. Als bester Inhibitor erwies sich in diesem Test DRYIRY-D-BoroNorleucin (**165**). Bereits bei 0,3 μM konnten Spuren des Substrats beobachtet werden. Bei 1 μM und dementsprechend auch bei höheren Konzentrationen konnte bereits kein Substratumsatz mehr nachgewiesen werden. Als ein weiterer, hochpotenter Inhibitor stellte sich das Peptid DRFWRY-D-BoroNorleucin (**168**) heraus. Bei diesem Inhibitor sind wiederum Spuren des Substrats bereits bei einer Konzentration von 0,3 μM erkennbar. Bei 1 μM wird der Unterschied zwischen DRYIRY-D-BoroNorleucin (**165**) und DRFWRY-D-BoroNorleucin (**168**) deutlich. Es ist zu sehen, dass die Substratbande im Vergleich zu höheren Konzentrationen schwächer ist.

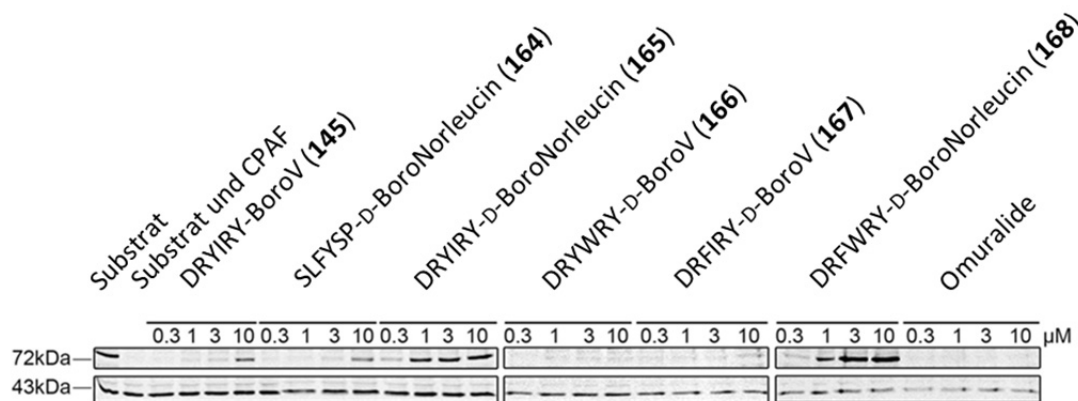


Abbildung 56: Western Blot der neu synthetisierten CPAF-Inhibitoren bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Bei 43 kDa liegt die Beladungskontrolle Erk 1/2.

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens drei Mal durchgeführt. So konnte ein Diagramm zusammengestellt werden, das die Unterschiede zwischen den verschiedenen Inhibitoren zeigt. Das Diagramm (Abbildung 57) zeigt die Hemmung der Protease CPAF in Prozent bei 3 μM . Dabei zeigen alle neusynthetisierten Inhibitoren eine vielfach-höhere Potenz als Omuralide, das bisher in biologischen Untersuchungen als chemisches Werkzeug zur Hemmung von CPAF eingesetzt wurde.

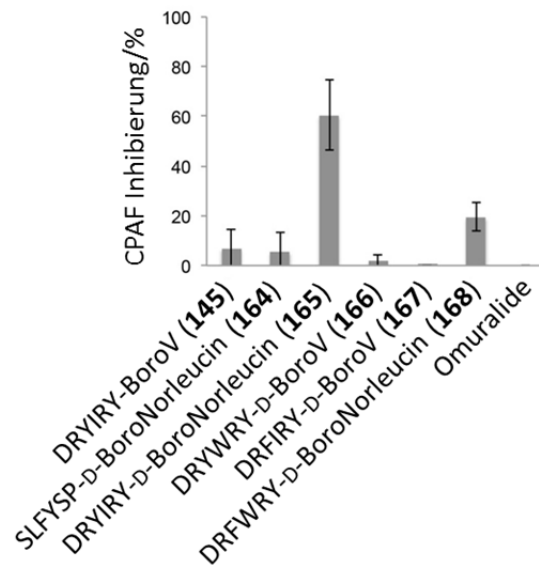


Abbildung 57: Das Diagramm zeigt die prozentuelle Inhibierung von CPAF durch die neu synthetisierten Inhibitoren bei 3 μ M.

Die Inhibitoren sollen daher in Zukunft dazu dienen, die Wirkungsweise von CPAF für die Virulenz von Chlamydien zu erforschen. So kann auch festgestellt werden, ob CPAF ein mögliches Target bei der Entwicklung neuer Medikamente sein kann. Ein chemisches Werkzeug ist hierzu essentiell, da es bisher keine Möglichkeit gibt, einen CPAF-Gen-Knockout durchzuführen. Daher wurde bisher meistens Lactacystein, ein biochemischer Vorläufer von Omuralide, eingesetzt, welches ein schwacher Inhibitor für CPAF ist und dementsprechend in hohen Konzentrationen eingesetzt werden muss. Dieser Wirkstoff inhibiert jedoch ebenfalls und deutlich effektiver das Proteasom. So ist es schwierig, mit diesem Inhibitor die Wirkungsweise von CPAF zu untersuchen, weil es nicht möglich ist, genau abzugrenzen, ob der Effekt auf der Hemmung von CPAF oder vom Proteasom beruht. Auf Grund dieser Problematik ist es wichtig, Inhibitoren zu entwickeln, die eine möglichst hohe Selektivität für CPAF erreichen. Um diese Selektivität für die synthetisierten Boronsäureinhibitoren zu bestimmen, wurden sie daher in einem nächsten Schritt in einem 20S Proteasom Assay getestet. Die Ergebnisse sind in einem Diagramm (Abbildung 58) dargestellt. Es wird die prozentuale Hemmung des 20S Proteasoms bei 3 μ M gezeigt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die beiden potenten Inhibitoren DRYIRY-D-BoroNorleucin (165) und DRFWRY-D-BoroNorleucin (168) ebenfalls - zumindest teilweise - das Proteasom hemmen, allerdings mit einer viel geringeren Hemmwirkung als der bisherige Standardinhibitor Lactacystein. Zusammengefasst kann man daher sagen, dass das Verhältnis zwischen CPAF- und Proteasom- Inhibierung für die Boronsäureinhibitoren deutlich besser

ist als für Lactacystein. Durch weitere Verbesserungen in der Sequenz kann die Selektivität in Zukunft sicherlich weiter gesteigert werden.

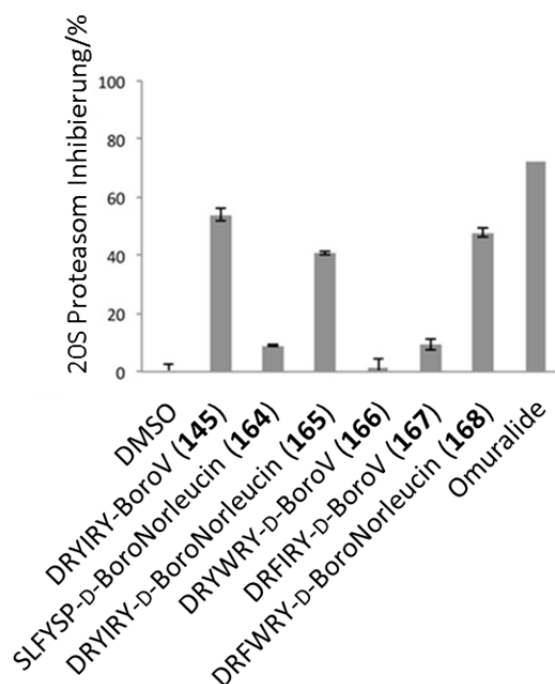


Abbildung 58: Das Diagramm zeigt die prozentuelle Inhibierung des 20S Proteasoms durch die neu synthetisierten Inhibitoren bei 3 µM.

4.1.15 Boronsäureinhibitoren mit Fluorophoren

Um weitere biochemische Untersuchungen mit den Boronsäureinhibitoren durchführen zu können, wurde exemplarisch eine Fluorophor-markierte Peptidboronsäure synthetisiert (Abbildung 59). Als Fluorophor wurde dabei Biman verwendet. Dieser Fluorophor kann als Monobromobiman mittels einer nucleophilen Substitution in Peptide eingeführt werden. So reagiert dieses Reagenz z. B. mit Thiolen, wie z. B. von Cysteinen, zu kovalenten Addukten unter Abspaltung des Bromids.^[123] Daher wurde mittels Festphasenpeptidsynthese ein N-terminal um ein Cystein-verlängertes Peptid synthetisiert, d. h. anstelle von DPMFKL wurde CDPMFKL gekuppelt. Zur Schützung der Thiolgruppe wurde das Cystein dabei als Cystin-Analogon in die Peptidsequenz eingeführt. Die Entschützung erfolgt anschließend unter reduktiven Bedingungen mittels DTT. Die Reaktion mit dem Monobromobiman wurde auch noch an fester Phase durchgeführt.^[124] Erst danach wurde das noch geschützte Peptid vom Harz abgespalten, unter Standardbedingungen mit dem BoroValinpinandiolester (**90**) gekuppelt und zum Schluss vollständig entschützt. Nach der Aufreinigung mittels präparativer HPLC konnte das Produkt **171** in einer Ausbeute von 22,4 % erhalten werden.

Aufgrund der limitierten Zeit konnte dieses Peptid bisher jedoch noch nicht in weitergehenden biochemischen Studien untersucht werden.

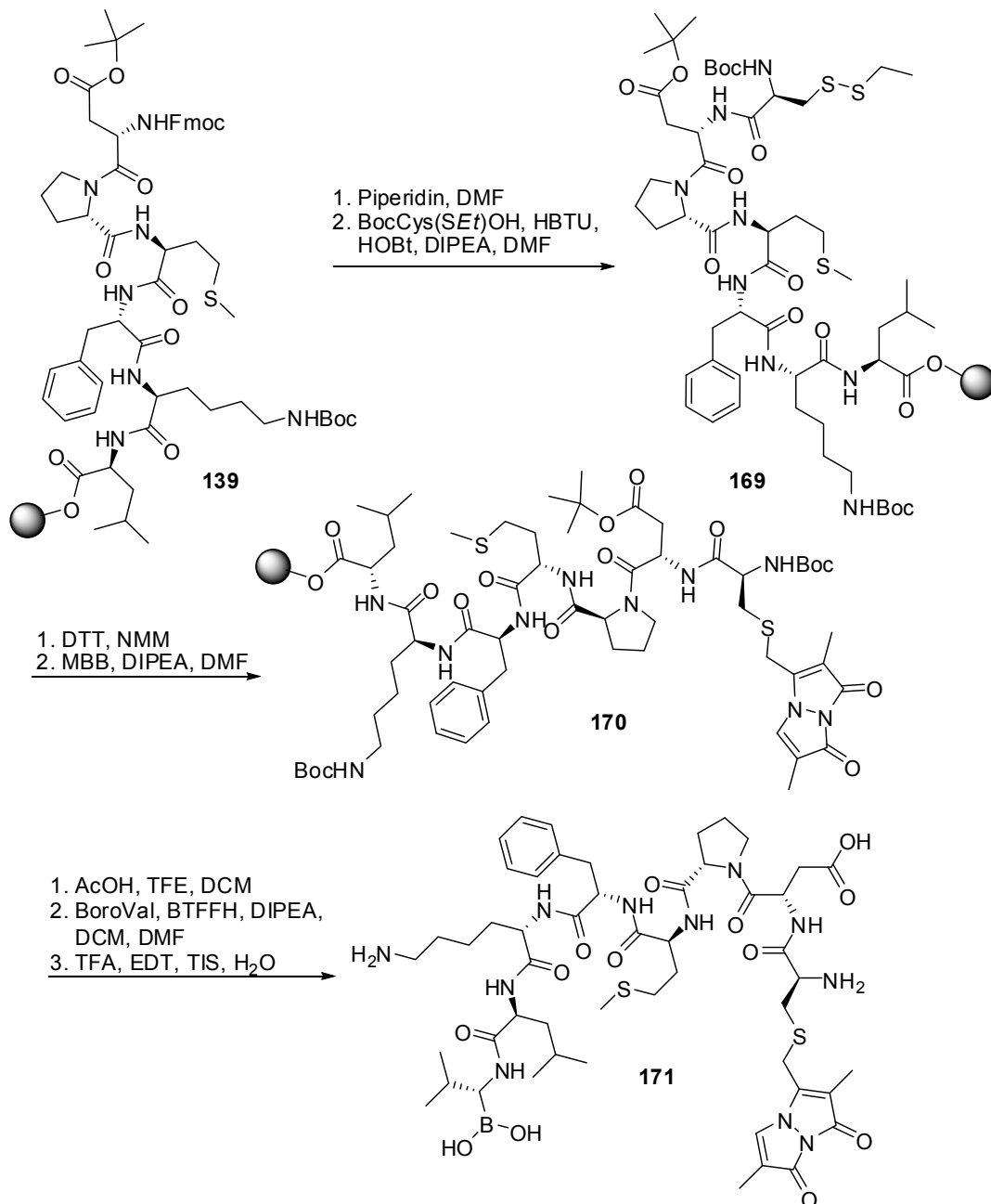


Abbildung 59: Synthese von DPMFKL-BoroV mit Bimannfluorophor (171).

4.2 Entwicklung cyclischer Boronsäureester als neuartige Inhibitoren der Serinproteasen

4.2.1 Einleitung

Am C-Terminus mit einer Boronsäure-substituierte Peptide sind bekannte Inhibitoren von Serin- und Threoninproteasen wie z. B. dem Proteasom. In der Tat ist mit dem Proteasominhibitor Bortezomib ein Peptidboronsäureinhibitor als Chemotherapeutikum zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen. Trotz der potenten Hemmwirkung von Peptidboronsäuren auf Serinproteasen sind bisher jedoch keine entsprechenden Verbindungen zur Hemmung ausgewählter Serinproteasen zugelassen. Eine Ursache hierfür liegt darin, dass mit „klassischen“ Peptidboronsäure-Inhibitoren eine Selektivität von Serinproteasen gegenüber dem Proteasom nur sehr schwer erreicht werden kann, da das Proteasom 1) eine hochabundante Protease ist (man nimmt an, dass ca. 1 % der Gesamtproteinmenge einer Zelle dem Proteasom zuzuordnen ist) und 2) Peptidboronsäuren besonders effizient mit dem aktiven Zentrum, einem N-terminalen Threoninrest des Proteasoms, wechselwirken können (die Aminogruppe des Threonins interagiert mit dem Boronat über Ausbildung einer zusätzlichen Salzbrücke). Daher sind zur Entwicklung selektiverer Boronsäure-basierter Serinproteaseinhibitoren Alternativansätze notwendig.

Im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Sara Christina Stolze wurden in der Arbeitsgruppe Kaiser selektive Serinproteaseinhibitoren auf der Basis der Ahp-Cyclodepsipeptid-Naturstoffe entwickelt (Abbildung 60). Diese Naturstoffe enthalten eine namensgebende 3-Amino-6-hydroxy-2-piperidon-Einheit (Ahp) und hemmen Serinproteasen nicht-kovalent unter Ausbildung einer kanonischen Konformation, einem bekannten und für Serinproteasen selektiven Hemmmotiv, welches normalerweise in Komplexen von Serinproteasen mit proteinogenen Serinproteaseinhibitoren gefunden wird. Die Ahp-Cyclodepsipeptide sind somit niedermolekulare Analoga von Protein-basierten Inhibitoren.

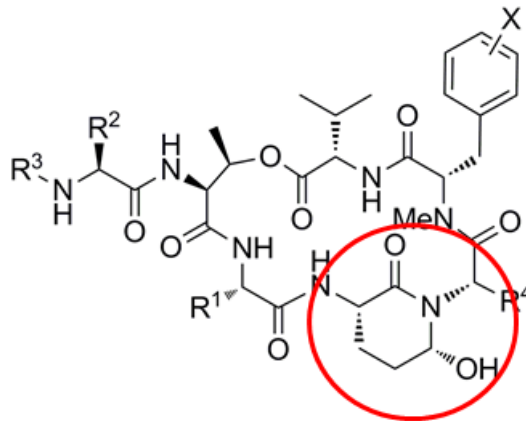


Abbildung 60: Allgemeine chemische Struktur der Ahp-Cyclodepsipeptide. Die namensgebende Ahp-Einheit ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet, mit R^1 - R^4 bzw. X sind variable Reste bezeichnet, die bei den verschiedenen Naturstoffen unterschiedlich substituiert sind.

Der Bindungsmodus der Ahp-Cyclodepsipeptide konnte durch Cokristall-Röntgenstrukturen genau aufgeklärt werden (Abbildung 61). Diese binden wie Substratanaloga, in welchen die Ahp-Einheit die $P1'$ -Tasche belegt und die Hydroxylgruppe der Ahp-Einheit das katalytische Wassermolekül ersetzt. Die Aminosäuren N-terminal der Ahp-Einheit belegen somit die Substratpositionen $P1$ - P_n , währenddessen die C-terminalen Aminosäuren die Taschen $S2'$ - $S3'$ belegen. Von besonderem Interesse ist der in allen Ahp-Cyclodepsipeptiden konservierte Threoninrest, der an Position P2 die Cyclisierung zum Macrolacton einleitet.

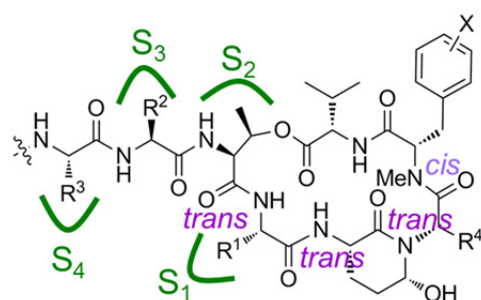
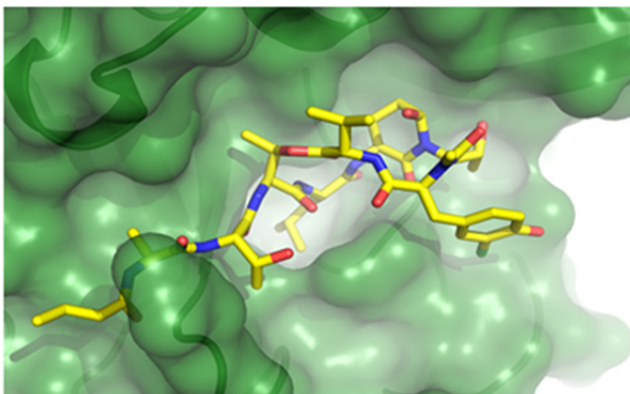


Abbildung 61: Röntgenstrukturanalyse der Co-Kristallstruktur der S1-Serinprotease Elastase und dem Ahp-Cyclodepsipeptid Scyptolin A und dem daraus abgeleiteten, kanonischen Bindungsmodus der Ahp-Cyclodepsipeptide. S_1 - S_4 steht dabei für die entsprechenden Substratbindungstaschen der Protease, *trans* und *cis* bezeichnet die Konformation der Amidbindung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der in Ahp-Cyclodepsipeptiden gefundene Bindungsmechanismus auch zur Entwicklung Serinprotease-selektiver Peptidboronsäureinhibitoren verwendet werden kann, d. h. es sollten „kanonische

Peptidboronsäureinhibitoren“ entworfen werden, in welchen die Ahp-Einheit durch eine Boronsäureestereinheit ersetzt wird (Abbildung 62). Dies hätte neben einer höheren Selektivität den Vorteil, dass nicht nur die Spezifität der Taschen S1, S2, S3,... usw. für die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor nutzbar wären, sondern auch die Taschen S1', S2' und S3' miteinbezogen werden können. Zusätzlich zeigen cyclische Peptide häufig bessere pharmakokinetische Eigenschaften als die entsprechenden linearen Peptide.

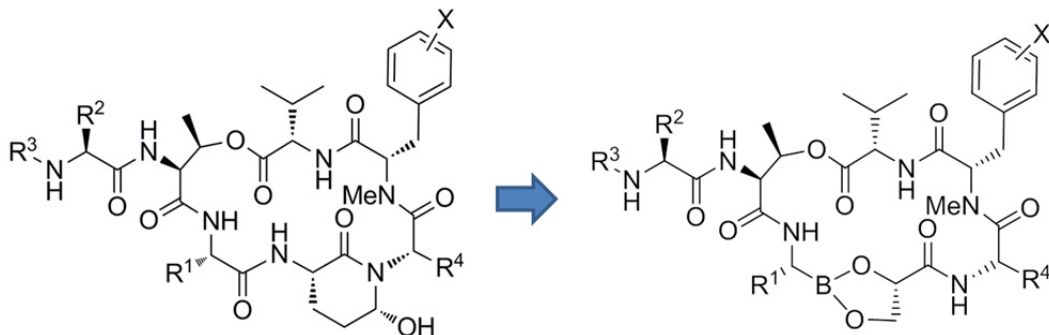


Abbildung 62: Die Übertragung der allgemeinen Struktur der Ahp-Cyclodepsipeptide und deren spezifischer kanonischer Bindungsmodus führen zu einem möglichen Design „kanonischer“ cyclischer Peptidboronsäure-Inhibitoren.

Als Beispiel für diesen neuen Ansatz zum Entwurf eines Peptidboronsäureinhibitors sollte ein cyclisches Boronsäureester-Cyclodepsipeptid synthetisiert werden, welches die Protease DegS hemmt. Vorherige Versuche, DegS-Inhibitoren mittels einer „klassischen“ Peptidboronsäureinhibitors zu erhalten, erwiesen sich als sehr schwierig; eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass für eine effektive Hemmung von DegS auch eine Belegung der S'-Taschen notwendig ist. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein entsprechender Inhibitor auf der Basis des natürlichen Substrates von DegS, dem Protein RseA, entwickelt werden. Das entsprechende Boronsäureester-Cyclodepsipeptid beinhaltet somit die fünf Aminosäuren, die N-terminal der Schnittstelle liegen, und vier Aminosäuren, die sich C-terminal davon befinden (Abbildung 63).

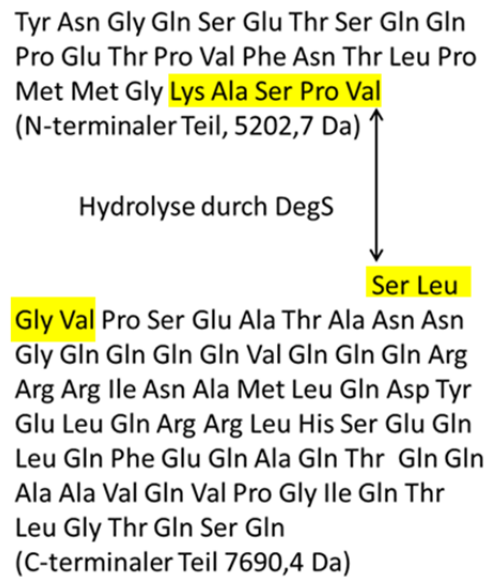


Abbildung 63: Ausschnitt aus der Sequenz von RseA mit der Schnittstelle von DegS. Die für das Cyclodepsipeptid verwendeten Aminosäuren sind gelb markiert.

So sollen mit diesem Inhibitor die Enzymtaschen S5 bis S3' besetzt werden. Die aus dieser Spaltsequenz abgeleitete Struktur des cyclischen Boronsäureesters ist in Abbildung 64 gezeigt.

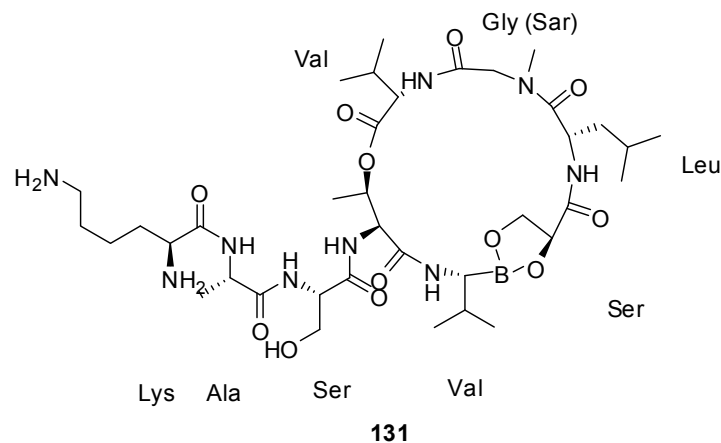


Abbildung 64: Struktur des geplanten, cyclischen DegS-Boronsäureesterinhibitors.

4.2.2 Retrosynthese des anvisierten Boronsäureester-Cyclodepsipeptids

Die Synthese des Cyclodepsipeptids sollte an der festen Phase erfolgen. Das Retrosyntheschema wird in Abbildung 65 gezeigt. Das erste Retron ist ein cyclisches Amid, das durch eine Lactamisierung aufgebaut werden soll. Die entsprechende Lactamisierung sollte N-terminal von Leucin erfolgen. Die nächsten beiden Schritte sind Amidkupplungen mit Leucin und Sarcosin. Das nächste Retron ist ein Ester, der sich zwischen Threonin und

Valin befindet. Nach der Spaltung des Esters werden noch drei Amidkupplungen geschnitten. Die entfernten Moleküle sind Lysin, Alanin und Serin. Übrig bleibt das Dipeptid **175**, das aus Threonin und BoroValin besteht, wobei die Boronsäure mit einem Diol, α -Hydroxyserin, verestert ist. Um die Synthese dieses Dipeptids soll es im nächsten Kapitel 4.2.3 gehen.

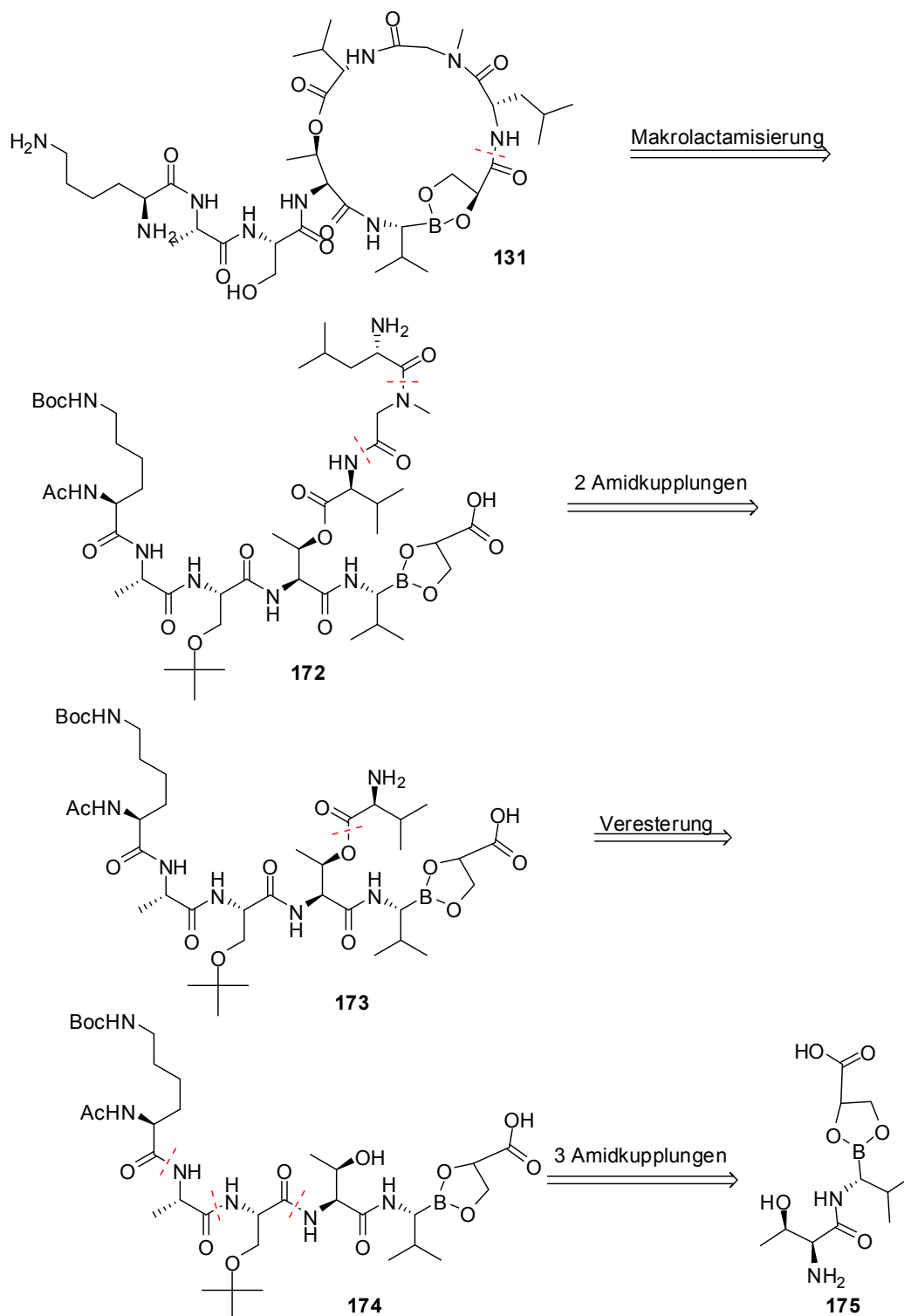


Abbildung 65: Retrosyntheseschema zur Darstellung des anvisierten cyclischen Boronsäureesters **131**.

4.2.3 Synthese des Dipeptids

Wie in der Retrosynthese dargelegt, sollte die Synthese des Boronsäureester-Cyclodepsipeptids mit der Synthese eines Boronsäureester-Dipeptidbausteins **175** beginnen. Zur Darstellung dieses Bausteines wurde in einem ersten Schritt Fmoc-geschütztes Threonin (**176**) an der freien Hydroxylgruppe mit einer Silylschutzgruppe modifiziert. Da bei den geplanten weiteren Reaktionen sowohl saure als auch basische Reaktionsbedingungen vorgesehen waren, sollte dementsprechend eine TIPS-Schutzgruppe eingeführt werden. Da es sich um eine sekundäre Alkoholgruppe handelt, wurde daher TIPSOTf als Silylierungsreagenz und DIPEA als Base verwendet (Abbildung 66). Die Reaktion wurde unter trockenen Bedingungen durchgeführt und das gewünschte Produkt **177** konnte in einer nur mäßigen Ausbeute von 27 % erhalten werden. Da zuerst aber der weitere Verlauf der Synthese getestet werden sollte, wurde keine weitere Optimierung dieses Schützungs-schrittes durchgeführt.

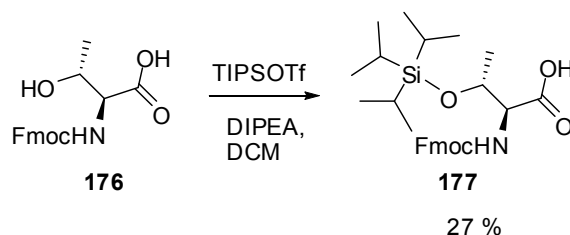


Abbildung 66: TIPS-Schätzung von Fmoc-Thr-OH (**176**).

Der Silyl-geschützte Threoninbaustein wurde anschließend mit D-BoroValinpinandiolester (**178**) gekuppelt (Abbildung 67). Die Kupplung wurde mit EDC*HCl unter Verwendung von HOBT zur Vermeidung von Racemisierungen mit DIPEA als Base durchgeführt. Der hierzu benötigte Pinandiol-geschützte D-BoroValin-Baustein **178** wurde analog zu den bereits beschriebenen Synthesen über einen Matteson-Chemie-Ansatz synthetisiert. Für die Kupplung konnte eine Ausbeute von 35 % erhalten werden.

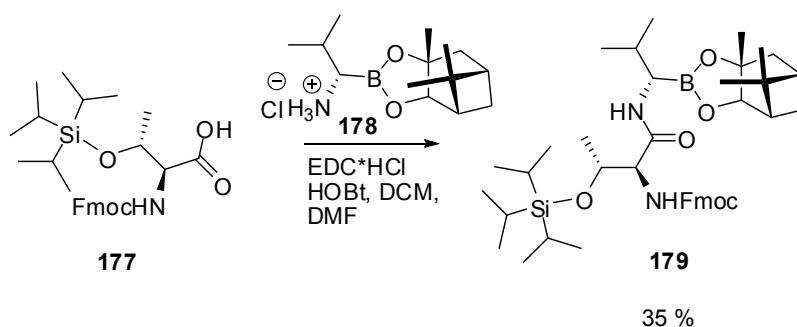


Abbildung 67: Kupplung von FmocThr(TIPS)-OH (**177**) mit D-BoroValinpinandiolester (**178**).

Im nächsten Schritt sollte nun der Boronsäurepinandiolester **179** zu einem Boronsäure-2,3-Dihydroxypropansäure-methylester (**182**) umgeestert werden (Abbildung 68). Der 2,3-Dihydroxypropansäuremethylester (**181**) entspricht dabei einem α -Hydroxyderivat von einem Serinmethylester. Um diesen zu erhalten, wurde das kommerziell erhältliche Acetonid (-)-Methyl-(*S*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**180**) zuerst mit 25 %iger Trifluoressigsäure in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (2:1) zu dem Diol **181** entschützt und dieses Intermediat anschließend mit dem Boronsäurepinandiolester **179** in einem zwanzigfachen Überschuss umgesetzt. Leider konnte in dieser Reaktion jedoch keine Bildung des gewünschten Produktes beobachtet werden.

Die Ursache hierfür könnte in der außerordentlich hohen Stabilität des Boronsäurepinandiolesters **179** liegen. In der Tat gehören diese zu den stabilsten bekannten Boronsäureestern. Ihre Stabilität ist auf die hohe sterische Hinderung der Sauerstoff-Kohlenstoffbindung zurückzuführen. So wurden in einer Arbeit verschiedene Studien zur Stabilität von Boronsäureestern durchgeführt.^[125] In dieser Veröffentlichung wurde die Umesterung eines 1,2-Ethandiolboronsäureesters mit verschiedenen Diolen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sterisch anspruchsvollere Diole stabilere Boronsäureester bilden; dementsprechend bilden also z. B. tertiäre Alkohole stabilere Boronsäureester als z. B. sekundäre Alkohole. So konnte eine Stabilitätsreihe von 1,2-Ethandiol über 1,2-Propandiol und 2,3-Butanediol zu Pinakol aufgestellt werden. Allerdings werden die sterischen Effekte zusätzlich durch elektronische Effekte ergänzt. So sind (+)-Diisopropyltetrat-boronsäureester trotz ihrer sekundären Alkoholfunktionen mit die thermodynamisch labilsten Boronsäureester, die bisher bekannt sind.

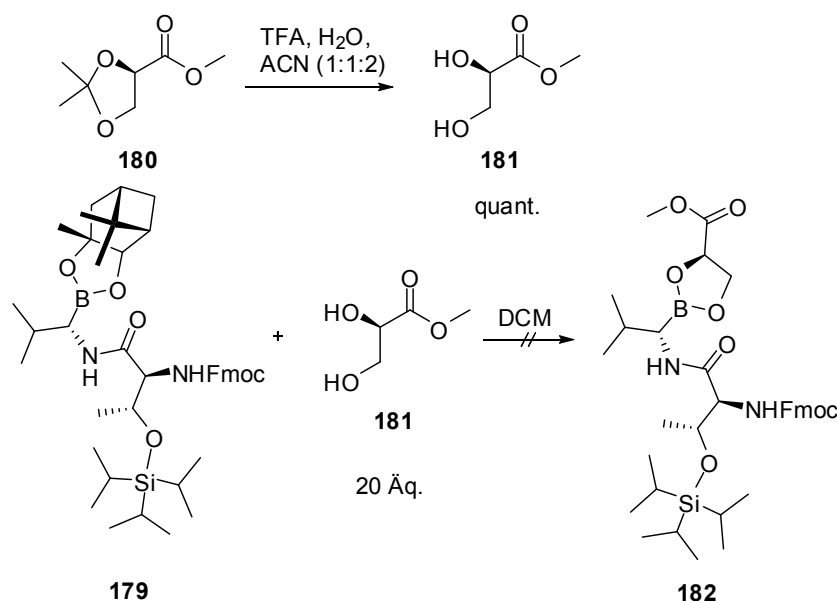


Abbildung 68: Fehlgeschlagene Umesterung mit zu Serin analoger α -Hydroxysäure **180**.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass ein α -Hydroxylserinderivat kein geeigneter „Partner“ zur Ausbildung einer stabilen Boronsäureesterbindung ist. Dementsprechend wurden nun zuerst zwei weitere, höher substituierte Diole **184** und **187** synthetisiert (Abbildung 69). Dazu wurde zum einen Tiglinsäure (**183**) zu einem Diol **184** oxidiert. Diese Reaktion wurde stereoselektiv mittels der Sharpless-Dihydroxylierung durchgeführt. Als Reagenz hierzu wurde der ADmix- β verwendet, welcher aus Dihydrochinidin-Phthalazin ((DHQD)₂PHAL) als chiraalem Liganden, Kaliumcarbonat als Base, Kaliumhexacyanidoferrat(III) als mildes, stöchiometrisches Oxidationsmittel und Kaliumosmat-Dihydrat als katalytisch aktives Dihydroxylierungsreagenz besteht. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Diol **184** in einer Ausbeute von 76 % isoliert werden.

Zum anderen wurde in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion Methyl 2-(diethylphosphono)propanoat (**185**) mit Aceton umgesetzt. Nach zwei Tagen wurde das Aceton vorsichtig unter vermindertem Druck weitgehend entfernt. Anschließend wurde die Reaktion wässrig aufgearbeitet und das gewünschte Produkt **186** mit Diethylether extrahiert. Da das erwünschte Produkt, der α,β -ungesättigte Methylester **186**, eine leichtflüchtige Substanz ist, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet. Das Rohprodukt wurde anschließend analog zur Tiglinsäure (**183**) in einer Sharpless Dihydroxylierung stereoselektiv zum hochsubstituierten Diol **187**, in welchem beide Alkohole tertiär sind, umgesetzt. Das Diol **187** konnte mittels dieser Reaktionssequenz über zwei Stufen in einer Ausbeute von 41 % isoliert werden.

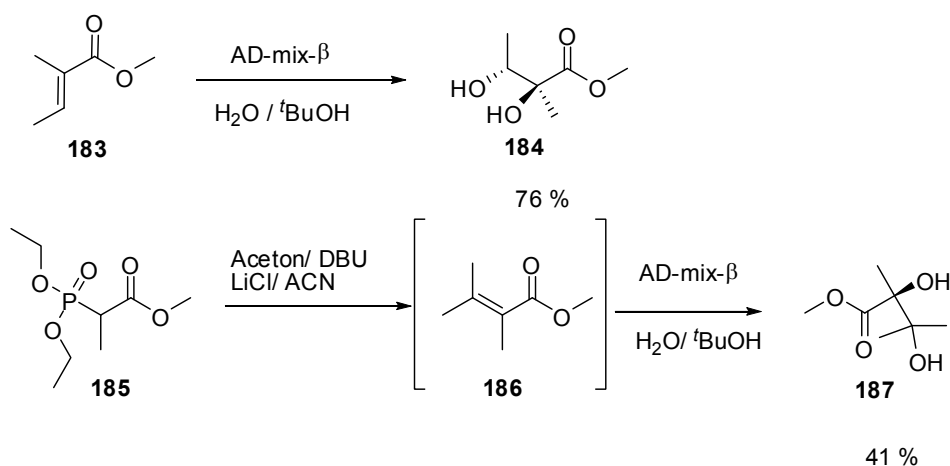
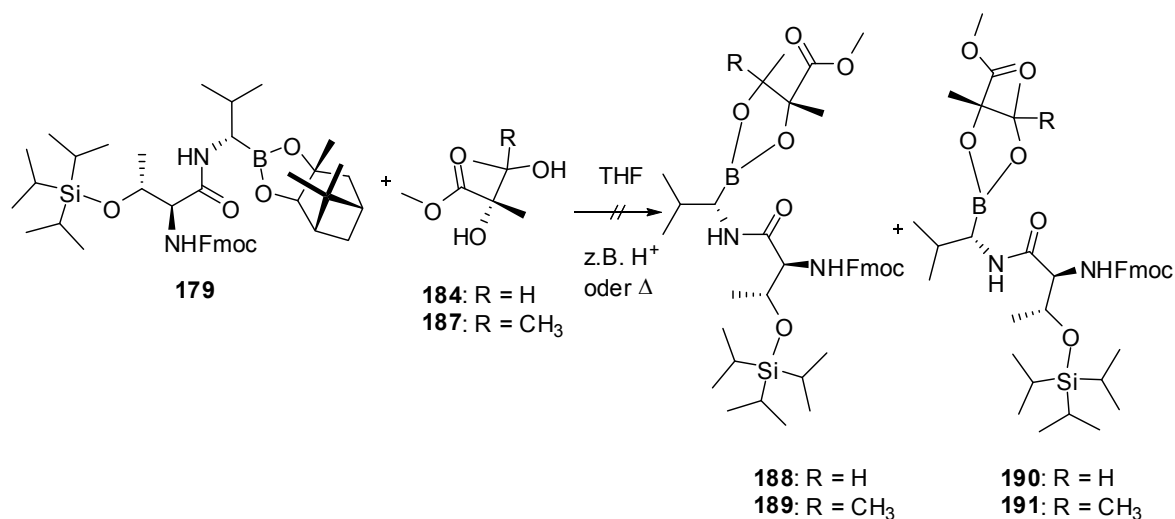


Abbildung 69: Synthese sterisch stärker gehinderter Diole.

Die beiden so synthetisierten Diole **184** und **187** wurden anschließend erneut mit dem Pinakolboronsäureester-Derivat **179** umgesetzt (Abbildung 70). Leider konnte auch bei diesem Reaktionsweg keine erfolgreiche Umesterungsreaktion beobachtet werden. Dabei wurden verschiedene Bedingungen wie z. B. erhöhte Temperaturen, saure Katalyse oder eine Erhöhung der Anzahl der Äquivalente an Diol getestet. Keine dieser Reaktionsbedingungen führte jedoch zu einem nennenswerten Umsatz der Reaktion.

Abbildung 70: Fehlgeschlagene Umesterungen mit den Diolen **184** und **187**.

Da die Umesterungs-Strategie keinen Erfolg brachte, sollte nun versucht werden, den gewünschten Baustein mittels einer alternativen Strategie zu erhalten. Hierzu sollte zuerst der Pinandiolester gespalten werden, um anschließend die freie Boronsäure mit den unterschiedlichen Diolen erneut zu einem Boronsäureester umzusetzen. Zur Spaltung von Boronsäurepinandioleestern werden hauptsächlich zwei verschiedene Methoden verwendet.^[126] So kann eine Spaltung der Boronsäureester unter oxidativen und sauren Bedingungen mit

Natriumperiodat erreicht werden. Häufiger wurde jedoch eine Hydrolyse des Boronsäureesters mittels einer Umesterung mit Phenylboronsäure in einem zweiphasigen System und schwach saurer Katalyse erreicht. Dazu ist entscheidend, dass sich das Edukt und die Phenylboronsäure in der wässrigen Phase befinden. Der bei der Reaktion als Nebenprodukt entstehende Phenylboronsäurepinandiolester (**193**) reichert sich dagegen in der organischen Hexanphase an. Somit verschiebt sich das Gleichgewicht der Reaktion vollständig auf die Produktseite, obwohl Phenylboronsäure und Edukt äquimolar eingesetzt werden.

Daher wurde diese Umesterungsreaktion mit dem Hydrochlorid-Salz des BoroValin-Pinandiolesters **178** versucht (Abbildung 71). Hierzu wurden nach Beendigung der Reaktion die Phasen getrennt und die wässrige Phase zusätzlich mit Hexan extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der resultierende Rückstand lieferte die ungeschützte Aminoboronsäure **192** in quantitativer Ausbeute.

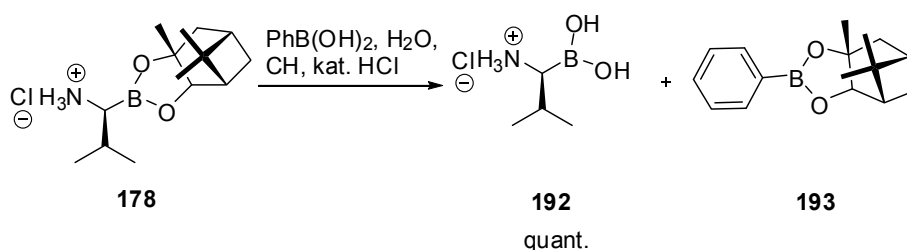


Abbildung 71: Boronsäureesterspaltung mit Phenylboronsäure im 2-Phasensystem.

Die erhaltene Aminoboronsäure sollte anschließend mit den Diolen **184** und **187** zum entsprechenden Diol ester umgesetzt werden. Boronsäureester mit freien Aminen scheinen nicht stabil zu sein. Aus diesem Grunde werden bei der Synthese der Aminoboronsäureester immer die Hydrochloridsalze isoliert und nicht die freien Amine. Ein weiteres Problem liegt in der Ausbildung trimerer Boronsäurestrukturen, wodurch Reaktivität verloren geht.

Daher wurde nun versucht, die freie Boronsäure **192** mit einem geschützten Threoninbaustein **177** zu kuppeln, allerdings auch ohne Erfolg. Auch der Versuch, die freie Boronsäure **192** am N-Terminus mit Boc zu schützen, war nicht erfolgreich. Eine Ursache für die fehlgeschlagenen Reaktionen könnte in der besonderen Reaktivität von α -Aminoboronsäuren bzw. deren Derivaten liegen. So ist bekannt, dass die Boronsäuregruppe unter Ausbildung einer B-N-Bindung auf benachbarte, deprotonierte Aminogruppen wandert. Das Produkt ist jedoch nicht besonders stabil und neigt zur Zersetzung. Da die entsprechenden Reaktionen unter leicht basischen Bedingungen durchgeführt werden müssen,

könnte es somit anstelle der gewünschten Reaktion zu einer Umlagerung und damit zu einer Zersetzung des Ausgangsmaterials gekommen sein.

Interessanterweise gelang es jedoch, das Hydrochloridsalz des D-BoroValin-Pinandiolesters (**178**) an der Aminogruppe mit einer Ausbeute von 59 % mit der Fmoc-Schutzgruppe zu schützen (Abbildung 72). Anschließend wurde eine saure Hydrolyse des Boronsäureesters, analog der Pinandiolesterspaltung bei den Peptidboronsäureinhibitoren, versucht. Zwar konnte das gewünschte Produkt **195** im LC-MS beobachtet werden, eine Isolierung in präparativ-annehmbaren Ausbeuten war jedoch nicht möglich.

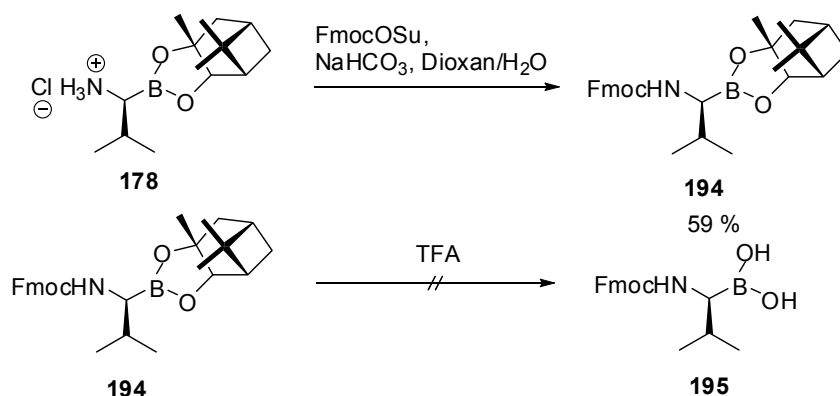


Abbildung 72: Synthese von Fmoc-D-BoroValin-Pinandiolester (**194**) und fehlgeschlagene Esterspaltung mit TFA.

Diese Serie an negativen Ergebnissen zeigt, dass erneut eine Alternativstrategie zur Darstellung des Dipeptidbausteines notwendig wurde. Aus den vorherigen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass eine Kupplung einer freien Aminoboronsäure mit einem Aminosäurebaustein vermutlich äußerst schwierig ist. In der Tat finden sich in der Literatur nur wenige Beispiele für einen solchen Ansatz, dort konnten die Reaktionsprodukte einer solchen Reaktionsführung aber entweder nicht aufgereinigt werden oder es konnte nur ein Eliminierungs-Nebenprodukt isoliert werden.^[127] Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es als sinnvoller, dass zuerst der N-Terminus der Aminoboronsäure auf einen Threoninbaustein gekuppelt werden muss, bevor der Pinandiolester gespalten werden kann. Da ein entsprechendes Threonyl-BoroValin-Pinandiolester-Dipeptid jedoch in wässrigem Puffer nicht löslich ist, kann zur anschließenden Hydrolyse des Boronsäureesters durch Umesterung mit Phenylboronsäure nicht auf das etablierte Zwei-Phasen-Reaktionssystem zurückgegriffen werden.

Daher wurde die Reaktionsführung den Gegebenheiten angepasst, um den Verlust des Vorteils der Gleichgewichtsverschiebung durch Verwendung eines Zwei-Phasen-Systems zu kompensieren. So wurde versucht, das Gleichgewicht der Umesterungsreaktion durch eine

Erhöhung der Menge an eingesetzter Phenylboronsäure zu verschieben. Hierzu wurde das Edukt mit 20 Äquivalenten Phenylboronsäure in Isopropanol bei 80 °C erhitzt. Dabei sollte durch Verwendung von Isopropanol als Lösungsmittel als Intermediat der Reaktion eventuell ein Isopropylboronsäureester entstehen, welcher jedoch nur sehr wenig stabil ist und leicht mit einem Diol zu einem weiteren Boronsäureester umzusetzen sein sollte. Nachdem sich das Umesterungs-Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde anschließend das gewünschte Diol (25 Äquivalente) zugegeben. Zusätzlich wurde aktiviertes Molsieb der Reaktion zugefügt, um das bei der Veresterung eventuell entstehende Wasser abzufangen. Das Diol sollte das Isopropanol aufgrund des Chelateffekts verdrängen. Der Chelateffekt beruht auf der Entropiezunahme durch Freisetzung zweier Moleküle Isopropanol anstelle des Diols. In der Tat konnte das gewünschte, umgeesterte Produkt mittels LC-MS nachgewiesen werden. Eine vollständige säulenchromatographische Aufreinigung misslang jedoch und das gewünschte Produkt war noch mit Nebenprodukten bzw. den im vielfachen Überschuß zugegebenen Reagenzien verunreinigt. Zu diesem Zeitpunkt wurden nun aufgrund der Zeitbeschränkung bei der Doktorarbeit die Synthesbemühungen zur Darstellung der Boronsäure-Cyclodepsipeptidderivate eingestellt.

4.3 Kahalalide F

4.3.1 Einleitung

In einem Teilprojekt wurde eine chemische Synthese von Kahalalide F (**132**) und einer fluoreszenten Sonde, die von Kahalalide F (**132**) abgeleitet wurde, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine biologische Charakterisierung des Naturstoffes und der Sonde durch Dr. Maja Vuk aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hemmo Meyer (Universität Duisburg-Essen).

Kahalalide F (**132**) ist ein Cyclodepsipeptid, das ursprünglich in Hawaii aus der pflanzenfressenden Meeresschnecke *Elysia rufescens* isoliert wurde.^[116] Es besteht aus 13 Aminosäuren und einer kurzen N-terminalen Fettsäure (Abbildung 73). Das Molekül kann dabei im Wesentlichen in zwei Fragmente unterteilt werden: Zum einen besteht Kahalalide F (**132**) aus einem Macrolacton, welches aus sechs Aminosäuren aufgebaut ist. Der Ring ist dabei über eine Esterbindung (Depsibindung) zwischen dem C-Terminus und einem *D-allo*-Threonin-Rest geschlossen. Zum anderen besteht der Naturstoff aus einer linearen Aminosäurekette, die über den N-Terminus des Threonins mit dem Cyclus verknüpft ist. Das Ende des Moleküls bildet eine kurze Fettsäure, die aus sieben Kohlenstoffatomen aufgebaut ist. Unter den 13 Aminosäuren befinden sich sehr viele, nicht-proteinogene Aminosäuren, wie z. B. die *D*-Aminosäuren *D*-Valin, die drei Mal im Molekül enthalten ist, *D-allo*-Isoleucin, die zwei Mal vorkommt, *D*-Prolin und *D-allo*-Threonin. Ebenfalls finden sich in Kahalalide F (**132**) die nicht-proteinogenen Aminosäuren Ornithin und α,β -Didehydro- α -aminobuttersäure.

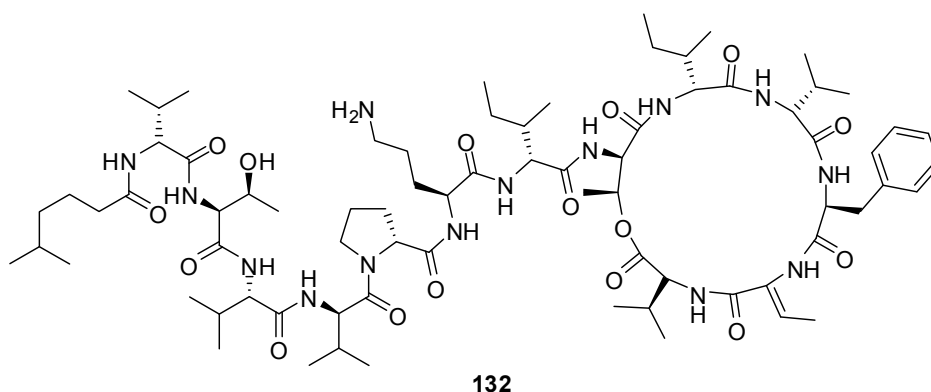


Abbildung 73: Chemische Struktur von Kahalalide F (**132**) inklusive der Stereochemie.

Kahalalide F zeigt vielfältige und hochpotente biologische Aktivitäten. Man vermutet, dass der Naturstoff der Meeresschnecke *Elysia rufescens* zur chemischen Abwehr gegen Fressfeinde dient.^[128] Darüberhinaus und für medizinische Anwendungen von größerem

Interesse ist, dass Kahalalide F (**132**) in *in vitro* Untersuchungen eine extrem starke Zytotoxizität in verschiedenen Krebszelllinien zeigt. So konnten für einige Zelllinien wie z. B. Prostatakrebs-Zelllinien IC₅₀-Werte von unter 10 nM gemessen werden. Weiterhin konnte eine antimikrobielle Wirkung von Kahalalide F (**132**) z. B. gegen Tuberkulose, beobachtet werden.^[129]

Trotz intensiver biologischer Untersuchungen ist der genaue molekulare Wirkmechanismus von Kahalalide F (**132**) bisher noch weitgehend unbekannt. In einer Studie von Suárez *et al.* konnte jedoch gezeigt werden, dass Applikation von Kahalalide F zu einem „Anschwellen“ der Lysosomen in einigen Krebszelllinien führt.^[130]

Ein ähnlicher Phänotyp wurde z. B. auch bei der Hemmung der zellulären ATPase p97 beobachtet, ein wichtiges Enzym aus dem Ubiquitin-Proteasom-Proteolysesystem (UPP), dessen biochemischen und zellbiologischen Mechanismen in der Arbeitsgruppe Meyer an der Universität Duisburg-Essen untersucht werden. Daher sollte im Rahmen dieses Teilprojektes untersucht werden, ob sich einerseits die Literatur-berichteten Phänotypen bzw. biologischen Aktivitäten reproduzieren lassen, und ob andererseits Kahalalide F (**132**) eventuell in das UPP modulierend eingreift.

4.3.2 Synthese von Kahalalide F

Zur Überprüfung dieser Fragen musste zuerst Kahalalide F (**132**) für weitergehende biologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Eine entsprechende chemische Synthese von Kahalalide F (**132**) wurde 2001 von Àngel López-Macià *et al.* publiziert.^[117] Die hier durchgeführte Synthese an der festen Phase folgt weitestgehend dieser Synthese, allerdings wurden in der Durchführung bzw. den Reagenzien einzelne Schritte bei Bedarf leicht abgewandelt (Abbildung 74). Die Synthese begann mit der Beladung eines 2-Chlorotriylchloridharzes mit Fmoc-D-Valin. Die Beladung wurde anschließend UV-spektroskopisch bestimmt und konnte mit 0,67 mmol/g bestimmt werden. Die weiteren Schritte in der Synthese waren dann alternierende Fmoc-Abspaltungen mit Piperidin in Dimethylformamid und Kupplungen der drei folgenden geschützten Aminosäuren *D-allo*-Isoleucin, *D-allo*-Threonin und *D-allo*-Isoleucin. Die Kupplungen erfolgten im Gegensatz zur publizierten Synthese mit HBTU/HOBt, da diese Kupplungsreagenzien deutlich preisgünstiger als HATU sind. Nachfolgend wurde dann der freie sekundäre Alkohol des Threonins mit einem Alloc-Valin-Baustein verestert. Zur Veresterung wurden Steglich-Bedingungen mit DIC und DMAP in 10 % Dimethylformamid in Dichlormethan verwendet.

Die weiteren Aminosäuren des linearen Peptids Ornithin, D-Prolin, D-Valin, Valin, Threonin und D-Valin wurden danach unter Standardbedingungen gekuppelt. Bei der Kupplung der 5-Methylhexylsäure wurde kein HOBt zugesetzt, da die Säure kein Chiralitätszentrum besitzt. Im nächsten Schritt wurde die Alloc-Schutzgruppe am Valin, welches über eine Estergruppe mit dem Threonin verbunden ist, abgespalten. Die Reaktion erfolgte analog zu Stolze *et al.*^[131] mit Morpholin und Pd(PPh₃)₄. Auf das freie Amin wurde anschließend Fmoc-L-Thr-OH (d. h. mit freier, ungeschützter OH-Gruppe) gekuppelt. Nach einer Fmoc-Entschützung folgte eine weitere Kupplungsreaktion mit Alloc-Phe-OH. Die Alloc-Schutzgruppe wurde an dieser Stelle verwendet, da in einem nächsten Schritt eine reduktive Eliminierung des Threonins zu α,β -Didehydro- α -aminobuttersäure durchgeführt wurde, welche mit der Fmoc-Schutzgruppe inkompatibel ist. Für diese langsame Reaktion wurden EDC·HCl und CuCl als Reagenzien verwendet. Der lineare Vorläufer von Kahalalide F war nun vollständig aufgebaut. Nach der Entfernung der Alloc-Schutzgruppe wurde das Peptid unter Erhalt der Boc-Schutzgruppe am Ornithin mit jeweils 20 % Essigsäure und Trifluorethanol in Dichlormethan abgespalten. Das Rohpeptid wurde unter vermindertem Druck zur Trockne aufkonzentriert. Dabei wurde durch Zugabe von Cyclohexan verhindert, dass die Essigsäurekonzentration anstieg, denn Essigsäure bildet mit Cyclohexan ein Azeotrop und kann so mild entfernt werden. Das Rohprodukt wurde vor der folgenden Macrolactamisierung säulenchromatographisch vorgereinigt, die anschließende Cyclisierung erfolgte dann unter Hochverdünnung, um Polymerisierungen zu vermeiden. Als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP und HOBt verwendet. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Ornithin wurde Kahalalide F (**132**) erfolgreich mittels präparativer HPLC mit einer Ausbeute von 3,0 % über 18 Stufen isoliert.

4.3.3 Biologische Untersuchungen mit Kahalalide F

Der so synthetisierte Naturstoff Kahalalide F (**132**) wurde anschließend durch Dr. Maja Vuk biologisch untersucht. Dabei wurde der Effekt von Kahalalide F (**132**) auf die Zell- und insbesondere die Lysosomen-Morphologie von CV-1 Zellen beobachtet. Diese Zellen sind Nierenfibroblasten der westlichen Grünmeerkatze. Dabei wurden Zellen verwendet, welche vorher mit einem lysosomspezifischen Marker (LAMP1-RFP) transfiziert wurden. Nach 24 h wurden die Zellen dann mit 1 μ M Kahalalide F (**132**) inkubiert. Als Negativkontrolle fand Dimethylsulfoxid Verwendung. Nach ein, zwei und vier Stunden wurden dann Aufnahmen der Zellmorphologie mittels eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen (Abbildung 75).

Dabei zeigte sich, dass die Lysosomen bereits nach einer Stunde vergrößert waren und sich in der Zelle anhäufelten. Dieser Phänotyp verstärkte sich nach zwei und vier Stunden.

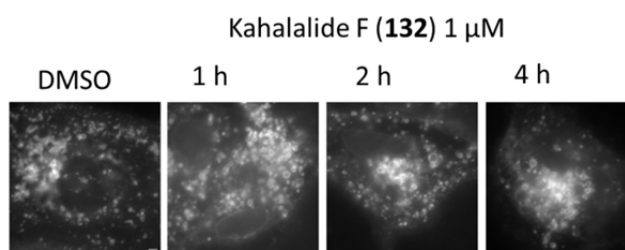


Abbildung 75: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden CV-1 Zellen, die mit LAMP1-RFP transfiziert und mit Kahalalide F (**132**) inkubiert wurden.

Weitere Zellen, die ebenfalls mit LAMP1-RFP transfiziert und anschließend für eine oder zwei Stunden mit Kahalalide F (**132**) inkubiert wurden, wurden mit kaltem Methanol fixiert und ebenfalls mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops betrachtet. Wie bereits bei den nicht fixierten Zellen konnte auch hier beobachtet werden, dass die Lysosomen unter Kahalalide F-Behandlung anschwellen.

Außerdem konnten die Zellkerne über eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden, welche allerdings zum Teil Deformierungen aufgrund der Kahalalide F-Behandlung aufwies (Abbildung 76).

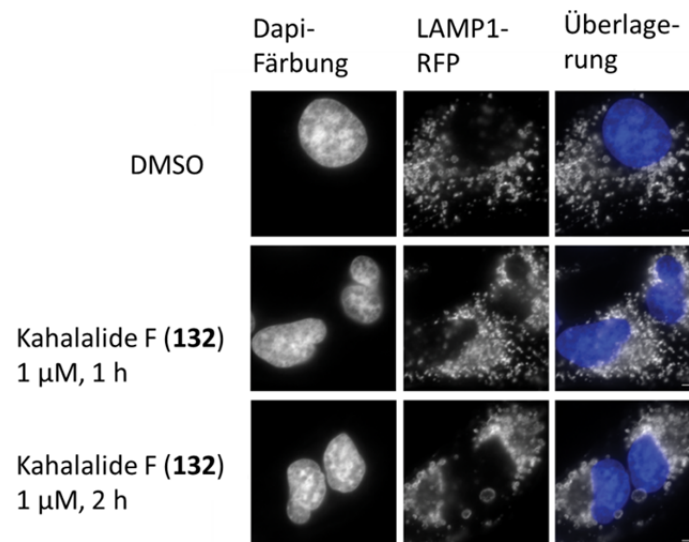


Abbildung 76: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fixierten CV-1 Zellen, die mit LAMP1-RFP transfiziert und mit Kahalalide F (**132**) inkubiert wurden. Außerdem wurden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol angefärbt.

Die fixierten Zellen wurden auch mittels Differentialinterferenz-Kontrastmikroskopie untersucht (Abbildung 77). Mit dieser Methode wird die allgemeine Morphologie der Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass eine Stunde nach der Inkubation mit Kahalalide F (**132**) die Anzahl der Zellen zwar reduziert war, diese aber trotzdem eine der DMSO-Kontrolle ähnliche Morphologie aufwiesen. Nach einer weiteren Stunde hatte sich die Zahl der Zellen weiter deutlich reduziert. Weitere Ergebnisse, die beobachtet werden konnten, waren abgerundete Zellen und deformierte Zellkerne. Außerdem lösten sich die Zellen auch vom Glas, ein Zeichen für absterbende Zellen. In der Literatur ist zu finden, dass Kahalalide F (**132**) einen Prozess namens Onkosis auslöst.^[132] Die gezeigten morphologischen Untersuchungen entsprachen denen in der Literatur beschriebenen Effekten, so dass diese biologische Aktivität von Kahalalide F (**132**) bestätigt werden konnte.

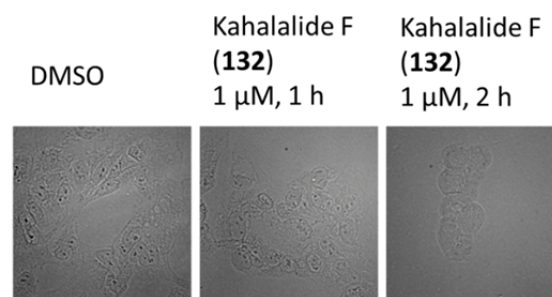


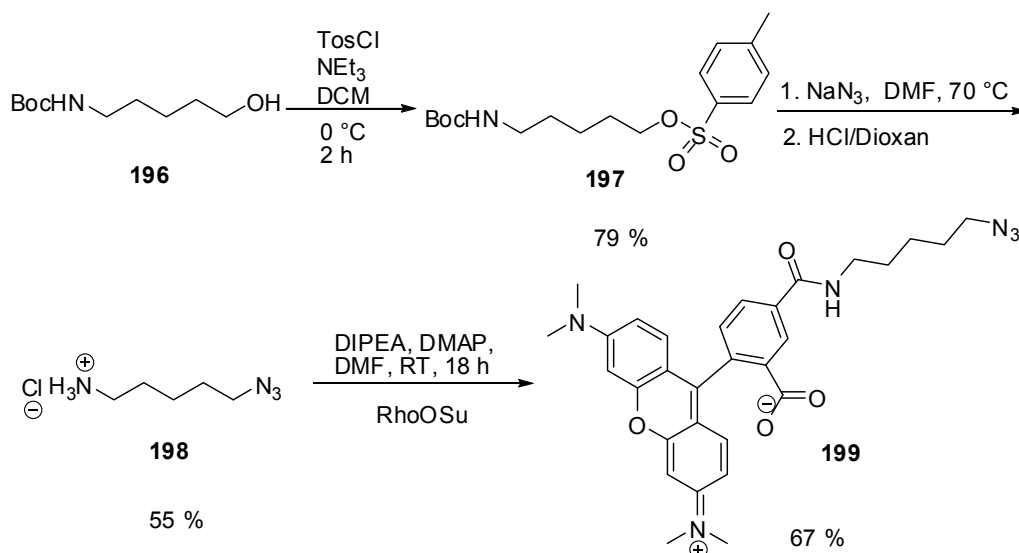
Abbildung 77: Differentialinterferenzkontrast-mikroskopische Aufnahme von mit Kahalalide F (**132**) behandelten Zellen.

4.3.4 Synthese einer Rhodaminsonde von Kahalalide F

Um weitere biologische Untersuchungen via Fluoreszenzmikroskopie durchführen zu können, wurde nachfolgend Kahalalide F (**132**) mit einem Rhodamin-Fluorophor chemisch modifiziert. Ein großer Vorteil von Kahalalide F (**132**) liegt in der geringen Zahl von reaktiven, funktionellen Gruppen. Der Naturstoff besitzt nur ein freies Amin und einen sekundären Alkohol am Threonin. Daher sollte es prinzipiell möglich sein, den fertigen Naturstoff an diesen Stellen selektiv ohne weitere Einführungen von Schutzgruppen, etc. zu modifizieren. So konnten Shilabin *et al.* z. B. zeigen, dass eine Modifikation der Aminogruppe des Ornithins mittels reduktiver Aminierung möglich ist.^[133] Für diese Reaktionen wurden substituierte Benzaldehyde verwendet. Daher wurde entschieden, einen ähnlichen Ansatz zur Synthese der Rhodaminsonde von Kahalalide F zu verfolgen.

Die Sonde sollte hierzu aus zwei Teilen aufgebaut werden. Der erste Baustein war Rhodaminazid (**199**), ein Reagenz, das bereits mehrfach in der Arbeitsgruppe Kaiser synthetisiert wurde.^[134] Dieses Molekül sollte dann über eine Click-Reaktion mit 4-Ethynylbenzaldehyd (**200**) gekuppelt werden. Dieses Derivat würde dann in einer reduktiven Aminierung eingesetzt.

Gemäß diesem Plan wurde als erster Schritt der Synthese eine Tosylierung von Boc-5-aminopentanol (**196**) durchgeführt (Abbildung 78). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt **197** in ansprechender Ausbeute von 79 % isoliert werden. Durch die Tosylierung wurde der Alkohol in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt, die im nächsten Schritt nucleophil mit Natriumazid substituiert wurde. Nach saurer Boc-Abspaltung konnte das entsprechende Produkt **198** in 55 % Ausbeute isoliert werden. Dieses Intermediat wurde anschließend mit Rhodamin-OSu, dem *N*-Hydroxysuccinimidester von Rhodamin, gekuppelt. Als Produkt der Reaktion wurde der gewünschte Baustein Rhodaminazid (**199**) in einer Ausbeute von 67 % erhalten.

Abbildung 78: Synthese des Rhodaminazid-Bausteines **199**.

Der nächste Schritt auf dem Wege zur Darstellung einer mit Rhodamin-modifizierten Kahalalide F-Sonde **202** war die Durchführung einer Click-Reaktion nach Sharpless-Bedingungen (Abbildung 79).^[135] Dabei wurde unter Kupferkatalyse das Azid **199** mit dem Alkin **200** zu einem Triazol **201** verbunden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ergab sich für das Produkt **201** eine Ausbeute von 30 %. Im letzten Schritt wurde dann die reduktive Aminierung durchgeführt. Die Reaktion verlief dabei sehr langsam und auch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur konnte keinen höheren Umsatz bewirken. In der Literatur wurden zur Beschleunigung und Erhöhung der Ausbeute fünf Äquivalente des Benzaldehyd-Bausteines eingesetzt. Aufgrund der hohen Kosten des Rhodaminderivates **201** wurde hiervon jedoch abgesehen, so dass die Synthese der Rhodamin-modifizierten Kahalalides F-Sonde **202** letztendlich in einer Ausbeute von 14 % erfolgreich abgeschlossen wurde.

LAMP1-GFP transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen dann mit der Rhodaminsonde **202** (1 μ M) inkubiert. Vor der Untersuchung unter dem Mikroskop wurden die lebenden Zellen dann gewaschen, um Rhodamin-Reste außerhalb der Zellen zu entfernen.

Das mit Rhodamin-modifizierte Kahalalide F-Derivat **202** zeigte die gleiche Aktivität wie der Naturstoff, d. h. auch diese Substanz bewirkte eine Veränderung der Morphologie der Lysosomen, die sich hauptsächlich in einem Anschwellen äußerte (Abbildung 80). Außerdem konnte über die Fluoreszenzmikroskopie eine erhöhte Konzentration von Rhodamin in den Lysosomen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konzentrierte sich Rhodaminazid (**199**) als Kontrolle nicht in den Lysosomen auf.

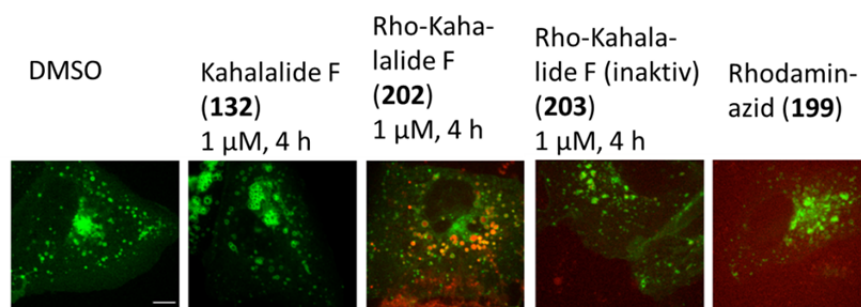


Abbildung 80: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CV-1 Zellen, die mit LAMP1-GFP transfiziert und mit verschiedenen Kahalalide F-Proben inkubiert wurden.

Um frühe Endosomen anzufärben, wurden die Zellen in einem zweiten Experiment mit Rab5-GFP transfiziert und anschließend analog inkubiert (Abbildung 81). Die frühen Endosomen schwollen ebenfalls an und lagerten sich zusammen. Das fluoreszente Kahalalide F (**202**) konnte innerhalb der Endosomen beobachtet werden.

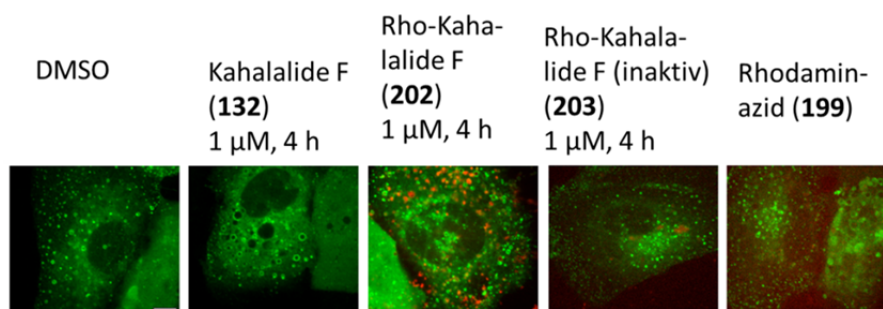


Abbildung 81: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CV-1 Zellen, die mit RAB5-GFP transfiziert und mit verschiedenen Kahalalide F-Proben inkubiert wurden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kahalalide F (**132**) eventuell mit einem Targetprotein innerhalb des Endosom-Lysosom-Systems wechselwirkt. Für eine tiefere Analyse sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. So müsste

insbesondere in einem nächsten Schritt zuerst das wirkliche Proteintarget aufgeklärt werden. Diese könnte z. B. mit einem chemischen Proteomik-Ansatz erfolgen. Aufgrund der Zeitbeschränkungen im Rahmen der Dissertation konnten diese bisher jedoch nicht durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation konnte eine Reihe von biologisch aktiven Boronsäureinhibitoren synthetisiert werden. Deren Synthesen erfolgten als konvergente Bausteinsynthesen. So wurden mittels Matteson-Chemie Aminoboronsäure-Bausteine hergestellt, welche anschließend mit voll-geschützten Peptiden, die üblicherweise aus sechs Aminosäuren bestanden und über Festphasenpeptidsynthese dargestellt wurden, gekuppelt wurden. Eine anschließende Abspaltung aller Schutzgruppen führte dann zu den gewünschten Peptidboronsäureinhibitoren.

Ein Großteil der synthetisierten Inhibitoren zeigte bei den anschließenden biochemischen bzw. biologischen Untersuchungen, welche von verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt wurden, deutliche inhibitorische Effekte. Die Peptidboronsäuren zeigten eine potente Hemmung verschiedenster Proteasen. Um für die verschiedenen Proteasen erhöhte Spezifität zu erreichen, wurden vor allem die sechs Aminosäuren variiert. Tabelle 7 zeigt den jeweils besten Inhibitor für die jeweilige Protease.

Tabelle 7: Zusammenfassung der besten Inhibitoren für die jeweilige Protease.

Protease	Inhibitor	IC ₅₀ /μM
DegP	DPMFKL-BoroV (142)	0,3
HtrA1	DRMIKQ-BoroV (144)	0,5
Tsp	DRMIKQ-BoroV (144)	0,3
Elastase	DPMFKL-BoroV (142)	0,06
DegS	DRYMRY-BoroV (149)	1,5

Für die chlamydiale Protease CPAF konnte DRYIRY-D-BoroNorleucin (**165**) als potentester Inhibitor identifiziert werden.

Ein vollständig-kombinatorischer Ansatz zur Variation der sechs Aminosäuren wäre jedoch aufgrund des hohen Syntheseaufwands nicht möglich gewesen, da dann unter Verwendung der 20 proteinogenen Aminosäuren $6^{20} = 3656158440062976$ verschiedene Inhibitoren herzustellen wären. Daher wurden zur Darstellung potenter Hemmstoffe unterschiedliche Ansätze verfolgt, die noch einmal kurz zusammengefasst werden sollen.

In einem ersten Ansatz wurden Inhibitoren entwickelt, deren Sequenzen aus biochemischen Verdauexperimenten mit der Protease DegP abgeleitet wurden. Diese

Inhibitoren stellen potente DegP-Inhibitoren dar. Des Weiteren zeigten diese eine starke Hemmwirkung der homologen Protease HtrA1, welche es ermöglichte, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Clausen vom *Research Institute of Molecular Pathology* in Wien die erste Röntgenkristallstruktur von Inhibitor-gebundenem HtrA1 zu erhalten. Dadurch war es möglich, die Struktur der Protease in ihrer aktiven Konformation einzufrieren, da Boronsäureinhibitoren zu den Übergangszustandsanaloga zuzuordnen sind.

Ausgehend von dieser Kristallstruktur wurde nun in einem zweiten Ansatz versucht, optimierte HtrA1-Inhibitoren zu erhalten. Hierzu wurde mit Hilfe des Programms Pymol ein „visuelles“ Modelling durchgeführt, indem verschiedene Aminosäuren am Computer in die Struktur integriert wurden. Die Größen der Aminosäuren konnten mit dem Volumen der entsprechenden Taschen im Enzym verglichen und verschiedene vermutete Wechselwirkungen zwischen den Resten der Aminosäuren und der Protease bewertet werden. Dabei wurde besonderer Wert auf die potentielle Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen und denkbaren π - π -Interaktionen zwischen Aromaten gelegt. Größenmäßig passende und mit starken attraktiven Kräften ausgestattete Inhibitoren wurden dann synthetisiert und in einem anschließenden biochemischen Test untersucht. Diese Optimierungsversuche ermöglichten es, einen HtrA1-Inhibitor mit einem K_i von 0,5 μ M zu erhalten, was einer Verbesserung um einen Faktor 5 entsprach.

Ein anderer Ansatz wurde bei der Entwicklung der Inhibitoren für die chlamydiale Protease CPAF verwendet. Zu Beginn wurde die vorhandene Bibliothek, die für HtrA1 synthetisiert wurde, auf ihre Aktivität hin untersucht. In diesem Screening konnte DRYIRY-BoroV (**145**) als der potenteste Inhibitor identifiziert werden. Diese Bemühungen wurden dann ergänzt durch ein rationales Design, in welchem die Zymogensequenz als möglicher Startpunkt für die Entwicklung eines Inhibitors verwendet wurde. Eine Analyse der verschiedenen CPAF-vermittelten Proteolysen in der Zymogenstruktur zeigte, dass bei zwei der drei Schnittstellen eine große Übereinstimmung in der Sequenz vorlag. Dementsprechend wurde ein analoges Boronsäurepeptid hergestellt, in welchem diese Zymogenspaltsequenzen verwendet wurden; allerdings wurde anstelle des P1-Methioninrestes ein D-BoroNorleucin verwendet, da dieses synthetisch leichter zugänglich war. In einem zweiten, parallelen Ansatz wurde dann der beste Inhibitor der bestehenden Bibliothek DRYIRY-BoroV (**145**) an drei Stellen mit den entsprechenden Aminosäuren aus der Zymogensequenz modifiziert. Die Kombination führte zu den bisher besten Inhibitoren für CPAF, nämlich DRYIRY-D-

BoroNorleucin (**165**) und DRFWRY-D-BoroNorleucin (**168**). Die Verwendung von D-BoroNorleucin ergab eine deutliche Verbesserung des Inhibitors gegenüber BoroValin.

Eine weitere Steigerung könnte dementsprechend die Darstellung von Inhibitoren, welche ein BoroMethionin an P1 tragen, bringen. Eine Synthese von BoroMethionin ist nicht trivial, da die Sulfidseitenkette inkompatibel mit der verwendeten Matteson-Chemie ist, so dass diese laut der Literatur nur in Ausbeuten zwischen 20 % und 35 % unter Verwendung des chiralen Auxiliars (*R,R*)-2,3-Butandiol erhältlich ist. Allerdings wurde in der Literatur eine Alternativsynthese zu BoroMethioninpinandiolester **208** beschrieben, in welcher eine Insertion in (*s*)-Pinandiolvinylboronat (**204**) und ein anschließender radikalischer Aufbau der Methioninseitenkette durchgeführt wird (Abbildung 82).^[136]

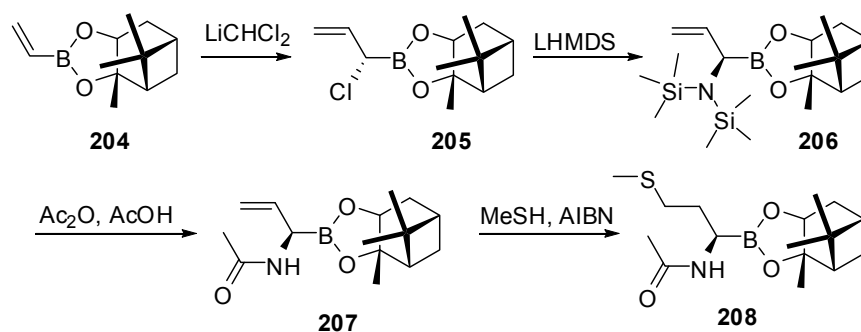


Abbildung 82: Literatur-beschriebene Synthese von Acetyl-BoroMethionin.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese eines cyclischen Boronsäureester-Analogons der Ahp-Cyclodepsipeptide. Leider konnte diese Synthese im Rahmen der Dissertation nicht beendet werden. Bei den Studien stellte sich insbesondere die Kontrolle der verschiedenen Stabilitäten bzw. Labilitäten der Boronsäureester während der Synthese als besonders schwierig heraus. So sind z. B. freie Aminoboronsäureester nicht stabil. Sie können entweder als Salze isoliert werden oder müssen direkt acyliert werden, z. B. mit Essigsäureanhydrid. Das freie Amin hingegen kann als Nucleophil den Ester spalten. Zum anderen tendieren freie Boronsäuren zur Bildung von trimeren Strukturen (Abbildung 83). Derartige Strukturen erschweren die Veresterung der Boronsäure.

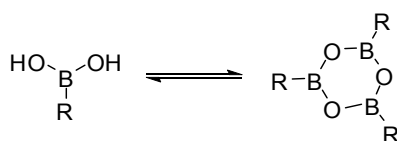


Abbildung 83: Gleichgewicht zwischen monomerer und trimerer Struktur freier Boronsäuren.

Ein zusätzliches Problem ergab sich aus der sehr hohen Stabilität von Pinandiolesteren. So ließen sich Pinandiolester kaum mit einem anderen Diol umestern. Der Einsatz von Pinandiolesteren war jedoch notwendig, da die Boronaminosäuren über die Matteson-Chemie synthetisiert wurden. Eine Möglichkeit zur Etablierung der Synthese cyclischer Boronsäureester wäre dementsprechend der Einsatz alternativer chiraler Diole wie z.B. 1,2-Dicyclohexyl-1,2-ethandiol während der Boronaminosäuresynthese, da sich diese Boronsäureester milder spalten lassen sollten.^[90]

Alternativ könnte auf die Ergebnisse von Dunsdon *et al.* zurückgegriffen werden, welche 2000 eine Festphasensynthese für Peptidboronsäuren veröffentlichten.^[137] In dieser Publikation wurde ein stabiler Boronsäureester beschrieben, der als Linker in einer Festphasensynthese eingesetzt wurde und sowohl gegenüber Fmoc-Entschützungen mit Piperidin als auch gegenüber Kupplungen von Fmoc-Aminosäuren stabil war. Die Stabilität von Boronsäureestern wird sowohl von sterischen als auch elektronischen Effekten bestimmt, wie sich z. B. an der großen Labilität eines Diethyltartratesters mit einer Boronsäure zeigt.^[125] Dunsdon *et al.* verwendeten nun einen Linker, der ebenso eine freie Säure und ein pinakolartiges Diol enthielt. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Dissertation benutzten Diolen war in dieser Arbeit die Säurefunktion jedoch nicht direkt zum Diol benachbart, so dass die elektronischen Effekte vermutlich eine geringere Rolle spielten. Dies würde andeuten, dass die Synthese eines Diols **212**, in welchem die Dioleinheit mittels einer CH₂-Gruppe von der Carboxylgruppe getrennt wurde, eine Möglichkeit bietet, den cyclischen Boronsäureester darzustellen. Eine mögliche Synthese für einen solchen Baustein ist in Abbildung 84 gezeigt.

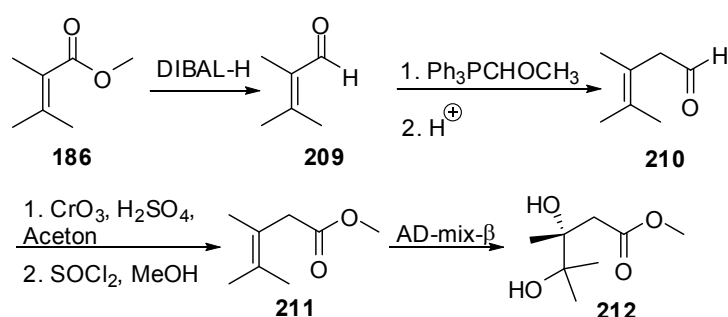


Abbildung 84: Mögliche Synthese des Diols mit zusätzlicher Methylengruppe.

Auch ein Amid besitzt andere elektronische Eigenschaften als eine freie Säure. So könnte man durch Umstellen der Synthese das ursprüngliche Produkt erhalten, ohne eine Säurefunktion in direkter Nachbarschaft zum Diol zu haben (Abbildung 85). Dazu wird Methyl-2,3-dimethylbut-2-enoat (**186**) zur Säure **213** verseift und mit Leucinbutylester

gekuppelt. Das Alken **214** wird anschließend dihydroxyliert. Derartig stark gehinderte quartäre Alkene könnten allerdings schlechte Ausbeuten und Diastereoselektivitäten liefern.

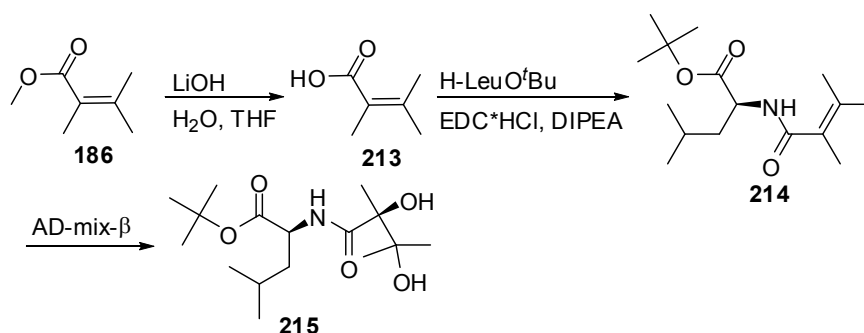


Abbildung 85: Mögliche Synthese des Diols unter direkter Verbrückung mit der nächsten Aminosäure Leucin.

In einem Nebenprojekt wurde des Weiteren der Naturstoff Kahalalide F (**132**) in Anlehnung an die Synthese von Àngel López-Macià *et al.* erfolgreich synthetisiert.^[117] Anschließend konnte das Molekül über eine reduktive Aminierung mit einem Rhodamin modifiziert werden (Abbildung 86).

Der Naturstoff **132** und die Rhodaminsonde **202** wurden danach von Dr. Maja Vuk aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hemmo Meyer biologisch mit verschiedenen mikroskopischen Methoden untersucht. Beide Substanzen wurden von CV-1 Zellen aufgenommen und verursachten interessante biologische Effekte. Der erste Effekt, der beobachtet werden konnte, war eine Veränderung der allgemeinen Morphologie der Zellen. Die Zellen wurden runder und lösten sich von der Glaswand, was auf einen möglichen Zelltod hinweist (und damit in Übereinstimmung mit der berichteten cytotoxischen Aktivität von Kahalalide F (**132**) ist). Weiterhin veränderten sich die Zellkerne, die sich deformiert zeigten. Am interessantesten war jedoch der Effekt auf die Lysosomen und Endosomen, zwei Zellorganellen des endolysosomalen Proteinabbausystems. Beide Kompartimente schwellen nach Kahalalide F-Gabe erheblich an. Außerdem konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie eine Anreicherung des mit Rhodamin-modifizierten Kahalalide F **202** in diesen beiden Organellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass sich die Proteintargets von Kahalalide F (**132**) eventuell in diesen Zellorganellen befinden. Weitergehende Studien der Proteintargetidentifizierung, z.B. mittels chemischer Proteomik, sollten daher insbesondere mit diesen beiden Zellorganellen durchgeführt werden. Hierzu könnte z. B. ein Photoaffinitäts-Labeling durchgeführt werden. Ein möglicher Weg wäre z. B. die Synthese eines Derivates, in welchem Phenylalanin gegen Benzoylphenylalanin ausgetauscht worden wäre. Nach Anbringen eines Alkin-Tags, z. B. am Fettsäurerest von Kahalalide F (**132**), wäre es dann möglich, nach UV-Bestrahlung das Target kovalent mit Kahalalide F (**132**) zu verknüpfen.

Anschließend könnte mittels eines 2-Schritt-ABPP-Ansatzes das Protein mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

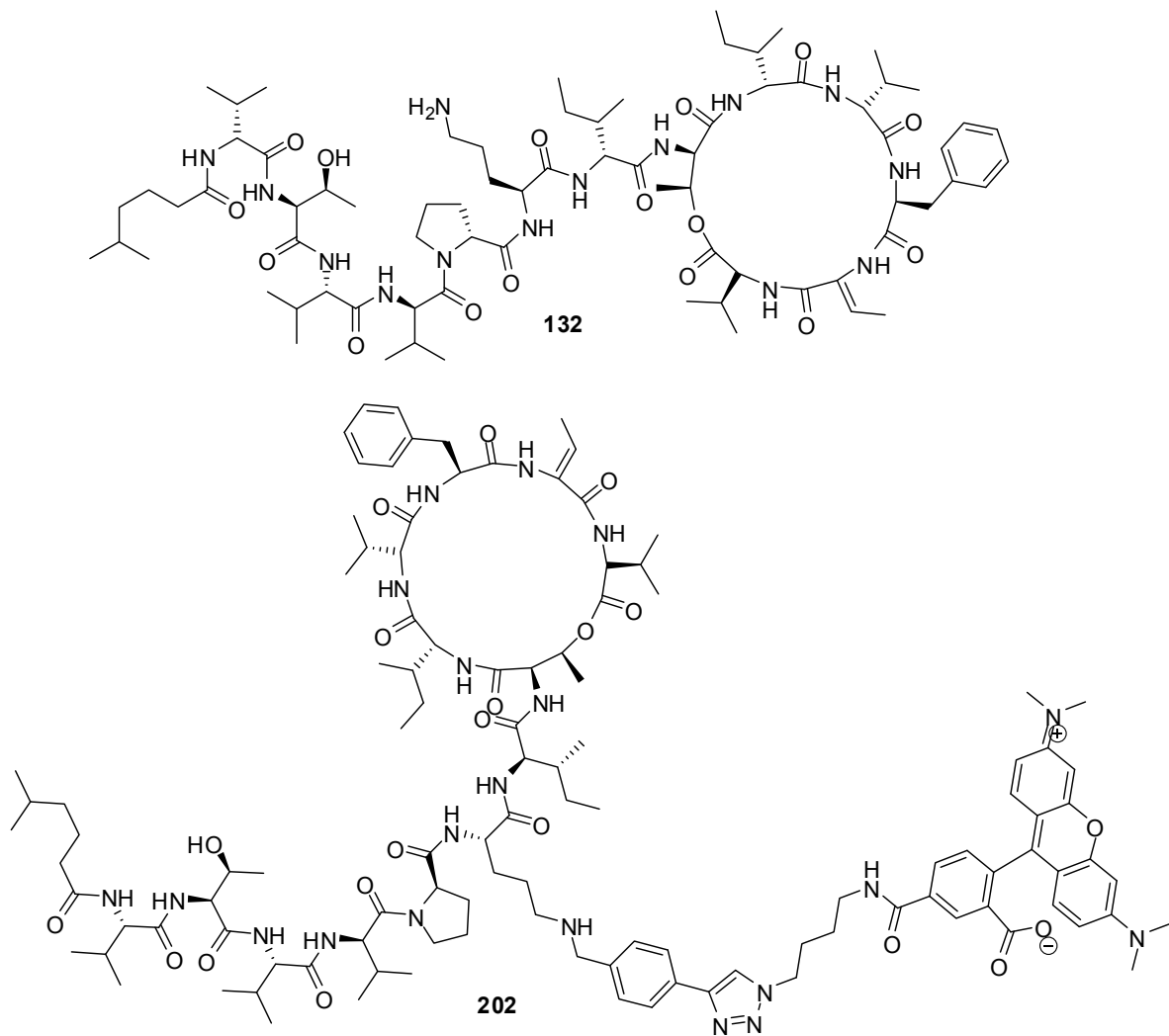


Abbildung 86: Struktur von Kahalalide F (**132**) und des mit Rhodamin modifizierten Naturstoffs **202**.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

6.1.1 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen VWR, Sigma Aldrich, ABCR, Acros, Novabiochem, Merck, Alfa Aesar, Senn Chemicals, Iris Biotech, Bachem und Epsilon Chimie erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

6.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60_{F254} beschichtete Aluminiumplatten von Merck verwendet. Zur Analyse wurde zum einen UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm und 366 nm und zum anderen zwei verschiedene Färbebäder benutzt. Das erste Färbebad bestand aus Molybdätdiphosphorsäure (20 g) in Ethanol (80 mL), das zweite aus Kaliumpermanganat (1,5 g) in Wasser (100 mL).

6.1.3 Präparative Säulenchromatographie

Die säulenchromatographischen Aufreinigungen erfolgten in Glassäulen, die mit einer Fritte unterschiedlicher Porosität zwischen 1 und 4 ausgestattet waren. Der Durchmesser der Säule war abhängig vom Trennproblem und der Menge an Rohprodukt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße zwischen 35 nm und 70 nm benutzt. Die Lösungsmittelgemische sind bei den einzelnen Versuchsvorschriften angegeben. Für die Umkehrphasenchromatographie wurde als stationäre Phase LiChroprep RP-18 (40-63 µm) von der Firma Merck verwendet.

6.1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gekoppelte Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Die LC-MS-Analysen wurden mittels eines LC-MS-Systems der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Als Säule wurde eine Eclipse XDB-C18 (5 µm) der Firma Agilent verwendet. Zur Detektion wurde die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen. Die

HPLC wurde mit einem Thermo Scientific LCQ FleetTM ESI-Spektrometer gekoppelt. Für Messungen im positiven Modus wurde ein linear ansteigender Gradient des Lösungsmittels B (0,1 % Ameisensäure in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0,1 % Ameisensäure in Wasser) angewendet. Für Messungen im negativen Modus wurde ein linearer Gradient des Lösungsmittels D (5 mM Ammoniumacetat in Acetonitril) in Lösungsmittel C (5 mM Ammoniumacetat in Wasser) benutzt. Sowohl im positiven wie auch im negativen Modus betrug die Flussrate 1 mL/Min..

Gradient für den positiven Modus: 0 Min. /10 % B → 1 Min. /10 % B → 10 Min. /100 % B → 12 Min. /100 % B → 15 Min. /10 % B

Gradient für den negativen Modus: 0 Min. /10 % C → 1 Min. /10 % C → 10 Min. /100 % C → 12 Min. / 100 % C → 15 Min. /10 % C

6.1.5 Präparative

Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die Aufreinigung von Substanzen mittels präparativer HPLC erfolgte auf einem Shimadzu HPLC System mit dem Namen Prominence UFLC. Bei der Säule (Luna[®] 5 µm C18(2), 100 * 21.20 mm) handelte es sich um eine RP-C₁₈-Säule der Firma Phenomenex. Die Detektion der Peaks erfolgte bei einer Wellenlänge von entweder 210 nm oder 254 nm. Bei einem Fluss von 25 mL/Min. wurden an das Trennproblem angepasste Gradienten aus Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure und 0,1 %ige wässrige Trifluoressigsäure im positiven Modus verwendet, während im negativen Modus 5 mM Lösungen von Ammoniumacetat in Acetonitril und Wasser benutzt wurden.

6.1.6 Gefriertrocknung

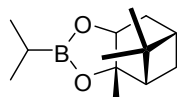
Zum Lyophilisieren wurden die wässrigen Lösungen der Produkte in einem Bad aus flüssigem Stickstoff unter Drehen des Kolbens als möglichst feine Schicht mit großer Oberfläche eingefroren. Anschließend wurden die Kolben an den Gefriertrockner Alpha 2-4 LD plus gegangen. Das lyophilisierte Produkt blieb als schaumartiger Feststoff zurück.

6.1.7 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Aufnahme von Spektren der Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* (NMR)) erfolgte mit den Geräten Avance II 400 oder Avance II 700 von der Firma Bruker. Das erste Gerät verfügte über eine Messfrequenz von 400 MHz für Protonen- und 100 MHz für Kohlenstoffspektren. Das zweite Gerät verfügte dementsprechend über eine Messfrequenz von 700 MHz für Protonen- und 176 MHz für Kohlenstoffspektren. Bei den ^1H -Spektren wurden folgende Daten ausgewertet: Die chemische Verschiebung (δ) wurde in ppm angegeben. Als Standard wurde der undeuterte Rest des Lösemittelpeaks verwendet. Als zweites folgte die Multiplizität des Signals [s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet), m (Multiplet)] mit den entsprechenden Kopplungskonstanten in Hertz (Hz). Als letztes wurde das Integral angegeben, das der Anzahl der Protonen entspricht. Für ^{13}C -Spektren wurden die chemischen Verschiebungen der Signale aufgezählt.

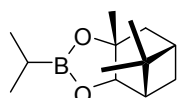
6.2 Synthese der C-terminal mit einer Boronsäure modifizierten Peptide

6.2.1 Synthese des (+)-Pinandiolisopropylboronsäureesters **71**

**71**

Eine Lösung von Isopropylboronsäure (**86**) (2 g, 22 mmol, 1 eq.) wurde in Diethylether (2,8 mL) gelöst. Zu dieser wurde eine Lösung von *s*-Pinandiol (**87**) (3,88 g, 22 mmol, 1 eq) in Diethylether (5,6 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 1 h gerührt, danach mit Diethylether (22 mL) verdünnt und über Natriumsulfat getrocknet. Der Ether wurde nachfolgend unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel gereinigt (EA : CH = 1 : 9) (V : V) und kurz am Hochvakuum getrocknet, um den Boronsäureester **71** zu erhalten (3,92 g, 17,6 mmol, 80 %); $^1\text{H-NMR}$ (400,452 MHz, CDCl_3) δ 4,24 (dd, $J = 8,7, 2,0$ Hz, 1H), 2,37-2,29 (m, 1H), 2,24-2,17 (m, 1H), 2,06-2,03 (m, 1H), 1,92-1,87 (m, 1H), 1,83 (ddd, $J = 14,5, 3,4, 2,0$ Hz, 1H), 1,37 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,17-1,06 (m, 1H), 1,09 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 1,00 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H), 0,84 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,704 MHz, CDCl_3) δ 85,2, 77,6, 51,3, 39,5, 38,1, 35,6, 28,7, 27,1, 26,9, 26,4, 24,0, 18,2.

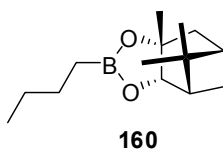
6.2.2 Synthese des (-)-Pinandiolisopropylboronsäureesters **D-71**

**D-71**

Die Synthese des anderen Stereoisomers **D-71** wurde analog Vorschrift 6.2.1. mit *r*-Pinandiol (**159**) (3,88 g, 22 mmol, 1 eq) durchgeführt, um somit den gewünschten Boronsäureester **D-71** zu erhalten (3,72 g, 16,7 mmol, 76 %) $^1\text{H-NMR}$ (400,452 MHz, CDCl_3) δ 4,23 (dd, $J = 8,7, 2,0$ Hz, 1H), 2,38-2,31 (m, 1H), 2,22-2,15 (m, 1H), 2,07-2,03 (m, 1H), 1,92-1,87 (m, 1H), 1,82 (ddd, $J = 14,5, 3,3, 2,0$ Hz, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,17-1,05 (m, 1H), 1,10 (d, J

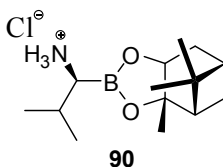
= 10,9 Hz, 1H), 1,01 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H), 0,84 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100,704 MHz, CDCl_3) δ 85,3, 77,4, 51,3, 39,5, 38,0, 35,5, 28,7, 27,0, 26,9, 26,3, 23,9, 18,4.

6.2.3 Synthese des (-)-Pinandiolbutylboronsäureesters **160**



Eine Lösung von *n*-Butylboronsäure (**158**) (1 g, 9,81 mmol, 1 eq) wurde in Diethylether (1,4 mL) gelöst. Zu dieser wurde eine Lösung von *r*-Pinandiol (**159**) (1,67 g, 9,81 mmol, 1 eq) in Diethylether (2,8 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 1 h gerührt, danach mit Diethylether (11 mL) verdünnt und über Natriumsulfat getrocknet. Der Ether wurde nachfolgend unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel gereinigt (EA : CH = 1 : 19) (V : V) und kurz am Hochvakuum getrocknet, um den Boronsäureester **160** zu erhalten (2,135 g, 9,04 mmol, 92,2 %) ^1H -NMR (399,92 MHz, CDCl_3) δ 4,23 (dd, $J = 8,7, 2,0$ Hz, 1H), 2,36-2,29 (m, 1H), 2,24-2,18 (m, 1H), 2,05-2,02 (m, 1H), 1,92-1,88 (m, 1H), 1,86-1,81 (m, 1H), 1,45-1,38 (m, 2H), 1,37 (s, 3H), 1,35-1,29 (m, 2H), 1,28 (s, 3H), 1,11 (d, $J = 10,9$ Hz), 1H), 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,84 (s, 3H), 0,84-0,79 (m, 2H); ^{13}C -NMR (100,58 MHz, CDCl_3) δ 85,5, 77,8 51,5, 39,8, 38,3, 35,8, 28,9, 27,3, 26,7, 26,6, 25,7, 24,2, 14,1.

6.2.4 Synthese von BoroValinpinandiolester **90**

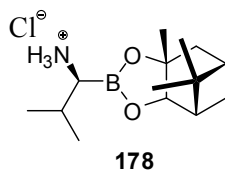


Eine Lösung von Dichlormethan (76 μL , 1,19 mmol, 1,5 eq) in trockenem Tetrahydrofuran (1,5 mL) wurde unter Argonatmosphäre auf -100 °C abgekühlt. Eine Lösung von *n*-BuLi in Hexan (0,58 mL, 0,928 mmol, 1,2 eq, 1,6 M) wurde langsam zugetropft. Nach 15 Min. wurde eine Lösung des (+)-Isopropylboronsäureesters **71** (150 mg, 0,675 mmol, 1 eq) in

Tetrahydrofuran (1,5 mL) langsam zugegeben. Nach weiteren 5 Min. wurde eine Lösung von Zinkchlorid (0,62 mL, 0,618 mmol, 0,8 eq, 1 M) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zur Trockne aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Cyclohexan und gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Cyclohexan reextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Die Reaktion wurde drei Mal wiederholt, so dass am Ende 480 mg Rohprodukt **88** erhalten wurde, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

Eine Lösung von Lithiumhexamethyldisilzan in Tetrahydrofuran (2,42 mL, 2,42 mmol, 1,22 eq, 1 M) wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Das Rohprodukt **88** (480 mg, 1,98 mmol, 1 eq) wurde in Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst und zu der LHMDs-Lösung zugetropft. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend zur Trockne unter Argonatmosphäre aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in trockenem Hexan aufgenommen. Die Suspension wurde dann über Celite unter Argonatmosphäre filtriert. Das Filtrat wurde nachfolgend auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit Chlorwasserstoff in Dioxan (1,9 mL, 7,6 mmol, 3.8 eq, 4 M) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Produkt **90** wurde mit Hexan ausgefällt und danach bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min., 20 Min.). Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Die Mutterlauge wurde aufkonzentriert und erneut mit Hexan behandelt, wodurch eine zweite Kristallfraktion erhalten wurde. Die vereinigten weißen Feststoffe entsprachen dem erwünschten Produkt **90** (350 mg, 1,21 mmol, 59,8 %) LC-MS (ESI) $t_R = 5,90\text{ Min.}$, m/z 251,98 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 252,21 berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{BNO}_2]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400,454 MHz, MeOD) δ 4,50 (d, $J = 8,8\text{ Hz}$, 1H), 3,32-3,31 (m, 1H), 2,79 (d, $J = 5,2\text{ Hz}$, 1H), 2,48-2,41 (m, 1H), 2,34-2,28 (m, 1H), 2,15-2,06 (m, 1H), 1,96-1,87 (m, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,21 (d, $J = 11,0\text{ Hz}$, 1H), 1,10-1,06 (m, 6H), 0,90 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,58 MHz, MeOD) δ 89,0, 80,1, 52,5, 40,8, 39,3, 36,1, 30,4, 29,0, 27,5, 27,4, 24,3, 20,3, 19,7.

6.2.5 Synthese von D-BoroValinpinandiolester 178

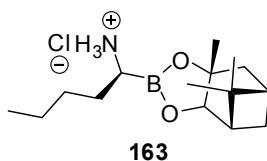


Eine Lösung von Dichlormethan (456 μ L, 7,14 mmol, 1,5 eq) in trockenem Tetrahydrofuran (9 mL) wurde unter Argonatmosphäre auf $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Eine Lösung von *n*-BuLi in Hexan (3,48 mL, 5,57 mmol, 1,2 eq, 1,6 M) wurde langsam zugetropft. Nach 15 Min. wurde eine Lösung des (-)-Isopropylboronsäureesters **D-71** (900 mg, 4,05 mmol, 1 eq) in Tetrahydrofuran (10 mL) langsam zugegeben. Nach weiteren 5 Min. wurde eine Lösung von Zinkchlorid (3,72 mL, 3,708 mmol, 0,8 eq, 1 M) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zur Trockne aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Cyclohexan und gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Cyclohexan reextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Es konnte 2,75 g Rohprodukt **D-88** erhalten werden, das ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

Eine Lösung von Lithiumhexamethyldisilzan in Tetrahydrofuran (22,46 mL, 22,46 mmol, 1,22 eq, 1 M) wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Das Rohprodukt **D-88** (2,75 g, 11,34 mmol, 1 eq) wurde in Tetrahydrofuran (30 mL) gelöst und zu der LHMDS-Lösung zugetropft. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend zur Trockne unter Argonatmosphäre aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in trockenem Hexan aufgenommen. Die Suspension wurde dann über Celite unter Argonatmosphäre filtriert. Das Filtrat wurde nachfolgend auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit Chlorwasserstoff in Dioxan (10,9 mL, 43,5 mmol, 3,8 eq, 4 M) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Produkt **178** wurde mit Hexan ausgefällt und danach bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min., 20 Min.). Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Die Mutterlauge wurde aufkonzentriert und erneut mit Hexan behandelt, wodurch eine zweite Kristallfraktion erhalten wurde. Die vereinigten weißen Feststoffe entsprachen dem erwünschten Produkt **178** (826 mg, 2,86 mmol, 70,5 %) LC-MS (ESI) $t_R = 5,91\text{ Min.}$, m/z

251,97 [M+H]⁺, 252,21 berechnet für [C₁₄H₂₇BNO₂]⁺; ¹H-NMR (400,454 MHz, MeOD) δ 4,49 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,33-3,31 (m, 1H), 2,80 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 2,49-2,41 (m, 1H), 2,34-2,29 (m, 1H), 2,15-2,05 (m, 1H), 1,96-1,88 (m, 2H), 1,44 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,21 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 1,10-1,05 (m, 6H), 0,91 (s, 3H); ¹³C-NMR (100,58 MHz, MeOD) δ 89,1, 80,1, 52,5, 40,8, 39,4, 36,1, 30,3, 29,1, 27,5, 27,3, 24,3, 20,2, 19,8.

6.2.6 Synthese von D-BoroNorleucinpinandiolester 163



Eine Lösung von Dichlormethan (81 µL, 1,27 mmol, 1,5 eq) in trockenem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Argonatmosphäre auf -100 °C abgekühlt. Eine Lösung von *n*-BuLi in Hexan (0,79 mL, 1,27 mmol, 1,5 eq, 1,6 M) wurde langsam zugetropft. Nach 15 Min. wurde eine Lösung des Butylboronsäureesters **160** (200 mg, 0,847 mmol, 1 eq) in Tetrahydrofuran (2,5 mL) langsam zugegeben. Nach weiteren 5 Min. wurde eine Lösung von Zinkchlorid (0,97 mL, 0,678 mmol, 0,8 eq, 0,7 M) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zur Trockne aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Cyclohexan und gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Cyclohexan reextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Die Reaktion wurde sechs Mal wiederholt, so dass am Ende 1,34 g Rohprodukt **161** erhalten wurde, das ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

Eine Lösung von Lithiumbis(trimethylsilyl)amid in Tetrahydrofuran (5,89 mL, 5,89 mmol, 1,25 eq, 1 M) wurde auf -78 °C abgekühlt. Das Rohprodukt (1,34 g, 4,71 mmol, 1 eq) wurde in Tetrahydrofuran (15 mL) gelöst und zu der LHMDs-Lösung zugetropft. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend zur Trockne unter Argonatmosphäre aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in trockenem Hexan aufgenommen. Die Suspension wurde dann über Celite unter Argonatmosphäre filtriert. Das Filtrat wurde nachfolgend auf -78 °C abgekühlt und mit

Chlorwasserstoff in Dioxan (4,5 mL, 18 mmol, 3.8 eq, 4 M) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Produkt **163** wurde mit Hexan ausgefällt und danach bei 4 °C zentrifugiert (3000 Umdrehungen/Min., 20 Min.). Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Die Mutterlauge wurde aufkonzentriert und erneut mit Hexan behandelt, wodurch eine zweite Kristallfraktion erhalten wurde. Die vereinigten weißen Feststoffe entsprachen dem erwünschten Produkt **163** (515 mg, 1,71 mmol, 33,5 %) LC-MS (ESI) $t_R = 6,43$ Min., m/z 266,65 $[M+H]^+$, 266,23 berechnet für $[C_{15}H_{29}BNO_2]^+$, 1H -NMR (399,99 MHz, MeOD) δ 4,48 (dd, $J = 8,8, 1,8$ Hz, 1H), 2,88 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 2,47-2,38 (m, 1H), 2,33-2,25 (m, 1H), 2,10-2,05 (m, 1H), 1,97-1,85 (m, 2H), 1,81-1,68 (m, 2H), 1,50-1,35 (m, 4H), 1,45 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 1,17 (dd, $J = 11,0, 4,2$ Hz, 1H), 0,97-0,91 (m, 3H), 0,88 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100,58 MHz, MeOD) δ 96,3, 87,2, 60,4, 58,2, 47,5, 44,4, 38,5, 37,9, 37,7, 36,5, 35,6, 33,3, 31,6.

6.2.7 Beladung eines Chlorotriethylchloridharzes

Die gewünschte Fmoc-geschützte Aminosäure (1,2 eq) wurde in trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst. Ethyldiisopropylamin (4,8 eq) wurde zugegeben. Die entstandene Lösung wurde 30 s geschüttelt und anschließend zu Chlorotriethylchloridharz (1 eq) hinzugefügt. Die erhaltene Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und danach mit Dimethylformamid (5x1 Min.) gewaschen. Nachfolgend wurde das Harz mit einer Mischung aus Dichlormethan, Methanol und Ethyldiisopropylamin (17:2:1) für 15 Min. behandelt. Dann wurde das Harz mit Dichlormethan (1x1 Min.) gewaschen und der vorherige Schritt wiederholt. Danach wurde das Harz mit Dimethylformamid (3x1 Min.), alternierend mit Methanol (3x1 Min.) und Dichlormethan (3x1 Min.) und abschließend mit Dichlormethan (3x1 Min.) gewaschen. Das Harz wurde zum Schluss gründlich am Hochvakuum getrocknet.

6.2.8 Bestimmung der Beladung des Harzes

Ca. 5 mg des beladenen und getrockneten Harzes wurden entnommen, exakt gewogen und in einer Lösung von Piperidin in Dimethylformamid (20 %, 5 mL) suspendiert. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für mindestens 15 Min. geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung vom Harz getrennt und die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 301 nm gemessen. Die Berechnung der Beladung c erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit der folgenden Formel.

$$c = \frac{A * V}{\epsilon * d * m * F}$$

mit: A: Absorption

V: Volumen

ϵ : Extinktionskoeffizient (780 mL*mmol⁻¹*mm⁻¹)

d: Schichtdicke der Küvette in mm

m: Einwaage an Harz

F: Verdünnungsfaktor

6.2.9 Synthese der geschützten Peptide

Auf die beladenen Harze wurden anschließend mit dem Peptidsynthesizer Syro I von Biotage die Aminosäuren gekuppelt. Dazu wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin (20 %) in Dimethylformamid abgespalten, dann wurde das Harz mit Dimethylformamid gewaschen und dann die zweite Fmoc-Aminosäure (4 eq. bezogen auf die Beladung) unter Verwendung von HBTU (4 eq.), HOBT (4 eq.) und Ethyldiisopropylamin (4 eq.) gekuppelt. Der Zyklus wurde durch erneutes Waschen des Harzes abgeschlossen. Die weiteren Aminosäuren wurden analog gekuppelt, wobei die letzte Aminosäure nicht Fmoc- sondern Boc-geschützt eingesetzt wurde.

Zur Abspaltung der Peptide unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen wurde anschließend das Harz für zwei Stunden mit Essigsäure (20 %) und Trifluorethanol (20 %) in Dichlormethan behandelt. Die Lösung wurde anschließend filtriert und das Harz mit Dichlormethan (3x1 Min.) gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und dann mit Cyclohexan coevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Peptide konnten ohne weitere Aufreinigung direkt mit den entsprechenden BoroAminosäuren gekuppelt werden.

6.2.10 Kupplung der Peptide mit den BoroAminosäuren



Unter Argonatmosphäre wurde das Rohpeptid (1 eq) in trockenem Dimethylformamid und Dichlormethan (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden Fluoro-*N,N,N',N'*-bis(tetramethylen)formamidiniumhexafluorophosphat (1,1 eq) und Ethyldiisopropylamin (2 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 Min. gerührt, gefolgt von der Zugabe der BoroAminosäure (1,1 eq) und einer weiteren Menge Ethyldiisopropylamin (2 eq). Die Reaktionsmischung wurde dann zwischen 3 h und 17 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Folgenden unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und 2x mit wässriger gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Wenn das Peptid schwefelhaltige Aminosäuren enthielt, wurde der Feststoff anschließend 2 h mit Trifluoressigsäure, Ethandithiol, Wasser und Triisopropylsilan (95:2:2:1) behandelt. Ohne Cystein oder Methionin wurde Ethandithiol nicht verwendet, wodurch die Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan (95:2,5:2,5) bestand. Danach wurde das Rohpeptid langsam unter Eiskühlung mit Diethylether gefällt und durch Zentrifugieren (3500 Umdrehungen/Min., 4 °C, 20 Min.) isoliert. Das Rohprodukt wurde zum Schluss mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

SPMFKG-BoroV (**143**): Ausbeute = 11 mg (0,014 mmol, 22,2 %) LC-MS (ESI): t_R 4,88 Min. m/z 729,47 $[M+H-2H_2O]^+$, 729,392 berechnet für $C_{34}H_{54}BN_8O_7S^+$.

DPMFKL-BoroV (**142**): Ausbeute = 64,09 mg (0,0595 mmol, 31,5 %) LC-MS (ESI): t_R 4.72 Min., m/z 831,40 $[M+H-H_2O]^+$, 853,47 $[M+Na-H_2O]^+$, 813,60 $[M+H-2H_2O]^+$, 831,46 berechnet für $C_{39}H_{64}BN_8O_9S^+$; 1H -NMR (700,22 MHz, MeOD) δ 7,30-7,24 (m, 4H), 7,20 (m, 1H) 4,62 (dd, $J = 10,6, 4,6$ Hz, 1H), 4,42 (dd, $J = 9,3, 5,6$ Hz, 1H), 4,37 (dd, $J = 8,4, 5,6$ Hz, 1H), 4,34 (dd, $J = 9,6, 5,2$ Hz, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,22 (dd, $J = 9,8, 4,6$ Hz, 1H), 3,87-3,81 (m, 1H), 3,79-3,74 (m, 1H), 3,23 (dd, $J = 14,1, 5,6$ Hz, 1H), 3,08 (dd, $J = 14,1, 9,4$ Hz, 1H), 2,92 (m, 2H), 2,74 (dd, $J = 15,4, 8,0$ Hz, 1H), 2,67 (dd, $J = 15,3, 5,7$ Hz, 1H), 2,54-2,47 (m, 1H), 2,44-2,38 (m, 1H), 2,33 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 2,08 (m, 3H), 2,03 (s, 3H), 1,99-1,95 (m, 4H), 1,95 (s, 6H), 1,92-1,86 (m, 1H), 1,85-1,76 (m, 3H), 1,75-1,70 (m, 1H), 1,68-1,59 (m, 3H), 1,47-1,38 (m, 2H), 1,34-1,27 (m, 1H), 1,00-0,91 (m, 12H); ^{13}C -NMR (176,07 MHz, MeOD) δ 178,1, 175,9, 175,0, 173,5, 173,5, 172,9, 172,5, 171,0, 137,3, 128,9, 128,2, 126,4, 61,6,

55,7, 53,6, 53,5, 49,6, 48,4, 48,0, 47,9, 39,6, 39,1, 36,1, 30,4, 30,0, 29,6, 29,4, 28,6, 26,6, 24,5, 24,4, 22,5, 21,9, 20,8, 20,2, 20,1, 19,6, 13,9, 13,8.

DRMIRY-BoroV (**148**): Ausbeute = 19,53 mg (0,0151 mmol, 30,2 %) LC-MS (ESI): t_R 4,79 Min., m/z 952,40 $[M+H]^+$, 934,60 $[M+H-H_2O]^+$, 952,52 berechnet für $C_{40}H_{71}BN_{13}O_{11}S^+$.

DRYIRY-BoroV (**145**): Ausbeute = 20,20 mg (0,0152 mmol, 20,0 %) LC-MS (ESI): t_R 4,73 Min., m/z 984,47 $[M+H]^+$, 966,73 $[M+H-H_2O]^+$, 984,54 berechnet für $C_{44}H_{71}BN_{13}O_{12}^+$.

DRYMRY-BoroV (**149**): Ausbeute = 15,64 mg (0,0116 mmol, 16,6 %) LC-MS (ESI): t_R 4,73 Min., m/z 1002,40 $[M+H]^+$, 984,53 $[M+H-H_2O]^+$, 1002,50 berechnet für $C_{43}H_{69}BN_{13}O_{12}S^+$.

DRMIKY-BoroV (**146**): Ausbeute = 18,98 mg (0,0150 mmol, 17,2 %) LC-MS (ESI): t_R 3,29 Min., m/z 924,40 $[M+H]^+$, 906,60 $[M+H-H_2O]^+$, 924,51 berechnet für $C_{40}H_{71}BN_{11}O_{11}S^+$.

DRMMRY-BoroV (**150**): Ausbeute = 24,88 mg (0,0190 mmol, 24,6 %) LC-MS (ESI): t_R 4,67 Min., m/z 970,33 $[M+H]^+$, 952,53 $[M+H-H_2O]^+$, 970,48 berechnet für $C_{39}H_{69}BN_{13}O_{11}S_2^+$.

DRYIKY-BoroV (**147**): Ausbeute = 30,73 mg (0,0237 mmol, 26,3 %) LC-MS (ESI): t_R 3,41 Min., m/z 956,33 $[M+H]^+$, 938,60 $[M+H-H_2O]^+$, 956,54 berechnet für $C_{44}H_{71}BN_{11}O_{12}^+$.

DRYMRQ-BoroV (**151**): Ausbeute = 17,96 mg (0,0137 mmol, 22,1 %) LC-MS (ESI): t_R 1,32 Min., m/z 967,40 $[M+H]^+$, 949,53 $[M+H-H_2O]^+$, 967,49 berechnet für $C_{39}H_{68}BN_{14}O_{12}S^+$.

DRMMKQ-BoroV (**154**): Ausbeute = 10,89 mg (0,00872 mmol, 13,0 %) LC-MS (ESI): t_R 1,29 Min., m/z 907,20 $[M+H]^+$, 889,53 $[M+H-H_2O]^+$, 907,47 berechnet für $C_{35}H_{68}BN_{12}O_{11}S_2^+$.

DRYMKQ-BoroV (**152**): Ausbeute = 7,33 mg (0,00572 mmol, 9,6 %) LC-MS (ESI): t_R 2,61 Min., m/z 939,53 $[M+H]^+$, 921,53 $[M+H-H_2O]^+$, 939,91 berechnet für $C_{39}H_{68}BN_{12}O_{12}S^+$.

DRMIKQ-BoroV (**144**): Ausbeute = 12,10 mg (0,00983 mmol, 16,3 %) LC-MS (ESI): t_R 3,14 Min., m/z 889,20 $[M+H]^+$, 871,60 $[M+H-H_2O]^+$, 889,51 berechnet für $C_{36}H_{70}BN_{12}O_{11}S^+$.

DRMIRQ-BoroV (**153**): Ausbeute = 1,62 mg (0,00113 mmol, 1,6 %) LC-MS (ESI): t_R 2,00 Min., m/z 915,53 $[M-H]$, 915,50 berechnet für $C_{36}H_{68}BN_{14}O_{11}S^-$.

DRYIKQ-BoroV (**155**): Ausbeute = 5,2 mg (0,00564 mmol, 7,1 %) LC-MS (ESI): t_R 4,31 Min., m/z 921,47 $[M+H]^+$, 921,53 berechnet für $C_{40}H_{70}BN_{12}O_{12}^+$.

DRMMRQ-BoroV (**156**): Ausbeute = 19,59 mg (0,021 mmol, 31,3 %) LC-MS (ESI): t_R 2,65 Min., m/z 935,33 $[M+H]^+$, 935,47 berechnet für $C_{35}H_{68}BN_{14}O_{11}S_2^+$.

MGKASP-BoroV (**157**): Ausbeute = 4,0 mg (0,0058 mmol, 5,5 %), LC-MS (ESI): t_R 2,32 Min., m/z 689,07 $[M+H]^+$, 689,38 berechnet für $C_{28}H_{54}BN_8O_9^+$.

SLFYSP-D-BoroNorleucin (**164**): Ausbeute = 30 mg (0,036 mmol, 23,5 %) LC-MS (ESI): t_R 4,97 Min., m/z 807,79 $[M+H]^+$, 808,44 berechnet für $C_{40}H_{59}BN_7O_{10}^+$.

DRYIRY-D-BoroNorleucin (**165**): Ausbeute = 6 mg (0,006 mmol, 6,5 %) LC-MS (ESI): t_R 3,82 Min., m/z 997,85 $[M+H]^+$, 998,56 berechnet für $C_{45}H_{73}BN_{13}O_{12}^+$.

DRYWRV-D-BoroV (**166**): Ausbeute = 31 mg (0,029 mmol, 33,3 %) LC-MS (ESI): t_R 3,81 Min., m/z 1056,97 $[M+H]^+$, 1057,54 berechnet für $C_{49}H_{70}BN_{14}O_{12}^+$.

DRFIRY-D-BoroV (**167**): Ausbeute = 21 mg (0,022 mmol, 22,6 %) LC-MS (ESI): t_R 3,68 Min., m/z 968,97 $[M+H]^+$, 968,55 berechnet für $C_{44}H_{71}BN_{13}O_{11}^+$.

DRFWRY-D-BoroNorleucin (**168**): Ausbeute 16 mg (0,015 mmol, 16,0 %) LC-MS (ESI): t_R 4,26 Min., m/z 1054,85 $[M+H]^+$, 1055,56 berechnet für $C_{50}H_{72}BN_{14}O_{11}^+$.

6.2.11 Synthese von Biman-CDPMFKL-BoroV (**171**)

Analog zu den vorherigen Beschreibungen wurde das auf Chlorotriptyl-Harz gebundene Peptid FmocAsp(O^tBu)-Pro-Met-Phe-Lys(Boc)-Leu-OH mittels eines Peptidsynthesizers hergestellt. Durch einen Fmoc-Test (6.2.8) konnte eine Beladung des Harzes mit diesem Peptid von 0,22 mmol/g bestimmt werden. Dieses Harz **139** (475 mg, 0,105 mmol, 1 eq) wurde darauf für 15 Min. mit 20 % Piperidin in Dimethylformamid behandelt. Anschließend wurde es mit Dimethylformamid (1x1 Min.) gewaschen und der vorherige Schritt wiederholt. Nachdem das Harz mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen worden war, wurde eine Lösung von BocCys(SEt)OH (193 mg, 0,418 mmol, 4 eq), HBTU (139 mg, 0,368 mmol, 3,5 eq), HOBt (58 mg, 0,418 mmol, 4 eq) und Ethyldiisopropylamin (55 μ L, 0,315 mmol, 3 eq) zugegeben und das Harz für 2 h geschüttelt. Das Harz wurde daraufhin erneut mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Als nächstes wurde es in vier gleichgroße Ansätze aufgeteilt. Das Harz **169** (0,02625 mmol, 1 eq) wurde mit einer Lösung von Dithiothreitol (51 mg, 0,2625 mmol, 10 eq) und *N*-Methylmorpholin (3 μ L, 0,02625 mmol, 1 eq) in Dimethylformamid behandelt. Es wurde über Nacht geschüttelt und nachfolgend mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Eine Lösung von Monobromobiman (7 mg, 0,02625 mmol, 1 eq) und Ethyldiisopropylamin (14 μ L, 0,07875 mmol, 3 eq) in Dimethylformamid wurde zu dem gewaschenen Harz gegeben. Dann wurde für drei Tage unter Lichtausschluss geschüttelt. Das Harz **170** wurde mit Dimethylformamid gewaschen und mit Essigsäure (20 %) und Trifluorethanol (20 %) in Dichlormethan für 2 h behandelt. Die Lösung wurde als nächstes abfiltriert und das Harz zusätzlich mit Dichlormethan (3x)

gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und anschließend mit Cyclohexan coevaporiert und im Hochvakuum getrocknet.

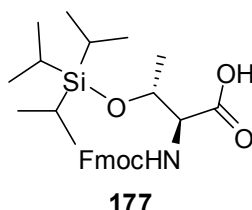
Unter Argonatmosphäre wurde das Rohpeptid (62 mg, 0,048 mmol, 1 eq) in trockenem Dimethylformamid und Dichlormethan (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden BTFFH (18 mg, 0,053 mmol, 1,1 eq) und Ethyldiisopropylamin (34 μ L, 0,096 mmol, 2 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 Min. gerührt, gefolgt von der Zugabe von BoroValinpinandiolester **90** (16 mg, 0,053 mmol, 1,1 eq) und einer weiteren Menge an Ethyldiisopropylamin (34 μ L, 0,096 mmol, 2 eq). Die Reaktionsmischung wurde dann über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Folgenden unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und 2x mit wässriger gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Der Feststoff wurde anschließend 2 h mit Trifluoressigsäure, Ethandithiol, Wasser und Triisopropylsilan (95:2:2:1) behandelt. Danach wurde das Rohpeptid langsam unter Eiskühlung mit Diethylether gefällt und durch Zentrifugieren (3500 Umdrehungen/Min., 4 °C, 20 Min.) isoliert. Das Rohprodukt wurde zum Schluss mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

BimanCDPMFKL-BoroV (**171**): Ausbeute 14,73 mg (0,0107 mmol, 22,4 %) LC-MS (ESI): t_R 5,90 Min., m/z 1142,07 $[M+H]^+$, 1142,55 berechnet für $C_{52}H_{81}BN_{11}O_{13}S_2^+$.

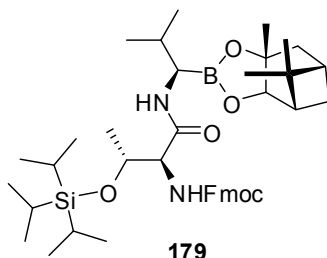
6.3 Synthesen zur versuchten Darstellung cyclischer Boronsäureester

6.3.1 TIPS-Schätzung von FmocThrOH



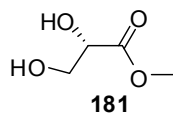
Fmoc-Thr-OH (**176**) (1,67 g, 4,897 mmol, 1 eq) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und mit Ethyldiisopropylamin (3,41 mL, 19,52 mmol, 4 eq) versetzt. Dann wurde TIPSOTf (3 g, 9,794 mmol, 2 eq) langsam zutropft. Die resultierende Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde sie mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung angesäuert. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase erneut mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde an Silicagel gereinigt (CH : EA = 4 : 1 + 1 % Ameisensäure) (V : V), um 670 mg (1,35 mmol, 27 %) des erwünschten Produkts **177** zu erhalten; R_F : 0,23 (CH : EA = 4 : 1 + 1 % Ameisensäure); $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,62-7,58 (m, 2H), 7,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,65-4,56 (m, 1H), 4,46-4,33 (m, 3H), 4,26-4,21 (m, 1H), 1,37-1,24 (m, 4H), 1,18-1,05 (m, 20H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,58 MHz, MeOD) δ 168,8, 157,5, 144,1, 143,8, 141,6, 141,5, 128,0, 127,9, 127,3, 125,3, 120,2, 120,2, 68,8, 67,5, 59,0, 47,3, 27,1, 18,1, 12,5.

6.3.2 Kupplung von Fmoc-Thr(OTIPS)-OH mit D-BoroValinpinandiolester



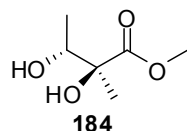
Fmoc-Thr(OTIPS)-OH (**177**) (590 mg, 1,185 mmol, 1 eq) wurde in Dichlormethan gelöst, dann wurde HOBt (322 mg, 2,37 mmol, 2 eq), EDC*HCl (458 mg, 2,37 mmol, 2 eq) und Ethyldiisopropylamin (1,25 mL, 7,11 mmol, 6 eq) zugegeben. Der Kolben wurde kurz geschwenkt, woraufhin D-BoroValinpinandiolester (**178**) (341 mg, 1,185 mmol, 1 eq) hinzugefügt wurde. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und anschließend mit gesättigter Kaliumhydrogensulfat- und Natriumhydrogencarbonatlösung je 2x gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde an Silicagel gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat = 20 : 1 nach 9 : 1) (V : V), um 305 mg (0,417 mmol, 35 %) des erwünschten Produkts **179** zu erhalten; R_F : 0,58 (CH : EA = 4 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 7,75 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,63-7,79 (m, 2H), 7,41-7,36 (m, 2H), 7,32-7,27 (m, 2H), 7,03-6,96 (m, 1H), 4,49-4,34 (m, 2H), 4,31 (dd, $J = 8,9, 2,1$ Hz, 1H), 4,29-4,26 (m, 1H), 4,25-4,18 (m, 1H), 3,41 (dd, $J = 7,2, 5,2$ Hz, 1H), 2,38-2,28 (m, 1H), 2,24-2,15 (m, 1H), 2,09-1,97 (m, 1H), 1,94-1,87 (m, 1H), 1,84 (d, $J = 14,5$ Hz, 1H), 1,65-1,57 (m, 1H), 1,38 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,28-1,24 (m, 2H), 1,21-1,08 (m, 24H), 1,02-0,96 (m, 6H), 0,84 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,58 MHz, CDCl_3) δ 169,2, 156,2, 144,0, 141,5, 129,0, 127,2, 125,4, 125,2, 120,4, 120,2, 120,1, 109,6, 86,4, 85,3, 78,3, 77,4, 68,6, 51,5, 47,4, 39,7, 38,4, 35,6, 30,6, 28,9, 26,7, 24,2, 20,6, 20,3, 18,3, 14,4, 12,4.

6.3.3 Spaltung des Acetonids in (*S*)-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolan-4-carbonsäuremethylester



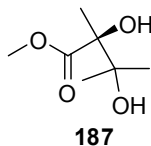
(*S*)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbonsäuremethylester (**180**) (50 mg, 0,312 mmol, 1 eq) wurde in Trifluorethanol (1 mL), Wasser (1 mL) und Acetonitril (2 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet, um 37 mg (0,312 mmol, >98 %) des erwünschten Produkts **181** ohne weitere Aufreinigung zu erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 6,09 (s, 2H), 4,35 (t, $J = 3,7$ Hz, 1H), 3,98-3,87 (m, 2H), 3,79 (s, 3H).

6.3.4 Synthese von (*2S,3R*)-2,3-Dihydroxy-2-methylbutansäuremethylester (**184**)



Tiglin säuremethylester (**183**) (600 mg, 5,26 mmol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus Wasser (20 mL) und *t*-Butanol (20 mL) gelöst. Diese Lösung wurde auf 4 °C abgekühlt, und es wurde AD-mix- β (7,4 g) zugegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde bei 4 °C für 24 h gerührt. Nachfolgend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Natriummetabisulfit (12 g) abgebrochen. Die Phasen wurden nach einer Stunde getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat = 1 : 1) (V : V), um 594 mg (4,01 mmol, 76 %) des erwünschten Diols **184** zu erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 3,94 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 3,04 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,58 MHz, CDCl_3) δ 176,7, 71,6, 53,0, 21,7, 16,6.

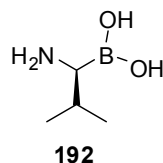
6.3.5 Synthese von (S)-2,3-Dihydroxy-2,3-dimethylbutansäuremethylester (**187**)



2-(Diethylphosphono)propansäuremethylester (**185**) (5 g, 22,3 mmol, 1 eq) wurde in Aceton (30 mL) und Acetonitril (5 mL) gelöst. Es wurden Lithiumchlorid (1,89 g, 44,6 mmol, 2 eq) und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (4,22 mL, 4,304 g, 1,25 eq) hinzugefügt und die Reaktionsmischung für zwei Tage gerührt. Aceton wurde unter vermindertem Druck vorsichtig destillativ weitgehend entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in Diethylether aufgenommen und mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel vorsichtig unter vermindertem Druck destillativ entfernt, um 2,618 g einer farblosen Flüssigkeit **186** zu erhalten, die ohne weitere Aufreinigung direkt umgesetzt wurde.

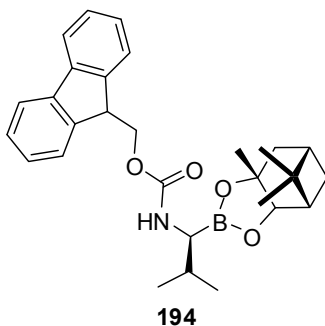
Das Rohprodukt **186** (2,618 g, 20,43 mmol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus Wasser (80 mL) und ^tButanol (8 mL) gelöst. Diese Lösung wurde auf 4 °C abgekühlt, und es wurde AD-mix-β (28,6 g) zugegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde bei 4 °C für zwei Tage gerührt. Nachfolgend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Natriummetabisulfit (47 g) abgebrochen. Die Phasen wurden nach einer Stunde getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat = 6 : 1 nach 1 : 1) (V : V), um 1,486 g (9,16 mmol, 41 %) des erwünschten Diols **187** über zwei Stufen zu erhalten; R_F : 0,37 (CH : EA = 1 : 1) ¹H-NMR (399,99 MHz, CDCl₃) δ 3,81 (s, 3H), 1,41 (s, 3H), 1,26 (s, 3H), 1,20 (s, 3H); ¹³C-NMR (100,58 MHz, CDCl₃) δ 176,0, 79,0, 73,9, 62,3, 24,6, 24,5, 20,4, 14,1.

6.3.6 Spaltung des Boronsäureesters von D-BoroValinpinandiolester



D-BoroValinpinandiolester (**178**) (100 mg, 0,35 mmol, 1 eq) wurde in einem Zweiphasensystem aus schwach HCl-saurer wässriger Lösung (pH 3) und Cyclohexan gelöst. Phenylboronsäure (43 mg, 0,35 mmol, 1 eq) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Cyclohexan gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und im Hochvakuum getrocknet, um 54 mg (0,35 mmol, >98 %) des erwünschten Produkts **192** zu erhalten; LC-MS (ESI): t_R 1,82 Min., m/z 118,41 $[M+H]^+$, 118,10 berechnet für $C_4H_{13}BNO_2^+$; 1H -NMR (399,99 MHz, MeOD) δ 2,61 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H), 2,09-1,95 (m, 1H), 0,96 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H), 0,94 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H).

6.3.7 Synthese von Fmoc-D-BoroValinpinandiolester (**194**)

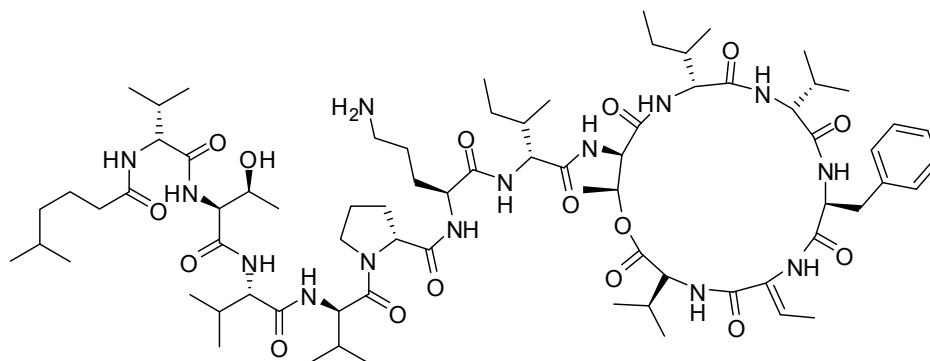


D-BoroValinpinandiolester (**178**) (400 mg, 1,39 mmol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus Wasser und Dioxan gelöst. Die Lösung wurde durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat (467 mg, 5,56 mmol, 4 eq) basisch gemacht. Dazu wurde 9-Fluorenylmethyl-*N*-succinimidylcarbonat (670 mg, 2,086 mmol, 1,5 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Danach wurde Ethylacetat zugefügt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde sowohl sauer mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung als auch basisch mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck destillativ

entfernt. Das Rohprodukt wurde an Silicagel gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat = 9 : 1) (V : V), um 391 mg (0,82 mmol, 59 %) des erwünschten Produkts **194** zu erhalten; R_F : 0,58 (CH : EA = 4 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,64-7,59 (m, 2H), 7,42-7,37 (m, 2H), 7,34-7,29 (m, 2H), 4,41 (dd, $J = 10,6, 7,4$ Hz, 1H), 4,37-4,30 (m, 2H), 4,28-4,21 (m, 1H), 3,29-3,17 (m, 1H), 2,42-2,29 (m, 1H), 2,28-2,17 (m, 1H), 2,10-2,05 (m, 1H), 2,04-1,97 (m, 1H), 1,95-1,90 (m, 1H), 1,90-1,83 (m, 1H), 1,41 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,20 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 0,97 (dd, $J = 6,7, 4,6$ Hz, 6H), 0,85 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,58 MHz, CDCl_3) δ 157,0, 144,1, 141,3, 127,6, 127,0, 125,2, 119,9, 86,4, 78,2, 66,7, 51,2, 47,4, 39,5, 38,2, 35,5, 30,6, 28,7, 27,1, 26,5, 20,0, 19,8, 14,2.

6.4 Kahalalide F und die Rhodaminsonde von Kahalalide F

6.4.1 Synthese von Kahalalide F (132)



132

Zu Chlorotriethylchloridharz (500 mg, 0,8 mmol, 1 eq) wurde eine Lösung aus Fmoc-D-Val-OH (326 mg, 0,96 mmol, 1,2 eq) und Ethyldiisopropylamin (2,29 mL, 6,4 mmol, 8 eq) in trockenem Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit Dimethylformamid (5x1 Min.) gewaschen. Nachfolgend wurde es mit einer Mischung aus Dichlormethan, Methanol und Ethyldiisopropylamin (17:2:1) für 15 Min. behandelt. Dann wurde das Harz mit Dichlormethan (1x1 Min.) gewaschen und der vorherige Schritt wiederholt. Danach wurde es mit Dimethylformamid (3x1 Min.), alternierend mit Methanol (3x1 Min.) und Dichlormethan (3x1 Min.) und abschließend mit Dichlormethan (3x1 Min.) gewaschen. Es wurde zum Schluss gründlich am Hochvakuum getrocknet.

Als nächstes wurde die Beladung des Harzes analog zu Kapitel 6.2.8 bestimmt. Die Beladung betrug 0,67 mmol/g.

Ein Teil des Harzes (300 mg, 0,201 mmol, 1 eq) wurde im nächsten Schritt mit Piperidin (20 %) in Dimethylformamid (2x15 Min.) behandelt. Dazwischen wurde das Harz mit Dimethylformamid (1x1 Min.) gewaschen. Danach wurde es ebenfalls mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Eine Lösung aus Fmoc-D-*allo*-IleOH (284 mg, 0,804 mmol, 4 eq), HBTU (267 mg, 0,704 mmol, 3,5 eq), HOBt (111 mg, 0,804 mmol, 4 eq) und Ethyldiisopropylamin (106 μ L, 0,603 mmol, 3 eq) in Dichlormethan wurde hergestellt und zu dem Harz gegeben. Dann wurde das Harz 2 h geschüttelt. Zum Abschluss des ersten Kupplungszyklus wurde es mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Dieser Zyklus, der aus der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und der Kupplung der folgenden Aminosäure bestand, wurde für die Aminosäuren Fmoc-D-*allo*-Thr-OH (274 mg, 0,804 mmol, 4 eq) und

Fmoc-D-*allo*-Ile-OH (284 mg, 0,804 mmol, 4 eq) inklusive aller vorher beschriebenen Waschschrte wiederholt.

Als nchstes wurde das Harz fr 24 h mit einer Lsung aus Alloc-Val-OH (0,95 mg, 2,01 mmol, 10 eq), Diisopropylcarbodiimid (311 μ L, 2,01 mmol, 10 eq) und Dimethylaminopyridin (25 mg, 0,201 mmol, 1 eq) in einer Mischung aus Dichlormethan (90 %) und Dimethylformamid (10 %) behandelt. Danach wurde es mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Es folgten weitere Kupplungszyklen mit Fmoc-Orn(Boc)-OH (365 mg, 0,804 mmol, 4 eq), Fmoc-D-Pro-OH (271 mg, 0,804 mmol, 4 eq), Fmoc-D-Val-OH (273 mg, 0,804 mmol, 4 eq), Fmoc-Thr(O^tBu)-OH (320 mg, 0,804 mmol, 4 eq), Fmoc-D-Val-OH (273 mg, 0,804 mmol, 4 eq) und 5-Methylhexylsre (115 μ L, 0,804 mmol, 4 eq). Bei der letzten Kupplung wurde auf die Zugabe von HOBt verzichtet.

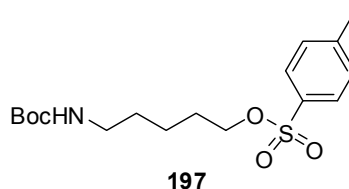
Das Harz wurde nachfolgend zusstzlich mit Methanol (2x1 Min.), abwechselnd mit Methanol und Dichlormethan (jeweils 2x1 Min.), Dimethylformamid (5x1 Min.), *N*-Methyl-2-pyrrolidon (5x1 Min.), Dichlormethan (2x1 Min.) und Diethylether (2x1 Min.) gewaschen und ber Nacht am Hochvakuum getrocknet, um es fr die Alloc-Entschtzung vorzubereiten. Danach wurde es im Hochvakuum mittels eines Ultraschallbades fr 15 Min. entgast. Als nchstes wurde es mit entgastem Dichlormethan (3x2 Min.) gewaschen. Whrend der Waschschrte wurde Argon durch die Lsung geleitet. Dann wurde Morpholin (422 μ L, 4,824 mmol, 24 eq) in entgastem Dichlormethan zugegeben und wieder wurde fr zwei Minuten Argon durch die Suspension geleitet. Pd(PPh₃)₄ (58 mg, 0,0503 mmol, 0,25 eq) wurde in entgastem Dichlormethan gelst und der Harzsuspension zugefgt. Erneut wurde Argon fr zwei Minuten durch die Reaktionsmischung geleitet, die daraufhin fr 30 Min. vorsichtig geschttelt wurde. Als nchstes wurde das Harz mit Dichlormethan (3x1 Min.), *N*-Methyl-2-pyrrolidon (3x1 Min.) und Dichlormethan (4x1 Min.) gewaschen. Diese Schritte wurden anschlieend wiederholt, gefolgt von Waschschrten mit Dichlormethan (3x1 Min.), *N*-Methyl-2-pyrrolidon (3x1 Min.), einer Lsung von Natriumdiethyldithiocarbamat (0,02 M) in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (3x5 Min.), *N*-Methyl-2-pyrrolidon (5x1 Min.) und Dimethylformamid (2x1 Min.). Das Harz wurde nun mit einer Lsung von Fmoc-Thr-OH (0,804 mmol, 4 eq), HBTU (267 mg, 0,704 mmol, 3,5 eq), HOBt (111 mg, 0,804 mmol, 4 eq) und Ethyldiisopropylamin (106 μ L, 0,603 mmol, 3 eq) in Dichlormethan fr zwei Stunden behandelt. Es wurde nachfolgend mit Dimethylformamid (6x1 Min.) gewaschen. Als nchstes folgten eine Fmoc-Abspaltung und eine Kupplung von Alloc-Phe-OH (200 mg, 0,804 mmol, 4 eq), wie oben beschrieben. Die sich anschlieende Alloc-Abspaltung fand analog der bereits durchgefhrten Alloc-Entschtzung mit allen Waschschrten statt.

Zum Harz wurde darauffolgend eine Mischung aus Essigsäure (20 %), Trifluorethanol (20 %) und Dichlormethan (60 %) gegeben. Die resultierende Suspension wurde für 2 h geschüttelt. Die Lösung wurde abfiltriert und das Harz mit Dichlormethan (3x1 Min.) gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und anschließend mit Cyclohexan coevaporiert und im Hochvakuum getrocknet, um 214 mg eines geschützten Vorläuferpeptids von Kahalalide F zu erhalten.

Ein Teil des Rohpeptids (100 mg, 0,067 mmol, 1 eq) wurde in Dichlormethan (100 mL) gelöst, und es wurden PyBOP (52 mg, 0,1005 mmol, 1,5 eq), HOBt (18 mg, 0,134 mmol, 2 eq) und Ethyldiisopropylamin (23 μ L, 0,134 mmol, 2 eq) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt, um 2,75 mg (1,86 μ mol, 2,8 %) des Naturstoffs Kahalalide F zu erhalten.

Der andere Teil des Rohpeptids wurde an Silicagel vorgereinigt, um 18 mg eines nur noch leicht verunreinigten Vorläufers zu erhalten. Ein Teil dieses Vorläuferpeptids (10 mg, 6,7 μ mol, 1 eq) wurde mit PyBOP (5,2 mg, 10,1 μ mol, 1,5 eq), HOBt (1,8 mg, 13,4 μ mol, 2 eq) und Ethyldiisopropylamin (2,3 μ L, 13,4 μ mol, 2 eq) in Dimethylformamid (7 mL) über Nacht cyclisiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu der beschriebenen Methode. Das Rohprodukt wurde ebenfalls mittels präparativer HPLC aufgereinigt, um 6 mg (4,1 μ mol, 61 %) Kahalalide F (**132**) zu erhalten. Insgesamt konnte so eine Ausbeute von 3,0 % über 18 Stufen erreicht werden; LC-MS (ESI): t_R 7,14 Min., m/z 1478,43 $[M+H]^+$, 1499,83 $[M+Na]^+$, 740,29 $[M+2H]^{2+}$, 1477,93 berechnet für $C_{75}H_{125}N_{14}O_{16}^+$.

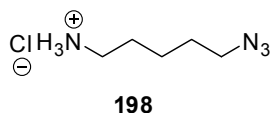
6.4.2 Tosylierung von 5-(Boc-amino)-1-pentanol



5-(Boc-amino)-1-pentanol (**196**) (500 mg, 2,46 mmol, 1 eq) und Triethylamin (0,514 mL, 3,69 mmol, 1,5 eq) wurden in Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. *p*-Toluolsulfonylchlorid (562 mg, 2,95 mmol, 1,2 eq) wurde in Dichlormethan gelöst und

langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt. Dann wurde Diethylether zugegeben und der Feststoff über Celite abfiltriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand an Silicagel aufgereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat = 9 : 1) (V : V), um 694 mg (1,94 mmol, 79 %) des erwünschten Produkts **197** zu erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, CDCl_3) δ 7,71 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,94 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,02-2,94 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,63-1,54 (m, 2H), 1,40-1,23 (m, 4H), 1,36 (s, 9H).

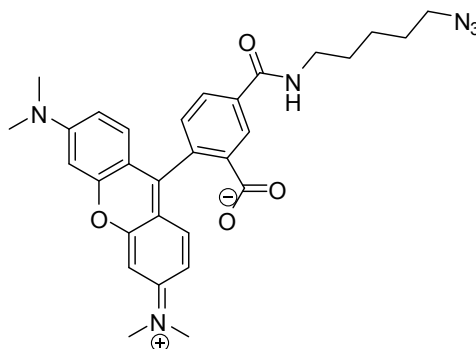
6.4.3 Synthese von 1-Azidopentanammoniumchlorid (**198**)



Das tosylierte 5-(Boc-amino)-1-pentanol **197** (674 mg, 2,96 mmol, 1 eq) wurde in Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurde Natriumazid (306 mg, 4,72 mmol, 2,5 eq) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 6 h bei 66 °C und danach bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Als nächstes wurde Wasser (20 mL) zugegeben und 30 Min. weitergerührt. Das Gemisch wurde auf Eis gegossen und mit Diethylether (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2x) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

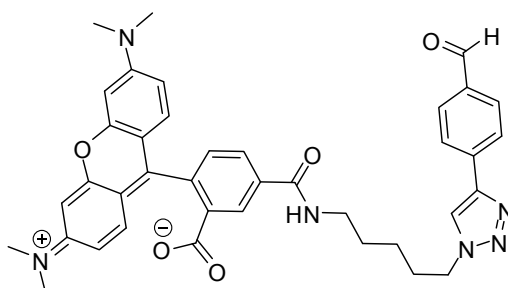
Der Rückstand wurde in einer Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan (14 mL, 4 M) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt, und abschließend das Lösungsmittel vorsichtig unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und entspricht 267 mg (1,62 mmol, 55 %) des gewünschten Produkts **198**; $^1\text{H-NMR}$ (399,99 MHz, MeOD) δ 3,34 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,94 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,75-1,59 (m, 4H), 1,54-1,43 (m, 2H).

6.4.4 Synthese von Rhodaminazid (**199**)

**199**

Rhodamin-OSu (25 mg, 0,047 mmol, 1 eq), 1-Azidopentanammoniumchlorid (**198**) (12 mg, 0,071 mmol, 1,5 eq), Ethyldiisopropylamin (40 μ L, 0,235 mmol, 5 eq) und Dimethylaminopyridin (2 mg, 0,014 mmol, 0,3 eq) wurden in Dimethylformamid gelöst und unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde danach unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Umkehrphasenchromatographie aufgereinigt (Acetonitril : Wasser = 1 : 9 nach 4 : 6) (V : V), um 17 mg (0,031 mmol, 67 %) des erwünschten Produkts **199** zu erhalten; LC-MS (ESI): t_R 6,55 Min., m/z 541,29 [M+H]⁺, 541,26 berechnet für C₃₀H₃₃N₆O₄⁺.

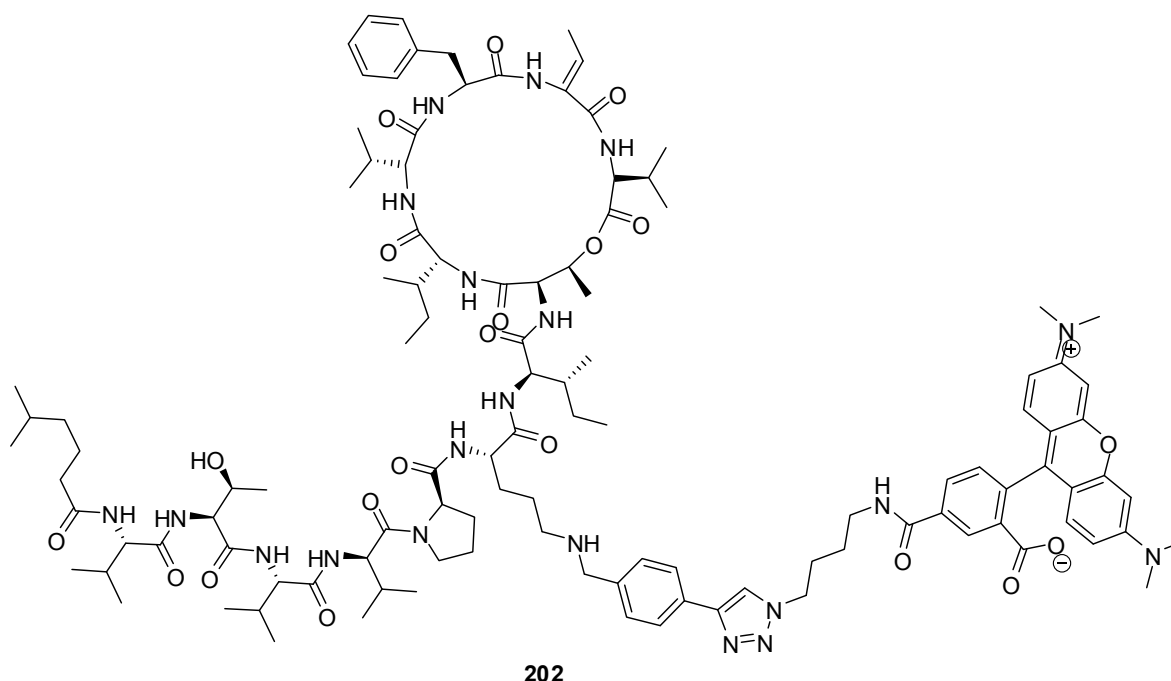
6.4.5 Click-Reaktion zwischen Rhodaminazid und 4-Ethynylbenzaldehyd

**201**

Rhodaminazid (**199**) (8 mg, 0,015 mmol, 1 eq), 4-Ethynylbenzaldehyd (**200**) (2 mg, 0,015 mmol, 1 eq), TBTA (18 μ L, 50 mM in DMSO, 0,0075 mmol, 0,5 eq), TCEP (9 μ L, 50 mM in Wasser, 0,00375 mmol, 0,25 eq) und Kupfersulfat (9 μ L, 50 mM in Wasser, 0,25 eq) wurden in Dimethylformamid (300 μ L) gelöst. Die resultierende Reaktionsmischung

wurde drei Tage bei 60 °C unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Umkehrphasenchromatographie aufgereinigt (Acetonitril : Wasser = 1 : 9 nach 5 : 5) (V : V), um 3 mg (0,0045 mmol, 30 %) des erwünschten Produkts **201** zu erhalten; LC-MS (ESI): t_R 6,15 Min., m/z 671,55 $[M+H]^+$, 671,30 berechnet für $C_{39}H_{39}N_6O_5^+$.

6.4.6 Synthese der Rhodaminsonde **202** von Kahalalide F



Kahalalide F (**132**) (1 mg, 0,68 μ mol, 1 eq) und der Aldehyd **201** (0,9 mg, 1,35 μ mol, 2 eq) wurden in trockenem Methanol gelöst. Dann wurde Natriumtriacetoxyborhydrid (0,3 mg, 1,35 mmol, 2 eq) zugegeben. Da die Reaktion sehr langsam verlief, wurde über sechs Wochen regelmäßig das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und durch frisches trockenes Methanol ersetzt, gefolgt von der Zugabe kleiner Mengen Natriumtriacetoxyborhydrid. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt, um 0,2 mg (0,094 μ M, 14 %) des erwünschten Produkts **202** zu erhalten; LC-MS (ESI): t_R 7,16 Min., m/z 1061,13 $[M+2H]^{2+}$, 1074,48 $[M+Na+H]^{2+}$, 1081,20 $[M+2Na]^{2+}$, 1060,31 berechnet für $C_{113}H_{162}N_{20}O_{20}^{2+}$.

7. Literatur

- [1] H. Waldmann, P. Janning, *Chemical Biology: Learning through Case Studies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [2] R. Reents, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* **2004**, *43*, 2711.
- [3] N. Sin, K. B. Kim, M. Elofsson, L. H. Meng, H. Auth, B. H. B. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283.
- [4] P. Hauske, M. Meltzer, C. Ottmann, T. Krojer, T. Clausen, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2920.
- [5] R. L. Stein, D. A. Trainor, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5414.
- [6] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. M. Overall, C. Lopez-Otin, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544.
- [7] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D343.
- [8] A. J. Barrett, J. K. McDonald, *Biochem. J.* **1986**, *237*, 935.
- [9] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes 2nd edn.*, Academic, Amsterdam, **2004**.
- [10] J. Tyedmers, A. Mogk, B. Bukau, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 777.
- [11] X. Li, B. Wang, L. Feng, H. Kang, Y. Qi, J. Wang, Y. Shi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14837.
- [12] D. Chen, L. Lei, C. Lu, R. Flores, M. P. DeLisa, T. C. Roberts, F. E. Romesberg, G. Zhong, *Microbiology* **2010**, *156*, 3031.
- [13] M. Merdanovic, T. Clausen, M. Kaiser, R. Huber, M. Ehrmann, *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 149.
- [14] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 395.
- [15] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.
- [16] T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 443.
- [17] C. Nourry, S. G. N. Grant, J.-P. Borg, *Sci. STKE* **2003**, *2003*, re7.
- [18] T. Krojer, J. Sawa, R. Huber, T. Clausen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 844.
- [19] H. Hasselblatt, R. Kurzbauer, C. Wilken, T. Krojer, J. Sawa, J. Kurt, R. Kirk, S. Hasenbein, M. Ehrmann, T. Clausen, *Genes & Development* **2007**, *21*, 2659.
- [20] P. Hauske, N. Mamant, S. Hasenbein, S. Nickel, C. Ottmann, T. Clausen, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 980.
- [21] C. Wilken, K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann, T. Clausen, *Cell* **2004**, *117*, 483.
- [22] M. Merdanovic, N. Mamant, M. Meltzer, S. Poepsel, A. Auckenthaler, R. Melgaard, P. Hauske, L. Nagel-Steger, A. R. Clarke, M. Kaiser, R. Huber, M. Ehrmann, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 837.
- [23] T. Krojer, M. Garrido-Franco, R. Huber, M. Ehrmann, T. Clausen, *Nature* **2002**, *416*, 455.
- [24] S. Hasenbein, M. Meltzer, P. Hauske, M. Kaiser, R. Huber, T. Clausen, M. Ehrmann, *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 957.
- [25] T. Krojer, J. Sawa, E. Schafer, H. R. Saibil, M. Ehrmann, T. Clausen, *Nature* **2008**, *453*, 885.
- [26] J. M. Milner, A. Patel, A. D. Rowan, *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 3644.
- [27] S. I. Hu, M. Carozza, M. Klein, P. Nantermet, D. Luk, R. M. Crowl, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34406.
- [28] J. Chien, M. Campioni, V. Shridhar, A. Baldi, *Curr. Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 451.

- [29] K. Hara, A. Shiga, T. Fukutake, H. Nozaki, A. Miyashita, A. Yokoseki, H. Kawata, A. Koyama, K. Arima, T. Takahashi, M. Ikeda, H. Shiota, M. Tamura, Y. Shimoe, M. Hirayama, T. Arisato, S. Yanagawa, A. Tanaka, I. Nakano, S. Ikeda, Y. Yoshida, T. Yamamoto, T. Ikeuchi, R. Kuwano, M. Nishizawa, S. Tsuji, O. Onodera, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1729.
- [30] H. R. Coleman, C. C. Chan, F. L. Ferris, 3rd, E. Y. Chew, *Lancet* **2008**, *372*, 1835.
- [31] S. Grau, A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. A. Jones, V. Shridhar, T. Clausen, M. Ehrmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 6021.
- [32] K. R. Silber, K. C. Keiler, R. T. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 295.
- [33] K. D. Beebe, J. Shin, J. Peng, C. Chaudhury, J. Khera, D. Pei, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3149.
- [34] I. Jorgensen, M. M. Bednar, V. Amin, B. K. Davis, J. P. Ting, D. G. McCafferty, R. H. Valdivia, *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 21.
- [35] G. Zhong, *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 467.
- [36] Z. Huang, Y. Feng, D. Chen, X. Wu, S. Huang, X. Wang, X. Xiao, W. Li, N. Huang, L. Gu, G. Zhong, J. Chai, *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 529.
- [37] G. Zhong, P. Fan, H. Ji, F. Dong, Y. Huang, *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, 935.
- [38] F. Dong, H. Su, Y. Huang, Y. Zhong, G. Zhong, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 3863.
- [39] A. L. Chen, K. A. Johnson, J. K. Lee, C. Sutterlin, M. Tan, *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002842.
- [40] S. Hou, L. Lei, Z. Yang, M. Qi, Q. Liu, G. Zhong, *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 951.
- [41] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [42] Z. Fang, C. Grutter, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 58.
- [43] M. Merdanovic, T. Mönig, M. Ehrmann, M. Kaiser, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 19.
- [44] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, de Gruyter, Berlin New York, **2002**.
- [45] P. Hunter, *Embo Rep.* **2009**, *10*, 125.
- [46] K. A. Koehler, G. E. Lienhard, *Biochemistry* **1971**, *10*, 2477.
- [47] J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 769.
- [48] J. Myung, K. B. Kim, C. M. Crews, *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245.
- [49] T. A. Steitz, Henderso.R, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **1969**, *46*, 337.
- [50] C. G. Binnie, S. T. Lord, *Blood* **1993**, *81*, 3186.
- [51] C. Kettner, L. Mersinger, R. Knabb, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18289.
- [52] J. Wityak, R. A. Earl, M. M. Abelman, Y. B. Bethel, B. N. Fisher, G. S. Kauffman, C. A. Kettner, P. Ma, J. L. Mcmillan, L. J. Mersinger, J. Pesti, M. E. Pierce, F. W. Rankin, R. J. Chorvat, P. N. Confalone, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3717.
- [53] B. Leiting, K. D. Pryor, J. K. Wu, F. Marsilio, R. A. Patel, C. S. Craik, J. A. Ellman, R. T. Cummings, N. A. Thornberry, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 525.
- [54] T. W. von Geldern, J. M. Trevillyan, *Drug Develop. Res.* **2006**, *67*, 627.
- [55] S. J. Coutts, T. A. Kelly, R. J. Snow, C. A. Kennedy, R. W. Barton, J. Adams, D. A. Krolikowski, D. M. Freeman, S. J. Campbell, J. F. Ksiazek, W. W. Bachovchin, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2087.
- [56] R. C. Gardner, S. J. Assinder, G. Christie, G. G. F. Mason, R. Markwell, H. Wadsworth, M. McLaughlin, R. King, M. C. Chabot-Fletcher, J. J. Breton, D. Allsop, A. J. Rivett, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 447.
- [57] M. Rechsteiner, L. Hoffman, W. Dubiel, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6065.
- [58] E. Genin, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 232.
- [59] J. Adams, *Cancer Cell* **2004**, *5*, 417.
- [60] R. Z. Orlowski, D. J. Kuhn, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649.

- [61] J. Adams, M. Behnke, S. W. 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.
- [62] J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 395.
- [63] S. M. Drawz, R. A. Bonomo, *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160.
- [64] J. M. Thomson, F. Prati, C. R. Bethel, R. A. Bonomo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1577.
- [65] S. Ness, R. Martin, A. M. Kindler, M. Paetzel, M. Gold, S. E. Jensen, J. B. Jones, N. C. J. Strynadka, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5312.
- [66] F. Morandi, E. Caselli, S. Morandi, P. J. Focia, J. Blazquez, B. K. Shoichet, F. Prati, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 685.
- [67] J. Goubeau, K. H. Rohwedder, *Liebigs Ann. Chem.* **1957**, *604*, 168.
- [68] D. S. Matteson, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5004.
- [69] D. J. Pasto, R. Snyder, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2773.
- [70] D. S. Matteson, R. W. H. Mah, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2599.
- [71] D. S. Matteson, J. D. Liedtke, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1924.
- [72] D. S. Matteson, Schaumbe.Gd, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 726.
- [73] D. J. Pasto, J. Hickman, T. C. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6259.
- [74] R. B. Castel, D. S. Matteson, *J. Organomet. Chem.* **1969**, *20*, 19.
- [75] B. A. Carlson, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6876.
- [76] D. S. Matteson, D. Majumdar, *J. Organomet. Chem.* **1980**, *184*, C41.
- [77] D. S. Matteson, R. Ray, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7590.
- [78] J. H. Brewster, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5483.
- [79] R. Ray, D. S. Matteson, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 449.
- [80] D. J. S. Tsai, D. S. Matteson, *Organometallics* **1983**, *2*, 236.
- [81] C. Elschenbroich, *Organometallchemie*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [82] K. M. Sadhu, D. S. Matteson, *Organometallics* **1985**, *4*, 1687.
- [83] G. Kobrich, H. R. Merkle, *Angew. Chem. Int. Edit. (English)* **1967**, *6*, 74.
- [84] M. W. Rathke, E. Chao, G. Wu, *J. Organomet. Chem.* **1976**, *122*, 145.
- [85] D. S. Matteson, K. M. Sadhu, M. L. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 810.
- [86] D. S. Matteson, E. Erdik, *Organometallics* **1983**, *2*, 1083.
- [87] D. S. Matteson, R. Ray, R. R. Rocks, D. J. Tsai, *Organometallics* **1983**, *2*, 1536.
- [88] M. Carmack, C. J. Kelley, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2171.
- [89] D. S. Matteson, E. C. Beedle, A. A. Kandil, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5034.
- [90] K. Ditrich, T. Bube, R. Sturmer, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Edit. (English)* **1986**, *25*, 1028.
- [91] D. S. Matteson, K. M. Sadhu, G. E. Lienhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5241.
- [92] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
- [93] M. Srebnik, P. V. Ramachandran, *Aldrichim. Acta* **1987**, *20*, 9.
- [94] D. S. Matteson, K. M. Sadhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2077.
- [95] D. S. Matteson, M. L. Peterson, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5116.
- [96] D. S. Matteson, E. C. Beedle, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4499.
- [97] T. A. Kelly, V. U. Fuchs, C. W. Perry, R. J. Snow, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1009.
- [98] G. Mann, K. D. John, R. T. Baker, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2105.
- [99] S. Touchet, F. Carreaux, B. Carboni, A. Bouillon, J. L. Boucher, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3895.
- [100] M. A. Beenen, C. H. An, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6910.
- [101] D. S. Laitar, E. Y. Tsui, J. P. Sadighi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11036.
- [102] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [103] R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Edit. (English)* **1985**, *24*, 799.
- [104] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [105] G. Breipohl, J. Knolle, W. Stuber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5651.

- [106] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- [107] K. Barlos, D. Gatos, S. Kaposos, G. Papaphotiu, W. Schafer, W. Q. Yao, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947.
- [108] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3243.
- [109] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 245.
- [110] M. A. Dorman, S. A. Noble, L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 95.
- [111] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 751.
- [112] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527.
- [113] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643.
- [114] S. Booth, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15385.
- [115] S. C. Stolze, M. Meltzer, M. Ehrmann, M. Kaiser, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1301.
- [116] M. T. Hamann, P. J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5825.
- [117] A. Lopez-Macia, J. C. Jimenez, M. Royo, E. Giralt, F. Albericio, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398.
- [118] M. Meltzer, S. Hasenbein, P. Hauske, N. Kucz, M. Merdanovic, S. Grau, A. Beil, D. Jones, T. Krojer, T. Clausen, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Angew. Chem. Int. Edit. (English)* **2008**, *47*, 1332.
- [119] M. Meltzer, Universität Duisburg-Essen (Essen), **2008**.
- [120] L. Trübestein, Universität Duisburg-Essen (Essen), **2010**.
- [121] C. A. Kettner, A. B. Shenvi, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5106.
- [122] K. D. Beebe, D. H. Pei, *Anal. Biochem.* **1998**, *263*, 51.
- [123] A. E. Radkowsky, E. M. Kosower, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4527.
- [124] B. Krishnan, A. Szymanska, L. M. Gierasch, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, *69*, 31.
- [125] C. D. Roy, H. C. Brown, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 784.
- [126] S. J. Coutts, J. Adams, D. Krolkowski, R. J. Snow, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5109.
- [127] T. Watanabe, I. Momose, M. Abe, H. Abe, R. Sawa, Y. Umezawa, D. Ikeda, Y. Takahashi, Y. Akamatsu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2343.
- [128] M. A. Becerro, G. Goetz, V. J. Paul, P. J. Scheuer, *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 2287.
- [129] A. G. Shilabin, N. Kasanah, D. E. Wedge, M. T. Hamann, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4340.
- [130] Y. Suarez, L. Gonzalez, A. Cuadrado, M. Berciano, M. Lafarga, A. Munoz, *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 863.
- [131] S. C. Stolze, M. Meltzer, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8857.
- [132] J. T. Gao, M. T. Hamann, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3208.
- [133] A. G. Shilabin, M. T. Hamann, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6628.
- [134] S. Nickel, Universität Duisburg-Essen (Essen), **2012**.
- [135] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Edit. (English)* **2001**, *40*, 2004.
- [136] D. S. Matteson, T. J. Michnick, R. D. Willett, C. D. Patterson, *Organometallics* **1989**, *8*, 726.
- [137] R. M. Dunsdon, J. R. Greening, P. S. Jones, S. Jordan, F. X. Wilson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1577.
- [138] Anonymous, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2987.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
3 Å-MS	3 Å Molekularsieb
9-BBN	Bis(9-borabicyclo[3.3.1]nonan
ABPP	<i>activity based protein profiling</i>
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AD-mix	Asymmetrische Dihydroxylierungsmischung
Ahp	3-Amino-6-hydroxy-2-piperidon
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
Alloc	Allyloxycarbonyl
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	Benzyl
Boc	t-Butyloxycarbonyl
BOP	(Benzotriazol-1- yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium- hexafluorophosphat
BTFFH	Fluoro-N,N,N',N'- bis(tetramethylen)formamidinium- hexafluorophosphat
BuLi	<i>n</i> -Buthyllithium
bzgl.	bezüglich
CH	Cyclohexan
c-Hex	Cyclohexyl
CPAF	<i>chlamydial protease like activity factor</i>

d	Dublett
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DET	Diethyltatrat
d. h.	das heißt
Dhb	α,β -Didehydro- α -aminobuttersäure
DHQ	Dihydrochinin
DHQD	Dihydrochinidin
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DICHED	1,2-Dicyclohexylethandiol
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Ethyl-diisopropylamin
DIPED	1,2-Diisopropylethandiol
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DPP	Dipeptidylprotease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Ethylacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	Ethandithiol
eq	Äquivalente
Erk	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	<i>et cetera</i>

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Htr	<i>High temperature requirement</i>
Hz	Hertz
IC	Inhibierungskonzentration
iPr	Isopropyl
K _i	Inhibierungskonstante
L2	Loop 2
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LC-MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
LHMDS	Lithiumhexamethyldisilazan
LiTMP	2,2,6,6-Lithiumtetramethylpiperidin
m	Multipllett
M	Molar
Me	Methyl
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
Min.	Minute
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
m-RNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light chain enhancer of</i>

	<i>activated B-cells</i>
nM	nanomolar
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OmcB	<i>Outer membrane complex protein B</i>
Orn	Ornithin
OSu	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
PDZ	<i>PSD95, septate junction protein discs large, tight junction protein zonula occludentes-1</i>
Ph	Phenyl
Phal	Phthalazin
pM	pikomolar
pm	Pikometer
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
Ppm	<i>parts per million</i>
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl)-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
Q	Quartett
Rab	Ras-assoziertes Protein
Ras	<i>Rat sarcoma</i> Protein
R _F	Retentionsfaktor
RFP	rotfluoreszierendes Protein
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
S	Singulett
<i>S. cerevisiae.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sar	Sarcosin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
^{sec} Bu	^{sec} Butyl
SG	Schutzgruppe
S _N 2	nucleophile Substitution 2. Ordnung
T	Triplett

TBHP	'Butylhydroperoxid
TBS, TBDMS	'Butyldimethylsilyl
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
'Bu	'Butyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilyl
TIS	Triisopropylsilan
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
TMS	Trimethylsilyl
Tos	Tosyl
Trt	Trityl
Tsp	<i>tail specific</i>
UPP	Ubiquitin-Proteasom-Proteolysesystem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolet
V	Volumen
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.^[138]

Publikationsliste

L. Trübestein, A. Tennstaedt, T. Mönig, T. Krojer, F. Canellas, M. Kaiser, T. Clausen, M. Ehrmann (2011) „Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HtrA1 activity” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 386.

S. Cottier, T. Mönig, Z. Wang, J. Svoboda, W. Boland, M. Kaiser, E. Kombrink (2011) „The yeast three-hybrid system as an experimental platform to identify proteins interacting with small signaling molecules in plant cells: potential and limitations (2011) *Front. Plant Sci.* 2, 101.

J. Weski, M. Meltzer, L. Spaan, T. Mönig, J. Oeljeklaus, P. Hauske, L. Vouilleme, R. Volkmer, P. Boisguerin, D. Boyd, R. Huber, M. Kaiser, M. Ehrman (2012) Chemical biology approaches reveal conserved features of a C-terminal processing PDZ protease *ChemBioChem* 13, 402.

M. Merdanovic, T. Mönig, M. Ehrmann, M. Kaiser (2013) „Diversity of allosteric regulation in proteases“ *ACS Chem. Biol.* 8, 19.

C. Meesters, T. Mönig, J. Oeljeklaus, D. Krahn, C. S. Westfall, B. Hause, J. M. Jez, M. Kaiser, E. Kombrink „A selective inhibitor of jasmonate signaling targets the adenylate-forming enzyme JAR1 in *Arabidopsis thaliana*” (submitted)

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes
nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Synthese von Boronsäurederivaten als Modulatoren für Proteasen“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Februar 2014

- Timon Mönig -

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die Dissertation von Timon Mönig mit dem Thema „Synthese von Boronsäurederivaten als Modulatoren für Proteasen“ betreue und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, im Februar 2014

- Prof. Dr. Markus Kaiser -

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Markus Kaiser für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Weiterhin möchte ich ihm für die ständige Unterstützung bei vielen Fragen rund um die Arbeit meinen Dank aussprechen.

An zweiter Stelle bin ich Prof. Carsten Schmuck für die Übernahme des Zweitgutachtens zu Dank verpflichtet.

Als nächstes möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaiser bedanken. Zuerst sind da Daniel Krahn und Julian Oeljeklaus. Ich möchte mich bei euch ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken. Egal welche Art von Problemen es gab, auf euch konnte ich mich immer verlassen. Weiterhin möchte ich mich bei Sabrina und Philipp Nickel für ihre Unterstützung und für all die fachliche und mentale Unterstützung in den vergangenen Jahren im Studium und während der Promotion bedanken. Ein herzliches Dankeschön für ihre Bemühungen und die gemeinsamen schönen Momente möchte ich auch an Yvonne Blass und Marija Mamic richten. Auch Susanne Zweerink, Andreas Sprengel, Jan Krahn, Sabrina Ninck, Anna Laura Schmitz, Barbara Sacca und Farnusch Kaschani möchte ich für die gute Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen. Nicht vergessen möchte ich auf alle Fälle Svenja Kernchen, die bei vielen Fragen eigentlich immer eine Antwort parat hatte oder sich schnell um eine Lösung gekümmert hat: Danke! Bei den ehemaligen Mitarbeitern Sara Stolze und Patrick Hauske möchte ich mich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit in den gemeinsamen Laborjahren bedanken.

Ein besonderer Dank zum Schluss gilt meinen Eltern, die mich in allen Situationen mit viel Kraft in den langen Jahren des Studiums und der Promotion unterstützt haben.