

Entwicklung eines Testsystems zum Screening von Glycosylierungskatalysatoren

Dissertation

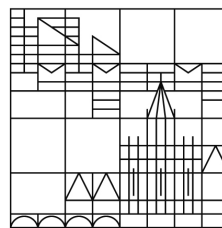
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Christian Risinger

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

Konstanz, 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2013

1. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Hartig

*Ein Mann hat eine Erfahrung gemacht, jetzt sucht er die Geschichte dazu –
man kann nicht leben mit einer Erfahrung, die ohne Geschichte bleibt,
scheint es, und manchmal stellte ich mir vor, ein anderer habe genau die
Geschichte meiner Erfahrung...*

Max Frisch

Books don't offer real escape, but they can stop a mind scratching itself raw.

David Mitchell

Vorwort

Die experimentellen und geistigen Arbeiten der vorliegenden Dissertation entstanden im Zeitraum von Juni 2005 bis Dezember 2009 im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. V. Wittmann.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. V. Wittmann für die Überlassung des spannenden Themas, die gewährte wissenschaftliche Handlungsfreiheit und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Insbesondere möchte ich mich auch für die weitere Unterstützung nach meiner Zeit in Konstanz bei der Anfertigung der Dissertation in Kopenhagen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hartig danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Durchführung der EPR-Experimente zur Aufklärung der Struktur der Kupfer-Zuckeroxazolin Komplexe möchte ich mich bei Dr. Petra Lüders, Dr. Maxim Yulikov und Prof. Dr. Gunnar Jeschke von der ETH Zürich bedanken.

Bei Dr. Silke Litzinger und PD Dr. Christoph Mayer von der Universität Konstanz (inzwischen Universität Tübingen) möchte ich mich für die sehr gute und interessante Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Glycobiologie der bakteriellen Zellwand bedanken. Dies schließt auch die After-Work-Diskussionen mit lokalen Spezialitäten aus dem Westerwald mit ein.

Ein besonderer Dank gebührt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Wittmann und Möller für wissenschaftliche Diskussionen, die tolle Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die sehr schöne gemeinsame Zeit, auch außerhalb des Labors, immer wieder gern auf Dachterrassen oder in den Bergen. Im Speziellen geht dieser Dank an Frank Sicherl, Daniel Specker, Caroline Maierhofer, Angelika Semmler, Dominik Gauss, Henning Beckmann, Magnus Schmidt (auch für CineSchmidt), Mônica Boldt, Andrea Niederwieser, sowie *last but certainly not least* an meinen langjährigen Laborkollegen Marco Worch, der mit seinem manchmal unkonventionellen Blick auf die Wissenschaft und das Leben „an und für sich“ meine Sicht der Dinge bereichert hat.

Der gesammelten Lektorenschaft Henning Beckmann, Magnus Schmidt, Andrea Niederwieser und Angelika Semmler danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Frau Anke Friemel und Prof. Dr. Heiko Möller möchte ich mich für die Unterstützung bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen und deren Interpretation bedanken. Der Arbeitsgruppe A. Meyer im Fachbereich Biologie danke ich für die Möglichkeit ihren Mikroarray-Scanner zu benutzen. Bei Herrn Michael Weiland von den Wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Konstanz bedanke ich mich für die große Unterstützung beim Bau und Design der Reaktionskammer für die Chipreaktionen.

Der Konstanzer Hip-Hop-Gruppe um Marc Hamitou und der Capoeira-Gruppe „Filhos de Angola“ um Axel Kabus danke ich für den Spaß bei außeruniversitären Aktivitäten und den nötigen sportlichen Ausgleich neben dem Dasein als Naturwissenschaftler.

Meinen Kollegen bei Glycom A/S in Kopenhagen danke ich für die freundliche Aufnahme, dem Verständnis und der Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, inklusive aller anregenden Diskussionen im Bereich der Kohlenhydratchemie. Dies gilt insbesondere für Lars Kröger, Andreas Schroven, Ignacio Figueroa Pérez, Ferenc Horvath, Christoph Röhrig, Markus Hederos, Johan Olsson, Ioannis Vrasidas, Elise Champion und meiner Laborkollegin Karin Mannerstedt.

Meinem ehemaligen Lehrer Rainer Stark danke ich für den spannenden und praxisorientierten Chemie-Unterricht, der einen entscheidenden Anteil daran hatte, die Faszination für die Welt der Moleküle bei mir zu wecken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie (*tack så mycket*), vor allem meiner Mutter Iris für die konstante Unterstützung in jeder Hinsicht und meinem Vater Gunnar für den bedingungslosen Optimismus.

Meiner Angelika danke ich für die Geduld mit dem Projekt Dissertation und die bisherige tolle gemeinsame Zeit und hoffe, dass sie noch lange anhalten wird.

Altid kun dig...

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	V
INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
1 EINLEITUNG UND KENNTNISSTAND.....	1
1.1 Glykokonjugate und deren Bedeutung	1
1.2 2-Acetamido-2-desoxyglycopyranoside	4
1.2.1 Besonderheiten bei Glycosylierungsreaktionen.....	5
1.2.2 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-glucopyranosiden.....	7
1.3 Zuckeroxazoline	12
1.3.1 Zuckeroxazolinsynthesen.....	14
1.3.2 Verwendung als Glycosyldonoren.....	17
1.3.3 Verwendung als Substrate in der enzymatischen Synthese und als Inhibitoren ..	22
1.3.4 Verwendung von Zuckeroxazolinen als Katalysatorliganden.....	25
1.4 Kohlenhydrat-Arrays.....	27
1.4.1 Aufbau von Arrays.....	27
1.4.2 Anknüpfungsmethoden und deren Chemie.....	28
1.4.3 Anwendungen von Kohlenhydratarrays	33
1.5 Murein.....	34
1.5.1 Vorkommen und Struktur	34
1.5.2 Enzymatischer Auf- und Abbau der bakteriellen Zellwand bei Bakterien	35
2 KONZEPTION UND AUFGABENSTELLUNG.....	39
2.1 Aufbau eines Chip-basierten Testsystems zur Detektion neuer Aktivatoren für den Einsatz von Zuckeroxazolinen als Glycosyldonoren	39
2.2 Untersuchungen zur Glycosylierung mit Oxazolinen als Glycosyldonoren.....	41

2.3	Strukturelle Untersuchungen eines Kupfer (II)-Zuckeroxazolinkomplexes	41
2.4	Synthese von 2-Desoxy-2-Aminozuckern als Substrate zur Untersuchung der Enzymaktivität bei bakteriellem Zellwandrecycling.....	42
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	43
3.1	Aufbau eines Chip-basierten Testsystems.....	43
3.1.1	Synthese eines zur Immobilisierung geeigneten Zuckeroxazolins.....	43
3.1.2	Chipsystem unter Verwendung der Maleinimid-Thiol-Ligation (Michael-Addition).....	50
3.1.3	Chipsystem unter Verwendung einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv).....	66
3.2	Glycosylierungen mit Oxazolinen als Glycosyldonoren	84
3.2.1	Untersuchung verschiedener Aktivatoren in Lösung.....	84
3.2.2	Untersuchung verschiedener Glycosylakzeptoren	91
3.2.3	Untersuchung weiterer Zuckeroxazoline	97
3.3	Strukturelle Untersuchungen von Zuckeroxazolinen und deren Metallkomplexen	101
3.3.1	Massenspektrometrie	101
3.3.2	IR-Spektroskopie	102
3.3.3	EPR-Spektroskopie	103
3.4	Biologische Anwendungen	120
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	127
4.1	Aufbau eines Chip-basierten Testsystems zur Detektion neuer Aktivatoren für den Einsatz von Zuckeroxazolinen als Glycosyldonoren	127
4.2	Untersuchungen zur Glycosylierung mit Oxazolinen als Glycosyldonoren	132
4.3	Strukturelle Untersuchungen eines Kupfer (II)-Zuckeroxazolinkomplexes, dem postulierten Intermediat der kupferaktivierten Oxazolinmethode.....	135
4.4	Synthese von 2-Desoxy-2-Aminozuckern als Substrate zur Untersuchung der Enzymaktivität bei bakteriellem Zellwandrecycling.....	136

5	EXPERIMENTELLER TEIL.....	137
5.1	Allgemeine Angaben.....	137
5.2	Synthesen und Experimente.....	140
5.2.1	2-Acetamido-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose (25a).....	140
5.2.2	2-Acetamido-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranose (25b).....	140
5.2.3	2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid (24).....	140
5.2.4	2-Methyl-(3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-1,2-didesoxy- α -D-glucopyrano)- [2,1- <i>d</i>]-oxazolin (4).....	141
5.2.5	<i>n</i> -Penten-4-yl-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (35).....	142
5.2.6	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (91).....	143
5.2.7	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -monomethoxy-trityl- β -D-glucopyranosid (93).....	144
5.2.8	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosid (88)....	145
5.2.9	Bernsteinsäuremonobenzylester 96.....	146
5.2.10	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -monobenzyl-succinyl- β -D- glucopyranosid (97).....	147
5.2.11	2-Methyl-(3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -monobenzylsuccinyl-1,2-didesoxy- β -D-glucopyrano)-[2,1- <i>d</i>]-oxazolin (98).....	148
5.2.12	<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (101).....	149
5.2.13	<i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N'</i> -(9'-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4,7,10-tri-oxa- 1,13-tridecandiamin (102).....	150
5.2.14	<i>N</i> -(9'-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (103).....	150
5.2.15	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(<i>p</i> -nitrophenoxy- carbonyl)- β -D-glucopyranosid (105).....	152
5.2.16	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di- <i>O</i> -acetyl-4- <i>O</i> -(<i>p</i> -nitrophenoxy- carbonyl)- β -D-glucopyranosid (109).....	153
5.2.17	<i>n</i> -Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(<i>N</i> -13'-(Fluorenylmethoxy carbonyl)-4',7',10'-trioxa-tridecancarbamoyl)- β -D-glucopyranosid (106).....	154
5.2.18	2-Methyl-(3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(<i>N</i> -13-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-4',7',10'- trioxa-tridecancarbamoyl)-1,2-didesoxy- β -D-glucopyrano)- [2,1- <i>d</i>]-oxazolin (107).....	156
5.2.19	2-Methyl-(3,4-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(4'',7'',10''-trioxa-tridecancarbamoyl)- 1,2-didesoxy- β -D-glucopyrano)-[2,1- <i>d</i>]-oxazolin (108).....	157
5.2.20	<i>N</i> -(3-Hydroxypropyl)maleinimid (111).....	158
5.2.21	Maleimidopropyl-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (112).....	159

5.2.22 Farbstoffdisulfid 119 (Produkt der Konjugation von Lissamin B Sulfonylchlorid 113 mit Cystamin 118).....	160
5.2.23 4'-Nitrorosamin B (122)	161
5.2.24 4'-Aminorosamin B (123).....	161
5.2.25 4'-Aminorosamin B - Isothiocyanat (124)	162
5.2.26 Farbstoffdisulfid 125 (Produkt der Konjugation von 4'-Aminorosamin B - Isothiocyanat 124 mit Cystamin 118)	162
5.2.27 4-Nitrophenylmaleinimidopropylcarbonat (127)	163
5.2.28 <i>N</i> -(6- <i>N'</i> -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)aminohexyl)maleinimid (130)	164
5.2.29 <i>N</i> -(6-aminohexyl)maleinimid (131)	165
5.2.30 1-(2-hydroxyethyl)-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (142)	165
5.2.31 1-Propyl-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (143).....	166
5.2.32 1-(6- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)aminohexyl)-3-(4-isothiocyanatophenyl)-thioharnstoff (144)	167
5.2.33 1-(<i>N</i> -(6-aminohexyl)maleinimid)-3-(4-isothiocyanatophenyl)-thioharnstoff (145)	168
5.2.34 <i>Cis</i> -5-Norbornen- <i>exo</i> -2,3- <i>N</i> -(3-hydroxypropyl)dicarboximid oder <i>N</i> -(3-hydroxypropyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en- <i>exo</i> -2,3-dicarboximid (149).....	170
5.2.35 <i>N</i> -(3-hydroxypropyl)-norbornan- <i>exo</i> -2,3-dicarboximid (159).....	171
5.2.36 (<i>N</i> -(3-hydroxypropyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en- <i>exo</i> -2,3-dicarboximidyl)-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (150)	172
5.2.37 <i>N</i> -(13-amino-4,7,10-trioxatridecanyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en- <i>exo</i> -2,3-dicarboximid (157).....	173
5.2.38 <i>N</i> -6-Aminohexyl-Lissamin B Sulfonamid (152a)	174
5.2.39 Lissamin B – Tetrazinkonjugat 154	175
5.2.40 DARinv-Ligationsprodukt des Tetrazins 154 mit dem Norbornenglycosid 150 (155)	177
5.2.41 Pyridazin nach Oxidation des Ligationsprodukts 155 (156).....	178
5.2.42 2-Methyl-(3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-1,2-didesoxy- α -D-galactopyrano)-[2,1-d]-oxazolin (176)	179
5.2.43 Cyclohexyl-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (55) ^[89]	179
5.2.44 6- <i>O</i> -(2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropyliden- α -D-galactopyranose ^[244,245] (47)	181
5.2.45 Benzyl-2,3-di- <i>O</i> -benzyl- β -D-glucopyranosid (172)	182
5.2.46 Benzyl-6- <i>O</i> -(2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2,3-di- <i>O</i> -benzyl- β -D-glucopyranosid (173)	183

5.2.47 Cyclohexyl-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β-D-galactopyranosid (179)	184
5.2.48 6- <i>O</i> -(2-Acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-β-D-galactopyranosyl)- 1,2:3,4-di- <i>O</i> -isopropyliden-α-D-galactopyranose (180)	185
5.2.49 Fmoc-Ser-OAll (175)	186
5.2.50 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- β-D-glucopyranosid (194)	187
5.2.51 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (184)	188
5.2.52 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -Benzyliden- β-D-glucopyranosid (195) ^[248]	189
5.2.53 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -Benzyliden- 3- <i>O</i> -[(1 <i>R</i>)-1-(ethoxycarbonyl)ethyl]-β-D-glucopyranosid (197)	190
5.2.54 1,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β-D-glucopyranosid (188)	191
5.2.55 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β-D-glucopyranose (189)	191
5.2.56 3,4,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α-D-glucopyranosetrichloracetimidat (190)	192
5.2.57 4-Methylumbelliferyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxy- carbonylamino)-β-D-glucopyranosid (191)	192
5.2.58 4-Methylumbelliferyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-amino-2-desoxy- β-D-glucopyranosid (192)	194
5.2.59 4-Methylumbelliferyl-2-amino-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (193)	195
5.3 Arrayexperimente	197
5.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen	197
5.3.2 Experimente mit Aminoslides	198
5.3.3 Experimente mit PDITC-Slides	198
6 LITERATURVERZEICHNIS	203
7 ANHANG	217

Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
aq.	wässrig
äq.	Äquivalente
Ar	Aryl
aromat.	aromatisch
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Å	Ångström
B ₀	äußeres Magnetfeld
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Box	Bisoxazolin
br. s	breites Singulett
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa

CAN	Cer(IV)ammoniumnitrat
Cbz	siehe Z
CD	circular dichroism
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxymizsäure
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> , Korrelationspektroskopie
CSA	<i>camphorsulfonic acid</i> , Campher-10-sulfonsäure
cw	continuous wave
d	Dublett
d	Tage
dd	Doppeldublett
ddd	doppeltes Doppeldublett
D/A	Donor / Akzeptor - Verhältnis
mDAP	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
DARinv	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf
DBU	1,5-Diazabicyclo[5.4.0]-5-undecen
DC	Dünnschichtchromatographie / -chromatogramm
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-Dicyanbenzochinon
dest.	destilliert
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMC	2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMM	Dimethylmaleoyl

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, sechsfach deuteriert
DMTST	Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dts	Dithiasuccinat
E. coli	Escherichia coli
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> '-(dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
Endo A	Endohexaminase von <i>Arthrobacter protophormiae</i>
Endo M	Endohexaminase von <i>Mucor hiemalis</i>
ENDOR	electron nuclear double resonance
EPR	electron paramagnetic resonance, Elektronenspinresonanz
eq	Äquivalente
ESEEM	electron spin echo envelope modulation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
Et ₃ SiOTf	Trifluormethansulfonsäure-triethylsilylester
FC	Flash-Chromatographie
FI	Fluoreszenzintensität
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Gal	D-Galactose
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
Glucobox	2'',2''-Bis-{4',5'-(3,4,6-tri-O-acetyl-1,2-dideoxy-)-D-gluco- pyranosido-[2',1'-d]-oxazolin-2'-yl}-propan

h	Stunde
HF	Hyperfeinaufspaltung
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSAB	hard-soft acid-base
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
HYSCORE	hyperfine sub-level correlation
Hz	Hertz
IDCP	Iodonium-di- <i>syn</i> -collidinperchlorid
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
konz.	Konzentriert
Lys	Lysin
m	Masse
m	Multipllett
M	molar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
Man	D-Mannose
MARCO	multifunctional array reaction chamber for oxazolines
Me	Methyl
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
mmol	Millimol
Mmt	Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure

N	normal
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , Kern-Overhauser-Effekt
Nr.	Nummer
Nu	Nucleophil
org.	organisch
<i>p</i>	para
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
PE	Petrolether
PFPA	<i>pentafluoropropionic acid</i> , Pentafluorpropionsäure
Ph	Phenyl
Phth	Phthalimid
PMT	<i>photomultiplier tube</i> , Photoelektronenvervielfacher
ppm	<i>parts per million</i> , Millionstel
PPTS	<i>para</i> -Pyridiniumtoluolsulfonat
Pr	Propyl
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
pyr	Pyridin
pyOTf	Pyridiniumtriflat
q	quartär
q	Quartett
quint	Quintett
R _f	Retentionsfaktor

Rfl.	Rückfluss
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Smp.	Schmelzpunkt
T	Temperatur
t	Triplett
TCEP	Tris-2-carboxyethylphosphin
TCP	Tetrachlorphthalimid
TES	Triethylsilyl
TESOTf	Trifluormethansulfonsäure-triethylsilylester
THF	Tetrahydrofuran
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i> , Trifluoressigsäure
Tf	Trifluormethansulfonyl
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeit
Troc	Trichloroethoxycarbonyl
t_R	Retentionszeit
Trt	Trityl
Ts	Tosyl
UV	ultraviolett

Z	Benzyloxycarbonyl
z.B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung
μ_B	Bohrsches Magneton
μL	Mikroliter

1 Einleitung und Kenntnisstand

1.1 Glykokonjugate und deren Bedeutung

Kohlenhydrate sind die häufigsten Biomoleküle der Erde.^[1] Sie stellen neben Proteinen und Nucleinsäuren die dritte große Klasse von Biopolymeren dar. Durch die Photosynthese werden alljährlich über 100 Mrd. Tonnen CO₂ und H₂O zu Cellulose und anderen pflanzlichen Produkten umgesetzt. Zucker und Stärke zählen in weiten Teilen der Welt zu den Hauptbestandteilen der Grundnahrungsmittel. Bei photosynthetisch nicht aktiven Zellen, wie z.B. bei tierischen, ist die Oxidation von Kohlenhydraten die wichtigste Quelle der Energiegewinnung. Darüber hinaus dienen sie als leicht zugängliche Kohlenstoff-Reserve für den höheren Organismus als Edukte zur Herstellung von Verbindungen diverser Naturstoffklassen.^[2] Man findet nichtlösliche Polysaccharide als mechanisch stabile Stütz- und Gerüstbestandteile sowohl in Zellwänden von Bakterien und Pflanzen als auch im Bindegewebe von Tieren.

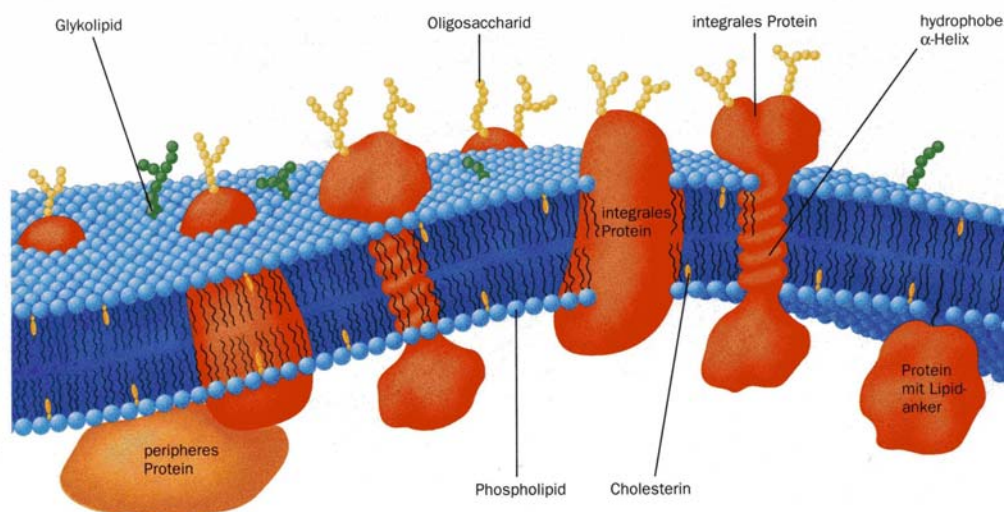


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau einer Zellmembran.^[1]

Neben diesen Funktionen als Energieträger und als Strukturmaterial wurde erst in den letzten vierzig Jahren erkannt, dass Kohlenhydrate auch als Überträger von biologischen Informationen dienen können. In den meisten dieser Fälle sind die Informationen codierenden Oligosaccharide kovalent an ein Protein (Glycoprotein) oder ein Lipid (Glycolipid) gebunden. Diese Glykokonjugate finden sich oft als Membranbestandteile. Proteine aller Lebewesen sind in der Regel auf eine Vielzahl verschiedener Arten

modifiziert. Die Glycosylierung stellt dabei einen der komplexesten Typen dar.^[3-5] Bereits die große Anzahl an unterschiedlichen Zuckern, die direkt mit dem Protein entweder *N*-glycosidisch über den Aminosäurerest Asparagin oder *O*-glycosidisch über die Hydroxyaminosäurereste Threonin, Serin, Hydroxyprolin und Tyrosin kovalent verknüpft sind, verdeutlicht diese Komplexität. Darüber hinaus können die an diesen Zuckern anschließenden Oligosaccharidketten unterschiedlichster Zusammensetzung mehr oder weniger verzweigt sein und sich erheblich in ihrer Länge unterscheiden. Anders als z.B. im Falle der Phosphorylierungen blieb die Funktion derartiger Glycosylierungen lange Zeit unbekannt. Bei *N*-Glycoproteinen findet man neben der stets 1,2-*trans*-*N*-glycosidischen Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) an die amidische Seitenkette von Asparagin eine gemeinsame Grundstruktur, die sogenannte Core-Struktur (Abb. 1.2).

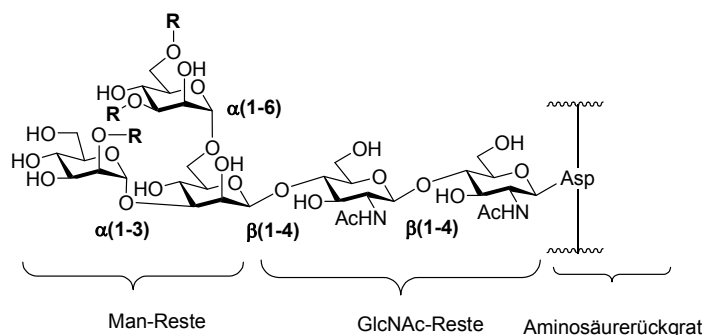


Abb. 1.2: Gemeinsame Core-Struktur von *N*-Glycoproteinen.

Bei Zellen von Säugetieren stellen die Glycokonjugate sogar einen Hauptmembranbestandteil dar und sind für jeden Zelltyp charakteristisch. Der Kohlenhydratmantel auf der Membran verändert sich je nach Entwicklung, Differenzierung oder Zellerkrankung. Dabei dienen die Kohlenhydrate als Erkennungsstellen für einige Proteine und wirken somit als Vermittler von Zell-Zell-Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen zwischen Zelle und der extrazellulären Matrix. Dazu gehören die Aktivierung und Regulation der Immunantwort des Körpers, Zellwachstumskontrolle, die bei der Tumorbildung eine Rolle spielt, Blutgerinnung und Zellwanderung während der Entwicklung eines Organismus. Kohlenhydrate dienen auch als Erkennungsdeterminanten der unterschiedlichen Blutgruppen.^[6] Dabei unterscheiden sich die Blutgruppen durch charakteristische terminale Di- und Trisaccharide verschiedener Glycokonjugate (Abb. 1.3).

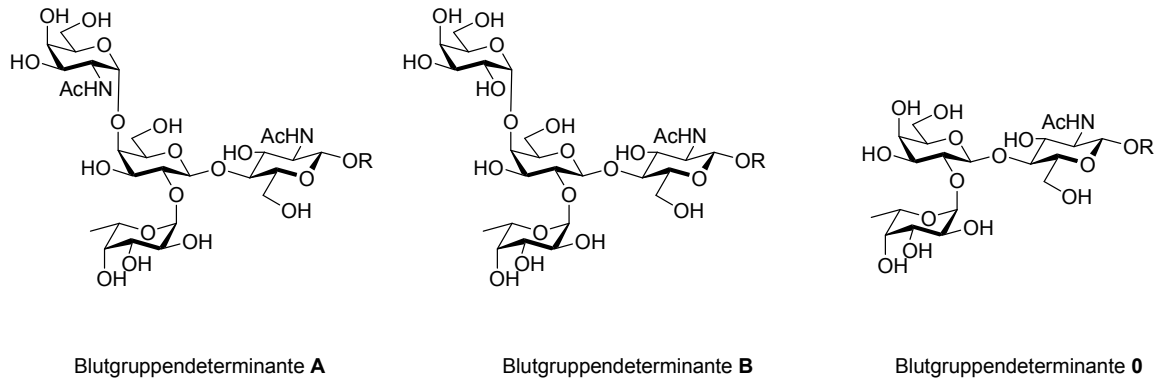


Abb. 1.3: Terminale Saccharidstruktur der Blutgruppendedeterminanten.

Untersuchungen der genauen Mechanismen, wie Kohlenhydrate im Organismus wirken, gestalten sich schwierig, was an der Komplexität und der vergleichsweise geringen Verfügbarkeit der natürlichen Glycostrukturen liegt. Der Hauptunterschied im Vergleich zu anderen Biopolymeren wie DNA oder Proteinen ist die Komplexität der Bindungen, die die einzelnen Monomereinheiten miteinander verbinden. Die glycosidische Bindung repräsentiert ein neues Stereozentrum, dessen stereoselektive Synthese eine große Herausforderung darstellt. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Glycokonjugaten in der Natur besteht ein erhebliches Interesse an Synthesemethoden^[7-10] zu ihrer Herstellung. Anders als bei der Biosynthese von Proteinen, welche direkt durch den genetischen Code bestimmt ist, wird die Struktur des Oligosaccharidteils durch verschiedene Enzyme (insbesondere Glycosyltransferasen) bestimmt. Oligosaccharide werden daher oft auch als sekundäre Genprodukte bezeichnet. Dies führt zum Vorhandensein einer Vielzahl an Varianten der Glycokonjugate mit oft sehr geringen Unterschieden. Eine Isolation einheitlicher Konjugate aus natürlichen Quellen wird durch diese sogenannte Mikroheterogenität überaus schwierig. Nach Synthese der Glycoside können diese auf ihre Bindungseigenschaften an Proteine oder RNA in Assays und damit auf ihre Wirkung hin untersucht werden, um so mehr über ihre Funktion im Organismus herausfinden zu können.

1.2 2-Acetamido-2-desoxyglycopyranoside

Glycoside der 2-Acetamido-2-desoxyzucker sind wesentlicher Bestandteil der wichtigsten Glycokonjugate und natürlich vorkommenden Oligosaccharide.^[3,4,11,12] Insbesondere die Vertreter der gluco- und galacto-Reihe sind Bestandteil vieler Glycoproteine, Glycolipide, Glycosaminoglycane und, wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, der Blutgruppenderminanten. Terminale Aminozucker auf Zelloberflächen spielen eine entscheidende Rolle als Rezeptorliganden für Proteine wie Enzyme, Lektine und Antikörper. Aminozucker sind ebenso Bestandteile wichtiger Gerüststrukturen wie z.B. Chitin oder Murein (**3**). Einige repräsentative Beispiele für solche Strukturen sind in Abb. 1.4 zu sehen.

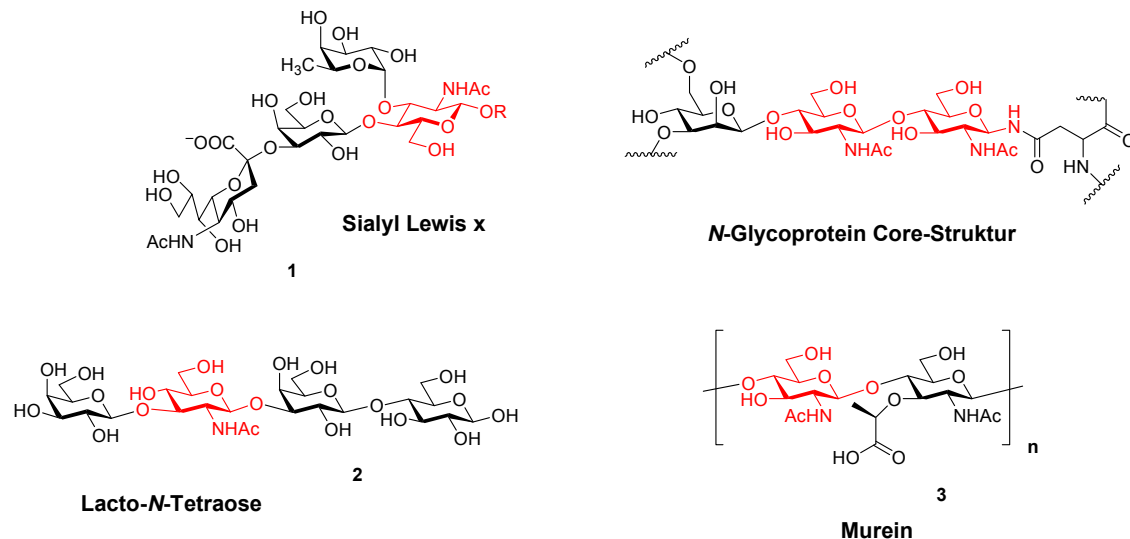


Abb. 1.4: Biologisch wichtige Glycoside mit GlcNAc (in rot markiert).

Sialyl Lewis x (**1**) ist ein Tetrasaccharid, welches sich auf der Zelloberfläche von weißen Blutkörperchen befindet und eine wichtige Rolle bei Entzündungen spielt. Es sorgt über Zell-Zell-Wechselwirkungen dafür, dass die Lymphozyten erkannt und an den Ort der Entzündung geleitet werden.^[13] Die gemeinsame Zuckerstruktur aller N-Glycoproteine weist zwei GlcNAc-Untereinheiten auf. Lacto-N-Tetraose (**2**) ist ein Oligosaccharid, welches mit einer Vielzahl an ähnlichen Strukturen in der menschlichen Muttermilch vorkommt, und Bedeutung für das Immunsystem und die Gehirnentwicklung von Säuglingen hat. Murein (**3**) bildet den Glycanteil der bakteriellen

Zellwand und sorgt für die äußere Stabilität von Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien (siehe auch Kapitel 1.5).

1.2.1 Besonderheiten bei Glycosylierungsreaktionen

Eine der großen Herausforderungen in der Kohlenhydratchemie ist die Synthese von Verbindungen einheitlicher Konfiguration am anomeren Zentrum. Die Stereochemie, die zum α - bzw. β -konfigurierten O-Glycosid führt, hängt sowohl vom Reaktionsmechanismus (S_N1 oder S_N2) als auch von der Beteiligung nachbargruppenaktiver Reste in der 2-Position ab. Abbildung 1.5 zeigt die unterschiedlichen Reaktionswege bei einer Glycosylierung ohne Nachbargruppeneffekt.

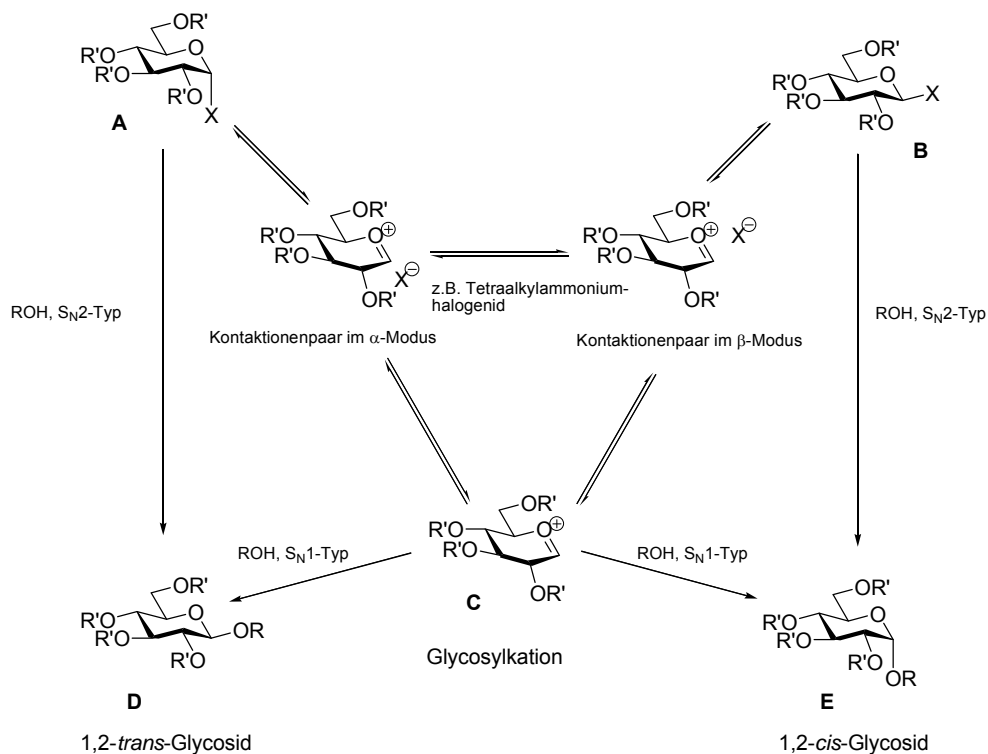


Abb. 1.5: Vereinfachte Betrachtung der Reaktionswege bei Glycosylierungsreaktionen ohne Berücksichtigung von Nachbargruppen- und Lösungsmittelleffekten.

Es wurde berichtet, dass man bei der Verwendung von Trichloracetimidaten^[14] durch Verwendung unpolarer Lösungsmittel und schwachen Lewisäuren (wie z.B. $BF_3 \cdot Et_2O$) eine reine S_N2 -Reaktion beobachten kann, die sonst nur selten auftritt. In der Regel ergibt sich durch die Mesomeriestabilisierung des Glycosylkations C ein deutlicher S_N1 -Anteil, dessen Ausprägung durch mehrere Parameter (Reaktivität des

Nucleophils, Qualität der Abgangsgruppe, Lösungsmittelpolarität, induktive Effekte der Reste am Zuckergerüst) beeinflusst werden kann. Bei Glycosylierungen nach einem S_N1 -Mechanismus bildet sich aufgrund des anomeren Effekts bevorzugt das α -Produkt **E** (Abb. 1.5). Dadurch ist man in der Lage, 1,2-*cis*-Glycoside der gluco- und galacto-Reihe zu synthetisieren.

Eine weitere Möglichkeit bildet das *In-situ*-Anomerisierungsverfahren, bei dem ein α -Pyranosylhalogenid **A** in Gegenwart von Tetraalkylammoniumhalogenid mit dem Alkohol umgesetzt wird.^[15] Hierbei bildet sich *in situ* das reaktivere β -Pyranosylhalogenid **B**, welches in einer S_N2 -Reaktion unter Inversion zum α -Glycosid **E** umgewandelt wird. Diese Reaktion findet somit unter kinetischer Kontrolle statt. Als Nachbargruppeneffekt bezeichnet man die intramolekulare Beteiligung eines räumlich nahen nucleophilen Substituenten bei einer Substitutionsreaktion. Im Falle einer Glycosylierungsreaktion mit Estergruppen am C2-Atom ist die Nachbargruppenbeteiligung der Grund für die Bildung der entsprechenden 1,2-*trans*-Glycoside.

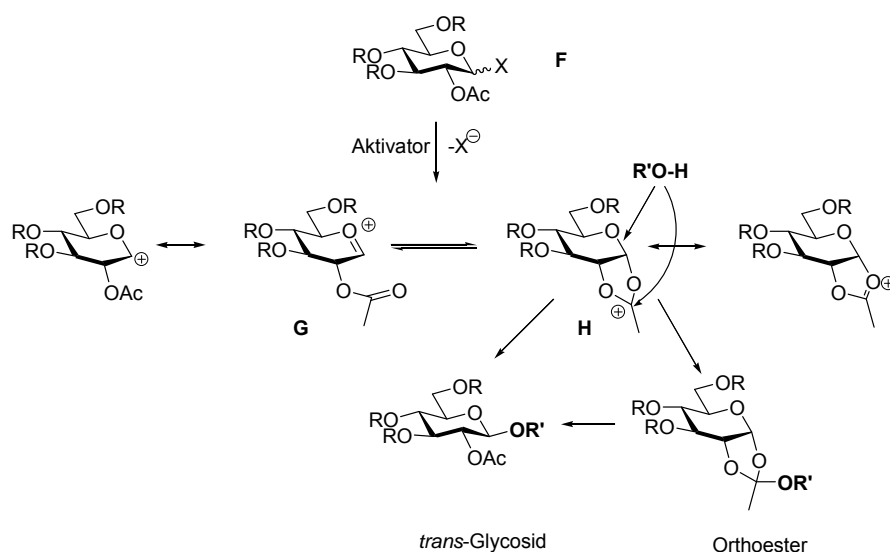


Abb. 1.6: Reaktionswege bei Glycosylierungsreaktionen mit Nachbargruppenbeteiligung.

Wie in Abb. 1.6 zu sehen ist, bildet sich dabei während der Reaktion aus dem primär gebildeten Oxocarbeniumion **G** ein Acetoxonium-Intermediat **H**, welches mit der Alkoholkomponente weiterreagiert. Das O-Nucleophil greift von der sterisch weniger abgeschirmten Seite an und reagiert somit zum 1,2-*trans*-Glycosid. Ein nucleophiler Angriff des Alkohols am Dioxolan-Ringkohlenstoff des Oxocarbeniumions kann in einer

Nebenreaktion zu Orthoestern führen, die je nach Reaktion eventuell zum gewünschten Produkt isomerisieren. Bei basischen oder neutralen Reaktionsbedingungen wird der Orthoester zum Hauptprodukt. Bei 2-Acetamido-2-desoxyzyranosiden bildet sich analog zu den 2-O-Acetylpyranosiden ein sogenanntes Oxazoliniumion **J** als Intermediat aus (Abb. 1.7). Im Gegensatz zum Acetoxoniumion **H** kann es durch Deprotonierung zum Oxazolin **4** als Hauptprodukt stabilisiert werden. Die gewünschte Glycosylierung erfolgt dann in Abwesenheit starker Aktivatoren häufig nur zu einem sehr geringen Anteil.

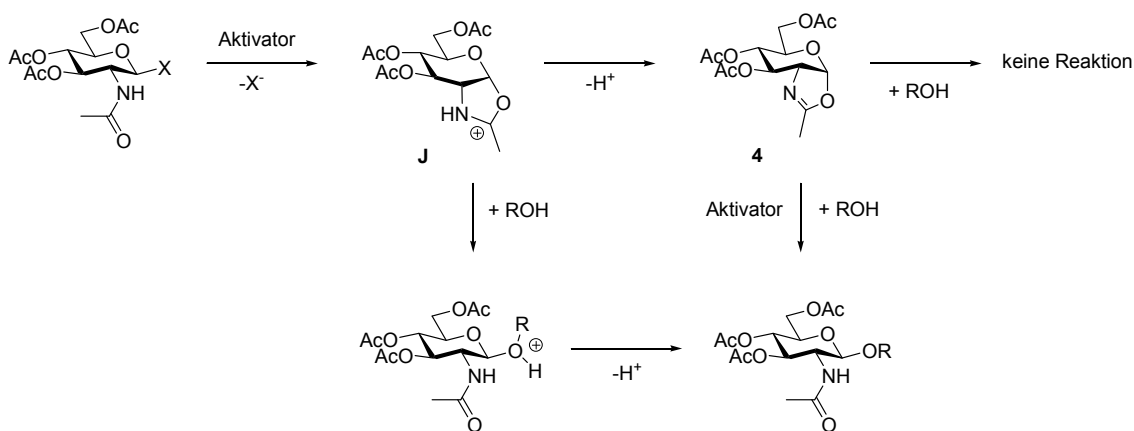


Abb. 1.7: Nachbargruppeneffekt bei 2-Acetamido-2-desoxyzuckern.

1.2.2 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-glycopyranosiden

1.2.2.1 Synthese ausgehend von Glycalen

Glycale werden oft als wertvolle Synthesebausteine in der Kohlenhydratchemie eingesetzt.^[16] In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an Methoden für die Addition eines Stickstoffsynthons an C-2 unter gleichzeitiger Ausbildung einer neuen Bindung an C-1 entwickelt, wodurch Glycale als Edukte für die Synthese von 2-Acetamido-2-desoxyzucker genutzt werden können.

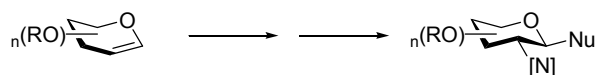


Abb. 1.8: Glycale als Edukte für die Synthese von 2-Amino-2-desoxyzuckern.

Eine der häufigsten Methoden ist hierbei die Einführung einer Azidgruppe an der 2-Position, die als maskiertes Amin aufgefasst werden kann. Im Vergleich zu Amino- oder Acylamidogruppen besitzt sie einen geringeren sterischen Anspruch, bessere Löslichkeit und aufgrund fehlender Protonen einfachere NMR-Spektren^[17]. Zudem tritt kein Nachbargruppeneffekt auf, wodurch auch die Synthese von 1,2-*cis*-Glycosiden ermöglicht wird.

Eine Möglichkeit zur Einführung des Azids ist die sogenannte Azidonitrierung, welche von Lemieux *et al.* 1979 entwickelt wurde.^[18] Dabei wird ein Azidradikal aus Natriumazid und Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) erzeugt, welches im Sinne einer *anti*-Markovnikov-Addition mit hoher Regioselektivität mit der Doppelbindung des Glycals reagiert (Abb. 1.9). Die entstehenden Nitrate können zu verschiedensten geeigneten Glycosyldonoren umgesetzt werden.^[19-24] Nach der eigentlichen Glycosylierung kann im letzten Schritt das Azid zum Amin reduziert werden. In der Literatur sind viele verschiedene Methoden dazu zu finden, unter anderem über katalytische Hydrierungen (H₂, Pd/C),^[25] Birch-Reduktion (mit Natrium in flüssigem Ammoniak),^[26] Staudinger-Reduktion (Ph₃P in THF/H₂O)^[27] oder Behandlung mit 1,3-Propandithiol^[28].

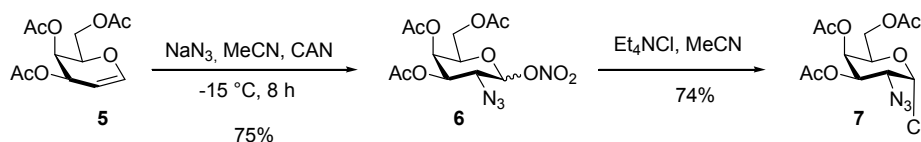


Abb. 1.9: Azidonitrierung eines peracetylierten Galactals **5** zum 2-Azido-2-desoxygalactosylnitrat **6** und anschließende Umsetzung zum 2-Azido-2-desoxygalactosylchlorid **7**.

Weitere Syntheszugänge, die zu 2-Acetamido-2-desoxyzuckern führen, sind die Nitrierung von Glycalen mit anschließender Michael-Addition^[29], die Amidierung von Glycalen über Aziridinzwischenstufen^[30-32] oder die Verwendung der Glycale in geeigneten Cycloadditionsreaktionen^[33,34].

1.2.2.2 Synthese durch nucleophile Substitution an C-2

Nucleophile Substitutionsreaktionen an geeignet aktivierten Zuckerderivaten sind eines der wichtigsten Werkzeuge zur Einführung neuer Substituenten am Zuckergerüst. Diese Reaktionen verlaufen nach einem S_N2-Mechanismus, was zu einer Inversion der Konfiguration führt. Üblicherweise werden Triflate eingesetzt, die durch Reaktion des freien Alkohols mit Tf₂O und Pyridin in Dichlormethan hergestellt werden.^[35-38]

Durch Umsetzung mit NaN_3 in DMF erhält man die 2-Azido-2-Desoxyzucker, welche nach Reduktion die gewünschten 2-Acetamido-2-desoxyzucker liefern (Abb. 1.10).^[37,39] Eine Alternative ist die Umsetzung von 1,2-Zuckerepoxiden mit NaN_3 (Abb. 1.11).^[40,41]

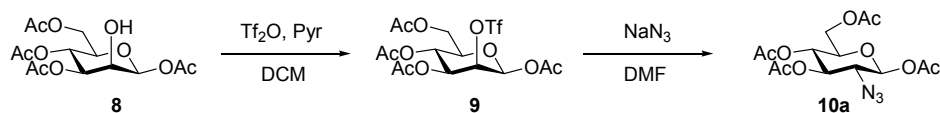


Abb. 1.10: Synthese des 2-Azido-2-desoxyglucosids **10a** über das Mannosyltriflat **9** als Zwischenstufe.^[37]

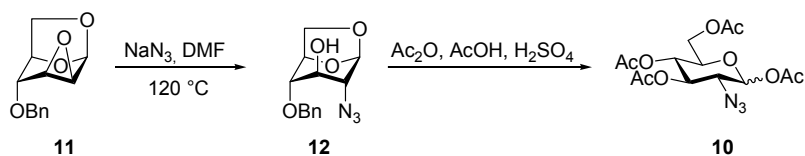


Abb. 1.11: Synthese des 2-Azido-2-desoxyglucosids **10** über die Ringöffnung des Epoxids **12** mit Natriumazid.^[41]

1.2.2.3 Einsatz von Schutzgruppen

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, sind natürlich vorkommende 2-Amino-2-desoxyglycopyranoside oft *N*-acetyliert und 1,2-*trans*-glycosidisch verknüpft. Die Verwendung von *N*-Acetylglycosyldonoren ist jedoch aus zwei Gründen oft nicht praktikabel. Zum Einen führt der auftretende Nachbargruppeneffekt bei Glycosylierungsreaktionen häufig zum Oxazolin als Hauptprodukt. Zum Anderen kann die hohe Nucleophilie des freien Elektronenpaars am Stickstoff zu Problemen führen, indem es mit Elektrophilen wie z.B. den Glycosylierungsaktivatoren wechselwirkt. Dies führt oft zu einer verminderten Reaktivität und/oder zusätzlicher Nebenproduktbildung. Durch den Einsatz elektronenziehender Aminoschutzgruppen lässt sich die Reaktivität des Amins herabsetzen. Dabei wird die Aminogruppe temporär in ein Amid, Imid oder Carbamat umgewandelt. Durch den elektronenziehenden Charakter wird auch die Oxazolinbildung effektiv verhindert, weil das intermediär entstehende Oxazoliniumion destabilisiert wird. Typische Vertreter hierfür sind Haloacetamidoderivate^[42-44] mit z.B. Trichloracetylgruppen oder 2-Alkoxy-carbamoyl-2-desoxyderivate^[11] (Abb. 1.12). Die

Entschützung nach erfolgter Glycosylierung richtet sich dabei nach der Art des verwendeten Carbamats. Benzylcarbamate wie $\text{NHCbz}^{[45]}$ (NHZ) werden durch katalytische Hydrogenolyse entschützt, Allylcarbamate^[46] (NHAlloc) durch Pd-katalysierte Isomerisierung, während Trichloroethoxycarbamate^[47-50] (NHTroc) leicht durch reduktive Eliminierung mit aktiviertem Zn zum freien Amin überführt werden können.

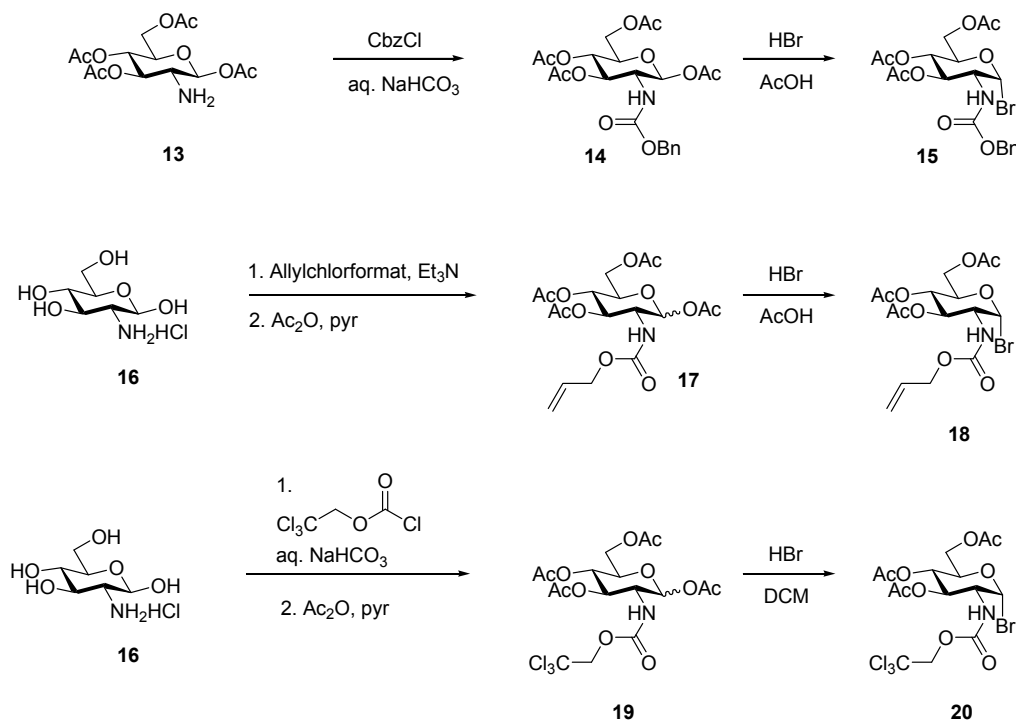


Abb. 1.12: Synthese verschiedener 2-Alkoxycarbamoyl-2-desoxyglycosylbromide als Glycosyldonoren (**15** mit Cbz, **18** mit Alloc, **20** mit Troc).^[45,46,50]

Mit Hilfe zweizähliger Aminoschutzgruppen (N^2 -Schutzgruppen)^[51] lässt sich ebenfalls die Oxazolinbildung verhindern (Abb. 1.13). Es bildet sich lediglich das intermediäre Oxazoliniumion, welches weiterhin die Stereoselektivität der Glycosylierung zu 1,2-*trans*-Glycosiden gewährleistet. Das klassische Beispiel für eine solche Schutzgruppe ist die von R.U. Lemieux eingeführte Phthaloyl-Schutzgruppe.^[52] Von R.R. Schmidt wurde die Dimethylmaleoylgruppe (DMM) eingeführt, die im Vergleich zur Phthaloylgruppe unter deutlich milderen Bedingungen abspaltbar ist.^[53] Tetrachlorphthaliminderivate (TCP) wurden 1995 von den Gruppen um R. R. Schmidt und B. Fraser-Reid als weitere Alternative vorgeschlagen.^[54,55] Des Weiteren wurden auch Dithiasuccinoyl-, Diacetyl- und Thiodiglycoloylschutzgruppen eingesetzt.^[54,56-58]

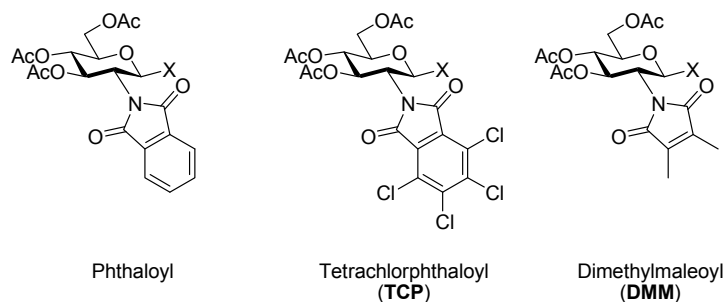


Abb. 1.13: Gebräuchliche zweizählige Aminoschutzgruppen für 2-Amino-2-desoxyzucker.^[52-55]

Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass die Einführung und Abspaltung der Schutzgruppen die Effizienz und Gesamtausbeute einer Synthese mindert und dies somit einen erheblichen Nachteil im Vergleich zu einer Methode darstellt, bei der man die Acetamidofunktionalität in der 2-Position direkt erhalten würde.

1.2.2.4 Die Oxazolinmethode

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, kann die Bildung von Oxazolinen bei der Aktivierung von 2-Acetamido-2-desoxyzuckern in der Regel nicht verhindert werden, da die Deprotonierung des Oxazoliniumions meist schneller als die Glycosylierung erfolgt. Das gebildete Oxazolin kann jedoch selbst als Glycosyldonor verwendet werden.^[9,11,12,59] Diese von Zurabayan *et al.* eingeführte sogenannte Oxazolinmethode hat den Vorteil, dass die 2-Acetamidofunktion nach der Glycosylierung direkt erhalten wird und die stereospezifische Reaktionsführung ausschließlich zum 1,2-*trans*-Glycosid führt.^[60-63] Unter den Bedingungen, die zur Aktivierung klassischer Glycosyldonoren nötig sind (z.B. Silbersalze, katalytische Mengen an TMSOTf usw.), ist das Oxazolin stabil und reagiert nicht weiter. Erst bei sehr viel härteren Bedingungen, wie z.B. hohe Temperaturen und der Einsatz starker Säuren, wird das Oxazolin aktiviert und reagiert zum gewünschten Glycosid. Sogar unter diesen Bedingungen sind oft lange Reaktionszeiten erforderlich, insbesondere bei sterisch anspruchsvolleren Glycosylakzeptoren. Dabei kann es zu einer partiellen Anomerisierung der β -glycosidischen Bindung des bereits gebildeten Produkts und zur Wanderungen säurelabiler Schutzgruppen wie Acetalen kommen. Aus diesem Grund wird im Allgemeinen eine starke Nebenproduktbildung beobachtet. Bisher wurde die Oxazolinmethode trotz ihrer immensen Vorteile gegenüber den Methoden, bei denen Schutzgruppen verwendet werden, aus den oben genannten Gründen nicht sehr häufig angewendet. In den letzten Jahren wurden nun von unserer und verschiedenen anderen Arbeitsgruppen diverse unterschiedliche erfolgversprechende Strategien verfolgt,

Oxazoline mild zu aktivieren, um sie für die Synthese von relevanten Glycosiden und deren Glykokonjugaten einzusetzen. Einen Überblick über die Verwendung von Oxazolinen als Glycosyldonoren in chemischen und chemo-enzymatischen Synthesen gibt der Abschnitt 1.3.

1.3 Zuckeroxazoline

Oxazoline sind seit vielen Jahren bekannt. Sie wurden zum ersten Mal im Jahre 1884 synthetisiert,^[64] haben aber erst in den letzten 30 Jahren ein großes Interesse auf sich gezogen. Es handelt sich bei ihnen um fünfgliedrige heterocyclische Verbindungen mit einem N-, einem O-Atom und einer Doppelbindung. Die Doppelbindung kann sich an drei unterschiedlichen Positionen befinden, wodurch es drei unterschiedliche Oxazolinringgrundstrukturen gibt (Abb. 1.14). In Naturstoffen kommt die 2-Oxazolinstruktur dabei am häufigsten vor. Inzwischen werden Oxazoline als wertvolle Synthesebausteine geschätzt. Die Anwesenheit des freien Elektronenpaars am Stickstoff ermöglicht es, Oxazoline als Übergangsmetallliganden z.B. in der Katalyse zu nutzen.

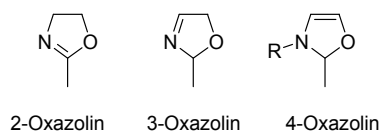


Abb. 1.14: Aufgrund der möglichen verschiedenen Lage der Doppelbindung existieren drei unterschiedliche Oxazolinstrukturen. Gezeigt sind hier nur die Grundringstrukturen ohne die weiteren möglichen Substitutionsmuster an den Kohlenstoffen.

Es wurden einige Metallchelatoren wie z.B. Vibriobactin^[65] (**21**) und Mycobactin^[66] (**22**) aus Mikroorganismen isoliert, die Oxazolinringe enthalten (siehe Abb. 1.15). Diese dienen dazu im Falle eines Eisenmangels im Mikroorganismus als sogenannte Siderophore das verbliebene Eisen effizient zu binden bzw. zu komplexieren.^[67] Daneben wurden auch aus Schwämmen Naturstoffe mit 2-Oxazolinringstrukturen wie das Ascidiacylamid (**23**) isoliert (Abb. 1.15). Dieses cyclische Peptid mit Oxazolin- und Thiazolringen besitzt eine starke cytostatische Wirkung und ist daher als Leitstruktur für die pharmazeutische Industrie von Interesse.^[68]

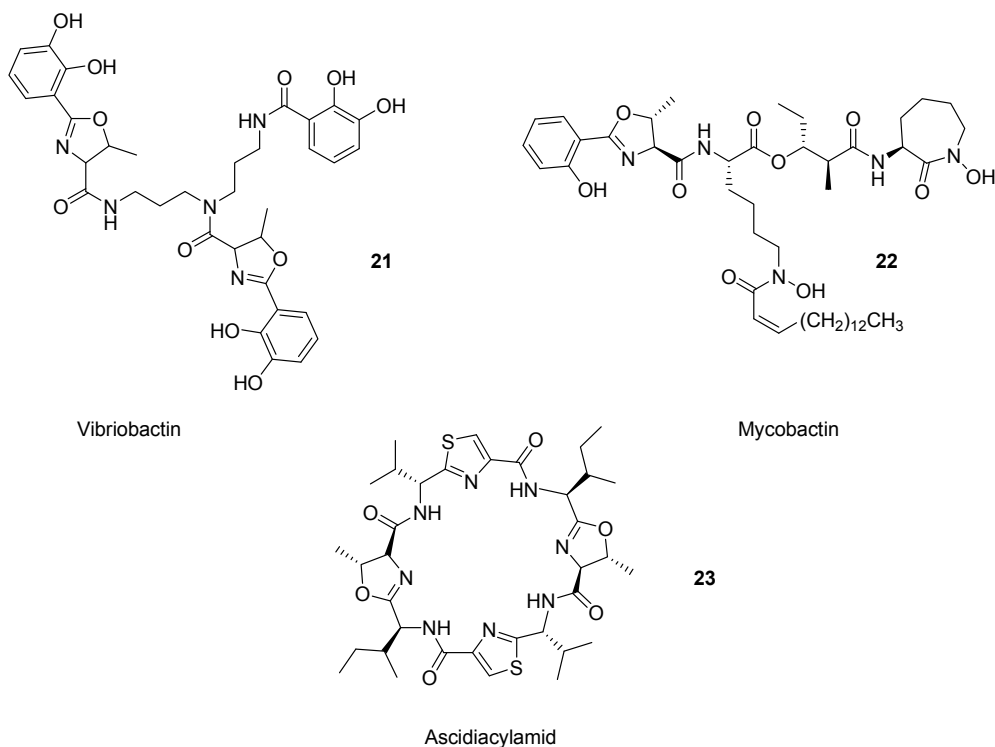


Abb. 1.15: Naturstoffe aus Bakterien und Schwämmen, die Oxazolinringe in ihrer Struktur vorweisen.

Zuckeroxazoline finden sich hingegen nicht als natürliche Strukturen in der Natur, sondern treten insbesondere als Nebenprodukte bei der Glycosidsynthese von 2-Acetamido-2-desoxyzuckern (Abschnitt 1.2.2) auf oder werden gezielt zur späteren Verwendung als Glycosyldonoren synthetisiert (Abschnitt 1.3.2). Dabei handelt es sich stets um 2-Oxazoline. Die Struktur bzw. die Konformation von Zuckeroxazolinen ähnelt dem Übergangszustand von Kohlenhydraten im aktiven Zentrum von Glycosidasen. Dies führt dazu, dass man sie auch als Inhibitoren oder als Substrate in chemoenzymatischen Synthesen einsetzen kann (Abschnitt 1.3.3). Wie bei einfachen Oxazolinringen ist es bei Zuckeroxazolinen möglich, sie als Metallliganden einzusetzen. Bei der Verwendung entsprechender Kohlenhydratoxazolinliganden in der asymmetrischen Synthese wird durch das Zuckergerüst die Stereoinduktion des Katalysators bestimmt (Abschnitt 1.3.4).

1.3.1 Zuckeroxazolinsynthesen

Neben der ungewollten Entstehung von Zuckeroxazolen als Nebenprodukt in Glycosidsynthesen, gibt es eine Vielzahl an Synthesemethoden, um gezielt Zuckeroxazoline als potentielle Glycosyldonoren (Abschnitt 1.3.2) herzustellen.^[11,59] 2-Methyl-(3,4,6-tri-O-Acetyl-1,2-dideoxy- α -D-glucopyrano)[2,1-d]-2-oxazolin (**4**) wurde so als erstes von der Gruppe um Zurabayan aus 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid in Anwesenheit von Silbersalzen und einer Base (Collidin, Pyridin oder 2,4,6-Trimethylpyridin) synthetisiert (Abb. 1.16).^[62,63] Nach dieser Methode wurden auch die 2-Methyl-2-oxazoline mit D-Manno- und D-Galactokonfiguration, sowie die der peracetylierten Chitobiose hergestellt.

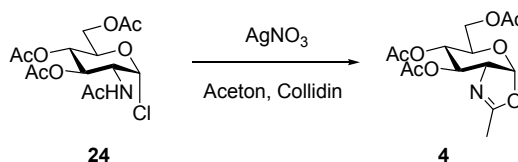


Abb. 1.16: Zuckeroxazolinsynthese nach Zurabyan *et al.* ausgehend vom Glucopyranosylchlorid **24**.^[62,63]

Eine andere gebräuchliche Methode ist die Umsetzung eines peracetylierten 2-Acetamido-2-desoxyzuckers wie **25** mit einer starken Lewissäure. Als Lewissäuren kommen hierbei ZnCl_2 ^[69], FeCl_3 ^[70], SnCl_4 ^[71], AlCl_3 ^[72] und TMSOTf ^[73] in Frage (Abb. 1.17).

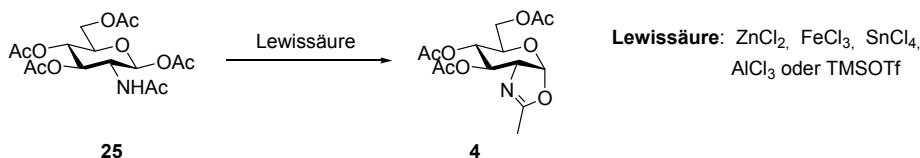


Abb. 1.17: Aktivierung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (**25**) mittels Lewissäuren zur Oxazolinsynthese.

Auch Allylglycoside kommen als Edukte für Zuckeroxazoline in Betracht. So können unter geeigneten Bedingungen Allylglycoside zunächst in Prop-1-enyl- β -D-glycoside isomerisiert werden, welche dann in Anwesenheit von Quecksilbersalzen^[74,75] oder Iod und DBU^[76] zu den entsprechenden Oxazolen weiterreagieren (Abb. 1.18). Des Weiteren können anomere Phosphate zum Oxazolin durch Behandlung mit Triethylamin weiterreagieren.^[77]

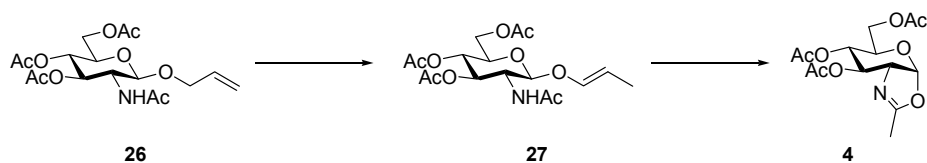


Abb. 1.18: Verwendung von Allylglycosiden zur Oxazolinsynthese.

J.Liu und D. Y. Gin synthetisierten 2002 Oxazoline ausgehend von Glycalen. Diese wurden in einem ersten Schritt mit Diarylsulfoniumtriflaten aktiviert und anschließend mit Amidnucleophilen der Form R^1CONHR^2 umgesetzt. Auf diese Weise konnten Methyl-, Phenyl- und Methoxybenzyloxazoline hergestellt werden (Abb. 1.19).^[78]

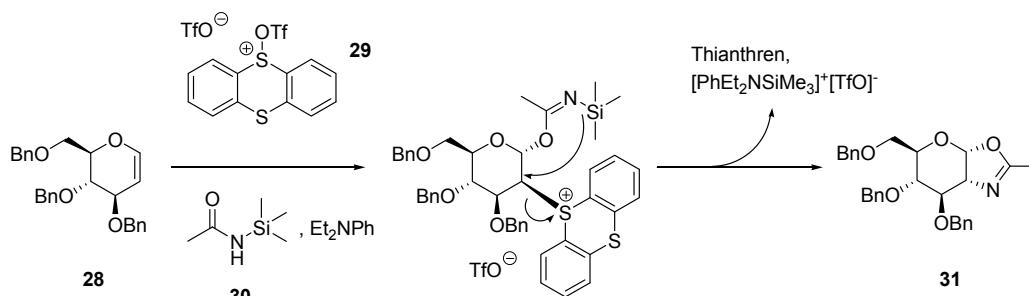


Abb. 1.19: Synthese vom 2-Methyl-2-Oxazolin **31** ausgehend vom benzylierten Glucal **28**.^[78]

Donohoe *et al.* gingen 2003 von 2-Trichloracetamid-2-desoxy- β -D-naphthylmethylglycosid (**32**) aus, um Trichloroxazoline als aktivierte Glycosyldonoren zu synthetisieren. Dazu wurde der Zucker zunächst mit 2,3-Dichlor-5,6-Dicyanbenzochinon (DDQ) anomer entschützt, um dann die frei gewordene Hydroxylgruppe mit Ms_2O zu aktivieren, wodurch die Oxazolinbildung ausgelöst wird (Abb. 1.20).^[79]

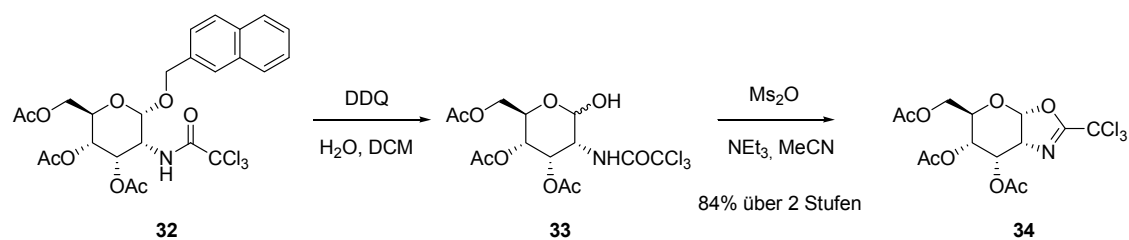


Abb. 1.20: Synthese des acetylierten Trichlormethyloxazolins **34** ausgehend vom 2-Trichloracetamid-naphthylglycosid **32** nach Donohoe *et al.*^[79]

Eine weitere elegante Möglichkeit ist die Verwendung von *n*-Pentenylglycosiden. Werden diese mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Triethylsilyltriflat (TESOTf) in DCM in

Abwesenheit eines Glycosylakzeptors aktiviert, bildet sich umgehend in einer intramolekularen Reaktion das entsprechende Zuckeroxazolin in guten bis sehr guten Ausbeuten (Abb. 1.21).^[80]

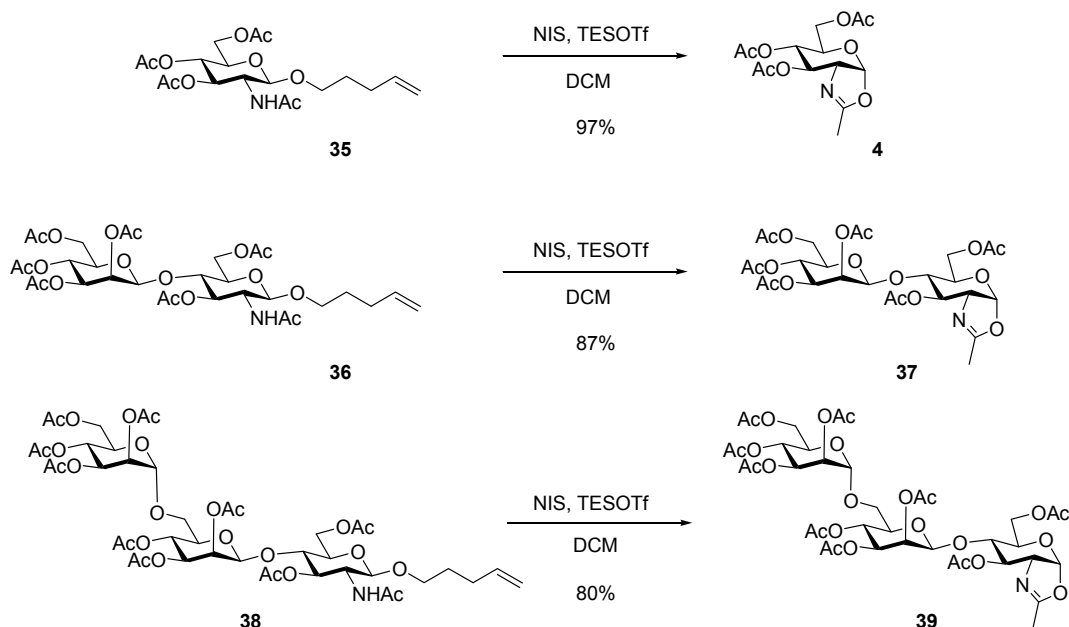


Abb. 1.21: Synthese von Mono-, Di- und Trisaccharidoxazolinen unter Zuhilfenahme von n-Pentenylglycosiden als Edukte.^[80]

Bei allen bisher vorgestellten Arbeiten wurden immer teilweise oder ganz geschützte Glycoside eingesetzt. In der Gruppe von Brossmer wurde 1988 GlcNAc (**40**) unter Rückfluss mit FeCl_3 in Aceton in ein synthetisch wertvolles Furanosyloxazolin **41** mit einer freien Hydroxygruppe in der 3-Position umgewandelt (Abb. 1.22).^[81]

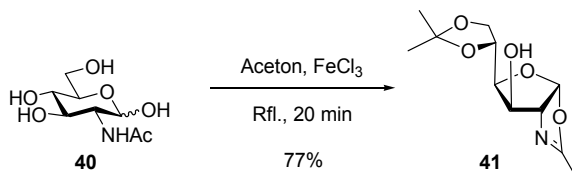


Abb. 1.22: Synthese des Furanosyloxazolins **41** durch Umsetzung von GlcNAc (**40**).^[81]

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass man bei der Umsetzung von GlcNAc mit 2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid (DMC) (**42**) in Anwesenheit einer tertiären Stickstoffbase wie z.B. Triethylamin das pyranoides Methyloxazolin mit freien OH-Gruppen erhält (Abb. 1.23). Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn man bei chemoenzymatischen Synthesen (Abschnitt 1.3.3) ein entschütztes Oxazolinsubstrat benötigt.^[82]

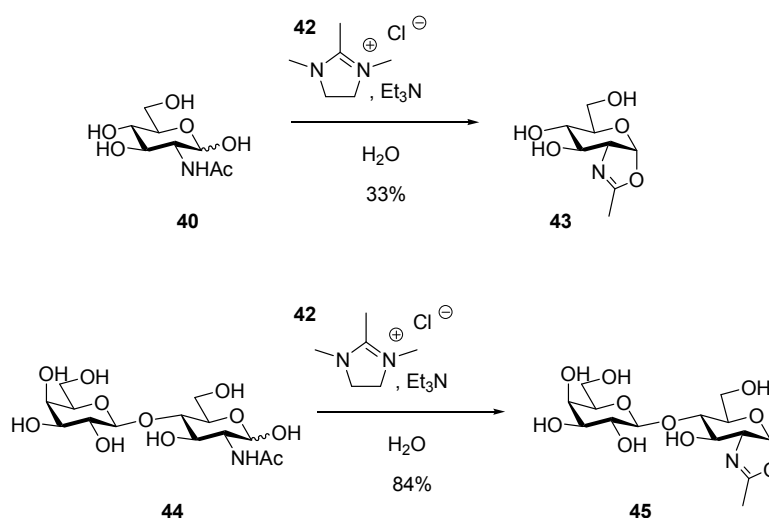


Abb. 1.23: Synthese ungeschützter Zuckeroxazoline mit DMC (**42**).^[82]

Neben den bisher vorgestellten Methyloxazolinen sind auch analoge Synthesen für Phenyl-^[60,83-85], Chlormethyl-,^[83-85] Phenylmethyl- und Methoxymethyloxazoline^[83,85] von Zuckern bekannt. Da diese aber nach Glycosylierungsreaktionen nicht zur natürlichen *N*-Acetylfunktion führen, wird auf diese Substanzklassen an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

1.3.2 Verwendung als Glycosyldonoren

In der Originalvorschrift von Zurabayan und Khorlin wurde zur Aktivierung *p*-TsOH in Glycosylierungen mit einfachen Alkoholen als Glycosylakzeptoren unter Rückfluß in Toluol oder Nitromethan verwendet.^[60,61] Die Glycosylierungen von reaktiven Alkoholen (Methanol, Allylalkohol, Benzylalkohol und Phenol) mit Monosaccharid- oder Disacchariddonoren führten zu Ausbeuten von 40-70% (Abb. 1.24). Bei der Verwendung von sekundären Alkoholen wurde die Bildung von 2-Acetamido-D-glycalen unter den harschen Reaktionsbedingungen als Nebenprodukt beobachtet. Durch den Einsatz von 1,2-Dichlorethan und anderen chlorierten Lösungsmitteln konnte das Ausfällen des Oxazolinium-*p*-Toluolsulfonatsalzes verhindert werden, wodurch die Reaktion auch bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden kann.



Abb. 1.24: Glycosylierungen mit Oxazolin **4** als Donor nach Zurabayan *et al.* [60,61]

Kiso und Anderson zeigten, dass man vom peracetylierten GlcNAc ausgehen kann und in Gegenwart stöchiometrischer Mengen an FeCl_3 das Oxazolin *in situ* direkt gebildet wird (Abb. 1.25). Durch Zusatz an Tetramethylharnstoff kann die Reaktionslösung soweit abgepuffert werden, dass auch säurelabile Glycosylakzeptoren wie Diaceton-galactose **46** eingesetzt werden können. [83,84]

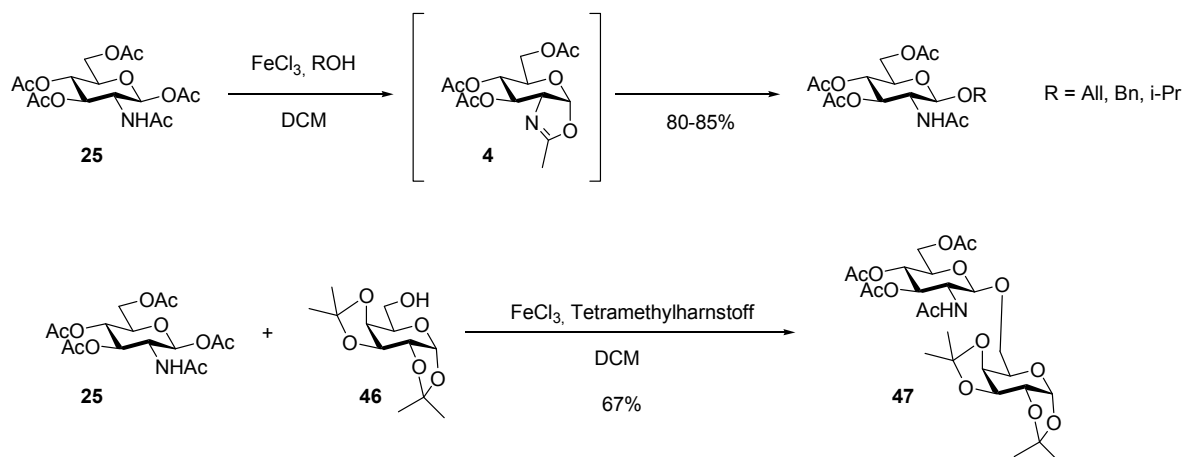


Abb. 1.25: FeCl_3 -aktivierte Glycosylierung nach Kiso *et al.*, bei der Oxazolin **4** *in situ* gebildet wird. [83,84]

TMSOTf [86] und CSA [87] erwiesen sich ebenso als geeignete Aktivatoren in der Oxazolinreaktion (**Abb. 1.26**). Im Jahre 1993 konnten Yohino *et al.* bei der Synthese von *N*-Acetyllactosaminglycosiden zeigen, dass **Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat** (PPTS) eine weitere Alternative bei der Aktivierung von Oxazolinen darstellt [88].

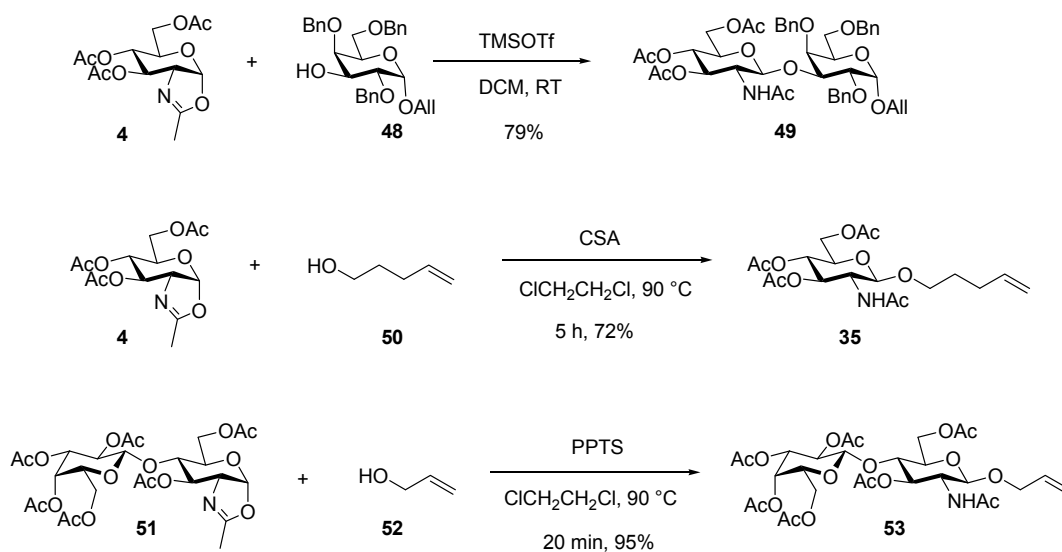


Abb. 1.26: Glycosylierungen von Oxazolinen mit organischen Lewissäuren.

Selbst unter diesen sauren Bedingungen sind oft lange Reaktionszeiten erforderlich, insbesondere bei sterisch anspruchsvolleren Glycosylakzeptoren. Dabei kann es zu einer partiellen Anomerisierung der β -glycosidischen Bindung und zur Wanderungen säurelabiler Schutzgruppen wie Acetalen kommen. Aus diesem Grund wird eine starke Nebenproduktbildung beobachtet. Bisher konnte sich die Oxazolinmethode aus den oben genannten Gründen nicht durchsetzen.

Bei der Suche nach geeigneten mildereren Aktivierungsbedingungen von Zuckeroxazolinen bei der Synthese von Neoglycopeptid-basierten Lectinliganden wurde in unserer Arbeitsgruppe entdeckt, dass sich Zuckeroxazoline auch mit Cu(II)-Salzen aktivieren lassen.^[89] So ließen sich unterschiedlichste Glycosylakzeptoren in wesentlich besseren Ausbeuten umsetzen als mit den bisher bekannten Methoden. Außerdem konnte von Evans *et al.* gezeigt werden, dass Oxazoline hervorragende Liganden für Cu(II) sind.^[25] Versuche zur Aktivierung von Zuckeroxazolinen mit Cu(I)-Salzen lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Verantwortlich dafür könnten der veränderte Ionenradius und/oder die erhöhte Härte der Lewis-Säure Cu^+ sein. Bei Experimenten mit unterschiedlichen Cu(II)-Salzen ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuSO_4 , CuBr_2 , CuCl_2) führten ausschließlich die Kupferhalogenide zu hohen Produktausbeuten. Bei Anwesenheit von Doppelbindungen traten bei der Verwendung von CuBr_2 und längeren Reaktionszeiten Nebenprodukte auf. Die Erklärung hierfür scheint die Eigenschaft von CuBr_2 zu sein, als Bromoniumquelle dienen zu können.

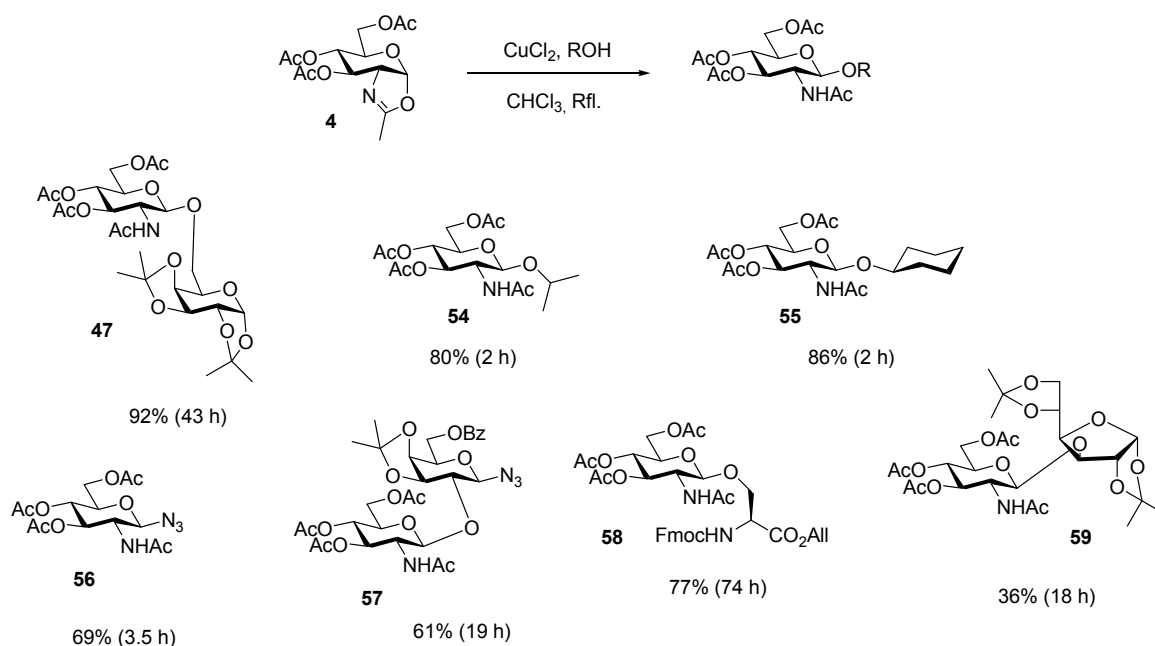


Abb. 1.27: Cu(II)-aktivierte Glycosylierungen mit Oxazolinonor **4** nach Wittmann und Lennartz. Die jeweilige Reaktionsdauer ist in Klammern angegeben.^[89]

Bei den nachfolgenden Testversuchen mit CuCl_2 erwies sich das Lösungsmittel Chloroform als geringfügig besser im Vergleich zu THF, Acetonitril und 1,2-Dichlorethan. In der Diplomarbeit von Dirk Lennartz^[90] wurde die Anwendungsbreite dieser Art der Oxazolinaktivierung untersucht. Es gelangen dabei Umsetzungen zu Glycopeptiden, Disacchariden und *N*-Glycosiden mit im Vergleich zu herkömmlichen Methoden erhöhten Ausbeuten (Abb. 1.27). Des Weiteren zeigte sich, dass die Reaktivität des Oxazolins durch elektronenspendende Reste wie Benzylgruppen erhöht werden konnte. Dieser Befund ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die Reaktivität von Glycosyldonoren von der Fähigkeit abhängt, eine positive Ladung am anomeren Zentrum stabilisieren zu können. Der entscheidende Parameter hierfür ist die Beschaffenheit der Schutzgruppen am Zuckergerüst.

Später wurde 2004 von Crasto *et al.* gezeigt, dass das Lanthanidtriflat $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ als Aktivator, ähnlich wie CuCl_2 , zur Synthese von β -Glycosiden von *N*-Acetylglucosamin eingesetzt werden kann.^[91] Christensen *et al.* untersuchten 2008, von diesen Arbeiten inspiriert, die Möglichkeit, weitere Seltenerdmetall-Triflate als Aktivatoren für die Synthese von β -Glycosiden von GlcNAc einzusetzen. Dabei gingen sie allerdings nicht von Oxazolinolen als Edukt aus, sondern vom β -Anomer des peracetylierten GlcNAcs, welches unter Lewisäure-Aktivierung *in situ* das Oxazolin bildet. Die besten Ergebnisse wurden mit 15 mol% $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ in DCM erzielt und kürzere Reaktionszeiten konnten

durch Glycosylierung in der Mikrowelle erreicht werden (siehe Abb. 1.28).^[92]

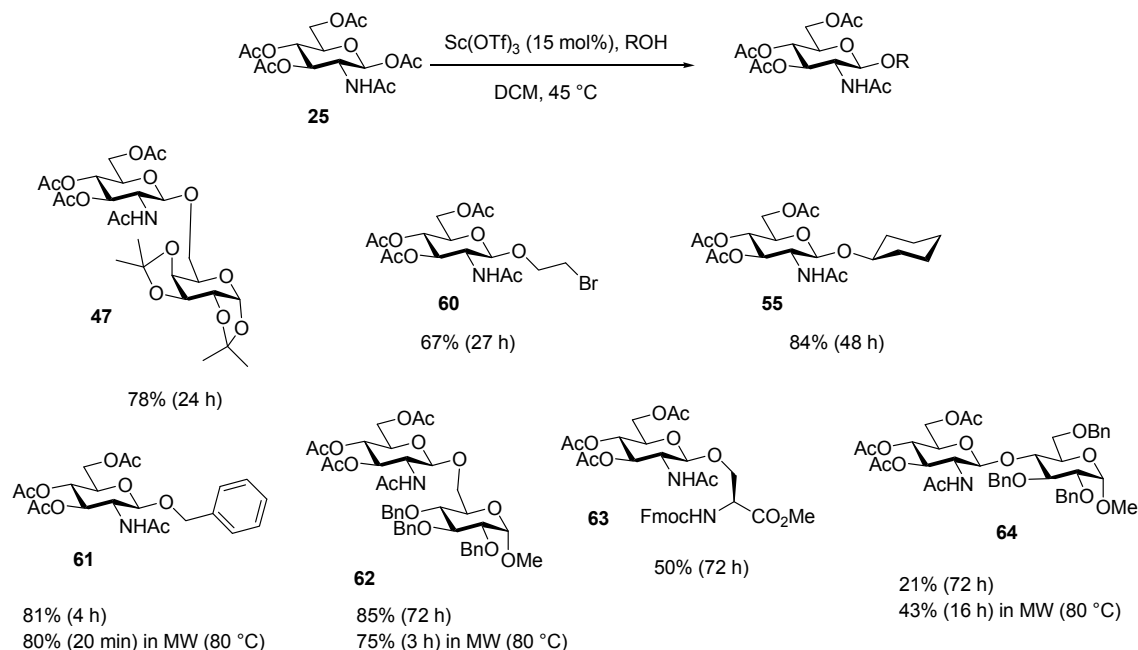


Abb. 1.28: Synthese von β -Glycosiden von *N*-Acetylglucosamin unter Scandiumtriflataktivierung des peracetylierten Zuckers **25**. Die jeweilige Reaktionsdauer ist in Klammern angegeben.^[92]

In der Gruppe um David Bundle wurden Untersuchungen zur Glycosylierung des Furanosyloxazolins **41** unternommen. Die erste sehr interessante Erkenntnis war, dass eine direkte Umsetzung des Oxazolins mit verschiedenen einfachen Alkoholen als Glycosylakzeptoren direkt zum 2-Acetamido-2-desoxy- β -Glucopyranosid führt, der Fünfring also während der Reaktion vollständig zum Sechsring reagiert (Abb. 1.29).^[93] 2009 wurde ebenfalls von Cai *et al.* die freie 3-OH des Furanosyloxazolins präparativ zur Synthese verschiedener β -Methylglycoside seltener Aminozucker genutzt, indem diese vor der eigentlichen Glycosylierung mesyliert wurde (Abb. 1.30). Durch Veretherung der 3-OH mit (*S*)-2-Brompropionsäure erhält man einen synthetischen Zugang zum β -Methylglycosid von MurNAc.^[94]

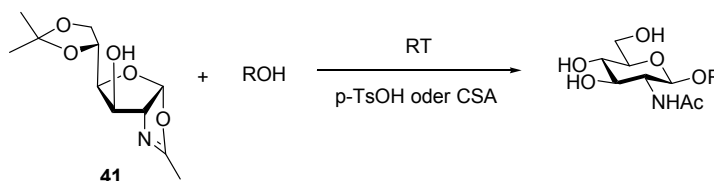


Abb. 1.29: Glycosylierung mit dem Furanosyloxazolin **41** zu Pyranosylglycosiden.^[93]

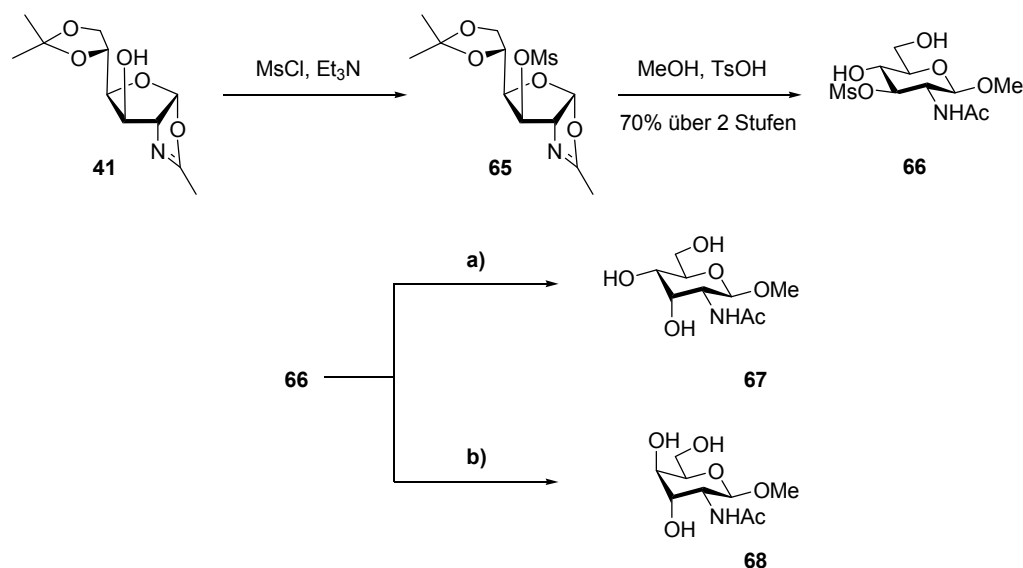


Abb. 1.30: Umsetzung des Furanosyloxazolins **41** zum 2-Acetamido-2-desoxy-β-d-Allopyranosid **67** und dem 2-Acetamido-2-desoxy-β-d-Gulopyranosid **68**.

- (a): NaOAc, 110 °C, 2-Methoxyethanol/ges. NaHCO₃-Lsg. (9:1), 89 %.
 (b): 1. 2 M NaOMe, MeOH 2. H⁺-Harz, Aceton/ MeOH, 64 %.

1.3.3 Verwendung als Substrate in der enzymatischen Synthese und als Inhibitoren

Als Alternative klassischer Syntheserouten zur Herstellung von Oligosacchariden kann die chemoenzymatische Synthese angewendet werden. Dabei werden Kohlenhydrat-spezifische Enzyme im Glycosylierungsschritt eingesetzt, wodurch es möglich wird, auf Schutzgruppen zu verzichten. Ein weiterer großer Vorteil ist die hohe Regio- und Stereoselektivität dieser Methode. Nachteile sind die hohen Kosten, die erschwerte Aufarbeitung nach enzymatischen Reaktionen, bei denen oft hohe Konzentrationen an Puffersalzen vonnöten sind, und die Beschränkung auf natürliche Substrate oder solche, die den natürlichen in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Dennoch wurde diese Methode bereits intensiv und sehr erfolgreich eingesetzt. In der enzymatischen Kohlenhydratsynthese können zwei Enzymklassen verwendet werden: Glycosidasen, die Glycosidbindungen brechen, und Glycosyltransferasen, die neue Glycosidbindungen ausbilden können. Im Falle der Glycosidasen wird zwischen invertierenden und erhaltenden unterschieden, je nachdem ob bei der Spaltung des Glycosids die Stereochemie am anomeren Zentrum erhalten bleibt oder invertiert wird.

Die Glycosidasereaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion; durch Verschieben des Gleichgewichts gelingt es, mit ihrer Hilfe neue glycosidische Bindungen zu bilden.

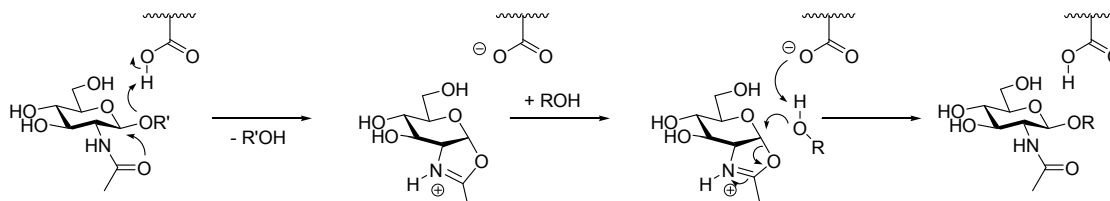


Abb. 1.31: Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum von Glycosidasen, bei denen die Stereochemie am anomeren Zentrum erhalten wird.

Seit Ende der 90er-Jahre werden Oxazolinderivate auch als Substrate für die chemoenzymatische Synthese diverser Glycoside verwendet. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass beim Übergangszustand des Zuckers im aktiven Zentrum bei Glycosidasen (siehe Abb. 1.31), deren Mechanismus unter Erhaltung der Stereochemie des anomeren Zentrums abläuft, ein Oxazoliniumionintermediat angenommen wird. Der eingesetzte synthetische Oxazolindonor wird als Mimikry des Übergangszustands benutzt.

Kobayashi *et al.* stellten mit Hilfe des Enzyms Chitinase von *Bacillus sp.* und dem Oxazolin **43** *N,N*-Diacetylchitobiose (**69**) her. Es handelt sich dabei um die kürzeste Wiederholungseinheit des Oligosaccharids Chitin. (Abb. 1.32). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde Chitobiose üblicherweise durch den Abbau von Chitin hergestellt, was kompliziert und teuer ist.^[95] Im Jahr 2006 wurde die Chitinase A1 von *Bacillus circulans* zur Synthese des Trisaccharids der *N*-verknüpften Corestruktur Man(β1-4)-GlcNAc(β1-4)-GlcNAc unter Verwendung des Man(β1-4)-GlcNAc-Oxazolins eingesetzt.^[96]

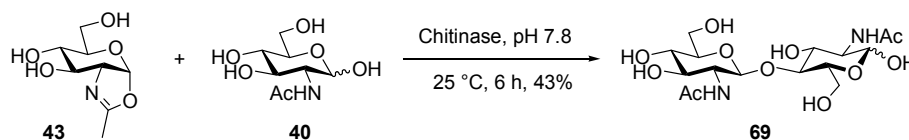


Abb. 1.32: Chemoenzymatische Synthese von *N,N*-Diacetylchitobiose ausgehend vom Oxazolin **43**.^[95]

Die Gruppe um Fairbanks konnte 2007 zeigen, dass die Oxazolinderivate **70** und **71** als Inhibitoren der Chitinbiosynthese bei bestimmten Pilzarten eingesetzt werden können, und so die Entwicklung neuer Fungizide ermöglichen.^[97]

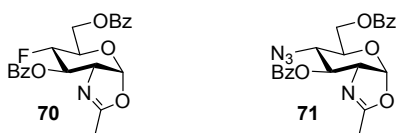


Abb. 1.33: 4-Desoxyzucker-oxazolone **70** und **71**, die als Inhibitoren der Chitinbiosynthese bei krankheits-
erregenden (pathogenen) Pilzen eingesetzt werden können.^[97]

Die Gruppe um Lai-Xi Wang nutzte die *endo*- β -*N*-Acetylglucosaminidase Endo-A von *Arthrobacter protopharmiae* und Endo-M von *Mucor Hiemalis*, um mit verschiedenen Oxazolindonoren neue Glycopeptide zu synthetisieren.^[98-100] Parsons *et al.* konnten mit Hilfe der gleichen Enzyme die in Abb. 1.34 gezeigte Corestruktur **73** ausgehend von einem zuvor synthetisierten Hexasaccharidoxazolin **72** darstellen und den Einfluss des pH-Werts und Cosolventien untersuchen.^[101] Dabei ergab sich, dass der Zusatz von 10% eines organischen Lösungsmittels wie DMF oder Aceton die Hydrolyse des Produkts im Reaktionspuffer deutlich verringert.

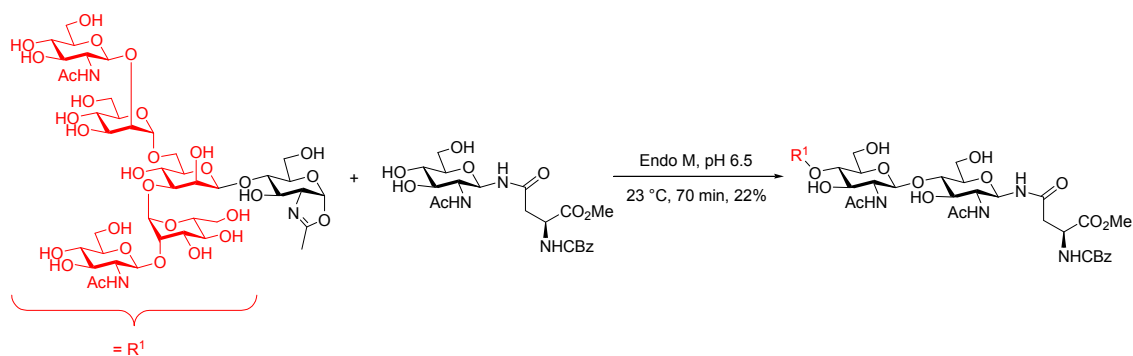


Abb. 1.34: Enzymatische Synthese des in der Glycopeptidsynthese einsetzbaren Bausteins **73**.^[101]

1.3.4 Verwendung von Zuckeroxazolin-Phosphitliganden

Kohlenhydratverbindungen gehören wie z.B. Aminosäuren, Terpene und Alkaloide zu den chiralen Naturstoffen, welche nach Isolation aus geeigneten Quellen enantiomerenrein vorliegen und somit bedeutende Edukte für die stereoselektive Synthese sind. Die Gesamtheit dieser Verbindungen wird auch als *chiral pool* bezeichnet. Im Gegensatz zu den letztgenannten Stoffgruppen, und trotz ihrer hohen Verfügbarkeit, werden Kohlenhydrate viel seltener als chirale Liganden in der metallkatalysierten asymmetrischen Synthese eingesetzt.^[102-104] Der Grund hierfür liegt an der hohen Dichte an funktionellen Gruppen und Stereozentren, die eher als Hindernis, und nicht als Vorteil betrachtet wird. Nichtsdestotrotz wurden seit der ersten Verwendung zuckerbasierter Liganden vor 30 Jahren^[105,106] viele interessante Strukturen designt, die als komplexierende Substanzen in neuartigen Katalysatorsystemen inzwischen immer mehr Aufmerksamkeit erhalten haben.^[107-109]

So wurden auch in mehreren Arbeiten Monooxazolinliganden verwendet, die ausgehend von GlcNAc-Vorläufern synthetisiert wurden. Diese beinhalten meist eine zusätzliche Phosphor-basierte Donorstelle.^[103,110] Ein interessantes Beispiel ist die Verwendung solcher Komplexliganden in der Pd-katalysierten asymmetrischen Heckreaktion vom Mata *et al.*^[111] Dabei wurde eine Phosphit-Oxazolinligand-Bibliothek synthetisiert und deren Eignung in der Heck-Reaktion von Cyclopenten (**74**) und 2,3-Dihydrofuran (**76**) mit Aryltriflaten untersucht.

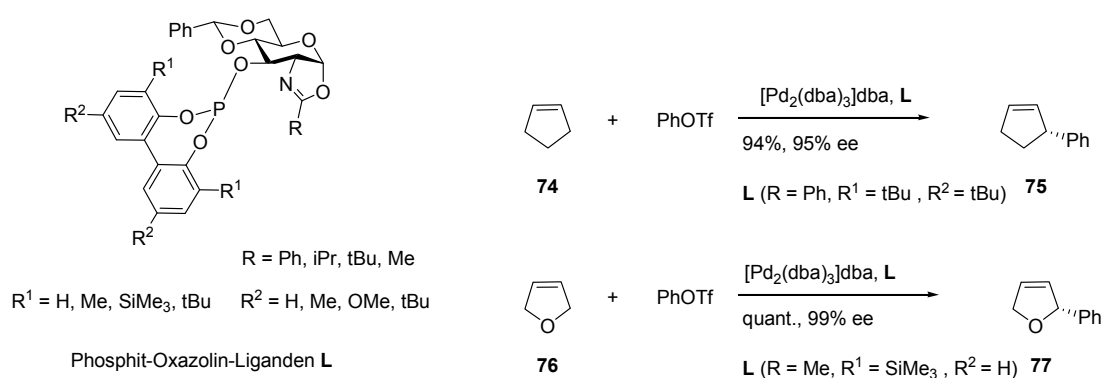


Abb. 1.35: Einsatz von Zuckeroxazolin-Phosphitliganden in der enantioselektiven Pd-katalysierten Heck-Reaktion.^[111]

Bis(oxazoline) (box)^[112] und Pyridylbis(oxazoline) (pybox)^[113] bilden eine Klasse an chiralen Komplexligenanden, die sehr erfolgreich in einer Vielzahl asymmetrischer Synthesen eingesetzt wurden. Im Jahre 2005 wurde die erste Synthese eines Kohlenhydrat-Bis(oxazolins) beschrieben, welches allerdings nicht für asymmetrische Synthesen verwendet wurde.^[114]

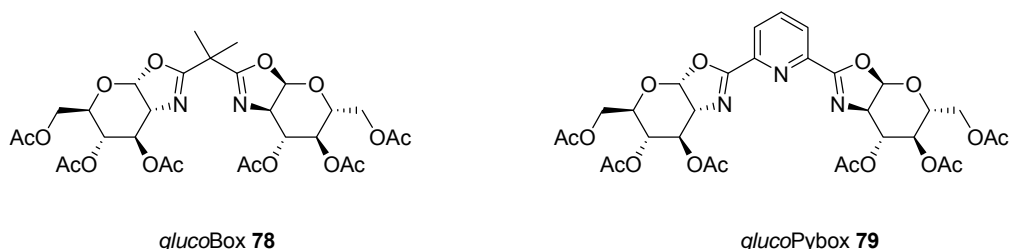


Abb. 1.36: Die in der Gruppe um Boysen entwickelten kohlenhydratbasierten Bis(oxazolin)liganden *glucoBox (78)* und *glucoPybox (79)*.^[108,109]

In der Gruppe um Boysen wurden die neuen kohlenhydratbasierten Bisoxazolin-Liganden *glucoBox (78)* und *glucoPybox*^[108] (**79**) (**Abb. 1.36**) und ihre verschiedenen geschützten Derivate^[109] entwickelt. Sie lieferten vielversprechende Ergebnisse in der Cu(I)-katalysierten Cyclopropanierung von Alkenen mit Diazoacetaten (**Abb. 1.37**) (*glucoBox*) und in der asymmetrischen Alkinylierung von Iminen (**Abb. 1.38**) (*glucoPybox*).

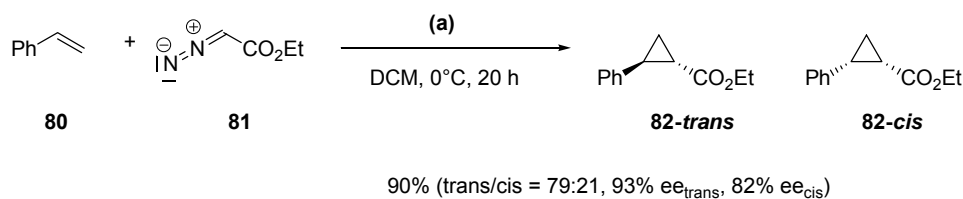


Abb. 1.37: Asymmetrische Cu(I)-katalysierte Cyclopropanierung ausgehend von Styrol **80**.
a): *glucoBox (78)* (1.1 mol-%), CuOTf·0.5 C₆H₆ (1 mol-%)

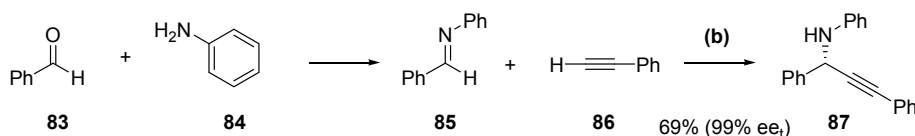


Abb. 1.38: Asymmetrische Alkinylierung von Iminen mit *glucoPybox (79)*.
b): *glucoPybox (79)* (8 mol-%), CuOTf·0.5 C₆H₆ (5 mol-%), DCM, RT, 48 h

1.4 Kohlenhydrat-Arrays

1.4.1 Aufbau von Arrays

Die relativ neue Arraytechnologie stellt eine wichtige Methode dar, um Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[115-117] Dazu werden verschiedene Varianten eines Bindungspartners räumlich definiert als sogenannte Sonden auf einem festen Träger immobilisiert (Abb. 1.39, C). Je nach immobilisierter Verbindung wird entsprechend von einem DNA-, Protein-, Kohlenhydrat- oder Small Molecule Array gesprochen. Den Bindungspartner (DNA, Proteine (Antikörper, Enzyme, Lectine), Kohlenhydrate, etc.) der anschließend in Lösung in markierter Form auf den Träger aufgebracht wird, bezeichnet man als Probe (Abb. 1.39, D). Die Markierung dient zur Identifikation der erfolgten Bindung und kann Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder radioaktive Marker beinhalten. Nach der Entfernung der nicht gebundenen Probenmoleküle durch zusätzliche Waschschrte können die verbliebenen spezifisch gebundenen orts aufgelöst detektiert werden. Aufgrund der vorher festgelegten Anordnung der immobilisierten Sonden, können so die jeweiligen Bindungspartner einander zugeordnet werden. Der große Vorteil von Arraymethoden liegt bei der Effizienz und Geschwindigkeit im Vergleich zu herkömmlichen Methoden. Zudem ist es möglich das Verfahren zu automatisieren, wodurch ein noch kostengünstigeres und leistungsfähigeres Screening ermöglicht wird.

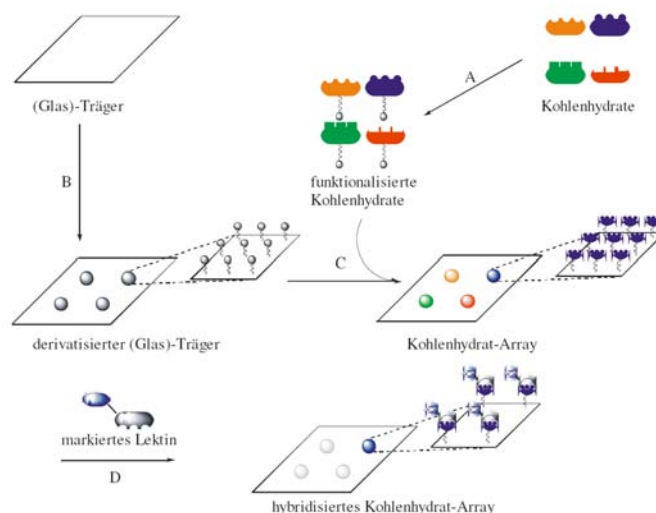


Abb. 1.39: Schematischer Ablauf eines Kohlenhydratarray-Experiments. B: Derivatisierung des Glas-Trägers; C: Immobilisierung geeigneter funktionalisierter Kohlenhydrate als Sonden; D: Hybridisierung mit markierten Bindungspartnern als Probe. (Mit freundlicher Genehmigung aus der Dissertation von Jan Uwe Müller, Konstanz 2008).

1.4.2 Anknüpfungsmethoden und deren Chemie

Je nach Größe der aufgetragenen Spots unterscheidet man zwischen Makroarrays (Spotdurchmesser ist üblicherweise größer als 300 µm) und Mikroarrays (Spotdurchmesser ist üblicherweise kleiner als 200 µm). Der Träger zur Immobilisierung der Sonden wird passend zum jeweiligen Verwendungszweck gewählt. Dabei wird Glas aufgrund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften bevorzugt. Glas ist lange haltbar, besitzt eine geringe Eigenfluoreszenz, erträgt hohe Temperaturen und ist chemisch relativ inert.^[118] Darüber hinaus werden aber auch Polymere wie Polypropylen, Polystyrol, Nitrocellulose und Latex als Trägermaterial verwendet. Es wurde bereits eine Vielzahl an Verbindungen nach Isolierung aus biologischen/biochemischen Quellen (z.B. Proteine, DNA, ganze Zellen oder Gewebekomponenten) in Form sogenannter Biochips immobilisiert.^[117,119,120] Im Gegensatz dazu werden bei chemischen Chips definierte synthetisierte organische Verbindungen wie Peptide, Oligonucleotide, Kohlenhydrate oder andere Moleküle mit geringem Molekulargewicht (*small molecules*) immobilisiert. Die Verbindungen können entweder vor der Anknüpfung an den Träger synthetisiert werden (*ex situ*) oder man baut sie auf der festen Phase auf (*in situ*).

Betrachtet man die Art der Immobilisierung, so kann man weiterhin zwischen kovalenten und nicht-kovalenten, sowie chemoselektiven (spezifischen) und nicht-selektiven (nicht-spezifischen) Methoden unterscheiden:

Bei nicht-kovalenter und nicht-spezifischer Immobilisierung findet lediglich eine physikalische Adsorption der Moleküle durch ionische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche des Trägers statt. Ein typisches Beispiel hierfür ist die Adsorption von Proteinen auf hydrophoben Plastikoberflächen^[121], auf Nitrocellulose-Membranen^[122] oder auf kationischen Oberflächen wie Poly-L-Lysin^[123] und Aminosilanen^[124]. Unmodifizierte Kohlenhydratkonjugate wie Glycoproteine wurden ebenso an Nitrocellulose^[125] oder Polystyrol^[126] adsorbiert.

Bei nicht-kovalenten, spezifischen Methoden werden die Sondenmoleküle mit einem Anker-molekül (*tag*) kovalent verknüpft. Der *tag* bindet wiederum spezifisch, aber nicht kovalent, an einen immobilisierten Bindungspartner auf der Trägeroberfläche. Bekannte Systeme dieser Art stellen Avidin-derivatisierte^[127-130] oder Ni-NTA-derivatisierte Oberflächen^[131] dar, an die Sonden binden können, die entsprechend biotinyliert oder mit einem His-Tag versehen wurden. Im Falle von Kohlenhydrat-Arrays wurden modifizierte Zucker mit Alkylketten versehen und an Nitrocellulose, Polystyrol

oder Polyvinylidenfluorid adsorbiert.^[132-136] Des Weiteren wurden ebenso auch biotinylierte Glycane an Streptavidin-modifizierte Oberflächen und mit einem Fluor-Tag versehene Glycokonjugate an Fluoralkylsilane adsorbiert.^[137-141]

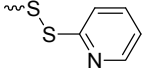

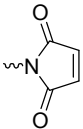
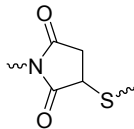
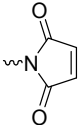
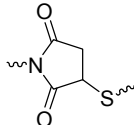
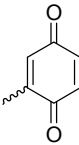

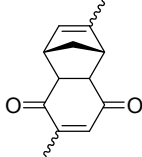
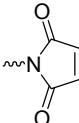

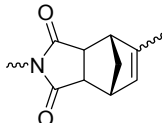
Für die Anknüpfung über kovalente Methoden muss die Trägeroberfläche durch vorher erfolgte Modifikationen mit definierten funktionellen Gruppen versehen sein. Es ergibt sich hierbei eine spezifische Immobilisierung, wenn lediglich eine einzige komplementäre funktionelle Gruppe im Sondenmolekül vorhanden ist. Sind mehrere solcher Funktionalitäten vorhanden, so führt dies zu einer nicht-spezifischen kovalenten Anbindung. Dies ist z.B. bei der Immobilisierung von Proteinen über die Aminofunktion der Lysinseitenketten an Aldehyd-^[142,143], Epoxy-^[131], Isothiocyanat-^[144] oder NHS-modifizierte^[145] Träger der Fall. Auch der Gebrauch von mit Phthalimid-^[146] oder Diazirinderivaten^[147,148] versehenen Oberflächen zur Immobilisierung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten über eine photochemische Reaktion gehört in diese Kategorie.

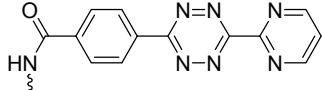
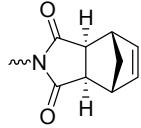
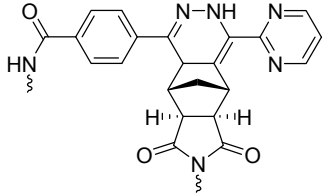



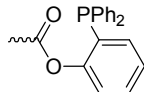


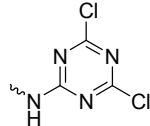
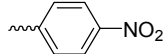
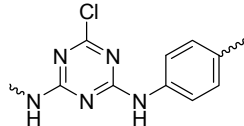




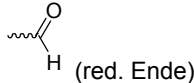



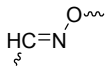

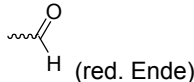
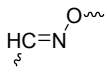






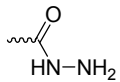
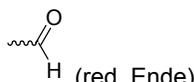
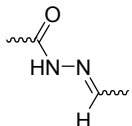
Spezifische Methoden besitzen den großen Vorteil, dass man eine klar definierte Anordnung der Sonden auf dem festen Träger erhält. Dafür muss die Sonde aber vor der Auftragung mit einer definierten funktionellen Gruppe derivatisiert worden sein. Durch kovalente Immobilisierungsstrategien kann verhindert werden, dass Sondenmoleküle während der nötigen Waschschriffe entfernt werden. Unter Umständen werden dadurch strengere Waschbedingungen ermöglicht, die die unspezifische Bindung anderer Moleküle verhindern. Für eine kovalente und spezifische Immobilisierung von Kohlenhydraten steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung. Bei der Funktionalisierung der Kohlenhydrate besteht die Möglichkeit einen Spacer einzuführen, um damit einen gewissen Abstand der Zucker zur Oberfläche zu gewährleisten, der für zu beobachtende Bindungsphänomene oder Reaktionen wichtig sein kann. Die wichtigsten Methoden zur spezifischen und kovalenten Immobilisierung bei der Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays können Tabelle 1.1 entnommen werden.

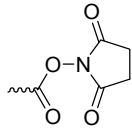







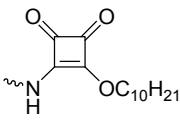
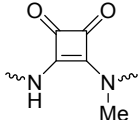

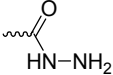
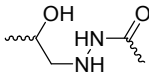

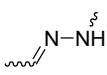


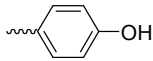
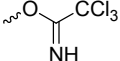
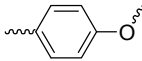
Thiol-modifizierte Monosaccharide können durch einen Disulfidaustausch auf Goldoberflächen immobilisiert werden.^[149] Die Gruppen um Shin, Mrksich und Seeberger nutzten die Michael-Addition von Maleinimid-derivatisierten Kohlenhydraten/Oberflächen mit Thiol-funktionalisierten Oberflächen/Kohlenhydraten.^[150-155] Aufgrund der Tatsache, dass viele Biomoleküle bereits Thiolgruppen enthalten, ist dieser Ansatz allerdings nur eingeschränkt nutzbar. Von größerer Bedeutung zur Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays sind Methoden, bei denen bioorthogonale

Ligationsreaktionen zum Einsatz kommen. Die Gruppen von Mrksich und Chaikof untersuchten die Verwendung der Diels-Alder-Reaktion Cyclopentadienylglycosiden mit Benzochinon- bzw. Maleinimid-derivatisierten Oberflächen. ^[156,157] Henning Beckmann *et al.* entwickelten ein Chipsystem, bei dem Kohlenhydrate über eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) immobilisiert werden. Dabei wurden Kohlenhydrate mit Norbornenfunktionalität und eine Tetrazin-derivatisierte Oberfläche verwendet. ^[158] Eine der am häufigsten verwendeten Reaktionen zur Immobilisierung ist die Click-Reaktion von Azid-derivatisierten Zuckern mit Alkin-modifizierten Trägern. ^[132,134,159-162] Die Gruppe um Waldmann verwendete die sogenannte Staudingerligation zur kovalenten Verknüpfung von ebenfalls mit Azidgruppen versehenen Kohlenhydraten mit Phosphan-derivatisierten Oberflächen. ^[163,164] Dabei entsteht eine stabile Amidbindung, welche auch durch die Reaktion von Amino- oder Carboxyl-funktionalisierte Kohlenhydrate mit entsprechend derivatisierten Trägern nach geeigneter Aktivierung erhalten werden kann. ^[164-174]

Tabelle 1.1: Immobilisierungsmethoden zur Darstellung von Kohlenhydratarrays

Funktionalität des Trägers	Funktionalität des Kohlenhydrats	Resultierende Bindung	Literatur
	~SH		[175]
~SH			[150,151]
	~SH		[152-155]
			[156]
			[157]

Funktionalität des Trägers	Funktionalität des Kohlenhydrats	Resultierende Bindung	Literatur
			[158]
			[132,134,159-162]
			[163,164]
			[176,177]
			[178,179]
			[180]
			[181]
			[182,183]
			[173]
			[173]
			[182,184]

Funktionalität des Trägers	Funktionalität des Kohlenhydrats	Resultierende Bindung	Literatur
	$\sim\text{NH}_2$		[165-172]
$\sim\text{NH}_2$			[173,174]
	$\sim\text{NH}_2$		[164]
$\sim\text{NHMe}$			[185-187]
$\sim\text{NHMe}$			[188]
			[189,190]
$\sim\text{NH}_2$			[191]
$\sim\text{NH}_2$			[179,192]
			[193]

Eine weitere Möglichkeit Kohlenhydrat-Arrays aufzubauen ist die Umsetzung Amino-derivatisierter Kohlenhydrate mit einer Aldehyd-beschichteten Oberfläche (oder umgekehrt) zu einem Imin (Schiffsche Base).^[178-180] Hierbei handelt es sich allerdings um eine reversible Reaktion, weshalb sie eigentlich nicht für eine Immobilisierung sinnvoll ist. Wird das Imin in einem zweiten, irreversiblen Schritt aber durch reduktive Aminierung zu einem sekundären Amin umgewandelt, so lässt sich eine stabile Bindung an den Träger verwirklichen.^[173] Bei der Verwendung von nicht-funktionalisierten Kohlenhydraten zum Aufbau von Arrays kann die Tatsache ausgenutzt werden, dass diese am reduzierenden Ende in ihrer offenkettigen Form

eine Aldehyd-Funktion besitzen. Diese lässt sich mit Amin-^[180], Aminoxy-^[181] oder Hydrazid-funktionaliserten^[182,184] Oberflächen umsetzen. Im Aminoxy-Fall entstehen dabei Oxime, bei denen die offenkettige Form der immobilisierten Kohlenhydrate bevorzugt wird. Das stellt einen erheblichen Nachteil dar, wenn das Kohlenhydrat-epitop am reduzierenden Ende für die Erkennung des Bindungspartners während des Arrayexperiments verantwortlich ist. Dieser Nachteil kann durch die Verwendung von sekundären statt primären Aminen umgangen werden, wodurch man bevorzugt die Ringform des immobilisierten Kohlenhydrats erhält.^[140]

1.4.3 Anwendungen von Kohlenhydratarrays

Kohlenhydrat-Arrays sind inzwischen zur Untersuchung verschiedenster Interaktionen mit anderen Biomolekülen eingesetzt worden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf Interaktionen von Lectinen mit Kohlenhydraten. Lectine sind Proteine, die spezifisch Kohlenhydrate binden, aber weder Antikörper noch Enzyme sind. So können neben der Untersuchung bekannter Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen auch die Wechselwirkung mit bisher unbekanntem Kohlenhydrat-erkennenden Proteinen nachgewiesen werden. Neben der Selektivität bzw. Spezifität dieser Bindungen, ist es möglich, über die Bestimmung der K_D - und IC_{50} -Werte Aussagen über deren Stärke zu treffen. Eine weitere Anwendung mit medizinischer Bedeutung ist die Identifizierung von Antikörpern im menschlichen Blutserum, welche spezifisch an bestimmte Kohlenhydrate binden. So ist bereits seit längerem bekannt, dass sich die Glycocalix bestimmter Zelltypen bei Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Menschen verändert und dadurch eine andere Antikörperzusammensetzung gefunden werden kann. Es besteht die Hoffnung, dass Kohlenhydrat-Arrays zu Diagnosezwecken bei Krebserkrankungen herangezogen werden können und in naher Zukunft eine unverzichtbare Hilfe darstellen. Inzwischen wurden auch die Aktivität und Spezifität Kohlenhydrat-modifizierender Enzyme mittels Array-Technologie untersucht. Zur Sequenzierung komplexer Glycokonjugatstrukturen werden oft massenspektrometrische Methoden herangezogen. So wurde nun auch die Kombination aus Kohlenhydrat-Array und MS-Analyse publiziert. Interessanterweise ist es sogar gelungen, die spezifischen Interaktionen ganzer Zellen mit Kohlenhydraten auf Arrays nachzuweisen. Es verwundert daher nicht, dass bereits erste Kohlenhydrat-Arrays kommerziell erhältlich sind. Reaktionen mit Kohlenhydraten, die zu neuen kovalenten Bindungen führen, wurden bisher allerdings noch nicht auf einem festphasengebundenen Arraysystem untersucht.

1.5 Murein

1.5.1 Vorkommen und Struktur

Fast alle Bakterien sind von einer Zellwand aus Peptidoglycanen umgeben, welche als Exoskelett fungiert und so der Zelle ermöglicht, dem immensen intrazellulären osmotischen Druck standzuhalten. Das als Murein^[194] bezeichnete Peptidoglycan besteht aus längeren Oligosaccharidsträngen, welche über kurze Peptidketten quervernetzt sind. Die Zuckerketten setzen sich aus den β -1,4-glycosidisch alternierend verknüpften Aminozuckern N-Acetylglucosamin(GlcNAc) und N-Acetylmuramin-säure (MurNac), zusammen. Die Peptidketten sind über den Milchsäureetherrest an der 3-Postion von MurNac mit dem Glycanstrang verbunden.

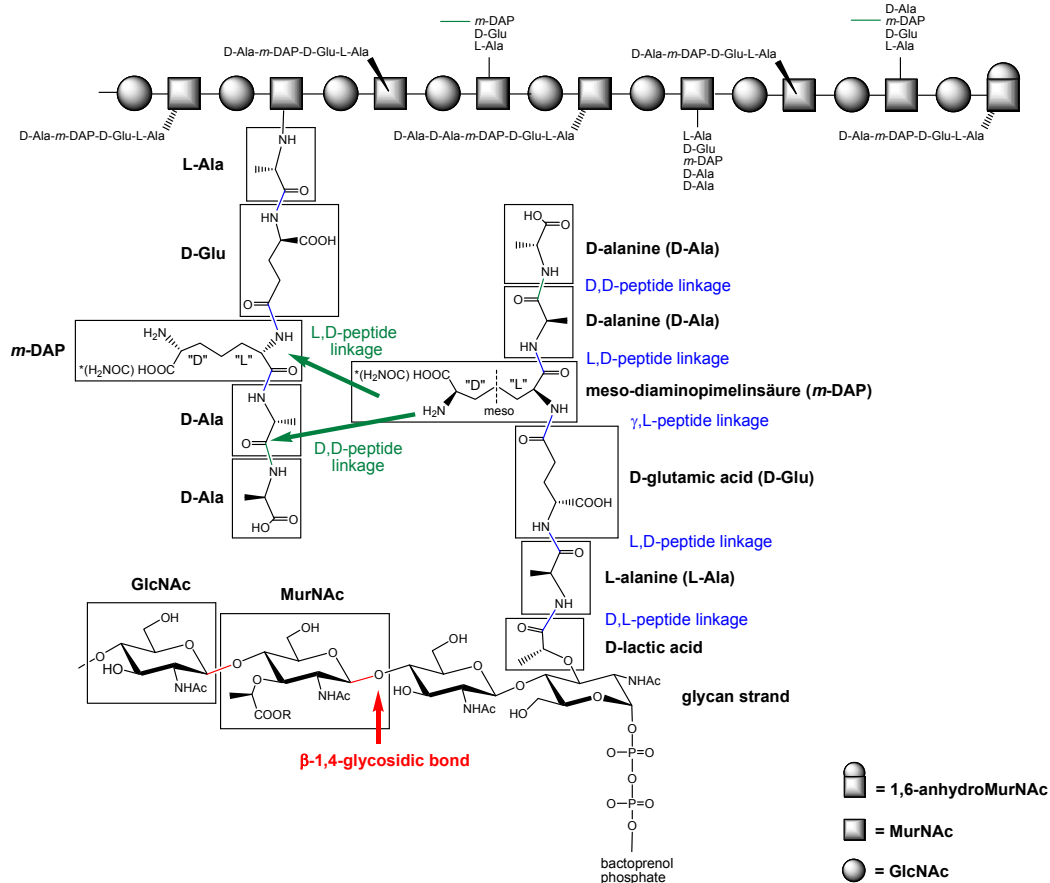


Abb. 1.40: Struktur des Mureins aus *E. coli* und Angriffsorte für die Enzyme der Biosynthese (grün) und des Abbaus des Mureins (rot).^[195]

Durch den sterischen Anspruch der Peptidketten entsteht eine helikale Struktur, im Gegensatz zur planaren Anordnung von Cellulose in Pflanzen. Dabei sind in einer Windung der Helix vier GlcNAc-MurNac-Peptide enthalten. Bei Gram-negativen Bakterien ist der sogenannte Mureinsacculus einschichtig, während er bei Gram-positiven aus mehreren Schichten besteht, mit einer Dicke von bis zu 100 nm.^[196] Der Glycanteil des Mureins sorgt für dessen Rigidität, während der Peptidteil relativ flexibel ist und sich auf das Vierfache strecken kann. Die Peptidkette beinhaltet ungewöhnliche D-Aminosäuren und dementsprechend auch Peptidbindungen, die von den normalen Peptidasen nicht angegriffen werden können. Bakterien besitzen für deren Abbau in Form von D,D- und L,D-Carboxypeptidasen und D,D-Endopeptidasen spezielle Autolysine. Eine schematische Übersicht über die Struktur des Mureins bei *E.coli* kann Abb. 1.40 entnommen werden.

1.5.2 Enzymatischer Auf- und Abbau der bakteriellen Zellwand bei Bakterien

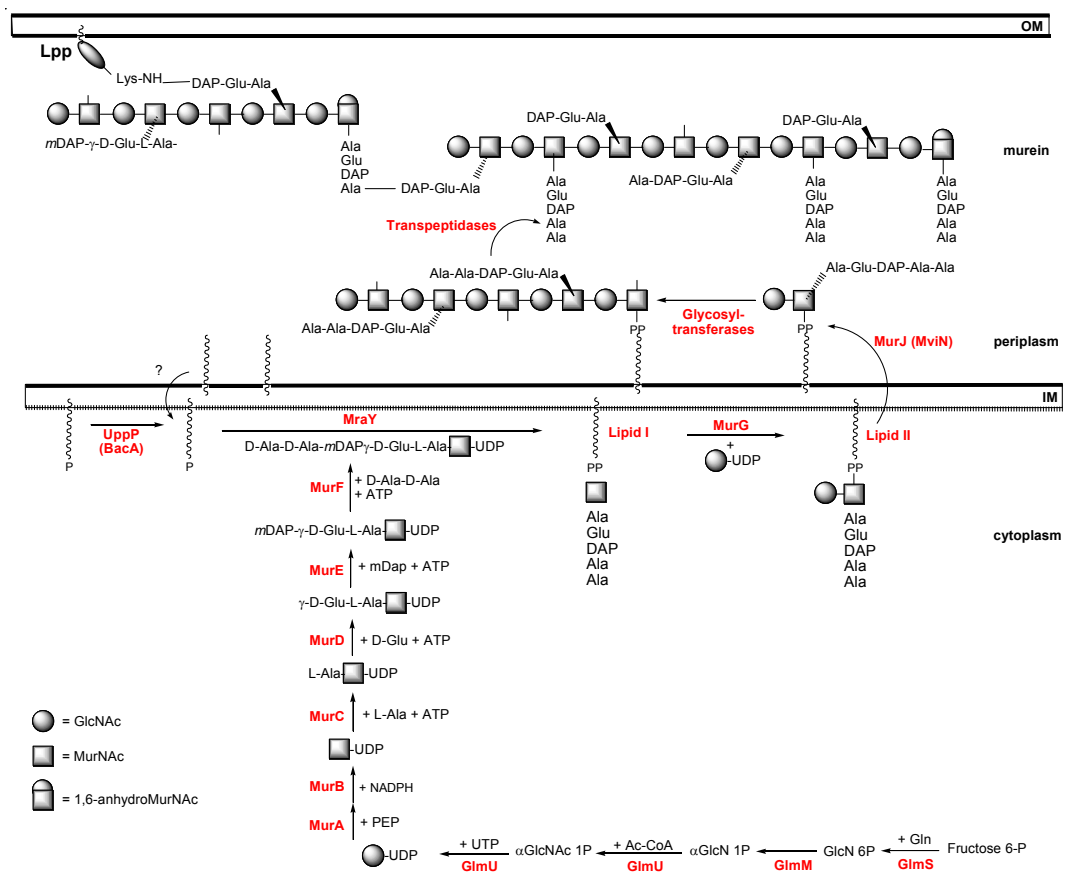


Abb. 1.41: Biosyntheseweg des Peptidoglycans in *E. coli* and *B. subtilis*.^[197]

Die Biosynthese der bakteriellen Zellwand findet außerhalb der Zelle statt, indem Glycosyltransferasen aus Lipid II, eine membrangebundene aktivierte Peptidyl-Disaccharidvorstufe, den Glycanstrang des Mureins synthetisieren. Lipid II selber wird vorher im Cytosol gebildet und über einen bisher unbekanntem Mechanismus durch die Zellmembran von innen nach außen bewegt. Transpeptidasen katalysieren schließlich die Quervernetzung der Glycanstränge. Penicillin und andere β -Lactam-Antibiotika hemmen durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum D-Ala-D-Ala-Rest den Aufbau der bakteriellen Zellwand, indem sie irreversibel kovalent an die Transpeptidasen binden. Beim Wachstum von Bakterien wird die Mureinaußenhülle ständig vergrößert. Dabei darf zu keinem Zeitpunkt ein Loch in der Struktur entstehen. Je nach Bakterienart werden dazu verschiedene Mechanismen diskutiert. Bei Gram-positiven Bakterien kann man sich den Wachstumsprozess wie eine Art Häutung vorstellen, bei dem unter der alten Mureinschicht eine neue gebildet wird, bevor die alte durch Autolysine abgebaut wird. Auch bei der Neusynthese von Murein im Fall von Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli*^[198] gibt es ein genau koordiniertes Zusammenspiel von Aufbau- (Glycosyltransferasen, Transpeptidasen) (Abb. 1.41) und Abbauprozessen (Abb. 1.42) (Glycosidasen und Peptidasen). Aufgrund der Tatsache, dass diese nur eine einzige Mureinschicht besitzen, läuft der Prozess erheblich komplizierter ab als bei Gram-positiven Bakterien.

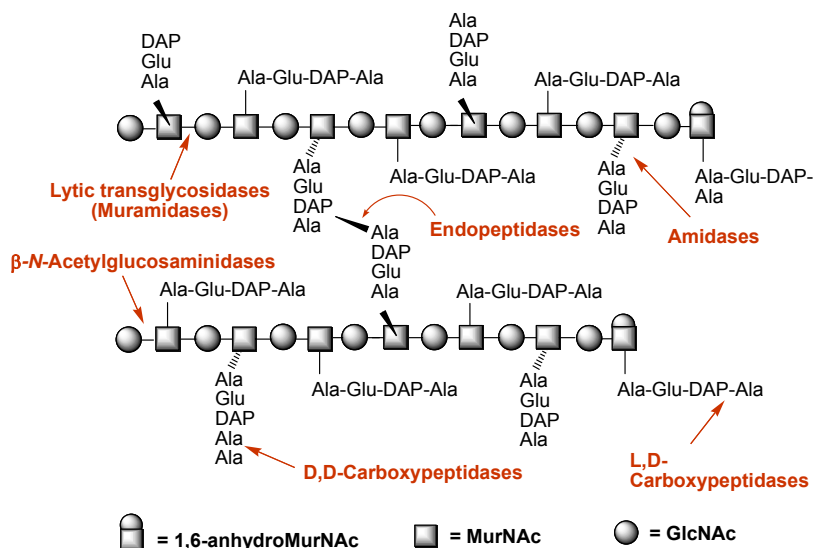


Abb. 1.42: Enzymatischer Abbau des Mureins. Die Spaltstellen der entsprechenden in rot angegebenen Enzyme sind durch Pfeile verdeutlicht.^[197]

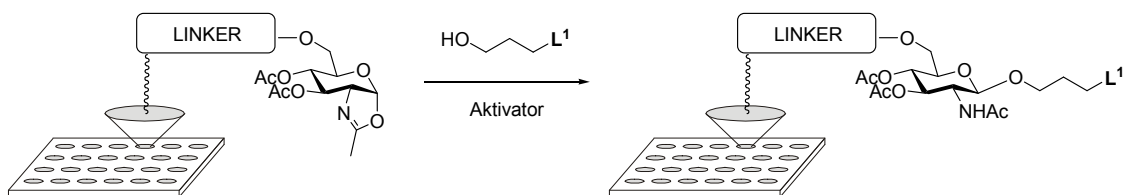
Der Abbau des Mureins ist immens: Pro Generation wird ungefähr die Hälfte des Mureins wieder abgebaut. Die abgebauten Bausteine werden in einer Art Recyclingprozess dem Neuaufbau der bakteriellen Zellwand wieder zugeführt. Dies konnte für *E. Coli* bereits gezeigt werden.^[199]

2 Konzeption und Aufgabenstellung

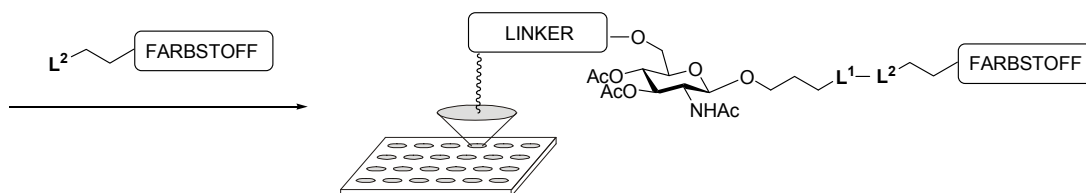
2.1 Aufbau eines Chip-basierten Testsystems zur Detektion neuer Aktivatoren für den Einsatz von Zuckeroxazolinolen als Glycosyldonoren

Wie in Abschnitt 1.2 erläutert, gehören Glycoside der 2-Amino-2-desoxyzucker zu den wichtigsten Bestandteilen natürlich vorkommender Oligosaccharide und Glycokongulate. Das immense Potential der Verwendung von Oxazolinolen als Glycosyldonoren zur Herstellung dieser Verbindungen liegt darin, dass keine weiteren Aminoschutzgruppen eingeführt werden müssen. Die gewünschte natürliche Acetamidofunktion wird direkt erhalten und die stereospezifische Reaktionsführung führt ausschließlich zum 1,2-*trans*-Glycosid. Da Oxazolinole im Vergleich zu anderen Glycosyldonoren unreaktiver sind, müssen allerdings geeignete Bedingungen und Aktivatoren eingesetzt werden. Um bisher unbekannte, effiziente Aktivatoren für die Oxazolinolemethode zu finden, wäre es von großem Vorteil, ein einfaches und schnelles Testsystem zur Hand zu haben. Besonders wertvoll wäre ein System in Analogie zu Kohlenhydrat-Chips mit einem immobilisierten Oxazolinole, wie es in Abb. 2.1 dargestellt ist. Somit stünde durch Kompartimentierung der festen Phase in einzelne Reaktionsräume ein System zur Verfügung, welches eine parallele und schnelle Evaluation möglicher Aktivatoren erlaubt. Das Ziel dieser Arbeit war somit zunächst die Entwicklung eines synthetischen Zugangs zu einem Oxazolinole, welches auf feste Träger immobilisiert werden kann. Danach sollte ein für das Testsystem geeigneter Glycosylakzeptor gefunden und synthetisiert werden. Während meiner Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass es beim Einsatz fluoreszenzmarkierter Alkohole zur Wechselwirkung zwischen Aktivatoren und Chromophoren während der Glycosylierung (**Schritt 1** in Abb. 2.1) kommen kann. Daher sollte ein Glycosylakzeptor ohne Fluoreszenzmarkierung verwendet werden. Dieser muss dann aber so funktionalisiert sein (mit der funktionellen Gruppe L^1), dass er nach der Glycosylierung in einer Ligationsreaktion (**Schritt 2** in Abb. 2.1) zur Visualisierung der Reaktion mit einem entsprechend modifizierten Fluoreszenzfarbstoff (mit der zu L^1 komplementären funktionellen Gruppe L^2) umgesetzt werden kann. Der Umsatz der Glycosylierung kann schließlich durch Messung der Fluoreszenz an einem Array-Scanner ausgelesen und bewertet werden (**Schritt 3** in Abb. 2.1).

1. Glycosylierung



2. Farbstoffligation



3. Auswertung am Array-Scanner

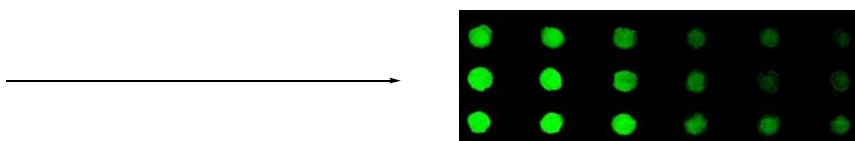


Abb. 2.1: Aufbau eines Testsystems für die Evaluierung neuer Oxazolinaktivatoren. Im ersten Schritt wird ein auf einem festen Träger immobilisiertes Oxazolin mit einem Testalkohol als Glycosylakzeptor und den zu untersuchenden Aktivator umgesetzt. Das entstandene Konjugat trägt eine funktionelle Gruppe L^1 , welche in einer Ligationsreaktion mit der funktionellen Gruppe L^2 an einem entsprechend modifizierten Fluoreszenzfarbstoff reagiert. Im letzten Schritt kann die Fluoreszenzintensität an einem Array-Scanner ausgelesen werden und somit der Umsatz der Glycosylierung indirekt bestimmt und bewertet werden.

Nach der Synthese der Farbstoffe kann die Reaktionsfolge zunächst in Lösung getestet werden, bevor die Reaktionsbedingungen mit allen hergestellten Testsystemelementen und einem bekannten Aktivator auf dem Chip optimiert werden können. Daraufhin sollte eine Beurteilung neuer möglicher Aktivatoren mit dem Testsystem durchgeführt werden.

2.2 Untersuchungen zur Glycosylierung mit Oxazolinen als Glycosyldonoren

Neben dem zu entwickelnden Testsystem auf fester Phase war es ein Ziel dieser Arbeit, verschiedene potentielle Aktivatoren für die Oxazolinmethode in Lösung zu untersuchen. Die Ergebnisse des Screenings in Lösung können dann mit denen des Chip-Systems verglichen werden. Ein Vergleich neuer identifizierter Aktivatoren mit CuCl_2 in relevanten Synthesen sollte ebenso erfolgen. Die bereits von Wittmann und Lennartz veröffentlichte Methode zur milden Glycosylierung von Oxazolinen mit CuCl_2 wurde bisher nur auf wenige Glycosylakzeptoren und ausschließlich zur Synthese von *N*-Acetylglucosaminglycosiden angewendet. Daher sollten im Rahmen meiner Arbeit kupferaktivierte Glycosylierungen mit weiteren Akzeptoren durchgeführt, sowie weitere Oxazolindonoren untersucht werden. Interessante Vertreter sind hierbei das von GalNAc abgeleitete Oxazolin, die Furanoseform des von GlcNAc abgeleiteten Oxazolins, als auch Disaccharidoxazoline.

2.3 Strukturelle Untersuchungen eines Kupfer (II)-Zuckeroxazolinkomplexes

Der genaue Mechanismus der von Wittmann und Lennartz entwickelten Oxazolinmethode unter Aktivierung mit CuCl_2 ist nicht bekannt. Bei Zugabe des Kupferchlorids, welches als Lewisäure zur Aktivierung eingesetzt wird, kommt es zu einer charakteristischen Verfärbung der Lösung. Eine aufgestellte Hypothese ist die Bildung eines Kupferkomplexes, der das aktivierte Intermediat der Glycosylierung darstellt. Diese Vermutung wird durch bekannte analoge Strukturen anderer Kupfer(II)komplexe mit Oxazolinliganden ohne Kohlenhydratanteil gestützt. Die Kenntnis der Struktur könnte zum Verständnis der kupferaktivierten Glycosylierung beitragen. Aufgrund der paramagnetischen Natur von Cu(II) sollte das Intermediat / der Komplex neben ESI-MS und IR auch mit EPR untersucht werden.

2.4 Synthese von 2-Desoxy-2-Aminozuckern als Substrate zur Untersuchung der Enzymaktivität bei bakteriellem Zellwandrecycling

Die Arbeitsgruppe um PD Dr. C. Mayer an der Universität Konstanz erforscht den Recycling-Stoffwechsel des wichtigen bakteriellen Zellwandbestandteils Murein bei *E. coli* und bei *Bacillus subtilis*, einem Gram-positiven Bakterium, das oft als Modellorganismus verwendet wird. Sie konnten dabei den genauen Stoffwechselweg und den dazugehörigen Gencluster identifizieren, der aus sechs Genen besteht. Diese Gene codieren für Enzyme, die für den Abbau der *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und des *N*-Acetylglucosamins (GlcNAc) im Murein verantwortlich sind. Zur Untersuchung der isolierten Enzyme und Bestimmung ihrer kinetischen Konstanten (Michaelis-Menten-Kinetik) werden die beta-Anomere der 4-Methylumbelliferon-glycoside der Enzymsubstrate benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher unter Zuhilfenahme der Oxazolinmethode Synthesen für diese fluoreszenzmarkierten Kohlenhydratsubstrate entwickelt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aufbau eines Chip-basierten Testsystems

3.1.1 Synthese eines zur Immobilisierung geeigneten Zuckeroxazolins

Synthesestrategie und Schutzgruppendesign

Zur Darstellung von Oxazolinen zur Anknüpfung an die feste Phase muss retrosynthetisch betrachtet, ein Zugang zu Verbindung **88** gefunden werden. Zur Kuppelung verschiedener möglicher Linker an die 6-Position muss diese selektiv entschützt sein. Danach kann der Oxazolinring durch Aktivierung eines *n*-Pentenylglycosids in einer intramolekularen Reaktion geschlossen werden, bevor der Zucker immobilisiert wird. **88** lässt sich aus dem entsprechenden peracetylierten Glycosid **35** herstellen, welches sich aus Glucosamin (**89**) synthetisieren lässt (Abb. 3.1).

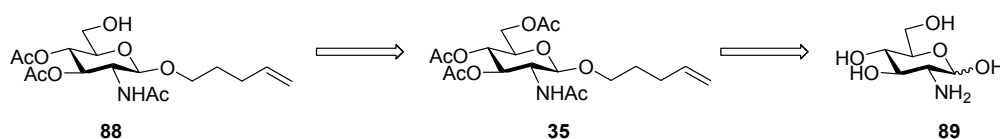


Abb. 3.1: Retrosynthetische Analyse zur Synthese des Pentenylglycosids **88**.

Der geplante Syntheseweg für den Baustein **88** kann Abb. 3.2 entnommen werden. Ausgehend von **25** sollte durch Glycosylierung mit 4-Penten-1-ol (**90**) der Zucker **35** dargestellt werden. Die Hydrolyse der Acetylester unter Zemplén-Bedingungen sollte zum Triol **91** und eine anschließende selektive Einbringung der Mmt-Schutzgruppe in die 6-Position sollte zum Diol **92** führen. Nach Peracetylierung der zwei freien OH-Gruppen des Glycosids **92** mit Essigsäureanhydrid zu **93** sollte es möglich sein, die 6-Position mit 80%iger Essigsäure selektiv zu entschützen. Der so erhaltene Zucker **88** kann nun mit verschiedenen Linkern R versehen werden. Durch Aktivierung des *n*-Pentenylglycosids mit Hilfe von NIS/Et₃SiOTf sollte ein Ringschluss zum Oxazolin erfolgen.

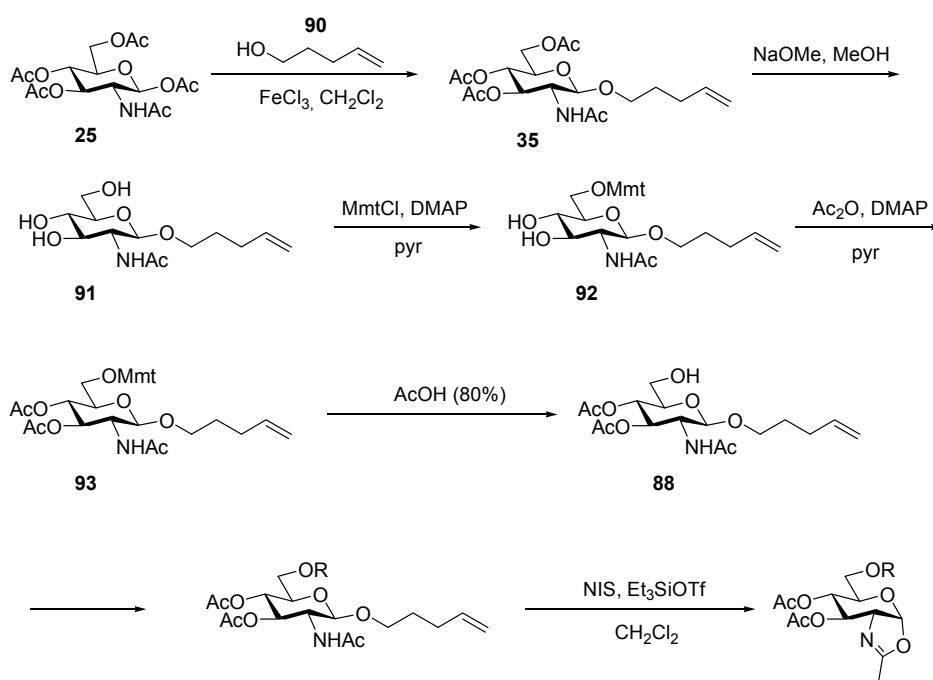


Abb. 3.2: Geplanter Syntheseweg zum Pentenylglycosid **88** und weitere Umsetzung zum linker-verbundenen Oxazolin.

Synthese des Oxazolins zur Immobilisierung auf modifizierten Glaträgern

Glucosamin **89** wurde nach einer Vorschrift von Takeda *et al.* mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zu **25a** peracetyliert. Dabei erhielt man den Zucker nach Umkristallisation als beinahe reines α -Anomer.^[200]

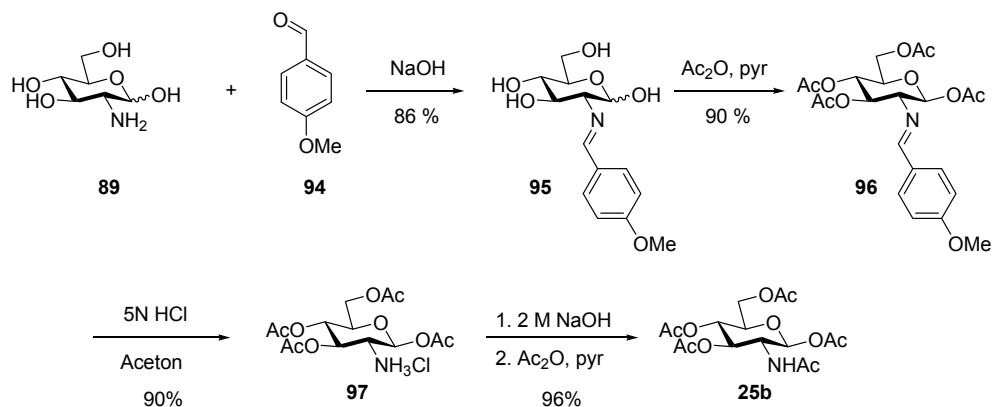


Abb. 3.3: Synthese von 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**25b**).

Für eine weitere geplante Umsetzung zum *n*-Pentenylglycosid nach einer Vorschrift von Peter *et al.* [201] wird allerdings das reaktivere β -Anomer **25b** benötigt. Dieses konnte wie in Abb. 3.3 gezeigt unter Zuhilfenahme von Anisaldehyd nach einer bekannten Literaturvorschrift [202] synthetisiert werden, bzw. ist inzwischen auch kommerziell verfügbar (Firma Glycon, www.glycon.de).

Für die Glycosylierung wurde FeCl_3 als Lewis-Säure eingesetzt. Man erhielt so das gewünschte Produkt **35** in mäßigen Ausbeuten von 58 %. Eine weitere Alternative stellt die direkte Reaktion ausgehend vom Oxazolin **4** unter Verwendung von CSA, CuCl_2 oder ZnCl_2 als Aktivator dar. Die anschließende Entschützung der O-Acetylgruppen mit katalytischen Mengen NaOMe in MeOH zu **91** gelang in quantitativen Ausbeuten in 30 min. Für ein selektives Schützen der primären OH-Gruppe wurde die sterisch anspruchsvolle Monomethoxytritylgruppe (Mmt) über ihr Chlorid eingeführt (Abb. 3.4).

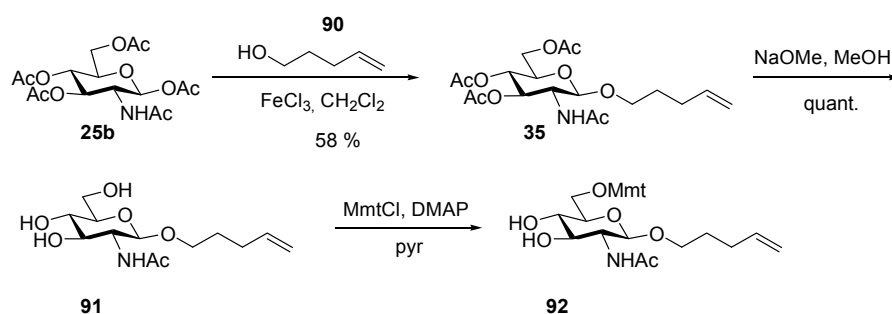


Abb. 3.4: Synthese des Mmt-geschützten Zuckers **92**.

Da die anschließende Peracetylierung ebenfalls in Pyridin mit DMAP als Katalysator stattfand, war es möglich, beide Reaktionen in einer sequentiellen Eintopfreaktion durchzuführen. Nach 48 h wurde kein weiterer Reaktionsumsatz zum Diol **92** beobachtet. Es wurden 4.4 eq Essigsäureanhydrid zur Reaktionslösung zugetropft. Auf diese Weise wurde **92** in einer sehr guten Gesamtausbeute von 80 % über zwei Stufen erhalten.

Bei der nun folgenden Entschützung zum wichtigen Zwischenprodukt **88** zeigte sich der Vorteil der Verwendung von Mmt als Schutzgruppe im Vergleich zur analogen Tritylschutzgruppe. Die Entschützung unter essigsäuren Bedingungen dauerte lediglich 12 h statt 48 h, ohne dass die Ausbeute verringert wurde. Die Acetylschutzgruppen wie auch der *n*-Pentenylrest erwiesen sich unter den Abspaltbedingungen wie erwartet als stabil und wurden nicht entfernt.

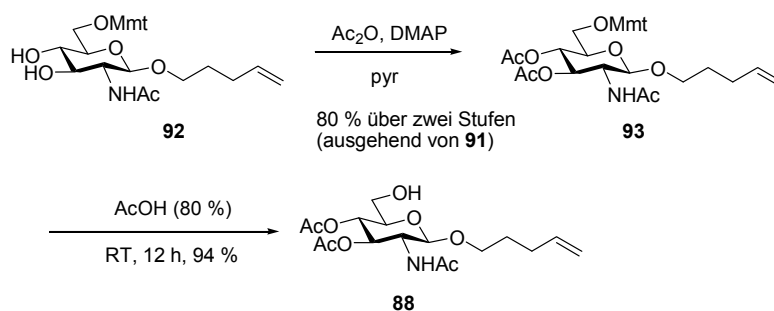


Abb. 3.5: Synthese des Glycosids **88** mit freier 6-OH-Gruppe.

Die Art des Linkers, der an die 6-Position angeknüpft werden soll, wird durch die verfügbaren Funktionalitäten der festen Phase und der damit verbundenen Immobilisierungschemie festgelegt. In meiner Arbeit wurden zwei verschiedene Linker eingefügt. Zum einen ein Linker, der an seinem Ende eine benzylgeschützte Carbonsäure trug, welche nach Entschützung zur Anknüpfung an mit Aminen beladene Oberflächen dienen sollte. Der zweite verwendete Linker sollte nach Entschützung am Ende der Synthesesequenz ein freies Amin tragen, um dieses auf entsprechend reaktiven Oberflächen wie z.B. Isothiocyanaten kovalent immobilisieren zu können.

Im ersten Fall wurde **88**, wie bereits in meiner Diplomarbeit durchgeführt, mit einem geringen Überschuss (1.2 eq) an zuvor hergestelltem Bernsteinsäuremonobenzylester (**96**) (MBE) (Abb. 3.6) unter Steglich-Bedingungen mit einer Ausbeute von 80% verestert. Ausgehend von **97** sollte nun die Ringschlussreaktion zum Zuckeroxazolin nach Aktivierung des *n*-Pentenylrests mit Hilfe von NIS erfolgen. Der Ringschlussmechanismus ist in Abb. 3.8 zu sehen. Die Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 59 % durchgeführt werden und war bereits nach 20 min beendet (Abb. 3.7).

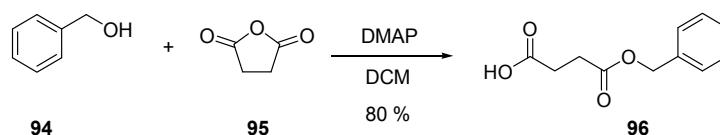


Abb. 3.6: Synthese des Bernsteinsäuremonobenzylesters (**96**) (MBE).

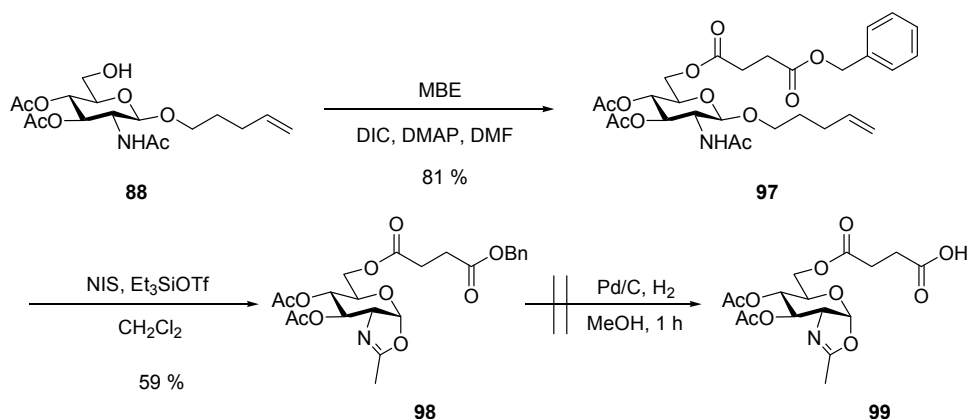


Abb. 3.7: Geplante Synthese des Oxazolins **99** mit Carbonsäurelinker.

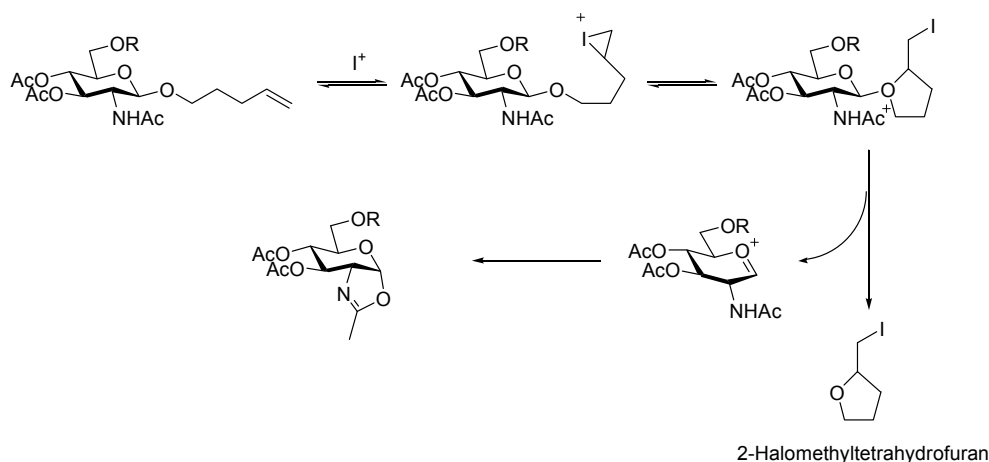


Abb. 3.8: Ringschlussmechanismus nach NIS-Aktivierung von n-Pentenylglycosiden zum Oxazolin.

Die Entschützung zur freien Carbonsäure **99** sollte durch hydrogenolytische Spaltung des Benzylesters **98** erfolgen. Unter allen untersuchten Bedingungen wurde neben der Esterspaltung stets auch eine Reduktion des Oxazolinrings beobachtet. Damit lieferte dieser Syntheseweg kein Zuckeroxazolin, welches auf Aminoberflächen durch Knüpfung einer Amidbindung direkt immobilisiert werden könnte.

Im zweiten Fall fiel die Wahl auf eine Anknüpfung eines einfach geschützten Diaminolinkers mit kurzem Ethylenglycol-Spacer. Diese Vorgehensweise hat mehrere Vorteile gegenüber der vorangegangenen Synthese. Zunächst wird statt einer vergleichsweise instabilen Esterbindung ein Urethan bei der Anknüpfung des Linkers erzeugt. Des Weiteren ist der Linker erheblich länger und kann dafür sorgen, dass das immobilisierte Oxazolin weit genug von der Oberfläche entfernt ist, um reagieren zu können. Der Linker wurde ausgehend von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**100**) in drei Stufen

synthetisiert. Dazu wurde ein großer Überschuss an Diamin zunächst mit Boc_2O einfach geschützt. Nach einer einfachen Aufreinigung durch mehrfache Extraktion mit DCM, wurde die zweite Aminogruppe mit FmocOSu zum gemischten Diurethan **102** umgesetzt. Nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit TFA erhielt man den gewünschten Linker **103** in einer Gesamtausbeute von 76 % über drei Stufen. Eine direkte Umsetzung des Diamins **100** zum einfach mit Fmoc geschützten Derivat **103** ist möglich, empfiehlt sich aber aufgrund der schwierigeren Aufreinigung nicht.

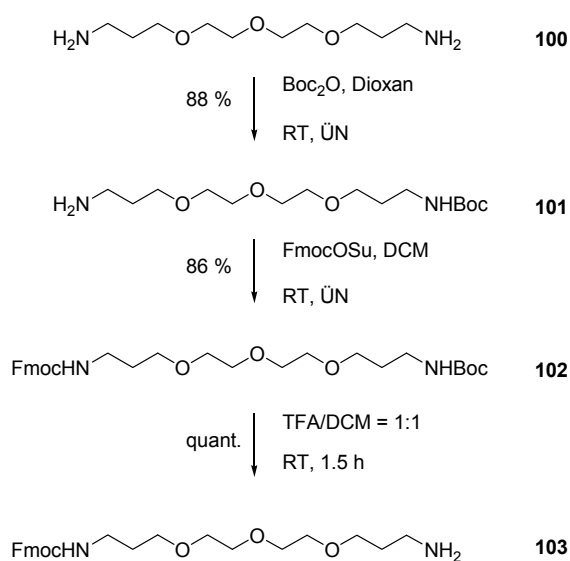


Abb. 3.9: Synthese des einfach Fmoc-geschützten Diaminolinkers **103**.

Vor der Anknüpfung des Linkers an den Zucker **88** muss die freie OH-Gruppe zuerst zu einer aminoreaktiven Gruppe aktiviert werden. Dies wurde in meiner Arbeit durch Umsetzung zu einem Aktivcarbonat mit *para*-Nitrophenylchloroformiat (**104**) ermöglicht. Dabei konnte eine Nebenproduktbildung zum Isomer **109** beobachtet werden (Abb. 3.10), bei der eine Acylwanderung stattgefunden hatte. Das Nebenprodukt, das in einer Ausbeute von 4 % entstand, konnte durch Säulenchromatographie entfernt werden. Der so hergestellte aktivierte Zucker **105** konnte nun mit dem Linker **103** in guten Ausbeuten von 84 % gekuppelt werden. Die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe besitzt den Vorteil, dass jetzt der Ringschluss zum Oxazolin **107** durchgeführt werden kann, ohne dass ein Amin als konkurrierendes Nucleophil anwesend ist.

Der säure- und hydrogenolytisch labile Oxazolinring bleibt unter den schwach basischen Bedingungen zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe stabil. Allerdings muss hier da-

rauf geachtet werden, dass kein zu basisches System gewählt wird, bei dem die Acetylgruppen mit abgespalten werden. In unserem Fall konnte dies durch Behandlung mit DMF/Morpholin = 9:1 erreicht werden. Zur Lagerung wurde das stabilere Fmoc-geschützte Oxazolin **107** verwendet, welches immer direkt vor Gebrauch zur Verbindung **108** entschützt wurde (Abb. 3.10).

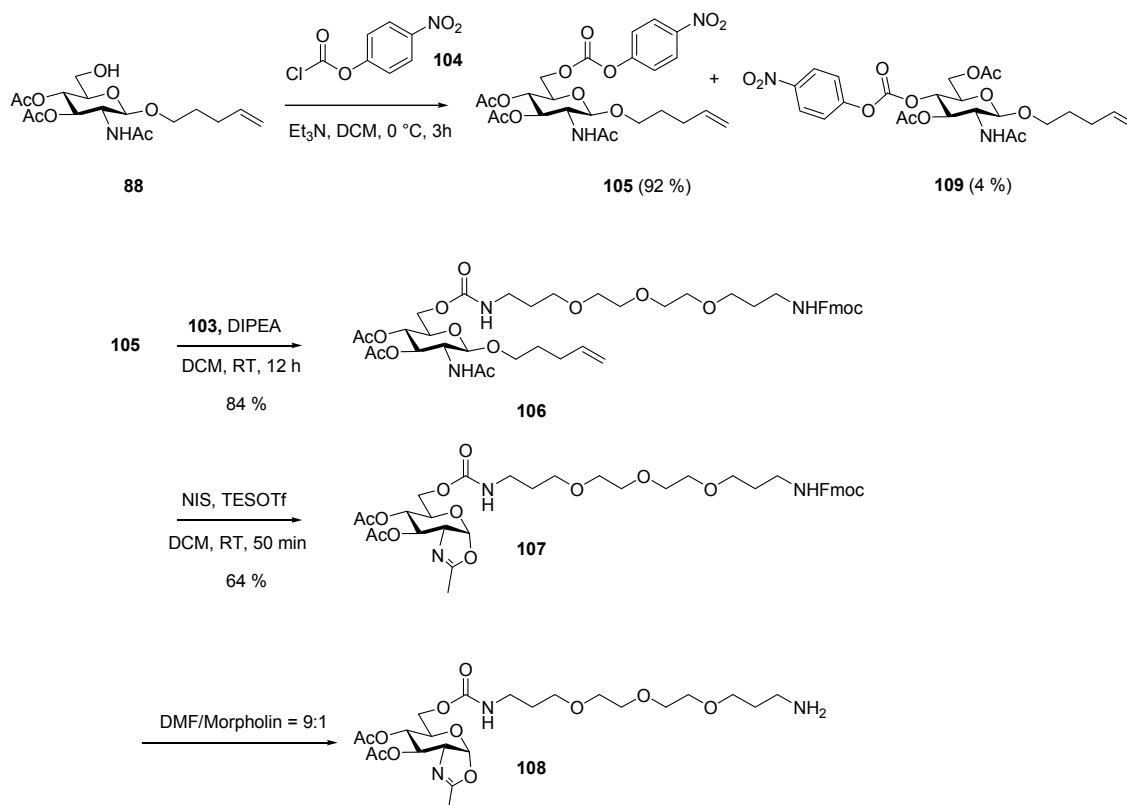


Abb. 3.10: Synthese des Oxazolins **108** zur Anknüpfung an aminoreaktive Oberflächen.

3.1.2 Chipsystem unter Verwendung der Maleinimid-Thiol-Ligation (Michael-Addition)

3.1.2.1 Testglycosylierung in Lösung

Die Reaktionskontrolle bei herkömmlichen organischen Reaktionen in Lösung ist viel einfacher zu bewerkstelligen als bei Reaktionen auf Chipoberflächen, da hier nur der letzte Schritt, der zu einer Markierung des gewünschten Produkts führt, direkt quantifiziert werden kann. Daher wurden für alle Reaktionen, welche für das spätere Chipsystem geplant wurden, die Bedingungen zunächst in Lösung getestet. Die Reaktionspartner und Parameter wurden dabei so gewählt, dass sie denen auf dem Chip möglichst nahe kommen.

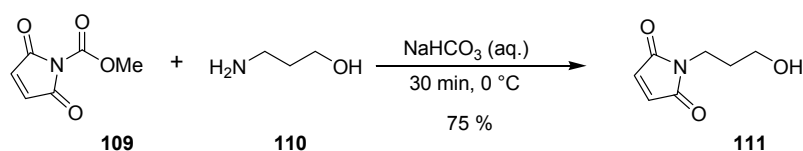


Abb. 3.11: Synthese des Maleinimidalkohols **111**.

Als erster möglicher Glycosylakzeptor in einer Testreaktion wurde der Maleinimidalkohol **111** analog einer literaturbekannten Methode^[203] synthetisiert (Abb. 3.11). Der Alkohol sollte stets kühl in Lösung aufbewahrt werden, da die Gefahr der Polymerisierung gegeben ist.

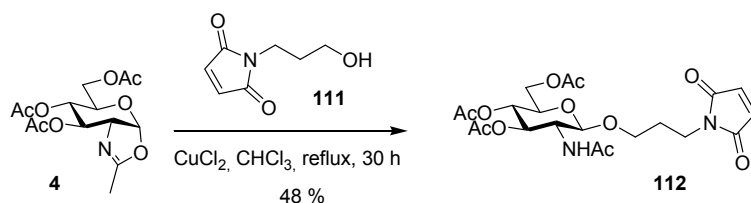


Abb. 3.12: Testreaktion des Oxazolins **4** mit dem Maleinimidalkohol **111**.

Der Alkohol **111** wurde anschließend in der Cu(II)-aktivierten Oxazolinmethode mit dem acetylierten Zuckeroxazolin **4** umgesetzt (Abb. 3.12). Die Ausbeute war dabei mit 48 % nur mäßig. Bedenkt man jedoch den späteren Einsatz der Reaktion auf dem Chip, nämlich dem Screening neuer Reaktionsaktivatoren, so erweist sich die Ausbeute von ca. 50 % durchaus als geeignet. Würde die Reaktion unabhängig vom Aktivator in hohen Ausbeuten verlaufen, so wäre ein Screening nicht möglich.

3.1.2.2 Farbstoffsynthese

Als fluoreszierender Chromophor wurde wie bereits in meiner Diplomarbeit^[204] Sulforhodamin B verwendet. Rhodaminfarbstoffe werden aufgrund ihrer hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften häufig an Biomoleküle konjugiert. Unter den am meisten verwendeten Reaktivfarbstoffen für die Markierung von Aminofunktionalitäten befinden sich die Sulforhodaminchloride, insbesondere Sulforhodamin B–Sulfonylchlorid^[205-207] und Texas Red–Sulfonylchlorid. Kommerziell erhältliches Sulforhodamin B–Sulfonylchlorid wird unter dem Namen Lissamin B im Gramm-Maßstab verkauft. Es liegt als Gemisch der beiden Regioisomere **113a** und **113b** vor, wobei die Verbindung **113a** (Abb. 3.13) mit dem *para*-ständigen Sulfonylchlorid die Hauptkomponente darstellt.^[205] Lissamin B kann schnell und einfach mit Aminen zu den entsprechenden stabilen Sulfonamiden umgesetzt werden. Bei der Reaktion mit primären Aminen bildet sich mit Isomer **113b** eine Sulfonamidgruppe (**B**), welche in *ortho*-Position zum Xanthyliumringsystem steht (Abb. 3.13). Im alkalischen Milieu besteht die Möglichkeit zur Ausbildung eines Spirosultams (**C**). Bei diesem Prozess entstehen zwei isolierte aromatische Ringe, wodurch das chromophore System zerstört wird und die Substanz folglich farblos wird. Allerdings ist die Ringbildung unter geeignetem pH reversibel (Der pK_a -Wert der Tautomerisierung beträgt beim Konjugat mit Methylamin 7.37^[205]). Man erhält mit dem Isomerengemisch des Konjugats also eine pH-abhängige Fluoreszenz.

Tabelle 3.1: Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Lissamin und Cy3 im Vergleich.

Farbstoff	$\lambda_{\max, \text{abs.}}$	$\lambda_{\max, \text{em.}}$	ϵ_{\max}	ϕ_F
	nm	nm	$M^{-1}cm^{-1} \cdot 10^4$	
Lissamin	564	583	7.2	0.33
Cy3	550	570	15.0	~ 0.15

Bei Verwendung des isolierten Konjugats **113a** tritt diese Problematik nicht auf. Eine weitere Möglichkeit die Bildung des Spirosultams zu vermeiden, ist die Kupplung mit sekundären Aminen. Die große Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften von Cy3 und Lissamin (Tabelle 3.1), sowie deren Konjugate, ermöglicht den Einsatz des gleichen

Scanner setups für beide Farbstoffe. Durch eine Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Biologie der Universität Konstanz stand innerhalb der Arbeitsgruppe Meyer ein entsprechender Arrayscanner zur Verfügung.

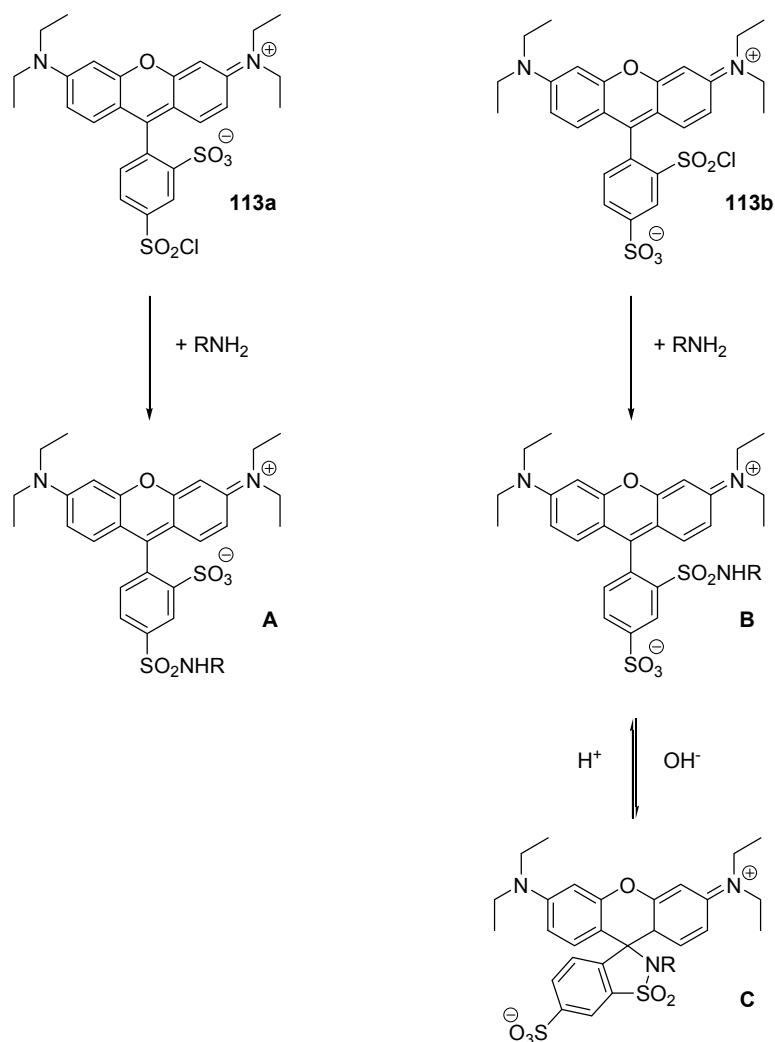


Abb. 3.13: Reaktion der zwei Isomere von Sulforhodamin B - Sulfonylchlorid (Lissamin) **113** mit primären Aminen. Im Falle des Isomers **113b** kann sich im Basischen ein Spirosulfonamid (C) ausbilden, wodurch das chromophore System unterbrochen wird.^[205]

Im Falle einer Glycosylierung des Oxazolins mit einem Maleinimidalkohol wird im anschließenden Ligationsschritt ein fluoreszenzmarkiertes Thiol benötigt. Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines mit Lissamin B markierten Disulfids, welches bei der Ligungsreaktion durch ein Reduktionsmittel wie Tris-2-carboxyethylphosphin (TCEP)·HCl (**116**) *in situ* zum Thiol reagiert.^[208] Diese Reaktion wurde mit einem

analogen Rhodamin-Farbstoff bereits von Nampalli *et al.* verwendet, um fluoreszenzmarkierte Nucleotide zu synthetisieren (Abb. 3.14).^[209]

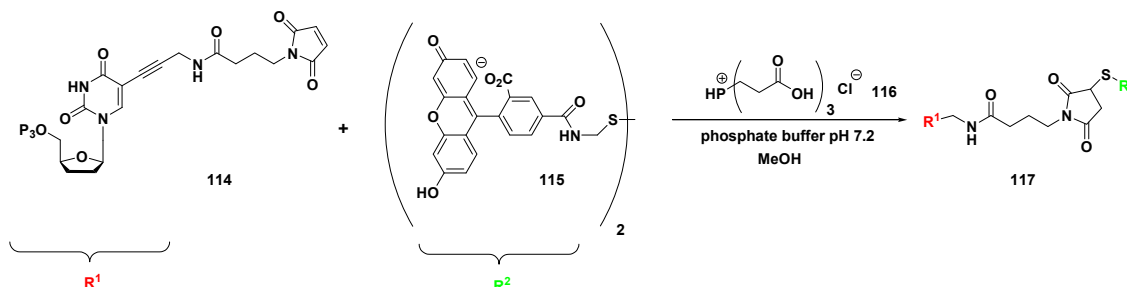


Abb. 3.14: Synthese eines fluoreszenzmarkierten unnatürlichen Nucleotids. Der Fluoreszenzfarbstoff **115** wird in der Reaktion als Disulfid eingesetzt und durch Zusatz von TCEP-HCl (**116**) als Reduktionsmittel *in situ* zum Thiol gespalten. Dieses reagiert dann im Sinne einer Michael-Addition zum gewünschten Produkt **117**.^[209]

Bei der Synthese wurde aus Kostengründen ein Gemisch aus den Regioisomeren des Lissamin B-Sulfonylchlorids (**113**) mit Cystamin (**118**) umgesetzt. Die Reaktion gelang mit einer Ausbeute von 79 %, wobei nach Säulenchromatographie überwiegend das doppelt *para*-substituierte Produkt erhalten wurde. Ein Grund hierfür ist vermutlich die geringere sterische Hinderung im Vergleich zum *ortho*-substituierten Isomer. Das ist insofern von Bedeutung, da es bei der letzteren Verbindung zu einer intramolekularen Reaktion kommen kann, welche eine Auslöschung der Fluoreszenz zur Folge hat.

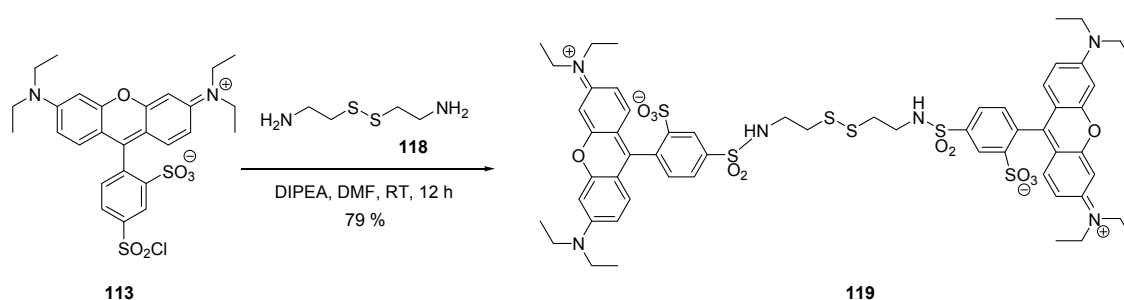


Abb. 3.15: Synthese des Lissamin B – Disulfids **119**.

Für vergleichende Experimente wurde noch ein weiteres Farbstoffdisulfid des sogenannten Aminorosamins B (**123**) hergestellt, welches über sehr ähnliche spektrale Eigenschaften, aber weniger Ladungen und keine Isomere verfügt. Es handelt sich dabei um ein isomerenreines Aminoderivat des 2,6-Tetraethyldiamino-9-Phenyl-xanthen. Ausgehend von *para*-Nitrobenzaldehyd (**120**) und *meta*-Diethylaminophenol

(**121**) wurde durch Kondensation in schwefelsaurer wässriger Lösung der Farbstoffgrundkörper aufgebaut.^[210] Die Reduktion des so erhaltenen und nach Borek und Silverstein benannten 4'-Nitrosamin B (**122**) erfolgte analog zu einer Methode von Sigmund *et al.*^[211] mit einer Mischung aus Natriumsulfid und Natriumhydrogensulfid. Die Umwandlung des 4'-Aminorosamins B (**123**) in sein Isothiocyanat **124** gelang durch Umsetzung mit Thiophosgen in trockenem Aceton. Der durch Flash-Chromatographie aufgereinigte Farbstoff **124** konnte durch Reaktion mit Cystamin (**118**) zum Disulfid **125** unter Ausbildung eines Thioharnstoffs gekuppelt werden (Abb. 3.17).^[210] Die niedrigen Ausbeuten bei der Umsetzung zum Isothiocyanat und bei der Kupplung mit dem Amin können auf die schlechte Löslichkeit des Farbstoffs zurückgeführt werden.

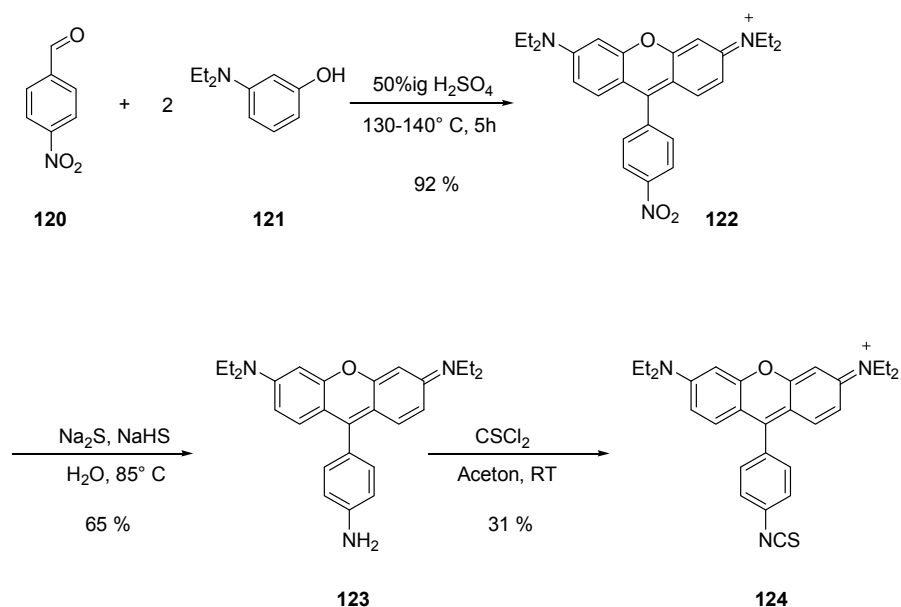


Abb. 3.16: Synthese des 4'-Aminorosamin B - Isothiocyanats (**124**).

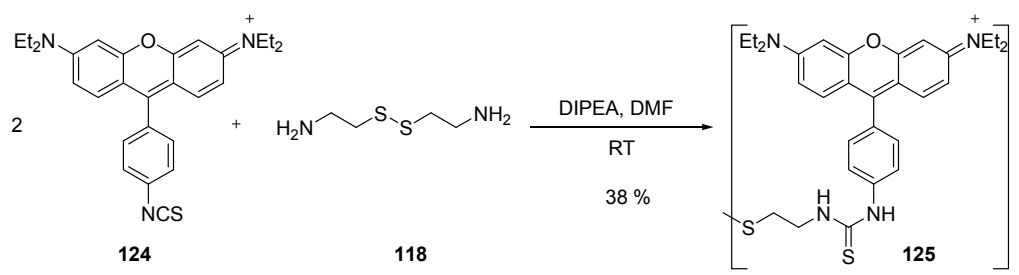


Abb. 3.17: Umsetzung des Isothiocyanats **124** mit Cystamin **118** zum Farbstoffdisulfid **125**.

3.1.2.3 Chipexperimente

Vor der Immobilisierung des Oxazolins **108** mit anschließenden Testreaktionen auf dem Chip, wurde eine Reaktionsausbeute der Testreaktion von 100 % simuliert. Dazu wurde der Maleinimidalkohol **111** direkt auf aminofunktionalisierte Glasträger immobilisiert. Der Alkohol wurde zunächst durch Reaktion mit dem Chloroformiat **126** in ein Amin-reaktives Aktivcarbonat **127** überführt (Abb. 3.18).

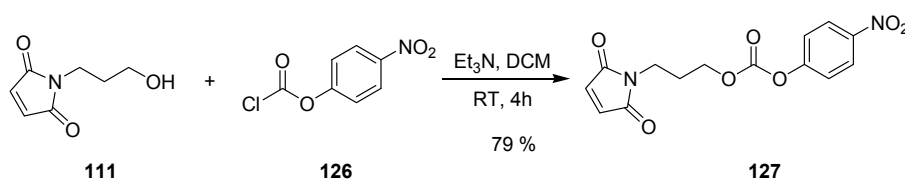


Abb. 3.18: Synthese des Aktivcarbonats **127** zur Immobilisierung auf aminofunktionalisierte Glasträger.

Das erhaltene Carbonat **127** wurde in DMF gelöst, mit DIPEA versetzt und in eine abgedichtete Objektträgeraufbewahrungsbox gefüllt, in der sich aminofunktionalisierte Objektglasträger befanden (Abb. 3.19). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Chips gründlich in DMF und DCM gewaschen. Die so präparierten Glasträger wurden mit einer selbstklebenden 24-Loch-Silikonmaske versehen. So konnte eine Unterteilung in mehrere Reaktionsräume erreicht werden. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der Lösungen des Disulfids **119** und entsprechende zehnfach konzentriertere Lösungen von TCEP-HCl (**116**) in einem MeOH-Phosphatpuffer-Gemisch (5:8, 10 mM, pH 7.3) präpariert. Nach Mischen der beiden Lösungen in den durch Auftragen der Silikonmasken entstandenen Vertiefungen (*wells*), wurde ein Objektträger als Abdeckung verwendet. Die so präparierten Chips wurden daraufhin

24 h auf einen Schüttler gelegt und anschließend gründlich gewaschen (Abb. 3.19). Das Auslesen der Fluoreszenzintensitäten erfolgte durch einen Array-Scanner.

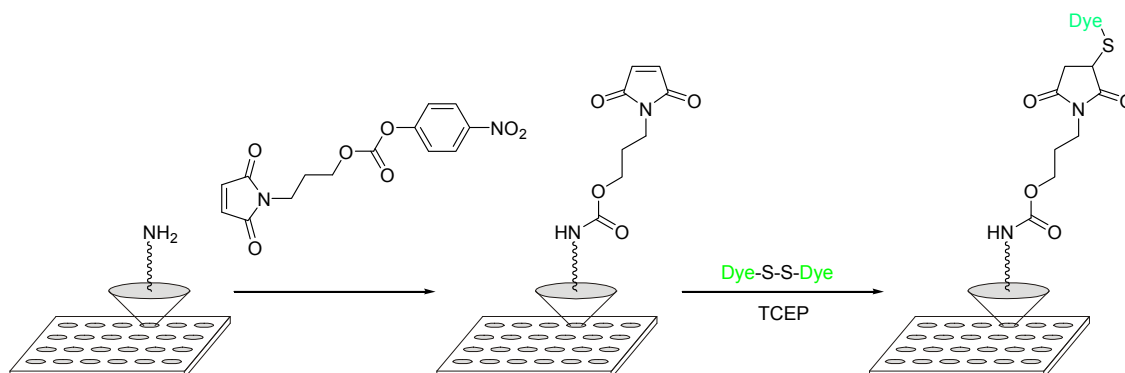


Abb. 3.19: Immobilisierung des Maleinimids auf einem aminofunktionalisierten Glasträger und anschließende Fluoreszenzmarkierung durch Ligationsreaktion mit dem Disulfid **119**.

Bei der Versuchsdurchführung wurden folgende Punkte stets berücksichtigt: Um eine optimale und gleichmäßige Benetzung der Oberflächen gewährleisten zu können, wurde penibel darauf geachtet, dass während des Abdeckens der Masken kein Flüssigkeitsaustausch von einem Well in ein benachbartes statt fand. Die Durchführung der Immobilisierung in einer Feuchtigkeitskammer (Atmosphäre mit Pufferlösung gesättigt) erwies sich dabei als die geeignetste Vorgehensweise. Zur Bestimmung der idealen Parameter wurden die Farbstoffkonzentration, die Maleinimidkonzentration und die Waschbedingungen variiert. Die Auswertung des Chips mit den optimalen Bedingungen kann Abb. 3.20 entnommen werden. Bei diesem Experiment wurden die Chips nach Anfärbung mehrfach bei 40 °C in Chippuffer mit 0.1 % des Detergens SDS im Ultraschallbad gewaschen. Die Hintergrundfluoreszenz der Glasträgeroberfläche kann dabei vernachlässigt werden. Es lässt sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und der Belegung der Oberflächen der Maleinimidgruppen bis zu einer Konzentration von 1 mM der Maleinimidaktivcarbonatlösung beobachten. Durch ausgiebiges Waschen kann die unspezifische Bindung des Farbstoffs an die Glasoberfläche verringert werden. Sie beträgt durchschnittlich dennoch etwa 50 % des Werts bei Sättigung.

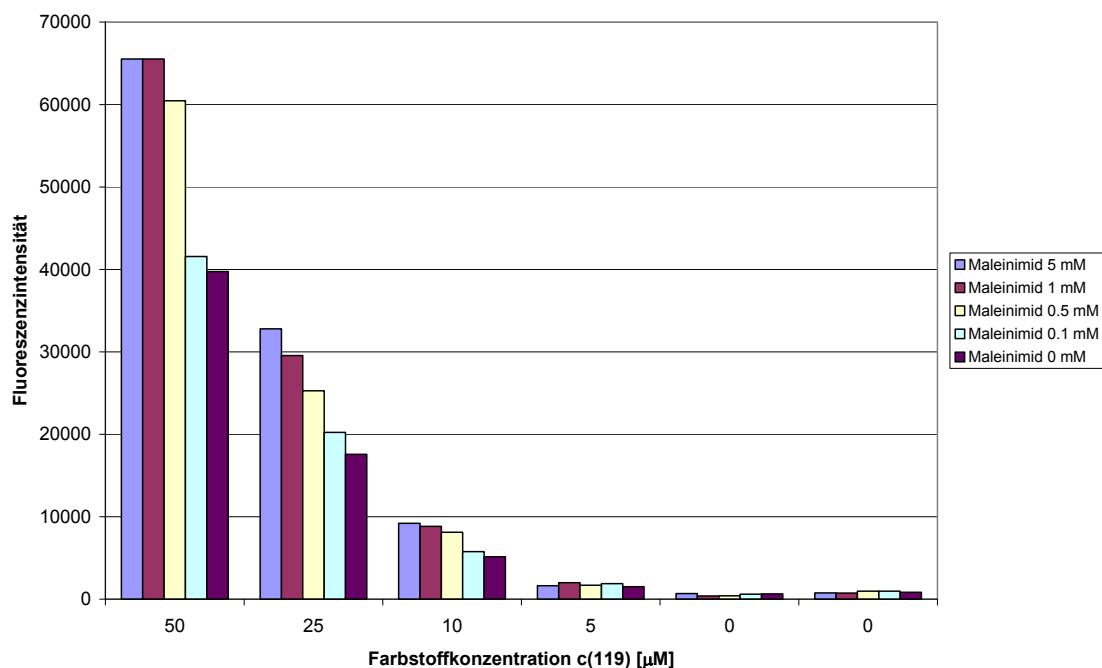


Abb. 3.20: Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 520 bei verschiedenen Konzentrationen des Maleinimids **127** und des Farbstoffdisulfids **119**.

Um die Immobilisierungsschemie und die Oberflächenmodifizierungen im Vergleich zum angestrebten Chipsystem realistischer nachzustellen, wurden in den nächsten Experimenten die Amin-modifizierten Glasträger zunächst mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (PDITC) (**128**) behandelt, um eine Amin-reaktive Oberfläche zu erhalten, an die ebenfalls ein Oxazolinbaustein angeknüpft werden kann (Abb. 3.21).

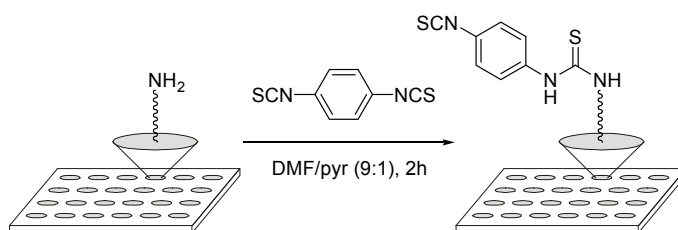


Abb. 3.21: Derivatisierung der aminofunktionalisierten Glasträger mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (PDITC) (**128**).

Zur Belegung der Oberfläche mit Maleinimidgruppen wird in diesem Fall ein Maleinimidamin benötigt. Dazu wurde **109** mit dem einfach Boc-geschützten Diamin **129** umgesetzt und anschließend sauer entschützt. Die Entschützung war bereits nach 30 min vollständig.

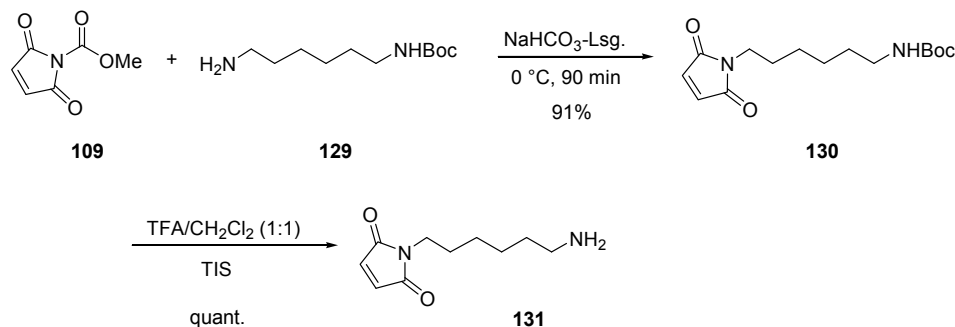


Abb. 3.22: Synthese des Maleinimidamins **131** zur Anknüpfung an PDITC modifizierte Glasträger.

Eine 2 mM Lösung in Carbonatpuffer (pH = 10.1) des so hergestellten Maleinimidamins **131** wurde mit einer 2 mM 2-Methoxyethylaminlösung in Carbonatpuffer (pH = 10.1) gemischt. Dadurch wurden Lösungen mit unterschiedlichen Molenbrüchen an **131** ($x = 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 0.9, 1.0$) erhalten. Die Lösungen wurden auf den Chip aufgetragen und über Nacht inkubiert. Danach wurden diese dreimal mit Puffer und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich unter N_2 -Strom getrocknet.

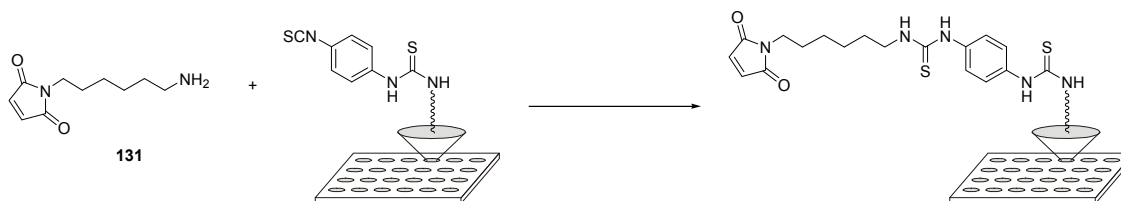


Abb. 3.23: Anknüpfung des Maleinimidamins **131** an mit PDITC modifizierte Glasträger.

In jedes Well wurden 4 μl des Farbstoffdisulfids **119** (1 mM) und 4 μl TCEP (10 mM) (Lösungen in PBS-Puffer / MeOH = 8:5) pipettiert und 3 h lang inkubiert. Danach wurden die Lösungen entfernt, in jedem well einzeln zweimal mit Aceton gewaschen und anschließend jeweils 15 Minuten lang im Ultraschallbad mit folgenden Lösungen behandelt: Aceton, Carbonatpuffer (pH = 10.1), Carbonatpuffer mit 0.2% SDS, Wasser und Aceton. Die so hergestellten Chips konnten nicht ausgewertet werden, da die ermittelten Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Molenbrüchen identisch

waren und denen der Negativkontrollen entsprachen. Auch bei Verwendung anderer Amine (Ethylamin, Propylamin) an Stelle von 2-Methoxyethylamin zur Herstellung der Lösungen mit verschiedenen Molenbrüchen wurden keine besseren Ergebnisse erzielt. Dieser Befund kann auf zweierlei Art interpretiert werden: Entweder ist kein Fluoreszenzfarbstoff an die Oberfläche gebunden oder der Farbstoff wird auch sehr stark unspezifisch im Falle von nicht mit Maleinimid funktionalisierten Oberflächen gebunden.

Um den offenen Fragen der Reaktivität auf der Oberfläche nachzugehen, wurden mehrere Testreaktionen in Lösung durchgeführt. Die Reaktion des Maleinimidamins **131** mit Phenylisothiocyanat (**132**) erfolgte schnell und quantitativ (Abb. 3.24). Das verwendete Maleinimidamin reagiert also mit aromatischen Isothiocyanaten, wie sie auf der Oberfläche der verwendeten Glaträger präsentiert werden, effektiv und vollständig.

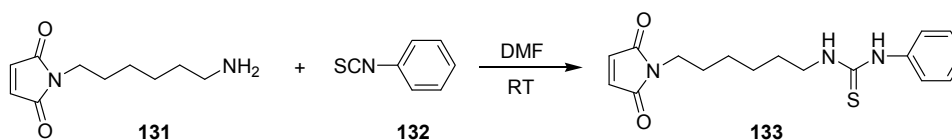


Abb. 3.24: Reaktion des Maleinimids **131** mit Phenylisothiocyanat (**132**) zum Thioharnstoff **133**.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob der Thioharnstoff **134** mit n-Octanthiol (**135**) reagiert. Übertragen auf das Chipsystem würde dies der direkten Reaktion des Farbstoffs mit den Thioharnstoffgruppen entsprechen, die auch bei den mit Amin gecappten Stellen bei Negativkontrollen auf dem Chip vorkommen. Dadurch würde der Glaträger an jeder Stelle angefärbt werden und die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen wären ebenso hoch wie die der Positivkontrollen. Es konnte bei der Testreaktion kein Umsatz beobachtet werden, wodurch diese Vermutung widerlegt wurde (Abb. 3.25).

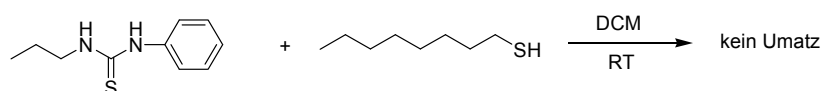


Abb. 3.25: Testansatz mit dem Thioharnstoff **134** und n-Octanthiol (**135**).

Als Nächstes wurde die Stabilität der basischen Maleinimidlösung im Carbonatpuffer untersucht, die zur Anknüpfung des Maleinimids verwendet wird. Wird das Boc-

geschützte Maleinimid **130** mit Propylamin (**136**) bei RT in Carbonatpuffer gerührt, so bildet sich ein neues Produkt (Abb. 3.26). Die Reaktion ist allerdings nach mehreren Tagen nicht vollständig.

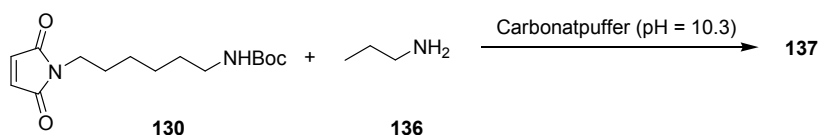


Abb. 3.26: Testansatz zur Überprüfung der Stabilität des Maleinimids **130** im basischen Milieu in Anwesenheit des nucleophilen Amins (**136**).

Denkbar sind ein nucleophiler Angriff des Propylamins in einer Michael-Addition zum Produkt **138** oder unter Öffnung des Maleinimidrings zu **139** (Abb. 3.27). Um den Verlauf dieser Reaktion genauer zu untersuchen, wurde das Maleinimidamin **131** in deuteriertem Carbonatpuffer bei RT gerührt und in regelmäßigen Abständen ^1H -NMR-Spektren aufgenommen.

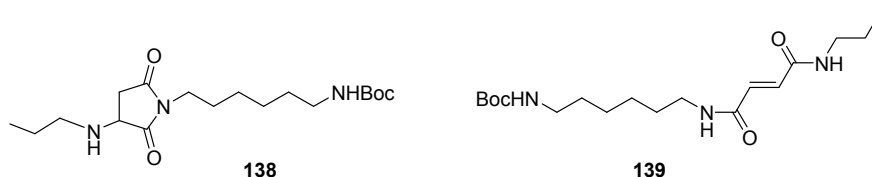


Abb. 3.27: Hypothetisch entstehende Produkte bei der Umsetzung von **130** mit Propylamin.

NMR-Spektren wurden alle 30 min aufgenommen. Nach 1 h war keine Reaktion zu erkennen. Nach 4 h war zu erkennen, dass das Singulett der Protonen am Maleinimidring bei 6.80 ppm schwächer wird, und dafür zwei Dublett-Signale bei 6.29 ppm und bei 5.89 ppm erscheinen (beide mit $J = 12.3$ Hz). Außerdem erscheint noch ein weiteres Triplett-Signal bei 3.20 ppm. Sogar nach 7 Tagen war der Umsatz der Reaktion noch immer nicht vollständig. Die basische Hydrolyse ist sehr langsam und sollte bei frisch hergestellten Lösungen kein Problem darstellen. Aufgrund der neu hinzugekommenen NMR-Signale kann man davon ausgehen, dass die Doppelbindung nicht reagiert, sondern dass es zu einer Öffnung des Maleinimidrings kommt. Dies entspricht der Bildung des α,β -ungesättigten Amids **140**. Eine Michael-Addition des Maleinimids mit einem Amin konnte nicht beobachtet werden. Das Produkt wiederum ist immer noch ein Michaelakzeptor. Diese Tatsache und der Befund, dass diese Reaktion sehr langsam ist, zeigen, dass die Stabilität des Maleinimids nicht der Grund

dafür sein kann, dass es auf den modifizierten Glaträgern nicht zu einer effizienten Anfärbung kam.

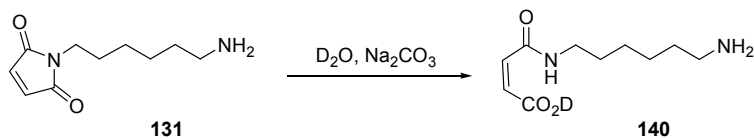


Abb. 3.28: Reaktion des Maleinimids **131** in deuteriertem Carbonatpuffer (pH = 10.2).

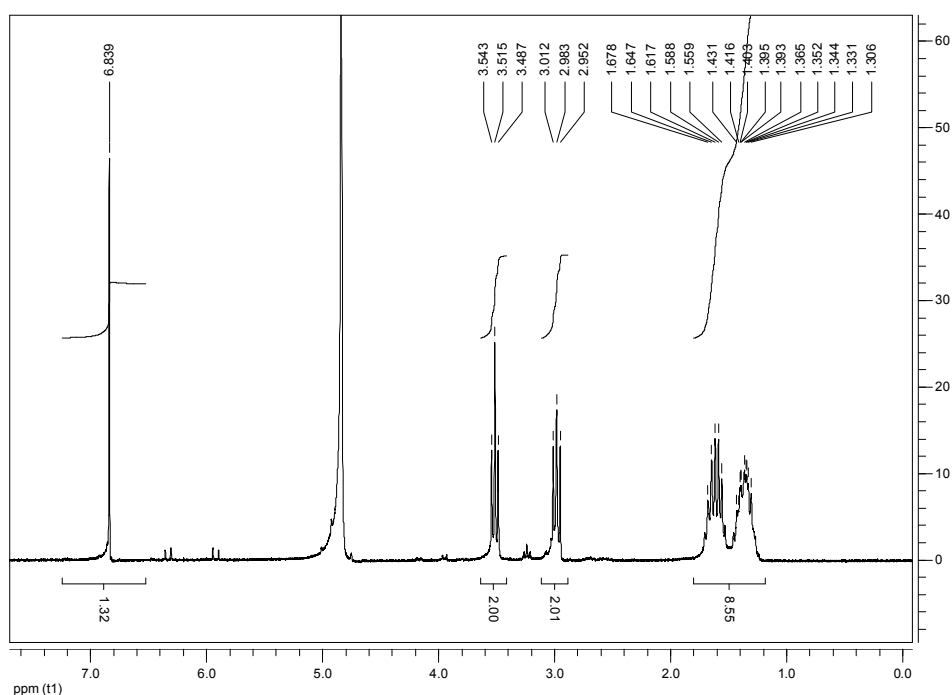


Abb. 3.29: $^1\text{H-NMR}$ der Verbindung **131** in D_2O .

Um die Anzahl der Reaktionsschritte auf dem Chip auf ein Minimum zu reduzieren wurde ein Überschuss an PDITC mit 2-Aminoethanol **141**, Propylamin **136**, dem einfach Boc-geschützten Amin **129** und dem Maleinimidamin **131** in Lösung umgesetzt. Eine analoge Synthese wurde bereits von Sonawane *et al.* veröffentlicht.^[212] Dadurch erhält man die einfach substituierten Isothiocyanate (Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Die so hergestellten Bausteine können nun zur direkten Anknüpfung an aminofunktionalisierte Slides benutzt werden. Vor der Immobilisierung wurden Molenbrüche des Maleinimidamins **145** mit **142**, **143** oder **144** eingestellt. Mit den hergestellten Chips wurden jedoch aufgrund der identischen Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrollen mit einem Molenbruch $x = 0$ im Vergleich zu höheren Molenbrüchen (0.1 – 1) ebenfalls keine auswertbaren Ergebnisse erhalten.

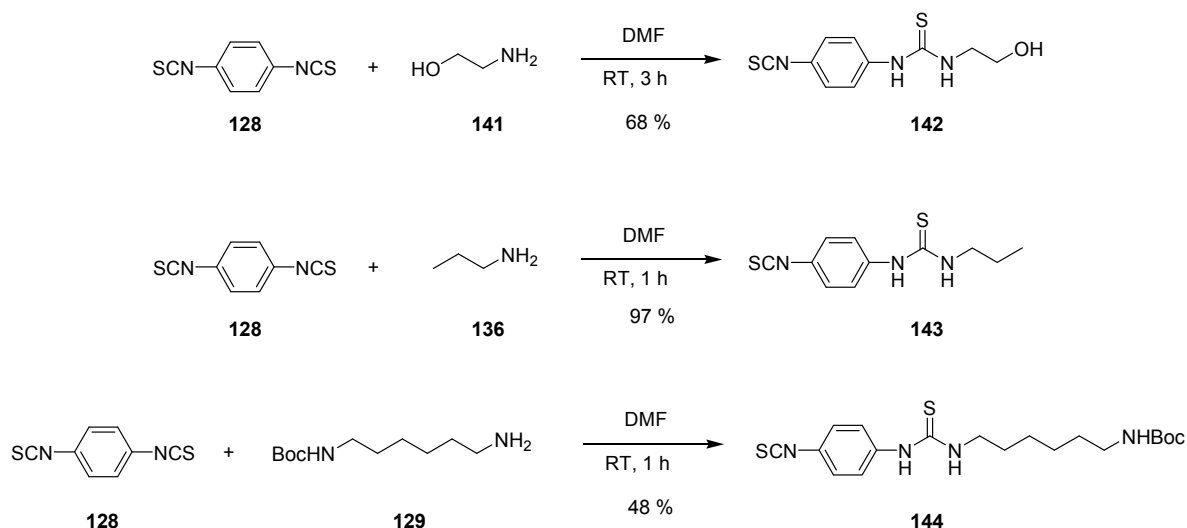


Abb. 3.30: Synthese der einfach substituierten PDITC-Derivate zur direkten Anknüpfung an Amin-modifizierte Glasträger.

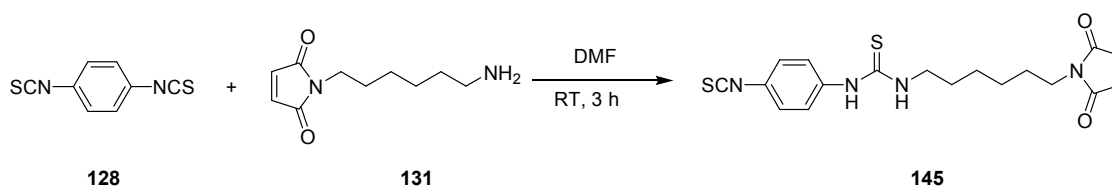


Abb. 3.31: Synthese des einfach mit Maleinimid **131** substituierten PDITCs zur direkten Anknüpfung an aminofunktionalisierte Glasträger.

Eine weitere mögliche Erklärung der erhaltenen Ergebnisse, bei denen die Fluoreszenzintensität bei unterschiedlich dichter Belegung an Maleinimid nicht zu unterscheiden ist, ist eine extrem hohe nichtspezifische Bindung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs. Lissaminethyldiamin **146** wurde in DMF/Carbonatpuffer = 2:1 gelöst und eine Verdünnungsreihe (0, 0.038, 0.38, 3.8, 38, 380 μM) hergestellt. Diese wurde auf mit PDITC funktionalisierte aminoreaktive Glasträger aufgetragen, um so eine Eichgerade für den Zusammenhang zwischen der Belegung der Oberfläche mit Farbstoff und den gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu erhalten. Zwei Negativproben (einmal mit Propylamin gecappte Stellen und einmal nur Pufferzugabe) wurden ebenfalls mitgespottet, welche auch mit Farbstoff behandelt wurden.

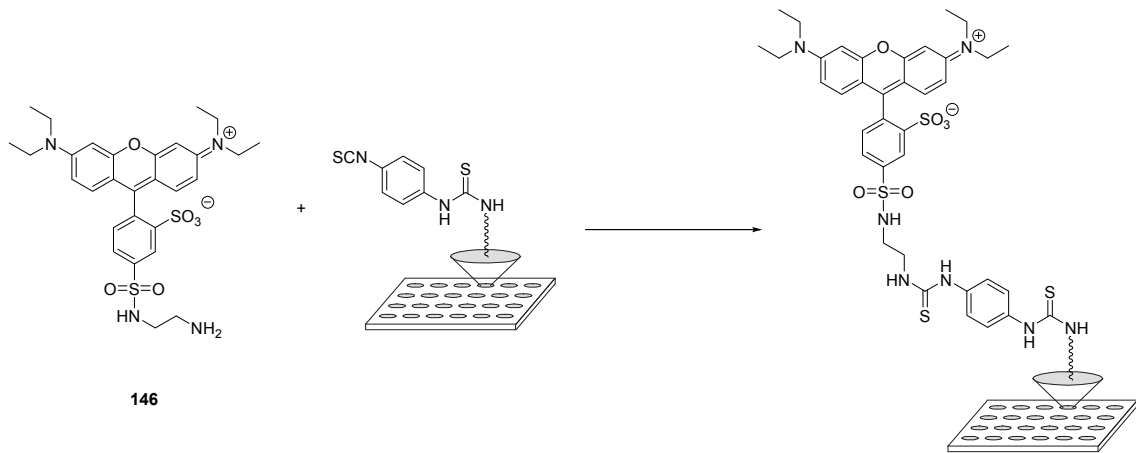


Abb. 3.32: Anknüpfung des Lissaminethyldiamins **146** an mit PDITC modifizierte Glasträger.

Nach 3 h wurde der Chip je zweimal mit MeOH, mit Aceton und mit Carbonatpuffer mit 0.2 % SDS gewaschen. Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **146** liefert die in Abb. 3.33 gezeigte Kurve.

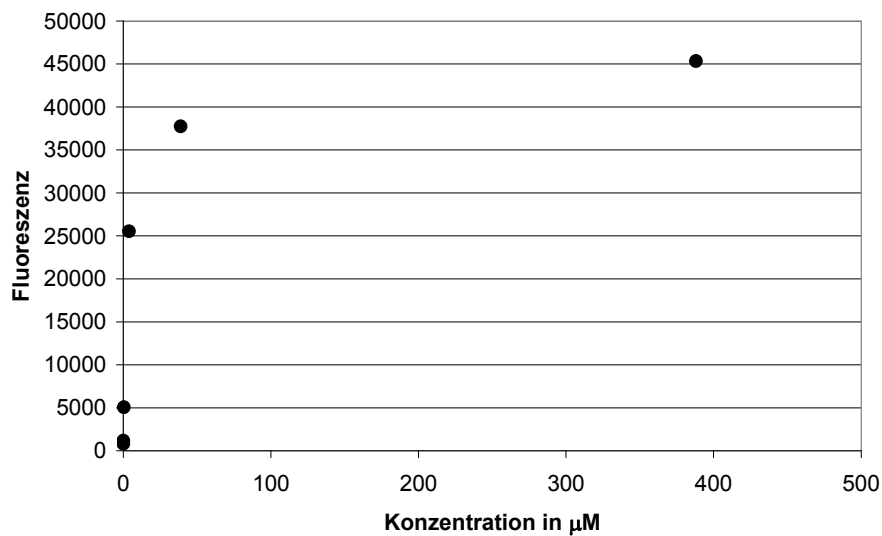


Abb. 3.33: Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 530 bei verschiedenen Konzentrationen des Lissaminethyldiamins **146** nach Immobilisierung auf PDITC modifizierte Glasträger.

Der Verlauf der Kurve entspricht dem einer typischen Sättigungskurve. Ab einer Konzentration von etwa 0.1 mM an **146** scheint die Oberfläche gesättigt zu sein. Die unspezifische Bindung ist bei der direkten Anknüpfung des Farbstoffs **146** vernachlässigbar klein: die gemessene Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle, bei der der Farbstoff mit der höchsten Konzentration auf mit Propylamin gecappte Stellen aufgetragen wurde, entspricht der Intensität, wenn nur Puffer ohne Farbstoff gespottet

wird. Daher ist anzunehmen, dass es sich um eine kovalente spezifische Immobilisierung handelt. Beim Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzintensitäten mit früheren Chip-Experimenten kann festgehalten werden, dass generell bei Negativkontrollen und geringer Maleinimidbelegung viel zu hohe Werte gemessen wurden. Diese Chips konnten folglich nicht ausgewertet werden, weil die unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die Oberfläche zu groß war.

In einem Vergleichsexperiment wurden nun vier verschiedene Rhodaminfarbstoffderivate (**119**, **125**, **146** und **147**) (Abb. 3.34) mit jeweils der gleichen Konzentration (0.1 mM) auf einen mit PDITC funktionalisierten Chip aufgetragen. Dieser war zuvor mit drei unterschiedlichen Lösungen mit verschiedenen Maleinimidmolenbrüchen (um eine verschieden große Maleinimidbelegungsdichte auf der Oberfläche zu erhalten) und drei unterschiedlichen Aminlösungen (als Negativkontrollen) behandelt worden (Abb. 3.35). Der Farbstoff **147** mit seiner Sulfonsäuregruppe und **146** mit seiner Aminogruppe gehen unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Reaktion mit Maleinimiden ein. Auf dem ausgewerteten Chip konnte auch keine nennenswerte Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit diesen Rhodaminverbindungen festgestellt werden. Es kommt folglich auch nicht zu einer unspezifischen Bindung. Bei Verwendung des Disulfids **125** kommt es ohne das Reduktionsmittel TCEP zu keiner Anfärbung. Erst nach Reduktion zum entsprechenden Disulfid findet eine Anfärbung statt. Diese ist allerdings höchst unspezifisch. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist unabhängig von der Oberflächenbelegung mit Maleinimid und der Wert entspricht sogar der im Falle der drei Negativkontrollen. Bei Verwendung des vom Lissamin abgeleiteten Disulfids **119** findet eine sehr starke unspezifische Bindung des Farbstoffs bereits ohne Verwendung von TCEP statt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die nicht vermeidbare unspezifische Bindung des Farbstoffs **119** nicht auf den Rhodamingrundkörper zurückgeführt werden kann, sondern in seiner Eigenschaft als Disulfid bzw. Thiol begründet liegt. Die Verwendung des alternativen Farbstoffdisulfids **125** ohne negative Ladungen unterdrückt die unspezifische Bindung des Disulfids, ist aber nach Reduktion genauso hoch. Die Verwendung der Maleinimid-Thiol-Ligation in einem auf Glasträger basierten Testsystem zum Screening von Aktivator von Zuckeroxazolinen ist somit keine geeignete Reaktion. Für die erfolgreiche Etablierung eines solchen Systems muss auf eine andere Art der Ligation zurückgegriffen werden (siehe Abschnitt 3.1.3).

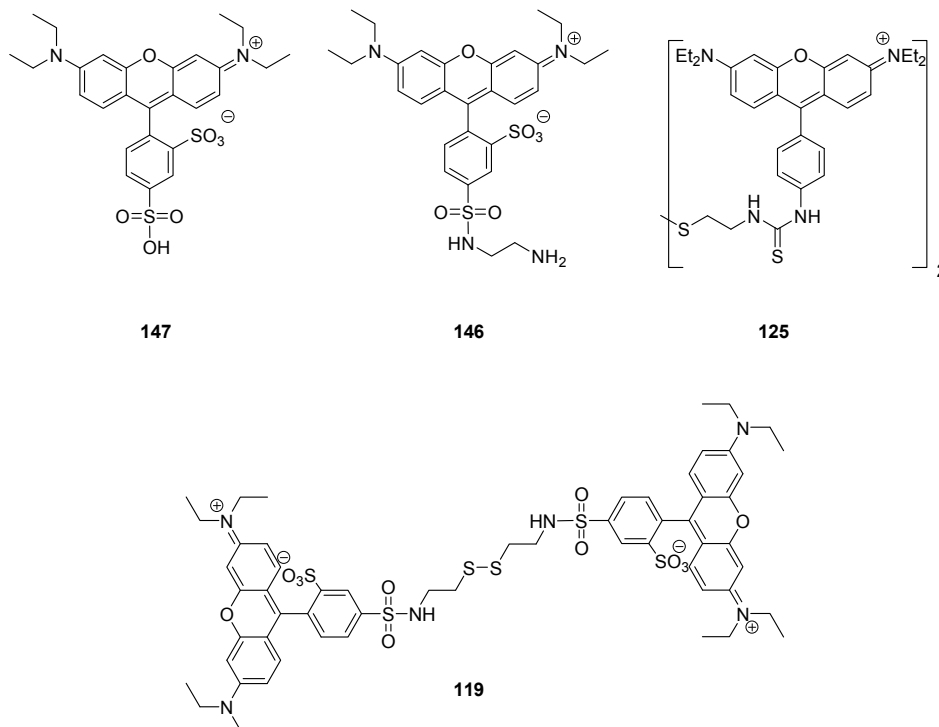


Abb. 3.34: Strukturen der verwendeten Rhodaminfarbstoffe: Lissamin (**147**), Lissaminethylendiamin (**146**), sowie die Disulfide des Rosamins (**125**) und des Lissamins (**119**).



Abb. 3.35: Chipexperiment mit vier verschiedenen Rhodaminfarbstoffen (vgl. Abb. 4.35) mit unterschiedlichem Molenbruch x des Maleinimids **131**.

3.1.3 Chipsystem unter Verwendung einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv)

Nachdem mit Hilfe der Maleinimid-Thiol-Ligation kein geeignetes Testsystem zur Bewertung von möglichen Zuckeroxazolinaktivatoren etabliert werden konnte, wandten wir uns der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (*Diels-Alder-Reaction with inverse electron demand*, **DARinv**) als weiterer Alternative zu. Bei dieser Reaktion reagiert ein elektronenreiches Dienophil mit einem elektronenarmen Dien. Bei der Verwendung von Tetrazinen als Diene, die im Jahre 1959 von Carboni *et al.* erstmals untersucht worden waren,^[213] kann die Reaktion als Ligationsreaktion verwendet werden, welche im Gegensatz zur gewöhnlichen Diels-Alder-Reaktion nicht reversibel ist (siehe Abb. 3.36). Das primäre Reaktionsaddukt **C** ist nicht stabil und reagiert unter Stickstoffbildung im Sinne einer Retro-Diels-Alder-Reaktion zum 4,5-Dihydropyridazin **D** weiter. Dieses lagert sich sofort auch zu weiteren tautomeren Dihydropyridazinen um. Als Dienophile können verschiedene reaktive Alkene **B** Verwendung finden. Als ideale Dienophile für die DARinv haben sich insbesondere Norbornene erwiesen.^[214] Für Anwendungen in einem chipbasierten Testsystem wurden zunächst ein Norbornenalkohol als Glycosylakzeptor und ein passendes mit Lissamin B fluoreszenzmarkiertes Tetrazin synthetisiert und getestet.

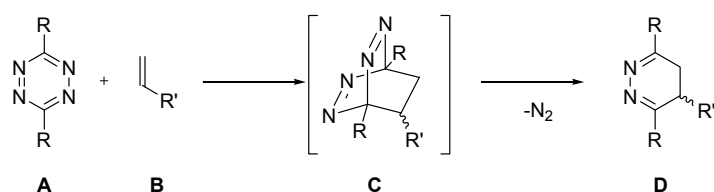


Abb. 3.36: Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (*Diels-Alder-Reaction with inverse electron demand*, DARinv) mit Tetrazin **A** als elektronenarmes Dien.

3.1.3.1 Testglycosylierung in Lösung

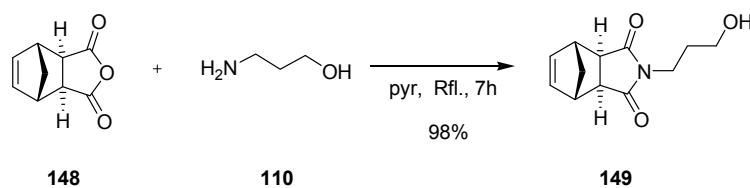


Abb. 3.37: Synthese des Norbornen-basierten Glycosylakzeptors **149**.

Zur Synthese des Glycosylakzeptors wurde das Norbornenanhydrid **148** mit 3-Amino-1-propanol (**110**) in Pyridin unter Rückfluss erhitzt. Der Norbornenalkohol **149** konnte nach anschließender Flash-Chromatographie in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden (siehe Abb. 3.37).

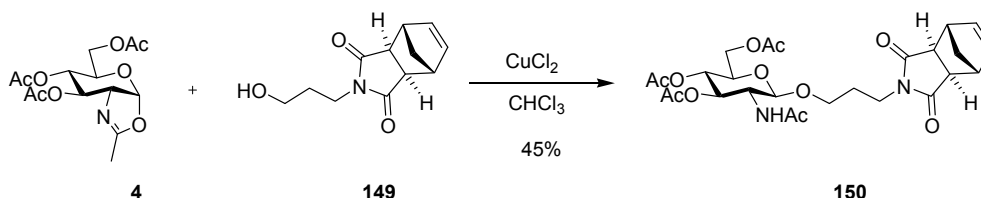


Abb. 3.38: Glycosylierung des Zuckeroxazolins **4** mit dem Norbornenalkohol **149**.

Die Glycosylierung mit dem Zuckeroxazolin **4** in Chloroform und CuCl_2 als Aktivator gelang mit einer Ausbeute von 45 % (siehe Abb. 3.38). Wie bereits im Falle der Reaktion mit dem entsprechenden Maleinimidalkohol ist die Ausbeute nur mäßig. Dies kommt der Verwendung in einem Testsystem aber entgegen, da so sowohl bessere als auch schlechtere Aktivatoren im Vergleich zu CuCl_2 anhand der Ausbeute gut beurteilt werden können.

3.1.3.2 Farbstoffsynthese

Zur Synthese eines fluoreszenzmarkierten Tetrazins wurde zunächst Lissamin B – Sulfonylchlorid (**113**) mit dem einfach Boc-geschützten Diamin **151** umgesetzt. Nach erfolgreicher Kopplung und Aufreinigung durch Flash-Chromatographie wurde das Konjugat mit einer Lösung aus TFA in DCM entschützt, wodurch man das freie Amin **152** in einer Gesamtausbeute von 40 % über 2 Stufen erhielt (Abb. 3.39). Zwei Isomere entstanden (Gesamtausbeute der beiden Isomere ist angegeben), welche aber nach der ersten Stufe mit FC getrennt werden konnten.

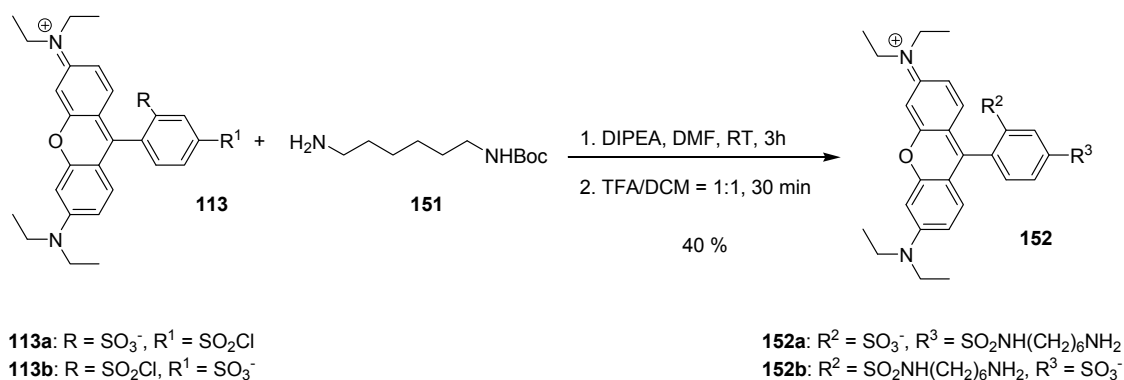


Abb. 3.39: Synthese des fluoreszenzgelabelten Amins **152**.

Das Amin **152a** wurde mit dem Tetrazin-Succinimidylester **153** umgesetzt, welcher mir freundlicherweise von Henning Beckmann und Andrea Niederwieser aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde. Man erhielt so das gewünschte Tetrazinfarbstoffkonjugat **154** in einer Ausbeute von 40 % (siehe Abb. 3.40).

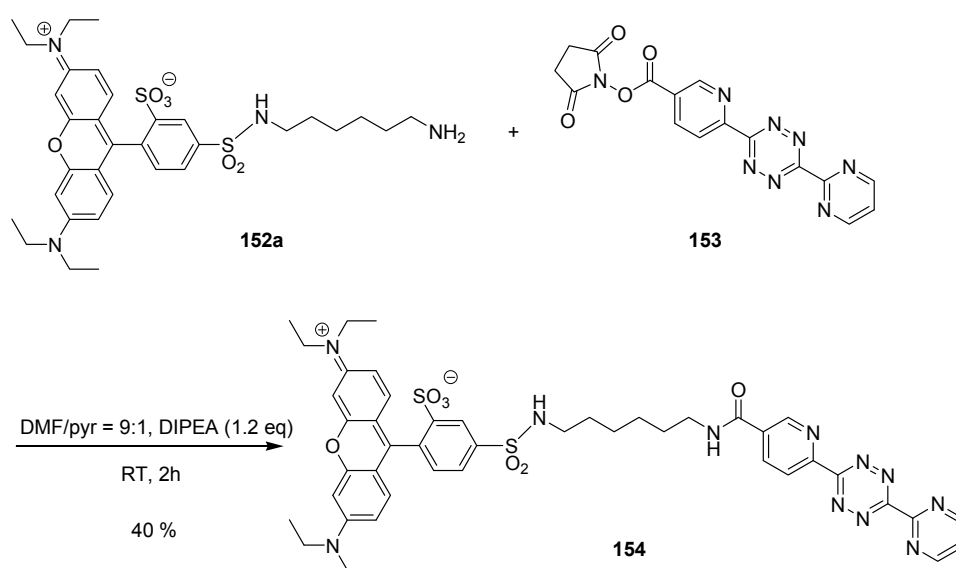


Abb. 3.40: Synthese des fluoreszenzgelabelten Tetrazins **154**.

Das Tetrazin **154** wurde nun in einer Testreaktion verwendet (Abb. 3.41), um in Lösung das bereits synthetisierte Glycosid **150** in der eigentlichen DARinv als Ligationreaktion anzufärben.

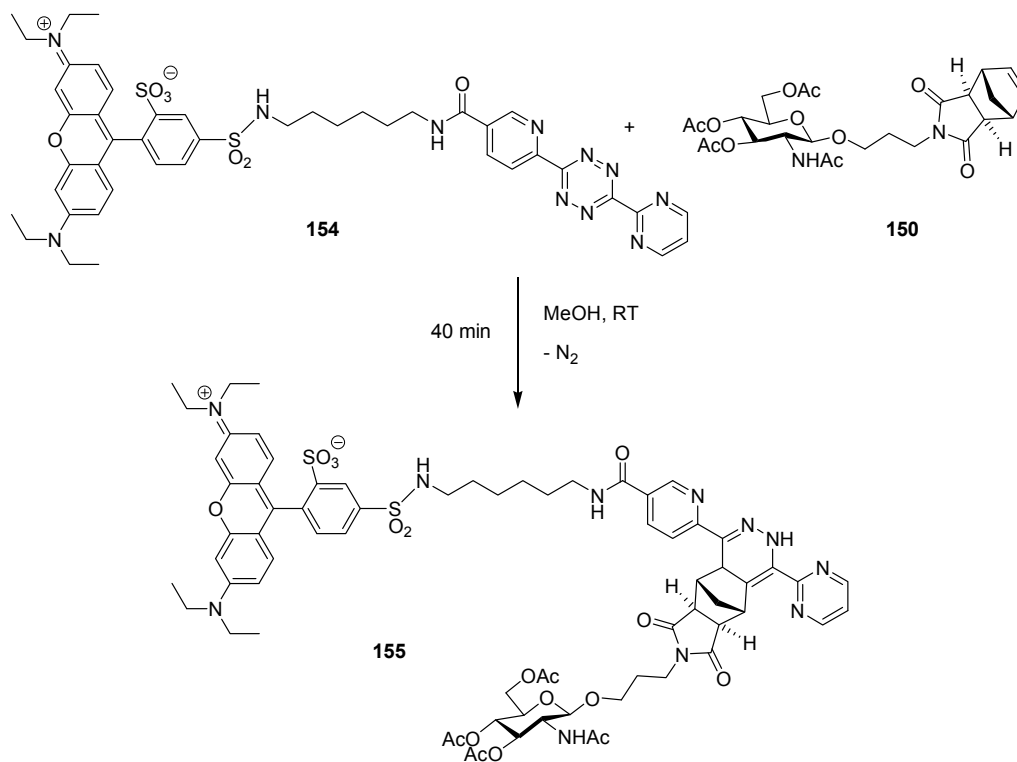


Abb. 3.41: DARinv-Ligationsreaktion zwischen dem Glycosid **150** und dem Tetrazin **154** (nur ein Isomer dargestellt).

Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC verfolgt. Die Reaktion war bereits nach 40 min bei RT beendet. Bei der Reaktion entstehen erwartungsgemäß drei Tautomere, die alle im Chromatogramm (Abb. 3.42) detektiert werden konnten.

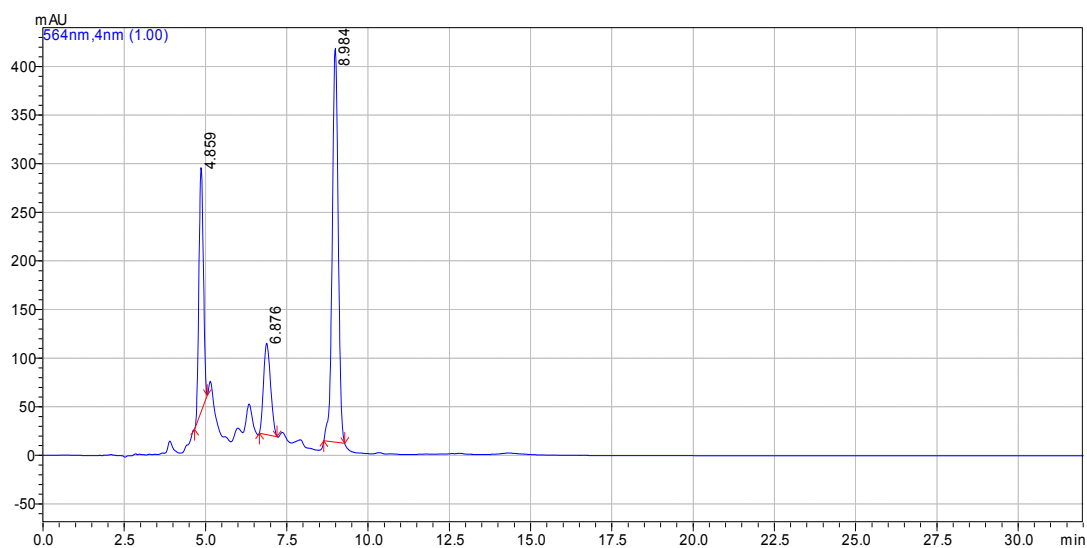


Abb. 3.42: HPLC-Chromatogramm der Verbindung **155**. Knauer C-18 Eurospher, ID = 4 mm, Fluss = 1 mL/min, Detektion bei 564 nm, Gradient: 55-100 % MeCN in 20 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % PFPA).

Durch Oxidation des Ligationsprodukts **155** mit Isopentylnitrit reagieren alle drei Isomere zur einheitlichen Verbindung **156** (Abb. 3.44). Dies kann die Analytik erleichtern und ist zudem ein Hinweis darauf, dass es sich bei den drei in der HPLC identifizierten Verbindungen tatsächlich um die vermuteten Tautomere handelt. Im anschließend aufgenommenen HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.43) findet man nur noch einen Peak des Produkts **156**.

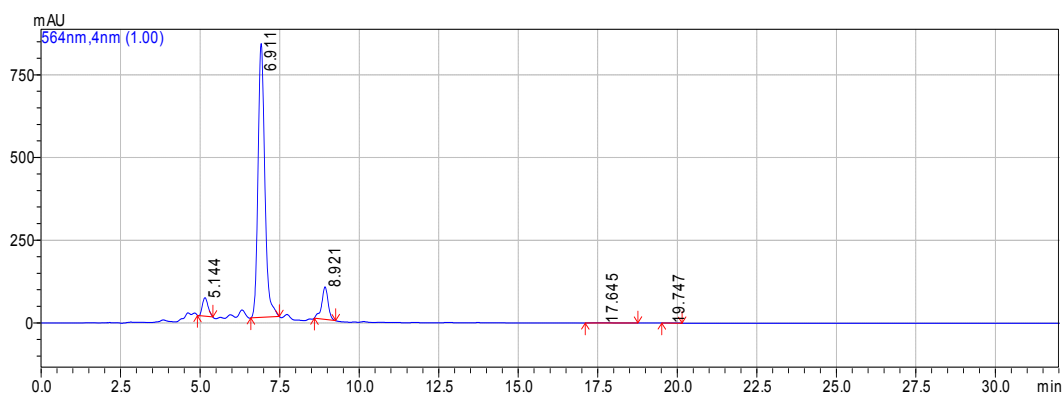


Abb. 3.43: HPLC-Chromatogramm der Verbindung **156**. Knauer C-18 Eurospher, ID = 4 mm, Fluss = 1 mL/min, Detektion bei 564 nm, Gradient: 55-100 % MeCN in 20 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % PFFA).

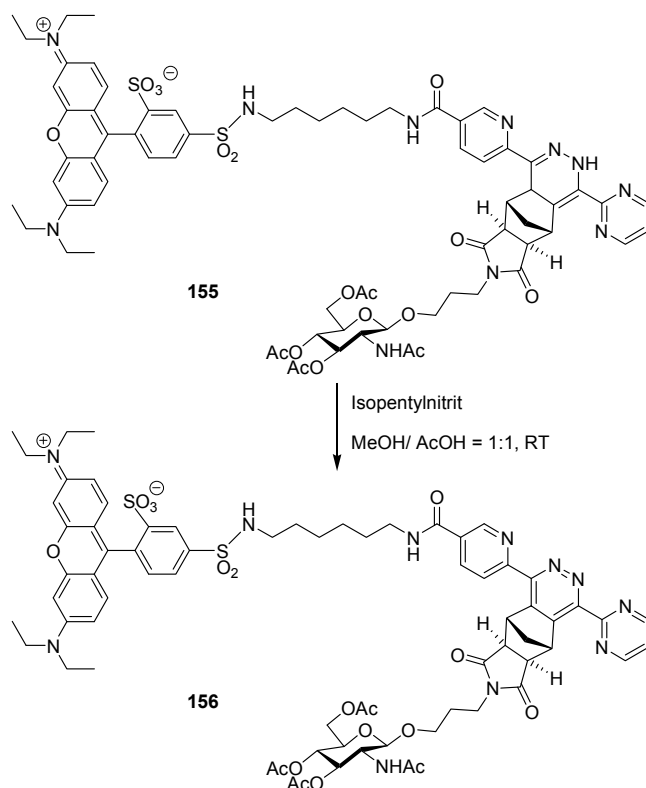


Abb. 3.44: Oxidation des Ligationsprodukts **155** mit Isopentylnitrit zum stabilen Pyridazin **156**.

Die Verwendung der DARinv mit Glycosid **150** als Dien und Tetrazinfarbstoffkonjugat **154** als Dienophil ist nach ihrer erfolgreichen Synthese in Lösung schnell und effizient. Die Reaktion erscheint daher als geeignet für das angestrebte chipbasierte Testsystem.

3.1.3.3 Chipexperimente

Analog zu den Untersuchungen bei Verwendung von Maleinimidalkoholen als Glycosylakzeptoren in einem chipbasierten Testsystem (siehe Kapitel 3.1.2.3) wurde zunächst das Norbornenderivat **157** hergestellt, welches direkt an eine PDITC-modifizierte Oberfläche angeknüpft werden kann. Dazu wurde das Norbornenanhydrid **148** mit einem 8-fachen Überschuß an Diamin **100** zum Amin **157** durch Erhitzen unter Rückfluß in Pyridin mit einer Ausbeute von 65 % umgesetzt. Die Aufreinigung des Rohprodukts gelang durch mehrfache Extraktion.

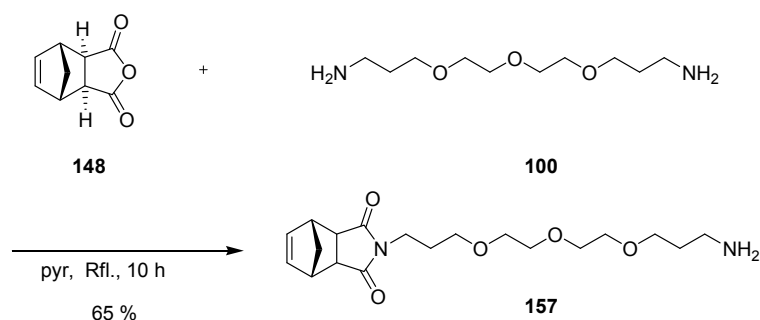


Abb. 3.45: Synthese des Norbornenamins **157** zur direkten Anknüpfung an PDITC-funktionalisierte Glasträger.

Nun kann das Norbornenderivat **157** als Lösung in Carbonat-Puffer (100 mM, pH 10.2) über eine Thioharnstoffbindung kovalent an die Glasoberfläche immobilisiert werden. Als Negativkontrollen wurde reiner Carbonat-Puffer gespottet. Nach Waschschrinen zur Entfernung des nicht gebundenen Amins wurde der Glasträger 3 h mit dem Farbstoffkonjugat **154** bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend kann der Chip mittels Arrays scanner bei einer Wellenlänge von 532 nm ausgewertet werden. Im ersten Experiment sollte die Konzentration an **157** ermittelt werden, bei der eine maximale Belegung der Oberfläche mit dem Norbornen **157** erreicht werden kann. Die Auftragung der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **157** zeigt die in Abb. 3.46 abgebildete Kurve.

Aus der erhaltenen Kurve wurde nun die Konzentration ausgewählt, die für die Herstellung von Molenbrüchen der Verbindung **101** und dem Amin-modifizierten Norbornen **157** verwendet werden sollte. Ziel war eine Gesamtkonzentration an reaktiven Aminogruppen zu haben, die ausreichend ist, um mit möglichst allen Isothiocyanatgruppen der Glasoberfläche zu reagieren. Mit Hilfe dieser Molenbrüche können verschiedene Ausbeuten bei Testreaktionen auf dem Chip simuliert werden. Es wurde eine Gesamtkonzentration von 0.5 mM gewählt, um den Substanzverbrauch zu minimieren. Diese Konzentration liegt im vorderen Bereich der Sättigung der in Abb. 3.46 zu sehenden Kurve.

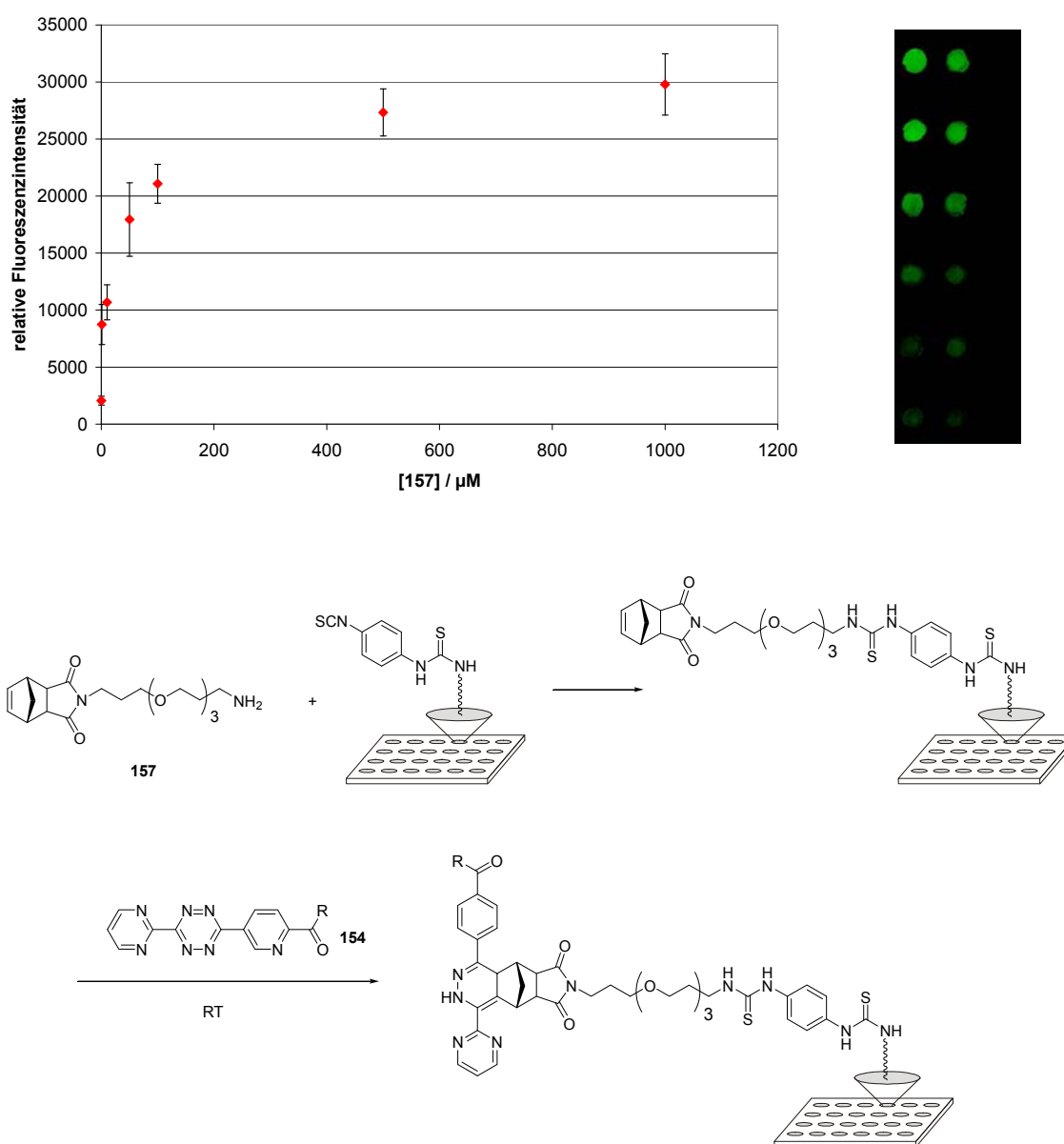


Abb. 3.46: Bestimmung der zur Sättigung der Oberfläche benötigten Konzentration an **157** bei einem PMT-Gain von 550 nach Inkubation mit dem Farbstoffkonjugat **154** (1 mM) für 3 h.

Es wurden verschiedene Molenbrüche x (immer bezogen auf das Norbornenderivat) durch Mischen von Lösungen von **101** und **157** (jeweils 0.5 mM) hergestellt. Diese wurden dann auf den mit PDITC modifizierten Glaträger aufgetragen und der Chip über Nacht inkubiert. Nach der Immobilisierung wurde zur Anfärbung eine 1 mM Lösung des Tetrazins **154** in MeOH verwendet. Nach 3 h wurde nichtgebundenes Farbstoffkonjugat abgewaschen und die Fluoreszenzintensität der Chips ausgelesen. Durch Auftragung dieser Werte gegen die Molenbrüche erhält man die Kurve in Abb. 3.47, welche zeigt, dass die Fluoreszenzintensität eindeutig linear mit zunehmendem Molenbruch x ansteigt und somit proportional mit der Beladung an Norbornen auf der Oberfläche ist. Dies ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass Norbornene als Alkohole im Testsystem verwendet werden können.

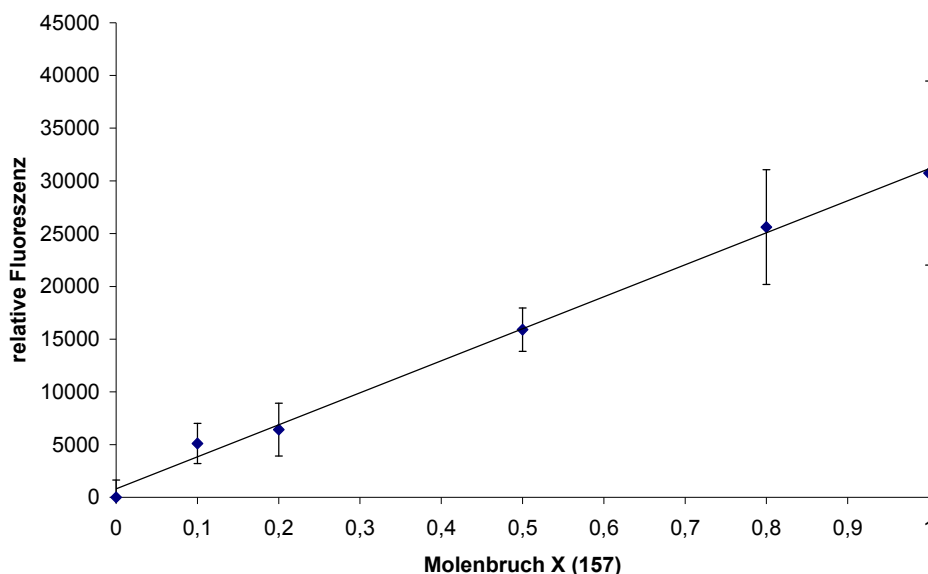


Abb. 3.47: Auftragung der Fluoreszenzintensität bei einem PMT-Gain von 550 gegen den Molenbruch x $[157]/[107]$ bei einer Gesamtkonzentration von 0.5 mM nach Inkubation mit dem Tetrazinkonjugat **154** (c) für 3 Stunden.

Eine weitere Herausforderung bei der Etablierung des chipbasierten Testsystems stellte die Einteilung des Chips in verschiedene Reaktionsräume dar. In der Biochemie wird oft auf silikonbasierte Masken zurückgegriffen (siehe Abb. 3.48), welche auf die Glasoberfläche aufgeklebt werden. Vor der Auswertung der Chips muss diese mechanisch wieder entfernt werden und es bleiben Kleberreste zurück, die unter Umständen stören können. Zudem ist man in der Wahl der Lösungsmittel stark eingeschränkt, da mit diesen Silikonmasken keine halogenierten Lösungsmittel

verwendet werden können (die Maske quillt auf und der Klebstoff wird angelöst). Ein Test mit Glasringen, die durch Wasserglas (wässrige Lösung von amorphen Natrium- und Kaliumsilicaten) auf die Glasträger aufgebracht wurden, erwies sich als wenig praktikabel. Schließlich entwickelten wir in Zusammenarbeit mit Markus Weiland von den wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Konstanz eine geeignete Reaktionskammer mit dem Namen „**MARCO**“, *multifunctional array reaction chamber for oxazolines*.



Abb. 3.48: Die neu entwickelte Reaktionskammer **MARCO** (*multifunctional array reaction chamber for oxazolines*). *oben links:* Die gesamte zusammengesetzte Reaktionskammer mit einer Maske mit 8 Teflonpfannen und eingesetztem Chip, dessen Rückseite zu sehen ist; *oben rechts:* die Elemente des **MARCO** sind hier einzeln zu sehen (von links im Uhrzeigersinn): Die Kunststoffmaske mit 8 Teflonpfannen, die Aluminiumhalterung, die Schrauben und die Glasplatte; *unten links:* Vergleichende Ansicht der verwendeten Einteilungen des Chips in mehrere Reaktionsräume: Reaktionskammer **MARCO**, Glasträger mit aufgeklebten Glasringen und Glasträger mit Silikonmaske; *unten rechts:* **MARCO** auf einem Horizontalschüttler.

Die Kammer besteht aus einer Aluminiumhalterung in dessen Mitte eine Kunststoffmaske aus VITON eingesetzt werden kann. Der verwendete Kunststoff VITON ist ein Fluorelastomer, sehr chemikalienbeständig und quillt nicht auf. In die

Maske werden Teflontöpfe bzw. -wells eingesetzt, in welche die Reaktionslösungen eingefüllt werden. Nun kann der Glasträger mit der reaktiven Seite nach unten aufgelegt und mit einer verschraubbaren Glasplatte fest an die Maske fixiert werden. Durch Umdrehen der abgedichteten Reaktionskammer wird der Chip optimal durch die Reaktionslösungen benetzt. Sie kann auch unter erhöhten Temperaturen und auf Horizontalschüttlern zur besseren Inkubierung benutzt werden. Nach dem Ende der Reaktion erhält man den Glasträger rückstandsfrei zurück. Es wurden Masken mit 8, 12 und 24 wells hergestellt. **MARCO** wurde bei allen folgenden Testreaktionen auf dem Chip verwendet.

Weitere mögliche Lösungsmittel zur Durchführung der Glycosylierungen auf dem Chip anstelle von Chloroform, deren Verwendung bei Einsatz des **MARCOs** möglich sind, sind Acetonitril, Toluol, DCM, DMF und THF. Vor der Verwendung in Experimenten auf fester Phase wurden dazu mehrere Reaktionen in Lösung durchgeführt.

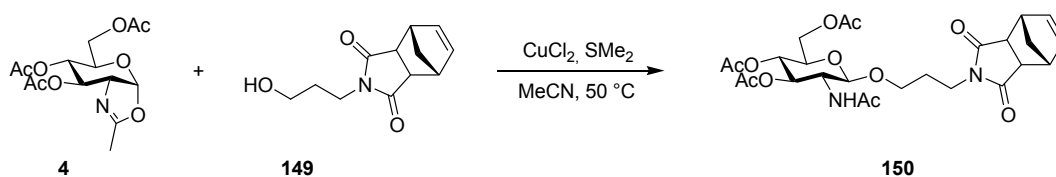


Abb. 3.49: Testreaktion des Oxazolins **4** in Acetonitril mit dem Norbornenalkohol **149** als Glycosylakzeptor.

Zunächst wurde Oxazolin **4** mit Norbornenalkohol **149** in Acetonitril umgesetzt. Zur besseren Löslichkeit des Aktivators Kupferchlorid wurden 0.75 eq Dimethylsulfid zugegeben (Abb. 3.49). Die erste Produktbildung konnte erst nach 7 h beobachtet werden. Nach 24 h war die Reaktion immer noch nicht vollständig abgelaufen und war somit erheblich langsamer als die Umsetzung in Chloroform. Wird bei der gleichen Reaktion als Donor das mit dem Linker versehene Oxazolin **107** eingesetzt, so konnte gar kein Umsatz beobachtet werden, weder in Acetonitril noch in Chloroform (Abb. 3.50). Womöglich wird das anomere Zentrum durch den relativ flexiblen Linker abgeschirmt oder die Polyglycolstruktur als solche koordiniert an den Aktivator. Genau diese Reaktionen scheinen sich daher nicht als Referenztestreaktionen auf dem Chip zu eignen.

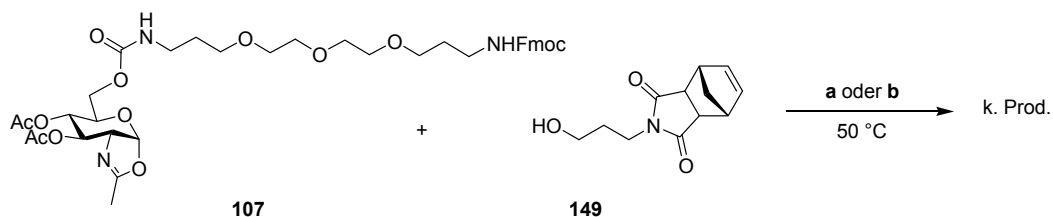


Abb. 3.50: Testreaktion des Oxazolins **4** in Acetonitril mit dem Norbornenalkohol **149** als Glycosylakzeptor. a: CuCl_2 , SMe_2 , MeCN ; b: CuCl_2 , CHCl_3

Weitere Reaktionen mit Zinkiodid und Pyridiniumtriflat als Aktivatoren und dem Norbornenalkohol **149** als Akzeptor gelangen mit dem Oxazolin **107** mit Linker, auch wenn nur geringe Ausbeuten erzielt werden konnten (Abb. 3.51). Der Trend, dass die Glycosylierungen bei Verwendung des Donors mit Linker langsamer und schlechter ablaufen, wird somit bestätigt. Die Schlussfolgerung, dass damit alle Reaktionen auf einer Glasoberfläche schlechter oder gar nicht ablaufen kann jedoch nicht gezogen werden, da durch die Immobilisierung der Linker nicht mehr beliebige Konformationen einnehmen kann. Zudem ist das Verhältnis von Glycosylakzeptor und Aktivator zum immobilisierten Zucker um ein Vielfaches größer als bei den homogenen Reaktionen in Lösung.

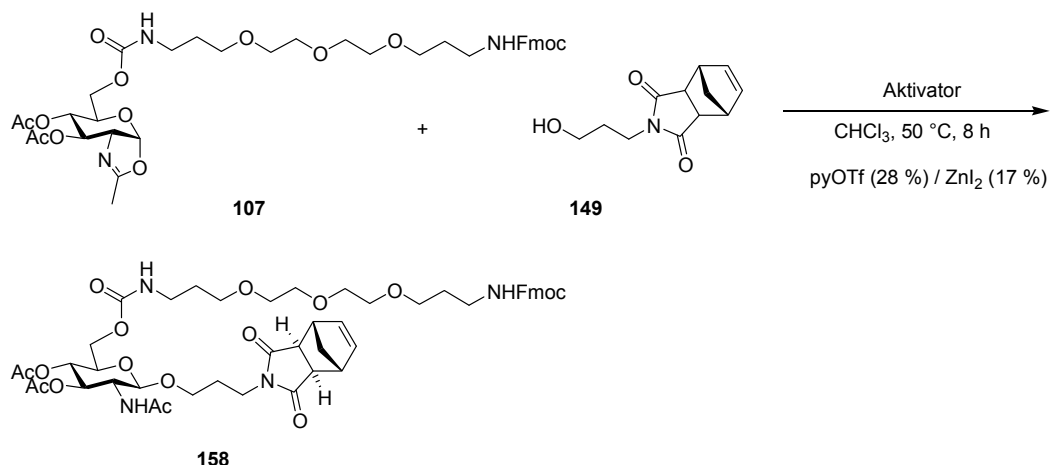


Abb. 3.51: Glycosylierung des Oxazolins **107** mit Linker zum Norbornenglycosid **158** mit Pyridiniumtriflat oder Zinkiodid als Aktivatoren.

Für die ersten Testglycosylierungen auf dem Chip unter Zuhilfenahme der **MARCO**-Reaktionskammer wurde ein PDITC-funktionalisierter Glasträger über Nacht mit 1 mM Lösungen der Amine **101** (Negativkontrolle), **108** (Oxazolin mit Linker) und **157** (Positivkontrolle) in Carbonatpuffer behandelt, um diese parallel kovalent zu immobilisieren. Im nächsten Schritt wurde die Testreaktion mit dem Norbornenalkohol **149** mit Pyridiniumtriflat (pyOTf) als Aktivator 16 h bei 50 °C in CHCl₃ in den *wells* mit immobilisiertem Oxazolin **108** durchgeführt (Abb. 3.52).

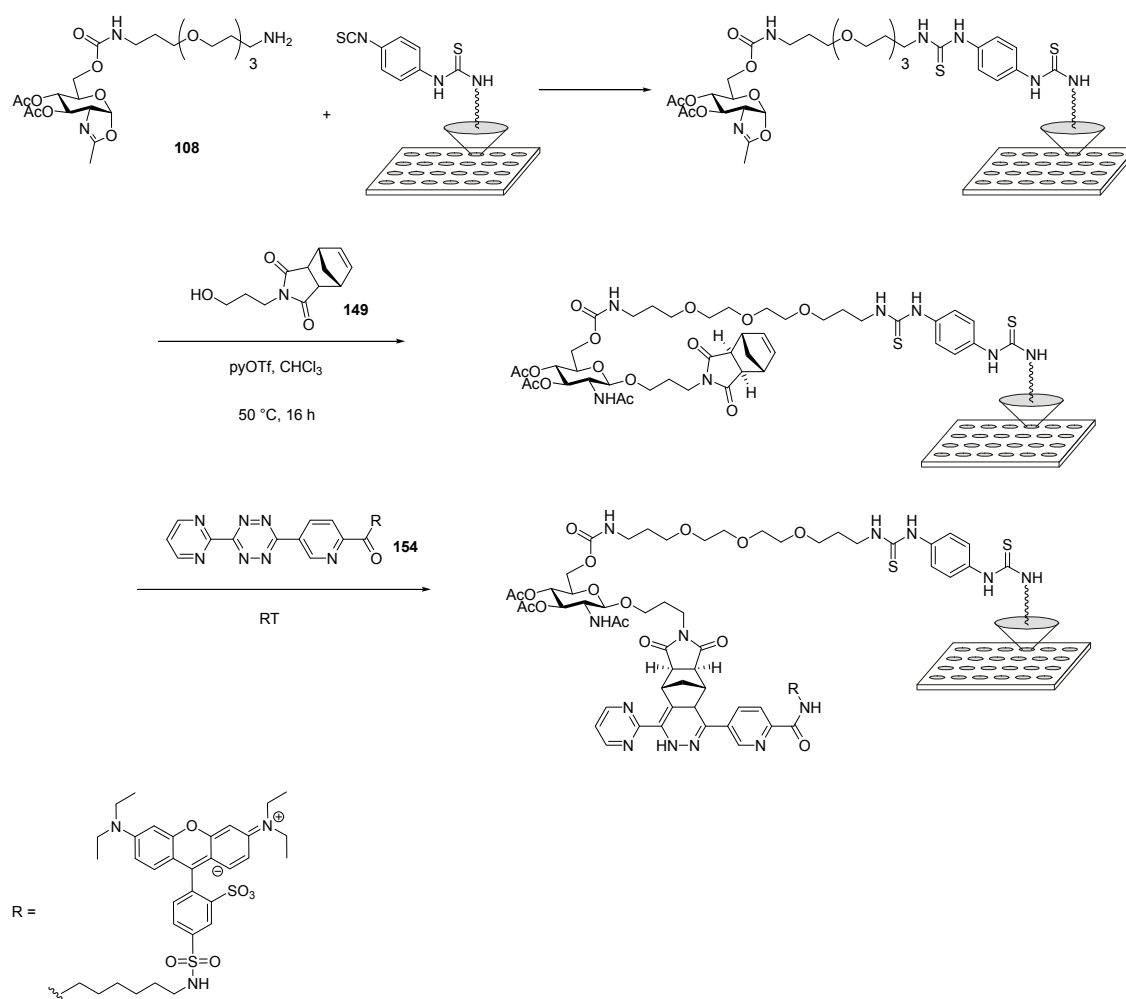


Abb. 3.52: Übersicht der Reaktionen des Oxazolins **108** auf dem PDITC funktionalisierten Glasträger: Zunächst wurde das Oxazolin als 1 mM Lösung in Carbonatpuffer aufgetragen, um dieses zu immobilisieren. In der eigentlichen Testreaktion reagierte der immobilisierte Zucker mit dem Norbornenalkohol **149** unter Ausbildung einer glycosidischen Bindung. Das erhaltene Glycosid wurde im letzten Schritt mit dem fluoreszenzgelabelten Tetrazin **154** umgesetzt. Das erhaltene Produkt konnte schließlich mit dem Arrayscanner quantifiziert werden.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten kann Abb. 3.53 entnommen werden. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass das entwickelte System für die Suche nach neuen Glycosylierungsaktivatoren geeignet ist. Das Verhältnis zwischen Positiv- und Negativkontrolle beträgt ca. 9:1, wodurch immer noch ein breites Fenster zur Unterscheidung der Aktivitätsabstufungen verschiedener Aktivatoren offen bleibt. Die Standardabweichung der Messwerte der höheren Werte liegt zwischen 10-15 %. Die erhaltenen Werte können also als signifikant gewertet werden. Zur Berechnung einer relativen Ausbeute auf dem Chip für die Reaktion kann der Wert für die Negativkontrolle von den anderen beiden Werten abgezogen werden und die so erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Für die Testreaktion mit Pyridiniumtriflat als Aktivator wird somit eine relative Ausbeute von 66 % ($\text{Ausbeute} = \frac{\text{FI}(\text{Reaktion}) - \text{FI}(\text{Negativkontrolle})}{\text{FI}(\text{Positivkontrolle}) - \text{FI}(\text{Negativkontrolle})} = \frac{13400 - 2200}{19200 - 2200} = \frac{11200}{17000} = 0,66$) bestimmt (Abb. 3.53).

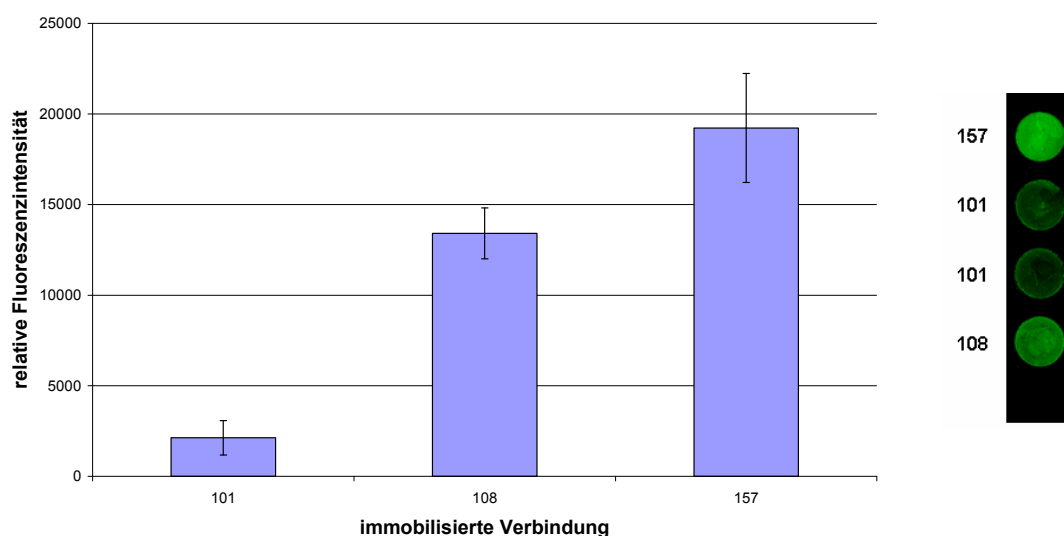


Abb. 3.53: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten bei einem PMT-Gain von 550 nach der Testreaktion des Oxazolins **108** auf einem PDITC funktionalisierten Glasträger. Das Amin **101** wurde als Negativkontrolle, das Norbornen mit Aminolinker **157** als Positivkontrolle aufgetragen. Rechts neben dem Diagramm ist ein repräsentativer Ausschnitt des Chips nach Auswertung im Array-Scanner zu sehen.

Als weitere Negativkontrollen bei den Chipexperimenten wäre ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen eine reduzierte Form des Alkohols **149** von Interesse, die bei der anschließenden Anfärbeligation nicht mit dem Tetrazin-Farbstoffkonjugat reagieren kann.

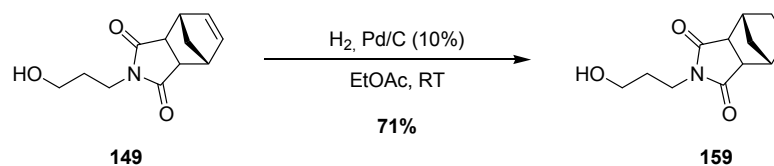
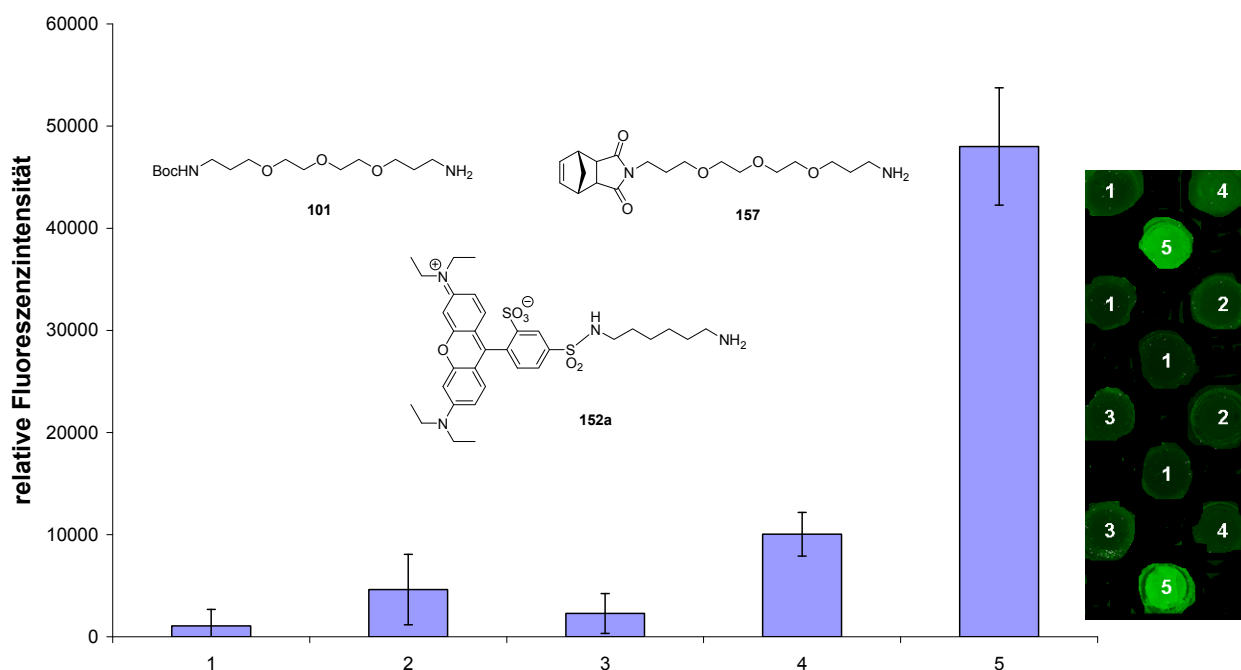


Abb. 3.54: Hydrogenolyse des Norbornens **149** zum Alkohol **159**.

Dazu wurde das Norbornen **149** in Ethylacetat mit Pd/C (10%) über Nacht unter H₂-Atmosphäre über Nacht zum gesättigten Alkohol **159** reduziert (Abb. 3.54). Im nächsten Chipexperiment (Abb. 3.55) wurden nun an PDITC-funktionalisierte Glaträger erneut das Boc-geschützte Amin **101** als Negativkontrolle und das Norbornenamin **157** als Positivkontrolle der weiteren Ligationsreaktion immobilisiert.

Als weiterer Vergleich wurde der Rhodaminfarbstoff **152a** direkt an die Oberfläche gekoppelt (Abb. 3.55, (5)). Die Negativkontrolle wurde im Folgenden entweder mit reinem Chloroform oder Lösungen des Testalkohols **149** oder seiner reduzierten Variante **159** in Chloroform bei 50 °C behandelt. Nach Anfärbereaktion mit dem Tetrazinfarbstoffkonjugat **154** wurde der Chip am Arrayscanner ausgelesen. Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten kann Abb. 3.55 entnommen werden. Die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle **157** (4) nach der Anfärbereaktion entspricht nur etwa einem Fünftel der Intensität, die man bei direkter Immobilisierung des Farbstoffs **152** (5) bei gleicher Konzentration auf der Oberfläche erhält. Bei einer Gesamtausbeute von 100 % in der Ligationsreaktion würde man die gleiche Intensität erwarten, es besteht also noch Optimierungsbedarf bezüglich der Ligationsreaktionsbedingungen. Die Intensität der Negativkontrolle bei Abwesenheit eines Testalkohols entspricht etwa einem Zehntel der Intensität der Positivkontrolle **157** (4). In Anwesenheit des Alkohols **149** (2) entspricht die Intensität ungefähr der Hälfte, in Anwesenheit des reduzierten Alkohols **159** (3) etwa einem Viertel der Positivkontrolle.



Amin	101	101	101	157	152a
Testalkohol	-	149	159	149	-
Tetrazin	+	+	+	+	-
Rel. FI	1060 ± 1618	4620 ± 3450	2290 ± 1950	10050 ± 2140	47990 ± 5740

Abb. 3.55: Einfluss des verwendeten Testalkohols auf die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen. Das Diagramm zeigt die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten bei einem PMT-Gain von 480 bei einer Gesamtkonzentration von 1 mM nach Inkubation mit dem Tetrazinkonjugat **154** für 3 Stunden.

Die Fluoreszenzintensität steigt folglich immer in Anwesenheit einer der beiden verwendeten Alkohole an. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die Doppelbindung, als auch die Hydroxyfunktion zu einem gewissen Teil dazu beitragen, dass es zu einer unspezifischen Bindung des Farbstoff-Tetrazinkonjugats an den Chip kommt. Das Experiment zeigte, dass der Waschschrift zur Entfernung überschüssigen Alkohols zwischen der Glycosylierung und der Anfärbung mittels Ligationsreaktion immens wichtig ist. Interessant ist allerdings, dass auch der reduzierte Alkohol **159**, an den keine DARinv mehr erfolgen kann die unspezifische Bindung des Farbstoffs verstärkt.

Möglicherweise wird die Oberflächenbeschaffenheit des Chips durch Verwendung bzw. Benetzung mit den beiden Alkoholen verändert (Oberflächenspannung, Ladungsverteilung etc.).

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen (siehe Experimentalteil) auf dem Chip wurden Testreaktionen mit den Aktivatoren Pyridiniumtriflat, $\text{La}(\text{OTf})_3$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, PPTS, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ und ZnI_2 durchgeführt. Die Auftragung der ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten (FI) können Abb. 3.56 und Abb. 3.57 entnommen werden. Die daraus abgeleiteten relativen Ausbeuten der Glycosylierung des oberflächengebundenen Oxazolins sind in Abb. 3.58 zu sehen. Die Berechnung der relativen Ausbeute erfolgte nach folgender Formel: $\text{FI}(\text{Reaktion}) - \text{FI}(\text{Negativkontrolle}) / \text{FI}(\text{Positivkontrolle}) - \text{FI}(\text{Negativkontrolle})$. Der Wert der Differenz der Fluoreszenzintensitäten der Positivkontrolle und der Negativkontrolle entspricht also einer relativen Ausbeute von 100 %.

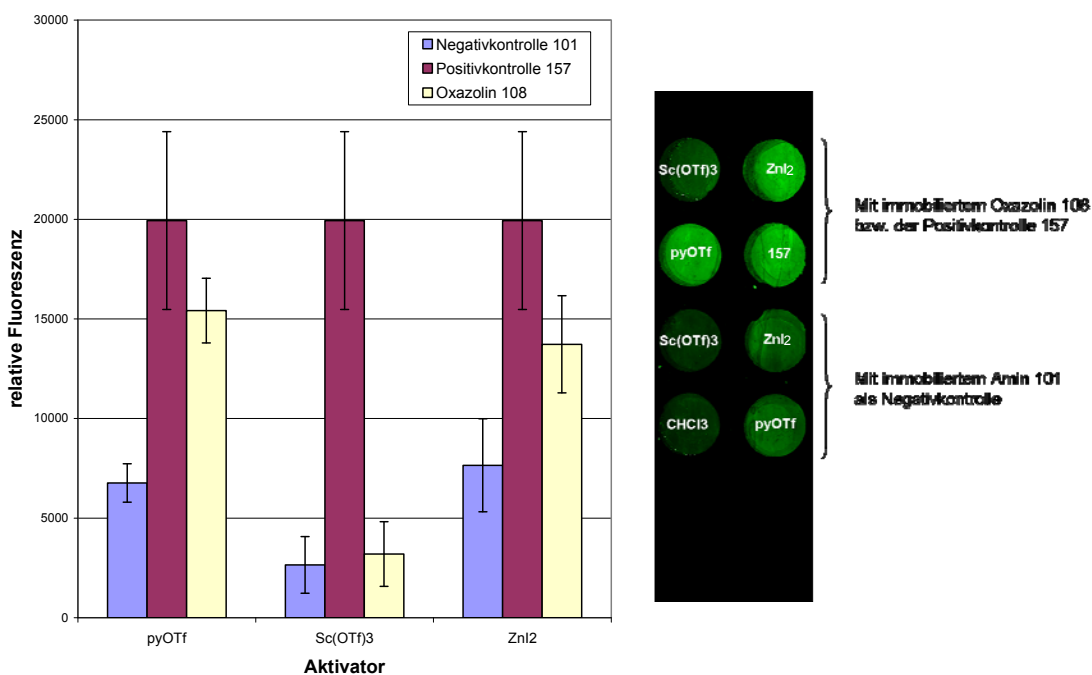


Abb. 3.56: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten bei einem PMT-Gain von 550 nach der Testreaktion des Oxazolins **108** auf einem PDITC funktionalisierten Glasträger unter Verwendung verschiedener Aktivatoren (pyOTf, Scandiumtriflat und ZnI_2). Das Amin **101** wurde als Negativkontrolle, das Norbornen mit Aminolinker **157** als Positivkontrolle aufgetragen.

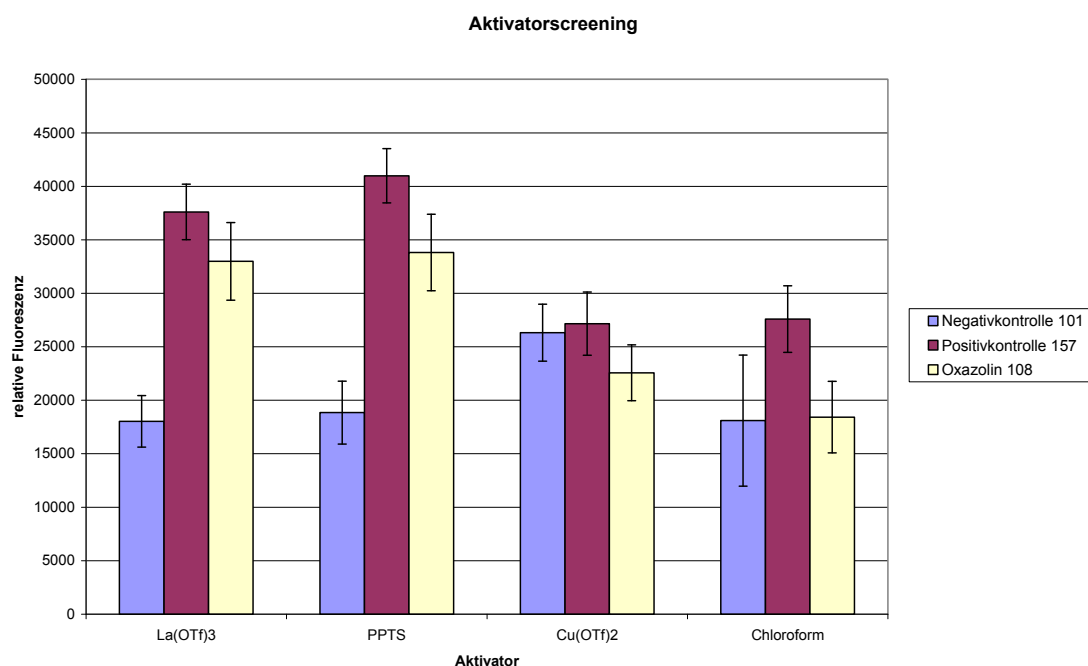


Abb. 3.57: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten bei einem PMT-Gain von 550 nach der Testreaktion des Oxazolins **108** auf einem PDITC funktionalisierten Glasträger unter Verwendung verschiedener Aktivatoren (La(OTf)₃, PPTS, Cu(OTf)₂) in Chloroform. Zum Vergleich wurde die Reaktion auch in Chloroform ohne Aktivator durchgeführt. Das Amin **101** wurde als Negativkontrolle, das Norbornen mit Aminolinker **157** als Positivkontrolle aufgetragen.

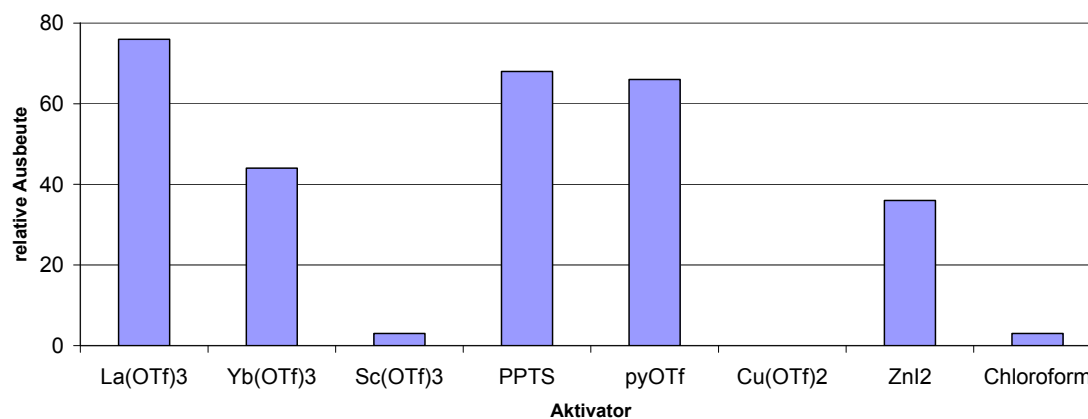


Abb. 3.58: Vergleich der auf dem Chipsystem ermittelten relativen Ausbeuten der Glycosylierung des oberflächengebundenen Oxazolins **108**.

Bis auf die Reaktion mit Kupfertriflat konnte in allen Fällen ein Reaktionsumsatz detektiert werden. Die höchste Ausbeute wurde dabei bei der Verwendung des Lanthantriflats beobachtet (relative Ausbeute von 76 %). PPTS und pyOTf führten zu

etwas geringeren relativen Ausbeuten (68 % bzw. 66 %), wohingegen Ytterbiumtriflat und Zinkiodid lediglich mäßige relative Ausbeuten (44 % und 36 %) ergaben. Inwieweit die Screening-Ergebnisse des erfolgreich entwickelten Systems auf die entsprechenden Glycosylierungen in Lösungen übertragen werden können, ist Bestandteil des folgenden Kapitels (Abschnitt 3.2.1). Sollte sich dabei ein qualitativer oder sogar eine direkte quantitative Korrelation zwischen den Ausbeuten in Lösung mit den relativen erhaltenen Fluoreszenzintensitäten ergeben, dann kann das Testsystem als ein wichtiges Werkzeug zur Identifizierung neuer Aktivatoren herangezogen werden. Es ist zudem das erste Testsystem dieser Art ohne weitere Beispiele in der aktuellen Literatur, bei dem Glycosylierungen auf einem festen Träger direkt ausgelesen werden können.

3.2 Glycosylierungen mit Oxazolinen als Glycosyldonoren

3.2.1 Untersuchung verschiedener Aktivatoren in Lösung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit neben Kupfer(II)chlorid auch andere Metallsalze bzw. deren Komplexe dazu in der Lage sind, Zuckeroxazine zu aktivieren oder deren Glycosylierung sogar zu katalysieren. Die dafür gewählte Hauptmethode stellt der in Kapitel 3.1 vorgestellte Ansatz eines chipbasierten Testsystems dar. Daneben wurden aber auch Testreaktionen in Lösung durchgeführt, um einerseits zu überprüfen, inwieweit die durch das entwickelte Testsystem identifizierten Aktivatoren in homogenen Reaktionen eingesetzt werden können. Zudem können so auch noch andere Parameter wie z.B. Reaktionszeit und Konzentrationsabhängigkeit beurteilt werden.

Die in Abb. 3.59 gezeigte Reaktion wurde bereits 2002 von Wittmann und Lennartz mit CuCl_2 als Aktivator untersucht.^[89] Dabei erhielt man eine Ausbeute von 92 % nach einer Reaktionsdauer von 43 h. Diese Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit in diversen Testansätzen mit unterschiedlichen Aktivatoren durchgeführt. Mittels DC-Kontrolle konnte auf diese Weise schnell die Qualität interessanter Lewissäuren beurteilt werden, die anschließend in quantitativen Ansätzen mit der Reaktion mit Kupfer(II)chlorid verglichen werden konnten.

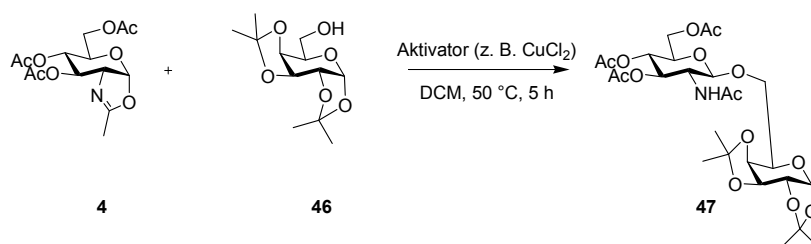


Abb. 3.59: Testglycosylierung in Lösung zur Untersuchung potentieller Aktivatoren des Zuckeroxazolins **4**.

Zunächst wurden Stammlösungen des Zuckeroxazolins **4** (1 M) und der Diacetongalactose **46** (0.67 M) in absolutem CHCl_3 hergestellt. Von diesen Stammlösungen wurden jeweils 150 μL über ein Septum in ein zuvor mit dem jeweiligen Aktivator befüllten Kolben gegeben. Damit erhält man eine Reaktionsmischung, in der ein Donor / Akzeptor – Verhältnis von 1.5:1 vorliegt. Alle Ansätze wurden 5h bei 50°C gerührt. In regelmä-

sigen Abständen (nach 60 min) wurde jeweils eine Probe für eine DC-Kontrolle entnommen. Die erhaltenen Ergebnisse können der Tabelle 3.2 für die Kupfer- und Zinksalze, sowie Tabelle 3.3 für verschiedene Lanthanidtriflate und -chloride entnommen werden.

Tabelle 3.2: Untersuchte Kupfer- und Zinksalze als Aktivatoren in der Oxazolinmethode. In den Glycosylierungen wurde der Oxazolindonor **4** (1.5 eq, 0.5 M) mit 1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**46**) (1 eq) unter Verwendung von 1.5 eq des Aktivators in CHCl_3 bei 50 °C umgesetzt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC beurteilt.

Metallsalz	Aktivität	Reaktionsgeschwindigkeit	Löslichkeit
CuCl_2	✓	Referenz	mäßig
CuF_2	-	-	gering
CuBr_2	✓	vergleichbar	mäßig
$\text{CuCl}_2 \times \text{SMe}_2$	✓	schneller	gut
$\text{CuBr}_2 \times \text{SMe}_2$	✓	schneller	gut
CuCl	-	-	mäßig
$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	-	-	mäßig
$\text{Cu}(\text{OTf})_2$	-	-	mäßig
ZnCl_2	-	-	gering
ZnBr_2	✓	langsamer	mäßig
ZnI_2	✓	schneller	gut
$\text{Zn}(\text{OAc})_2$	-	-	mäßig
$\text{Zn}(\text{OTf})_2$	✓	vergleichbar	gut

Beim Versuch das Oxazolin **4** mittels Kupfer(II)fluorid zu aktivieren, konnte auch nach 24 h keine Reaktion beobachtet werden. Es wurden allerdings auch keine Nebenprodukte gebildet. Somit macht es keinen Sinn, CuF_2 für EPR-Experimente zur

Strukturaufklärung einzusetzen (siehe Kapitel 3.3.3), obwohl Fluoridionen diese Messungen vereinfachen könnten. Wie erwartet erhielt man für CuCl_2 und CuBr_2 ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits früher in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden konnten.^[89] Bei der Verwendung von CuBr_2 können Bromoniumionen entstehen, die insbesondere bei der Verwendung von ungesättigten Glycosylakzeptoren zu Nebenreaktionen führen können. Wurden die entsprechenden Dimethylsulfidkomplexe eingesetzt, so lässt sich in beiden Fällen eine Aktivität bei höherer Reaktionsgeschwindigkeit feststellen. Eine Erklärung für diesen Befund scheint die bessere Löslichkeit der Sulfidkomplexe im Vergleich zum freien Metallsalz zu sein. CuCl als Kupfer(I)-Salz ist kein geeigneter Aktivator für die Glycosylierung. Die niedrigere Oxidationszahl führt zu einem veränderten Koordinations-Verhalten, bei der Wechselwirkung als Lewisäure mit dem Glycosyldonor bzw. bei einer Ausbildung eines entsprechenden Zuckerkomplexes. Die zwei weiteren Kupfer(II)-Salze $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ und $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ zeigten ebenfalls keine Aktivität. Dies ist insofern interessant, da von Christensen *et al.* berichtet wurde, dass zumindest $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ als Aktivator für Glycosylierungen eingesetzt werden kann.^[92] Die dänische Arbeitsgruppe ging bei ihren Reaktionen dabei von peracetyliertem GlcNAc in DCM als Lösungsmittel aus und vermutet eine *in situ* - Bildung des Oxazolins **4** während der Glycosylierung. Unsere Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass es sich um einen zu unserer Reaktion andersartigen Mechanismus handeln sollte. ZnBr_2 und ZnI_2 scheinen als Aktivatoren durchaus geeignet zu sein. Ob ZnI_2 sogar ein besserer oder ähnlich guter Aktivator wie CuCl_2 ist, muss mit einem quantitativen Ansatz ermittelt werden.

Neben den Kupfer- und Zinksalzen wurden insbesondere Lanthanidtriflate näher untersucht. Diese Lewisäuren zeichnen sich durch eine hohe Acidität aus und sind hydrolyseunempfindlich. Im Vergleich zu anderen herkömmlich verwendeten Lewisäuren wie AlCl_3 , BF_3 oder SnCl_4 können die Lanthanidtriflate aufgrund ihrer Stabilität in einer Vielzahl von Reaktionen statt in stöchiometrischen Mengen bereits in katalytischen Mengen zu einer erfolgreichen Umsetzung führen. Darüber hinaus ist es sogar oft möglich, dass man sie nach der Reaktion zurückgewinnen kann, ohne dass ihre Aktivität in weiteren Reaktionen beeinträchtigt wird.^[215]

Crasto *et al.* waren 2005 die Ersten, die mit Ytterbiumtriflat einen ersten Vertreter der Seltenerdtriflate in Glycosylierungen mit Zuckeroxazolinen als Donor mit Erfolg verwendet haben.^[91] Ausgehend von diesen Ergebnissen haben wir, wie in Tabelle 3.3 zu sehen, verschiedene Triflate in der gleichen Testreaktion wie in Abb. 3.59 gezeigt untersucht. Des Weiteren wurden fünf Lanthanidsalze bzw. deren Hydrate verwendet.

Bei den Triflaten konnte durchweg ein Umsatz beobachtet werden, lediglich Samariumtriflat zeigte keine Aktivität. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verwendung von Certriflat war sogar noch schneller als die der Referenz mit Kupfer(II)chlorid. Im Gegensatz dazu wurde kein Umsatz beobachtet, wenn Lanthanidchlorid-Hydrate als Aktivatoren zum Einsatz kamen. Mit dem reinen Europiumchlorid wiederum konnte die Glycosylierung erfolgreich durchgeführt werden.

Tabelle 3.3: Untersuchte Lanthanidtriflate und -chloride als Aktivatoren in der Oxazolinmethode. In den Glycosylierungen wurde der Oxazolindonor **4** (1.5 eq, 0.5 M) mit 1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**46**) (1 eq) unter Verwendung von 1.5 eq des Aktivators in CHCl_3 bei 50 °C umgesetzt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC beurteilt.

Metallsalz	Aktivität	Reaktionsgeschwindigkeit	Löslichkeit
$\text{La}(\text{OTf})_3$	✓	vergleichbar	gut
$\text{Ce}(\text{OTf})_4$	✓	schneller	gut
$\text{Sm}(\text{OTf})_3$	-	-	gering
$\text{Dy}(\text{OTf})_3$	✓	vergleichbar	gut
$\text{Sc}(\text{OTf})_3$	✓	vergleichbar	gut
$\text{Yb}(\text{OTf})_3$	✓	vergleichbar	gut
$\text{TbCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	-	-	gering
$\text{DyCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	-	-	gering
$\text{Ho}(\text{OAc})_3 \times \text{H}_2\text{O}$	-	-	gering
$\text{GdCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	-	-	gering
EuCl_3	✓	vergleichbar	gut

Mit den als aktiv identifizierten Aktivatoren wurden daraufhin quantitative Reaktionen durchgeführt. Des Weiteren wurden auch die entsprechenden Reaktionen mit pyOTf und PPTS durchgeführt. Diese Aktivatoren wurden von Oscarson *et al.* bei der

Glycosylierung von Chitobioseoxazolinen eingesetzt.^[216] Die erhaltenen Ausbeuten können der Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Quantitative Ansätze zur Oxazolinmethode. In den Glycosylierungen wurde der Oxazolindonor **4** (1.5 eq, 0.5 M) mit 1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**46**) (1 eq) unter Verwendung von 1.5 eq des Aktivators in CHCl₃ bei 50 °C zum Disaccharid **47** umgesetzt (Abb. 3.59).

Aktivator	Reaktionszeit	Ausbeute (47)
CuCl ₂	17 h	54 %
La(OTf) ₃	17 h	48 %
Ce(OTf) ₃	17 h	40 %
EuCl ₃	17 h	51 %
InCl ₃	17 h	10%
CuCl ₂	24 h	68 %
CuCl ₂ x SMe ₂	24 h	39 %
ZnI ₂	24 h	84 %
Yb(OTf) ₃	24 h	73 %
La(OTf) ₃	24 h	59 %
Sc(OTf) ₃	24 h	17 %
pyOTf	24 h	18 %
PPTS	24 h	27 %
CuCl ₂	43 h	92 % ^[89]

Die Reaktionen wurden jeweils nach 17 h oder 24 h abgebrochen und entsprechend aufgearbeitet. Beim Einsatz des Dimethylsulfidkomplexes anstatt reinem CuCl₂ ist die Löslichkeit des Aktivators in Chloroform viel größer, was aber auf die Reaktion in die-

sem Fall keinen positiven Einfluss hat. Man erhält sogar eine signifikant schlechtere Ausbeute (39 % im Vergleich zu 68 % nach 24 h). Wenn man davon ausgeht, dass das Oxazolin durch die Koordination an Kupfer aktiviert wird, kann dieser Befund damit erklärt werden, dass der Zucker mit Dimethylsulfid um Koordinationsstellen koordinieren muss. Bei den Seltenerdtriflatsen gibt es keinen generellen Trend zu beobachten. Während man mit $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ eine etwas bessere und mit $\text{La}(\text{OTf})_3$ sowie $\text{Ce}(\text{OTf})_3$ nur geringfügig schlechtere Ausbeuten erhält, so erwies sich $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ als deutlich schlechtere Alternative im Vergleich zu CuCl_2 . Die ermittelte Ausbeute von 73 %, die mit $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ erzielt wurde, war dabei geringer als die von Crasto *et al.* publizierte von 89 %, die lediglich Dichlormethan anstelle von Chloroform als Lösungsmittel für die gleiche Reaktion verwendet hatten. Christensen *et al.* erhielten im Gegensatz zu den hier bestimmten Ausbeuten die besten Glycosylierungsergebnisse mit $\text{Sc}(\text{OTf})_3$.^[92] Auch sie verwendeten wie Crasto *et al.* Dichlormethan als Lösungsmittel. Zudem hatten sie mit 2:1 ein höheres Donor/Akzeptor-Verhältnis und setzten lediglich 15 mol% des Scandiumtriflats ein. Die Säurestärke der Lewisäure Scandiumtriflat, von der im quantitativen Ansatz mit 1.5 eq oder 150 mol% das Zehnfache eingesetzt wurde, führte in meinem Fall zu einem Abspalten der Isopropylidengruppen des Akzeptors, wodurch viel weniger Produkt gebildet werden konnte. In einem weiteren Experiment konnte allerdings gezeigt werden, dass 15 mol% $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ für eine Aktivierung des Oxazolins **4** nicht ausreichen.

Auch Europium(III)chlorid führte zu einem ähnlich guten Ergebnis wie CuCl_2 . Indium(III)chlorid hingegen war von den getesteten Aktivatoren am ungeeignetsten. Auch bei der Verwendung der bekannten Aktivatoren / organischen Salze pyOTf und PPTS konnte das gewünschte Disaccharid **47** nur in geringen Ausbeuten isoliert werden. Interessant ist dabei, dass keine Nebenreaktion beobachtet werden konnte, d.h. es wurde keine Hydrolyse des Oxazolindonors oder eine Entschützung des Galactosylakzeptors durch Abspaltung der Isopropylidengruppen nachgewiesen. Vielmehr waren die Reaktionen sehr langsam und es wurden die Edukte zurückgewonnen. Mit Zinkiodid wurde schließlich eine Ausbeute erzielt, die noch über der von CuCl_2 oder $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ liegt.

Zur Übersicht sollen hier noch einmal die Reihenfolge der ermittelten Ausbeuten in Lösung und auf der festen Phase aufgeführt werden:

Reaktivitätsreihenfolge in Lösung (CHCl_3) : $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (17 %) < pyOTf (18 %) < PPTS (27 %) < $\text{CuCl}_2 \times \text{SMe}_2$ (39 %) < $\text{La}(\text{OTf})_3$ (59 %) < CuCl_2 (68 %) < $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (73 %) < ZnI_2 (84 %)

Reaktivitätsreihenfolge im Chipexperiment (CHCl_3): $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (3 %) < ZnI_2 (36 %) < $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (44 %) < pyOTf (66 %) < PPTS (68 %) < $\text{La}(\text{OTf})_3$ (76 %)

Eine 1:1 - Übertragung der Reaktivitäten liegt nicht vor und war auch nicht zu erwarten. Die Unterschiede zwischen den beiden Reaktionssystemen sind dafür einfach zu groß: verschiedene Donor- / Akzeptorverhältnisse und Konzentrationen (auf der festen Phase liegt ein großer Glycosylakzeptorüberschuss vor), unterschiedliche Akzeptoren (Diacetongalactose **46** vs. Norbornenalkohol **149**), sowie der Einfluss der Grenzflächenphänomene im Chipexperiment. Es muss also darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dem Vergleich zunächst um ein sehr spezielles System handelt, dessen Aussage sich bezüglich der Abstufung der Aktivatoren nicht zwangsläufig verallgemeinern lässt. Da sich aber der Donor nicht verändert, dessen Aktivierung ein sehr wichtiger und bestimmender Schritt der Glycosylierungen darstellt, ist eine Extrapolation der ermittelten Daten durchaus berechtigt. Auch wenn sich die mittels DC oder chipgebundenem Testsystem ermittelten Aktivitäten nicht direkt auf Reaktionen in Lösung übertragen lassen können, so erhält man doch schnell und effizient Hinweise, welche Kombinationsmöglichkeiten aus Aktivator und Glycosylierungsreaktion Sinn machen. So konnte mit ALLEN Aktivatoren, die in den Testsystemen als geeignet identifiziert wurden, eine entsprechende Reaktion in Lösung beobachtet werden, wenn auch teilweise mit geringerer Ausbeute. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit den entwickelten Methoden schneller eine Synthese für relevante GlcNAc-Glycoside ausgehend von Oxazolinen etablieren lässt.

3.2.1.1 Mikrowellenreaktionen mit Oxazolin 4 als Glycosyldonor

Mit anderen Aktivatorsystemen wie z.B. PPTS oder pyOTf wurden bereits Mikrowellen-Synthesen mit Oxazolinen als Glycosyldonor durchgeführt.^[216] Das folgende Experiment sollte zeigen (siehe Abb. 3.60), ob auch die Kupfer-vermittelte Oxazolinreaktion in der Mikrowelle möglich ist und Vorteile gegenüber einer konventionellen Reaktionsführung mit sich bringt.

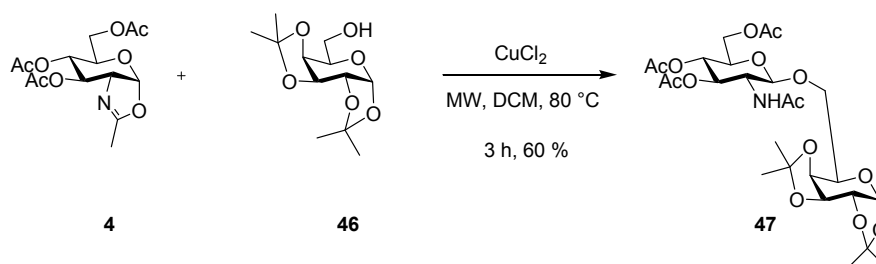


Abb. 3.60: Glycosylierung des Oxazolins 4 in der Mikrowelle.

Oxazolin 4 wurde zusammen mit Diacetongalactose 46 in CHCl_3 in einer Mikrowelle bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ zur Reaktion gebracht. Es wurde nach jeweils 1 h DC-Proben entnommen. Bereits nach 1 h war die Reaktion sehr weit fortgeschritten. Nach 3 h hatte sich die blaugrüne, klare Lösung braun verfärbt und ein Niederschlag hatte sich gebildet. Daher wurde die Reaktion bereits nach 3 h abgebrochen und aufgearbeitet. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung erhielt man das gewünschte Disaccharid 47 in einer Ausbeute von 60 %. Zum Vergleich: Bei der konventionellen Synthese konnte nach 17 h lediglich eine Ausbeute von 54 % erreicht werden. Zwei weitere Mikrowellenreaktionen mit CuCl_2 und ZnI_2 bei jeweils $130\text{ }^\circ\text{C}$ waren jedoch nicht erfolgreich, da es bei diesen hohen Temperaturen zur Zersetzung der Edukte kam.

3.2.2 Untersuchung verschiedener Glycosylakzeptoren

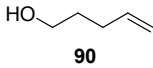
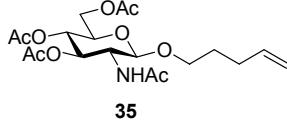
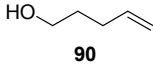
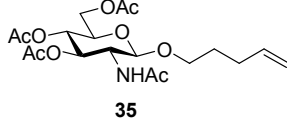
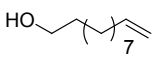
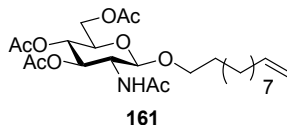
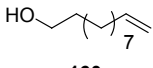
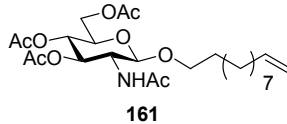
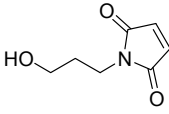
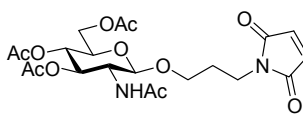
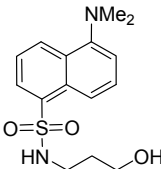
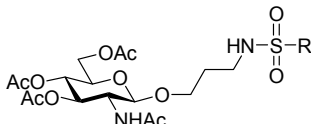
Zur Untersuchung der Anwendungsbreite des bereits bekannten Aktivators CuCl_2 und dem als weitere Alternative identifizierten Aktivator ZnI_2 wurden eine Reihe von Glycosylierungen mit dem Oxazolin 4 als Donor durchgeführt. Zunächst wurden Glycoside von einfachen Alkoholen ausgehend synthetisiert, die eine Reihe interessanter Anwendungen in chemischer Biologie und den Materialwissenschaften

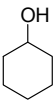
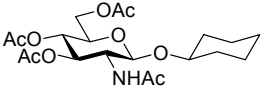
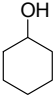
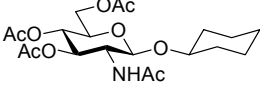
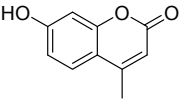
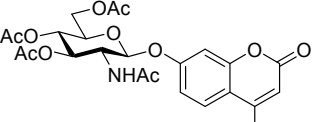
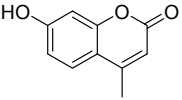
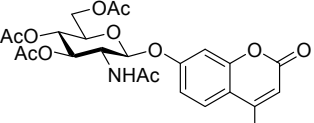
ermöglichen (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Des Weiteren wurden verschiedene Monosaccharide und eine Aminosäure als Glycosylakzeptoren verwendet. Dies ist insbesondere für die Herstellung biologisch relevanter Oligosaccharide von Bedeutung (siehe Abschnitt 3.2.2.2).

3.2.2.1 Reaktionen mit einfachen Alkoholen als Glycosylakzeptoren

Der Oxazolindonor **4** wurde mit einer Reihe primärer (**90**, **111**, **160** und **162**), einem sekundären (**164**) und einem aromatischen Alkohol (**165**) umgesetzt (siehe Tabelle 3.5). Die Reaktion mit dem primären Alkohol 4-Penten-1-ol (**90**) zu dem synthetisch wertvollen n-Pentenylglycosid **35** verlief unabhängig vom Aktivatorsalz mit nur mäßigen Ausbeuten. Als nächster primärer Alkohol wurde das ebenfalls ungesättigte 10-Undecen-1-ol (**160**) verwendet. Das dabei entstehende Glycosid **161** kann als Edukt bei der Synthese von Glyconanopartikeln verwendet werden. Die hier dargestellten Ergebnisse sind der Vollständigkeit halber angegeben, die Reaktionen wurden von Magnus Schmidt während seiner Dissertation durchgeführt.^[217] Die Synthesen verliefen vergleichbar schnell und mild ab. Es ergibt sich ein eindeutiger Unterschied beim Vergleich der zwei Aktivatoren. Beim Einsatz von ZnI_2 entstanden im Gegensatz zur Reaktion mit $CuCl_2$ mehrere nicht näher charakterisierte Nebenprodukte, welche die niedrigere Ausbeute von 41 % erklären. Schließlich können der Tabelle noch die Ausbeuten bei der Reaktion zwei weiterer primärer Alkohole, dem Maleinimidalkohol **111** und dem Dansylalkohol **162**, unter $CuCl_2$ – Aktivierung entnommen werden. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben kann **111** in Testsystemen Verwendung finden. Der Dansylalkohol **162** kann in potentiellen Glycosylierungs-Testreaktionen eingesetzt werden, bei denen das detektierbare Fluoreszenzsignal des Produkts von dem des Glycosylakzeptors unterschieden werden kann. Dies kann z.B. durch anschließende HPLC-Analytik geschehen.

Tabelle 3.5: Glycosylierung mit Oxazolin 4 als Donor und verschiedenen Akzeptoren unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Aktivatoren. D/A gibt das Verhältnis der Stoffmengen des Glycosyldonors im Vergleich zum Glycosylakzeptor an.

Aktivator	Akzeptor	Produkt	D/A	Zeit	Ausbeute
CuCl ₂	 90	 35	1 : 4	5 h	40 %
ZnI ₂	 90	 35	1 : 4	3 h	41 %
CuCl ₂	 160	 161	1 : 2	2 h	62 %
ZnI ₂	 160	 161	1 : 2	3 h	41 %
CuCl ₂	 111	 112	1 : 2	17 h	48 %
CuCl ₂	 162	 163	1 : 4	48 h	57 %

Aktivator	Akzeptor	Produkt	D/A	Zeit	Ausbeute
CuCl ₂	 164	 55	1 : 4	5 h	80 %
ZnI ₂	 164	 55	1:4	5 h	83 %
CuCl ₂	 165	 166	1:2	48 h	32 %
ZnI ₂	 165	 166	1:2	5 h	48 %

Cyclohexanol (**164**) als sekundärer Alkohol reagierte schnell und in guten Ausbeuten sowohl mit CuCl₂ als auch mit ZnI₂. Bei der Reaktion mit der phenolischen OH-Gruppe von 4-Methylumbelliferon (**165**) ergaben sich eindeutige Unterschiede zwischen den zwei Aktivatoren. Beim Einsatz von Zinkiodid konnte bereits nach 5 h kein weiterer Umsatz beobachtet werden, während dies mit Kupferchlorid erst nach 2 Tagen der Fall war. Zudem erhielt man mit ZnI₂ eine deutlich höhere Ausbeute (48%) als mit CuCl₂ (32%). Das Glycosid **166** ist ein wichtiges Intermediat in der Synthese von Substraten zur Bestimmung der Aktivität von Glycosidhydrolasen in fluorometrischen Assays (siehe Abschnitt 3.4). Insgesamt kann kein eindeutiger Trend bei den untersuchten Glycosylierungen erkannt werden. Es ist vom Glycosylakzeptor abhängig, ob CuCl₂ oder ZnI₂ die besseren Ergebnisse liefert. Beide Aktivatoren ermöglichen die Synthese wichtiger interessanter Verbindungen.

3.2.2.2 Reaktionen mit Kohlenhydraten und Aminosäuren als komplexe Glycosylakzeptoren

Der Oxazolindonor **4** ist auch in der Synthese von Di-, Tri- und anderen Oligosacchariden ein potentiell sehr interessanter Baustein. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse bei diversen Glycosylierungen mit verschiedenen Zuckern als Akzeptoren beschrieben.

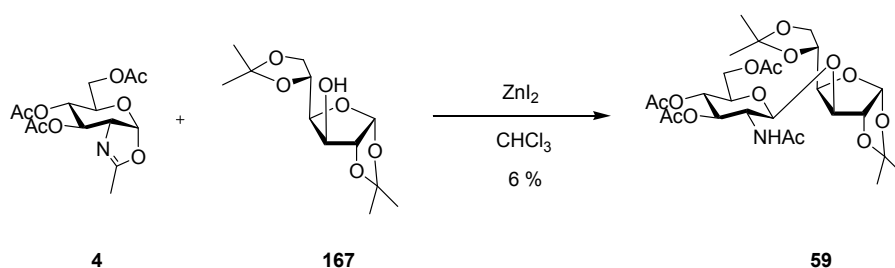


Abb. 3.61: Glycosylierung des Oxazolins **4** mit Diacetonglucose **167** und ZnI_2 als Aktivator.

Die Glycosylierung mit der sterisch gehinderten 3-OH Gruppe der 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- α -D-glucose **167** (Abb. 3.61) ergab nach 18 h lediglich eine Ausbeute von 6 %. Hauptgrund hierfür war wie schon bei der Verwendung von CuCl_2 (Ausbeute von 39 %) die Entschützung der besonders labilen 5,6-O-Isopropylidengruppe. In diesem Fall bringt die Verwendung von ZnI_2 folglich keine Vorteile gegenüber CuCl_2 .

Als nächstes sollte ein perbenzylierter Glycosylakzeptor **169** mit freier primärer OH-Gruppe an der 6-Position synthetisiert werden. Dazu wurde das Benzylidenacetal **168** bei 0 °C in DCM mit 10 eq $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ versetzt (Abb. 3.62). Nach 5 min wurde 1 eq TMSOTf zugetropft.

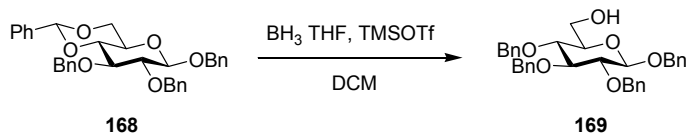


Abb. 3.62: Geplante selektive Entschützung des benzylierten Zuckers **168**.

Bei dem nach Flashchromatographie isolierten Produkt handelte es sich allerdings laut NMR und ESI-MS um die Verbindung **170** (Abb. 3.63), bei dem das Benzylidenacetal vollständig abgespalten wurde:

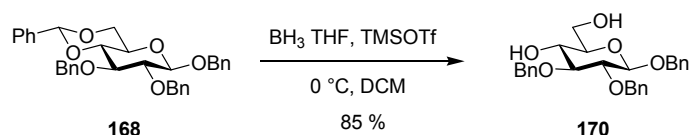


Abb. 3.63: Beobachtete Reaktion der benzylidengeschützten Verbindung **168** zum Diolakzeptor **170**.

Diese Verbindung **170** wurde dennoch als Glycosylakzeptor sowohl mit CuCl_2 als auch mit ZnI_2 als Aktivator (1.5 eq) verwendet (Abb. 3.64). Die Reaktion wurde nach 48 h abgebrochen und das Rohprodukt mittels FC mit PE/EE = 1:1 aufgereinigt. Im Falle der CuCl_2 -Aktivierung erhielt man neben dem erwarteten Produkt **171** (33 %) das Edukt **170** zurück. Die Reaktion war somit auch nach 2 Tagen nicht vollständig. Dies entsprach einer umsatzbezogenen Ausbeute von 50 %. Bei der Verwendung von ZnI_2 konnte in dieser Reaktion keine Produktbildung beobachtet werden.

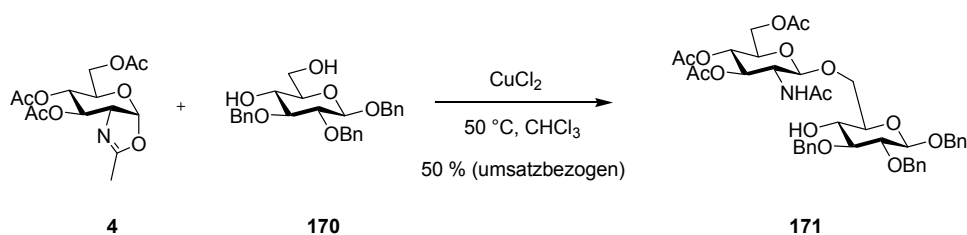


Abb. 3.64: Glycosylierung des Oxazolins **4** mit dem Diolakzeptor **170**. Nach 48 h wurde lediglich die Bildung des Disaccharids **171** beobachtet, eine 1,4-Verknüpfung fand unter den gewählten Bedingungen nicht statt.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet geeigneter Glycosyldonoren neben der Oligosaccharidsynthese ist die Herstellung von Glycopeptiden. Die Anknüpfung der Zucker an den Peptidteil kann dabei entweder an das fertige Peptid erfolgen oder man synthetisiert zunächst eine glycosylierte Aminosäure, welche dann in der weiteren Peptidsynthese eingesetzt wird. Ein Beispiel für die zweite Strategie ist die Glycosylierung der geschützten Aminosäure Fmoc-Ser-OAll (**173**). Sie wurde zunächst in einer Ausbeute von 70 % nach der in der Diplomarbeit von Dirk Lennartz beschriebenen Methode hergestellt (Abb. 3.65).^[90]

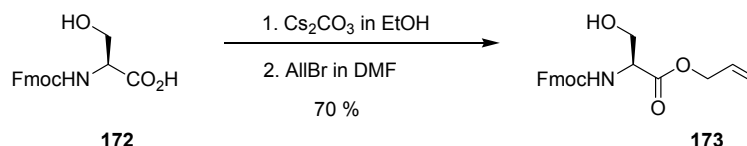


Abb. 3.65: Synthese von Fmoc-Ser-OAll (173).

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Glycosylierung dieses Serinderivats **173** mit dem Oxazolindonor **4** unter CuCl₂-Aktivierung mit einer Ausbeute von 77 % gelang. Bei der gleichen Reaktion unter Zuhilfenahme von ZnI₂ konnte das gewünschte Produkt **58** nur in einer äußerst geringen Ausbeute von 4 % synthetisiert werden (Abb. 3.66). Es wurde keine Nebenproduktbildung beobachtet, neben dem Produkt **58** wurden lediglich die Edukte isoliert.

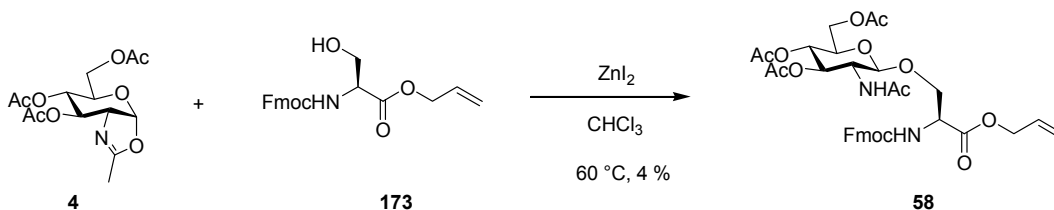


Abb. 3.66: Glycosylierung von Fmoc-Ser-OAll (173) mit Oxazolin 4.

3.2.3 Untersuchung weiterer Zuckeroxazoline

In der Literatur sind neben dem mit Abstand am häufigsten verwendeten, von *N*-Acetylglucosamin abgeleiteten Oxazolin **4**, auch die von anderen 2-Desoxy-2-aminozuckern abgeleiteten Zuckeroxazoline beschrieben, die ebenfalls unter geeigneten Bedingungen als Glycosyldonoren eingesetzt werden können (siehe Kapitel 2.3.1). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die von Galactosamin und Chitobiose abgeleiteten Oxazoline **174** und **176** sowie die reaktivere Furanoseform des GlcNAc-Oxazolins **41** für CuCl₂-aktivierte Glycosylierungen geeignet sind.

3.2.3.1 Reaktionen mit dem von Galactosamin abgeleiteten Oxazolin 178

Diese Untersuchungen wurden teilweise im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Julia Gehring durchgeführt.^[218] Sie sollen an dieser Stelle der Vollständigkeit halber beschrieben werden:

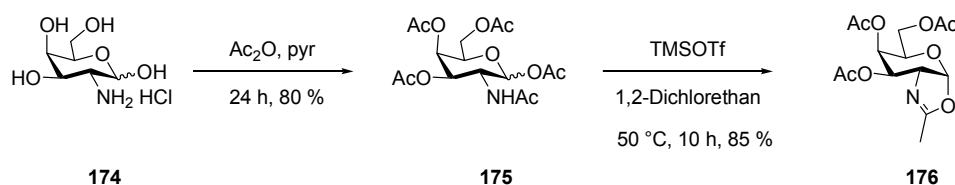


Abb. 3.67: Synthese des Oxazolins **176** ausgehend von Galactosaminhydrochlorid (**174**).

Ausgehend von Galactosaminhydrochlorid **174** konnte das Oxazolin **176** über zwei Stufen nach einer Vorschrift von Wu *et al.* synthetisiert werden (Abb. 3.67).^[219]

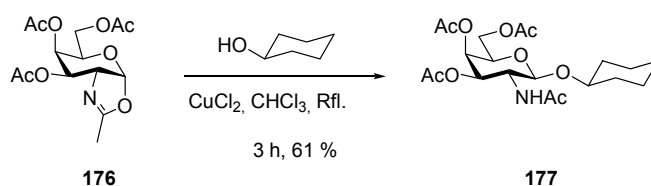


Abb. 3.68: Glycosylierung des Galactoseoxazolins **176** mit Cyclohexanol **164**.

Das erhaltene Galactoseoxazolin **176** wurde nun in einer Glycosylierungsreaktion mit Cyclohexanol **164** umgesetzt (Abb. 3.68). Bei der Verwendung von CuCl_2 war die Reaktion bereits nach 3 h beendet und man erhielt das Produkt **177** in einer Ausbeute von 61 %. Wurde hingegen ZnI_2 eingesetzt, so konnte nach 3 h lediglich eine Ausbeute von 47 % erzielt werden.

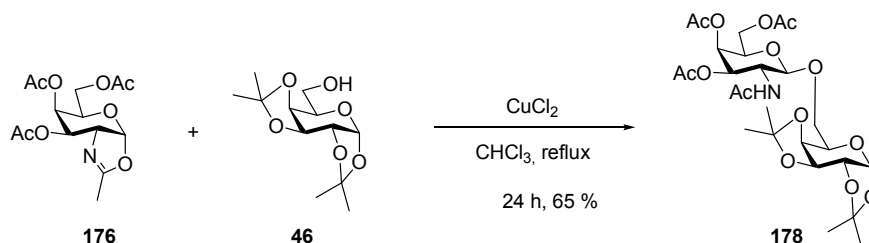


Abb. 3.69: Glycosylierung des Galactoseoxazolins **176** mit Diacetongalactose **46**.

Bei der analogen kupferkatalysierten Glycosylierung des Galactoseoxazolins **176** mit Diacetongalactose **46** konnte das Disaccharid **178** in 65 % Ausbeute dargestellt werden (Abb. 3.69). Im direkten Vergleich mit dem Glucoseoxazolin **4** scheint **176** also der schlechtere Donor zu sein (vgl. Abb. 3.59). Dennoch kann festgehalten werden, dass auch das von der peracetylierten Galactose abgeleitete Oxazolin **176** in übergangsmetallaktivierten Glycosylierungen erfolgreich eingesetzt werden kann.

3.2.3.2 Reaktionen mit dem von Chitobiose abgeleiteten Oxazolin 180

Yu *et al.* setzten bereits 1996 peracetylierte Chitobiose als Glycosyldonor ein, um mit TMSOTf das Trisaccharid **180** zu synthetisieren.^[220] Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Reaktion dabei über ein Oxazolinintermediat **179** abläuft. Dieses Oxazolin wurde in unserer Arbeitsgruppe von Henning Beckmann nach einer Vorschrift von Spinola hergestellt^[221] und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es konnte aber weder mit CuCl_2 noch mit ZnI_2 eine Bildung des Produkts **180** bei einer Umsetzung mit Diacetongalactose **46** beobachtet werden (Abb. 3.70). H. Beckmann hatte bereits in seiner Diplomarbeit versucht, das Oxazolin **179** mit Propargylalkohol zur Reaktion zu bringen.^[222] Auch dieser Versuch war nicht erfolgreich. Es wird allerdings auch keine Nebenproduktbildung beobachtet. Der Donor scheint folglich viel unreaktiver als die analogen Monosaccharidoxazoline zu sein. Durch die über die 4-OH Gruppe angeknüpfte GlcNAc-Einheit ist die Konformation des Oxazolinteils womöglich so verzerrt, dass eine Koordination von Zink oder Kupfer erschwert wird. Zudem wird der Stickstoff am Oxazolin eventuell stärker sterisch abgeschirmt. Eine computergestützte Strukturmodellierung wäre hier sehr hilfreich.

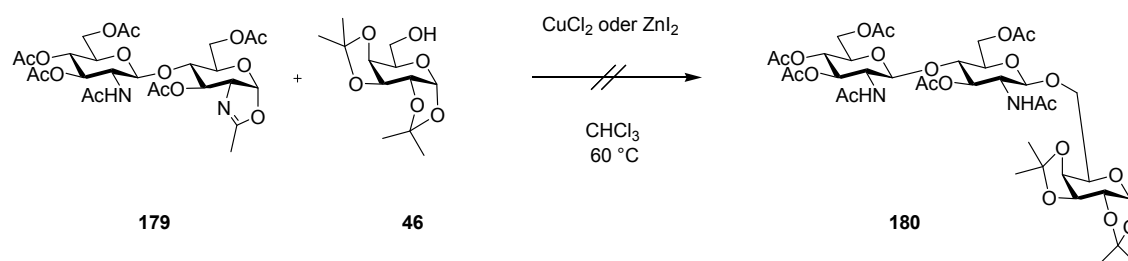


Abb. 3.70: Untersuchte Reaktion des Chitobioseoxazolins **179** mit der Diacetongalactose **46**.

3.2.3.3 Reaktionen mit dem Furanosyloxazolin 41

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben, konnte die Gruppe um David Bundle zeigen, dass Glycosylierungen mit dem vom GlcNAc abgeleiteten Furanosyloxazolin **41** möglich sind, im Vergleich zur Reaktion der Pyranoseform meist schneller ablaufen und wieder zur gewünschten Pyranoseform der Glycoside führen.^[93,94] Die für uns interessante Frage war nun, ob sich das Furanosyloxazolin **41** auch mit CuCl_2 aktivieren lässt und falls ja, ob die gebildeten Glycoside in der Pyranose- oder Furanoseform vorliegen.

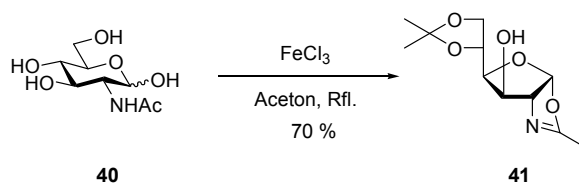


Abb. 3.71: Synthese des Furanosyloxazolins **41**.

Dazu wurde das Oxazolin **41** zunächst nach der Vorschrift von Bundle *et al.* in einer Ausbeute von 70 % hergestellt (Abb. 3.71).^[93] Dieses wurde in der darauffolgenden Reaktion mit Cyclohexanol **164** umgesetzt. Man erhielt das Glycosid **181b** nach einer Reaktionsdauer von 3 h in einer Ausbeute von 78 % (Abb. 3.72). Nach Analyse durch NMR-Spektroskopie konnte bestätigt werden, dass es sich dabei um die Pyranoseform **181b** handelt. Die Unterscheidung gelingt am einfachsten über die Kopplungskonstanten am anomeren Zentrum ($J(1-2)_{\text{pyr}} = 8.5 \text{ Hz}$ vs. $J(1-2)_{\text{fur}} = 1.1 \text{ Hz}$). In geringem Maße konnte das Furanoseglycosid **181a** als Nebenprodukt identifiziert werden.

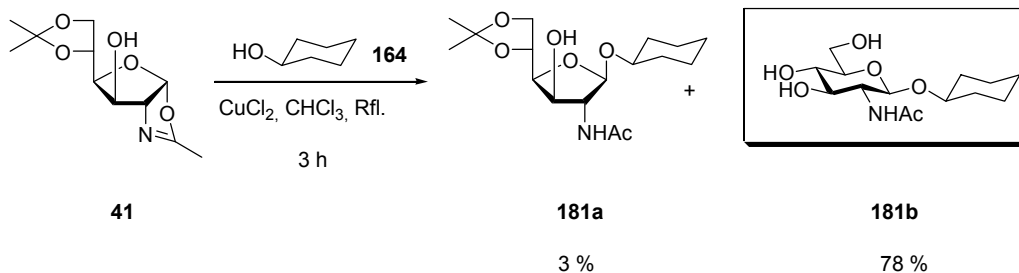


Abb. 3.72: Reaktion des Oxazolins **41** mit Cyclohexanol **164** unter Aktivierung mit CuCl_2 .

Das Oxazolin **41** kann also ebenfalls in der kupferkatalysierten Glycosylierung eingesetzt werden und lieferte sogar eine geringfügig höhere Ausbeute als bei der ursprünglichen Aktivierung mit CSA in Bundles Arbeitsgruppe, die mit 73 % gelang.

3.3 Strukturelle Untersuchungen von Zuckeroxazolinen und deren Metallkomplexen

3.3.1 Massenspektrometrie

Mittels sogenannter sanfter massenspektrometrischer Methoden (ESI-MS oder MALDI-MS) können metallorganische Komplexe identifiziert und charakterisiert werden. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, auch den Komplex als Ganzes zu ionisieren und zu detektieren. Daher könnten MALDI-MS und ESI-MS auch geeignet sein, Aufschluss über die Zusammensetzung eines potentiellen Kupfer-Zuckeroxazolin-Komplexes des Oxazolins **4** zu geben.

MALDI-MS-Spektren des Oxazolins **4** wurden mit DHB, CHCA oder trans-2-[3-(4-tert.-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malononitril (**182**) als Matrix aufgenommen. Die Verbindung **182** wurde bereits erfolgreich bei der Charakterisierung metallorganischer Komplexe und Cluster eingesetzt (Abb. 3.73).^[223] Der intensivste erhaltene Peak bei allen drei Matrizes lag bei $m/z = 440.4$. Der $M+H^+$ -Peak des Zuckerliganden **4** ($m/z = 330.1$) konnte nur viel schwächer detektiert werden.

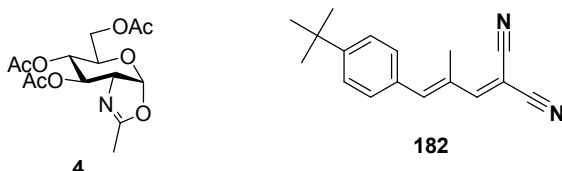


Abb. 3.73: Struktur des Zuckeroxazolins **4** und der als MALDI-Matrix verwendeten Verbindung trans-2-[3-(4-tert.-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malononitril (**182**).

Bei einem Komplex aus **4** und CuCl_2 würde man eine Masse von $m/z = 462$ erwarten, bei einem Dimer mit $\text{CuCl}_2(\mathbf{4})_2$ $m/z = 791$.

ESI-MS-Spektren wurden mit Proben einer Lösung des Zuckeroxazolins **4** mit 0.5 eq CuCl_2 in MeCN gemessen. Dabei konnten die folgenden Massen detektiert werden:

Pos. Mode: 330.3 $[\text{Oxazolin}+H]^+$, 352.3 $[\text{Oxazolin}+Na]^+$, 368.3 $[\text{Oxazolin}+K]^+$

Mit den verwendeten Parametern konnte sowohl mit MALDI-MS als auch mit ESI-MS nur der Zuckerligand **4**, aber nicht der Komplex als Ganzes detektiert werden.

3.3.2 IR-Spektroskopie

Zunächst wurde eine Lösung des Zuckeroxazolins **4** in DCM mit einer Konzentration von 10 mg/mL hergestellt. Ein Teil dieser Lösung wurde mit CuCl_2 versetzt und gerührt. Die festen Bestandteile wurden von der tiefgrünen Lösung abfiltriert. Von beiden Lösungen wurde ein IR-Spektrum im Bereich von 4000 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} aufgenommen. Dabei konnten die folgenden Banden zugeordnet werden:

Tabelle 3.6: Ausgewählte detektierte IR-Banden des isolierten Oxazolins **4** und im Komplex mit CuCl_2 .

Zuckeroxazolin	Komplex mit CuCl_2	Zuordnung
1745 cm^{-1}	1746 cm^{-1}	C=O-Streckschwingung
1673 cm^{-1}	1652 cm^{-1}	C=N-Streckschwingung
1369 cm^{-1}	1372 cm^{-1}	C-O-Streckschwingung Ester
1231 cm^{-1}	1230 cm^{-1}	C-O-Streckschwingung Acetylgruppen
1039 cm^{-1}	1041 cm^{-1}	C-O-Streckschwingung Ester

Beim Vergleich der Wellenzahlen der C=N-Streckschwingungen (Tabelle 3.6) fällt auf, dass diese beim Komplex bei niedrigeren Wellenzahlen auftritt. Die Energieniveaus der anderen Streckschwingungen unterscheiden sich beim Vergleich zwischen dem Komplex und dem isolierten Liganden hingegen kaum. Das legt die Vermutung nahe, dass die Komplexbildung, wie bereits früher angenommen, über den Oxazolinstickstoff und nicht über Carbonylsauerstoffe erfolgt. Durch die Komplexbildung wird die Elektronendichte am Stickstoff erniedrigt. Dies schwächt auch die C=N-Doppelbindung, wodurch die Schwingung einen niedrigeren Energiezustand und somit auch eine niedrigere Wellenzahl besitzt.

3.3.3 EPR-Spektroskopie

Electron Paramagnetic Resonance (EPR)-Spektroskopie (im deutschen Sprachraum auch als Elektronenspinresonanz oder ESR bezeichnet) kann für die Strukturbestimmung von Systemen mit ungepaarten Elektronen verwendet werden. Das ungepaarte Elektron ist für die Detektion notwendig, da dadurch ein permanentes magnetisches Moment im Molekül vorhanden ist, welches spektroskopische Übergänge induzieren kann. Mit Hilfe von EPR können verschiedenste Fragestellungen beantwortet werden. Die Anwendung der Methode reicht dabei von der Untersuchung lichtinduzierter Ein-Elektronenübergänge, über Triplettzustände, organische Radikale bis hin zu paramagnetischen Übergangsmetall-Komplexen, welche als Katalysatoren in vielen Bereichen der Chemie eingesetzt werden.

Durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes B_0 werden die energetisch entarteten Spinzustände des ungepaarten Elektrons aufgespalten. Diese Aufspaltung, die durch den Elektronenspin hervorgerufen wird, nennt man Zeemanwechselwirkung / Zeemaneffekt. Das Elektron kann parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet sein ($m_s = \pm 1/2$), wobei eine parallele Ausrichtung energetisch bevorzugt wird. Die Menge der absorbierten Energie kann mit dem Planck'schen Gesetz beschrieben werden. Die Energieniveaus werden gemäß Gleichung (1) aufgespalten,

$$h\nu = \Delta E = g\mu_B B_0 \quad (1)$$

Der Energieunterschied wird also durch das äußere Magnetfeld B_0 und den sogenannten g-Faktor bestimmt, während das Bohrsche Magneton μ_B , welches den Betrag des magnetischen Moments des Elektrons darstellt, eine physikalische Konstante ist. Der g-Faktor ist eine wichtige spektroskopische Größe, welche Informationen über die Eigenschaften des Spinsystems enthält. Der Wert des g-Faktors eines freien Elektrons beträgt 2.0023 und hat für organische Radikale meist eine Größenordnung von 2. Die üblicherweise verwendeten Frequenzen der im EPR-Experiment verwendeten Strahlung liegen im Gigahertzbereich. In dieser Arbeit wurde ausschließlich innerhalb des sogenannten X-Bands (≈ 9.5 GHz) gearbeitet. Durch die das Elektron umgebenden Atomkerne, welche einen Kernspin besitzen ($m_I \neq 0$), wird das lokale Magnetfeld am Ort des Elektrons verändert und die energetische Aufspaltung der Energieniveaus wird dadurch beeinflusst (Abb. 3.74). Dieses

Phänomen manifestiert sich in experimentellen Spektren als sogenannte Hyperfeinaufspaltung (HF).

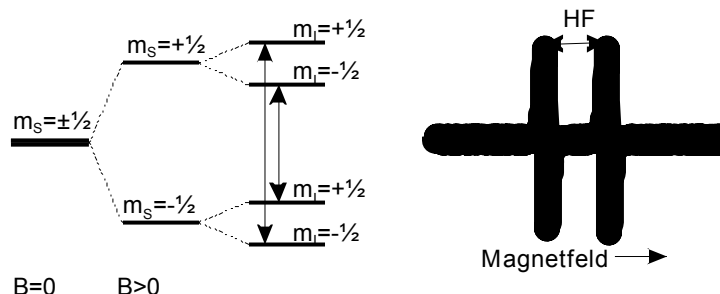


Abb. 3.74: Aufspaltung der Energiezustände des Elektronenspins durch ein angelegtes Magnetfeld und die umgebenden Atomkerne führen zur Hyperfeinaufspaltung (HF). Rechts dargestellt die Nahaufnahme eines durch die HF aufgespaltenen Signals eines idealisierten Spektrums.

Die spektroskopischen Auswahlregeln erlauben nur Übergänge, bei denen sich der Elektronenspin um den Wert 1 ändert ($\Delta m_s = \pm 1$) und die Kernspinquantenzahl dabei konstant bleibt ($\Delta m_l = 0$). Der Hamilton-Operator für diesen Übergang setzt sich somit wie in Gleichung (2) gezeigt aus der Elektronen-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{EZ}), der Kern-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{NZ}), der Hyperfeinwechselwirkung (\hat{H}_{HF}) sowie der Quadrupolarwechselwirkung (\hat{H}_Q) zusammen.

$$\hat{H} = \hat{H}_{EZ} + \hat{H}_{NZ} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_Q \quad (2)$$

Für die Untersuchung von EPR-aktiven Verbindungen lassen sich je nach Fragestellung *continuous wave* (cw) und gepulste EPR-Methoden anwenden. Im cw-EPR wird die Mikrowellenfrequenz konstant gehalten und das äußere Magnetfeld wird variiert. Ein typisches cw-EPR-Spektrum wird als erste Ableitung des Absorptionsspektrums dargestellt. Dies wird durch eine zusätzliche Magnetfeldmodulation erreicht, die zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit führt. Mit Hilfe von cw-EPR können vor allem starke Wechselwirkungen zwischen dem ungepaarten Elektron und der Umgebung detektiert werden. Sind die Wechselwirkungen nicht stark genug, so kann beispielsweise die HF-Kopplung nicht mehr aufgelöst werden, was zu einer ungewollten Linienverbreiterung führt. Um Informationen über diese schwachen Wechselwirkungen zu erhalten, ist es notwendig, Puls-EPR-Methoden anzuwenden.

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen von Elektronen mit den umgebenden Kernen unterscheidet man zwischen zwei prinzipiellen Methoden. Mit der „Electron Spin Echo Envelope Modulation“ (ESEEM) Spektroskopie kann ausgenutzt werden,

dass Übergänge, bei denen sich sowohl die Elektronenspinquantenzahl, als auch die Kernspinquantenzahl ändern, nicht streng verboten sind (und deshalb als teilweise erlaubt bezeichnet werden). Dies eröffnet die Möglichkeit durch gezieltes Pulsen auf Elektronenspinübergänge Einfluss auf die umgebenden Kerne zu nehmen. Weiterhin kann man Pulssequenzen anwenden, welche zusätzlich zu den Elektronenspinübergängen (≈ 10 GHz) auch Kernspinübergänge mit Hilfe von Pulsen im MHz-Frequenzbereich anregen. In diesem Fall spricht man von „Electron Nuclear DOuble Resonance“ (ENDOR) Spektroskopie. Welche der beide Methoden, ESEEM oder ENDOR, aussagekräftigere Ergebnisse liefern kann, hängt stark von den Eigenschaften des zu untersuchenden Systems ab.

Da Cu^{2+} paramagnetische Eigenschaften besitzt, ist es nicht möglich, Cu^{2+} -Komplexe mit Hilfe von NMR-Spektroskopie zu untersuchen. In solchen Fällen kann EPR eine sehr hilfreiche Methode zur Aufklärung derartiger Komplexstrukturen sein.

3.3.3.1 Probenpräparation

Es wurden Lösungen verschiedener Konzentration (20 μM , 100 μM , 1 mM, 10 mM) des Zuckeroxazolins **4** einmal in trockenem CHCl_3 und einmal in trockenem MeCN hergestellt. Dazu wurde jeweils 1 eq CuCl_2 gegeben. Die Messungen erfolgten in der AG Jeschke an der ETH Zürich. Als Referenzlösungen wurden sowohl Lösungen nur mit dem Zuckerligand ohne Kupfersalz, als auch Lösungen nur mit CuCl_2 ohne Ligand verwendet. Nach Optimierung der Messparameter konnte ein geeignetes Spektrum mit den Proben in MeCN (10 mM) erhalten werden. Dieses wurde allerdings bei RT gemessen und die Signale sind noch zu stark verbreitert, um genaue g-Werte und Hyperfeinkopplungen zu bestimmen. Zur Ermittlung der Komplexgeometrie musste ein Tieftemperaturspektrum aufgenommen werden. Dazu kann allerdings kein reines MeCN benutzt werden, da dieses beim Abkühlen keinen sogenannten Glaszustand, welcher für die EPR-Spektren nötig ist, annimmt. Eine mögliche Alternative ist ein Gemisch aus Toluol und MeCN im Verhältnis 1:1.

In einer Testreaktion (Abb. 3.75) wurde ein Toluol / DCM – Gemisch verwendet, welches bei der Präparation von CuCl_2 -Oxazolin-Proben für EPR-Experiment ebenfalls verwendet werden kann.

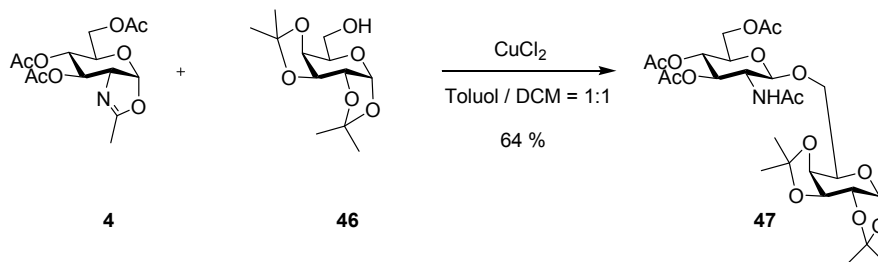


Abb. 3.75: Glycosylierung de Oxazolins **4** in einem Toluol/DCM - Gemisch.

Die Reaktion funktioniert auch mit Toluol/DCM als Lösungsmittel. Es kann daher vermutet werden, dass sich in diesem Gemisch der gleiche Zuckeroxazolin-Kupferkomplex ausbildet, der sich auch in anderen Lösungsmitteln wie z.B. in Chloroform beobachten lässt. Dies bedeutet auch, dass Daten, die von EPR-Messungen in Toluol/DCM = 1:1 gewonnen werden, für die Interpretation des Ablaufs der Reaktion bzw. der Natur des bei der Reaktion beteiligten Komplexes herangezogen werden können.

Zur weiteren Probenpräparation wurden somit 4 mM Lösungen des Oxazolins **4** und dem 2-Methyl-2-oxazolin (**183**) (für Vergleichsmessungen) in einer Mischung aus trockenem Toluol und Dichlormethan (1:1) unter Stickstoffstrom hergestellt (Abb. 3.77). Die entsprechende Menge an wasserfreiem Kupfer(II)chlorid wurde anschließend direkt zugegeben und man ließ die Mischung 1 h unter Schutzgas rühren. 100 μl dieser Lösung wurden danach in ein EPR-Messröhrchen überführt und sofort mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und so bis zur Messung aufbewahrt, um die Diffusion von Wasser in der Probenlösung zu vermeiden.

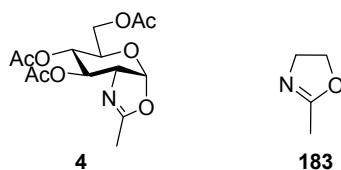


Abb. 3.76: Die zwei Oxazolinliganden **4** und **183**, die bei EPR-Messungen ihrer Kupfer(II)komplexe verwendet wurden.

3.3.3.2 Messungen und Interpretation der Daten

DFT-Berechnungen und Simulation von HYSCORE-Intensitäten

Die spektroskopischen Daten und Parameter verschiedener Kupferkomplextypen mit 2-Methyl-2-oxazolin (**183**) und dem Zuckeroxazolin **4** als Liganden wurden in zwei Schritten nach der DFT-Theorie mit Hilfe des Programms ORCA berechnet.^[224] Zunächst wurde eine Geometrieoptimierung durchgeführt. (calculation level – Medium Opt; method – unrestricted Kohn-Sham; functional – BP86; basis set – SV(d)/TZV(P)). Im darauffolgenden zweiten Schritt wurden der Hyperfein- und der elektrische Quadrupoltensor berechnet. (method – unrestricted Kohn-Sham; functional – PBE0; basis set – DZP). Um den Einfluss des verwendeten Funktionals zu untersuchen, wurden die EPR-Berechnungen mit dem Funktional B3LYP anstatt PBE0 wiederholt. Die dabei erhaltenen Hyperfeinparameter waren im B3LYP – Fall immer etwas größer, aber es wurden in keinem Fall qualitative Unterschiede bei den Werten erhalten. Die so berechneten spektralen Parameter wurden im weiteren Verlauf mit den Signallagen der experimentell erhaltenen EPR/ENDOR-Spektren verglichen, um die Signale zuordnen zu können.

CW-EPR

Die X-Band cw-EPR-Spektren der Kupferkomplexe können Abb. 3.77 entnommen werden. Die Spektren zeigen typische Aufspaltungsmuster für quadratisch-planare Kupferkomplexe mit einer großen Hyperfeinkopplung zum Kupferkernspin, der parallel zum äußeren angelegten Magnetfeld orientiert ist, und einer sehr schwachen Wechselwirkung zum Kupferkernspin, welche senkrecht zum Magnetfeld steht. In paralleler Orientierung eines solchen Komplexes (Tiefteildes Spektrums) sieht man aufgrund der Wechselwirkung mit dem Kupferkernspin ein Quartett. Dabei ist sowohl für ^{63}Cu als auch für ^{65}Cu $I=3/2$. Die Hyperfeinkopplungskonstanten der zwei Isotopen unterscheiden sich geringfügig voneinander, aber der Unterschied kann aufgrund der Linienbreite der aufgenommenen Spektren nicht erkannt werden.

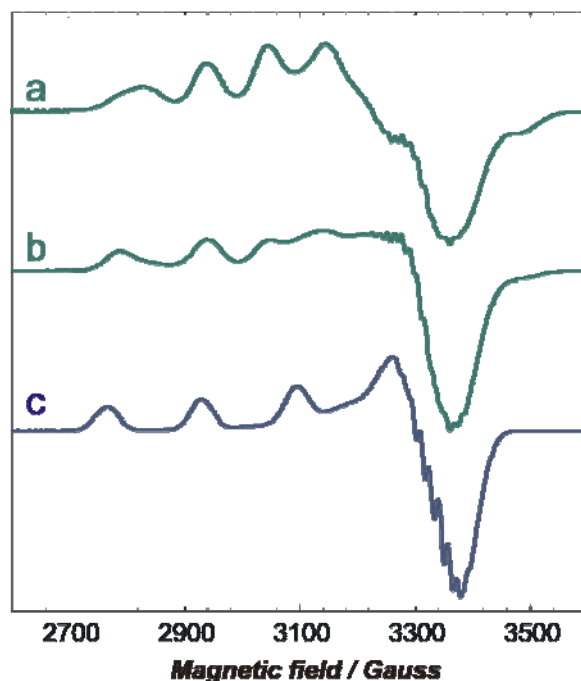


Abb. 3.77: cw-EPR-Spektren der Cu(II)-Komplexe. a) mit 2-Methyl-2-Oxazolin (**183**) als Ligand kurz nach Beginn der Komplexbildung b) mit 2-Methyl-2-Oxazolin (**183**) als Ligand nach Einstellung eines Komplex-gleichgewichts nach 70 min c) mit Zuckeroxazolin **4** als Ligand.

Beim 2-Methyl-2-oxazolin (**183**) kann direkt nach der Zugabe des Kupfersalzes eine Veränderung des EPR-Spektrums beobachtet werden, welche auf die Bildung verschiedener Kupferkomplexe hindeutet. Nach etwa 60-70 min hat sich ein stabiles Gleichgewicht gebildet. Das zugehörige Spektrum (Abb. 3.77 b)) deutet auf die Anwesenheit von zumindest 2 unterschiedlichen Kupferkomplexen mit verschiedenen $A_{||}$ -Werten (der parallelen Komponente des Hyperfeintensors des Kupferkerns) hin.

Bei der Zugabe von CuCl_2 zum Zuckeroxazolin **4** wurde zunächst keine Veränderung in der Form des EPR-Spektrums festgestellt. Die Signalintensität nahm zunächst zu und erreichte sein Maximum etwa 50-60 min nach Zugabe des Kupferchlorids, je nachdem wie viele Äquivalente zugegeben wurden. Ein typisches Spektrum hierfür ist in Abb. 3.77 c) gezeigt. Das experimentell erhaltene Spektrum kann nach Vergleich mit Computersimulationen als ein einzelner Kupferkomplex mit $g = [2.246; 2.033; 2.060]$ und der Kupfer-Hyperfeintensorkomponente $A(\text{Cu}) = [520; 0; 0]$ MHz interpretiert werden (Abb. 3.78).

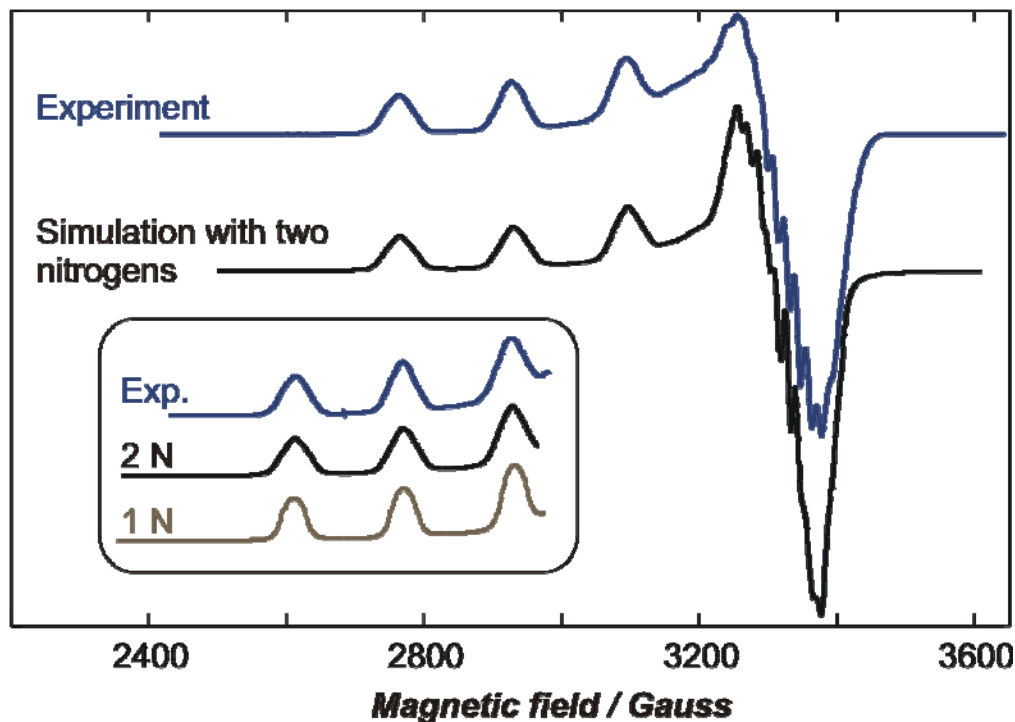


Abb. 3.78: Simulation des cw EPR-Spektrums des Kupfer-Zuckeroxazolin-Komplexes. In der Simulation wurden zwei äquivalente Stickstoffe mit der Hyperfeinkopplung [36 40 40] MHz verwendet. Wie im Kasten links unten zu sehen ist, muss bei der Simulation mehr als ein Stickstoffatom berücksichtigt werden, um die Kurvenform der experimentellen Daten nachbilden zu können.

In der senkrechten Orientierung des Komplexes (Hochfeldteil des Spektrums) kann bei beiden Komplexen eine weitere Kopplung entdeckt werden. Da sie durch ein gepulstes ENDOR – Spektrum nachgewiesen werden konnte, ist diese Kopplung als beinahe isotrop anzusehen, d.h. sie muss auch in der parallelen Orientierung des Komplexes präsent sein. Im Bereich der Spektren, die zur parallelen Orientierung gehören, kann sie durch die Linienbreite nicht mehr aufgelöst werden, aber sie beeinflusst die Form der Linien des Tieffeld-Quartetts. (Die vierte Linie des Quartetts kann nicht deutlich gesehen werden, da sie mit dem senkrechten Teil des Spektrums überlappt.)

Geht man davon aus, dass die Aufspaltung durch Wechselwirkung der ungepaarten Elektronen mit dem Kernspin der Stickstoffe im Oxazolinring verursacht wird, kann man dadurch Informationen über die mögliche Anzahl der Stickstoffliganden im Komplex gewinnen. Das häufigste Stickstoffisotop ^{14}N hat einen Kernspin $I = 1$ und die Wechselwirkung eines einzelnen Kerns dieses Typs führt zu einer Aufspaltung jeder Spektrallinie in drei Linien gleicher Intensität und dem gleichen Abstand zueinander. Wird die Kopplung nicht aufgelöst, dann kann man dies dennoch als Abflachung der Signalspitzen gesehen werden (vgl. Kasten in Abb. 3.78, unterste Kurve). Zwei oder

mehr gekoppelte Stickstoffkerne führen zu einer eher dreieckigen Linienform (vgl. Kasten in Abb. 3.78, mittlere Kurve), was viel besser zu dem Aussehen des experimentell erhaltenen Spektrums passt. Da der sterische Anspruch bei diesen Komplexen in Anwesenheit von mehr als zwei Oxazolinliganden sehr groß und energetisch äußerst ungünstig ist (siehe auch DFT-Berechnungen weiter unten), kann als Hypothese ein Komplex mit einem Kupferkern und 2 Zuckeroxazolinliganden angenommen werden.

Die Bildung eines solchen Komplexes wird außerdem auch durch Titrationsexperimente gestützt. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an Zuckeroxazolin zu einer konstant gehaltenen Menge an Kupferchlorid gegeben. Die Endkonzentration an Kupferchlorid war dabei immer 2 mM. In reinen Toluol/Dichlormethan – Mischungen ohne Oxazolin war Kupferchlorid nicht löslich. Bei einem Oxazolin / Cu-Verhältnis unter 2:1 konnte ein Niederschlag beobachtet werden. Waren mehr als zwei Zuckeroxazolinmoleküle pro Kupfer in der Lösung, konnte kein Niederschlag beobachtet werden und die Lösung färbte sich tiefblau. In Abb. 3.79 sieht man wie das EPR-Signal immer stärker wird, bis ein [Zuckeroxazolin]/[Cu]-Verhältnis von 2-3 erreicht wird und bei höheren Oxazolinkonzentrationen beinahe unverändert bleibt.

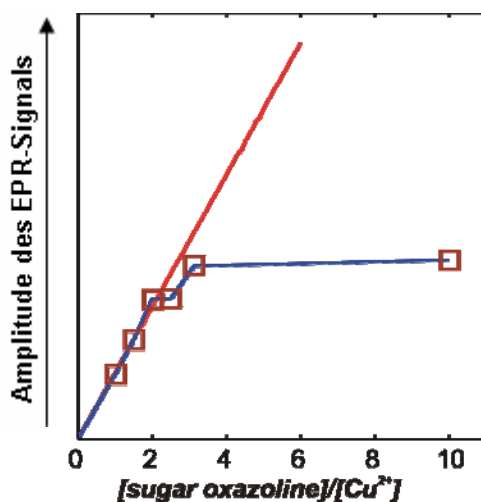


Abb. 3.79: Titrationsexperiment: Die Amplitude des EPR-Signals des Cu(II)-Zuckeroxazolin-Komplexes in Abhängigkeit des Verhältnisses der Konzentration an Zuckeroxazolin **4** und Kupferionen.

Pulse ENDOR

ENDOR-Spektroskopie ist eine weitere hilfreiche Methode, um die Kupfer-Ligand-Wechselwirkungen in diesem System zu untersuchen. Dabei ist das sogenannte Mims-ENDOR-Experiment empfindlicher gegenüber Kernen mit schwachen Hyperfeinkopp-

lungen, während Davies ENDOR für die Detektion von stark gekoppelten Kernen geeignet ist.

Das EPR-Spektrum eines Kupferkomplexes hat eine spektrale Breite von ungefähr 1000 Gauss. Dadurch ist es möglich, dass mit Mikrowellenpulsen nur bestimmte Bereiche angeregt werden, die für bestimmte Orientierungen charakteristisch sind. Die Selektivität kann nicht perfekt erreicht werden, insbesondere im mittleren Bereich, wo die Feldposition verschiedene Orientierungen des Komplexes entspricht. Nur die niedrigsten und höchsten Feldpositionen entsprechen einer eindeutigen und ausschließlichen Orientierung des Kupferkomplexes.

In Abb. 3.80 sind die Davies-ENDOR-Spektren der Cu-Oxazolin-Komplexe dargestellt. Um die Protonensignale zu unterdrücken, wurde eine Pulslänge von 12 ns und 24 ns gewählt.

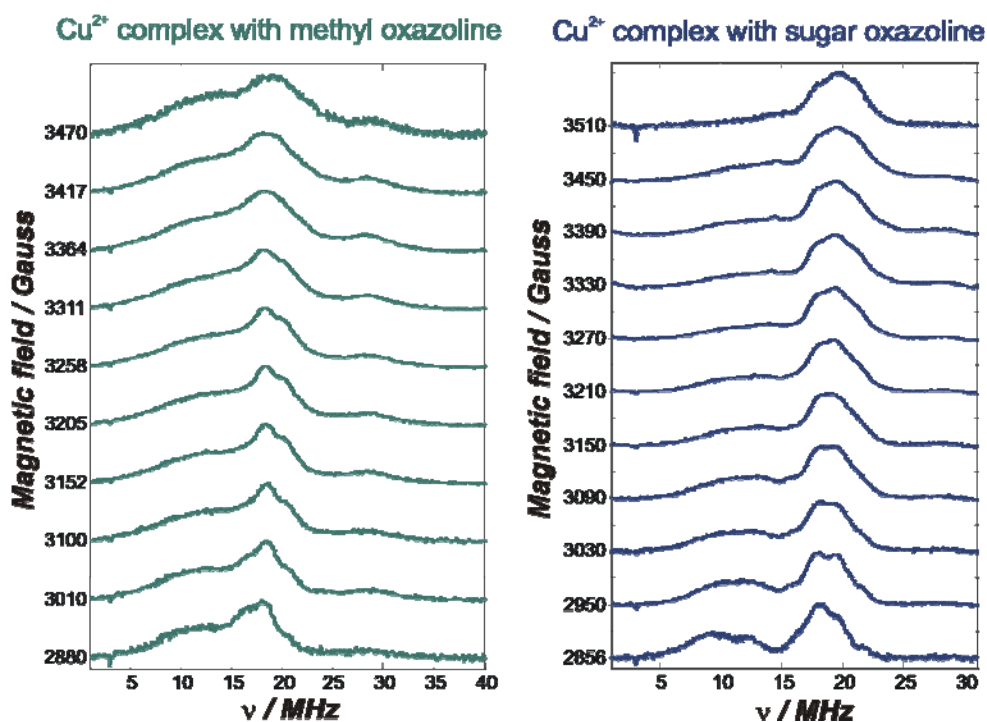


Abb. 3.80: ENDOR-Spektren der Kupferkomplexe mit den Liganden **183** (links) und **4** (rechts)

Beide Komplexe zeigen vergleichbare Davies-ENDOR-Spektren. Bei beiden sieht man zwei breite Hauptbanden. Die intensivste Bande befindet sich bei etwa 17-18 MHz in der parallelen Orientierung (Tiefeldbereich) und bei etwa 18-20 MHz in der senkrecht stehenden Orientierung (Hochfeldbereich). Die zweite Bande ist sogar etwas breiter und zeigt je nach Ligand ein unterschiedliches Verhalten. Im Falle von 2-Methyl-2-oxa-

zolin (**183**) zeigt die Bande fast keine Veränderung der Orientierung des Komplexes in Abhängigkeit vom angelegten äußeren magnetischen Feld. Diese Bande beginnt ungefähr bei 5 MHz und überlappt mit der ersten Bande, so dass ihre exakte Lage und Breite nicht bestimmt werden kann. Im Falle des Zuckeroxazolinliganden **4** beginnt die zweite Bande auch um 5 MHz. Für die parallele Orientierung ist die Bande etwas schmaler und besitzt ein eindeutiges Maximum im Bereich zwischen 8 und 13 MHz. In der senkrechten Orientierung des Komplexes ist die Bande weniger intensiv, hat kein eindeutiges Maximum und sieht aus wie ein Ausläufer der ersten Bande.

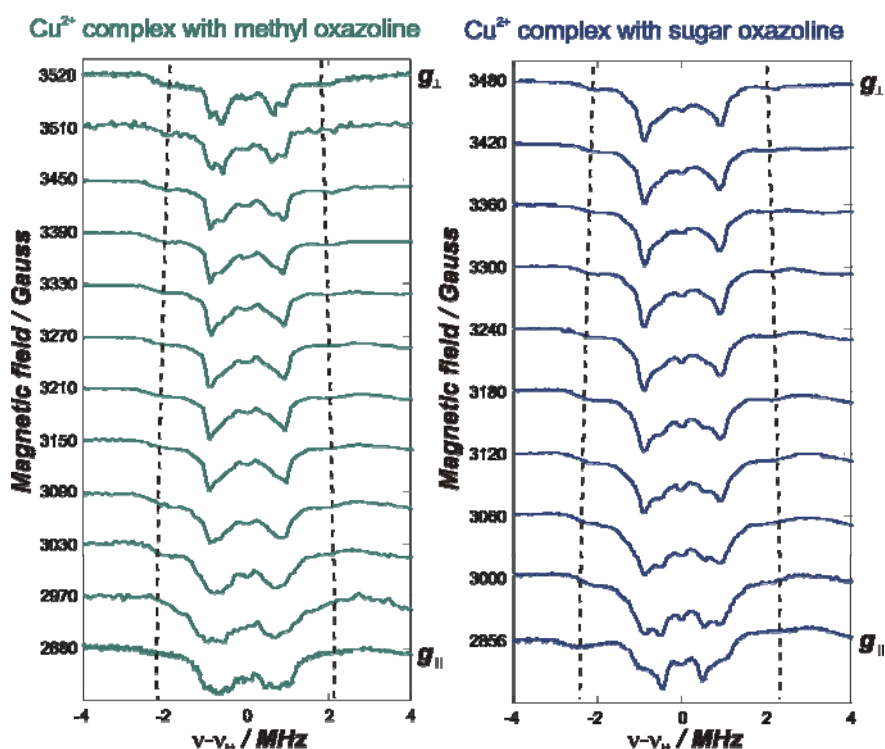


Abb. 3.81: Mims-ENDOR-Spektren der Komplexe mit 2-Methyl-2-oxazolin (**183**) (links) und dem Zuckeroxazolin **4** (rechts) als Liganden.

Mims-ENDOR-Spektren wurden ebenso aufgenommen (Abb. 3.81), um die Hyperfeinkopplungen der Protonen zu untersuchen. Dabei wurde eine Pulsdauer von 96 ns benutzt. Das Spektrum zeigt eine Vielzahl an überlappenden Signalen aufgrund der großen Anzahl an Protonen im System und konnte daher nur durch Vergleich mit Simulationen analysiert werden. Solche Simulationen sind durch viele freie wählbare Parameter nicht sonderlich verlässlich. Dennoch können aus dem Spektrum weitere Informationen gewonnen werden. Die stärkste Hyperfeinkopplung kann aus ENDOR-Spektren für jede Feldposition direkt ausgelesen werden. Die Protonen, die am

stärksten gekoppelt sind, sind vermutlich eines der drei Protonen der Methylgruppe am Oxazolinring oder die Protonen, die im Oxazolinring nah am Stickstoff liegen. Von der Winkelabhängigkeit dipolarer Wechselwirkungen (in diesem Fall zwischen dem magnetischen Moment des ungepaarten Elektrons und magnetischen Moment der Wasserstoffkerne) ist bekannt, dass man die stärkste Kopplung beobachten sollte, wenn das Dipol-Dipol-Paar entlang der Richtung des externen magnetischen Felds ausgerichtet ist. Die erhaltenen Ergebnisse reichen aus, um sagen zu können, dass die Methylgruppen der Oxazoline sich bei den analysierten Komplexen nahe bei der Parallelachse der Kupferkomplexe befinden. Anders gesagt bedeutet dies, dass die Oxazolinringe aus der senkrechten Ebene der Komplexe herausgedreht sind. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Strukturen, die bei DFT-Strukturoptimierungsberechnungen erhalten wurden.

DFT-Berechnungen und Vergleich mit experimentellen Daten

Für beide Komplexe wurden Geometrieoptimierungen mit zwei Liganden durchgeführt. In beiden Fällen wurden zwei Chloratome mit eingefügt. Die Gesamtladung wurde als 0 angenommen, was das Vorhandensein eines Cu^{2+} -Zentrums und zwei einfach negativ geladene Chloridliganden voraussetzt. Die Geometrien des 2-Methyl-2-oxazolins (**183**) und des Zuckeroxazolins **4** wurden zunächst für sich alleine optimiert, bevor sie in die Strukturen der jeweiligen Komplexe implementiert wurden.

Für die Kupferkomplexe mit 2-Methyl-2-oxazolin (**183**) wurden verschiedene Startgeometrien eingesetzt. In allen Fällen ging man dabei von einer quadratisch planaren Struktur mit Kupfer in der Mitte und jeweils zwei Stickstoffen und zwei Chloratomen in den vier Ecken aus. Die Chloratome können dabei entweder *cis* oder *trans* angeordnet sein, wobei die letztere Anordnung energetisch etwas günstiger sein sollte. Dies wird durch die Berechnungen ebenfalls bestätigt. Die Oxazolinringe können entweder in der Ebene des Quadrats liegen oder aus dieser herausgedreht sein. Zusätzlich können die Methylgruppen der Oxazoline im Vergleich zueinander parallel oder antiparallel angeordnet sein. Die verschiedenen erhaltenen optimierten Strukturen können Abb. 3.82 entnommen werden.

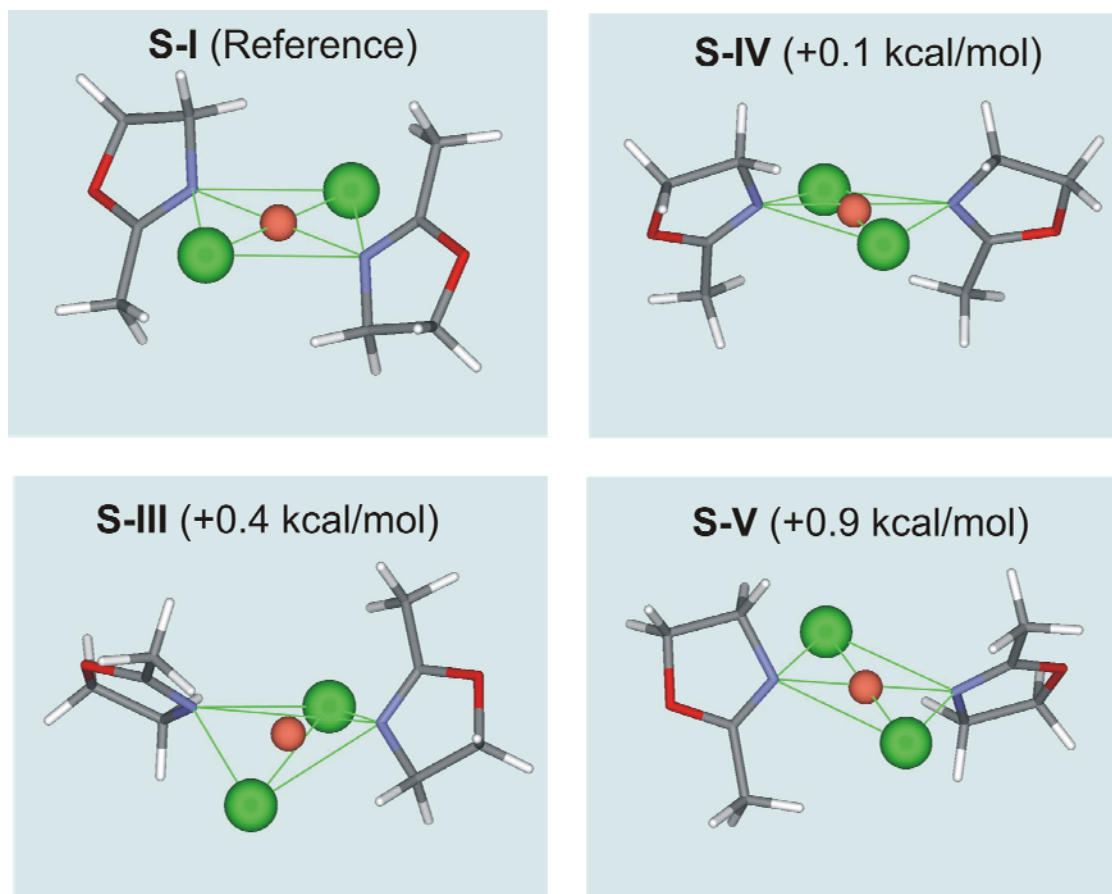


Abb. 3.82: Geometrieoptimierte Strukturen des Kupferoxazolinkomplexes mit zwei 2-Methyl-2-Oxazolinliganden nach DFT-Berechnungen.

Die niedrigsten Energiezustände wurden für Strukturen mit leicht „gestörter“ quadratisch planarer Geometrie erhalten. Bei allen erhaltenen Strukturen ist der Oxazolinring aus der CuCl_2N_2 Ebene herausgedreht. Die niedrigsten Energien wurden für Komplexe erhalten, bei denen die Oxazolinringe parallel zueinander angeordnet sind (S-I und S-IV in Abb. 3.82) Bei zwei weiteren erhaltenen Strukturen waren die Oxazolinringe nicht parallel zueinander angeordnet und die Energien etwas höher (S-III und S-V in Abb. 3.82).

Im Fall des Kupferkomplexes mit zwei Zuckeroxazolinliganden wurde die Startgeometrie zunächst so ausgewählt, dass sie eine ähnliche Anordnung wie S-I besitzt. Auf diese Weise wurde aber kein lokales Minimum für eine trans-Anordnung der Methylgruppen der Oxazoline gefunden. Die optimierte Struktur ist in Abb. 3.83 zu sehen.

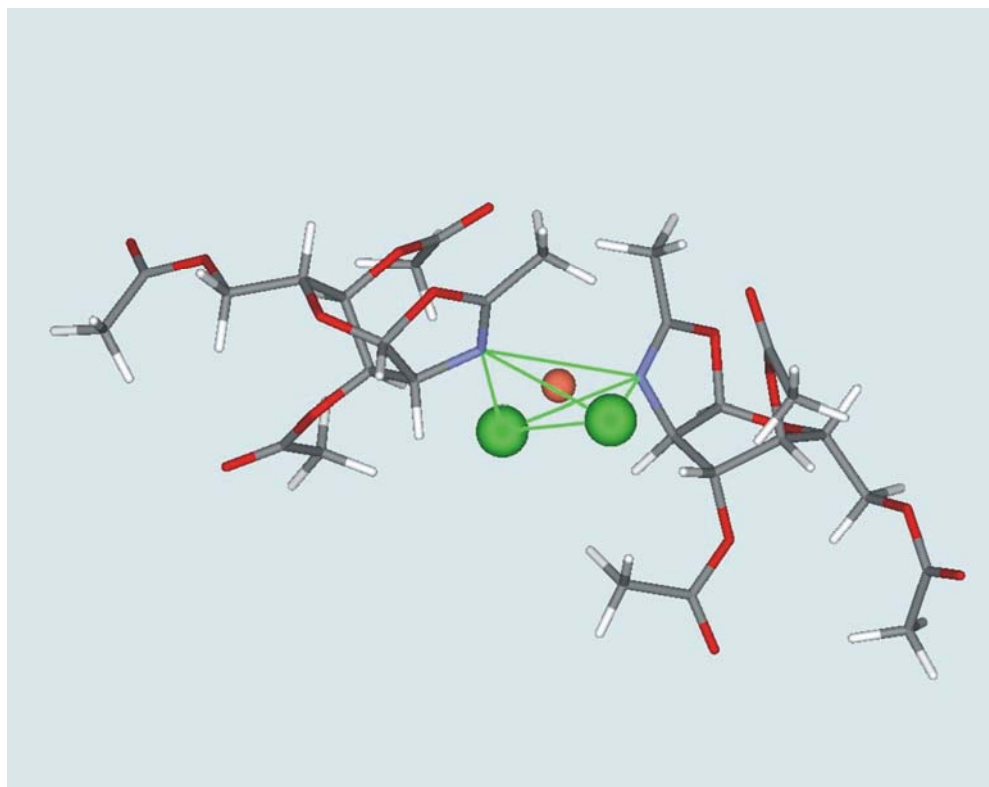


Abb. 3.83: Geometrieoptimierte Strukturen des Kupferoxazolincomplexes (Kupferatom orangefarben dargestellt) mit zwei Zuckeroxazolinliganden **4** und zwei Chlorliganden (grün dargestellt) nach DFT-Berechnungen.

Während der Geometrieoptimierung wurden die Oxazolinringe fast um 180° gegeneinander verdreht. Diese Geometrie gehört zu einem breiten und vielleicht dem einzigen Minimum der Energiehyperfläche der Verbindung. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung aus den EPR-Experimenten, dass sich unabhängig vom Mischungsverhältnis von Kupfer zu Ligand nur eine bestimmte Komplexform bildet.

Die Hyperfeinparameter der Wasserstoff-, Stickstoff- und Chlor-Kerne der optimierten Geometrien wurden ebenfalls berechnet. Ein Versuch die entsprechenden Parameter für den Kupferkern zu berechnen, wurde nicht durchgeführt, da bekannt ist, dass solche Berechnungen sehr aufwendig sind und oft unrealistische Ergebnisse liefern.^[225] Für die Liganden können DFT-Berechnungen auf dieser Grundlage Werte für die isotrope Hyperfeinkopplung liefern, die nur ca. 10-20 % abweichen. Der anisotrope Anteil des Ligand-Hyperfeintensors wird normalerweise mit einem Faktor von 2 überschätzt.^[225]

Tabelle 3.7: Hyperfein- und Quadrupolparameter der Stickstoffkerne (Ergebnisse nach DFT-Rechnung).

Structure		[A1; A2; A3] MHz	$[e^2qQ/4I(2I-1)]$ in MHz; η
S-I	N1	[44.7; 46.1; 54.2] PBE0	[0.50; 0.46] PBE0
		[46.4; 47.8; 56.4] B3LYP	[0.50; 0.51] B3LYP
	N2	[44.6; 46.0; 54.0] PBE0	[0.50; 0.47] PBE0
		[46.4; 47.8; 56.4] B3LYP	[0.50; 0.52] B3LYP
S-III	N1	[39.1; 40.3; 47.7] PBE0	[0.49; 0.47] PBE0
	N2	[38.8; 40.0; 47.4] PBE0	[0.49; 0.49] PBE0
S-IV	N1	[44.2; 45.6; 53.6] PBE0	[0.50; 0.44] PBE0
		[45.8; 47.2; 55.8] B3LYP	[0.507 0.50] B3LYP
	N2	[44.1; 45.4; 53.5] PBE0	[0.50; 0.44] PBE0
		[45.7; 47.0; 55.6] B3LYP	[0.51; 0.50] B3LYP
S-V	N1	[45.7; 47.2; 55.4] PBE0	[0.50; 0.43] PBE0
	N2	[44.6; 46.0; 54.0] PBE0	[0.50; 0.44] PBE0
S-GlcN	N1	[34.8; 35.8; 43.3] PBE0	[0.55; 0.21] PBE0
		[36.3; 37.3; 45.4] B3LYP	[0.56; 0.20] B3LYP
	N2	[30.4; 31.0; 38.1] PBE0	[0.57; 0.19] PBE0
		[31.6; 32.2; 39. 8] B3LYP	[0.57; 0.18] B3LYP

Die berechneten Hyperfein- und Quadrupolparameter der verschiedenen Kerne können Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8 entnommen werden. Die berechneten

Quadrupolparameter sind sowohl für die Stickstoffkerne als auch für die Chlorkerne nicht sonderlich groß; die Hyperfeinkopplung ist der dominierende Term.

Tabelle 3.8: Hyperfein- und Quadrupolparameter der Chlorkerne (Ergebnisse nach DFT-Rechnung).

Structure		[A1; A2; A3] MHz	$[e^2qQ/4I(2I-1)$ in MHz; $\eta]$
S-I	Cl1	[-9.0; -9.4; 64.5] PBE0	[-2.58; 0.25] PBE0
		[-12.1; -12.4; 69.0] B3LYP	[-2.69; 0.26] B3LYP
	Cl2	[-9.0; -9.3; 64.4] PBE0	[-2.58; 0.25] PBE0
		[-12.0; -12.3; 68.9] B3LYP	[-2.68; 0.26] B3LYP
S-IV	Cl1	[-10.1; -10.3; 63.2] PBE0	[-2.63; 0.14] PBE0
		[-13.2; -13.3; 67.6] B3LYP	[-2.74; 0.14] B3LYP
	Cl2	[-8.0; -8.4; 64.0] PBE0	[-2.53; 0.31] PBE0
		[-11.0; -11.4; 68.5] B3LYP	[-2.64; 0.32] B3LYP
S-GlcN	Cl1	[-7.8; -8.0; 50.4] PBE0	[-2.11; 0.32] PBE0
		[-10.9; -11.1; 55.2] B3LYP	[-2.20; 0.32] B3LYP
	Cl2	[-11.7; -11.8; 59.8] PBE0	[-2.54; 0.22] PBE0
		[-15.2; -15.4; 65.8] B3LYP	[-2.67; 0.22] B3LYP

Beim Stickstoffkern ist die berechnete Anisotropie des Hyperfeintensors in der Größenordnung von 10 MHz für alle Komplexe. Geht man nun davon aus, dass der Wert um den Faktor 2 zu groß ist, erhält man eine abgeschätzte Hyperfeinanisotropie von etwa 5 MHz. Da die beobachtete Signallage im ENDOR-Spektrum der Hälfte des Hyperfeinkopplungskonstante entsprechen (dies ist der Fall, wenn $A/2$ größer als die Larmorfrequenz des Stickstoffs ist) würde man erwarten, dass die beobachtete Anisotropie in der Größenordnung von 2-3 MHz liegt, was im Einklang mit dem Verhalten der Hauptbande in Davies-ENDOR-Spektrum ist. Die isotropen Werte der Hyperfeinkopplung sind ebenfalls in sehr guter Übereinstimmung mit der beobachteten Signallage im Davies-ENDOR-Spektrum. Für die Chlorkerne wurde eine Anisotropie

von ungefähr 70-80 MHz berechnet. Auch wenn man annimmt, dass dieser Wert viel zu hoch sein könnte, sollte das entsprechende ENDOR-Spektrum eindeutig anisotropisch sein. Das ist in Übereinstimmung mit dem Verhalten der niederfrequenten Bande im Davies-ENDOR-Spektrum. Unterschiedliche Orientierungen des äußeren Felds sind in der senkrechten Orientierung des Komplexes möglich. Falls nun der Cu-Cl-Vektor annähernd in der senkrechten Ebene liegt, dann bedeutet dies, dass der Wert der Hyperfeinkopplung je nach Feldrichtung zwischen seinem Maximum und Minimum liegt, was zu einer breiten Bande führt. In der parallelen Orientierung des Komplexes würde sich hingegen im ENDOR-Spektrum nur die kleinere Komponente des Hyperfeintensors manifestieren, da der Cu-Cl-Vektor senkrecht zum äußeren Magnetfeld stehen würde. Dies würde zu einer beträchtlich schmalen Bande führen. Genau das kann in den erhaltenen Spektren beobachtet werden. Im Fall der senkrechten Orientierung der Kupfer-Zuckerkomplex-Verbindung kann man lediglich eine kleine Schulter der zweiten Absorptionsbande erahnen, wohingegen im parallelen Fall diese Bande stärker betont ist, was auf eine gewisse Verschmälerung der Bande hindeutet.

Alle Beobachtungen bezüglich der Wechselwirkungen der stark gekoppelten Kerne zusammengenommen, können zu der Schlussfolgerung führen, dass eine direkte Komplexierung des Oxazolinring-Stickstoffs mit dem Kupfer vorliegt. Zudem gibt es starke experimentelle und theoretische Hinweise darauf, dass auch Chlorliganden im Komplex sind und ebenfalls direkt an das Kupfer koordiniert sind. Diese Überlegungen, welche auf den Ergebnissen der cw-EPR, Puls-ENDOR-Spektren und DFT-Rechnungen beruhen, führen uns zu der Annahme, dass es sich um einen leicht verdrehten annähernd quadratisch-planaren Komplex handelt, bei dem zwei Oxazolinring-Stickstoffe und zwei Chlorliganden an das Zentralmetall Cu koordiniert sind.

Eine weitere wichtige Frage ist die Orientierung der Oxazolinringe zur Komplexebene. Um diese Frage beantworten zu können, müssen die Daten der erhaltenen Protonenspektren im Mims-ENDOR-spektrum zusammen mit den entsprechenden DFT-Daten analysiert werden. Ein wichtiger Befund, der auch in dieser Analyse berücksichtigen werden konnte, ist die breite Orientierungsverteilung in der senkrechten Ebene und eine verhältnismäßig schmale Verteilung der Orientierungen, welche nah an der parallelen Orientierung des Komplexes liegen. Den DFT-Berechnungen zufolge gibt es zwei verschiedene Arten von Protonen, welche die stärkste Hyperfeinkopplung mit dem ungepaarten Elektron des Kupferions zeigen. Zum Einen sind das die Protonen der Oxazolinmethylgruppe und zum Anderen die Protonen des

Oxazolinrings, die in direkter Nachbarschaft zum Stickstoff liegen. Die berechnete Hyperfeinkopplung all dieser Protonen liegt bei etwa 4.5-5 MHz für den Dipol-Dipol-Vektor, der parallel zum äußeren Feld liegt. Da die Struktur des Zuckeroxazolins durch zwei kondensierte Ringe sehr starr ist, können die möglichen Orientierungen des Liganden simuliert werden, indem man das Zuckeroxazolin um die Cu-N-Komplexbindung rotieren lässt. Durch solch eine Analyse wird klar, dass nur die Protonen der Methylgruppe der parallelen Achse des Kupferkomplexes nahe kommen können. Andere Protonen wären immer näher an der dazu senkrechten Ebene. Im Protonen-ENDOR-Spektrum wird eine Zunahme der Aufspaltung beobachtet, wenn man von der senkrechten zur parallelen Orientierung geht. Es kann daher vermutet werden, dass die Methylgruppe des Oxazolins tatsächlich zur parallelen Orientierung hin gedreht ist.

3.4 Biologische Anwendungen

Das als Murein bezeichnete Peptidoglycan ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand. Es verleiht den Zellwänden ihre Stabilität, ohne dass die Bakterie an Flexibilität einbüßt. Die Prozesse, die beim Auf- und Abbau der bakteriellen Zellwand ablaufen, sowie die dabei beteiligten Enzyme und die Identifizierung der Metabolite sind Gegenstand aktueller molekularbiologischer Forschungsarbeiten (siehe Kapitel 1.4). Wenn Bakterien wachsen, dann muss auch die Mureinhülle vergrößert werden. Die Zellwand wird dabei schrittweise durch sehr spezifische Autolysine abgebaut, damit neue Mureinfragmente eingebaut werden können.^[226] In *E. coli* ist dieser als Zellwand-Turnover bezeichnete Prozess genau aufgeklärt worden. Als primäre Metaboliten entstehen zunächst GlcNAc-1,6-anhydro-MurNAc-Peptide, die im Zellinneren weiter zu GlcNAc (**40**), 1,6-anhydro-MurNAc und den Peptiden umgesetzt werden und dann als Bausteine für ein Zellwand-Recycling zur Verfügung stehen.^[227-229] Von besonderem Interesse sind dabei auch die Gene bzw. Gencluster, die für die Enzyme codieren. Die Arbeitsgruppe um PD Dr. C. Mayer an der Universität Konstanz (inzwischen Universität Tübingen) erforscht neben dem Recycling-Stoffwechsel des Mureins bei *E. coli* auch den bei *Bacillus subtilis*, einem Gram-positiven Bakterium, das oft als Modellorganismus verwendet wird. Sie konnten dabei den genauen Stoffwechselweg und den dazugehörigen Gencluster identifizieren. Dieser besteht aus sechs Genen, von denen drei Orthologe zu den Genen sind, die auch beim entsprechenden Metabolismus in *E. coli* gefunden wurden. Gene werden als ortholog bezeichnet, wenn diese von einem gemeinsamen Gen abstammen und die Proteine, für die sie codieren, in der jeweiligen Spezies eine ähnliche Funktion übernehmen. Es handelt sich dabei um MurQ^[230], MurR und MurP, die alle für Enzyme codieren, die am N-Acetylmuraminsäure (MurNAc)- Abbau beteiligt sind. Zwei weitere Gene des Clusters, BsNagZ und AmiE, sind für *B. subtilis* spezifisch und wurden eingehender erforscht. Es konnte in der Dissertation von S. Litzinger gezeigt werden, dass BsNagZ eine Zellwand-assoziierte *exo*- β -N-Acetylglucosaminidase codiert, die das endständige nicht-reduzierende N-Acetylglucosamin des Muropeptids spaltet. Sie konnten auch zeigen, dass AmiE für eine neue MurNAc-L-Alanin-Amidase codiert, die die Bindung zwischen MurNAc und L-Alanin bei MurNAc-Peptiden spaltet, nicht aber bei Muropeptiden, bei denen GlcNAc noch glycosidisch an MurNAc gebunden ist. Für seine Funktion benötigt AmiE also zunächst BsNagZ. Die beiden Enzyme setzen daraufhin gemeinsam MurNAc in einer sequentiellen Hydrolyse frei, welches dann als

Baustein für eine neue Zellwand im Sinne eines Recyclingprozesses wieder zur Verfügung steht.^[231]



Abb. 3.84: Vom GlcNAc abgeleitete Enzymsubstrate **184** und **185** zur Bestimmung der kinetischen Konstanten von N-Acetylglucosaminidasen.

Zur Untersuchung der isolierten Enzyme und Bestimmung ihrer kinetischen Konstanten (Michaelis-Menten-Kinetik) werden modifizierte Derivate der Enzymsubstrate benötigt (Abb. 3.84). Diese ermöglichen eine empfindlichere Detektion der Hydrolyse als lediglich chromogene Derivate wie z.B. das 2,4-Dinitrophenylglycosid **185**, die in photometrischen Assays zum Einsatz kommen. 4-Methylumbelliferylglycoside wie **184** werden häufig als geeignete Substrate zur Bestimmung der Aktivität von Glycosidhydrolasen in fluorometrischen Assays verwendet. Das 4-Methylumbelliferyl-glycosid **184** von GlcNAc ist kommerziell erhältlich. In den von der Arbeitsgruppe Mayer untersuchten Bakterienstämmen (*E. coli*, *B. subtilis*, *P. marina*) konnte ein unterschiedlich starker Acetylierungsgrad des Mureins beobachtet werden, d.h. das zu einem gewissen Prozentsatz Glucosamin statt GlcNAc eingebaut wird. Um die Frage klären zu können, ob die gleichen Enzyme, die für den Abbau von GlcNAc im Murein verantwortlich sind, auch für den entsprechenden Glucosamin-Abbau eingesetzt werden, wird ein β -4-Methylumbelliferyl-glycosid des Glucosamins benötigt. Wir entschieden uns als geeigneten Glycosyldonor zur Glycosylierung mit 4-Methylumbelliferon **165** für das Troc-geschützte Trichloracetimidat **190** (Abb. 3.85). Es wurde nach einer Methode von Castro-Palomino *et al.*^[50] in 4 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 63 % ausgehend von Glucosamin (**185**) synthetisiert. Zunächst wurde die Aminogruppe mit Hilfe des Chloroformiats TrocCl zur Verbindung **187** umgesetzt, welche direkt zu **188** peracetyliert werden konnte. Der vollständig geschützte Zucker **188** wurde mit Ethylendiamin, anstatt wie in der publizierten Methode mit Hydrazinacetat, anomer zu **189** entschützt, welcher schließlich mit Trichloracetonitril selektiv zum α -Anomer des Trichloracetimidats **190** reagierte.

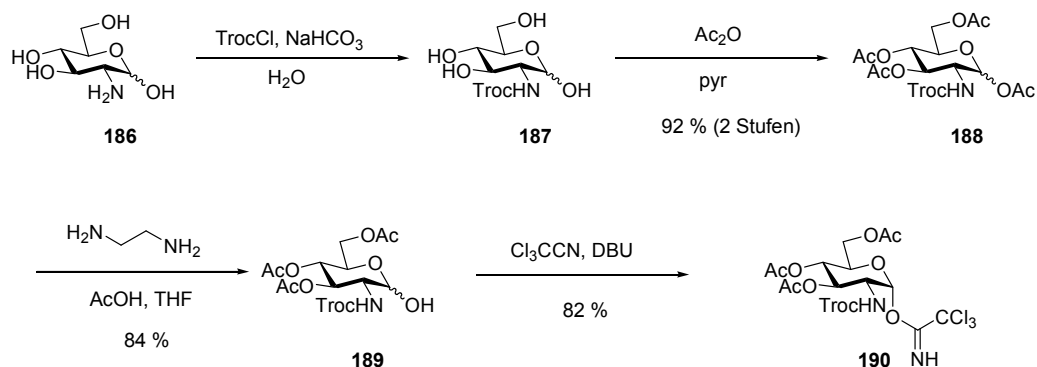


Abb. 3.85: Synthese des Glycosyldonors **190**.

Die selektive Glycosylierung mit 4-Methylumbelliferon **165** gelang unter S_N2 -Bedingungen in DCM in einer Ausbeute von 60 %. Die anschließenden Entschützungsstufen, zunächst eine β -Eliminierung unter Zn-Aktivierung zum freien Amin **192** und danach eine Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen, gelangen in einer Ausbeute von 85 % über 2 Stufen zum gewünschten Substrat **193**. Hervorzuheben ist, dass es im letzten Schritt nicht zu einer Acetylwanderung unter Ausbildung eines Amids kam.

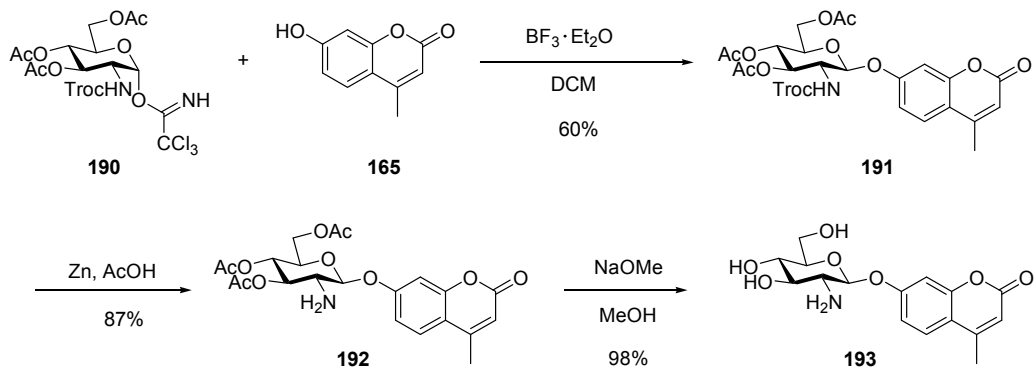


Abb. 3.86: Synthese des 4-Methylumbelliferylglucosids des Glucosamins **193** ausgehend vom Trichloracetimidatdonor **190**.

Vor der Anwendung in enzymatischen Assays von S. Litzinger in der Arbeitsgruppe Mayer wurde das Substrat mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (Abb. 3.87). Die Vorstufe **192** wurde 1980 bereits von Roeser und Legler ausgehend von 2-Amino-2-desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucosylbromid in einer Ausbeute von 36% hergestellt, wobei 5 eq des Akzeptors 4-Methylumbelliferon (**165**) nötig waren.^[232-234] Unser Ansatz vom stabileren Glycosyldonor **190** aus ermöglicht die Synthese mit einer Ausbeute

über zwei Stufen von 52 %. Des Weiteren sind bei der Glycosylierung lediglich 1.5 eq des Akzeptors nötig.

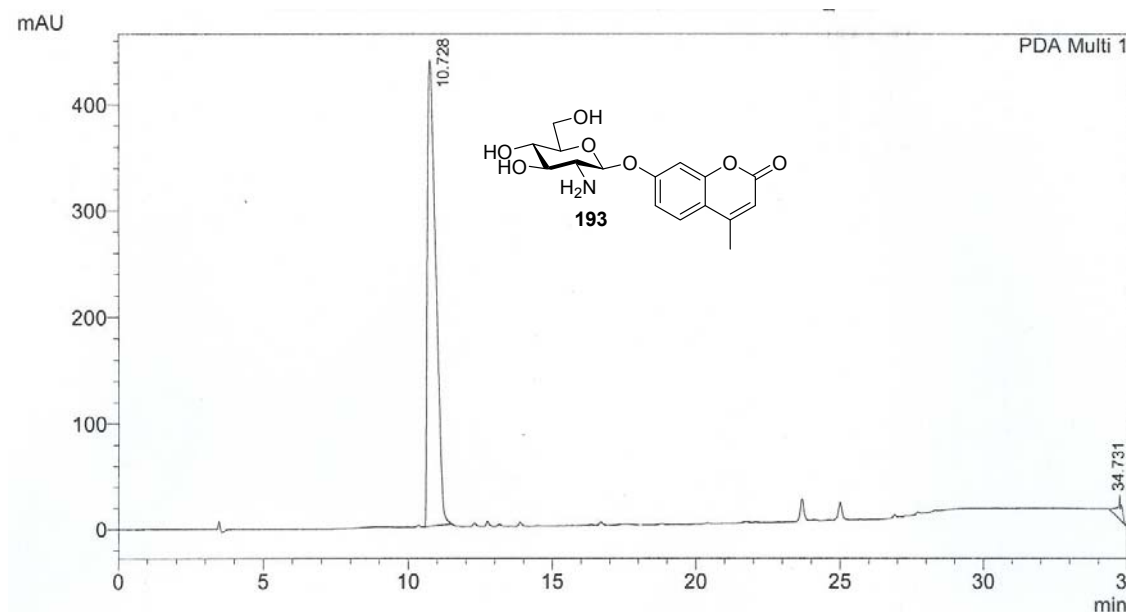


Abb. 3.87: HPLC-Chromatogramm der Verbindung **193**. Säule, ID = 4 mm, Fluss = 1 mL/min, Detektion bei 254 nm, Gradient: 5-80 % MeCN in 20 min (MeCN und H₂O mit 0.1 % Ameisensäure).

4-Methylumbelliferylglucosamin (**193**) wurde in den enzymatischen Assays mit *BsNAgZ* nicht hydrolysiert. Das bedeutet, dass das Enzym Glucosamin in Mureinen nicht abbauen kann. Das wiederum heißt, dass *B. subtilis* weitere, bisher noch nicht identifizierte Enzyme besitzt, die diese wichtige Aufgabe im Organismus besitzen. *BsNAgZ* erweist sich damit als ein sehr substratspezifisches Enzym, bei dem die Erkennung des Substrats auch über die Amidstruktur erfolgen muss.

Zur Synthese eines weiteren Substrats, des 4'-Methylumbelliferylglycosids der N-Acetylmuraminsäure (4'-MeU-MurNAc) **197**, wurde als Glycosyldonor das Oxazolin **4** verwendet (Abb. 3.88). Es wurde mit Hilfe des in dieser Arbeit als geeigneten Aktivator identifizierten ZnI₂ in THF zum Glycosid umgesetzt. Anstelle dem sonst üblichen DCM wurde hier THF als Lösungsmittel verwendet, weil sich 4-Methylumbelliferon im ersteren nur sehr schlecht lösen ließ. Man erhielt das gewünschte peracetylierte 4'-Methylumbelliferylglycosid von GlcNAc **194** in einer Ausbeute von 48 %. Ein weiterer Ansatz mit EuCl₃ als Aktivator ergibt auch nach 48 h keinen Umsatz. Dunstan *et al.* hatten bereits 1972 eine optimierte Glycosylierung des

Methylumbelliferylglycosids **194** mit Hilfe von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxyglucopyranosylglucose als Donor veröffentlicht, bei der sie aber nur eine Ausbeute von 32 % erreichen konnten.^[235]

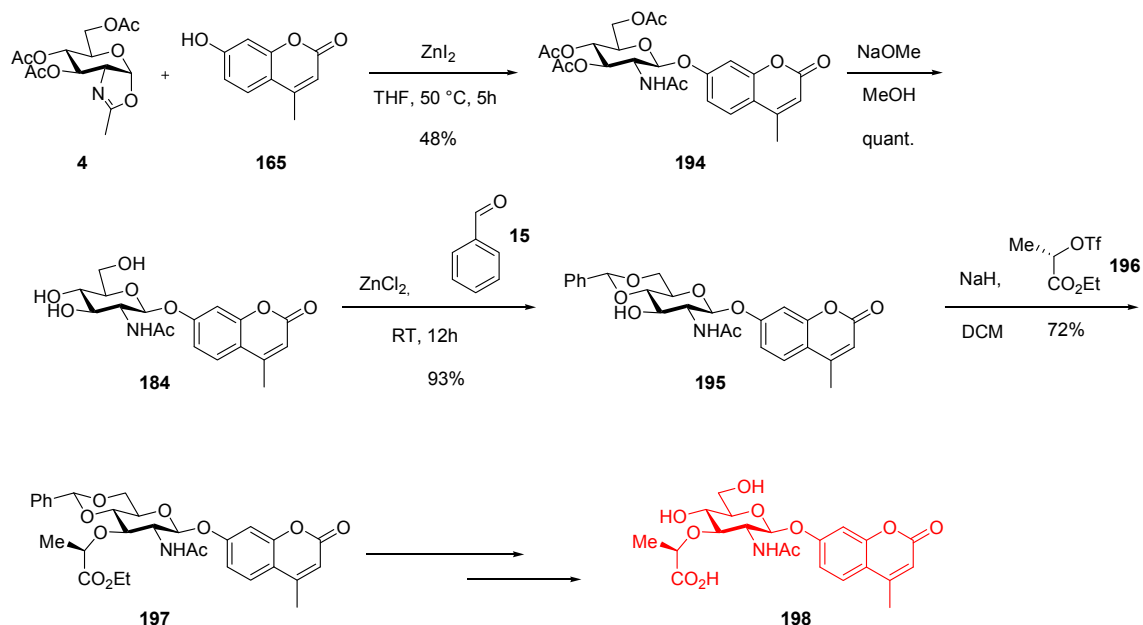


Abb. 3.88: Synthese des 4-Methylumbelliferylglycosids der Muraminsäure **197**, welches die vollgeschützte Vorstufe des Enzymsubstrats **198** darstellt.

Die anschließende Deacetylierung zu **184** verlief quantitativ. Whitworth *et al.* publizierten 2007 die Synthese von **184** und weiteren 2-Desoxy-2-Acylzucker über das nach Roeser *et al.*^[232] hergestellte 2-Desoxy-2-Aminozuckerinertmediat **192** (siehe Abb. 3.86).^[234] Sie erhielten die Zielverbindungen in einer Gesamtausbeute zwischen 8 und 15 % ausgehend von Glucosaminhydrochlorid über 4 Stufen. Nach unserer neuen Syntheseroute erhält man **184** über ebenfalls 4 Stufen mit einer verbesserten Gesamtausbeute von 29 %.

Zur Umwandlung von GlcNAc in MurNAc muss dieses an der 3-Position mit Milchsäure verethert werden. Deshalb wurden zunächst die freien Hydroxygruppen an den Positionen 4 und 6 durch Ausbildung eines Benzylidenacetals blockiert. Der so entstandene Zucker **195** kann mit Natriumhydrid und dem Triflat des Milchsäureethylesters **196** zum vollgeschützten MurNAc-Derivat **197** reagieren. Schmidt *et al.* konnten in früheren Arbeiten zur Synthese von Muraminsäureglycosiden zeigen, dass das Triflat eine stereoselektivere Reaktion als das analoge Bromid erlaubt.^[236] Diese wichtige Zwischenstufe konnte in einer Gesamtausbeute von

32 % über nur 4 Stufen erhalten werden. Durch die Verwendung des Oxazolins **4** kann man außerdem einen sehr einfach verfügbaren und günstigen Glycosyldonor benutzen. Die geschützte Substanz **197** ist ideal lagerbar. Vor der Verwendung des Substrats in enzymatischen Assays muss sie lediglich nach literaturbekannten Methoden zu **198** entschützt werden.^[237]

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Aufbau eines Chip-basierten Testsystems zur Detektion neuer Aktivatoren für den Einsatz von Zuckeroxazolinolen als Glycosyldonoren

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, alle Elemente eines chipbasierten Testsystems zu entwickeln, um die Glycosylierung bzw. die Aktivierung des Oxazolins **4** zur Synthese von β -Glycosiden des *N*-Acetylglucosamins untersuchen zu können (Abb. 4.1).

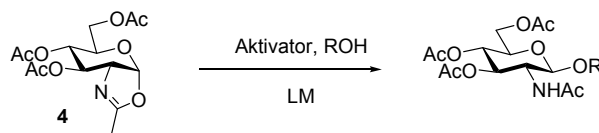


Abb. 4.1: Stereospezifische Glycosylierung des Oxazolins **4**.

Dazu wurde zunächst das von *N*-Acetylglucosamin abgeleitete Zuckeroxazolinderivat **108** mit Linker synthetisiert (Abb. 4.2). Die Synthese gelang ausgehend von 2-Acet-amido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (**25**) über das *n*-Pentenylglycosidintermediat **88** in einer sehr guten Gesamtausbeute von 24 % über 9 Stufen. Die Oxazolinbildung gelang durch Aktivierung der *n*-Pentenylgruppe mit NIS/ Et₃SiOTf. Über den mit einer Aminofunktion versehenen Linker kann die Verbindung **108** an entsprechend funktionalisierte Oberflächen wie z.B. an Glasträgern kovalent verknüpft werden, ohne dass dabei eine glycosidische Bindung gebildet werden muss. Der Oxazolinring wird dabei nicht geöffnet und steht zur Untersuchung der Glycosylierungen auf der festen Phase zur Verfügung. In allen zu entwickelnden Testsystemen war vorgesehen, den immobilisierten Zucker mit einem geeigneten Glycosylakzeptor zu verknüpfen, der daraufhin in einer zweiten Ligationsreaktion selektiv mit einem Farbstoff reagiert.

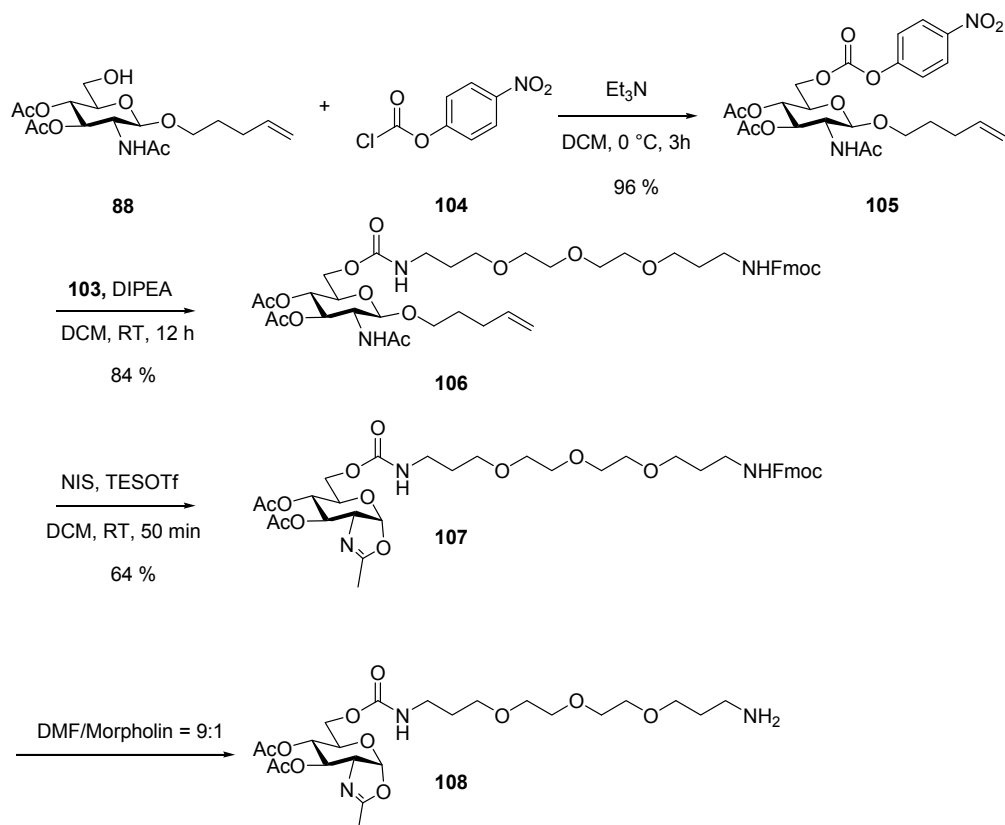


Abb. 4.2: Synthese des Oxazolins **108** mit Aminolinker zur Immobilisierung auf einen festen Träger.

Die Auswertung der Reaktionen kann anschließend über die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgen. Als mögliche Ligrationsreaktionen wurden die Reaktion zwischen einem Maleinimid und einem Thiol, sowie die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) gewählt.

Bei der Verwendung von Farbstoffdisulfiden wurde bei allen untersuchten Parametern eine so hohe unspezifische Bindung beobachtet, dass eine Verwendung der Maleinimid-Thiol-Ligation für ein Testsystem ausgeschlossen wurde.

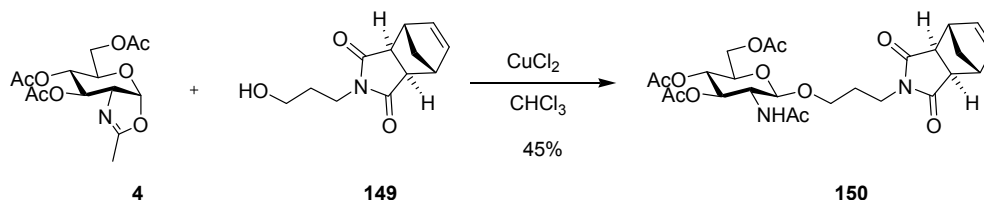


Abb. 4.3: Glycosylierung des Zuckeroxazolins **4** mit dem Norbornenalkohol **149**.

Für ein Testsystem unter Verwendung der DARinv wurde zuerst der Norbornen-basierte Glycosylakzeptor **150** synthetisiert, welcher in der Glycosylierung mit dem Oxazolin **4** mit einer Ausbeute von 45 % umgesetzt werden konnte (Abb. 4.3).

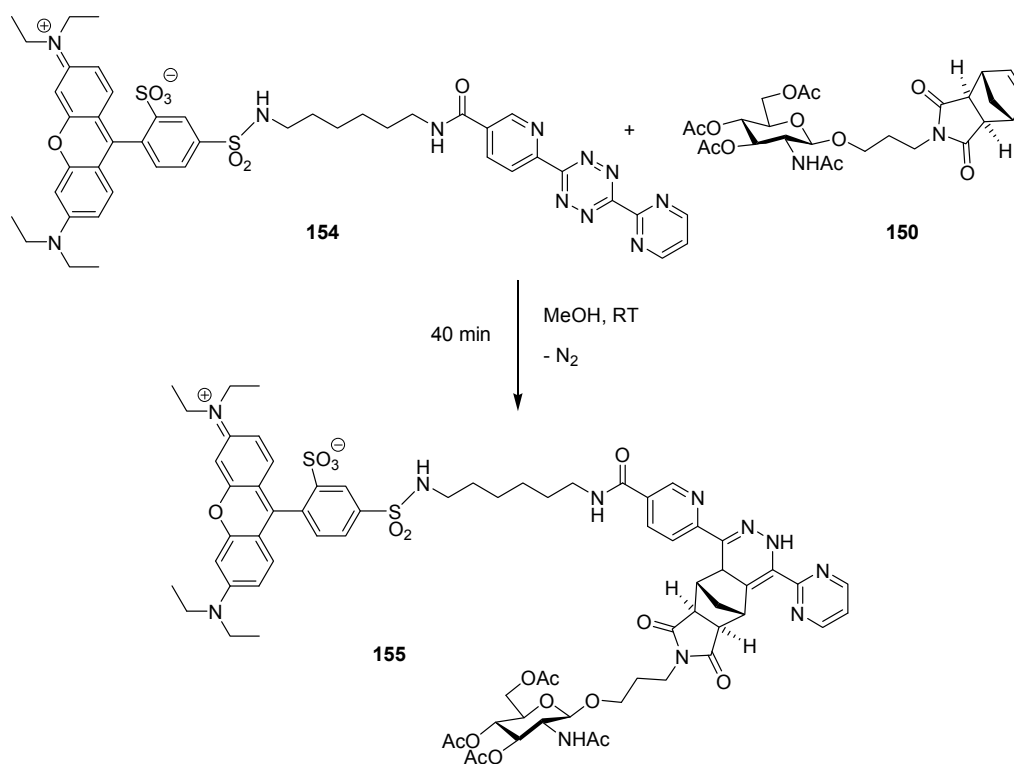


Abb. 4.4: DARinv-Ligationsreaktion zwischen dem Glycosid **150** und dem Tetrazin **154** (nur ein Isomer dargestellt).

Als Farbstoff, welcher in der DARinv-Reaktion mit dem gebildeten Norbornenglycosid **150** als elektronenarmes Dien fungierte, wurde ausgehend von Sulforhodamin B in 3 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 16 % das Tetrazinkonjugat **154** synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Glycosid **150** mit dem Farbstoff **154** in Lösung im Sinne einer DARinv reagiert (Abb. 4.4). Analog zu den Untersuchungen bei Verwendung von Maleinimidalkoholen als Glycosylakzeptoren wurde zunächst das Norbornenderivat **157** hergestellt, welches direkt an eine PDITC-modifizierte Oberfläche angeknüpft werden konnte. Als erstes sollte die Konzentration an **157** ermittelt werden, bei der eine maximale Belegung der Oberfläche mit dem Norbornen **157** erreicht werden kann. Die Auftragung der gemessenen relativen Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration von **157** zeigt die in Abb. 4.5 abgebildete Kurve.

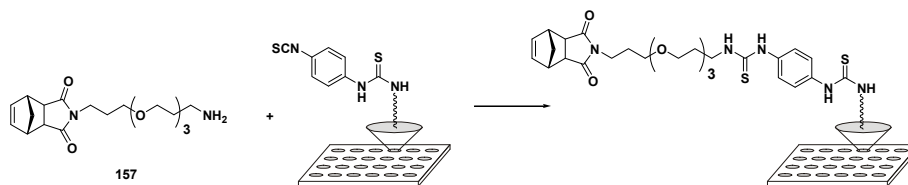
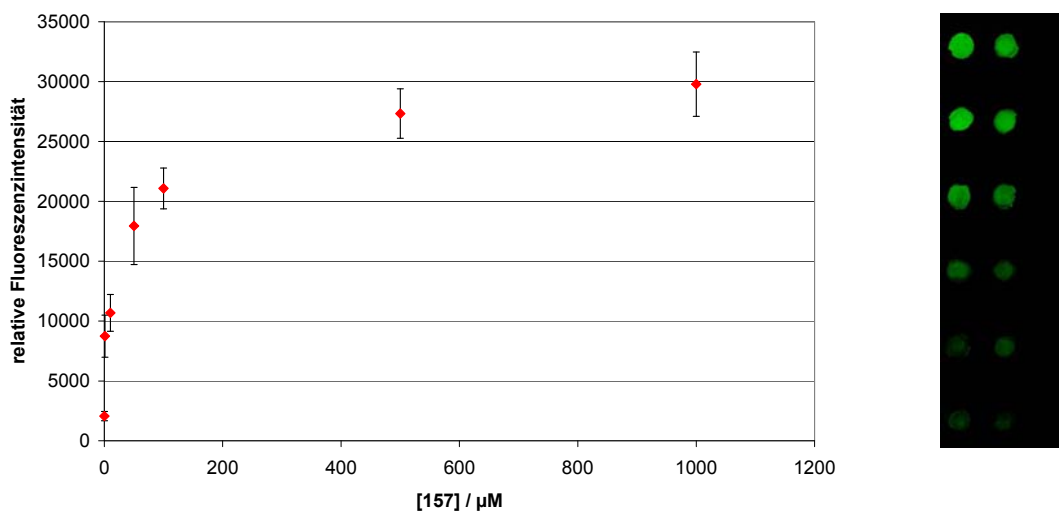


Abb. 4.5: Bestimmung der zur Sättigung der Oberfläche benötigten Konzentration an **157** bei einem PMT-Gain von 550 nach Inkubation mit dem Farbstoffkonjugat **154** (1 mM) für 3 h.

Aus der erhaltenen Kurve wurde nun die Konzentration ausgewählt, die für die Herstellung von Molenbrüchen der Verbindung **101** und dem Amino-modifizierten Norbornen **157** verwendet wurde. Ziel war eine Gesamtkonzentration an reaktiven Aminogruppen zu haben, die ausreichend ist, um mit möglichst allen Isothiocyanatgruppen der Glasoberfläche zu reagieren. Mit Hilfe dieser Molenbrüche können verschiedene Ausbeuten bei Testreaktionen auf dem Chip simuliert und die Reaktions- sowie Waschbedingungen optimiert werden. Es wurde eine Gesamtkonzentration von 0.5 mM gewählt, um den Substanzverbrauch zu minimieren. Diese Konzentration liegt im vorderen Bereich der Sättigung der in Abb. 4.5 zu sehenden Kurve.

Schließlich wurde in Zusammenarbeit mit Markus Weiland von den wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Konstanz eine geeignete Reaktionskammer mit dem Namen „**MARCO**“, *multifunctional array reaction chamber for oxazolines* entwickelt, mit der viele Reaktionsräume parallel auf einem Chip erzeugt werden konnten.

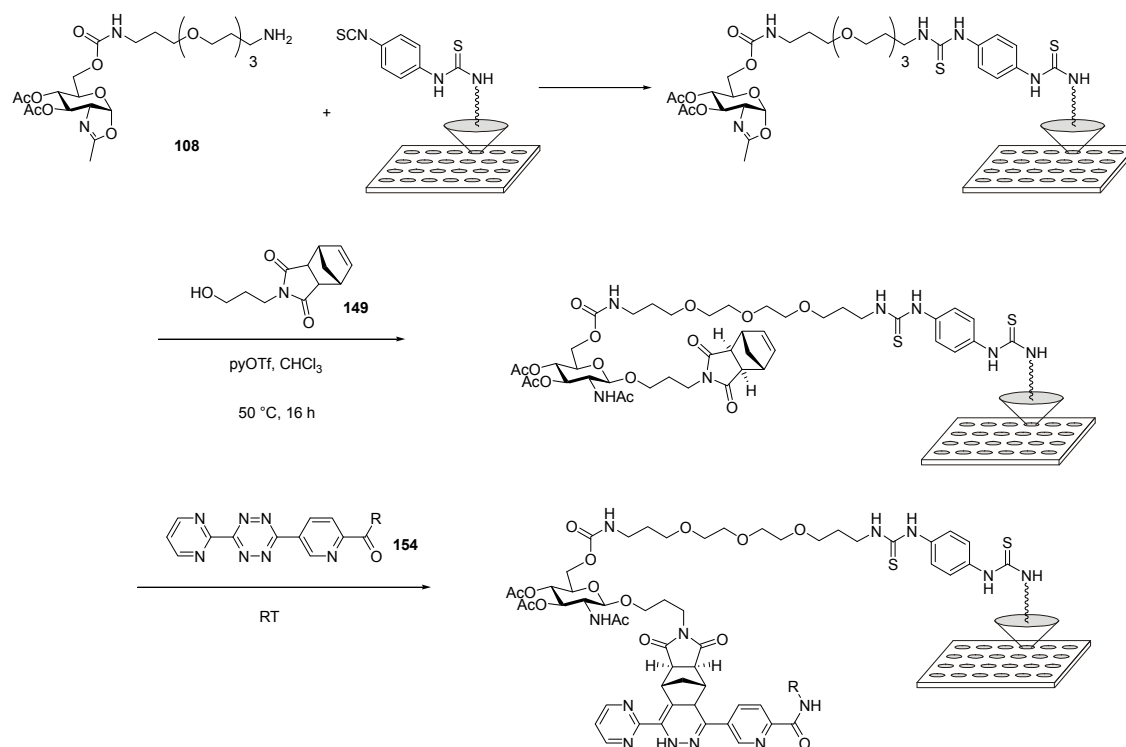


Abb. 4.6: Übersicht der Reaktionen des Oxazolins **108** auf dem PDITC funktionalisierten Glsträger.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass das entwickelte System für die Suche nach neuen Glycosylierungsaktivatoren geeignet ist. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen Positiv- und Negativkontrolle beträgt dabei etwa 9:1. Die ermittelten relativen Ausbeuten der untersuchten Aktivatoren können Abb. 4.7 entnommen werden. Die größte Aktivität wurde dabei bei der Verwendung des Lanthantriflats beobachtet (relative Ausbeute von 76 %). PPTS und Pyridiniumtriflat führten zu etwas geringeren relativen Ausbeuten (68 % bzw. 66 %), wohingegen Ytterbiumtriflat und Zinkiodid lediglich mäßige relative Ausbeuten lieferten (44% und 36 %).

Sollte sich eine qualitative oder eine direkte quantitative Korrelation zwischen den Ausbeuten in Lösung mit den relativen erhaltenen Fluoreszenzintensitäten ergeben, dann kann das Testsystem als ein wichtiges Werkzeug zur Identifizierung neuer Aktivatoren herangezogen werden. Es ist zudem das erste Testsystem dieser Art in der aktuellen Literatur, bei dem Glycosylierungen auf einem festen Träger direkt ausgelesen werden. Das etablierte Testsystem kann nun natürlich für die Evaluation einer Vielzahl verschiedener Aktivatoren oder Katalysatoren herangezogen werden.

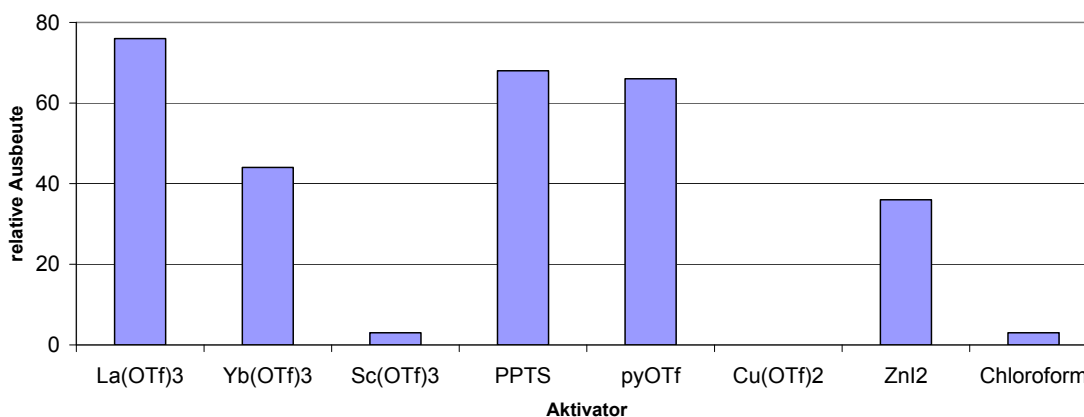


Abb. 4.7: Vergleich der auf dem Chipsystem ermittelten relativen Ausbeuten der Glycosylierung eines oberflächengebundenen Oxazolins **108**.

4.2 Untersuchungen zur Glycosylierung mit Oxazolinen als Glycosyldonoren

Wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben, ist es für die effiziente Synthese von 2-Amino-2-Desoxyzuckerglycosiden von großem Interesse zu untersuchen, inwieweit neben Kupfer(II)chlorid auch andere Metallsalze bzw. deren Komplexe dazu in der Lage sind, Zuckeroxazoline zu aktivieren oder deren Glycosylierung sogar zu katalysieren. Die dafür gewählte Hauptmethode stellte der Ansatz eines chipbasierten Testsystems dar. Daneben wurden aber auch Testreaktionen in Lösung durchgeführt. Dazu wurde die kupferaktivierte Glycosylierung des Oxazolins **4** mit Diacetongalactose **46** verwendet. Von insgesamt 23 getesteten potentiellen Aktivatoren erwiesen sich die folgenden als aktiv: CuCl_2 , $\text{CuCl}_2 \times \text{SMe}_2$, ZnI_2 , $\text{La}(\text{OTf})_3$, $\text{Ce}(\text{OTf})_3$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ und EuCl_3 . Mit diesen Aktivatoren, sowie mit pyOTf und PPTS wurden daraufhin quantitative Reaktionen durchgeführt. Die Reihenfolge der ermittelten Ausbeuten in Lösung und auf der festen Phase war:

Reaktivitätsreihenfolge in Lösung (CHCl_3): $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (17 %) < pyOTf (18 %) < PPTS (27 %) < $\text{CuCl}_2 \times \text{SMe}_2$ (39 %) < $\text{La}(\text{OTf})_3$ (59 %) < CuCl_2 (68 %) < $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (73 %) < ZnI_2 (84 %)

Reaktivitätsreihenfolge im Chipexperiment (CHCl_3): $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (3 %) < ZnI_2 (36 %) < $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (44 %) < pyOTf (66 %) < PPTS (68 %) < $\text{La}(\text{OTf})_3$ (76 %)

Eine 1:1 - Übertragung der Reaktivitäten zwischen dem Chiptestsystem und den Reaktionen in Lösung liegt also nicht vor. Die Unterschiede zwischen den beiden

Reaktionssystemen sind dafür einfach zu groß: verschiedene Donor- / Akzeptorverhältnisse und Konzentrationen (auf der festen Phase liegt ein großer Glycosylakzeptorüberschuss vor), unterschiedliche Akzeptoren (Diacetongalactose **46** vs. Norbornenalkohol **149**), sowie der Einfluss der Grenzflächenphänomene im Chipexperiment. Auch wenn sich die mittels chipgebundenem Testsystem ermittelten Aktivitäten nicht direkt auf Reaktionen in Lösung übertragen lassen können, so erhält man doch schnell und effizient Hinweise, welche Kombinationsmöglichkeiten aus Aktivator und Glycosylierungsreaktion Sinn machen. So konnte mit ALLEN Aktivatoren, die in den Testsystemen als geeignet identifiziert wurden, eine entsprechende Reaktion in Lösung beobachtet werden, wenn auch teilweise mit geringerer Ausbeute.

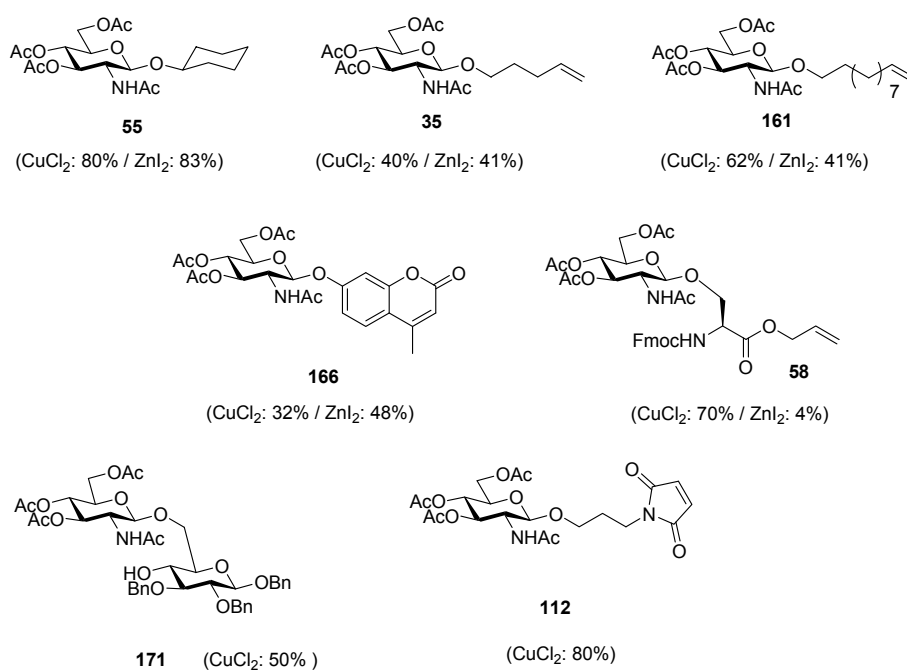


Abb. 4.8: Übersicht der mit CuCl₂ und ZnI₂ synthetisierten Glycoside.

Zur Untersuchung der Anwendungsbreite des bereits bekannten Aktivators CuCl₂ und dem als Alternative entdeckten einsetzbaren Aktivator ZnI₂ wurden eine Reihe von Glycosylierungen mit dem Oxazolin **4** als Donor durchgeführt. Es konnten mit beiden Aktivatoren Glycoside synthetisiert werden, die eine Reihe von Anwendungen in chemischer Biologie und den Materialwissenschaften ermöglichen (Abb. 4.8). Es zeigt sich, dass ZnI₂ in den meisten Fällen ein ähnlich guter Aktivator wie CuCl₂ ist.

Schließlich wurden die Zuckeroxazoline **41**, **176** und **179** synthetisiert (Abb. 4.9) und in kupferkatalysierten Glycosylierungen verwendet. Die Umsetzungen mit dem Galactosyloxazolin **176** und dem Furanosyloxazolin **41** waren dabei erfolgreich, wohingegen mit dem Chitobioseoxazolin **179** keine Reaktion beobachtet werden konnte.

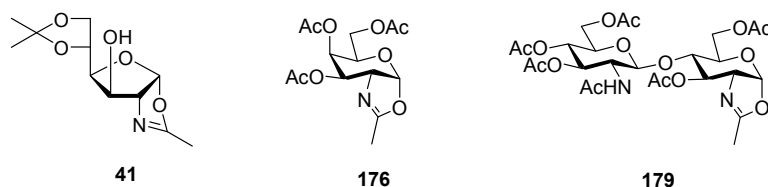


Abb. 4.9: Synthetisierte Oxazoline, die neben dem Oxazolin 4 in kupferaktivierten Glycosylierungen eingesetzt wurden.

Mit Hilfe der gewonnenen Informationen über die Anwendungsbreite verschiedener Oxazoline und Aktivatoren zeigt sich, dass es weiterhin ein großes Potential für diese Art von Donoren in Glycosylierungen zur Synthese von 2-Desoxy-2-aminoglycosiden besteht. Weitere mechanistische Untersuchungen unter Verwendung der neu identifizierten Aktivatoren könnten zu einem besseren Verständnis über den genauen Ablauf der Aktivierung liefern. So ist es denkbar, ein strukturbezogenes Design von Aktivator und Oxazolin zu verwirklichen.

4.3 Strukturelle Untersuchungen eines Kupfer (II)-Zuckeroxazolinkomplexes, dem postulierten Intermediat der kupfer-aktivierten Oxazolinmethode

Unter Verwendung von IR- und EPR-Spektroskopie, welche von der AG Jeschke an der ETH Zürich durchgeführt wurde, konnte folgende Struktur des Komplexes, der sich aus dem Zuckeroxazolin **4** und CuCl_2 bildet, plausibel gemacht werden:

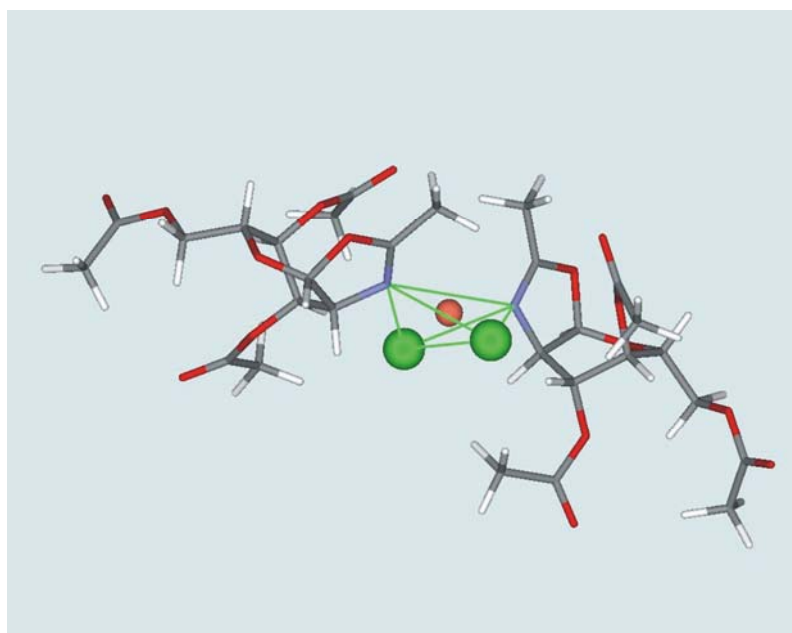


Abb. 4.10: Geometrieoptimierte Strukturen des Kupferoxazolinkomplexes (Kupferatom orangerot dargestellt) mit zwei Zuckeroxazolinliganden **4** und zwei Chlorliganden (grün dargestellt) nach DFT-Berechnungen.

Die Interpretation der aufgenommenen Spektren unter Berücksichtigung von DFT-Berechnungen lassen uns zu dem Schluss kommen, dass es sich sehr wahrscheinlich um einen leicht verdrehten, annähernd quadratisch-planaren Komplex handelt, bei dem zwei Oxazolinring-Stickstoffe und zwei Chlorliganden direkt an das Zentralmetall Cu koordiniert sind. Für weitere vergleichende Studien wurden Proben der entsprechenden Oxazoline, welche sich von der peracetylierten *N*-Acetyl-Galactose und der peracetylierten Chitobiose ableiten, der AG Jeschke für EPR-Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

4.4 Synthese von 2-Desoxy-2-Aminozuckern als Substrate zur Untersuchung der Enzymaktivität bei bakteriellem Zellwandrecycling

In diesem Teilprojekt sollten geeignete Synthesemethoden für die Methylumbelliferonglycoside **193** und **197** entwickelt werden (Abb. 4.11). Diese sollten dann in der Arbeitsgruppe um PD Dr. C. Mayer im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz als Substrate zur Untersuchung der am bakteriellen Zellwandrecycling von *E. coli* und *B. subtilis* beteiligten isolierten Enzyme eingesetzt werden. Die Synthese des Glucosaminglycosids **193** gelang ausgehend von einem literaturbekannten Trocgeschützten Trichloracetimidat-Donor **190**^[50] mit einer Ausbeute von 51 % über 3 Stufen.

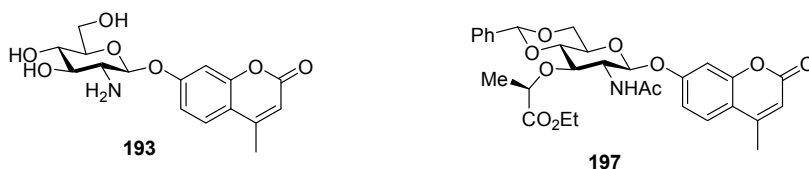


Abb. 4.11: 4-Methylumbelliferylglucoside des Glucosamins **193** und der N-Acetylmuraminsäure **197**.

Die Synthese zum MurNAc-Methylumbelliferonglycosid **197** konnte ausgehend vom Oxazolin **4** als Donor in 4 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 32 % durchgeführt werden. Vor der Verwendung des Substrats in enzymatischen Assays muss es lediglich nach literaturbekannten Methoden entschützt werden.^[237] Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert.^[231] Beide Substrate können zukünftig neben der Untersuchung des Zellwandrecyclings in *E.coli* und *B. subtilis* auch bei anderen Bakterienstämmen verwendet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

Zur analytischen **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Alufolien der Firma Merck (Schichtdicke von 0.2 mm) verwendet. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Zur Anfärbung wurden folgende Reagenzien verwendet:

- A: 1 %ige wässrige Kaliumpermanganatlösung
- B: Cer-Reagenz (5 g Phosphormolybdänsäure, 25 mL konzentrierte H₂SO₄, 2.5 g Ce(SO₄)₂ x H₂O und 225 mL dest. Wasser)
- C: 15 %ige ethanolische Schwefelsäure
- D: 3 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol

Die DC-Folien wurden nach Behandlung mit einem dieser Tauchreagenzien durch Wärmebehandlung visualisiert. Alle R_f – Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt.

Zur präparativen **Flash-Chromatographie (FC)** wurde Kieselgel 60 der Firma Merck mit einer Korngröße von 40 – 63 µm als Trennmittel verwendet. Die technischen Lösungsmittel wurden vor Benutzung destilliert.

Analytische und präparative **RP-HPLC** erfolgte an einer LC-20A prominence – Anlage (Hochdruckpumpen LC-20AT, Autosampler SIL-20A, Säulenofen CTO-20AC, Detektor SPD-M20A, Controller CBM-20A und Software LC-Solution) der Firma *Shimadzu*. Die Trennungen erfolgten auf Eurospher 100-5 C-18 Säulen (analytisch 4*250 mm, Flussrate 0.9 mL/min), bzw. Eurospher 100 C-18 Säulen (präparativ 16*250 mm, Flussrate 9.6 mL/min) der Firma *Knauer*.

Die verwendeten Eluenten setzten sich aus den folgenden Lösungen zusammen:

Eluent 1: A: 0.1% TFA in H₂O B: 0.1% TFA in MeCN

Eluent 2: A: 0.1% HCOOH in H₂O B: 0.1% HCOOH in MeCN

Die gemessenen **Kernresonanzspektren** wurden mit den Geräten Bruker AC 250, Jeol Lambda 400, Bruker Avance III 400 und Bruker Avance DRX 600 aufgenommen. Als interner Standard dienten dabei die ^1H - bzw. die ^{13}C -Resonanzsignale der nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel. Als Lösungsmittel wurden D_2O ($\delta_{\text{H}} = 4.80$ ppm), D_3COD ($\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49.15$ ppm), CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm), DMSO-d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm) verwendet. Die Zuordnung der Signale wurde durch zweidimensionale Aufnahmetechniken (DQF-COSY, HSQC, ROESY, NOESY) erleichtert bzw. ermöglicht. Die Kopplungskonstanten werden in Hertz angegeben. Alle Spektren wurden bei 300 K aufgenommen. Für die Angabe der Multiplizität werden folgende Abkürzungen verwendet: br. = breites Signal, s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Geminale Protonen werden durch Buchstaben unterschieden.

CW (continous wave) **EPR**-Spektren wurden mit einem Bruker ElexSys Spektrometer (Mikrowellenfrequenz 9.47 GHz, Maximalleistung der Mikrowellenbrücke 200 mW) mit einem super high Q Resonator (ER 4122 SHQ) und einem He-Strom-Kryostaten (ESR 910, Oxford Instruments) aufgenommen. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 15 K und mit einer Modulationsamplitude von 0.5 mT aufgenommen. Das Sättigungsverhalten wurde bei jeder Probe in einem Abschwächungsbereich von 0-48 dB untersucht.

X-Band-Puls-EPR wurde an einem Bruker E680 X-Spektrometer gemessen. Für die Pulsmessungen wurde ein MD4 dielektrischer Resonator von Bruker Biospin (Mikrowellenfrequenz 9.78 GHz) verwendet. Alle Pulsmessungen wurden bei einer Temperatur von 15 K mit einem He-Strom-Kryostaten (CF 935, Oxford Instruments) aufgenommen.

Infrarotspektren wurden an einem Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR-Gerät aufgenommen. Es wurden KBr-Presslinge angefertigt. Pro Pressling wurden 72 mg des fein gemahlenden KBr-Substanz-Gemisches verwendet.

UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 50 - Einstrahlspektrometer von Varian in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil aufgenommen.

CD-Spektren wurden an einem J-715 Spectropolarimeter der Firma Jasco in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil aufgenommen.

MALDI-TOF-Spektren wurden mit einem Bruker Biflex III Spektrometer aufgenommen. Dabei wurde im positiven, linearen Modus mit einem gepulsten Stickstofflaser (337 nm) gearbeitet.

Die verwendete Matrix war α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (CHCA) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Zur Probenpräparation wurden 10 μ l einer 1,4-Dioxanlösung der Matrix (20 mg/mL) mit 10 μ l einer 1,4-Dioxanlösung der Probe (1 mg/mL) gemischt. Auf das „target“ wurde 1 μ l dieser Mischung aufgetragen. Die Kalibrierung mittels linearer Regression wurde mit folgenden Proteinen vorgenommen:

Bradykinin 1-7:	757.40	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Angiotensin II:	1046.54	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Angiotensin I:	1296.69	[M+H] ⁺ monoisotopisch
Insulin (B-Kette):	3494.56	[M+H] ⁺ monoisotopisch

ESI-MS-Spektren wurden mit einem Esquire 3000 plus der Firma Bruker Daltonics im positiven oder negativen Modus gemessen. Die Proben (ca. 1 μ g/mL in Methanol) wurden dabei mit einer Flussrate von 3 μ L/min eingespritzt.

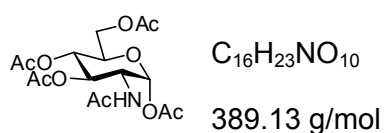
Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor der Universität Konstanz mit einem CHN-Analysator (CHN-O-RAPID) der Firma Heraeus und einem CHN-Analysator der Firma Elementar durchgeführt.

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Fluka, Merck und Sigma-Aldrich bezogen und wiesen, sofern nicht anders angegeben, die Qualitätsstufe p.a. auf.

5.2 Synthesen und Experimente

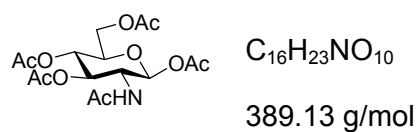
A) Synthese eines zur Immobilisierung geeigneten Zuckeroxazolins

5.2.1 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose (25a)



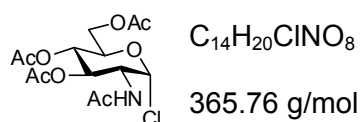
Verbindung **25a** wurde nach einer Vorschrift von Takeda *et al.*^[200] in 72 % erhalten.

5.2.2 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranose (25b)



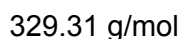
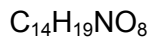
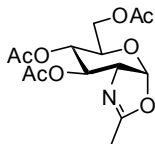
Verbindung **25b** wurde nach einer Vorschrift von Bergmann *et al.*^[202] über vier Stufen in 65 % Ausbeute hergestellt.

5.2.3 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid (24)



Glucosylchlorid **24** wurde nach Horton *et al.*^[238] hergestellt.

5.2.4 2-Methyl-(3,4,6-tri-O-acetyl-1,2-dideoxy- α -D-glucopyrano)- [2,1-d]-oxazolin (4)



Das Oxazolin **4** wurde nach Nakayabashi *et al.*^[73] ausgehend vom Pentaacetat **25** in 86 % Ausbeute hergestellt. Alternativ konnte Verbindung **4** nach Warren *et al.*^[239] ausgehend vom Glycosylchlorid **24** in 60 % hergestellt werden.

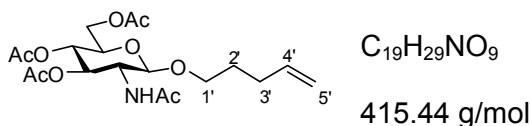
DC: $R_f = 0.19$ (DCM/MeOH = 95:5)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.96$ (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H; H-1), 5.26 ("t", $J = 2.5$ Hz, 1 H; H-3), 4.92 (ddd, $J = 9.3, 2.1, 1.6$ Hz, 1 H; H-4), 4.22-4.08 (m, 3 H; H-2, H-6a, H-6b), 3.63-3.56 (m, 1 H; H-5), 2.11 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.09 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.08 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H; Me) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.8$ (C(O)CH₃), 169.8 (C(O)CH₃), 169.5 (C(O)CH₃), 166.9 (N=C(CH₃)), 99.6 (C-1), 70.6 (C-3), 68.6 (C-4), 67.7 (C-5), 65.2 (C-2), 63.6 (C-6), 21.2 (C(O)CH₃), 21.1 (C(O)CH₃), 21.0 (C(O)CH₃), 14.2 (N=C(CH₃)) ppm.

ESI-MS (pos. Modus): m/z [M+H]⁺ berechnet: 330.1, gefunden: 329.7; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 352.1, gefunden: 351.7; m/z [M+K]⁺ berechnet: 368.1, gefunden: 367.6.

5.2.5 *n*-Penten-4-yl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**35**)



Das Pentenylglycosid **35** wurde nach Peter et al.^[201] ausgehend vom β -Pentaacetat **25b** in 58 % Ausbeute hergestellt.

Alternativer Reaktionsweg mit $CuCl_2$ als Lewis-Säure:

130 mg (0.96 mmol, 1.5 eq) $CuCl_2$ und 138 mg (1.15 mmol, 1.8 eq) $MgSO_4$ wurden zusammengemischt und mit getrocknetem 1.28 mL CH_2Cl_2 überspült. Nachdem die Suspension 15 min bei RT gerührt wurde, gab man 250 mg (0.64 mmol, 1 eq) 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranose (**24**), hinzu. Nach weiteren 15 min wurden 265 μ L (3.06 mmol, 4.8 eq) 4-Penten-1-ol (**90**) zugetropft. Nach 25 h Rühren bei RT war das Edukt vollständig umgesetzt und die Reaktion wurde mit 50 mL $CHCl_3$ gequenchet. Die Reaktionsmischung wurde auf 70 mL eiskalte, gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung gegeben und solange gerührt, bis die organische Phase farblos erschien. Anschließend wurde die wässrige Phase zweimal mit je 30 mL $CHCl_3$ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 25 mL H_2O gegengewaschen. Nach Trocknung über $MgSO_4$ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man eine viskose, gelbe Flüssigkeit, aus der sich weiße Kristalle abschieden. Nach Flash-Chromatographie mit EE/PE = 4:1 erhielt man 86 mg (32 %) **35** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.51$ ($CHCl_3$ /Aceton = 3:1)

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.76$ - 5.64 (m, 2 H; NH, H-4'), 5.28 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.04-4.92 (m mit ,t' bei 5.03, $J_{4,5} = J_{4,3} = 9.6$ Hz, 3 H; H-4, H-5'), 4.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; H-1), 4.23 (dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz, 1 H; H-6a), 4.09 (dd, $J = 12.3, 2.5$ Hz, 1 H; H-6b), 3.85-3.79 (m, 2 H; H-2, H-1'a), 3.67 (ddd, $J = 9.6, 4.8, 2.5$ Hz, 1 H; H-5),

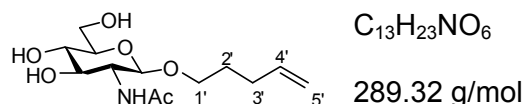
3.48 (dt, $J = 9.8, 6.8$ Hz, 1H; H-1'b), 2.06-1.99 (m, 11 H; H-3', 3 C(O)CH₃), 1.91 (s, 3 H; CH₃CONH), 1.67-1.61 (m, 2 H; H-2') ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.8$ (C(O)CH₃), 170.7 (C(O)CH₃), 170.2 (C(O)CH₃), 169.4 (C(O)CH₃), 138.0 (C-4'), 115.0 (C-5'), 100.7 (C-1), 72.4 (C-3), 71.7 (C-5), 69.1 (C-1'), 68.8 (C-4), 62.2 (C-6), 54.8 (C-2), 29.9 (C-3'), 28.6 (C-2'), 23.3 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 20.6 (C(O)CH₃) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+H]⁺ berechnet: 416.2, gefunden: 416.8; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 438.2, gefunden: 438.8; m/z [M+K]⁺ berechnet: 454.2, gefunden: 454.8.

Elementaranalyse, berechnet für C₁₉H₂₉NO₉: C 54.93, H 7.04, N 3.37, gefunden: C 55.40, H 7.25, N 3.39.

5.2.6 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**91**)



2.50 g (6.0 mmol) des peracetylierten Zuckers **35** wurden in 100 mL abs. Methanol gelöst. Anschließend wurden 1.42 mL einer 0.42 M methanolischen Lösung an NaOMe zugegeben. Man ließ 30 min bei RT rühren. Dann wurde die Lösung mit einem sauren Ionenaustauscher (DOWEX 50 WX8) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde anschließend abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 1.70 g (98 %) **91** als weißen kristallinen Feststoff.

DC: $R_f = 0.47$ (MeCN/H₂O = 5:1)

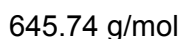
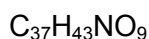
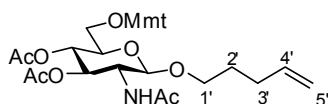
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 5.87-5.77 (m, 1 H; H-4'), 5.00 (dd, *J* = 17.4, 1.8 Hz, 1 H; H-5'a), 4.94 (dd, *J* = 10.2, 1.8 Hz, 1 H; H-5'b), 4.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H; H-1), 3.89-3.85 (m, 2 H; H-1'a, H-6a), 3.67 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1 H; H-6b), 3.62 (dd, *J* = 9.6, 8.4 Hz, 1 H; H-2), 3.48-3.42 (m, 2 H; H-1'b, H-3), 3.32-3.25 (m, 2 H; H-4, H-5), 2.11-2.09 (m, 2 H; H-3'), 1.96 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.64-1.60 (m, 2 H; H-2') ppm.

¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃): δ = 173.6 (C(O)CH₃), 139.2 (C-4'), 114.9 (C-5'), 102.4 (C-1), 77.7 (C-5), 75.8 (C-3), 71.9 (C-4), 69.5 (C-1'), 62.5 (C-6), 57.2 (C-2), 30.8 (C-3'), 29.8 (C-2'), 23.0 (C(O)CH₃) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): *m/z* [M+H]⁺ berechnet: 290.2, gefunden: 290.9; *m/z* [M+Na]⁺ berechnet: 312.2, gefunden: 312.9; *m/z* [M+K]⁺ berechnet: 328.2, gefunden: 328.9.

Elementaranalyse, berechnet für C₁₃H₂₃NO₆: C 53.97, H 8.01, N 4.84, gefunden: C 54.01, H 8.13, N 4.79.

5.2.7 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-monomethoxytrityl-β-*D*-glucopyranosid (**93**)



8.38 g (28.9 mmol, 1 eq) des entschützten Pentenylglycosids **91** wurden in 200 mL Pyridin gelöst und 13.39 g (43.35 mmol, 1.5 eq) Monomethoxytritylchlorid (MmtCl) hinzugegeben. Nachdem die Mischung 30 min bei RT gerührt wurde, fügte man 530 mg (4.33 mmol, 0.15 eq) DMAP hinzu. Nach 2 Tagen bei RT wurden 12 mL (12.96 g, 126.93 mmol, 15.1 eq) Ac₂O zugetropft und man ließ einen weiteren Tag rühren. Pyridin und überschüssiges Essigsäureanhydrid wurden im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit PE/EE = 1:1 erhielt man 14.93 g (80 % über zwei Stufen) des Glycosids **93** als weißen Feststoff.

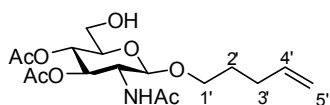
DC: $R_f = 0.26$ (PE/EE = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.39$ (d, $J = 8.0$ Hz, 4 H; PhOCH_3), 7.30-7.10 (m, 8 H; Ph) 6.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H; PhOCH_3), 5.83-5.69 (m, 1 H; H-4'), 5.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H; NH), 5.15-5.07 (m, 2 H; H-3, H-4), 4.98-4.87 (m, 2H; H-5'), 4.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H; H-1), 3.94-3.84 (m, 2 H; H-1'a, H-2), 3.72 (s, 3 H; PhOCH_3), 3.56-3.40 (m, 2 H; H-1'b, H-5), 3.16 (dd, $J = 10.3, 1.9$ Hz, 1 H; H-6a), 3.01 (dd, $J = 10.3, 4.8$ Hz, 1 H; H-6b), 2.12-2.04 (m, 2 H; H-3'), 1.95 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.89 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.66 (s, 3 H; C(O)CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.1$ (C(O)CH_3), 170.1 (C(O)CH_3), 168.9 (C(O)CH_3), 158.5 (PhOMe), 144.1-144.0 (arom. C), 138.0 (C-4'), 128.5-126.8 (C_6H_5), 115.0 (C-5'), 113.0 (PhOMe), 100.9 (C-1), 86.2 (quart. C), 73.3 (C-5), 72.9 (C-3), 68.9 (C-4), 68.7 (C-1'), 62.0 (C-6), 55.2 (PhOCH_3), 54.7 (C-2), 30.1 (C-3'), 28.7 (C-2'), 23.4 (C(O)CH_3), 20.7 (C(O)CH_3), 20.4 (C(O)CH_3) ppm.

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{NO}_9$: C 68.82, H 6.71, N 2.17, gefunden: C 68.65, H 6.75, N 2.35.

5.2.8 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (**88**)



$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_8$

373.40 g/mol

3.5 g (5.42 mmol) des mit Monomethoxytrityl geschützten Pentenylglycosids **93** wurden 12 h bei RT in 80%iger AcOH gerührt. Die Lösung verfärbt sich dabei orange. Die Essigsäurelösung wurde im Vakuum eingedunstet und zweimal mit Toluol coevaporiert. Dabei bildet sich eine gelartige Masse. Zur Entfernung der restlichen Lösungsmittelreste aus dem Gel wurde das Rohprodukt am Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 1.91 g (94 %) der Verbindung **88** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.28$ (EE)

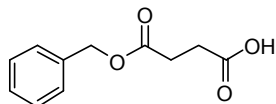
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.84\text{--}5.76$ (m, 1 H; H-4'), 5.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H; NH), 5.32 (dd, $J = 10.4, 9.3$ Hz, 1 H, H-3), 5.02-4.96 (m, 3 H; H-4, H-5'), 4.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H; H-1), 3.90-3.81 (m, 2 H; H-1'a, H-2), 3.75-3.72 (m, 1 H; H-6a), 3.63-3.59 (m, 1 H; H-6b), 3.53-3.48 (m, 2 H; H-1'b, H-5), 2.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H; OH), 2.13-2.08 (m, 2 H; H-3'), 2.05 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.95 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.70-1.65 (m, 2 H; H-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.0$ ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.1 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.0 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 137.9 (C-4'), 115.0 (C-5'), 100.8 (C-1), 74.0 (C-5), 72.3 (C-3), 69.1 (C-4), 69.0 (C-1'), 61.5 (C-6), 55.0 (C-2), 29.9 (C-3'), 28.6 (C-2'), 23.4 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 396.2, gefunden: 396.4; m/z $[\text{M}+\text{K}]^+$ berechnet: 412.2, gefunden: 412.3.

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_8$: C 54.68, H 7.29, N 3.75, gefunden: C 53.53, H 7.14, N 3.94.

5.2.9 Bernsteinsäuremonobenzylester **96**

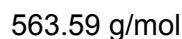
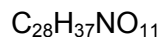
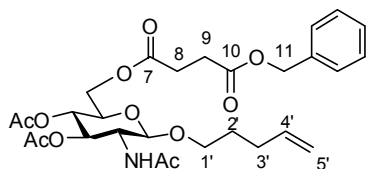


$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_4$

208.21 g/mol

Verbindung **96** wurde nach einer Vorschrift von Isomura *et al.* ^[240] in 80 % erhalten.

5.2.10 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-monobenzylsuccinyl- β -D-glucopyranosid (**97**)



Eine Mischung aus 350 mg (0.94 mmol, 1 eq) des Pentenylglycosids **88**, 238 mg (1.13 mmol, 1.2 eq) des Monobenzylesters **96** und 5 mg (4.7 μmol , 0.005 eq) DMAP in 4.5 mL DMF wurde im Eisbad bei 0° C gerührt. Nach 10 min wurden 175 μl (142 mg, 1.13 mmol, 1.2 eq) DIC hinzugegeben. Unter Erwärmen von 0° C auf RT wurde die Reaktionsmischung noch 3 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ (19:1) erhielt man 430 mg (81 %) der Verbindung **97** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.45$ (DCM/Aceton = 4:1)

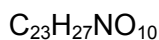
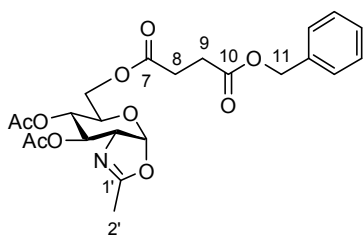
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36\text{-}7.32$ (m, 5 H; Ph), 5.85-5.69 (m, 1 H; H-4'), 5.41 (d, $J = 9$ Hz, 1 H; NH), 5.26 (dd, $J = 10.8, 9.5$ Hz, 1 H; H-3), 5.12 (s, 2 H; H-11), 5.03-4.94 (m, 3 H; H-4, H-5'), 4.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; H-1), 4.22 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, 1 H; H-6a), 4.15 (dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, 1 H; H-6b), 3.86-3.79 (m, 2 H; H-1'a, H-2), 3.69-3.63 (m, 1 H; H-5), 3.48-3.45 (m, 1 H; H-1'b), 2.67 (d, $J = 1.8$ Hz, 4 H; H-8, H-9), 2.09-2.06 (m, 2 H; H-3'), 2.02 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.01 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.94 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.72-1.57 (m, 2 H; H-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.0$ ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.9 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.1 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_2$), 169.4 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 165.2 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_2$), 138.0 (C-4'), 128.6 (arom. C), 128.3 (arom. C), 128.2 (arom. C), 115.0 (C-5'), 100.7 (C-1), 72.3 (C-3), 71.8 (C-5), 69.1 (C-1'), 68.7 (C-4), 66.6 (C-11), 62.6 (C-6), 54.9 (C-2), 30.0 (C-3'), 29.1-29.0 (C-7, C-8), 28.6 (C-2'), 23.4 ($\text{C(O)}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C(O)}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C(O)}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z $[M+Na]^+$ berechnet: 586.2, gefunden: 586.2; m/z $[M+K]^+$ berechnet: 602.2, gefunden: 602.1.

Elementaranalyse, berechnet für $C_{28}H_{37}NO_{11}$: C 59.67, H 6.62, N 2.49, gefunden: C 59.71, H 6.77, N 2.63.

5.2.11 2-Methyl-(3,4-di-O-acetyl-6-O-monobenzylsuccinyl-1,2-didesoxy- β -D-glucopyrano)-[2,1-d]-oxazolin (**98**)



477.46 g/mol

2.15 g (3.81 mmol, 1 eq) des Pentenylglycosids **97** wurden zweimal mit Toluol coevaporiert und anschließend 2 h lang am Ölpumpenvakuum getrocknet. Dazu wurden unter Stickstoffatmosphäre 950 mg (4.19 mmol, 1.1 eq) NIS eingewogen und über ein Septum 60 mL CH_2Cl_2 abs. zugegeben. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hatte, wurden langsam 263 μ L (298 mg, 1.14 mmol, 0.3 eq) Et_3SiOTf zugetropft. Dabei konnte eine starke Gelbfärbung beobachtet werden. Nach etwa 10 min färbte sich die Reaktionsmischung rötlich. Die Reaktion wurde nach 50 min durch Zugabe von 300 mL CH_2Cl_2 abgebrochen. Es wurde mit je 400 mL 10%iger $Na_2S_2O_4$ -Lösung, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 1.07 g (59 %) des Oxazolins **98** als eine viskose Flüssigkeit.

DC: $R_f = 0.28$ (EE)

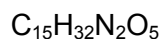
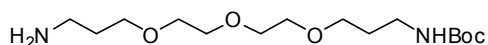
1H -NMR (600.1 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.42$ - 7.32 (m, 5 H; Ph), 5.95 (d, $J = 7.2$, 1 H; H-1), 5.26 (br. s, 1 H; H-3), 5.13 (s, 2 H; H-11), 4.91 (dd, 1 H; H-4), 4.26-4.09 (m, 3 H; H-2, H-

6a, H-6b), 3.63-3.57 (m, 1 H; H-5), 2.70 (d, $J = 1.8$ Hz, 4 H; H-8, H-9), 2.10 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.09 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.07 (s, 3 H; Me) ppm.

¹³C-NMR (150.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.0$ (C(O)CH₃), 171.8 (C(O)CH₃), 169.5 (C(O)CH₃), 169.2 (C(O)CH₃), 163.7 (C-1'), 135.8 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.3 (arom. C), 128.2 (arom. C), 99.4 (C-1), 70.3 (C-3), 68.4 (C-4), 67.6 (C-5), 66.6 (C-11), 64.9 (C-2), 63.6 C-6), 29.1-29.0 (C-8, C-9), 20.9 (CH₃), 14.0 (C-2') ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+H]⁺ berechnet: 478.2, gefunden: 478.3; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 500.2, gefunden: 500.4.

5.2.12 *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (**101**)



320.42 g/mol

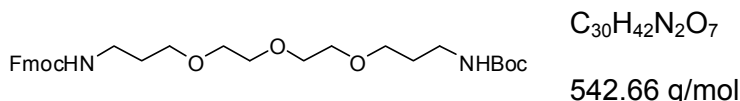
Verbindung **101** wurde nach Fan *et al.*^[241] in 88 % Ausbeute als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.63$ -3.50 (m, 12 H; 6 x CH₂), 3.24-3.18 (m, 2 H; BocNHCH₂CH₂CH₂O), 2.81-2.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H; H₂NCH₂CH₂CH₂O), 1.80-1.65 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 1.42 (s, 9 H; *tert*-Bu) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+H]⁺ berechnet: 321.2, gefunden: 321.2

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+H]⁺ berechnet: 321.2, gefunden: 321.5; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 343.2, gefunden: 343.4; m/z [M+K]⁺ berechnet: 359.2, gefunden: 359.3.

5.2.13 *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N'*-(9'-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (**102**)



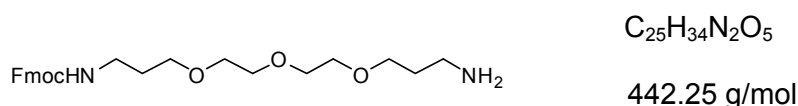
Verbindung **102** wurde nach Zhang *et al.*^[242] ausgehend von **101** in 86 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

DC: $R_f = 0.25$ (DCM/MeOH = 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.66$ (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{4,5}H), 7.50 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{1,8}H), 7.30 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{2,7}H), 7.21 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{3,6}H), 5.23-5.46 (br. s, 1 H; NH), 4.73-5.07 (br. s, 1 H; NH), 4.30 (d, $J = 6.6$ Hz, 2 H; Fmoc-C¹⁰H₂), 4.13 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H; Fmoc-C⁹H), 3.09-3.56 (m, 16 H, CH₂), 1.58-1.71 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 1.34 (s, 9 H; *tert*-Bu) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z $[M+H]^+$ berechnet: 543.2, gefunden: 543.1; m/z $[M+Na]^+$ berechnet: 565.2, gefunden: 565.1; m/z $[M+K]^+$ berechnet: 581.2, gefunden: 581.1

5.2.14 *N*-(9'-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (**103**)



a) ausgehend von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**100**)

13.4 mL (61 mmol, 7.9 eq) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**100**) wurden in 15 mL CH_2Cl_2 vorgelegt, 2.65 g (7.7 mmol, 1.0 eq) FmocOSu in 10 mL CH_2Cl_2 gelöst und über 5 h langsam mit einem Tropftrichter zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nachdem mittels DC-Reaktionskontrolle kein weiterer Umsatz

mehr beobachtet werden konnte, wurde CH_2Cl_2 am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 25 mL H_2O aufgenommen und 5 Mal mit je 25 mL CHCl_3 extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit $\text{DCM}/\text{MeOH} = 8:1$ erhielt man 1.76 g (3.98 mmol, 52 %) des Amins **103** als ein farbloses Öl.

b) Verbindung **103** wurde nach Zhang *et al.*^[242] nach Entschützung von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N'*-(9'-Fluorenylmethoxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (**102**) in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

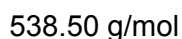
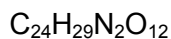
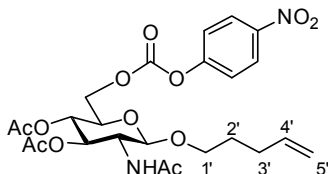
DC: $R_f = 0.19$ (DCM/MeOH = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.76$ (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{4,5}H), 7.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{1,8}H), 7.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{2,7}H), 7.31 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{3,6}H), 5.62 (br, 2 H; NH), 4.39 (d, $J = 6.6$ Hz, 2 H; Fmoc-C¹⁰H₂), 4.21 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H; Fmoc-C⁹H), 3.74-3.45 (m, 16 H, CH₂), 2.05-1.60 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 443.2, gefunden: 443.0

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 443.2, gefunden: 443.3; m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 465.2, gefunden: 465.4;

5.2.15 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-(*p*-nitrophenoxycarbonyl)- β -D-glucopyranosid (**105**)



In einem Rundkolben wurden 50 mg (0.13 mmol, 1.0 eq) *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (**88**) in 2 mL abs. DCM gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 38 μ l (0.27 mmol, 2.0 eq) Et₃N zugegeben. Danach wurde eine Lösung aus 60 mg (0.30 mmol, 2.2 eq) Chloroformiat **104** in 1.5 mL abs. DCM zugetropft, woraufhin sich sofort ein weißer Niederschlag bildete. Nach 3 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen und mit 10%iger Zitronensäure und anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden nochmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann über MgSO₄ getrocknet und nach dem Abfiltrieren bis zur Trockene eingengt. Mittels Lösungsmittelgradienten wurde durch Flash-Chromatographie erst das Nebenprodukt *p*-Nitrophenol entfernt (EE/PE=2:1) und dann das Produkt eluiert (EE). Man erhielt 64 mg (92 %) **105** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.24$ (PE/EE = 1:2)

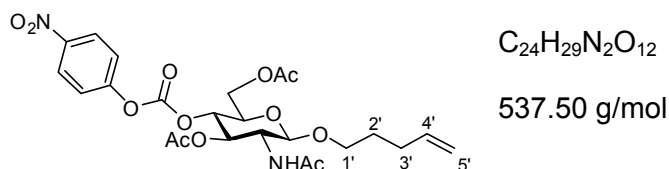
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.29$ (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H; arom. H), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H; arom. H), 5.82-5.76 (m, 1 H; H-4'), 5.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; NH), 5.39 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.12 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-4), 5.03-4.97 (m, 2 H; H-5'), 4.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; H-1), 4.46 (dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, 1 H; H-6a), 4.37 (dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, 1 H; H-6b), 3.90 (dd, $J = 15.6, 6.0$ Hz, 1 H, H-1'a), 3.84-3.80 (m, 2 H; H-2, H-5), 3.53 (dd, $J = 15.6, 7.2$ Hz, 1 H; H-1'b), 2.20-2.10 (m, 2 H; H-3'), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH₃), 1.97 (s, 3 H, C(O)CH₃), 1.71-1.65 (m, 2 H; H-2') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.2$ ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.7 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.5 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 156.4 (quart. arom. C), 153.4 ($\text{OC}(\text{O})\text{O}$), 146.5 (quart. arom. C), 138.8 (C-4'), 126.3 (arom. C), 122.9 (arom. C), 116.0 (C-5'), 101.6 (C-1), 71.9 (C-3), 71.4 (C-5), 69.0 (C-1'), 68.5 (C-4), 66.7 (C-6), 54.8 (C-2), 29.8 (C-3'), 28.4 (C-2'), 24.4 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 21.7 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z $[M+\text{Na}]^+$ berechnet: 561.2, gefunden: 561.5; m/z $[M+\text{K}]^+$ berechnet: 577.2, gefunden: 577.5.

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{12}$: C 53.53, H 5.62, N 5.20, gefunden: C 53.32, H 5.55, N 5.24.

5.2.16 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-*O*-acetyl-4-*O*-(*p*-nitrophenoxycarbonyl)- β -D-glucopyranosid (**109**)



Bei der Synthese des Aktivcarbonats **105** konnte das Regioisomer **109** als Nebenprodukt mit einer Ausbute von 4 % isoliert werden.

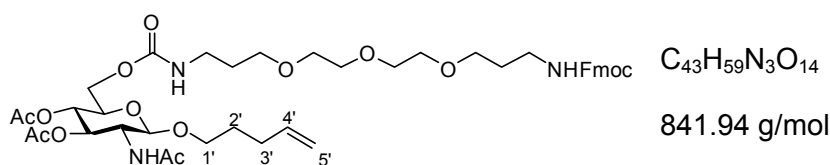
DC: $R_f = 0.28$ (PE/EE = 1:2)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.29$ (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H; arom. H), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H; arom. H), 5.82-5.76 (m, 1 H; H-4'), 5.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; NH), 5.45 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.03-4.94 (m, 3 H; H-4, H-5'), 4.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H; H-1), 4.54 (dd, $J = 12.6, 4.2$ Hz, 1 H; H-6a), 4.22 (dd, $J = 12.6, 1.8$ Hz, 1 H; H-6b), 3.92-3.84 (m, 3 H; H-1'a, H-2, H-5), 3.51 (dd, $J = 15.6, 7.2$ Hz, 1 H; H-1'b), 2.20-2.10 (m, 2 H; H-3'), 2.07 (s,

3 H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH₃), 1.97 (s, 3 H, C(O)CH₃), 1.71-1.65 (m, 2 H; H-2') ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 171.2 (C(O)CH₃), 170.7 (C(O)CH₃), 170.5 (C(O)CH₃), 156.2 (quart. arom. C), 152.6 (OC(O)O), 146.7 (quart. arom. C), 137.7 (C-4'), 126.4 (arom. C), 122.7 (arom. C), 116.0 (C-5'), 100.6 (C-1), 73.7 (C-4), 71.9 (C-3), 71.2 (C-5), 69.2 (C-1'), 61.7 (C-6), 54.8 (C-2), 29.7 (C-3'), 28.4 (C-2'), 24.4 (C(O)CH₃), 21.7 (C(O)CH₃) ppm.

5.2.17 *n*-Pentenyl-2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-O-acetyl-6-O-(*N*-13'-(Fluorenyl-methoxycarbamoyl)-4',7',10'-trioxa-tridecancarbamoyl)-β-D-glucopyranosid (**106**)



335 mg (0.622 mmol, 1.1 eq) des Aktivcarbonats **105** wurden in 3 mL DCM gelöst. 250 mg (0.565 mmol, 1.0 eq) des einfach Fmoc-geschützten Diamins **104** wurden in 3 mL DCM vorgelöst und über ein Septum langsam zur Zuckerlösung getropft. Schließlich wurden noch 93 µL (0.565 mmol, 1.0 eq) DIPEA zur Reaktionslösung zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum reinigte man das erhaltene Rohprodukt mittels FC in DCM/MeOH = 8:1 auf. Man erhielt 400 mg (0.475 mmol, 84 %) des Pentenylglycosids **106** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.53$ (EE/MeOH = 95:5)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (d, $J = 6.0$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{4,5}H), 7.60 (d, $J = 6.0$, 2 H; Fmoc-C^{1,8}H), 7.40 (t, $J = 6.0$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{2,7}H) 7.31 (t, $J = 6.0$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{3,6}H), 5.80-5.73 (m, 1 H; H-4'), 5.51 (br, 1 H; NH), 5.38 (br, 1 H; NH), 5.24 (t, $J = 9.5$ Hz, 1 H; H-3), 5.05-4.92 (m, 3 H; H-4, H-5'), 4.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H; H-1), 4.39 (d, $J =$

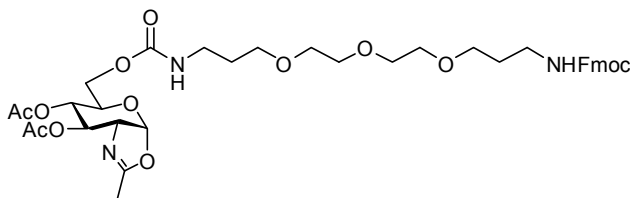
6.5 Hz, 2 H; Fmoc-C¹⁰H₂), 4.24-4.18 (m, 2 H; H-6a, Fmoc-C⁹H), 4.15-4.09 (m, 1 H; H-6b), 3.89-3.79 (m, 2 H; H-2, H-1'), 3.66-3.40 (m, 13 H; H-5, 6 x CH₂), 3.34-3.20 (m, 4 H; NHCH₂), 2.07-2.03 (m, 2 H; H-3'), 2.02-1.98 (m, 6 H; 2 x C(O)CH₃), 1.92 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.82-1.70 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O), 1.68-1.55 (2 H; H-2') ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 170.9 (C(O)CH₃), 170.2 (C(O)CH₃), 169.3 (C(O)CH₃), 156.5 (OC(O)NH), 156.0 (OC(O)NH), 144.0, 141.3 (arom. C), 137.9 (C-4'), 127.6, 127.0, 125.0, 119.9 (arom. C), 114.9 (C-5'), 100.8 (C-1), 72.6 (C-3), 72.1 (C-5), 70.5 (OCH₂CH₂O), 69.3 (C-1'), 68.4 (C-4), 66.3 (Fmoc-C¹⁰), 62.4 (C-6), 54.6 (C-2), 47.3 (Fmoc-C⁹), 39.0 (HNCH₂CH₂CH₂O), 29.9 (C-3'), 29.3 (HNCH₂CH₂CH₂O), 28.6 (C-2'), 23.2 (HNC(O)CH₃), 20.6 (OC(O)CH₃)ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+Na]⁺ berechnet: 864.4, gefunden: 864.6; m/z [M+K]⁺ berechnet: 880.4, gefunden: 880.6

Elementaranalyse, berechnet für C₄₃H₅₉N₃O₁₄: C 61.34, H 7.06, N 4.99, gefunden: C 61.05, H 6.99, N 5.03.

5.2.18 2-Methyl-(3,4-di-O-acetyl-6-O-(N-13-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-4',7',10'-trioxa-tridecancarbamoyl)-1,2-dideoxy-β-D-glucopyrano)-[2,1-d]-oxazolin (107)



$C_{38}H_{49}N_3O_{13}$

755.81 g/mol

Es wurden 243 mg (0.289 mmol, 1 eq) des Pentenylglycosids **106** unter Stickstoffatmosphäre in 15 mL DCM gelöst und mit 73 mg (0.329 mmol, 1.14 eq) NIS versetzt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hatte, wurden langsam 25 µl Et_3SiOTf (87 mmol, 0.3 eq) zugetropft. Dabei konnte eine starke Gelbfärbung beobachtet werden. Nach etwa 10 Minuten färbte sich die Reaktionsmischung rötlich. Die Reaktion wurde nach 50 Minuten durch Zugabe von 20 mL CH_2Cl_2 gequencht. Es wurde mit je 15 mL 10%iger $Na_2S_2O_4$ -Lösung, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit DCM/MeOH = 9:1 erhielt man 140 mg (64 %) **107** als ein viskoses Öl.

DC: $R_f = 0.42$ (Laufmittel: EE/MeOH = 95:5)

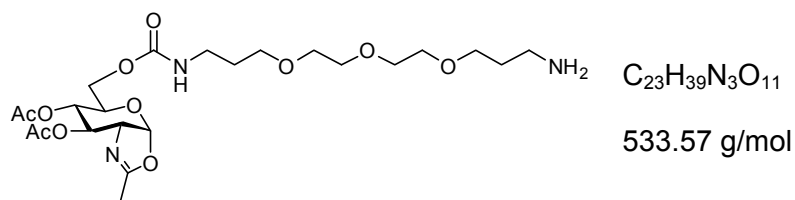
1H -NMR (600.1 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.74$ (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{4,5}H), 7.59 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{1,8}H), 7.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{2,7}H), 7.29 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H; Fmoc-C^{3,6}H), 5.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H; H-1), 5.52-5.33 (m, 2 H; NH), 5.31-5.14 (m, 1 H; H-3), 5.09-4.84 (m, 1 H; H-4), 4.47-4.35 (m, 2 H; Fmoc-C¹⁰H₂), 4.30-3.97 (m, 4 H; H-2, H-6, Fmoc-C⁹H), 3.77-3.45 (m, 13 H; H-5, 6 x CH₂), 3.35-3.25 (m, 4 H; NHCH₂), 2.10 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.08 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H; Me), 1.82-1.66 (m, 4 H; HNCH₂CH₂CH₂O) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.4$ ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.5 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 169.7 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 156.9 ($\text{O}\underline{\text{C}}(\text{O})\text{NH}$), 156.3 ($\text{O}\underline{\text{C}}(\text{O})\text{NH}$), 144.1 , 144.0 , 141.4 (arom. C), 127.8 , 127.1 , 125.1 , 120.0 (arom. C), 99.4 (C-1), 70.5 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.4 (C-3), 70.1 , 70.0 , 69.5 ($3 \times \text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.3 ($\text{HNCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 68.7 (C-4), 67.9 ($\text{HNCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 66.5 (Fmoc- C^{10}), 63.0 (C-6), 47.4 (Fmoc- C^9), 39.2 , 38.9 ($2 \times \text{HN}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 29.4 , 29.2 ($2 \times \text{HNCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$), 23.2 ($\text{HNC}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.8 , 20.7 ($2 \times \text{OC}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+\text{H}$] $^+$ berechnet: 756.3, gefunden: 756.2; m/z [$M+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 778.3, gefunden: 778.2; m/z [$M+\text{K}$] $^+$ berechnet: 794.3, gefunden: 794.2

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{13}$: C 60.39, H 6.53, N 5.56, gefunden: C 60.51, H 6.72, N 5.77.

5.2.19 2-Methyl-(3,4-di-O-acetyl-6-O-(4'',7'',10''-trioxa-tridecancarbamoyl)-1,2-dideoxy- β -D-glucopyrano)-[2,1-d]-oxazolin (108)



Es wurden 10 mg (0.013 mmol, 1 eq) des Oxazolins **107** unter Stickstoffatmosphäre in 130 μl DMF/Morpholin = 9:1 gelöst und bei RT gerührt. Die Entschützung war nach 2 h vollständig. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 6.8 mg (0.013 mmol) **108** als farbloses Öl.

DC: $R_f = 0.13$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1)

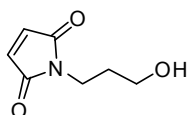
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.92$ (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H; H-1), 5.62 - 5.44 (m, 3 H; NH, NH_2), 5.31 - 5.21 (m, 1 H; H-3), 5.05 - 4.95 (m, 1 H; H-4), 4.30 - 3.97 (m, 3 H; H-2, H-6), 3.67 - 3.55 (m, 13 H; H-5, $6 \times \text{CH}_2$), 3.52 - 3.12 (m, 4 H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}_2$, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.01 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.99 (s, 3 H; $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.92 (s, 3 H; Me), 1.81 - 1.67 (m, 4 H; $\text{HNCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.4 (C(O)CH₃), 170.5 (C(O)CH₃), 169.6 (C(O)CH₃), 156.9 (OC(O)NH), 156.3 (OC(O)NH), 99.5 (C-1), 70.5 (OCH₂CH₂O), 70.4 (C-3), 70.1, 70.0, 69.5 (3 x OCH₂CH₂O), 69.3 (HNCH₂CH₂CH₂O), 68.7 (C-4), 67.9 (HNCH₂CH₂CH₂O), 63.0 (C-6), 39.2, 38.9 (2 x HNCH₂CH₂CH₂O), 29.4, 29.2 (2 x HNCH₂CH₂CH₂O), 23.2 (HNC(O)CH₃), 20.9, 20.8 (2 x OC(O)CH₃)ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+H]⁺ berechnet: 534.3, gefunden: 534.2; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 556.3, gefunden: 556.2; m/z [M+K]⁺ berechnet: 572.3, gefunden: 572.3

B) Chipsystem unter Anwendung der Maleinimid-Thiol-Ligation

5.2.20 N-(3-Hydroxypropyl)maleinimid (111)



C₇H₉NO₃

155.15 g/mol

Verbindung **111** wurde analog zu Keller *et al.*^[243] in 75 % Ausbeute als weißer Feststoff hergestellt.

DC: R_f = 0.38 (DCM/EE = 3:2)

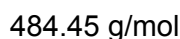
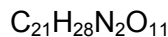
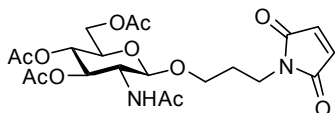
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 6.72 (s, 2 H; C(O)CH), 3.69 (t, J = 6.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂OH), 3.58 (t, J = 5.7 Hz, 2 H; NCH₂CH₂), 1.84-1.74 (m, 2 H; NCH₂CH₂CH₂OH) ppm.

¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃):

δ = 171.1 (C(O)CH), 134.2 (C(O)CH), 59.2 (CH₂CH₂OH), 34.3 (NCH₂CH₂), 31.2 (NCH₂CH₂CH₂OH) ppm.

5.2.21 Maleimidopropyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (112)



850 mg (2.58 mmol, 2 eq) des Oxazolins **4** und 347 mg (2.58 mmol, 2 eq) CuCl_2 wurden gemischt und mit Toluol coevaporiert. Der blaugrüne Rückstand wurde in 5.2 mL abs. CHCl_3 aufgenommen. Nach Zugabe von 200 mg (1.29 mmol, 1 eq) Maleinimidalkohol **111** liess man die Reaktionsmischung 17 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abkühlen auf RT wurde das CHCl_3 im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in EE aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit DCM/MeOH = 9:1 erhielt man 300 mg (0.62 mmol, 48 %) **112** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.40$ (DCM/MeOH = 9:1)

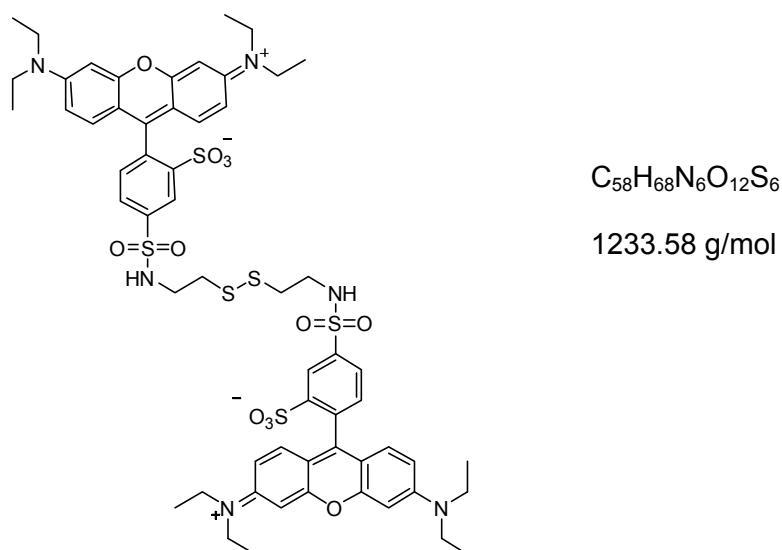
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.70$ (s, 2 H; C(O)CH), 6.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H; NH), 5.17 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.07 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H; H-4), 4.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H; H-1), 4.23 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1 H; H-6a), 4.10 (dd, $J = 12.4, 2.8$, 1 H; H-6b), 4.06-3.97 (m, 1 H; H-2), 3.96-3.90 (m, 1 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.75-3.62 (m, 2 H; H-5, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.55-3.47 (m, 1 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.23 (dt, $J = 10.1, 3.8$ Hz, 1 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.06 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.02 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.00 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.95 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.92-1.76 (m, 2 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.1$ ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 171.0 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}$), 170.8 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 170.7 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$), 169.3 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}$), 134.2 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}$), 101.2 (C-1), 73.2 (C-3), 71.9 (C-5), 68.5 (C-4), 62.3 (C-6), 62.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 54.2 (C-2), 34.2 ($(\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$), 28.2 ($\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 23.2 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.7 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.6 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z $[M+Na]^+$ berechnet: 507.3, gefunden: 507.0; m/z $[M+K]^+$ berechnet: 523.3, gefunden: 523.0.

Elementaranalyse, berechnet für $C_{21}H_{28}N_2O_{11}$: C 52.06, H 5.83, N 5.78, gefunden: C 52.42, H 5.71, N 6.03.

5.2.22 Farbstoffdisulfid **119** (Produkt der Konjugation von Lissamin **B** Sulfonylchlorid **113** mit Cystamin **118**)



Zu 30 mg (0.133 mmol, 1 eq.) des Cystamins **118** in 3 mL DMF wurden 115 μ L (0.665 mmol, 5 eq.) DIPEA hinzugegeben. 192 mg (0.333 mmol, 2.5 eq.) des Lissamins **113** wurden in 1 mL DMF gelöst und zugetropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Substanz mittels Flash-Chromatographie mit $CHCl_3/MeOH$ (9:1) aufgereinigt. Man erhielt 130 mg (0.11 mmol, 85 %) des Lissamindisulfids **119** als einen dunkelroten Feststoff.

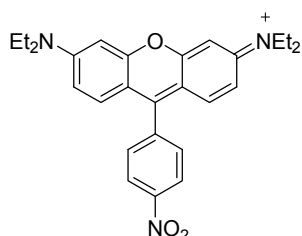
DC: $R_f = 0.26$ ($CHCl_3/MeOH = 9:1$)

¹H-NMR (250 MHz, MeOD-d₄):

δ = 8.71 (d, J = 1.8 Hz, 2 H; H-3'), 8.07 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 2 H; H-5'), 7.36 (d, J = 7.9 Hz, 2 H; H-6'), 7.17 (d, J = 9.5 Hz, 4 H; H-1, H-8), 7.01 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 4 H; H-2, H-7), 6.92 (d, J = 2.4 Hz, 4 H; H-4, H-5), 3.82-3.55 (m, 24 H; HNCH₂CH₂S, NCH₂CH₃), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 24 H; NCH₂CH₃) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [$M+H$]⁺ berechnet: 1233.3, gefunden: 1233.3; m/z [$M+Na$]⁺ berechnet: 1255.3, gefunden: 1255.3; m/z [$M+K$]⁺ berechnet: 1271.3, gefunden: 1271.3.

5.2.23 4'-Nitrososamin B (122)

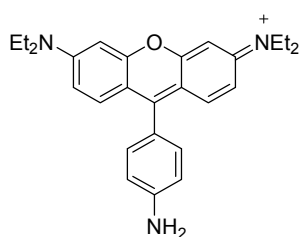


C₂₇H₃₀N₃O₃

444.54 g/mol

Verbindung **122** wurde nach einer Vorschrift von Borek *et al.*^[210] in 92 % erhalten.

5.2.24 4'-Aminorosamin B (123)

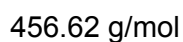
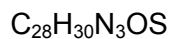
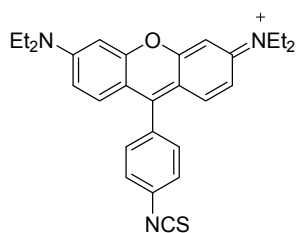


C₂₇H₃₂N₃O

414.56 g/mol

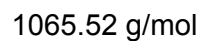
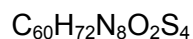
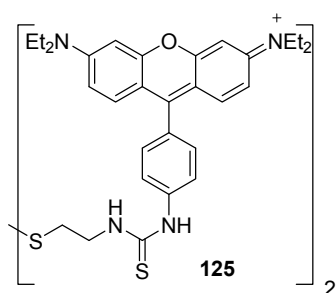
Verbindung **123** wurde ausgehend von 4'-Nitrososamin B (**122**) mit einer Methode von Sigmund *et al.*^[211] in 65 % erhalten.

5.2.25 4'-Aminorosamin B - Isothiocyanat (**124**)



Verbindung **124** wurde ausgehend von 4'-Aminorosamin B (**123**) nach einer Vorschrift von Borek *et al.*^[210] in 31 % erhalten.

5.2.26 Farbstoffdisulfid **125** (Produkt der Konjugation von 4'-Aminorosamin B - Isothiocyanat **124** mit Cystamin **118**)



Zu 21 mg (0.094 mmol, 1 eq.) des Cystamins **118** in 2 mL DMF wurden 81 μL (0.47 mmol, 5 eq.) DIPEA hinzugegeben. 107 mg (0.234 mmol, 2.5 eq.) des Rosamins **124** wurden in 1 mL DMF gelöst und zugetropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Substanz mittels Flash-Chromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) aufgereinigt. Man erhielt 44 mg (0.041 mmol, 38 %) des Rosamindisulfids **125** als einen dunkelroten Feststoff.

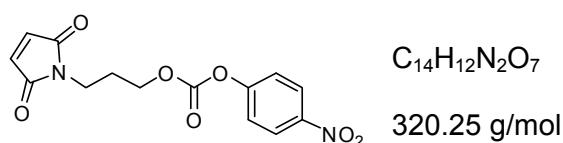
DC: $R_f = 0.34$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 7.60-7.27 (m, 8 H; H-1, H-8, H-2', H-6'), 7.02-6.10 (m, 12 H; H-2, H-4, H-5, H-7, H-3', H-5'), 3.73-3.15 (m, 24 H; HNCH₂CH₂S, NCH₂CH₃), 1.45-1.03 (m, 24 H; 4 x CH₃) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+H]⁺ berechnet: 1065.5, gefunden: 1065.5.

5.2.27 4-Nitrophenylmaleinimidopropylcarbonat (**127**)



300 mg (1.93 mmol, 1 eq.) des Maleinimidoalkohols **111** wurden mit 530 μ L (4.25 mmol, 2 eq.) Triethylamin in 9 mL DCM 5 min bei RT gerührt. Danach wurde eine Lösung aus 857 mg (3.87 mmol) Chloroformiat **126** (2.2 eq.), gelöst in 1 mL abs. DCM, zugetropft, woraufhin sich sofort ein weißer Niederschlag bildete. Nach 3 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen und mit 10%iger Zitronensäure und anschließend mit dest. Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden nochmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann über MgSO₄ getrocknet und nach dem Abfiltrieren bis zur Trockene eingengt. Nach Flash-Chromatographie mit PE/EE = 3:1 erhielt man 517 mg (84 %) des Aktivcarbonats **127** als einen weißen Feststoff.

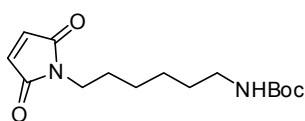
DC: R_f = 0.20 (PE/EE = 3:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.32-8.24 (m, 2 H; arom. H), 7.43-7.37 (m, 2 H; arom. H), 6.73 (s, 2 H; C(O)CH), 4.29 (t, J = 6.1 Hz, 2 H; NCH₂CH₂CH₂O), 3.71 (t, J = 6.5 Hz, 2 H; NCH₂CH₂CH₂O) 2.13-2.02 (m, 2 H; NCH₂CH₂CH₂O) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3): δ = 174.6 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}$), 164.6 (quart. arom. C), 162.9 ($\text{OC}(\underline{\text{O}})\text{O}$), 144.1 (quart. arom. C), 134.2 ($\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}$), 125.5 (arom. C), 122.1 (arom. C), 66.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 34.8 ($\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}$), 27.8 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm.

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$: C 52.51, H 3.78, N 8.75, gefunden: C 52.42, H 3.71, N 9.00.

5.2.28 *N*-(6-*N'*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminohexyl)maleinimid (**130**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$

296.36 g/mol

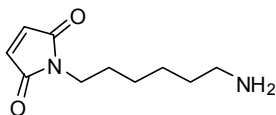
520 mg (2.4 mmol, 1.0 eq) *N*-Boc-1,6-Diaminohexan (**129**) wurden in 45 mL einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung bei 0°C gelöst. Zu dieser Lösung wurden 466 mg (3.0 mmol, 1.25 eq) *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**109**) in kleinen Portionen über 5 min zugegeben und weitere 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde noch 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nun 3 Mal mit je 45 mL CHCl_3 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 646 mg (2.18 mmol, 91 %) **130** als weissen Feststoff.

DC: $R_f = 0.51$ (DCM/EE = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ = 6.68 (s, 2 H; $\text{C}(\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.50 (br. s, 1 H; NH), 3.51 (t, $J = 5$ Hz, 2 H; NCH_2CH_2), 3.10 (q, $J = 6.5$ Hz, 2 H; BocNHCH_2) 1.70-1.53 (m, 4 H; CH_2), 1.44 (s, 9 H, *tert*-Bu), 1.37-1.22 (m, 4 H; CH_2) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 319.2, gefunden: 319.2

5.2.29 *N*-(6-aminohexyl)maleinimid (**131**)C₁₀H₁₆N₂O₂

196.25 g/mol

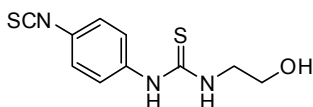
460 mg (1.55 mmol, 1.0 eq) des Boc-geschützten Maleinimids **130** wurden in 1 mL DCM gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden langsam 2.3 mL TFA zugetropft und 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man 260 mg (1.32 mmol, 85 %) **131** als gelben Sirup.

DC: $R_f = 0.26$ (DCM/MeOH = 9:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.68$ (s, 2 H; C(O)CH), 6.20 (br s, 2 H; NH₂), 3.49 (t, J = 7.5 Hz, 2 H; NCH₂CH₂), 2.97 (br, 2 H; CH₂NH₂), 1.75-1.20 (m, 8 H; CH₂) ppm.

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.1$ (C(O)CH), 134.1 (C(O)CH), 39.9 (CH₂NH₂), 37.3 (NCH₂CH₂), 28.0, 27.0, 25.6, 25.3 (4 x CH₂) ppm.

MALDI-MS (CHCA, pos. Mode): m/z [$M+H$]⁺ berechnet: 197.1, gefunden: 197.4.

5.2.30 1-(2-hydroxyethyl)-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (**142**)C₁₀H₁₁N₃OS₂

253.34 g/mol

Es wurden 192 mg (1 mmol, 6.0 eq) PDITC (**128**) in 2 mL absolutem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung aus 18 μ L (0.3 mmol, 1.0 eq) 2-Hydroxyethylamin in 2 mL absolutem DMF zugetropft. Nachdem die Reaktion 30 min bei RT gerührt wurde, war die Reaktion beendet. Nach Entfernung des Lösungsmittels

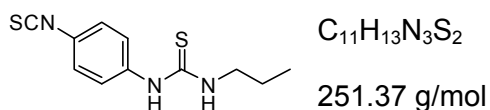
im Vakuum und anschließender säulenchromatographischer Aufarbeitung mit PE/EE = 1:2 erhielt man 52 mg (0.21 mmol, 68 %) des Thioharnstoffs **142** als weißen kristallinen Feststoff.

DC: $R_f = 0.15$ (PE/EE = 1:2)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD): $\delta = 7.50\text{-}7.15$ (m, 4 H; arom. H), 3.64 (br. s, 4 H; CH_2) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z $[M+H]^+$ berechnet: 254.0, gefunden: 253.9; m/z $[M+Na]^+$ berechnet: 276.0, gefunden: 275.9

5.2.31 1-Propyl-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (**143**)



100 mg (0.52 mmol, 3.3 eq) PDITC (**128**) wurden in 2.5 mL absolutem DMF gelöst. Dazu wurde langsam eine Lösung aus 13 μL (0.16 mmol, 1 eq) Propylamin (**136**) in 2.5 mL absolutem DMF über 20 min zugetropft. Nachdem die Reaktion 30 min bei RT gerührt wurde, war die Reaktion beendet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender säulenchromatographischer Aufarbeitung mit PE/EE = 1:1 erhielt man 39 mg (0.155 mmol, 97 %) des Thioharnstoffs **143** als weißen kristallinen Feststoff.

DC: $R_f = 0.52$ (Laufmittel: PE/EE = 1:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

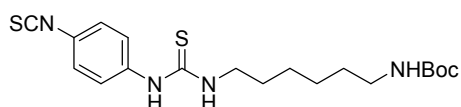
δ = 7.56 (br, 1 H; NHBoc), 7.42-7.15 (m, 4 H; arom. H), 5.96 (br. s, 1 H; NH), 3.65-3.52 (m, 2 H; NHCH₂CH₂), 1.70-1.53 (m, 2 H; NHCH₂CH₂), 1.60-1.25 (t, J = 7.6 Hz, 3 H; CH₃) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 180.4 (NHC(S)NH), 137.1 (NCS), 135.2 (quart. arom. C), 129.9 (quart. arom. C), 126.9 (arom. C), 125.9 (arom. C), 47.2 (C(S)NHCH₂CH₂CH₃), 22.2 (C(S)NHCH₂CH₂CH₃), 11.4 (C(S)NHCH₂CH₂CH₃) ppm.

ESI-MS (neg. Mode): m/z [M-H]⁻ berechnet: 250.1, gefunden: 249.8

5.2.32 1-(6-N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminohexyl)-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (**144**)



C₁₉H₂₈N₄O₂S₂

408.58 g/mol

100 mg (0.52 mmol, 4 eq) PDITC (**128**) wurden in 2 mL absolutem DMF gelöst. Dazu wurde langsam eine Lösung aus 28 mg (0.13 mmol, 1 eq) **129** in 2 mL absolutem DMF über 20 min zugetropft. Nachdem die Reaktion 30 min bei RT gerührt wurde, war die Reaktion beendet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender säulenchromatographischer Aufarbeitung mit PE/EE = 1:1 erhielt man 24 mg (0.06 mmol, 46 %) des Thioharnstoffs **144** als weißen kristallinen Feststoff.

DC: $R_f = 0.40$ (PE/EE = 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

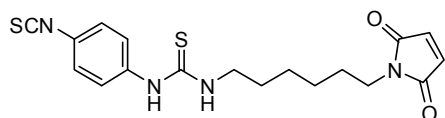
δ = 8.38 (br. s, 1 H; NHBoc), 7.27-7.19 (m, 4 H; arom. H), 6.44 (br. s, 1 H; NH), 4.66 (br. s, 1 H; NH), 3.58 (m, 2 H; NHCH₂CH₂), 3.07 (m, 2 H; BocNHCH₂CH₂), 1.60-1.25 (m, 17 H; CH₂, *tert*-Butyl) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 180.6 (NHC(S)NH), 156.3 (NHC(O)O), 136.5 (NCS), 136.0 (quart. arom. C), 129.1 (quart. arom. C), 126.9 (arom. C), 125.5 (arom. C), 79.3 (C(CH₃)₃), 44.5 (NHC(S)NHCH₂), 40.0 (CH₂NHC(O)O), 29.8 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.4 (C(CH₃)₃), 26.0 (CH₂), 25.8 (CH₂) ppm.

ESI-MS (pos. Modus): m/z [M+Na]⁺ berechnet: 431.2, gefunden: 430.9; m/z [M+K]⁺ berechnet: 447.2, gefunden: 446.9

5.2.33 1-(*N*-(6-aminohexyl)maleinimid)-3-(4-isothiocyanatophenyl)thioharnstoff (145)



C₁₈H₂₀N₄O₂S₂

388.51 g/mol

Es wurden 490 mg (2.55 mmol, 5.0 eq) PDITC (**128**) in 5 mL absolutem DMF in einem 50 mL-Kolben vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung aus 100 mg (0.51 mmol, 1.0 eq) *N*-(6-aminohexyl)maleinimid (**131**) in 5 mL absolutem DMF zugetropft. Nachdem die Reaktion 30 min bei RT gerührt wurde, war die Reaktion beendet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender säulenchromatographischer Aufarbeitung mit PE/EE = 1:2 erhielt man 28 mg (0.07 mmol, 14 %) des Thioharnstoffs **145** als weißen kristallinen Feststoff.

DC: R_f = 0.22 (PE/EE = 2:1)

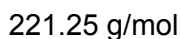
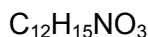
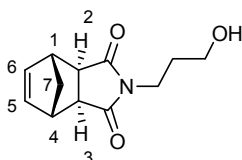
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ = 7.75 (br. s, 1 H; NH), 7.30-7.20 (m, 4 H; arom. H), 6.05 (br. s, 1 H; NH), 6.68 (s, 2 H; C(O)CH), 3.64-3.47 (m, 4 H; C(S)NHCH₂, CH₂N), 1.61-1.25 (m, 8 H; CH₂) ppm.

ESI-MS (neg. Mode): m/z $[M-H]^-$ berechnet: 387.1, gefunden: 387.0

C) Chipsystem unter Anwendung der DARinv

5.2.34 *Cis*-5-Norbornen-*exo*-2,3-*N*-(3-hydroxypropyl)dicarboximid oder *N*-(3-hydroxypropyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-*exo*-2,3-dicarboximid (149**)**



200 mg (1.22 mmol, 1.0 eq) *cis*-5-Norbornen-*exo*-2,3-dicarbonsäureanhydrid **148** wurden in 3 mL Pyridin vorgelegt und mit 120 μL (1.58 mmol, 1.3 eq) 3-Hydroxypropylamin **110** in 2 mL Pyridin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin 7 h lang unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung mit PE/EE = 3:1 erhielt man 267 mg (1.21 mmol, 99 %) des Norbornenalkohols **149** als farbloses Öl.

DC: $R_f = 0.37$ (Laufmittel: PE/EE = 3:1)

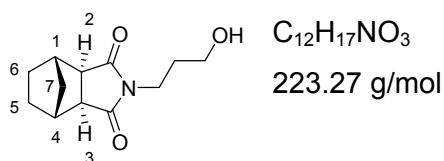
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 6.27$ (t, $J = 1.7$ Hz, 2 H; H-5, H-6), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H; NCH_2), 3.54 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H; CH_2OH), 3.25 (t, $J = 1.7$ Hz, 2 H; H-2, H-3), 2.69 (s, 2 H; H-1, H-4), 1.82 - 1.72 (m, 2 H; $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.65 (br. s, 1 H; OH), 1.54 - 1.48 (m, 1 H; H-7a), 1.24 - 1.16 (m, 1 H; H-7b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 178.7$ (C(O)N), 137.7 (C-5, C-6), 59.0 (CH_2OH), 47.8 (C-1, C-4), 45.1 (C-2, C-3), 42.7 (C-7), 35.0 (NCH_2), 30.6 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 244.1, gefunden: 243.9

5.2.35 N-(3-hydroxypropyl)-norbornan-exo-2,3-dicarboximid (159)

210 mg (0.95 mmol, 1 eq) des Norbornenalkohols **149** wurden in 10 mL EE gelöst und mit 190 mg Pd/C (10 %) versetzt. Die Apparatur wurde mit H_2 gespült und die Reaktionslösung 3 h lang in der Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde daraufhin über Kieselgur abfiltriert. Nach mehrmaligem Spülen mit EE wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 151 mg (67 mmol, 71 %) des Alkohols **159** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.53$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1)

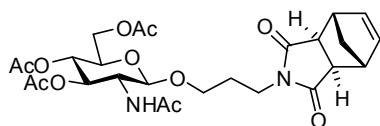
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 3.63$ (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H; NCH_2), 3.52 (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H; CH_2OH), 2.73 - 2.67 (m, 2 H; H-2, H-3), 2.63 (d, $J = 1.2$ Hz, 2 H;), 2.42 (br, 1 H; OH), 1.75 - 1.71 (m, 2 H; $NCH_2CH_2CH_2OH$), 1.70 - 1.63 (m, 2 H; H-1, H-4), 1.38 - 1.08 (m, 4 H; H-5, H-6) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 179.7$ ($C(O)N$), 58.9 (CH_2OH), 48.7 (C-1, C-4), 39.7 (C-2, C-3), 34.9 (NCH_2), 33.2 (C-7), 30.6 ($NCH_2CH_2CH_2OH$), 28.0 (C-5, C-6) ppm.

5.2.36 (N-(3-hydroxypropyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-exo-2,3-dicarboximidyl)-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (150)



$C_{26}H_{34}N_2O_{11}$

550.56 g/mol

Oxazolin **4** (112 mg, 0.34 mmol, 1.5 eq.) und $CuCl_2$ (45 mg, 0.34 mmol, 1.5 eq) wurden zu einem Ansatz vermengt, mit Toluol überspült und am Rotationsverdampfer evaporiert. Vor Start der Reaktion wurde der Ansatz in 1 mL abs. $CHCl_3$ aufgenommen. Schließlich gab man 50 mg Norbornenalkohol **149** (1.29 mmol, 1 eq.) hinzu und erhitzte die Reaktionsmischung auf Siedetemperatur. Man liess die Reaktion 20 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abbruch der Reaktion und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde $CHCl_3$ im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 57 mg (0.10 mmol, 45 %) **150** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.25$ (EE)

1H -NMR (400 MHz, MeOD):

$\delta = 6.33$ (s, 2 H; H-5', H-6'), 5.21 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H; H-3), 4.98 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H; H-4), 4.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H; H-1), 4.27 (dd, $J = 12.5, 4.7$ Hz, 1 H; H-6a), 4.12 (dd, $J = 12.5, 1.7$ Hz, 1 H; H-6b), 3.89-3.75 (m, 3 H; H-2, H-5, CH_2O), 3.60-3.45 (m, 3 H; NCH_2, CH_2O), 3.18 (s, 2 H; H-2', H-3'), 2.73 (s, 2 H; H-1', H-4'), 2.06 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 2.00 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.98 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.93 (s, 3 H; $C(O)CH_3$), 1.86-1.76 (m, 2 H; $NCH_2CH_2CH_2OH$), 1.49 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H; H-7'a), 1.21 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H; H-7'b) ppm.

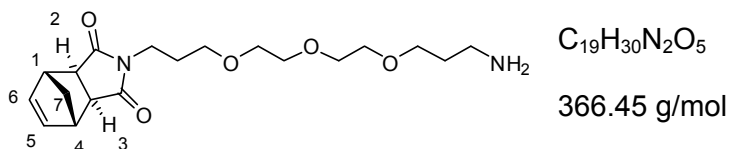
$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD):

δ = 180.2 (C(O)N), 173.7 (C(O)CH₃), 172.5 (C(O)CH₃), 172.0 (C(O)CH₃), 171.4 (C(O)CH₃), 139.1 (C-5', C-6'), 102.2 (C-1), 74.4 (C-3), 73.1 (C-5), 70.3 (C-4), 68.6 (CH₂O), 63.4 (C-6), 55.6 (C-2), 49.4 (C-2', C-3'), 46.5 (C-1', C-4'), 43.7 (C-7'), 37.0 (NCH₂), 29.1 (NCH₂CH₂CH₂OH), 23.0 (C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+H$]⁺ berechnet: 254.0, gefunden: 253.9; m/z [$M+Na$]⁺ berechnet: 276.0, gefunden: 275.9

Elementaranalyse, berechnet für C₃₆H₂₄N₂O₁₁: C 56.72, H 6.22, N 5.09, gefunden: C 56.54, H 6.02, N 4.95.

5.2.37 *N*-(13-amino-4,7,10-trioxa-tridecanyl)-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-*exo*-2,3-dicarboximid (**157**)



11 mL (50.29 mmol, 8 eq) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**100**) wurden in 20 mL Pyridin vorgelegt und mit 1.032 g (6.29 mmol, 1.0 eq) *cis*-5-Norbornen-*exo*-2,3-dicarbonsäureanhydrid (**148**) in 10 mL Pyridin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin 10 h lang unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 50 mL DCM aufgenommen und 8 Mal mit je 50 mL Wasser extrahiert. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 1.495 g (4.09 mmol, 65 %) des Norbornenamins **157** als gelbliches Öl.

DC: R_f = 0.32 (EE/MeOH = 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

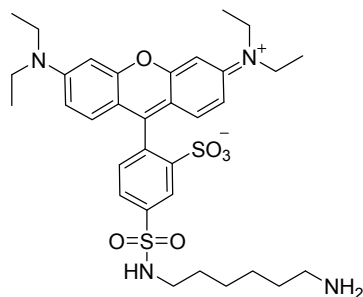
δ = 6.33 (t, J = 1.7 Hz, 2 H; H-5, H-6), 3.67-3.52 (m, 12 H; 6 x CH₂), 3.48 (t, J = 6.0 Hz, 2 H; NCH₂), 3.18 (t, J = 1.7 Hz, 2 H; H-2, H-3), 2.85 (t, J = 6.8 Hz, 2 H; CH₂NH₂), 2.72 (d, J = 1.7 Hz, 2 H; H-1, H-4), 1.85-1.65 (m, 4 H; OCH₂CH₂CH₂), 1.49 (dt, J = 9.7, 1.7 Hz, 1 H; H-7a), 1.25 (d, J = 9.7 Hz, 1 H; H-7b) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

δ = 180.2 (C(O)N), 139.1 (C-5, C-6), 71.6, 71.5, 71.4, 71.3, 70.6 (5 x CH₂), 70.2 (NCH₂), 49.2 (C-1, C-4), 46.4 (C-2, C-3), 43.7 (C-7), 40.3 (CH₂NH₂), 37.4 (CH₂), 31.9, 29.1 (2 x OCH₂CH₂CH₂) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [$M+Na$]⁺ berechnet: 389.2, gefunden: 389.2; m/z [$M+K$]⁺ berechnet: 405.2, gefunden: 405.2

5.2.38 N-6-Aminohexyl-Lissamin B Sulfonamid (**152a**)



C₃₃H₄₄N₄O₆S₂

656.86 g/mol

Zu 200 mg (0.35 mmol, 1 eq) Lissamin B-Sulfonylchlorid (**113**) in 15 mL DMF wurden 90 mg (0.42 mmol, 1.2 eq) des Boc-geschützten Diamins **151** in 5 mL DMF hinzugegeben. Zu dieser Mischung tropfte man noch 140 μ L (0.84 mmol, 2.4 eq) DIPEA. Nachdem die Reaktionslösung 4 h bei RT gerührt wurde, entfernte man das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum. Nach Flash-Chromatographie in DCM/MeOH = 9:1 erhielt man 104 mg (0.14 mmol, 40 %) der Vorstufe zu zu **152a** als violetten kristallinen Feststoff, welcher in 3 mL einer Lösung aus DCM/TFA = 1:1 entschützt. Die Reaktion war laut DC-Kontrolle nach 2 h in DCM/MeOH = 9:1 beendet und man entfernte TFA und Lösungsmittel im N₂-Strom. Man erhielt 101 mg (0.154 mmol, quant.) des Farbstoffamins **152a** als roten kristallinen Feststoff.

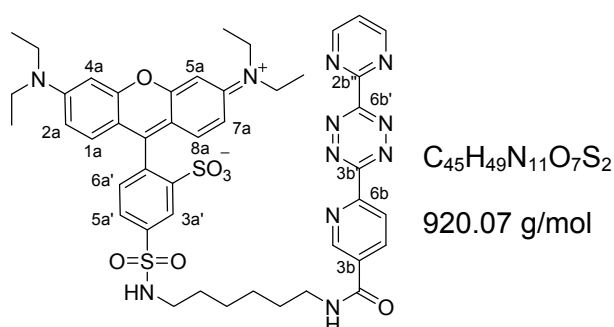
DC: $R_f = 0.07$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD):

$\delta = 8.54$ (s, 1 H; H-3'), 8.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H; H-6'), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H; H-5'), 7.20-6.94 (m, 6 H; H-1, H-2, H-4, H-5, H-7, H-8), 3.69 (q, $J = 7.3$ Hz, 8 H; 4 x CH₂), 2.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H; SO₂NHCH₂), 2.72 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H; NH₂CH₂), 1.49-1.11 (m, 18 H; 3 x CH₂, 4 x CH₃) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+H]⁺ berechnet: 657.3, gefunden: 657.3

5.2.39 Lissamin B – Tetrazinkonjugat 154



40 mg (0.14 mmol, 1 eq) 6-(6-(Pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nicotinsäure wurden zusammen mit 33 mg (0.21 mmol, 1.5 eq) EDC·HCl und 24 mg (0.21 mmol, 1.5 eq) NHS in 1.5 mL DMSO suspendiert. Nach Zugabe von 75 μL Pyridin wurde die Reaktionsmischung auf 50° C erhitzt. Nach 1.5 h hatte sich das Edukt zu 95 % zum NHS-Ester **153** umgesetzt. 80 mg (0.12 mmol, 0.86 eq) des Farbstoffs cr-426 wurden in 0.5 mL DMSO gelöst und zur Reaktionsmischung zugetropft. Nach der weiteren Zugabe von 20 μL DIPEA war die Reaktion zum Tetrazin-Farbstoffkonjugat nach 20 min laut DC beendet. DMSO wurde am Stickstoffrotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 10 mL DCM aufgenommen und mit je 10 mL H₂O, Acetatpuffer (pH = 4) und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden

daraufhin noch einmal mit DCM gegengewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Man erhielt 43 mg (0.048 mmol, 40%) des Tetrazinderivats **154** als dunkelrote Kristalle.

DC: $R_f = 0.27$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):

$\delta = 9.26\text{-}9.22$ (m, 3 H; H-2b, H-4b'', H-6b''), 8.82 (t, $J = 5.6$ Hz, 1 H; NH), 8.64 (dd, $J = 8.3, 3.0$ Hz, 1 H; H-5b), 8.48-8.41 (m, 2 H; H-3a', H-4b), 8.05-7.92 (m, 2 H; NH, H-6a'), 7.87 (t, $J = 4.8$ Hz, 1 H; H-5b''), 7.56-7.45 (m, 1 H; H-5a'), 7.24-6.90 (m, 6 H; H-1a, H-2a, H-4a, H-5a, H-7a, H-8a), 3.82-3.53 (m, 8 H; 4 x CH_2), 3.10-2.83 (m, 4 H; $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$, SO_2NHCH_2), 1.62-1.11 (m, 20 H; 4 x CH_2 , 4 x CH_3) ppm.

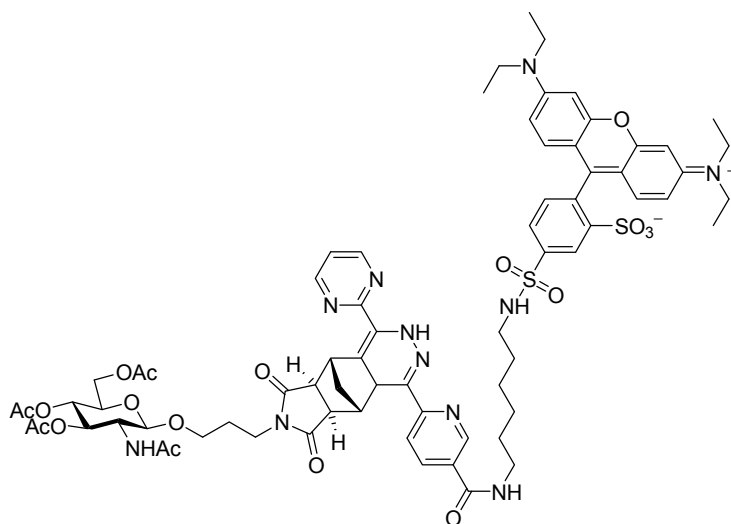
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6):

$\delta = 162.8, 162.4, 160.1, 159.0, 158.7, 158.5, 154.5$ (quat. C), 158.5 (C-4b'' und C-6b''), 151.7 (quat. C), 151.4 (C-2b), 140.5, 140.3 (aromat. C), 136.9 (C-4b), 132.6 (aromat. C), 130.8 (C-5a'), 126.7 (C-6a'), 126.6 (C-3a'), 124.7 (C-5b), 123.0 (C-5b''), 122.2 (aromat. C), 114.0 (aromat. C), 109.4 (aromat. C), 95.5 (aromat. C), 46.0 (NCH_2CH_3), 45.5 (NCH_2CH_3), 43.0 (SO_2NHCH_2), 39.7 ($\text{CH}_2\text{NHC(O)}$), 29.4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 26.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 12.7 (NCH_2CH_3) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 942.3, gefunden: 942.6

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{O}_7\text{S}_2$: C 58.74, H 5.37, N 16.75, gefunden: C 58.99, H 5.49, N 16.33.

5.2.40 DARinv-Ligationsprodukt des Tetrazins **154** mit dem Norbornenglycosid **150** (**155**)

 $C_{71}H_{83}N_{11}O_{18}$

1442.61 g/mol

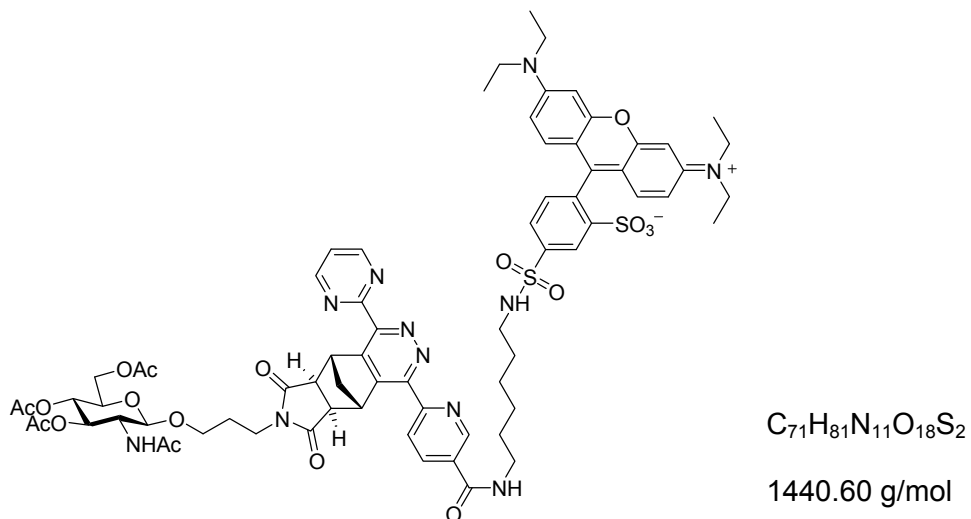
8 mg (8.7 μ mol, 1 eq) des Tetrazins **154** wurden mit 5 mg (9.1 μ mol, 1.05 eq) des Norbornenglycosids **150** bei RT in 100 μ L MeOH umgesetzt. Die Reaktion war nach 40 min vollständig abgelaufen. Anschliessende HPLC-Aufreinigung ergab drei Fraktionen, die den 3 Isomeren des gewünschten Produkts **155** entsprechen.

DC: $R_f = 0.32$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 8:1)

HPLC: $t_R = 4.9, 6.9$ und 9.0 min (4 mm, 0.9 mL/min, 55-100 % B in 20 min)

ESI-MS (pos. Mode): $m/z [M+H]^+$ berechnet: 1442.5, gefunden: 1443.8; $m/z [M+Na]^+$ berechnet: 1464.5, gefunden: 1465.7; $m/z [M+K]^+$ berechnet: 1480.5, gefunden: 1481.7

5.2.41 Pyridazin nach Oxidation des Ligationsprodukts **155** (**156**)

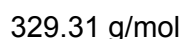
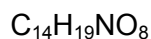
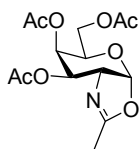


12.6 mg (8.7 μ mol) **155** wurden in 2 mL MeOH/AcOH = 1:1 gelöst und mit 1.3 μ l Isopentylnitrit (1.1 eq, 9.6 μ mol) versetzt. Nach einer Stunde war die Reaktion beendet. HPLC-Aufreinigung ergab einen Hauptpeak, der dem oxidierten Produkt **156** entspricht.

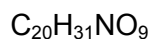
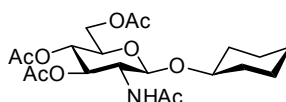
DC: $R_f = 0.32$ (Laufmittel: DCM/MeOH = 8:1)

HPLC: $t_R = 6.9$ min (4 mm, 0.9 mL/min, 55-100% B in 20 min)

ESI-MS (pos. Mode): m/z $[M+H]^+$ berechnet: 1440.5, gefunden: 1441.6; m/z $[M+Na]^+$ berechnet: 1462.5, gefunden: 1463.6; m/z $[M+K]^+$ berechnet: 1478.5, gefunden: 1479.5

5.2.42 2-Methyl-(3,4,6-tri-O-acetyl-1,2-didesoxy- α -D-galactopyrano)-[2,1-d]-oxazolin (176)

Verbindung **176** wurde nach einer Vorschrift von Wu *et al.* ^[219] in einer Ausbeute von 85 % erhalten.

5.2.43 Cyclohexyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (55)^[89]

Oxazolin **4** (462 mg, 1.33 mmol) und CuCl_2 (180 mg, 1.33 mmol) wurden gemischt und mit Toluol coevaporiert. Der blaugrüne Rückstand wurde in 3 mL abs. CHCl_3 aufgenommen. Nach Zugabe von 568 μL Cyclohexanol (534 mg, 5.32 mmol) liess man die Reaktionsmischung 5 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das CHCl_3 im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE/Hexan = 3:1 erhielt man 450 mg (80 %) **55** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.35$ (EE/Hexan = 3:1)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

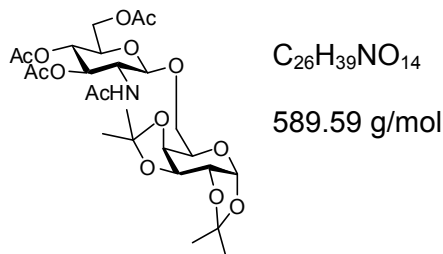
δ = 5.47 (d, J = 8.4 Hz, 1 H; NH), 5.39 (dd, J = 10.2, 9.6 Hz, 1 H; H-3), 5.03 (t, J = 9.6 Hz, 1 H; H-4), 4.86 (d, J = 8.4 Hz, 1 H; H-1), 4.25 (dd, J = 12.0, 5.4 Hz, 1 H; H-6a), 4.10 (dd, J = 12.0, 2.4 Hz, 1 H; H-6b), 3.70-3.59 (m, 3 H; H-2, H-5, OCH), 2.06 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.02 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.01 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.93 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.0-1.0 (m, 10 H; (CH₂)₅) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ = 170.8 (C(O)CH₃), 170.7 (C(O)CH₃), 170.1 (C(O)CH₃), 169.5 (C(O)CH₃), 98.9 (C-1), 77.8 (OCH), 72.2 (C-3), 71.6 (C-5), 69.0 (C-4), 62.4 (C-6), 55.6 (C-2), 33.3, 31.7, 25.5, 23.9, 23.7 [(CH₂)₅], 23.4, 20.6, 2 x 20.5 (4 C(O)CH₃) ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [M+H]⁺ berechnet: 430.2, gefunden: 430.3; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 453.2, gefunden: 453.4; m/z [M+K]⁺ berechnet: 468.2, gefunden: 468.4.

Elementaranalyse, berechnet für C₂₀H₃₁NO₉: C 55.93, H 7.28, N 3.26, gefunden: C 55.99, H 7.49, N 3.23.

5.2.44 6-O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose^[244,245] (47**)**

(a) präparativer Ansatz:

380 mg (1.15 mmol) des Oxazolins **4** wurden zusammen mit 200 mg (0.77 mmol) Diacetongalactose **46** mit abs. $CHCl_3$ in einen Kolben gespült. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 170 mg (1.15 mmol) $CuCl_2$ hinzugefügt. Diese Reaktionsmischung wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Dabei färbte sich die Lösung tiefblau. Der Ansatz wurde daraufhin in 2.5 mL abs. $CHCl_3$ gelöst und 24 h bei einer Ölbadtemperatur von 75 °C refluxiert. Dann wurde die Reaktionsmischung nach Entfernen von $CHCl_3$ am Rotationsverdampfer in 30 mL EE aufgenommen und mit 1 N HCl, ges. $NaHCO_3$ -Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt 307 mg (68 %) **47** als einen weißen Feststoff.

(b) DC/HPLC-Ansätze:

715 mg (2.17 mmol) Oxazolin **4** wurde zweimal mit Toluol coevaporiert und anschließend über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur Herstellung einer 1 M Stammlösung wurde **4** in 2.17 mL abs. $CHCl_3$ gelöst. Analog wurden 630 mg (2.42 mmol) Diacetongalactose **46** zweimal mit Toluol coevaporiert und anschließend über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur Herstellung einer 0.667 M Stammlösung wurde **46** in 3.63 mL abs. $CHCl_3$ gelöst.

In jeden Reaktionskolben wurden zunächst 20 mg (0.15 mmol) $CuCl_2$ eingewogen. Bei festen Additiven wurden diese nun äquimolar zu $CuCl_2$ dazugegeben. Über ein Septum wurden jeweils 150 μ l von jeder Stammlösung zugetropft. Schließlich folgte die Zugabe der flüssigen Additive. Die Reaktionslösung wurde 5 h lang bei 55 °C gerührt. DC-

Kontrollen der Reaktion in EE/MeOH (95:5) erfolgten jeweils nach 1 h, 3 h und 5 h. Nach 5 h wurde die Lösung auf RT abgekühlt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 500 μl MeOH aufgenommen. Durch Filtration entfernte man ungelöste Bestandteile. Von dieser Lösung wurden 50 μl in die HPLC eingespritzt. In manchen Fällen war es nötig, die Lösung noch einmal mit einem Faktor 10 zu verdünnen.

DC: $R_f = 0.44$ (EE/MeOH = 95:5)

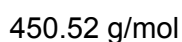
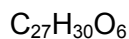
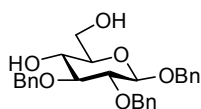
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.53$ (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H; H-1), 5.16-5.08 (m, 2 H; H-3', H-4'), 4.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H; H-1'), 4.57 (dd, $J = 7.8, 2.3$ Hz, 1 H; H-3), 4.31 (dd, $J = 5.3, 2.5$ Hz, 1 H; H-2), 4.27 (dd, $J = 12.3, 4.5$ Hz, 1 H; H-6a'), 4.12 (dd, $J = 7.8, 2.0$ Hz, 1 H; H-4), 4.11 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1 H; H-6b'), 4.00-3.91 (m, 2 H; H-2', H-5'), 3.96 (dd, $J = 12.8, 2.5$ Hz, 1 H; H-6a), 3.80-3.63 (m, 2 H; H-5, H-6b), 2.08, 2.02, 2.01 und 1.95 (4 s, 12 H; 4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 1.50, 1.44 und 1.31 (3 s, 12 H; 2 CH_3C) ppm.

HPLC: $t_R = 12.2$ min (4 mm, 0.9 mL/min, 20-80% B in 30 min)

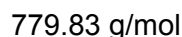
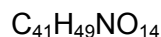
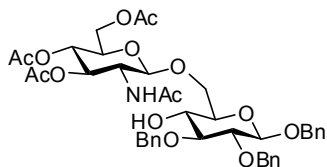
ESI-MS (pos. Mode, MeOH): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 590.2, gefunden: 590.0; m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 612.2, gefunden: 612.0; m/z $[\text{M}+\text{K}]^+$ berechnet: 628.2, gefunden: 628.0.

5.2.45 Benzyl-2,3-di-O-benzyl- β -D-glucopyranosid (172)



Verbindung **172** wurde nach einer Vorschrift von Bazin *et al.*^[246] in 85 % erhalten.

5.2.46 Benzyl-6-O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2,3-di-O-benzyl- β -D-glucopyranosid (**173**)



76 mg (0.23 mmol, 1.5 eq) des Oxazolins **4** wurden zusammen mit 70 mg (0.16 mmol, 1 eq) des Tribenzylglycosids **172** mit abs. CHCl_3 in einen Kolben gespült. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 31 mg (0.23 mmol, 1.5 eq) CuCl_2 hinzugefügt. Diese Reaktionsmischung wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Dabei färbte sich die Lösung tiefblau. Der Ansatz wurde daraufhin in 460 μl abs. CHCl_3 gelöst und 48 h bei einer Ölbadtemperatur von 75 °C refluxiert. Dann wurde die Reaktionsmischung nach Entfernen von CHCl_3 am Rotationsverdampfer in 10 mL EE aufgenommen und mit 1 N HCl, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit PE/EE = 1:2 erhielt man 41 mg (0.053 mmol) **173** als weißen, kristallinen Feststoff. Zudem konnten 24 mg des Edukts **172** zurückgewonnen werden. Dies entspricht einer umsatzkorrigierten Ausbeute von 50 %.

DC: $R_f = 0.14$ (PE/EE = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

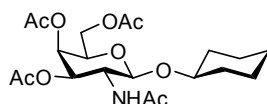
$\delta = 7.42 - 7.22$ (m, 15 H; PhH), 5.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H; NH), 5.29 (t, $J = 9.8$ Hz, 1 H; H-3'), 5.05 (t, $J = 9.8$ Hz, 1 H; H-4'), 4.98 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H; PhCHH), 4.85-4.77 (m, 3 H; PhCHH), 4.69 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H;), 4.63 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H; PhCHH), 4.54 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H;), 4.53 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H; PhCHH), 4.24 (dd, $J = 12.3, 4.7$ Hz, 1 H; H-6a), 4.14 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 1 H; H-6b), 4.00 (dd, $J = 11.0, 1.9$ Hz, 1 H; H-6'b), 3.89-3.67 (m, 5 H;), 3.54 (t, $J = 9.3$ Hz, 1 H;), 3.47 (dd, $J = 9.5, 3.6$ Hz, 1 H;), 2.44 (br s, 2 H;), 2.06 (s, 3 H; OAc), 2.03 (s, 3 H; OAc), 2.02 (s, 3 H; OAc), 1.90 (s, 3 H; NHAc) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 170.7\text{-}169.4$ (4 x $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), $139.0\text{-}127.6$ (arom. C), 101.1 (C-1'), 95.6 (C-1), 81.3 , 79.5 , 75.3 , 72.7 , 72.3 , 72.0 , 70.4 , 69.8 (C-5), 69.1 (C-5'), 68.6 (C-4'), 68.2 (C-6), 62.0 (C-6'), 54.8 (C-2'), 23.3 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.7 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.6 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 20.6 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z $[M+\text{Na}]^+$ berechnet: 802.3, gefunden: 802.1; m/z $[M+\text{K}]^+$ berechnet: 818.3, gefunden: 818.1.

5.2.47 Cyclohexyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (179)



$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_9$

429.46 g/mol

Oxazolin **178** (145 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) und CuCl_2 (59 mg, 0.44 mmol, 1 eq) wurden zu einem Ansatz vermengt, mit Toluol überspült und am Rotationsverdampfer evaporiert. Vor Start der Reaktion wurde der Ansatz in 0.9 mL abs. CHCl_3 aufgenommen. Schließlich gab man 188 μL Cyclohexanol **166** (176 mg, 1.76 mmol, 4 eq.) hinzu und erhitzte die Reaktionsmischung auf Siedetemperatur. Man liess die Reaktion 2 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abbruch der Reaktion und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde CHCl_3 im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 116 mg (0.27 mmol, 61 %) **179** als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.34$ (EE)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 7.78 (d, J = 9.3 Hz, 1 H; NH), 5.20 (d, J = 3.3 Hz, 1 H; H-4), 4.99 (dd, J = 11.2, 3.3 Hz, 1 H; H-3), 4.60 (d, J = 8.4 Hz, 1 H; H-1), 4.09-3.95 (m, 3 H; H-2, H-6), 3.85-3.73 (m, 1 H; H-5), 3.61-3.49 (m, 1 H; OCH), 3.31 (s, 2 H;), 2.11 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.99 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.89 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.76 (s, 3 H; C(O)CH₃), 1.74-1.10 (m, 10 H; (CH₂)₅) ppm.

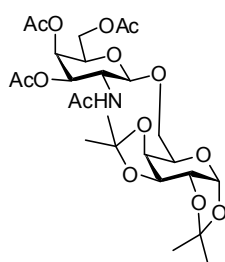
¹³C-NMR (100.0 MHz, DMSO-d₆):

δ = 170.0 (C(O)CH₃), 169.8 (C(O)CH₃), 169.6 (C(O)CH₃), 169.2 (C(O)CH₃), 99.5 (C-1), 76.3 (OCH), 70.4 (C-2), 69.7 (C-5), 66.6 (C-4), 61.3 (C-6), 49.7 (C-3), 32.8, 31.0, 25.1, 23.1, 22.8 [(CH₂)₅], 22.8 (C(O)CH₃), 22.7 (C(O)CH₃), 20.5 (C(O)CH₃), 20.4 (C(O)CH₃) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+H]⁺ berechnet: 430.2, gefunden: 430.1; m/z [M+Na]⁺ berechnet: 452.2, gefunden: 452.1; m/z [M+K]⁺ berechnet: 468.2, gefunden: 468.0.

Elementaranalyse, berechnet für C₂₀H₃₁NO₉: C 55.93, H 7.28, N 3.26, gefunden: C 55.96, H 7.34, N 3.34.

5.2.48 6-O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (180)



C₂₆H₃₉NO₁₄

589.59 g/mol

Oxazolin **178** (177 mg, 0.54 mmol, 1.3 eq.) und CuCl₂ (72 mg, 0.54 mmol, 1.3 eq) wurden zu einem Ansatz vermengt, mit Toluol überspült und am Rotationsverdampfer evaporiert. Vor Start der Reaktion wurde der Ansatz in 1.1 mL abs. CHCl₃ aufgenommen. Schließlich gab man Diacetongalactose **46** (107 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) hinzu und erhitze die Reaktionsmischung auf Siedetemperatur. Man liess die Reaktion

24 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abbruch der Reaktion und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde CHCl_3 im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 158 mg (0.27 mmol, 65 %) cr-507 als weißen Feststoff.

DC: $R_f = 0.26$ (EE)

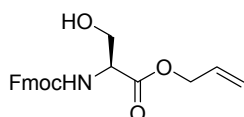
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.52$ (d, $J = 5.3$ Hz, 1 H; H-1), 5.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H; NH), 5.32 (d, $J = 3.3$ Hz, 1 H; H-4'), 5.14 (dd, $J = 10.8, 3.3$ Hz, 1 H; H-3'), 4.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H; H-1'), 4.57 (dd, $J = 7.9, 2.4$ Hz, 1 H; H-3), 4.30 (dd, $J = 5.1, 2.4$ Hz, 1 H; H-2), 4.19 - 4.08 (m, 4 H; H-2', H-4, H-6'), 4.00 - 3.93 (m, 2 H; H-5, H-6a), 3.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H; H-5'), 3.75 (dd, $J = 12.6, 9.0$ Hz, 1 H; H-6b), 2.14 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.99 (s, 3 H; C(O)CH_3), 1.96 (s, 3 H; C(O)CH_3), $1.51, 1.44$ und 1.31 (3 s, 12 H; 2 CH_3C) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.0 MHz, CDCl_3):

$\delta = 2 \times 170.5, 170.3, 170.2$ (4 C(O)CH_3), 109.3 (CH_3C), 108.6 (CH_3C), 102.1 (C-1'), 96.2 (C-1), 71.1 (C-4), 70.7 (C-3'), 2×70.6 (C-3, C-5'), 70.3 (C-2), 68.9 (C-6), 68.3 (C-5), 66.8 (C-4'), 61.4 (C-6'), 51.0 (C-2'), $26.1, 26.0, 24.9, 24.3$ (4 \times CH_3C), 23.4 (C(O)CH_3), 3×20.6 (3 C(O)CH_3) ppm.

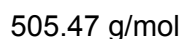
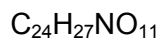
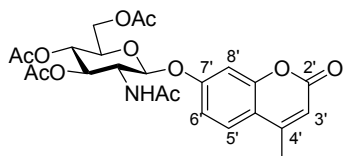
5.2.49 Fmoc-Ser-OAll (175)



$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}$

389.13 g/mol

Verbindung **175** wurde nach einer in der Diplomarbeit von D. Lennartz beschriebenen Vorschrift in 70 % erhalten.^[90]

5.2.50 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (194)

a) mittels Oxazolinmethode

Oxazolin **4** (331 mg, 1.01 mmol, 1.0 eq.) und ZnI_2 (320 mg, 1.01 mmol, 1.0 eq) wurden zu einem Ansatz vermengt, mit Toluol überspült und am Rotationsverdampfer evaporiert. Vor Start der Reaktion wurde der Ansatz in 2 mL abs. THF aufgenommen. Schließlich gab man 354 mg (2.02 mmol, 2.0 eq) 4-Methylumbelliferon **165** hinzu und erhitze die Reaktionsmischung auf Siedetemperatur. Man liess die Reaktion 5 h lang unter Rückfluss kochen. Nach Abbruch der Reaktion und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde CHCl_3 im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nun in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 1 N HCl, einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit EE erhielt man 245 mg (0.48 mmol, 48 %) **194** als weißen Feststoff. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den bereits publizierten überein.^[247]

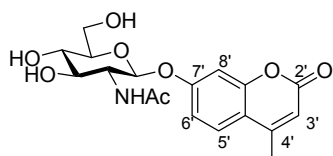
b) durch Umschützen

Zur Aktivierung wurden 10 g Zn in 20 mL 1 M HCl gerührt. Nach 10 min wurde das Zink über eine Fritte abfiltriert und mit je 20 mL H_2O und Et_2O nachgewaschen. 1.50 g (2.35 mmol, 1.0 eq) des Troc-geschützten Glycosids **191** wurden in 25 mL Ac_2O gelöst, mit dem aktivierten Zn versetzt und 27 h lang im Ultraschallbad behandelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie in EE erhielt man 646 mg (1.28 mmol, 54 %) des vollständig acetylierten Glycosids **194** als weißen Feststoff. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den bereits publizierten überein.^[247]

DC: $R_f = 0.20$ (Laufmittel: EE)

ESI-MS (pos. Mode): $m/z [M+H]^+$ berechnet: 506.2, gefunden: 506.1; $m/z [M+Na]^+$ berechnet: 528.2, gefunden: 528.0

5.2.51 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**184**)



$C_{18}H_{21}NO_8$

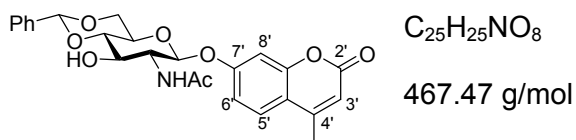
379.36 g/mol

850 mg (1.68 mmol, 1 eq) des peracetylierten Zuckers **194** wurden in 10 mL abs. Methanol gelöst. Anschließend wurden 336 μ L einer 0.5 M methanolischen Lösung an NaOMe (0.17 mmol, 0.1 eq) eingespritzt. Man ließ 2 h bei Raumtemperatur rühren. Dann wurde die Lösung mit einem sauren Ionenaustauscher (DOWEX 50 WX8) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde anschließend abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 612 mg (1.61 mmol, 96 %) **184** als weißen kristallinen Feststoff. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den bereits publizierten überein.^[234]

DC: $R_f = 0.50$ (MeCN/H₂O = 4:1)

MALDI-MS (CHCA, pos. Mode): $m/z [M+Na]^+$ berechnet: 402.1, gefunden: 402.1

5.2.52 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-O-Benzyliden- β -D-glucopyranosid (**195**)^[248]



100 mg (0.26 mmol, 1.0 eq) des entschützten Zuckers **184** wurden zusammen mit 77 mg (0.56 mmol, 2.1 eq) ZnCl₂ in 2 mL Benzaldehyd bei RT 12 h lang gerührt. Danach wurden 3 mL H₂O und 3 mL Hexan zur Reaktionslösung getropft. Der entstehende weiße Niederschlag wurde über eine Glasfritte abfiltriert und gründlich gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhielt man 114 mg (0.24 mmol, 93%) des Benzyliden-geschützten Glycosids **195** als weißen Feststoff.

DC: R_f = 0.55 (Laufmittel: EE/MeOH = 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

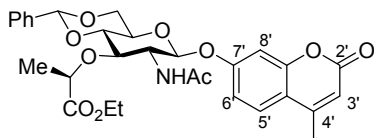
δ = 8.00 (d, J = 7.8 Hz, 1 H; NH), 7.70 (d, J = 8.8 Hz, 1 H; H-5'), 7.60-7.35 (m, 5 H; arom. H), 7.11 (d, J = 2.4 Hz, 1 H; H-8'), 6.98 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H; H-6'), 6.27 (d, J = 1.2 Hz, 1H; H-3'), 5.64 (s, 1 H; PhCH), 5.36 (d, J = 8.2 Hz, 1 H; H-1), 4.25 (d, J = 5.0 Hz, 1 H; H-6a), 3.91-3.67 (m, 4 H; H-2, H-4, H-5, H-6b), 3.55 (t, J = 8.7 Hz, 1 H; H-3), 2.40 (d, J = 1.1 Hz, 3 H; Me), 1.81 (s, 3 H; C(O)CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 169.4 (C(O)CH₃), 159.9 (C-2'), 159.7 (C-7'), 154.4 (C-4'), 153.2 (arom. C), 137.7 (arom. C), 129.2, 128.9, 128.1, 126.6, 126.4 (arom. C), 114.5 (arom. C), 113.5 (C-6'), 112.0 (C-3'), 103.2 (C-8'), 100.7 (Acetal-C), 98.6 (C-1), 80.9 (C-3), 70.1 (C-4), 67.7 (C-6), 66.0 (C-5), 56.0 (C-2), 23.0 (C(O)CH₃), 18.1 (C-7') ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+Na]⁺ berechnet: 490.2, gefunden: 489.9

5.2.53 4'-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy-4,6-O-Benzyliden-3-O-[(1*R*)-1-(ethoxycarbonyl)ethyl]-β-D-glucopyranosid (197)



$C_{30}H_{33}NO_{10}$

567.58 g/mol

50 mg (0.11 mmol, 1.0 eq) des benzylidengeschützten Glycosids **195** wurden in 16 mL THF bei RT gelöst. Die Lösung (6.8 mM) wurde auf 0°C abgekühlt und mit 1.2 eq NaH versetzt. Nach Beendigung der H₂-Entwicklung bei 40°C wurde bei RT eine Lösung aus Milchsäureethylester-Triflat **196** (58 mg, 0.13 mmol, 2.2 eq) in 3 mL THF langsam zugetropft. Die Reaktion wird nun über Nacht auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 mL CHCl₃ und drei Mal mit je 30 mL H₂O gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden dann zwei Mal mit je 20 mL CHCl₃ gegengewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man eine viskose, gelbe Flüssigkeit. Nach Flash-Chromatographie mit PE/EE = 9:1 erhielt man 21 mg (0.037 mmol, 34 %) **197** als farbloses Öl.

DC: R_f = 0.61 (Laufmittel: PE/EE = 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 8.02-7.93 (m, 1 H; NH), 7.76 - 7.64 (m, 1 H; H-5'), 7.51 – 7.32 (m, 5 H; arom. H), 7.11 (d, J = 2.5 Hz, 1 H; H-8'), 6.98 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1 H; H-6'), 6.27 (d, J = 1.2 Hz, 1H; H-3'), 5.64 (s, 1H; PhCH), 5.36 (d, J = 8.2 Hz, 1H; H-1), 4.38 – 4.05 (m, 4 H; H-6a, CH₃CH₂C(O), OCH(CH₃)C(O)), 3.87 – 3.69 (m, 4 H; H-2, H-4, H-5, H-6b), 3.54 (t, J = 8.7 Hz, 1H; H-3), 2.41 (s, 3 H; Me), 1.81 (s, 3H; C(O)CH₃), 1.55 (d, J = 6.9 Hz, 3 H; OCH(CH₃)C(O)), 1.20 (t, 3 H; CH₃CH₂C(O)) ppm.

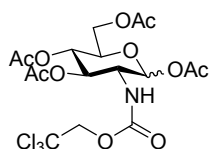
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 169.4 (C(O)), 165.1 (C(O)CH₃), 160.0 (C-2'), 159.6 (C-7'), 154.5 (C-4'), 153.2 (arom. C), 137.7, 133.6, 129.3, 128.9, 128.1, 126.6, 126.4, 114.5 (arom. C), 113.5 (C-3'), 112.0 (C-6'), 103.2 (C-8'), 100.7 (PhCH), 98.6 (C-1), 80.9 (C-3), 74.0

(OCH(CH₃)C(O)), 69.7 (C-4), 69.1 (C-6), 65.9 (C-5), 61.0 (CH₃CH₂C(O)), 56.0 (C-2), 26.0 (OCH(CH₃)C(O)), 23.0 (C(O)CH₃), 18.1 (C-7'), 14.1 (CH₃CH₂C(O)) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [M+Na]⁺ berechnet: 590.2, gefunden: 590.4.

5.2.54 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranosid (188)

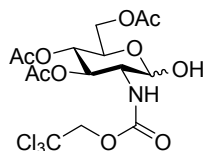


C₁₇H₂₂Cl₃NO₁₁

522.72 g/mol

Verbindung **188** wurde nach einer Vorschrift von Dullenkopf *et al.*^[50] in 92 % erhalten.

5.2.55 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranose (189)

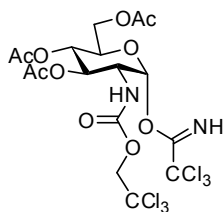


C₁₅H₂₀Cl₃NO₁₀

480.68 g/mol

Verbindung **189** wurde nach einer Vorschrift von Dullenkopf *et al.*^[50] in 83 % erhalten.

5.2.56 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α -D-glucopyranosetrichloracetimidat (**190**)


 $C_{17}H_{20}Cl_6N_2O_{10}$

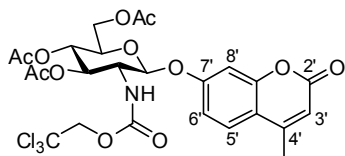
625.07 g/mol

Verbindung **190** wurde ausgehend vom anomer entschützten Zucker **189** nach einer Vorschrift von Dullenkopf *et al.*^[50] in 82 % erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ = 8.80 (s, 1 H; NH), 6.41 (d, J = 3.7 Hz, 1 H; H-1), 5.40-5.16 (m, 3 H; H-3, H-4, NH), 4.74-4.68 (m, 2 H; Cl₃CCH₂), 4.35-4.21 (m, 2 H; H-2, H-6^a), 4.18-4.05 (m, 2 H; H-5, H-6b), 2.07 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.05 (br, 6 H; 2 x C(O)CH₃) ppm.

5.2.57 4-Methylumbelliferyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-(2,2,2-trichlorethoxy-carbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**191**)


 $C_{25}H_{26}Cl_3NO_{12}$

638.83 g/mol

1.875 g (3 mmol, 1.0 eq) Trichloracetimidat **190** und 792 mg (4.5 mmol, 1.5 eq) Methylumbelliferonalkohol **165** wurden in 30 mL DCM (abs.) vorgelegt. Anschließend wurden bei 0°C 36 μ l (0.3 mmol, 0.1 eq) BF₃·OEt₂ langsam zugegeben. Dann wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur 20 h lang gerührt, wobei eine Verfärbung nach gelb zu beobachten war. Die Reaktionslösung wurde mit 120 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, zweimal 120 mL destilliertem Wasser und einmal 120 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit dem Laufmittelgemisch PE/EE = 1:2 konnten 1.154 g (1.81 mmol, 60 %) **191** als weißer Feststoff erhalten werden.

DC: $R_f = 0.31$ (PE/EE = 1:2)

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, CDCl_3):

$\delta = 7.46$ (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-5'), 6.94 (s, 1 H; H-8'), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-6'), 6.16 (s, 1 H; H-3'), 5.62 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H; NH), 5.44 (dd, $J = 10.0, 9.6$ Hz, 1 H; H-3), 5.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H; H-1), 5.14 (dd, $J = 9.6, 9.4$ Hz, 1 H; H-4), 4.77-4.59 (m, 2 H; Cl_3CCH_2), 4.31 (dd, $J = 12.0, 6.8$ Hz, 1 H; H-6a), 4.18 (dd, $J = 12.0, 1.5$ Hz, 1 H; H-6b), 4.03-3.90 (m, 2 H; H-2, H-5), 2.37 (s, 1 H; Me'), 2.12 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.08 (s, 3 H; C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H; C(O)CH_3) ppm.

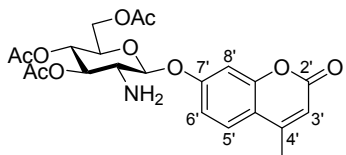
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.0 MHz, CDCl_3):

$\delta = 170.6$ (C(O)CH_3), 170.5 (C(O)CH_3), 169.5 (C(O)CH_3), 160.9, 159.3, 154.7, 154.1, 152.3 (quart. C), 125.6 (C-5'), 115.3 (quart. C), 114.0 (C-6'), 113.0 (C-3'), 103.7 (C-8'), 98.2 (C-1), 95.4 (Cl_3CCH_2), 74.4 (Cl_3CCH_2), 72.4 (C-5), 71.5 (C-3), 68.4 (C-4), 61.9 (C-6), 56.0 (C-2), 20.7 (C(O)CH_3), 20.6 (C(O)CH_3), 20.6 (C(O)CH_3), 18.6 (CH_3') ppm.

MALDI-MS (pos. Mode, CHCA): m/z [$M+\text{Na}$] $^+$ berechnet: 660.1, gefunden: 660.9; m/z [$M+\text{K}$] $^+$ berechnet: 676.1, gefunden: 676.9.

Elementaranalyse, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{NO}_{12}$: C 47.00, H 4.10, N 2.19, gefunden: C 46.96, H 4.28, N 2.32.

5.2.58 4-Methylumbelliferyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**192**)


 $C_{22}H_{25}NO_{10}$

463.43 g/mol

Zur Aktivierung wurden 3.5 g Zn in 7 mL 1 M HCl gerührt. Nach 10 min wurde das Zink über eine Fritte abfiltriert und mit je 7 mL H₂O und Et₂O nachgewaschen. 1.50 g (2.35 mmol, 1.0 eq) des Troc-geschützten Glycosids **191** wurden in 85 mL AcOH gelöst, mit dem aktivierten Zn versetzt und 24 h lang im Ultraschallbad gerührt. Die Reaktionslösung wurde nun mit 80 mL H₂O gequench und drei Mal mit je 80 mL DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zwei Mal mit je 80 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und H₂O gegengewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 946 mg (2.04 mmol, 87%) des Glycosids **192** mit freier Aminogruppe als weißen Schaum.

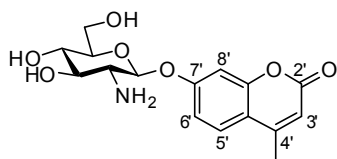
DC: $R_f = 0.31$ (EE)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

$\delta = 7.47$ (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-5'), 6.94 (s, 1 H; H-8'), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-6'), 6.13 (d, $J = 1.2$ Hz, 1 H; H-3'), 5.25-4.90 (m, 3 H; H-1, H-3, H-4), 4.27 (dd, $J = 12.3, 5.5$ Hz, 1 H; H-6a), 4.10 (dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz, 1 H; H-6b), 3.95-3.83 (m, 1 H; H-5) 3.21 (t, $J = 8.6$ Hz, 1 H; H-2), 2.36 (s, 3 H; Me'), 2.07 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.06 (s, 3 H; C(O)CH₃), 2.01 (s, 3 H; C(O)CH₃) ppm.

MALDI-MS (CHCA, pos. Mode): m/z [$M+Na$]⁺ berechnet: 486.1, gefunden: 486.1

Elementaranalyse, berechnet für C₂₂H₂₅NO₁₀: C 57.02, H 5.44, N 3.02, gefunden: C 56.99, H 5.58, N 2.75.

5.2.59 4-Methylumbelliferyl-2-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (193) $C_{16}H_{19}NO_7$

337.32 g/mol

32 mg (0.069 mmol) des peracetylierten Zuckers **192** wurden in 1 mL abs. Methanol gelöst. Anschließend wurde 1 mL einer 0.5 M methanolischen Lösung an NaOMe eingespritzt. Man ließ 90 min. bei Raumtemperatur rühren. Dann wurde die Lösung mit einem sauren Ionenaustauscher (Amberlite IR-120 (H^+)) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde anschließend abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 23 mg (0.068 mmol, 98 %) **193** als weißen kristallinen Feststoff. Das Glycosid wurde vor der Verwendung in biologischen Assays über RP-HPLC aufgereinigt.

DC: $R_f = 0.38$ (MeCN/ $H_2O = 4:1$)

RP-HPLC: (semipräparative Säule) (5–80 % B in 20 min): t_R 10.7 min

1H -NMR (600 MHz, MeOD):

$\delta = 8.46$ (br s; NH_2), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H; H-5'), 7.17-7.12 (m, 2 H; H-6', H-8'), 6.24 (s, 1 H; H-3'), 5.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H; H-1), 3.92 (dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz, 1 H; H-6a), 3.74 (dd, $J = 12.3, 5.8$ Hz, 1 H; H-6b), 3.59-3.40 (m, 3 H; H-3, H-4, H-5), 3.08 (t, $J = 9.5$ Hz, 1 H; H-2), 2.47 (s, 3 H; Me) ppm.

^{13}C -NMR (150.0 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 163.4, 162.0, 156.2, 155.6$ (quartäre C's), 127.5 (C-5'), 116.3 (quartäres C), 115.1 (C-6'), 113.1 (C-3'), 105.2 (C-8'), 102.6 (C-1), 78.8 (C-5), 77.6 (C-3), 71.6 (C-4), 62.6 (C-6), 58.4 (C-2), 18.8 (Me) ppm.

ESI-MS (pos. Mode): m/z [$M+H$] $^+$ berechnet: 338.1, gefunden: 338.1.

5.3 Arrayexperimente

Fluoreszenzmessungen an Glasträgern mit immobilisierten Rhodaminfarbstoffen wurden an einem Array-Scanner *GenePix Personal 4100 A* der Firma *Axon Instruments* (inzwischen *Molecular Devices*) durchgeführt (Anregungswellenlänge 532 nm, Detektionsfilter 550-600 nm). Der Träger wurde bei einer Pixelgröße von 20 µm bei einem geeigneten PMT-Gain zweimal gescannt. Es wurde dann automatisch der Mittelwert (Median) der relativen Fluoreszenzintensitäten F aus den beiden Messungen gebildet. Die Auswertung der Microarray-Bilder (Rohdaten) erfolgte mit Hilfe der Software *GenePixPro 4.1*.

5.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS), pH 7.3 (10 mM Phosphat, 150 mM NaCl)

362 mg (2.32 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2.751 g (7.68 mmol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ und 8.75 g (150 mmol) NaCl wurden in 800 mL Reinstwasser gelöst, Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7.3 eingestellt und die Lösung auf 1000 mL Endvolumen aufgefüllt.

100 mM Carbonat/Bicarbonat-Puffer, pH 10.2

1.325 g (12.5 mmol) Na_2CO_3 und 1.050 g (12.5 mmol) NaHCO_3 wurden in Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N NaOH auf 10.2 gestellt und der Der Puffer wurde immer unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Lösungen des Lissamin B-Disulfids **119**

Das Lissamin B-Disulfid **119** wurde eingewogen und in den entsprechenden Volumina PBS / MeOH = 8:5 gelöst.

TCEP-HCl (**116**) Lösung

Das Reduktionsmittel TCEP-HCl wurde eingewogen und in den entsprechenden Volumina PBS / MeOH = 8:5 gelöst.

5.3.2 Experimente mit Aminoslides

Immobilisierung des Maleinimids **127** auf Aminoslides

50 mg des Maleinimid-Aktivcarbonats **127** wurden in 15 mL DMF gelöst, Davon wurden 10 mL mit 16 µl DIPEA versetzt und in eine abgedichtete Objektträgeraufbewahrungsbox gefüllt, in der sich 5 aminofunktionalisierte Slides der Firma *Genetix* befanden. Nach 24 h wurden die Slides/Chips in einer Schale auf einem Schüttler 6 x mit je 15 mL DMF und 3 x mit je 15 mL DCM (jeweils 5 Minuten lang) gewaschen. Danach wurden die Glasträger im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und direkt weiterverwendet.

Reaktion des immobilisierten Maleinimids mit dem Lissamindisulfid **119**

Die präparierten Slides wurden mit einer selbstklebenden Silikonmaske mit 24 *wells* von *GraceBioLabs* versehen. Für jede verwendete Farbstoffkonzentration wurden 4 µL der Lösung des Disulfids 119 mit 4 µL einer zehnfach höher konzentrierteren Lösung TCEP·HCl (116) im Verhältnis 1:1 in den *wells* gemischt und ein Objektträger als Abdeckung verwendet. Nach Inkubation von 24 h auf einem Schüttler bei RT wurden die *wells* geleert. Anschließend wurden die Glasträger 3 x mit PBS / MeOH = 8:5 auf dem Schüttler, 3 x mit PBS / MeOH = 8:5 mit 0.1% SDS bei 40 °C im Ultraschallbad, 1 x mit Wasser bei 40 °C im Ultraschallbad gewaschen (jeweils 5 min) und im Stickstoff-Gasstrom getrocknet. Die Glasträger wurden daraufhin am Array-Scanner ausgelesen.

5.3.3 Experimente mit PDITC-Slides

Aktivierung von aminopropylsilanisierten Glasträgern

Die aminopropylsilanisierten Glasträger der Firma *Genetix* (Amine Arraying Slides) bzw. der Firma *Schott* (Nexterion Slide Aplus) wurden in einer Lösung aus 0.2 % 1,4-Diphenylendiisothiocyanat (PDITC) in 10 % Pyridin/DMF über Nacht auf einem Schüttler leicht geschwenkt. Die Glasträger wurden im Anschluss dreimal mit DMF, zweimal mit Dichlormethan und einmal mit Aceton für je 10 Minuten gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und im Exsikkator über CaCl₂ aufbewahrt.

5.3.3.1 Maleinimid-Thiol-Ligation

Immobilisierung des Maleinimidamins **131** auf PDITC-modifizierte Glasträger

Die PDITC-modifizierten Glasträger wurden mit einer 2 mM Lösung des Maleinimidamins **131** in Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) behandelt (8 μ L pro *well*). Dann wurden die Glasträger in einer Feuchtigkeitskammer bei RT über Nacht inkubiert. Die *wells* wurden geleert und 3 x mit Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) und 3 x mit Wasser gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und im Exsikkator über CaCl₂ aufbewahrt.

Reaktion des immobilisierten Maleinimids **131** mit dem Lissamindisulfid **119**

In jedes *well* wurden 4 μ l des Farbstoffdisulfids **119** (1 mM) und 4 μ l TCEP-HCl (**116**) (10 mM) (Lösungen in PBS-Puffer / MeOH = 8:5) pipettiert und 3 h lang inkubiert. Danach wurden die Lösungen entfernt, in jedem *well* einzeln zweimal mit Aceton gewaschen und anschließend jeweils 15 Minuten lang im Ultraschallbad mit folgenden Lösungen behandelt: Aceton, Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2), Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) mit 0.2% SDS, Wasser und Aceton. Die Glasträger wurden daraufhin am Array-Scanner ausgelesen.

Direkte Immobilisierung des Lissaminethylendiamins **146**

Die PDITC-modifizierten Glasträger wurden mit Lösungen unterschiedlicher Konzentration des Lissaminethylendiamins **146** in DMF / (Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2)) = 2:1 behandelt (8 μ L pro *well*). Nach 3 h wurden die *wells* geleert und 2 x mit MeOH, 2 x mit Aceton und 2 x mit Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) mit 0.2% SDS gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet und am Array-Scanner ausgelesen.

5.3.3.2 DARinv mit Tetrazinen

Immobilisierung des Norbornens **157** auf PDITC-modifizierte Glasträger

Die PDITC-modifizierten Glasträger wurden mit einer 0.5 mM Lösung des Norbornens **157** in Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) behandelt. Alternativ wurden bei einigen Experimenten Lösungen des Norbornens mit unterschiedlichen Molenbrüchen hergestellt. Dazu wurde die 0.5 mM Lösung der Verbindung **157** im gewünschten Verhältnis mit einer 0.5 mM Lösung des Amins **101** in Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) gemischt und anschließend auf den PDITC-modifizierten Glasträger aufgebracht. Die Glasträger wurden über Nacht bei RT inkubiert. Die *wells* wurden geleert und die Chips 3 x mit Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) und 3 x mit Wasser gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet.

Anfärbung durch Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) des Farbstoff-Tetrazinkonjugats **154** mit immobilisiertem Norbornen.

Zur Anfärbung wurde eine 1 mM Lösung des Farbstoff-Tetrazinkonjugats **154** in MeOH oder DMSO oder H₂O / DMSO = 4:1 zugegeben. Nach 3 h Inkubationszeit bei RT wurde der Chip mit MeOH, Wasser und Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) gewaschen. Die Glasträger wurden daraufhin am Array-Scanner ausgelesen.

Immobilisierung des Oxazolins **108**, sowie der Amine **101** und **157** auf PDITC-modifizierte Glasträger

Die PDITC-modifizierten Glasträger wurden mit 1 mM Lösungen der jeweiligen Verbindung mit Aminolinker in Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) über Nacht 16 h lang bei RT im **MARCO** behandelt (8 µL pro *well* (2x4 Setup) oder 40 µL pro *well* (4x6 Setup)). Die *wells* wurden geleert und die Chips 3 x mit Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) und 3 x mit Wasser gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet.

Glycosylierung des immobilisierten Oxazolins **108** mit Norbornenalkoholen

Eine 100 mM Lösung des Norbornen-Testalkohols in CHCl_3 oder THF wurde mit 100 mM Lösungen des jeweiligen Aktivators in CHCl_3 oder THF im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die Glycosylierung auf dem Chip wurden 40 bzw. 8 μL dieser Mischung pro *well* verwendet und der Glasträger in der **MARCO**-Reaktionskammer 16 h lang bei 50 °C inkubiert. Die *wells* wurden geleert und die Chips 2 x mit CHCl_3 und 2 x mit MeOH gewaschen. Danach wurden sie im Stickstoff-Gasstrom getrocknet.

Anfärbung durch Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) des Farbstoff-Tetrazinkonjugats **154**

Zur Anfärbung wurde eine 0.6 mM Lösung des Farbstoff-Tetrazinkonjugats **154** in H_2O / MeOH / DMSO = 4:1:1 zugegeben. Nach 3 h Inkubationszeit bei RT wurde der Chip mit MeOH, Wasser und Carbonat/Bicarbonatpuffer-Puffer (100 mM, pH 10.2) gewaschen. Die Glasträger wurden daraufhin am Array-Scanner ausgelesen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.
- [2] J. Lehmann, *Kohlenhydrate: Chemie und Biologie*, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1996**.
- [3] V. Wittmann, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology, Band III* (Hrsg.: B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer-Verlag, Berlin, **2001**, S. 2253-2287.
- [4] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4537.
- [5] V. Wittmann, in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology, Band III*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer-Verlag, Heidelberg, **2008**, S. 1735-1770.
- [6] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [7] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236.
- [8] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- [9] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1932-1967.
- [10] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184-201.
- [11] J. Banoub, P. Boullanger, D. Lafont, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1167-1195.
- [12] A. F. G. Bongat, A. V. Demchenko, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 374-406.
- [13] E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, *Immunol. Res.* **2007**, *37*, 47-60.
- [14] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236.
- [15] R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.
- [16] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 1380-1419.
- [17] P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778.
- [18] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.

- [19] F. Gauffeny, A. Marra, L. K. Shi Shun, P. Sinaÿ, C. Tabeur, *Carbohydr. Res.* **1991**, 219, 237-240.
- [20] M. Forsgren, T. Norberg, *Carbohydr. Res.* **1983**, 116, 39-47.
- [21] S. A. Svarovsky, J. J. Barchi, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1925-1935.
- [22] G. Grundler, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1984, 1826-1847.
- [23] H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1988, 75-86.
- [24] A. Marra, F. Gauffeny, P. Sinaÿ, *Tetrahedron* **1991**, 47, 5149-5160.
- [25] R. N. de Oliveira, L. Cottier, D. Sinou, R. M. Srivastava, *Tetrahedron* **2005**, 61, 8271-8281.
- [26] M. Hederos, P. Konradsson, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7196-7207.
- [27] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43, 3106-3116.
- [28] H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 3633-3634.
- [29] R. U. Lemieux, T. L. Nagabushan, I. K. O' Neill, *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 413-418.
- [30] D. Lafont, G. Descotes, *Carbohydr. Res.* **1987**, 166, 195-209.
- [31] D. A. Griffith, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 112, 5811-5819.
- [32] J. Du Bois, C. S. Tomooka, J. Hong, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3179-3180.
- [33] B. J. Fitzsimmons, Y. Leblanc, J. Rokach, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 109, 285-286.
- [34] R. S. Dahl, N. S. Finney, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8356-8357.
- [35] L. Cipolla, L. Lay, F. Nicotra, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 6678-6681.
- [36] V. Pozsgay, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 7277-7280.
- [37] V. Pavliak, P. Kovác, *Carbohydrate Research* **1991**, 210, 333-337.
- [38] W. Karpiesiuk, A. Banaszek, A. Zamojski, *Carbohydrate Research* **1989**, 186, 156-162.

- [39] J. N. Vos, J. H. Van Boom, C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1984**, 3, 117-124.
- [40] M. Černý, J. Stanek, Jr., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1977**, 34, 23-177.
- [41] D. Tailler, J. C. Jacquinet, A. M. Noiret, J. M. Beau, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 23, 3163-3164.
- [42] M. L. Wolfrom, H. B. Bhat, *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 1821-1823.
- [43] G. Blatter, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **1994**, 260, 189-202.
- [44] W. Meyer-zu-Reckendorf, N. Vassiliadou-Micheli, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 1792-1796.
- [45] P. Boullanger, M. Jouineau, B. Bouammali, D. Lafont, G. Descotes, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 151-164.
- [46] P. Boullanger, J. Banoub, G. Descotes, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 1343-1348.
- [47] M. Imoto, H. Yoshimura, T. Shimamoto, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 2205-2214.
- [48] H. Paulsen, C. Krogmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1203-1213.
- [49] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 251-260.
- [50] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, 296, 135-147.
- [51] J. Debenham, R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 791-802.
- [52] R. U. Lemieux, T. Takeda, B. Y. Chung, *ACS Symp. Ser.* **1976**, 39, 90-115.
- [53] M. R. E. Aly, J. C. Castro-Palomino, E.-S. I. Ibrahim, E.-S. H. El-Ashry, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2305-2316.
- [54] J. C. Castro-Palomino, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5343-5346.
- [55] J. S. Debenham, R. Madsen, C. Roberts, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3302-3303.
- [56] E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 405-415.
- [57] K. J. Jensen, P. R. Hansen, D. Venugopal, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3148-3155.

- [58] J. C. Castro-Palomino, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 629-632.
- [59] W. P. Stöckl, H. Weidmann, *J. Carbohydr. Chem.* **1989**, *8*, 169-198.
- [60] A. Y. Khorlin, M. L. Shul'man, S. E. Zurabyan, I. M. Privalova, Y. L. Kopaevich, L. Yu, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya* **1968**, 227.
- [61] A. Y. Khorlin, M. L. Shul'man, S. E. Zurabyan, I. M. Privalova, Y. L. Kopaevich, L. Yu, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya* **1968**, 2094.
- [62] S. E. Zurabyan, T. P. Volosyuk, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1969**, *9*, 215-220.
- [63] S. E. Zurabyan, T. S. Antonenko, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1970**, *15*, 21-27.
- [64] R. Andreasch, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1884**, *5*, 33-46.
- [65] G. L. Griffiths, S. P. Sigel, S. M. Payne, J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 383-385.
- [66] A. J. White, G. A. Snow, *The Biochemical journal.* **1969**, *111*, 785-792.
- [67] J. H. Crosa, C. T. Walsh, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223-249.
- [68] B. M. Degnan, C. J. Hawkins, M. F. Lavin, E. J. McCaffrey, D. L. Parry, A. L. Van den Brenk, D. J. Watters, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1349-1354.
- [69] N. Pravdic, T. Inch, J. H. Fletcher, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1815-1818.
- [70] K. L. Matta, E. A. Johnson, J. J. Barlow, *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 215-218.
- [71] V. K. Srivastava, *Carbohydr. Res.* **1982**, *103*, 286-292.
- [72] T. Osawa, *Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 597.
- [73] S. Nakabayashi, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, C7-C10.
- [74] M. A. Nashed, C. W. Slife, M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, C13-C16.
- [75] M. A. Nashed, C. W. Slife, M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 237-252.
- [76] M. A. Nashed, L. Anderson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1274-1276.

- [77] J. J. Oltvoort, C. A. A. Van Boeckel, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, *Recl.: J. R. Neth. Chem. Soc.* **1983**, *102*, 475-476.
- [78] J. Liu, D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9789-9797.
- [79] T. J. Donohoe, J. G. Logan, D. D. P. Laffan, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4995-4998.
- [80] Y. Zeng, J. Wang, B. Li, S. Hauser, H. Li, L.-X. Wang, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3355-3364.
- [81] H. Mack, J. V. Basabe, R. Brossmer, *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 311-316.
- [82] M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S.-i. Shoda, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2210-2212.
- [83] M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, C12-C14.
- [84] M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, C15-C17.
- [85] M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res.* **1985**, *136*, 309-323.
- [86] T. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C6-C9.
- [87] S. Nishimura, K. Matsuoka, T. Furuie, S. Ishii, K. Kurita, K. M. Nishimura, *Macromolecules* **1991**, *24*, 4236-4241.
- [88] T. Yohino, K.-I. Sato, F. Wanme, I. Takai, Y. Ishido, *Glycoconjugate J.* **1992**, *9*, 287-291.
- [89] V. Wittmann, D. Lennartz, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1363-1367.
- [90] D. Lennartz, *Diplomarbeit*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main 2001.
- [91] C. F. Crasto, G. B. Jones, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*.
- [92] H. Christensen, M. S. Christiansen, J. Petersen, H. H. Jensen, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3276-3283.
- [93] Y. Cai, C.-C. Ling, D. R. Bundle, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4021-4024.
- [94] Y. Cai, C.-C. Ling, D. R. Bundle, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *74*, 580-589.
- [95] S. Kobayashi, T. Kiyosada, S.-i. Shoda, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2111-2112.
- [96] A. Kobayashi, H. Kuwata, M. Kohri, R. Izumi, T. Watanabe, S. i. Shoda, *J. Carbohydr. Chem.* **2006**, *25*, 533-541.

- [97] R. Danac, L. Ball, S. J. Gurr, T. Muller, A. J. Fairbanks, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1241-1245.
- [98] B. Li, Y. Zeng, S. Hauser, H. Song, L.-X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9692-9693.
- [99] W. Huang, H. Ochiai, X. Zhang, L.-X. Wang, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2903-2913.
- [100] L.-X. Wang, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1509-1522.
- [101] C. D. Heidecke, T. B. Parsons, A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2433-2438.
- [102] H. Kunz, K. Rück, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 355-377.
- [103] M. Diéguez, O. Pàmies, C. Claver, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3189-3215.
- [104] Mike M. K. Boysen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8648-8659.
- [105] W. R. Cullen, Y. Sugi, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1635-1636.
- [106] R. Jackson, D. J. Thompson, *J. Organomet. Chem.* **1978**, *159*, C29-C31.
- [107] M. Diéguez, C. Claver, O. Pàmies, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 4621-4634.
- [108] M. Irmak, M. M. K. Boysen, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 403-405.
- [109] T. Minuth, M. Irmak, A. Groschner, T. Lehnert, M. M. K. Boysen, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 997-1008.
- [110] Y. Mata, M. Diéguez, O. Pàmies, S. Woodward, *Inorg. Chim. Acta* **2008**, *361*, 1381-1384.
- [111] Y. Mata, O. Pàmies, M. Diéguez, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3296-3304.
- [112] G. Desimoni, G. Faita, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3561-3651.
- [113] G. Desimoni, G. Faita, P. Quadrelli, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3119-3154.
- [114] C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, M. Galanski, M. Reithofer, B. K. Keppler, *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 3301-3308.
- [115] S. Choudhuri, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2004**, 171-179.
- [116] D. N. Howbrook, A. M. van der Valk, M. C. O'Shaughnessy, D. K. Sarker, S. C. Baker, A. W. Lloyd, *Drug Discovery Today* **2003**, 642-651.
- [117] Q. Xu, K. S. Lam, *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, 257-266.

- [118] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science (Washington, DC, U. S.)* **1995**, 467-470.
- [119] K.-y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, 6, 782-799.
- [120] L. Bonetta, *Nat. Methods* **2006**, 3, 571-578.
- [121] G. Walter, K. Büssov, D. Cahill, A. Lueking, H. Lehrach, *Current Opinion in Microbiology* **2000**, 3, 298-302.
- [122] T. O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herrick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hämmerle, *Electrophoresis* **2000**, 21, 2641-2650.
- [123] B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Genome Biol* **2001**, 2, research 0004.0001-0004.0013.
- [124] B. D. Martin, B. P. Gaber, C. H. Patterson, D. C. Turner, *Langmuir* **1998**, 14, 3971-3975.
- [125] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 275-281.
- [126] W. G. T. Willats, S. E. Rasmussen, T. Kristensen, J. D. Mikkelsen, J. P. Knox, *Proteomics* **2002**, 2, 1666-1671.
- [127] C. A. Rowe, L. M. Tender, M. J. Feldstein, J. P. Golden, S. B. Scruggs, B. D. MacCraith, J. J. Cras, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3846-3852.
- [128] M.-L. Lesaichere, R. Y. P. Lue, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8768-8769.
- [129] P. Pavlickova, N. M. Jensen, H. Paul, M. Schaeferling, C. Giammasi, M. Kruschina, W.-D. Du, M. Theisen, M. Ibba, F. Ortigao, D. Kambhampati, *J. Proteome Res.* **2002**, 1, 227-231.
- [130] M. Schaeferling, M. Riepl, P. Pavlickova, H. Paul, D. Kambhampati, B. Liedberg, *Microchim. Acta* **2003**, 142, 193-203.
- [131] H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, M. Snyder, *Nat. Genet.* **2000**, 26, 283-289.
- [132] T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 637-645.

- [133] T. Feizi, W. Chai, *Nature* **2004**, *5*, 582-588.
- [134] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [135] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017.
- [136] M. C. Bryan, O. Plettenburg, P. Sears, D. Rabuka, S. Wacowich-Sgarbi, C.-H. Wong, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 713-720.
- [137] O. E. Galanina, M. Mecklenburg, N. E. Nifantiev, G. V. Pazynina, N. V. Bovin, *Lab Chip* **2003**, *3*, 260-265.
- [138] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162-13163.
- [139] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4307-4312.
- [140] G.-S. Chen, N. L. Pohl, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 785-788.
- [141] F. A. Jaipuri, B. Y. M. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1731-1734.
- [142] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2001**, *293*, 2101-2105.
- [143] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [144] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686-694.
- [145] S. C. Lin, F. G. Tseng, H. M. Huang, C. Y. Huang, C. C. Chieng, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 202-208.
- [146] G. T. Carroll, D. Wang, N. J. Turro, J. T. Koberstein, *Langmuir* **2006**, *22*, 2899-2905.
- [147] S. Angeloni, J. L. Ridet, N. Kusy, H. Gao, F. Crevoisier, S. Guinchard, S. Kochhar, H. Sigrist, N. Sprenger, *Glycobiology* **2005**, *15*, 31-41.
- [148] Y. Chevolut, J. Martins, N. Milosevic, D. Leonard, S. Zeng, M. Malissard, E. G. Berger, P. Maier, H. J. Mathieu, D. H. G. Crout, H. Sigrist, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2943-2953.
- [149] L. L. Kiessling, C. W. Cairo, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 234-235.
- [150] S. Park, I. Shin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3312-3314.

- [151] S. Park, M.-R. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [152] B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksich, *Langmuir* **2003**, *19*, 1522-1531.
- [153] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379-383.
- [154] Y.-U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem.--Eur. J.* **2005**, *11*, 2493-2504.
- [155] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 421-424.
- [156] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443-454.
- [157] X.-L. Sun, L. Yang, E. L. Chaikof, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2510-2513.
- [158] H. S. G. Beckmann, A. Niederwieser, M. Wiessler, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6548-6554.
- [159] M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8640-8641.
- [160] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi, *Langmuir* **2004**, *20*, 3844-3847.
- [161] Y. Zhang, S. Luo, Y. Tang, L. Yu, K.-Y. Hou, J.-P. Cheng, X. Zeng, G. Wang Peng, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2001-2008.
- [162] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52-57.
- [163] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulère, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010-6014.
- [164] T. Sato, S. Fujita, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, T. Yamagata, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 580-581.
- [165] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177-11184.
- [166] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Drug Discovery Today: Targets* **2004**, *3*, 151-158.
- [167] M. Mizuno, M. Noguchi, M. Imai, T. Motoyoshi, T. Inazu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 485-490.

- [168] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17033-17038.
- [169] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A. Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15-20.
- [170] J. L. de Paz, C. Noti, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2766-2767.
- [171] O. Blixt, S. Han, L. Liao, Y. Zeng, J. Hoffmann, S. Futakawa, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6680-6681.
- [172] O. Bohorov, H. Andersson-Sand, J. Hoffmann, O. Blixt, *Glycobiology* **2006**, *16*, 21C-27C.
- [173] M. B. Biskup, J. U. Müller, R. Weingart, R. R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.
- [174] F. K. Wallner, H. A. Norberg, A. I. Johansson, M. Mogemark, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 309-315.
- [175] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140-6148.
- [176] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749-754.
- [177] L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology* **2004**, *14*, 197-203.
- [178] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3308-3314.
- [179] J. L. de Paz, P. H. Seeberger, *Mol. BioSyst.* **2008**, DOI: 10.1039/b802217h.
- [180] E. A. Yates, M. O. Jones, C. E. Clarke, A. K. Powell, S. R. Johnson, A. Porch, P. P. Edwards, J. E. Turnbull, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2061-2063.
- [181] S. E. Tully, M. Rawat, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7740-7741.
- [182] M.-r. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269-4272.
- [183] X. Zhou, J. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1451-1458.

- [184] Z.-L. Zhi, A. K. Powell, J. E. Turnbull, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4786-4793.
- [185] H. C. Hansen, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 233-242.
- [186] U. Nilsson, R. Johansson, G. Magnusson, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 295-302.
- [187] U. Nilsson, R. T. Striker, S. J. Hultgren, G. Magnusson, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1809-1817.
- [188] A. Bergh, B. G. Magnusson, J. Ohlsson, U. Wellmar, U. J. Nilsson, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 615-621.
- [189] M.-r. Lee, I. Shin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2941-2944.
- [190] S. Park, I. Shin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1675-1678.
- [191] Y.-G. Kim, D.-S. Shin, Y.-H. Yang, G.-C. Gil, C.-G. Park, Y. Mimura, D. K. C. Cooper, P. M. Rudd, R. A. Dwek, Y.-S. Lee, B.-G. Kim, *Chem. Biol. (Cambridge, MA, U. S.)* **2008**, *15*, 215-223.
- [192] J. L. de Paz, D. Spillmann, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2006**, 3116-3118.
- [193] L. Ban, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3444-3447.
- [194] W. Weidel, H. Pelzer, *Adv. Enzymol.* **1964**, *26*, 193-232.
- [195] C. Mayer, *BIOspektrum* **2005**, *11*, 616-619.
- [196] G. Seltmann, O. Holst, *The bacterial cell wall*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [197] S. Litzinger, *Dissertation*, Universität Konstanz **2009**.
- [198] J.-V. Höltje, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 181-203.
- [199] E. W. Goodell, *J. Bacteriol.* **1985**, *163*, 305-310.
- [200] R. Takeda, S. Y. Ryu, J. H. Park, K. Nakanishi, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5533-5542.
- [201] M. G. Peter, P.-C. Boldt, S. Petersen, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 1275-1279.
- [202] M. Bergmann, L. Zervas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1931**, *64*, 975-980.
- [203] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta.* **1975**, *58*, 531-541.
- [204] C. Risinger, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, Konstanz 2005.

- [205] J. E. T. Corrie, C. T. Davis, J. F. Eccleston, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 186-194.
- [206] R. M. Metrione, *J. Chromatogr.* **1986**, *363*, 337-344.
- [207] M. W. Wessendorf, T. C. Brelje, *Histochem.* **1992**, *98*, 81-85.
- [208] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.
- [209] S. Nampalli, M. G. McDougall, K. Lavrenov, H. Xiao, S. Kumar, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 468-473.
- [210] F. Borek, A. M. Silverstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 87 1960, p. 293-297.
- [211] H. Sigmund, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2299-2334.
- [212] N. D. Sonawane, J. Hu, C. Muanprasat, A. S. Verkman, *The FASEB Journal* **2006**, *20*, 130-132.
- [213] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [214] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [215] S. Kobayashi, M. Sugiura, H. Kitagawa, W. W. L. Lam, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2227-2302.
- [216] H. Mohan, E. Gemma, K. Ruda, S. Oscarson, *Synlett* **2003**, *9*, 1255-1256.
- [217] M. Schmidt, Dissertation, Universität Konstanz 2010.
- [218] J. Gehring, *Bachelorarbeit*, Universität Konstanz 2008.
- [219] Y. Wu, T. Buranda, R. L. Metzner, L. A. Sklar, G. P. Lopez, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 359-365.
- [220] B. Yu, Q. Ouyang, C. Li, Y. Hui, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*.
- [221] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 4158-&.
- [222] H. Beckmann, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz 2006.
- [223] L. Ulmer, J. Mattay, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, *6*, 49-52.
- [224] F. Neese, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 526-563.
- [225] F. Neese, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4290-4299.
- [226] S. Litzinger, C. Mayer, H. König, H. Claus, A. Varma, 3-52.

- [227] U. Dahl, T. Jaeger, B. T. Nguyen, J. M. Sattler, C. Mayer, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 2385-2392.
- [228] T. Jaeger, M. Arsic, C. Mayer, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30100-30106.
- [229] T. Jaeger, C. Mayer, *CMLS - Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 928.
- [230] T. Hadi, U. Dahl, C. Mayer, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11547-11558.
- [231] S. Litzinger, A. Duckworth, K. Nitzsche, C. Risinger, V. Wittmann, C. Mayer, *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3132-3143.
- [232] K.-R. Roeser, G. Legler, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *657*, 321-333.
- [233] M. S. Macauley, K. A. Stubbs, D. J. Vocadlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17202-17203.
- [234] G. E. Whitworth, M. S. Macauley, K. A. Stubbs, R. J. Dennis, E. J. Taylor, G. J. Davies, I. R. Greig, D. J. Vocadlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 635-644.
- [235] D. Dunstan, L. Hough, *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 425-426.
- [236] K. W. S. R. R., *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 407-415.
- [237] N. Kubasch, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2710.
- [238] D. Horton, *Org. Synth., Collect. Vol. V* **1973**, 1-5.
- [239] C. D. Warren, M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 427-448.
- [240] S. Isomura, P. Wirsching, K. D. Janda, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4115-4121.
- [241] E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.
- [242] Z. Zhang, J. C. Pickens, W. G. J. Hol, E. Fan, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1377-1380.
- [243] K. A. Keller, J. Guo, S. Punna, M. G. Finn, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1181-1184.
- [244] S. S. Pertel, V. Y. Chirva, A. L. Kadun, E. S. Kakayan, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 895-899.
- [245] D. A. Griffith, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5811-5819.
- [246] H. G. Bazin, M. W. Wolff, R. J. Linhardt, *J. Org. Chem.* **1998**, *64*, 144-152.

- [247] D. Carrière, S. J. Meunier, F. D. Tropper, S. Cao, R. Roy, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, *154*, 9-22.
- [248] L. S. A. del Rão, R. C. W. Berkeley, *Anal. Biochem.* **1975**, *66*, 405-411.

7 Anhang

7.1 Ausgewählte Spektren

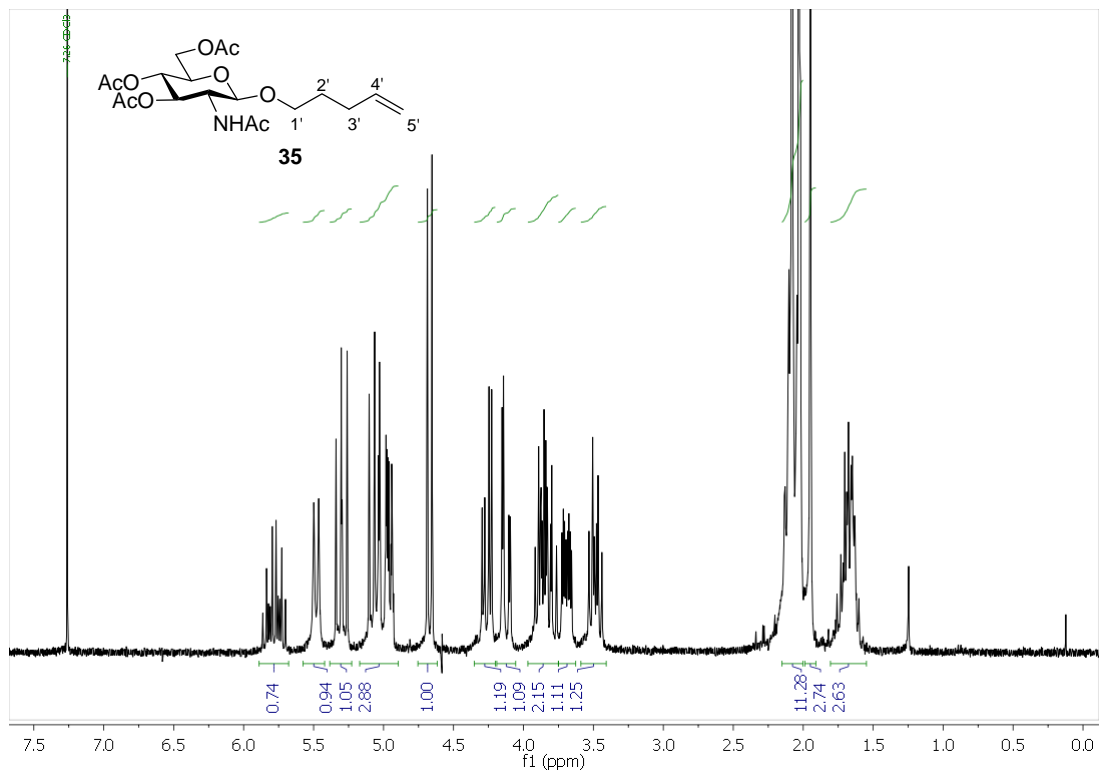


Abb. 7.1: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **35** bei 250 MHz in CDCl₃.

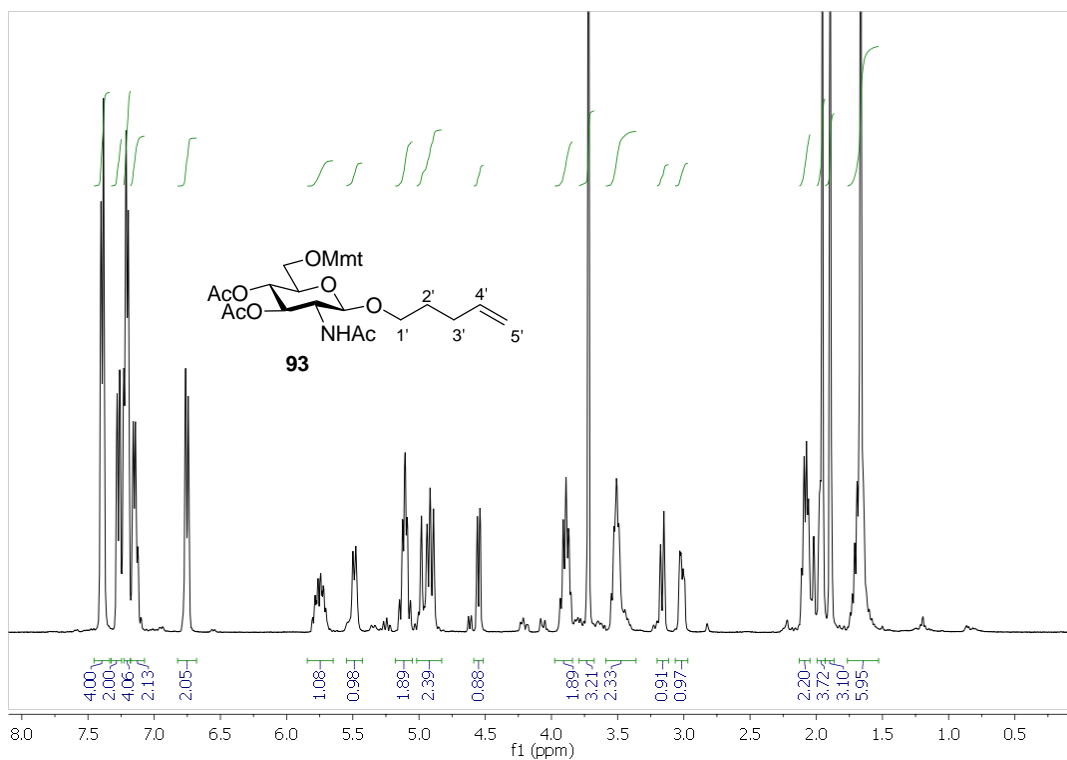


Abb. 7.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **93** bei 400 MHz in CDCl_3 .

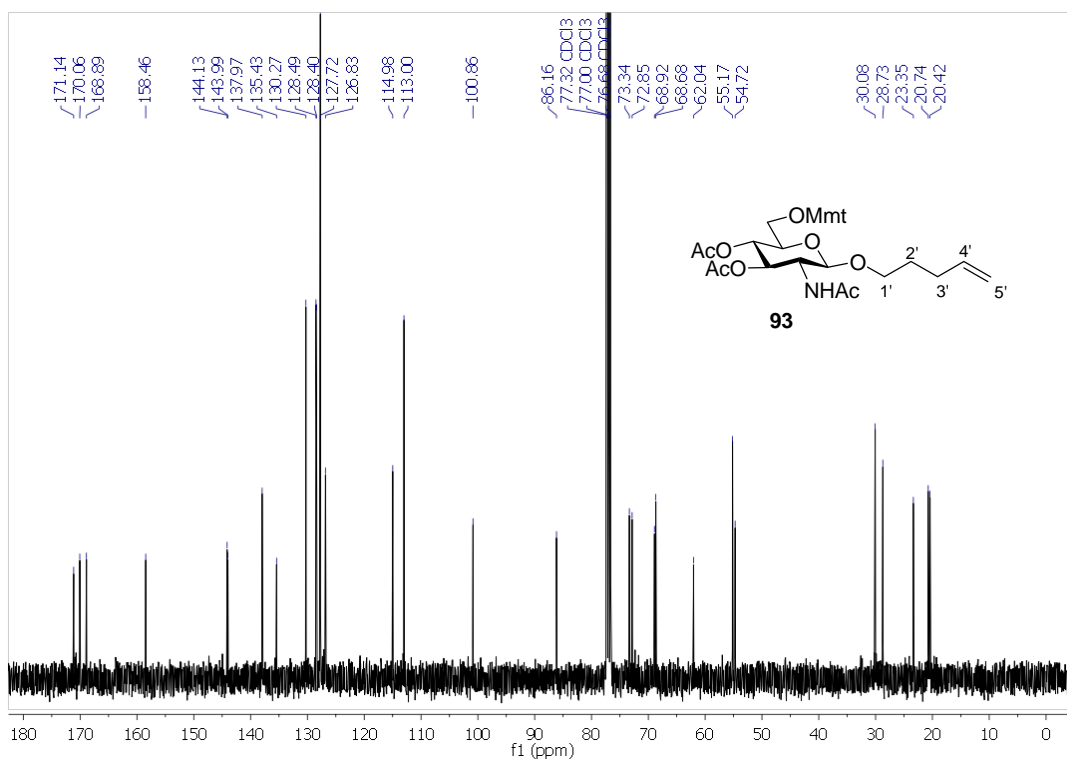


Abb. 7.3: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **93** bei 100 MHz in CDCl_3 .

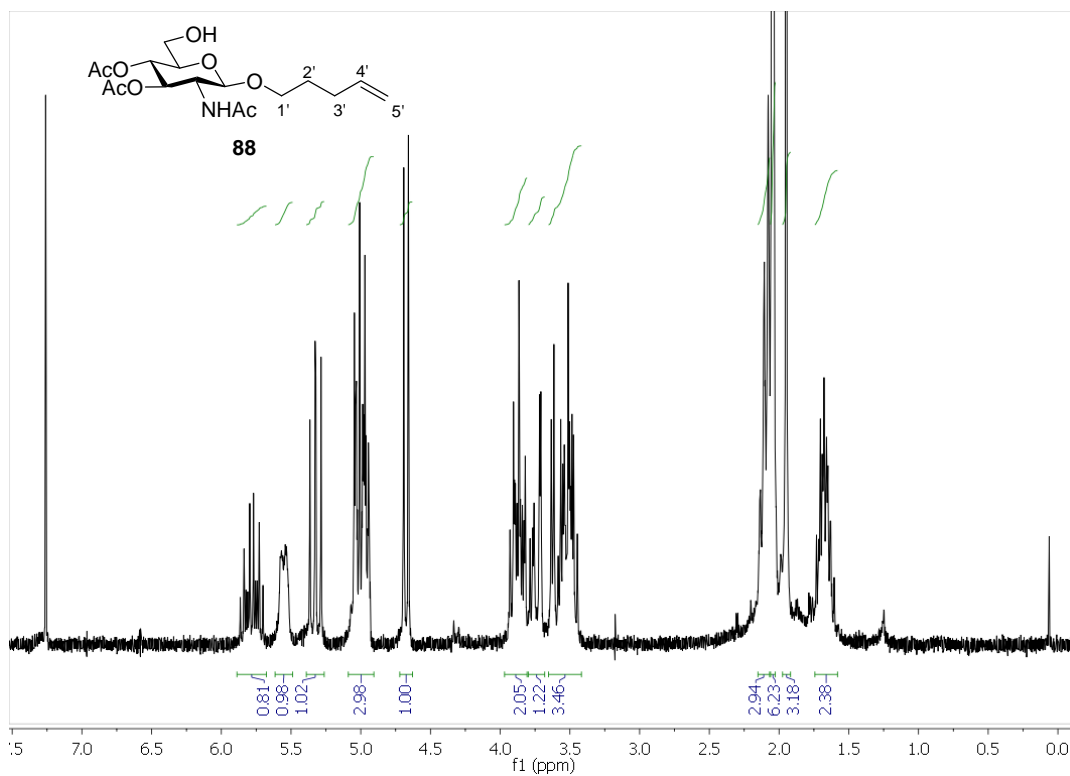


Abb. 7.4: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **88** bei 250 MHz in CDCl₃.

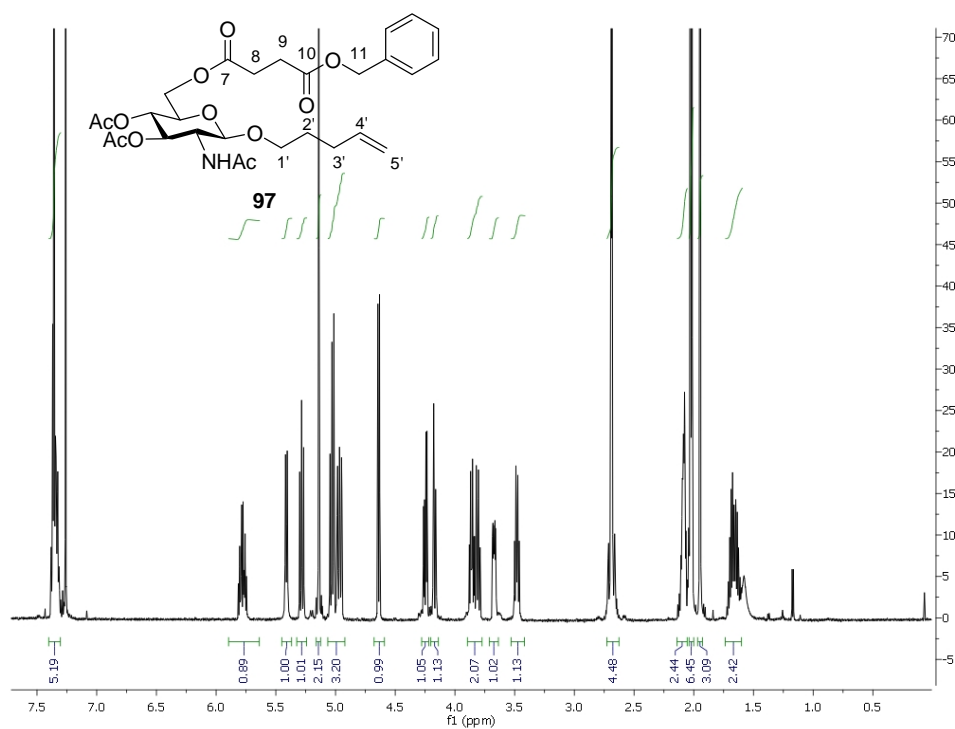


Abb. 7.5: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **97** bei 600 MHz in CDCl₃.

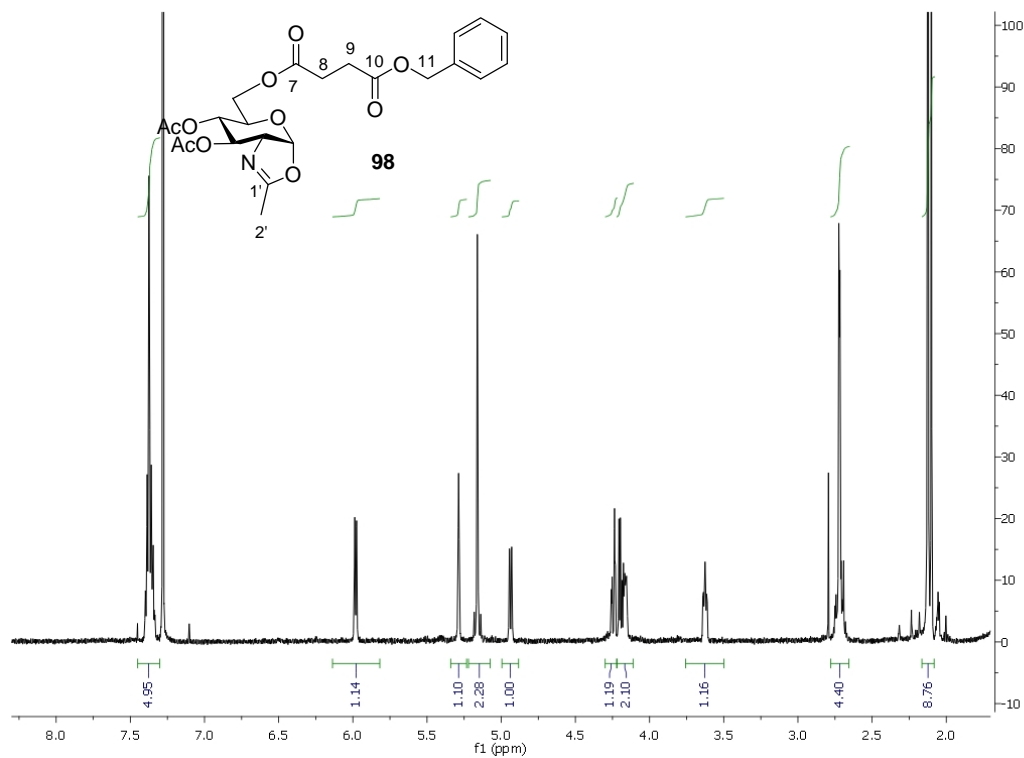


Abb. 7.6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **98** bei 600 MHz in CDCl_3 .

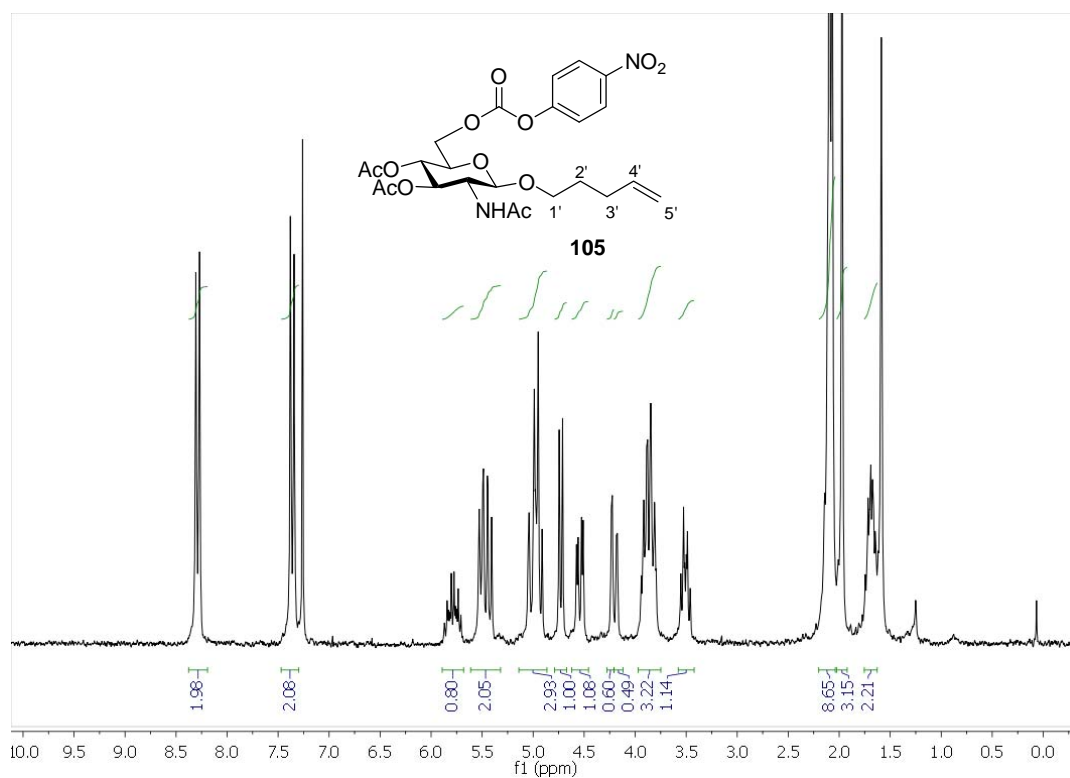


Abb. 7.7: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **105** bei 600 MHz in CDCl_3 .

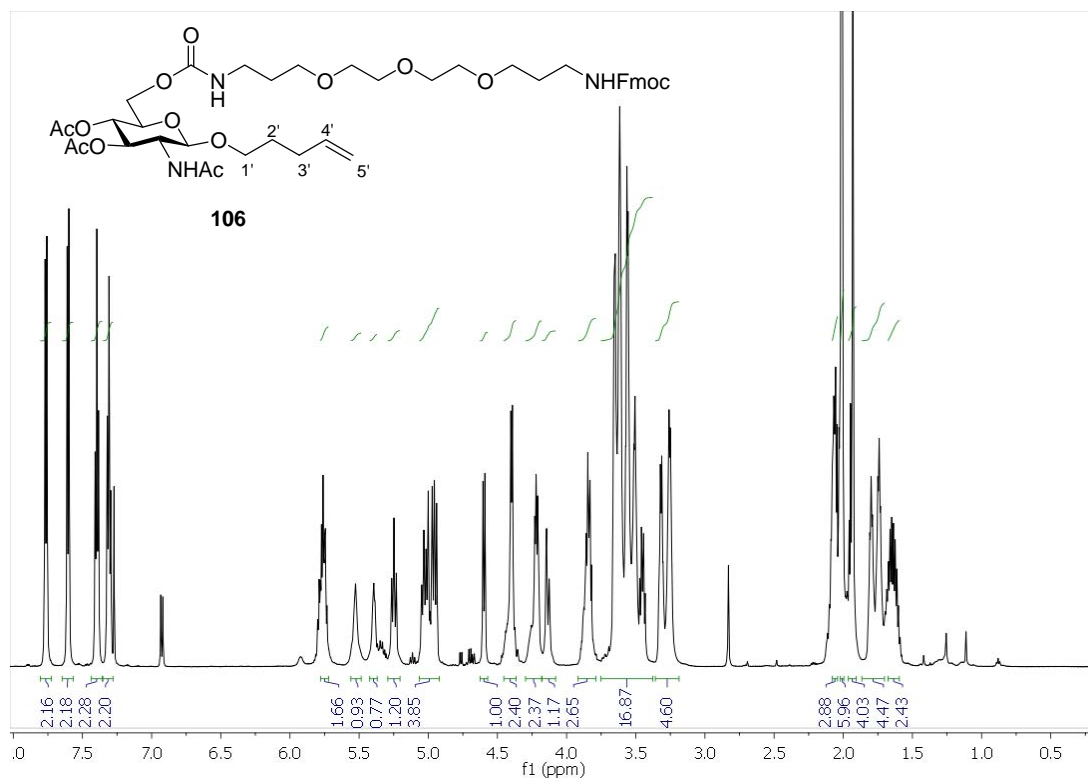


Abb. 7.8: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **106** bei 600 MHz in CDCl₃.

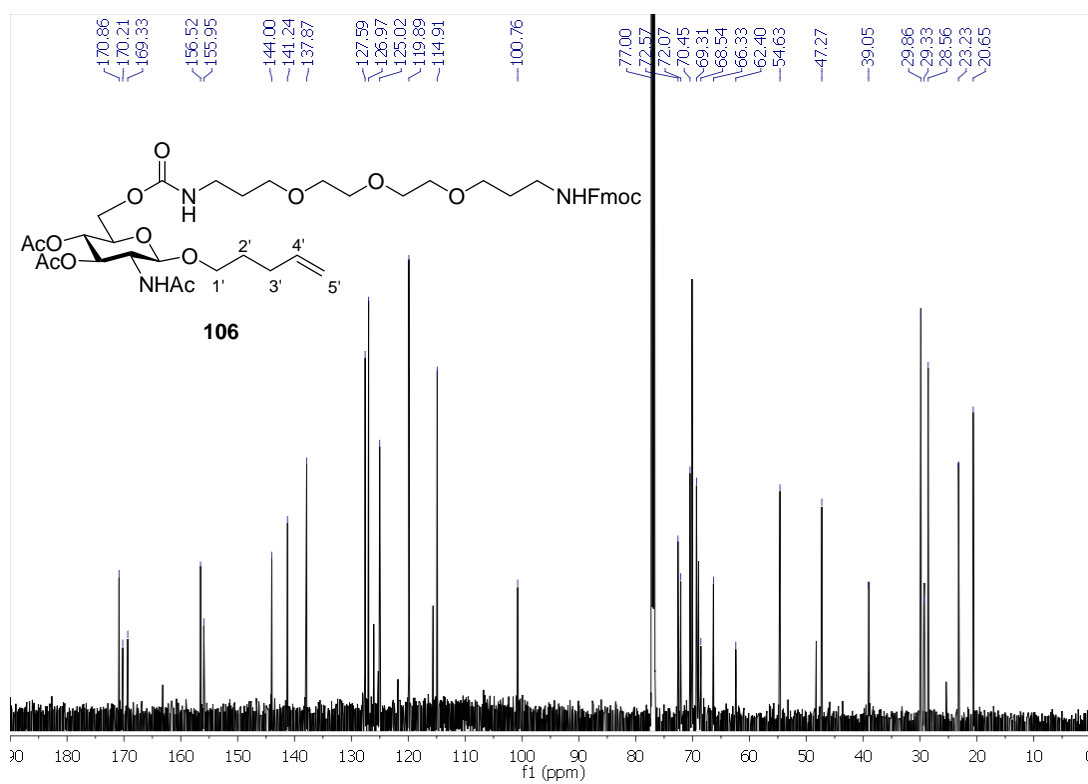


Abb. 7.9: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **106** bei 150 MHz in CDCl₃.

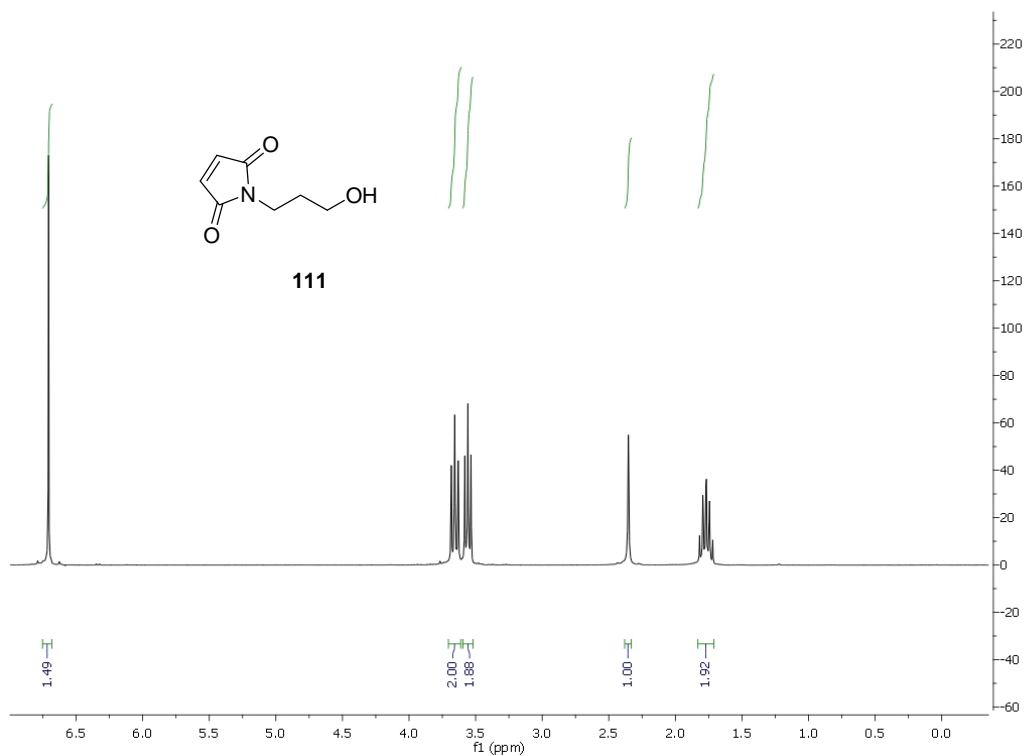


Abb. 7.12: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 111 bei 250 MHz in CDCl_3 .

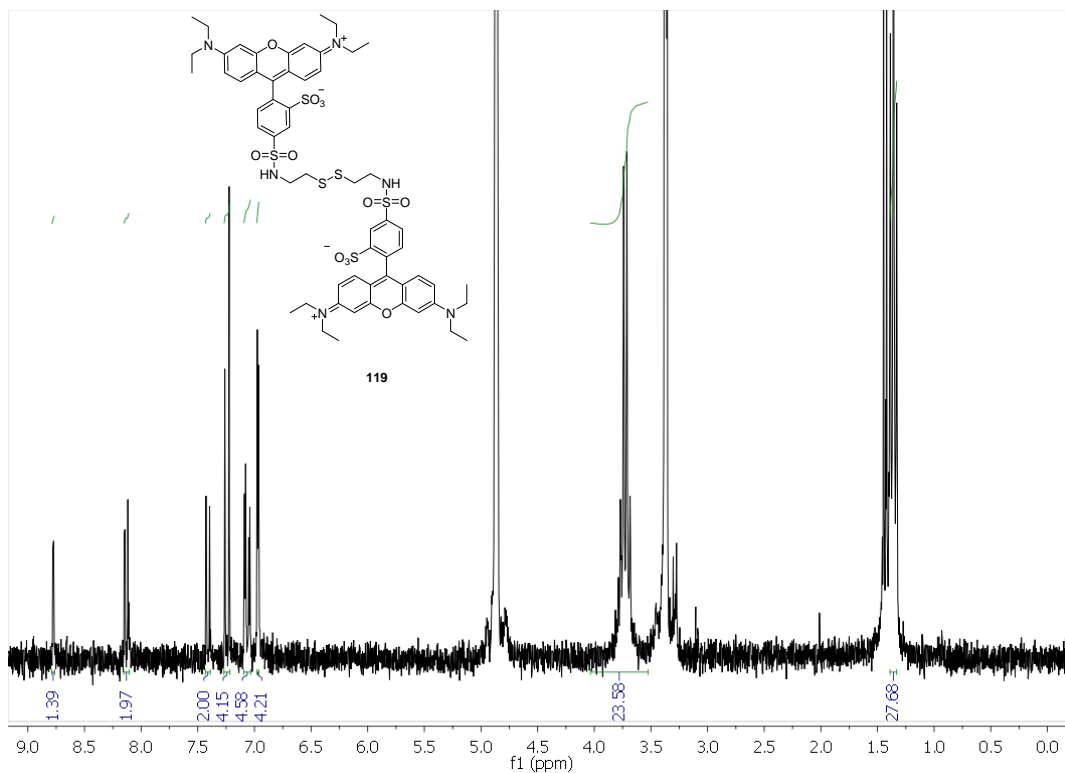


Abb. 7.13: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 119 bei 250 MHz in MeOD.

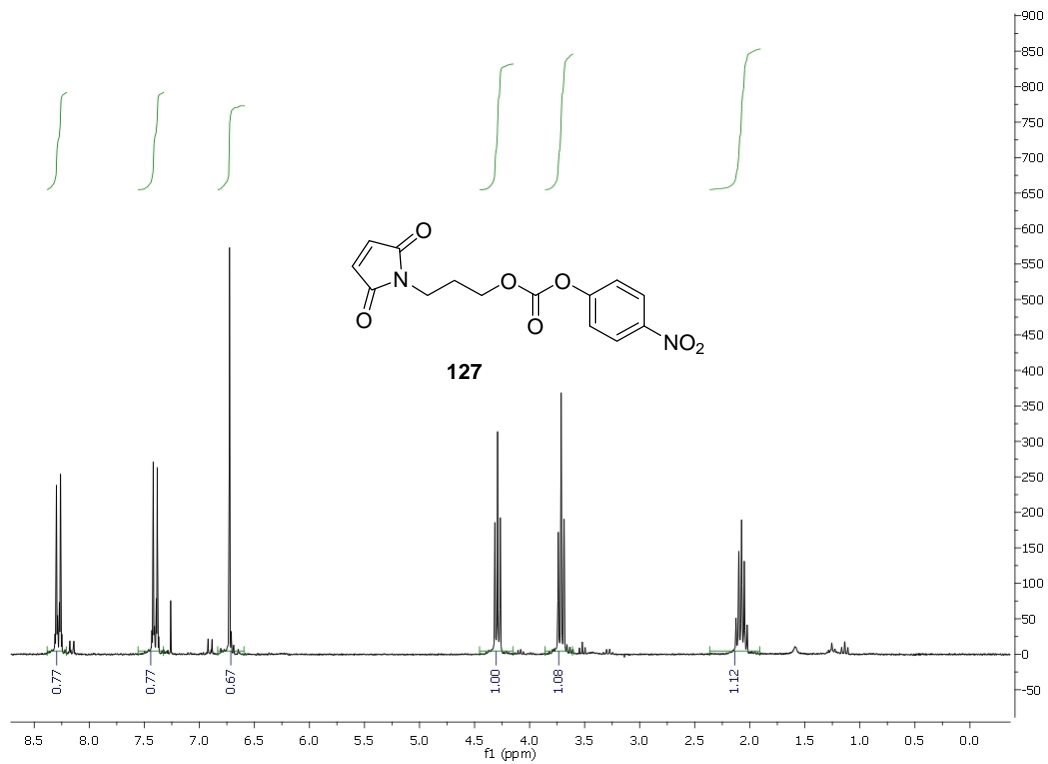


Abb. 7.14: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 127 bei 250 MHz in CDCl₃.

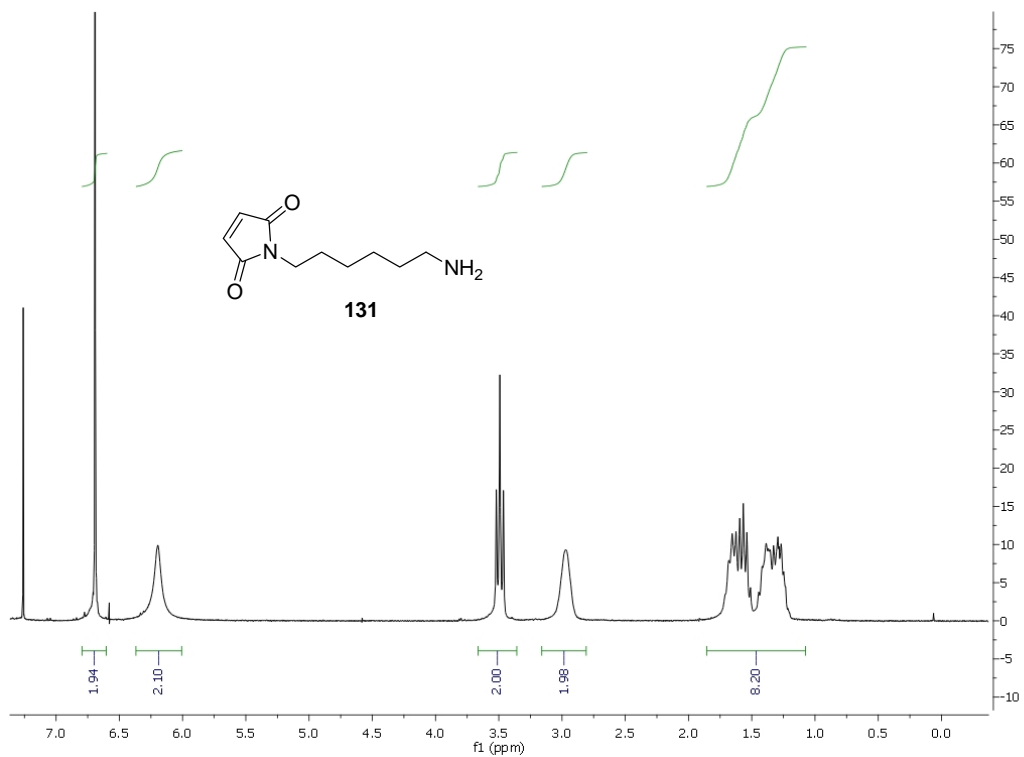


Abb. 7.15: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 131 bei 250 MHz in CDCl₃.

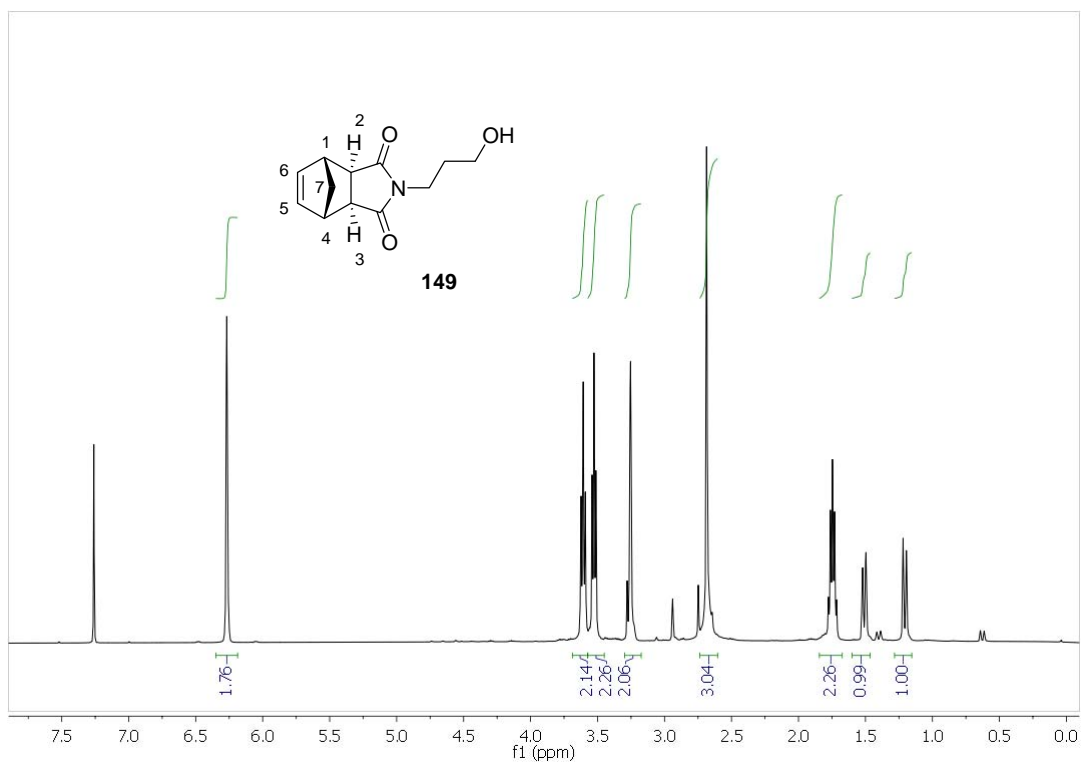


Abb. 7.16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **149** bei 400 MHz in CDCl_3

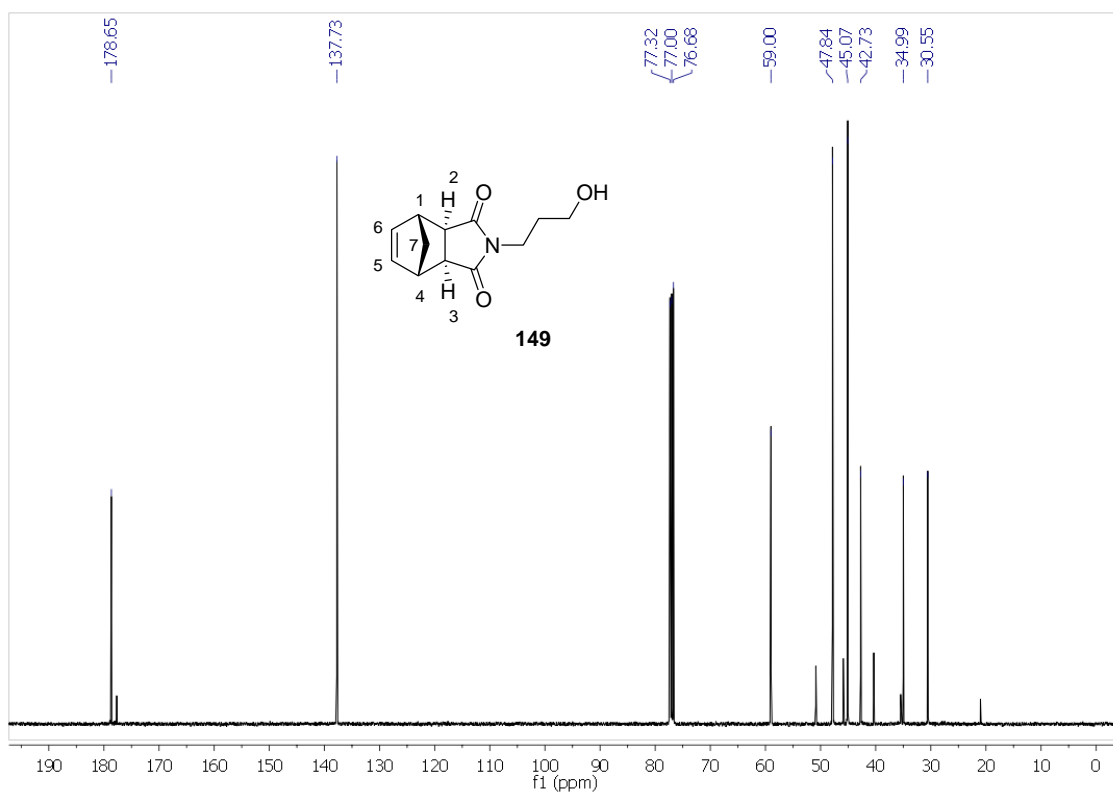


Abb. 7.17: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **149** bei 100 MHz in CDCl_3 .

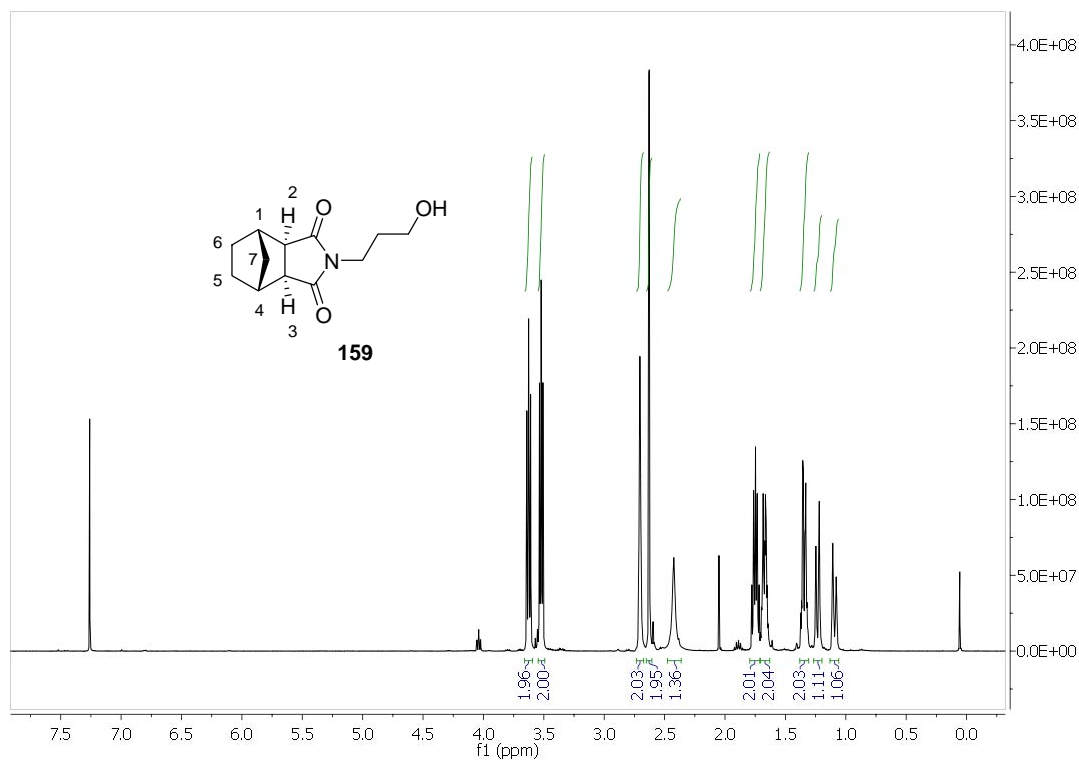


Abb. 7.18: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **159** bei 400 MHz in CDCl_3 .

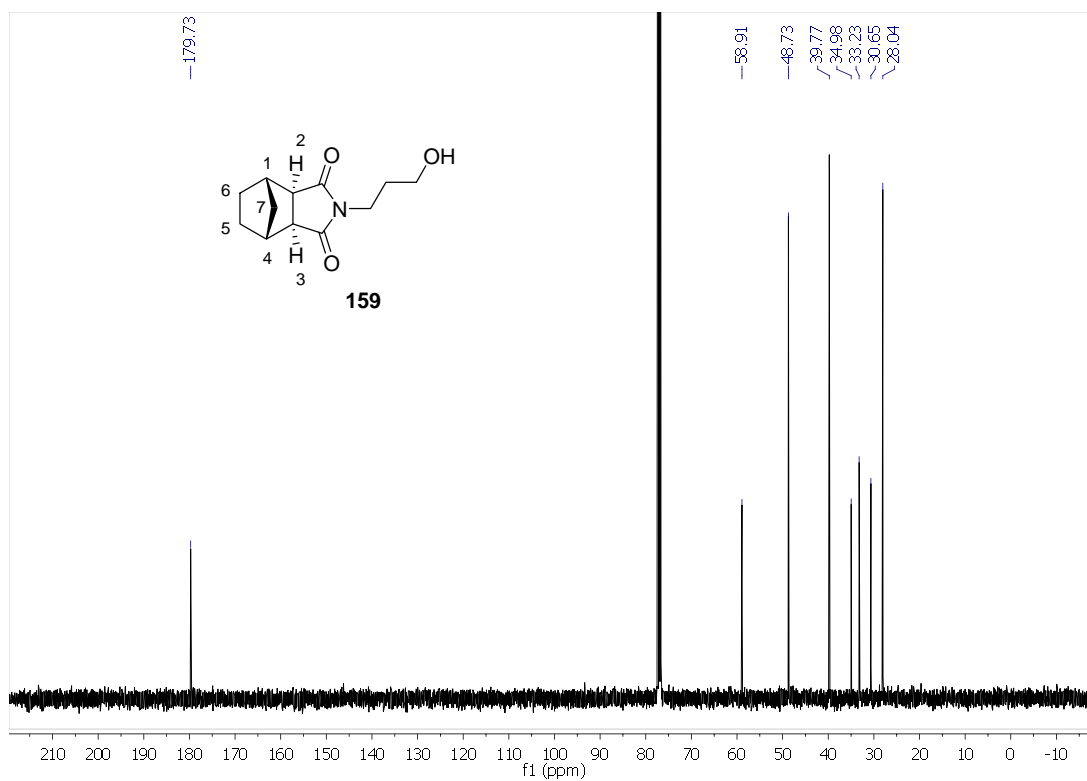


Abb. 7.19: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **159** bei 100 MHz in CDCl_3 .

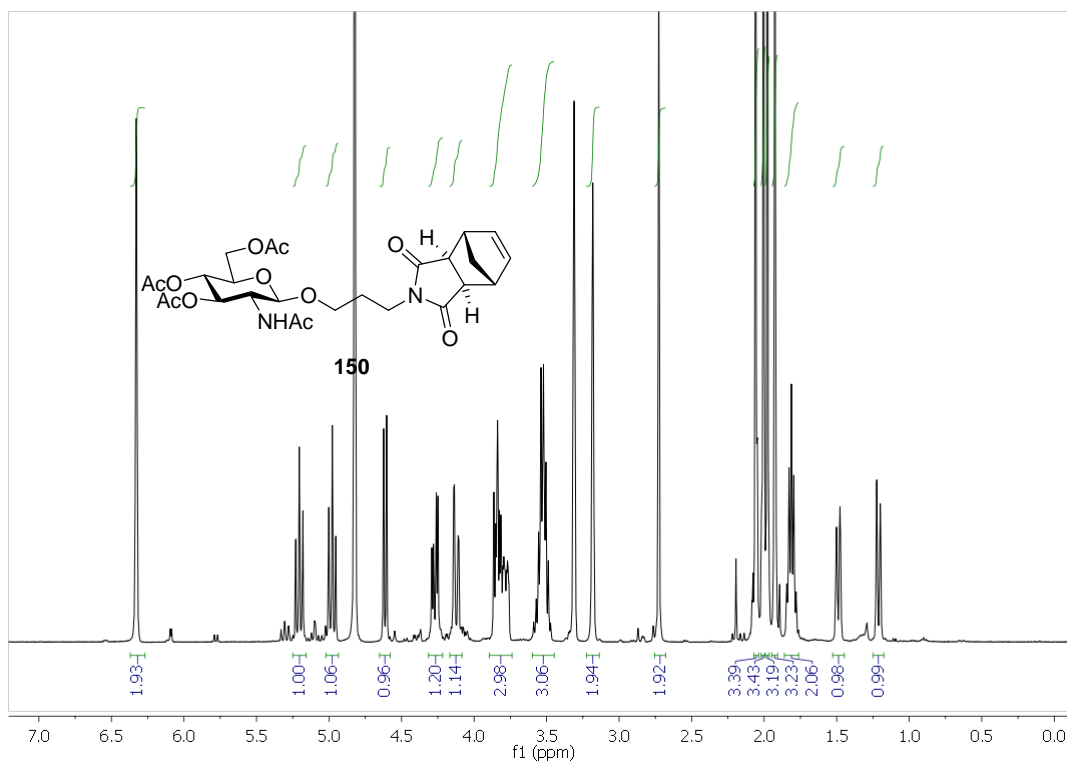


Abb. 7.20: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **150** bei 400 MHz in CDCl_3 .

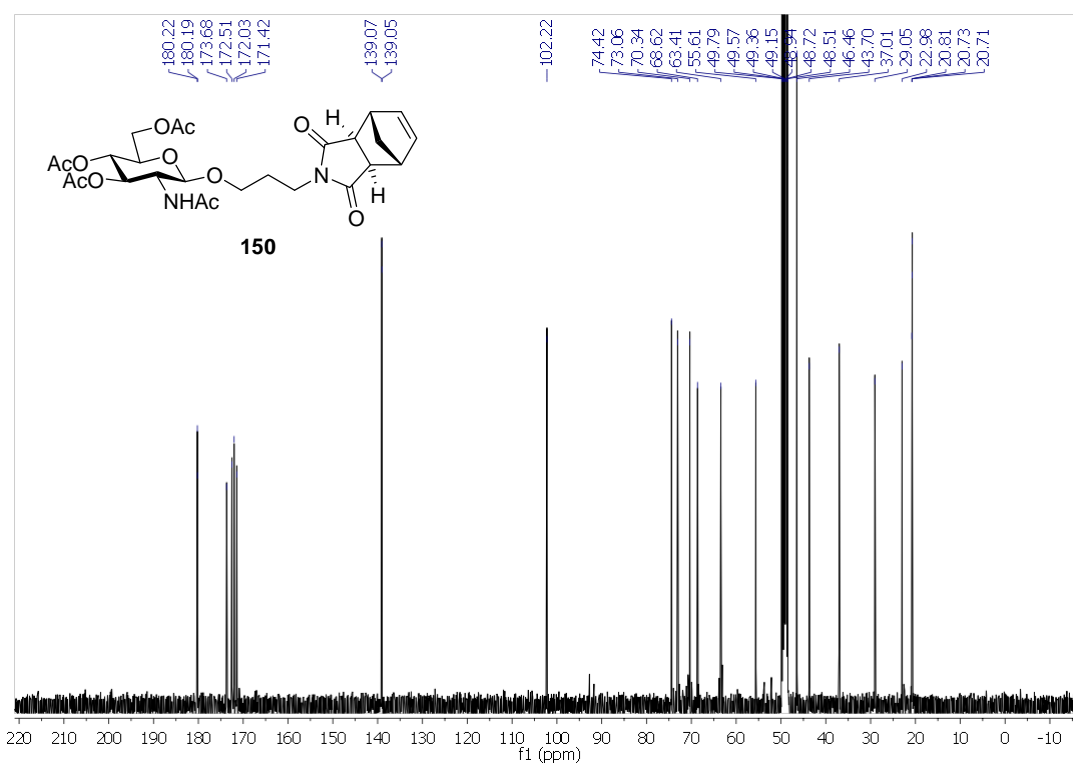


Abb. 7.21: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **150** bei 100 MHz in CDCl_3 .

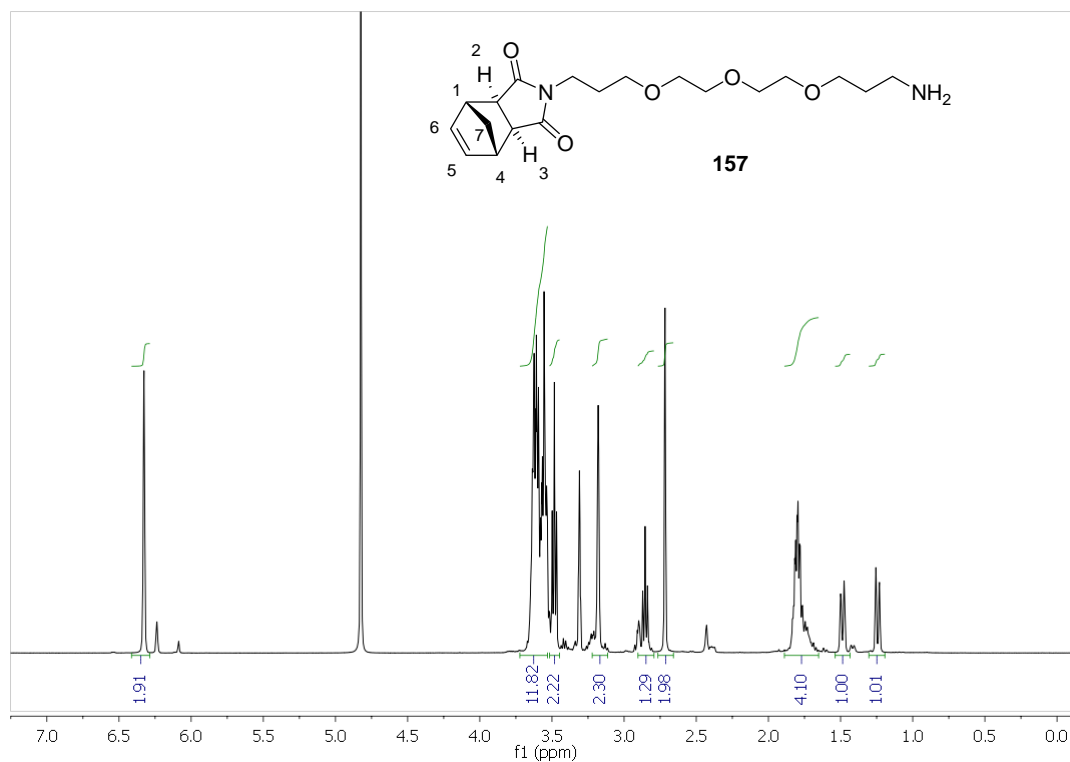


Abb. 7.22: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **157** bei 400 MHz in CDCl_3 .

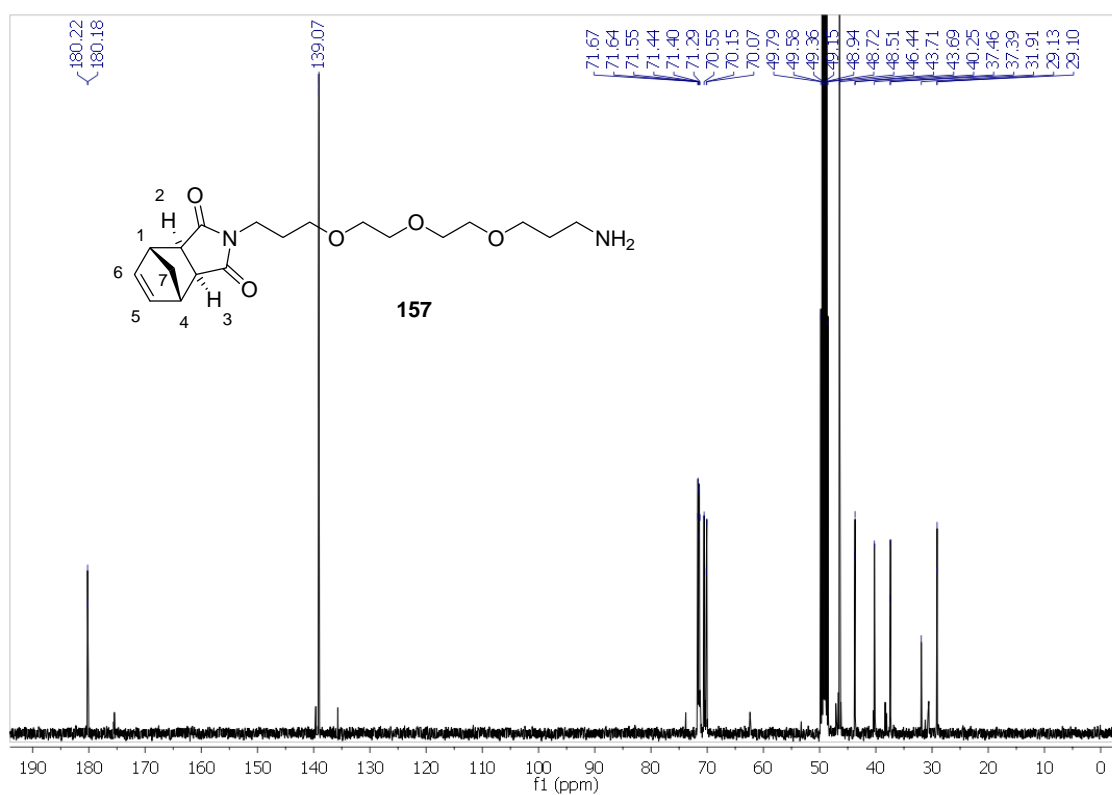


Abb. 7.23: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **157** bei 100 MHz in CDCl_3 .

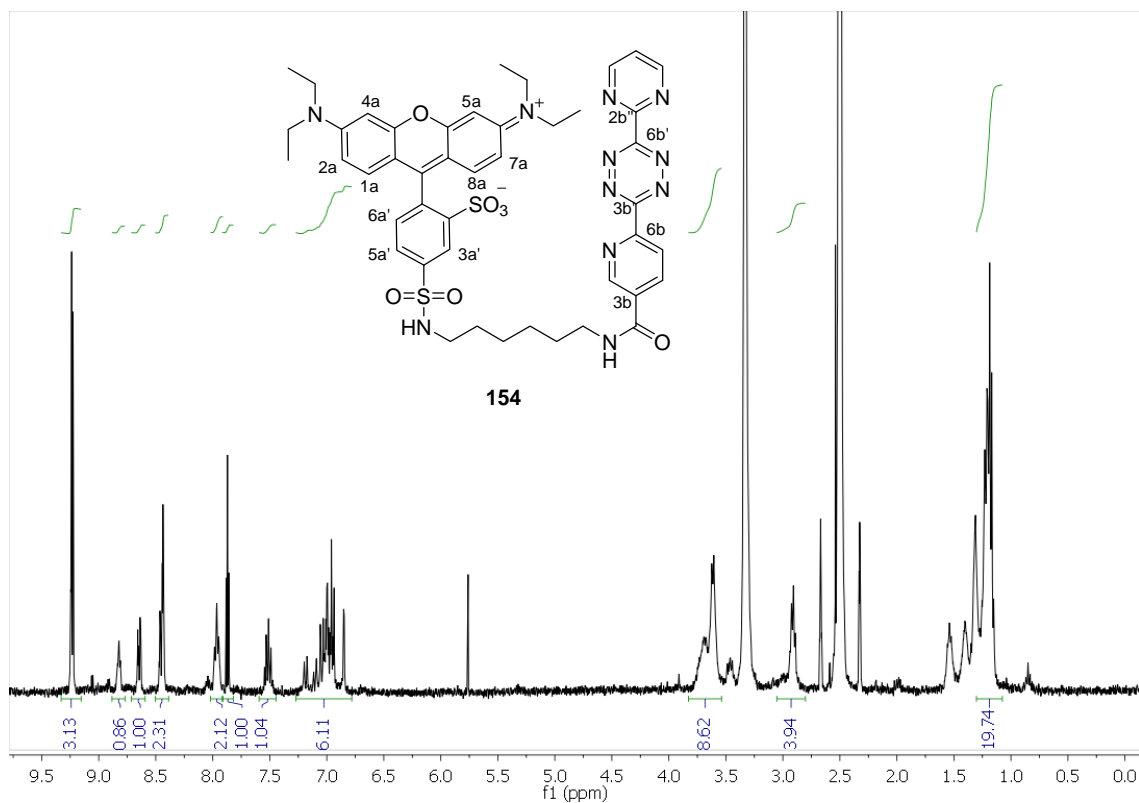


Abb. 7.24: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **154** bei 400 MHz in DMSO-d₆.

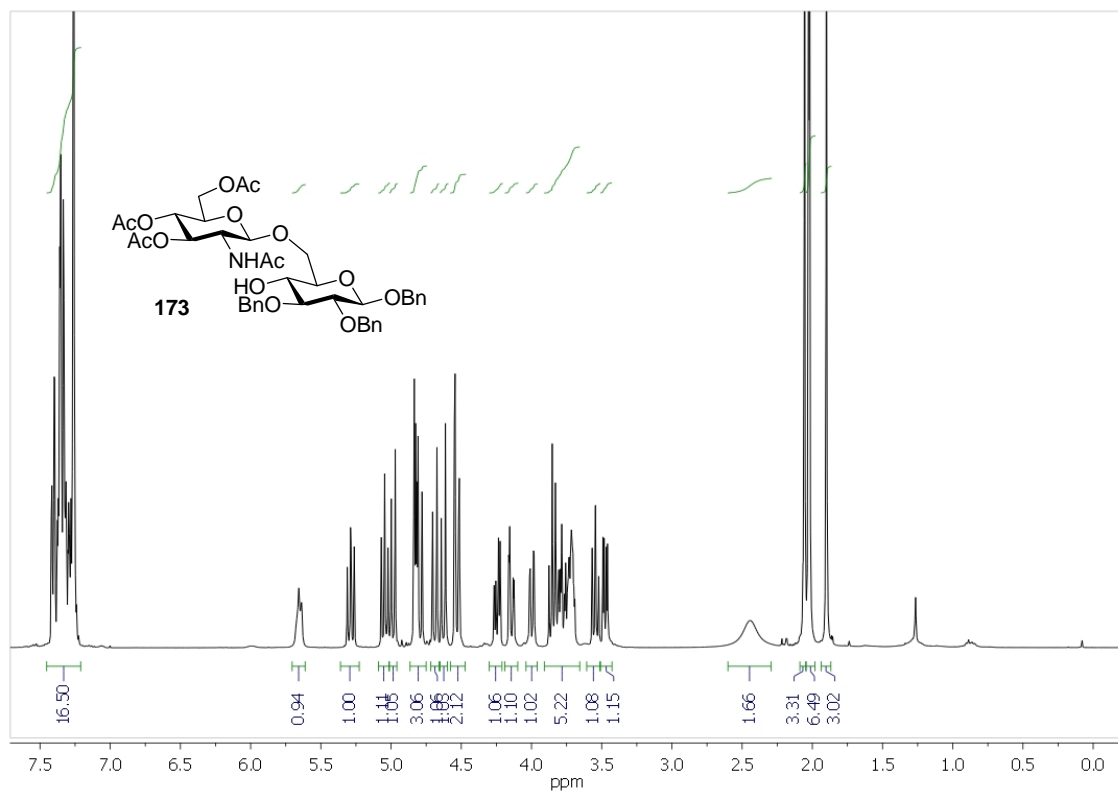


Abb. 7.25: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **173** bei 400 MHz in CDCl₃.

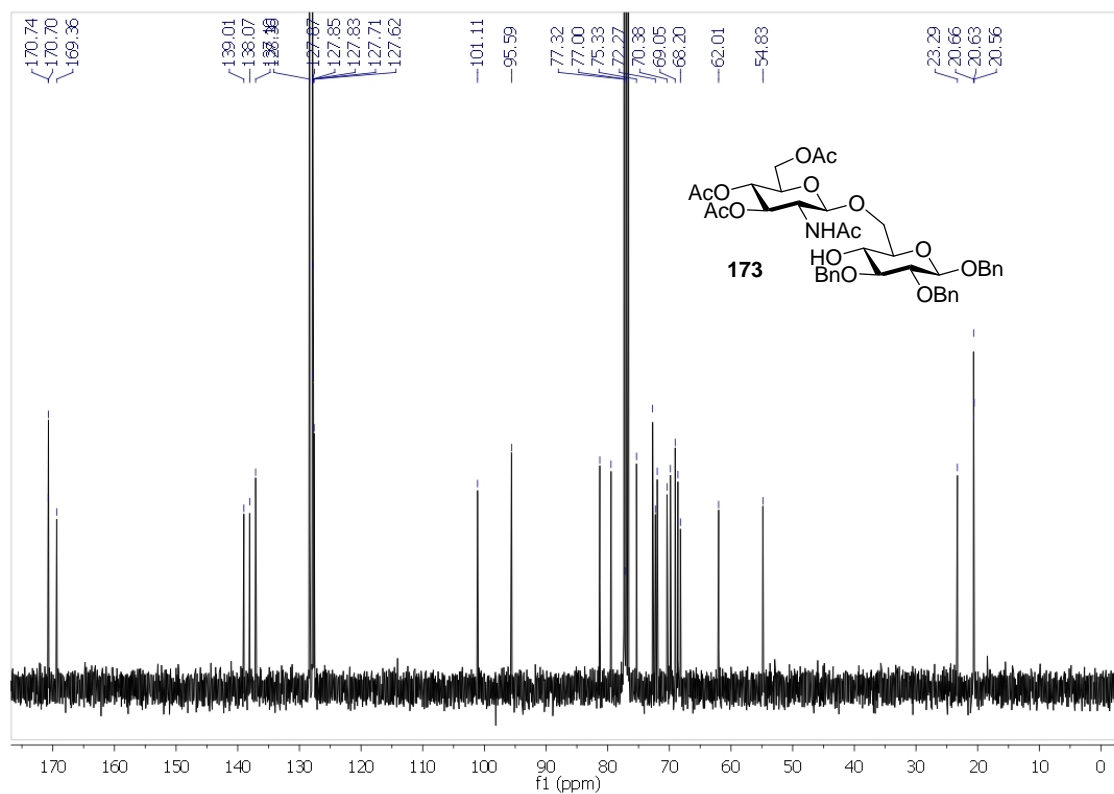


Abb. 7.26: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **173** bei 100 MHz in CDCl_3 .

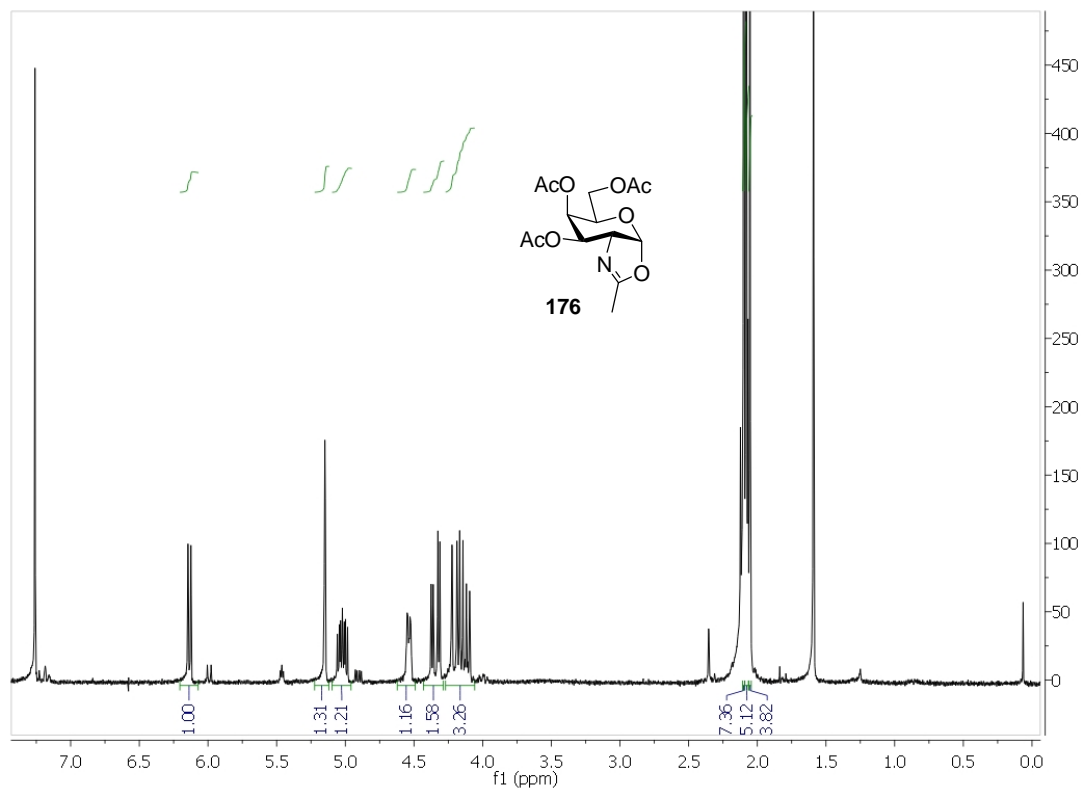


Abb. 7.27: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **176** bei 400 MHz in CDCl_3 .

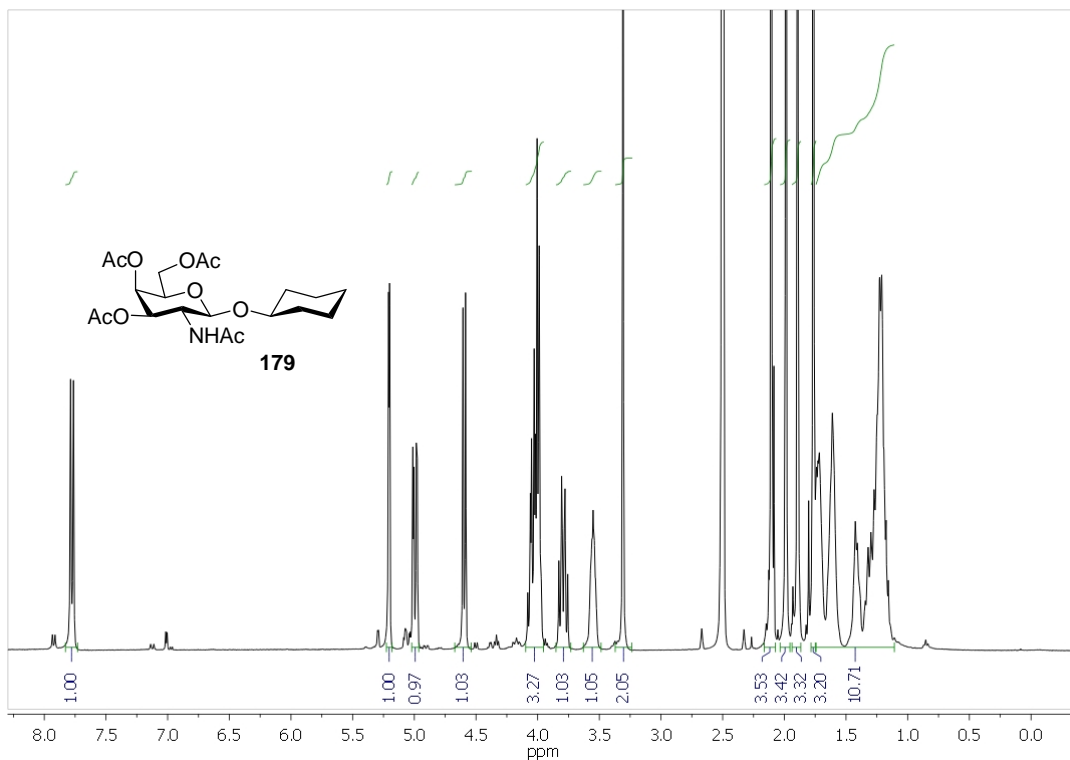


Abb. 7.28: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 179 bei 600 MHz in DMSO-d₆.

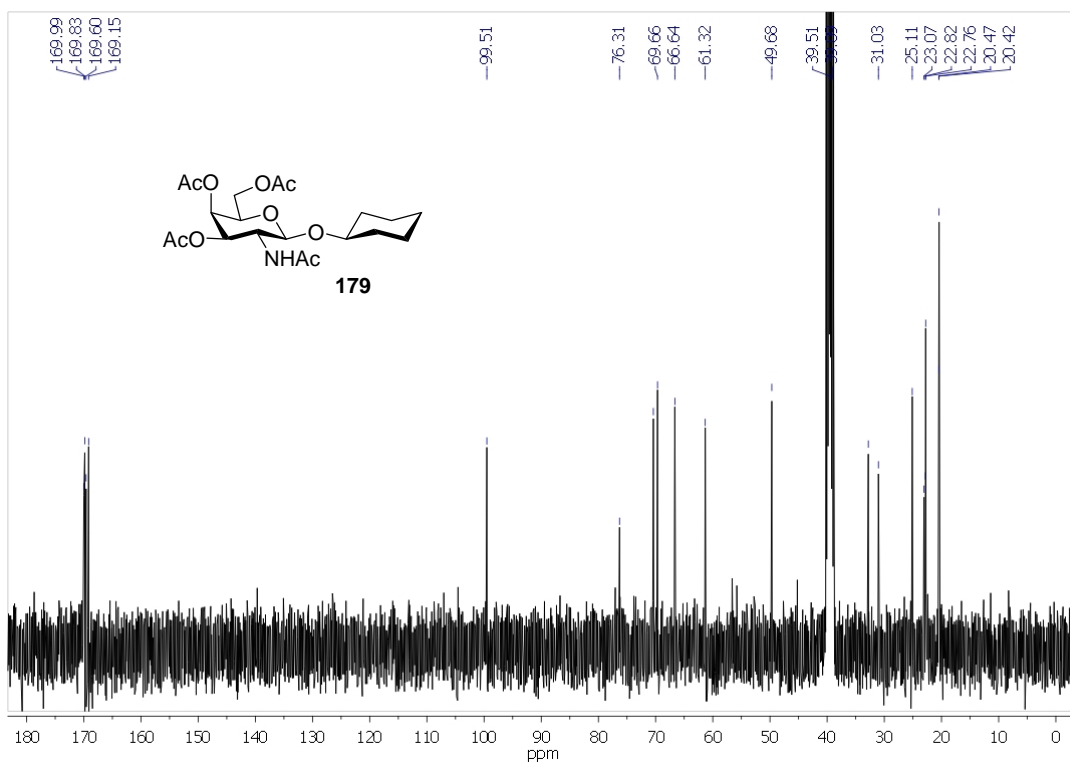


Abb. 7.29: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung 179 bei 150 MHz in DMSO-d₆.

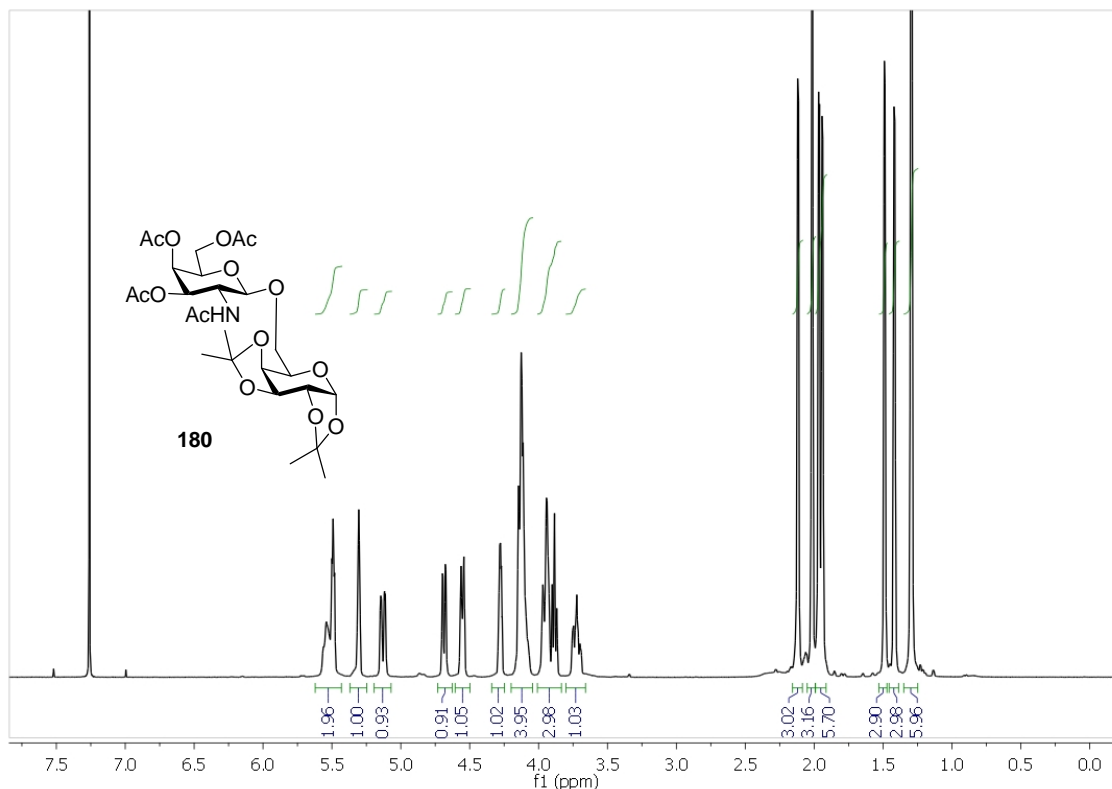


Abb. 7.30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **180** bei 600 MHz in CDCl_3 .

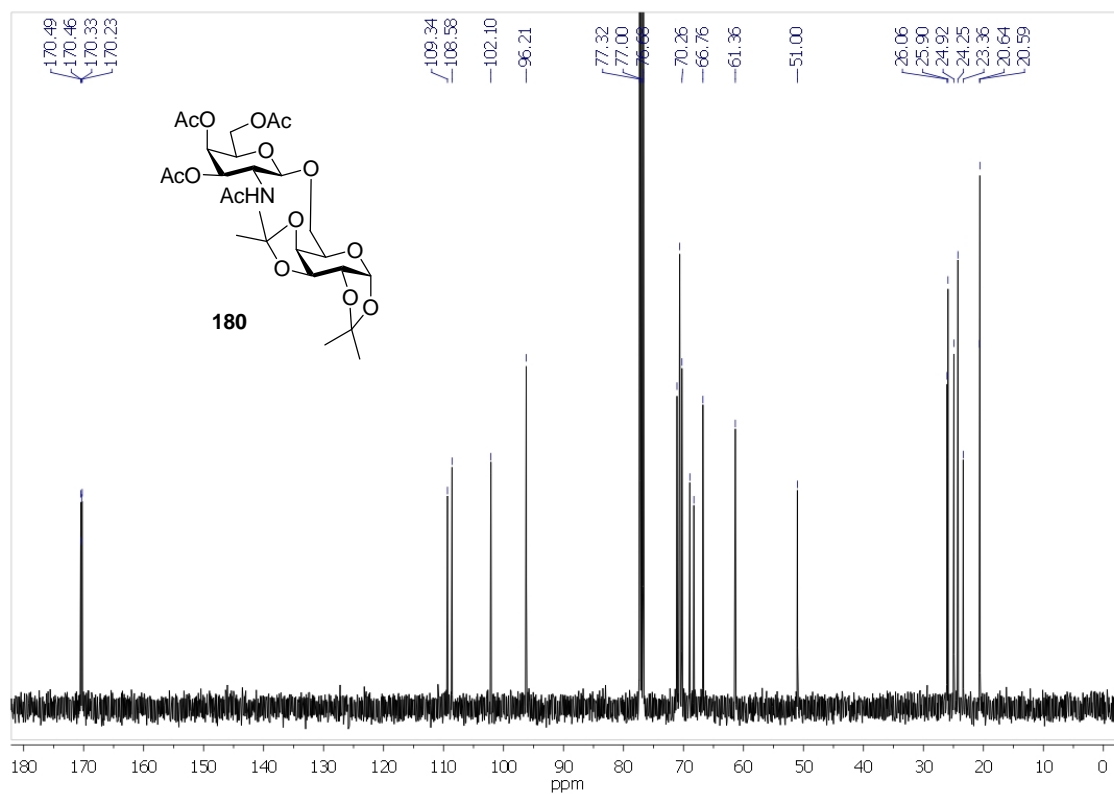


Abb. 7.31: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **180** bei 150 MHz in CDCl_3 .

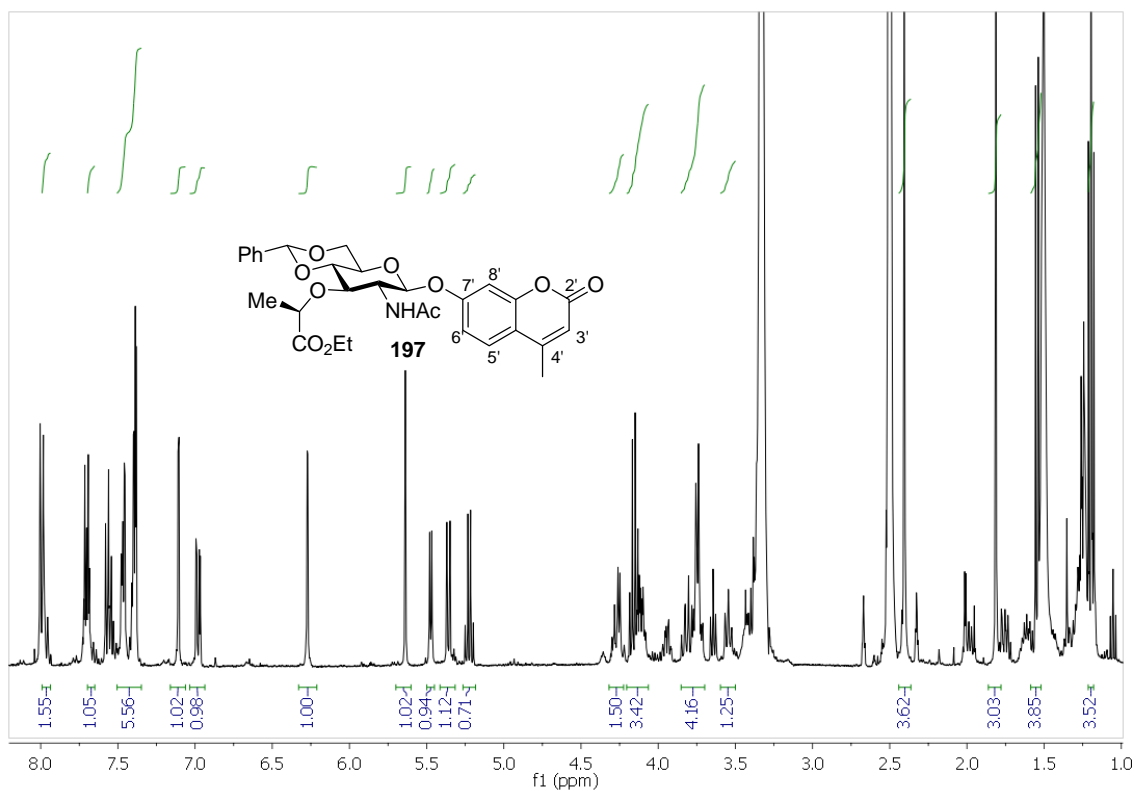


Abb. 7.32: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **197** bei 400 MHz in DMSO-d₆.

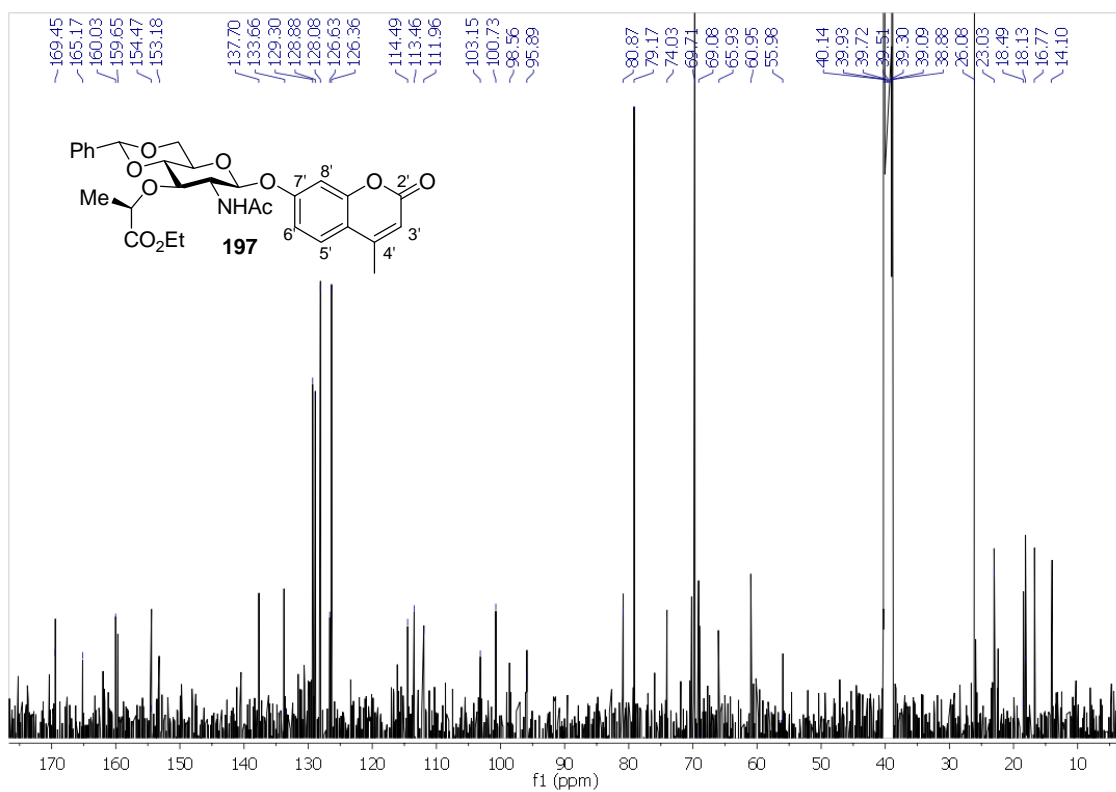


Abb. 7.33: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **197** bei 100 MHz in DMSO-d₆.

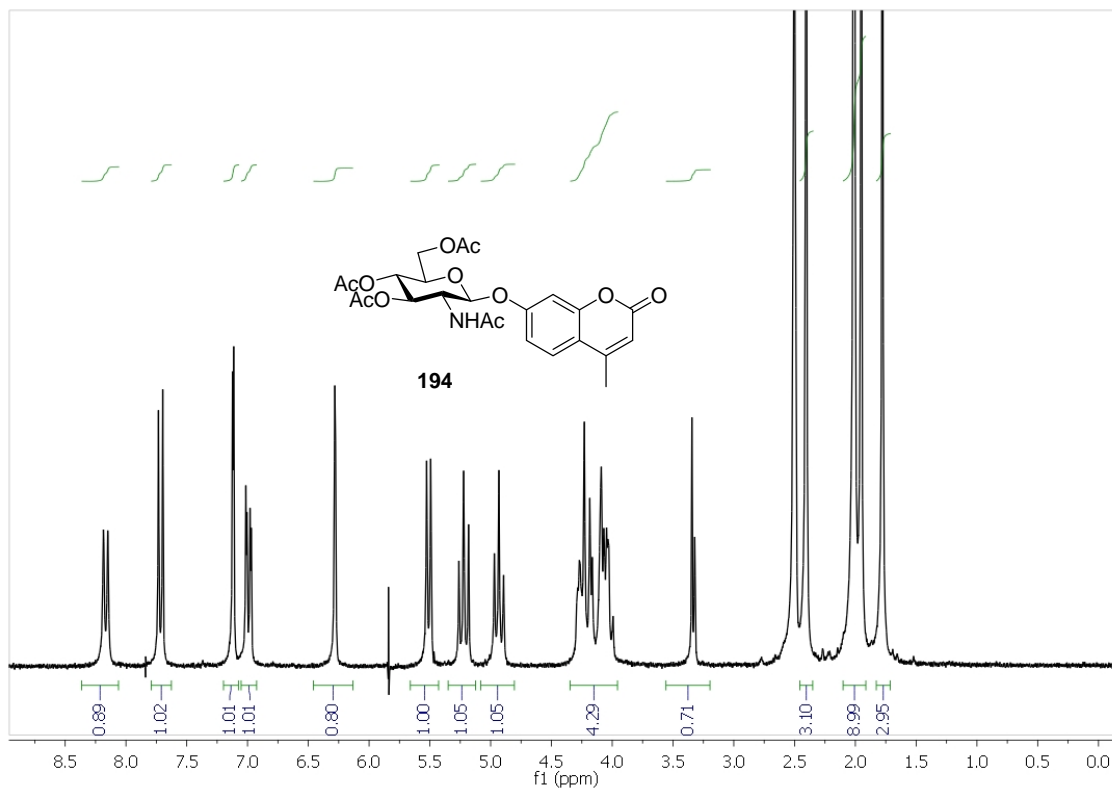


Abb. 7.34: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **194** bei 400 MHz in CDCl_3 .

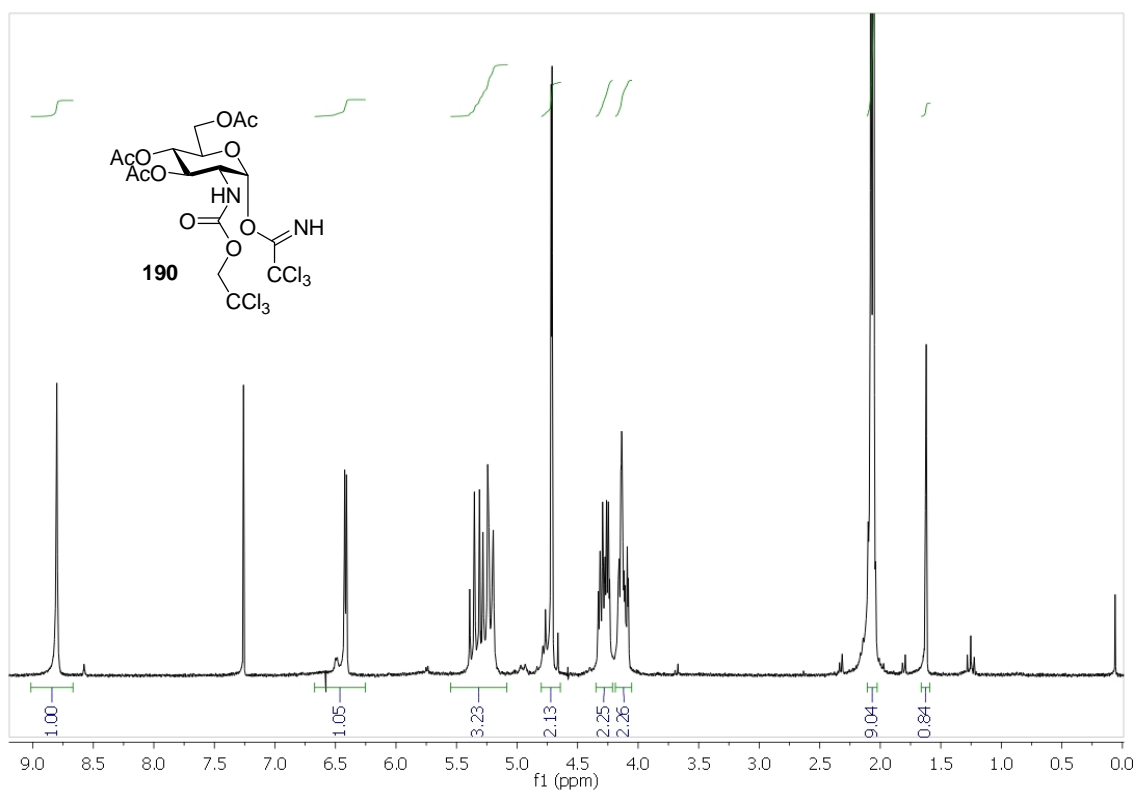


Abb. 7.35: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **190** bei 400 MHz in CDCl_3 .

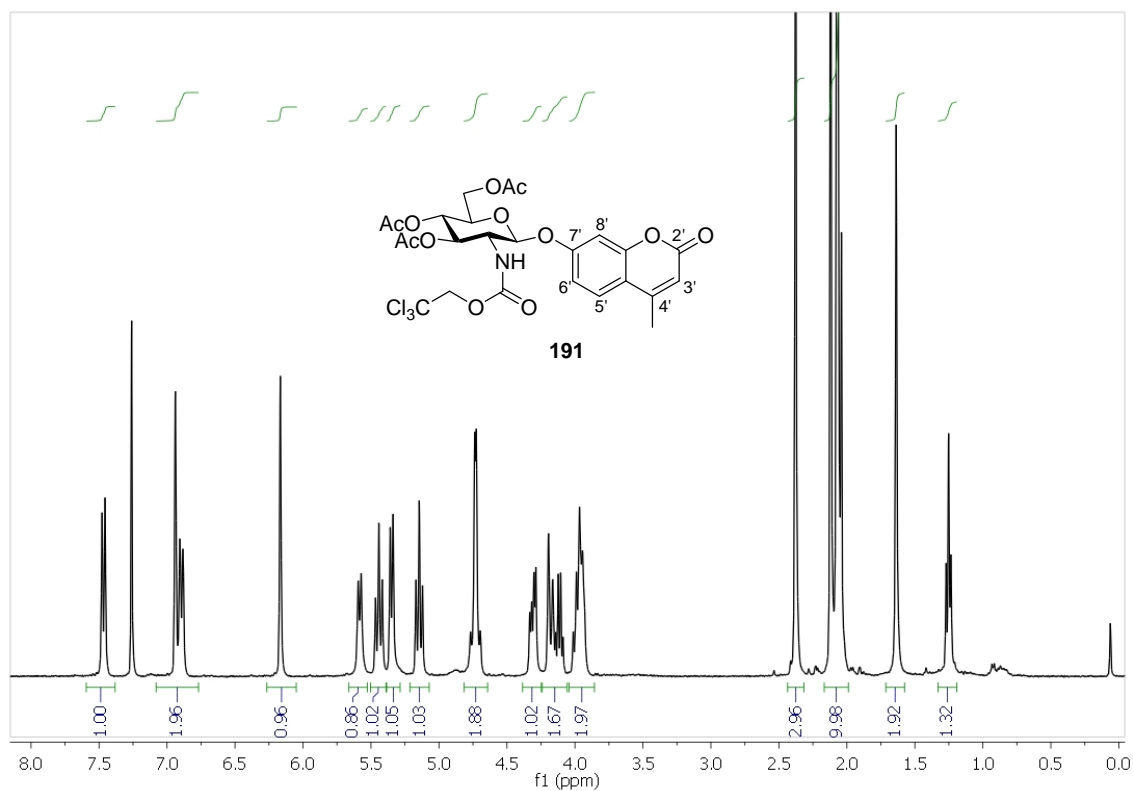


Abb. 7.36: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **191** bei 400 MHz in CDCl₃.

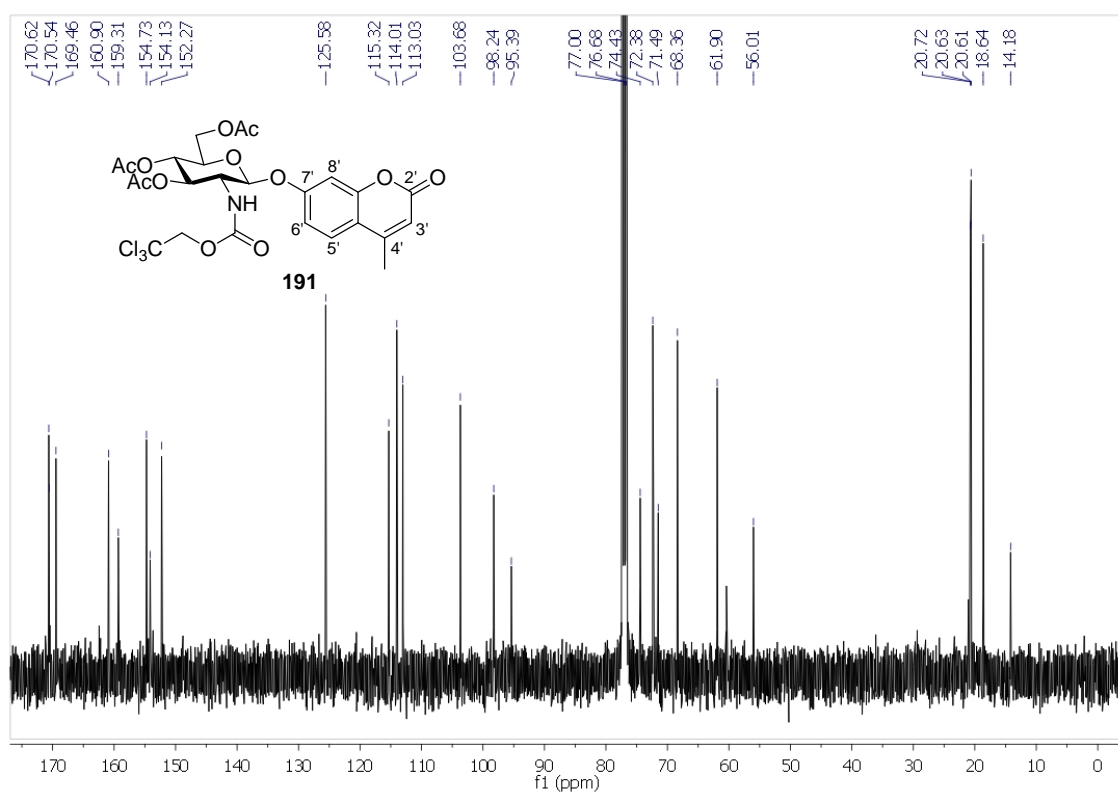


Abb. 7.37: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **191** bei 400 MHz in CDCl₃.

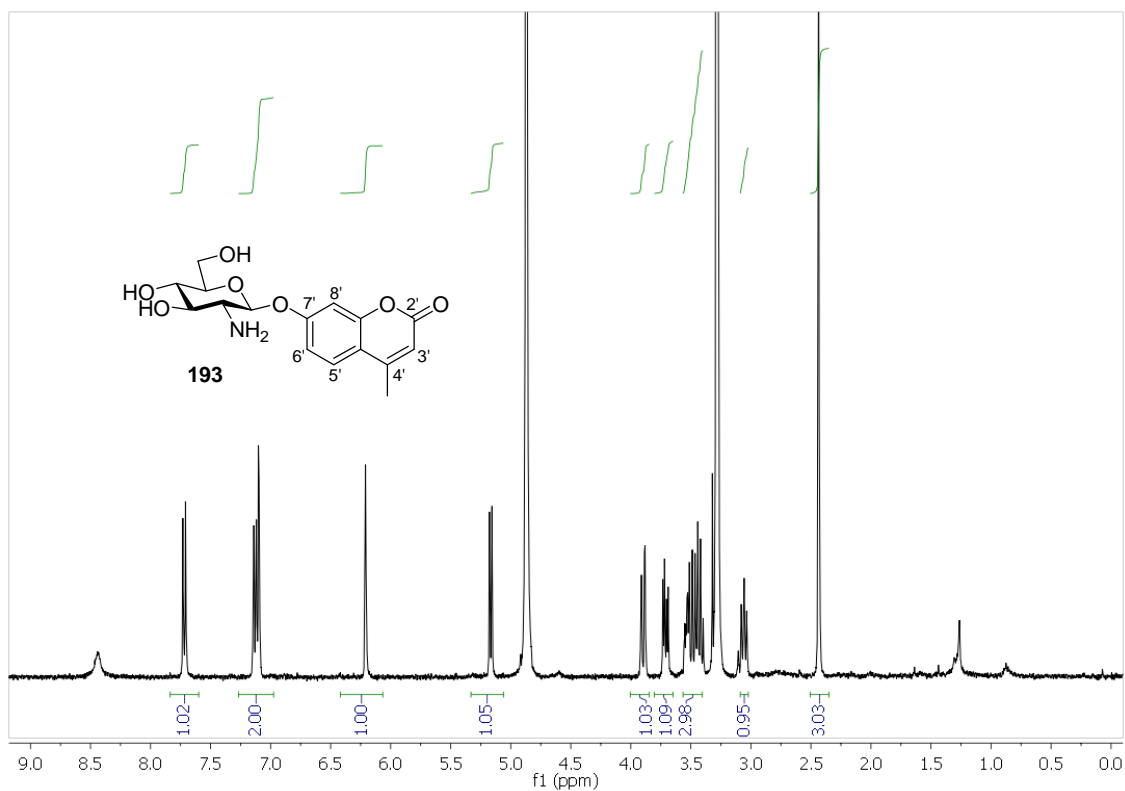


Abb. 7.38: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **193** bei 600 MHz in MeOD.

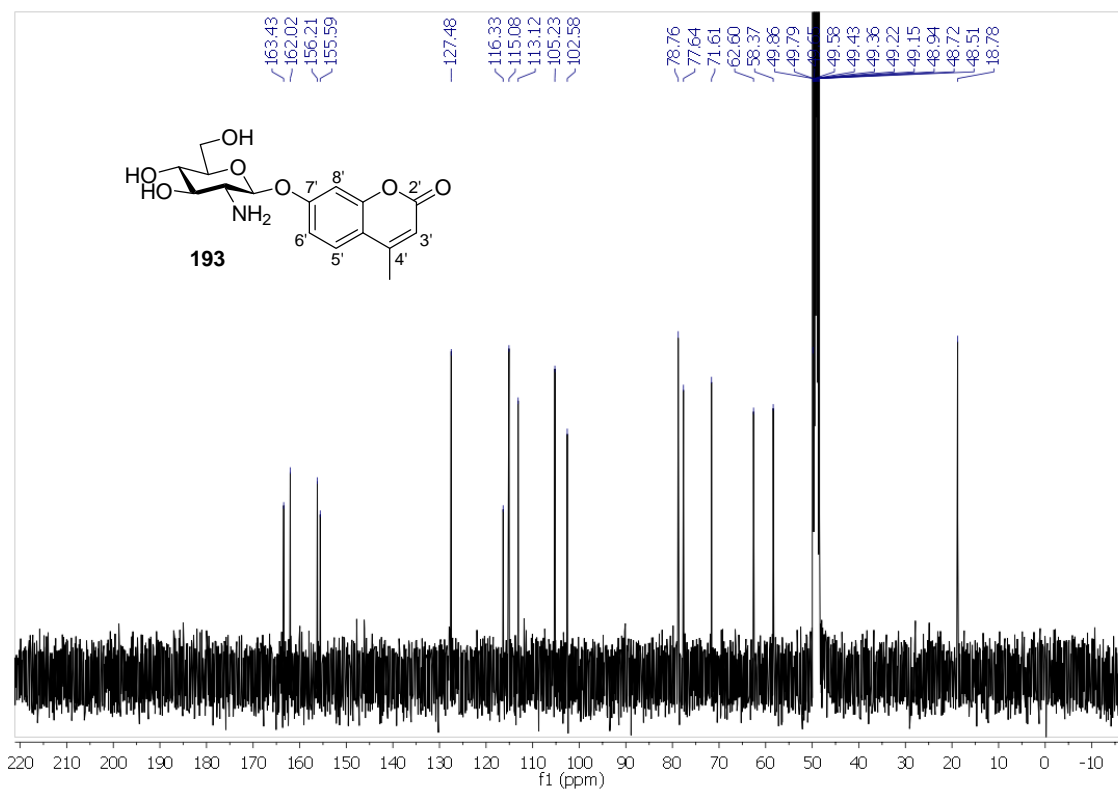


Abb. 7.39: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **193** bei 150 MHz in MeOD.