

**Identifikation und Optimierung von Liganden für die PDZ-Domänen der
Proteine Shank3 und Dishevelled 3**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jörn Saupe

aus

Brandenburg an der Havel

2011

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2007 bis April 2011 unter der Betreuung von Prof. Dr. Jörg Rademann am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Tag der Disputation 09.08.2011

*"Früher starben die Menschen mit 35 Jahren,
heute schimpfen sie bis 95 auf die Chemie."*

Carl H. Krauch (Chemiker)

Für meine Familie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. RADEMANN für die Möglichkeit, dieses interessante und anspruchsvolle Thema selbstständig bearbeiten zu können sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Betreuung.

Herrn Prof. Dr. U. HEINEMANN danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes sowie für die stets gewährte Unterstützung.

Frau Dr. A. DIEHL und ihrem Team gilt mein Dank für die Expression und Reinigung aller für die Arbeit verwendeten Proteine.

Für die Kristallisation der Proteine und Proteinkomplexe und deren Strukturaufklärung danke ich Frau Dr. Y. ROSKE. Außerdem danke ich ihr für die anregenden.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. LUGER und Frau M. WEBER für Kristallstrukturanalysen der „kleinen Moleküle“ bedanken.

Der Screening-Unit unter Leitung von Herrn Dr. J.-P. von KRIES danke ich für die Unterstützung während des Screenings der ChemBioNet-Bibliothek und die Mitbenutzung der Geräte.

Herrn Dr. G. KRAUSE und Herrn Dipl. Bioinf. C. SCHILLINGER bin ich dankbar für die durchgeführten Dockingexperimente und das virtuelle Screening.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die interessanten und hilfreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. L. PEREPELITCHENKO, Dr. M. F. SCHMIDT und Dipl. Chem. M. RICHTER.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Teilprojektes fünf „Modulation of PDZ domain-mediated protein-protein interactions“ (Forschergruppe 806).

Außerdem danke ich meiner Familie, meinen Eltern und Großeltern sowie meinen Freunden für die Unterstützung und die gemeinsam verbrachte Zeit.

Zusammenfassung

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) sind für die Bildung von Proteinnetzwerken von entscheidender Bedeutung, beispielsweise in der Signaltransduktion oder der Apoptose. Die Interaktionen der Proteine werden durch PPI-Domänen realisiert. Inhibitoren von PPIs werden wie z.B. Paclitaxel bereits klinisch für die Krebstherapie eingesetzt. Außerdem sind verschiedene Krankheiten mit Fehlfunktionen im Auf- bzw. Abbau von Proteinnetzwerken assoziiert, so dass Inhibitoren für die entsprechenden PPI-Domänen einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung dieser Fehlfunktion bzw. zur Therapie leisten können.

Eine der am weit verbreiteten PPI-Domänen ist die *Postsynaptic density 95/Discs large/Zonula occludentes-1* (PDZ)-Domäne. In dieser Arbeit wurde die PDZ-Domäne des Proteins Shank3 näher untersucht. Dieses Protein ist das zentrale Gerüstprotein in der exzitatorischen Synapse. Besonders die PDZ-Domäne ist für die Lokalisation des Proteins essenziell. Mutationen des *Shank*-Gens wurden im Zusammenhang mit Autismus beobachtet. Eine signifikant geringere Menge des Shank-Proteins wurde bei Alzheimerpatienten nachgewiesen. Selektive Liganden dieser PDZ-Domäne können wesentlich zur Aufklärung der Mechanismen dieser Krankheiten beitragen

Um Liganden für die Shank3-PDZ-Domäne zu finden, wurde eine Fluoreszenzpolarisation (FP)-Assay etabliert und für das Screening der ChemBioNet-Bibliothek verwendet. Tetrahydrochinolinderivate wurden als aktive Verbindungen identifiziert. Die Synthese und Untersuchung einer fokussierten Bibliothek von Chinolinderivate ergab insgesamt vier aktive Verbindungen (K_I -Werten von 10 – 70 μM). Die Ergebnisse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungs (SAR)-Studie konnten durch die Kristallstruktur der Shank3-PDZ-Domäne im Komplex mit einem der Tetrahydrochinolinderivate erklärt werden. Die Selektivitätsuntersuchung, durchgeführt an den PDZ-Domänen von DVL3, PSD-95 und Syntrophin, zeigte eine breite Aktivität der Chinolinderivate.

Um selektivere Inhibitoren zu erhalten, wurden diverse Fragmente (aus dem virtuellen Screening bzw. dem Screening einer Fragmentbibliothek) und ein Peptidmimetikum untersucht. Das Peptidmimetikum, in dem das C-terminale Carboxylat durch ein Tetrazol substituiert war, zeigte wie die Fragmente eine geringe Affinität ($K_I \geq 300 \mu\text{M}$).

Das zweite untersuchte Protein, das DVL-Protein, ist ein essenzieller Teil des kanonischen Wnt-Signalwegs. Eine permanente Aktivierung dieser Signalkaskade wurde bei diversen Krebserkrankungen beobachtet. Außerdem ist bekannt, dass das Fehlen der PDZ-Domäne des DVL-Proteins den Wnt-Signalweg herunterreguliert. Inhibitoren dieser PDZ-Domäne sollten folglich den gleichen Effekt erzeugen.

Aus Vorarbeiten waren Anthranilsäurederivate als Inhibitoren für die DVL3-PDZ-Domäne bekannt. Es wurden weitere Derivate synthetisiert, die K_D -Werte von bis zu 7 μM aufwiesen. Für einen dieser Liganden konnte eine selektive Bindung an die DVL3-PDZ-Domäne gegenüber der DVL1-PDZ-Domäne nachgewiesen werden. Durch Kristallstrukturen von zwei Liganden jeweils im Komplex mit der DVL3-PDZ-Domäne konnte der Bindungsmodus aufgeklärt und damit eine Erklärung für die Selektivität geben werden.

Die hier beschriebenen Liganden der PDZ-Domänen von Shank3 und DVL3 zeigten Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich ($K_I = 10 \mu\text{M}$ für die Shank3-PDZ-Domäne und $K_D = 7 \mu\text{M}$ für die DVL3-PDZ-Domäne).

Abschließend ist festzuhalten, dass die Interaktion mit der Carboxylatbindungsstelle der PDZ-Domäne für die Bindung unabdingbar ist. Gelingt es zusätzliche Interaktionen, beispielsweise entlang der Peptidbindungsspalte, zu generieren, sollte eine Erhöhung der Affinität bis in den nanomolaren Bereich möglich sein.

Abstract

Protein-protein interactions (PPIs) are important for the formation of protein networks, e.g. in signal transduction or apoptosis. The interactions of proteins are mediated by PPI domains. Inhibitors of PPIs, e.g. Paclitaxel are already in use for cancer therapy. Furthermore, problems concerning the formation or degradation of protein networks are interconnected to several diseases. Inhibitors for these PPI domains are useful as therapeutics as well as tool compounds to elucidate the mechanism of such diseases.

One of the most widespread PPI domains is the Postsynaptic density 95/Discs large/Zonula occludentes-1 (PDZ) domain. In the present work the PDZ domain of the protein Shank3 was the subject of investigation. The Shank protein is the central scaffold protein of excitatory synapses. Especially the Shank PDZ domain is crucial for the localization of the protein within the synapse. Mutations in the Shank gene are linked to autism spectrum disorders. A significant reduction of Shank contents in the synapse is reported for Alzheimer patients. Selective inhibitors of the Shank PDZ domain could be used as tool to clarify the mechanisms of these disorders.

In order to screen the ChemBioNet library a homogeneous binding assay based on fluorescence polarization (FP) was developed. The screening revealed tetrahydroquinoline derivatives as ligands for the Shank3 PDZ domain. After synthesizing and analyzing a focused library of quinoline derivatives four compounds showed activity (K_I values between 10 and 70 μM) in regard to the Shank3 PDZ domain. The result of a structure activity relationship study was completely confirmed by the crystal structure of the Shank3 PDZ domain in complex with a tetrahydroquinoline derivative of the focused library. Binding studies of the active compounds using the PDZ domains of PSD-95, Dishevelled 3 (DVL3) and syntrophin were performed. All tested compounds showed bindings to several PDZ domains.

To obtain selective ligands several fragments derived from a virtual screening and a screening of a fragment library were tested. Additionally a peptide analogue with a C-terminal tetrazole as a known isoster of a carboxylate was synthesized and tested. It showed as well as the fragments weak binding to the PDZ domain (peptide analogue: $K_I = 372 \mu\text{M}$; best fragments $K_I = 300 \mu\text{M}$).

The DVL3 protein was the second one investigated in this work. DVL is a crucial part of the canonical Wnt signaling. A permanent activation of this signaling cascade was observed in

cancer. It is known that the absence of the PDZ domain in DVL results in a down-regulation of Wnt signaling. Inhibitors of the PDZ domain should cause the same effect.

From previous work, it is known that anthranilic acid derivatives are ligands for the DVL3 PDZ domain. The synthesis of derivatives revealed compounds showing K_D -values up to 7 μM . One of these compounds showed selectivity towards the DVL1 PDZ domain. The crystal structures of two ligands in complex with the DVL3 PDZ domain revealed the binding mode and explained the selectivity.

The ligands identified in this work showed affinities in the lower micromolar range ($K_I = 10 \mu\text{M}$ for the Shank3 PDZ domain and $K_D = 7 \mu\text{M}$ for the DVL3 PDZ domain). The

It can be summarized that an interaction with the carboxylate binding loop of the PDZ domain is crucial for binding of a ligand. It should be possible to generate a nanomolar affinity, if additional interactions could be produced.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Protein-Protein-Interaktion.....	1
1.2 Protein-Protein-Interaktions-Domänen.....	4
1.2.1 Phosphotyrosin und Phosphoserin bindende PPIs.....	6
1.2.1.1 <i>Src</i> homology (SH2)-Domänen.....	6
1.2.1.2 <i>Phosphotyrosine binding</i> (PTB)-Domäne.....	7
1.2.1.3 WW-Domänen.....	8
1.2.2 Polyprolin bindende PPIs.....	9
1.2.2.1 <i>Src-homology</i> (SH3)-Domänen.....	9
1.2.2.2 <i>Enabled/VASP Homology 1</i> (EVH1)-Domänen.....	10
1.2.2.3 WW-Domänen.....	11
1.2.3 Oligomerbildende PPIs.....	12
1.2.3.1 <i>Sterile alpha motive</i> (SAM)-Domänen.....	12
1.2.4 PDZ-Domänen.....	14
1.3 Liganden von PPI-Domänen.....	16
1.3.1 Überblick.....	16
1.3.2 Liganden für PDZ-Domänen.....	19
2 Aufgabenstellung.....	21
3 Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.1 Die Synapse.....	22
3.2 Das Gerüstprotein Shank.....	24
3.2.1 Shank-PDZ-Domäne.....	27
3.2.2 Assayentwicklung.....	28
3.2.3 Screening und Validierung der Hits.....	34
3.2.4 Synthese der fokussierten Tetrahydrochinolin-Bibliothek.....	36
3.2.5 Untersuchung der fokussierten Bibliothek und SAR.....	52
3.2.6 Kristallstruktur der Shank3-PDZ-Domäne im Komplex mit Liganden 63.....	58
3.2.7 Selektivitätsuntersuchung der aktiven Verbindungen.....	60
3.2.8 Alternative Methoden der Inhibitorentwicklung.....	63
3.2.8.1 Bioisostere.....	63
3.2.8.2 Fragmentbasierte Inhibitorentwicklung.....	70

Inhaltsverzeichnis

3.2.9	Ausblick	73
3.3	Das Dishevelled-Protein	74
3.3.1	Die Dishevelled-PDZ-Domäne	76
3.3.2	Assayentwicklung	77
3.3.3	Optimierung von Liganden für die DVL3-PDZ-Domäne	80
3.3.4	Ausblick	88
3.3.4.1	FP-Assay	88
3.3.4.2	Ligandenoptimierung	89
4	Fazit	92
5	Experimenteller Teil	94
5.1	Allgemein	94
5.2	Shank3-PDZ-Domäne	96
5.2.1	Assays	96
5.2.2	Synthese	97
5.3	DVL3-PDZ-Domäne	131
5.3.1	Assays	131
5.3.2	Synthese	132
6	Literatur	138
I.	Appendix	156
I.1.	Berechnung des K_I -Wertes	156
I.2.	Primärhits der Screenings	158
I.2.1.	ChemBioNet-Bibliothek	158
I.2.2.	Carboxylat-Bibliothek	161
I.3.	Auswertung des Screenings der ChemBioNet-Bibliothek	162
I.4.	Strukturdaten	163
I.4.1.	Strukturdaten der Verbindung 32	163
I.4.2.	Skturdaten der Verbundung 58b	166
I.4.3.	Strukturdaten der Verbindung 97	171
I.4.4.	Strukturdaten der Protein-Ligand-Komplexe	176
I.5.	NMR-Spektren	178
I.5.1.	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren	178
I.5.2.	^{13}C NMR-Spektrum des Tetrazolpeptids 100	180
I.6.	Abbildungsverzeichnis	181
I.7.	Tabellenverzeichnis	184

Abkürzungsverzeichnis

Δ CSP	<i>chemical shift perturbation</i>
2-PrOH	2-Propanol, Isopropanol
AA	Aminosäure / Aminosäuren
AcOH	Essigsäure
AF6	<i>ALL-1 fusion partner on chromosome 6</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
Ank	<i>ankyrin repeat</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
aq.	<i>aqua</i> – „in wässriger Lösung“
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
Chr	Chromo-(Domäne)
CK1	<i>casein kinase 1</i>
Dasm1	<i>dendrite arborization and synapse maturation 1</i>
DC	Dünschichtchromatographie / Dünnschichtchromatogramm
DEP	Dishevelled/egl 10/pleckstrin
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	dynamisches Ligationscreening
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMF- <i>d</i> ₇	deutერიertes <i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DVL	Dishevelled
ee	<i>enantiomeric excess</i> – Enantiomerenüberschuss
EE	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EVH1	<i>Enabled/VASP Homology 1</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
Fluo	Fluorescein
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe

Fmoc-SPPS	Standard-Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese
FP	Fluoreszenzpolarisation
GKAP	<i>guanylate kinase-associated protein</i>
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
hGH	<i>human growth hormone</i>
hGHbp	<i>human growth hormone binding protein</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> – höchstes besetztes Molekülorbital
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> – isotherme Titrationskalorimetrie
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor related protein</i>
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> – niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOH- <i>d</i> ₄	deuteriertes Methanol
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MW	Mikrowelle
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-aspartat
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> – nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PDZ	PSD-95/Discs-large/Zonula occludens-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PICK1	<i>protein interaction with protein C kinase Cα</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PPII-Helix	Polyprolin Type II-Helix
PSD	<i>postsynaptic density</i> – postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>postsynaptic density 95kDa</i>
Ret9	<i>receptor tyrosine kinase subtype 9</i>
SAM	<i>sterile alpha motive</i>
SAR	<i>structure activity relationship</i> – Struktur-Aktivitäts-Beziehung
SH2	<i>Src homology 2</i>

SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SNTA1	Alpha-1-syntrophin
SSTR2	<i>somatostatin receptor subtype 2</i>
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription 3</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TCF	<i>T-cell factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
Ub	Ubiquitin
UIM	<i>ubiquitin interacting motive (Domäne)</i>
ZNS	Zentralnervensystem
β -TrcP	<i>β-transducin repeat-containing protein</i>

1 Einleitung

1.1 Protein-Protein-Interaktion

In nahezu allen zellulären Prozessen spielen Protein-Protein-Interaktionen (PPI) eine wichtige Rolle. Die Bildung von Protein-Komplexen beeinflusst eine Vielzahl von Abläufen in der Zelle, wie beispielsweise die Signaltransduktion, die Stabilität des Cytoskeletts oder den programmierten Zelltod (Apoptose).^{[1]-[4]} Die vielfältigen Einflüsse der PPIs auf die Vorgänge in der Zelle machen sie zu einem vielversprechenden Ziel der Wirkstoffforschung. Ein weiterer Vorteil der Inhibition von PPIs ist, dass durch das spezifische Vorkommen der jeweiligen Proteine in bestimmten Zelltypen auch eine Spezifität hinsichtlich der Zellen bzw. des Gewebes erreicht werden könnte.^[5] So kommen beispielsweise die Shank-Gerüstproteine hauptsächlich im Gewebe des zentralen Nervensystems vor.^[6] Ein spezifischer Ligand für das Shank-Protein sollte deshalb auch nur im zentralen Nervensystem Wirkung zeigen.

Bei den derzeit klinisch eingesetzten Inhibitoren von PPIs handelt es sich insbesondere um Verbindungen auf der Grundlage von monoklonalen Antikörpern.^{[5],[7]} Es werden aber auch kleine Moleküle, wie die Gruppe der tubulinbindenden Substanzen, vor allem in der Krebstherapie eingesetzt.^{[8],[9]}

Tubulin ist ein Protein, welches durch Polymerisation die sog. Mikrotubuli bildet. Diese Mikrotubuli sind als Teil des Cytoskeletts an einer Reihe von zellulären Aufgaben, wie der Aufrechterhaltung der Zellform und der Mitose, beteiligt.^[10] Während der Mitose werden die Mikrotubuli des Zellskeletts zum Spindelapparat umgebildet. Der Spindelapparat ist essentiell für die Trennung der Chromatiden zu den Tochterchromosomen und die gleichmäßige Aufteilung dieser auf die beiden neu gebildeten Zellen.^[11] Durch die Bindung von Tubulin-Liganden kommt es zur Beeinflussung der normalen Bildungs- bzw. Abbau-Dynamik der Mikrotubuli und damit auch zu einer direkten Modulation der Mitose. Auf dieser Mitosehemmung beruht der Einsatz als Krebsmedikament.^[8]

Die drei Hauptklassen der Tubulin-bindenden Wirkstoffe – Vincaalkaloide, Taxane und Colchicin – können in Mikrotubuli stabilisierende und destabilisierende Verbindungen eingeteilt werden. Die Vincaalkaloide und die Colchicinderivate behindern den Aufbau der Mikrotubuli bzw. bewirken eine Destabilisierung und damit einen Abbau selbiger, während die Bindung von Taxanen an Tubulin zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli führt.^[8]

Bei den Vincaalkaloiden, Taxanen und Colchicin handelt es sich um pflanzliche Sekundärmetabolite. Vinblastin (**I**, Abb. 1.1), ein Vertreter der Vincaalkaloide, wurde aus

dem Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus* auch *Vinca rosea* genannt) isoliert und wird unter anderem als *Velban*[®] von *Eli Lilly* vertrieben.^[12] Paclitaxel (**II**, Abb. 1.1), ein Naturstoff aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) wurde von *Bristol-Myers Squibb* unter dem Namen *Taxol*[®] auf den Markt gebracht.^[12] Colchicin (**III**, Abb. 1.1) wurde zur Behandlung von Gichtpatienten verwendet. Ein Einsatz als Krebsmedikament findet aber, wahrscheinlich auf Grunde der starken Toxizität, bisher nicht statt.^[12]

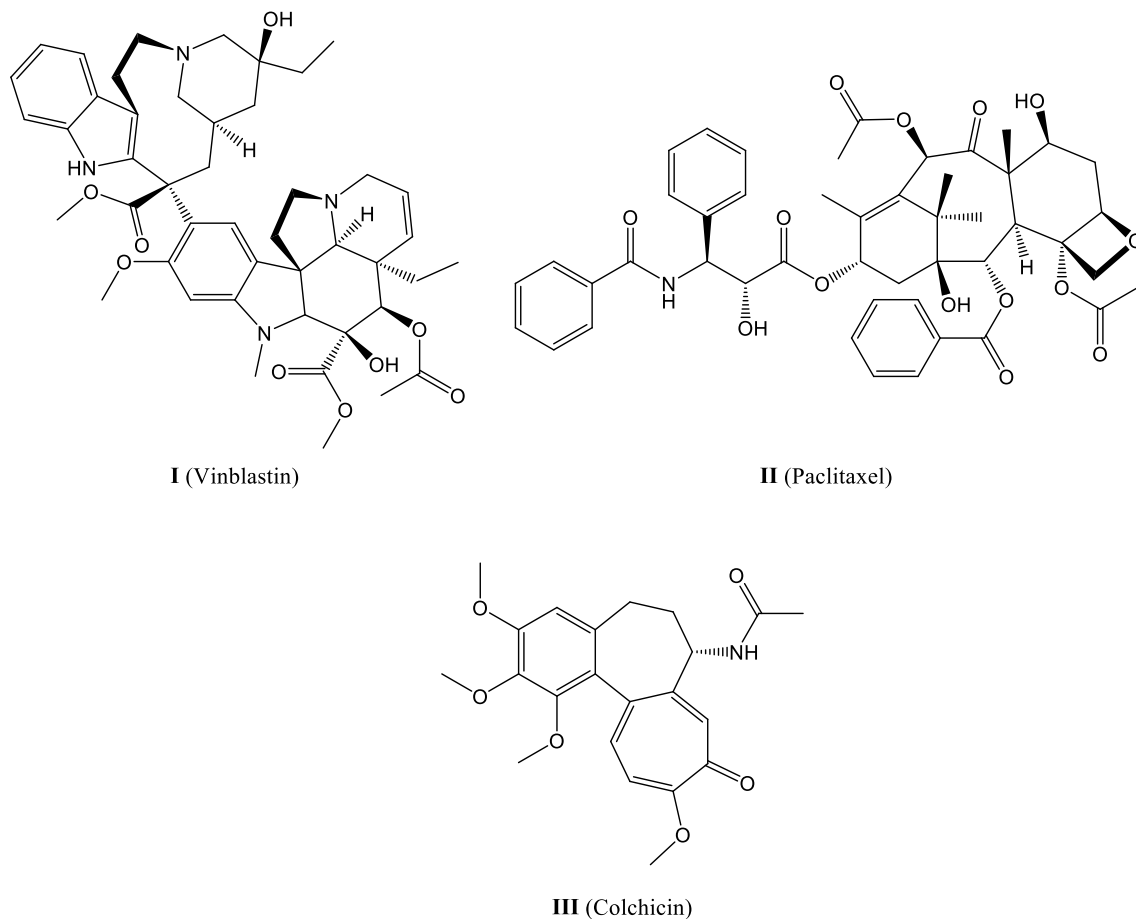


Abb. 1.1 Strukturen der Tubulin-Liganden Vinblastin (**I**) – ein Vincaalkaloid, Paclitaxel (**II**) – ein Taxan und Colchicin (**III**).

Jede der in Abb. 1.1 gezeigten Substanzen bzw. deren Derivate binden an separate Stellen des Tubulins und modulieren so die PPI mit den anderen Tubulinmolekülen.^{[8],[12]}

Die chemotherapeutisch eingesetzten Naturstoffe Vinblastin (**I**) und Paclitaxel (**II**) werden auf Grund ihrer Größe durch Injektionen verabreicht. Dieses große Molekulargewicht von jeweils mehr als 800 g/mol (**I**: M = 811 g/mol; **II**: M = 854 g/mol) gibt ein generelles Merkmal von PPI-Domänen wider. Im Gegensatz zu Enzymen besitzen PPI-Domänen in den meisten Fällen keine wohl definierte Bindungstasche. Bei der Interaktionsstelle handelt es

sich viel mehr um eine wenig strukturierte und sehr große „Bindungsfläche“ mit Ausdehnungen von bis zu 1600 \AA^2 .^[13]

Diese Ausdehnung kann insofern problematisch sein, weil ein Molekül den Lipinski-Regeln^[14] entsprechen sollte, um oral verfügbar zu sein. Das heißt, neben den Anforderungen an die Anzahl von Wasserstoffbrücken-Donoren (maximal 5) und Akzeptoren (maximal 10), sowie an den Verteilungskoeffizienten $\log P$ (kleiner 5) sollte die molare Masse 500 g/mol nicht überschreiten.^[14] Die für eine Bindung benötigten Interaktionen, welche sich beim nativen Bindungspartner über die gesamte Kontaktfläche verteilen konnten, müssen folglich mit einem kleinen Molekül ($M \leq 500 \text{ g/mol}$) eingegangen werden. Aus diesem Grund galten PPI-Domänen in der Wirkstoffforschung lange als nicht adressierbar und stellen auch heute noch sehr schwierige Ziele dar.^[15]

Mitte der 1990er Jahre konnte die Gruppe um WELLS zeigen, dass die Bindungsenergie nicht gleichmäßig über das Interaktionsfläche verteilt ist. Einen energetischen Beitrag zur Bindung leisten nur wenige, vorwiegend geladenen Aminosäuren, die sogenannten *hot spots*.^{[16],[17]} Diese Entdeckung wurde bei der Untersuchungen der Bindung des *human growth hormone* (hGH) an das *human growth hormone binding protein* (hGHbp) gemacht. Die Kontaktfläche der beiden Proteine ist etwa 1300 \AA^2 groß und wird auf Seiten des hGH durch 31^[16] bzw. am hGHbp durch 33 Aminosäuren^[17] gebildet. Durch den Austausch jeweils einer der in der Interaktionsstelle lokalisierten Aminosäuren gegen Alanin, wurden die individuellen Bindungsbeiträge ermittelt. Auf diese Weise konnten für das hGH acht und für das hGHbp elf Aminosäuren als essentiell für die Bindung bestimmt werden.^{[16],[17]} Somit wird der Großteil der Bindungsenergie durch nur etwa ein Drittel der in der Kontaktfläche lokalisierten Aminosäuren erzeugt.

Um zu Gewährleisten, dass der Affinitätsverlust zum nativen Bindungspartner nicht durch andere mit der Mutation assoziierte Phänomene, wie beispielsweise die Änderung der Oberflächenstruktur bis hin zu einer partiellen oder globalen Entfaltung des Proteins^[18] hervorgerufen wird, ist es nötig bei derartigen Versuchen die strukturelle Kontinuität zu untersuchen.^[19] Für hGH wurde die einheitliche Struktur der Mutanten und des Wildtyps durch die Bindung von sieben verschiedenen monoklonalen Antikörpern, welche sensitiv auf Konformationsänderungen reagieren, bestätigt.^[20] Außerdem ist ebenfalls für den hGH/hGHbp-Komplex beschrieben, dass umfangreiche Mutationen zu einer starken Konformationsänderung führen können.^[21] Jedoch waren Mutationen von drei Aminosäuren in Alanin ohne Auswirkungen auf die Struktur des hGH-Proteins^[22], wie anhand von

Kristallstrukturen belegt wurde. Es wird außerdem in der Literatur davon ausgegangen, dass einzelne Alaninmutationen nicht zu einer Konformationsänderung des Proteins führen.^[23]

Ein kleines Molekül, welches diese *hot spots* adressiert, sollte in der Lage sein den nativen Bindungspartner zu verdrängen und mit diesem um die Bindungsstelle konkurrieren. Unter anderem durch die Entdeckung der *hot spots* wurde verstärkt nach Inhibitoren für PPIs gesucht. Es konnte durch verschiedene Beispiele gezeigt werden, dass sowohl Peptide und Peptidmimetika als auch kleine Moleküle in der Lage sind an PPI-Domänen zu binden. Im Folgenden werden einige der bekanntesten PPI-Domänen eingehender betrachtet.

1.2 Protein-Protein-Interaktions-Domänen

Die Kontakte zwischen den Proteinen werden durch kleine, in der Regel 40 bis 200 Aminosäuren lange Proteinmodule, die sog. PPI-Domänen, vermittelt.^[24] N- und C-Terminus der PPI-Domänen befinden sich typischerweise in räumlicher Nähe, so dass die Ligandenbindungsstelle zugänglich bleibt, wenn die PPI-Domäne in ein größeres Polypeptid eingebunden ist.^[1]

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben ist die Interaktionsfläche mit durchschnittlich 1600 \AA^2 im Vergleich zum aktiven Zentrum eines Enzyms sehr groß.^[13] Die Affinitäten mit denen die nativen Interaktionspartner gebunden werden variieren von nanomolaren Bindungen bis in den dreistelligen mikromolaren Bereich.^[25]

Eine grobe Einteilung der PPI-Domänen kann anhand bevorzugter Bindungsmotive vorgenommen werden. (Abb. 1.2) Als Beispiele für PPI-Domänen, welche an modifizierte Peptidsequenzen z.B. phosphorylierte Tyrosin- bzw. Serinseitenketten binden, sind die *Src homology* (SH2)-Domäne^[26], die *Phosphotyrosine binding* (PTB)-Domäne^[27] sowie die WW-Domäne^[28] zu nennen (Abb. 1.2). Zu dieser Gruppe gehören auch PPI-Domänen, die methylierte oder acetylierte Lysinseitenketten (Chromo(Chr)-Domäne^[29] und Bromodomäne^[30]) bzw. ubiquitinylierte Proteine (*ubiquitin interacting motive*(UIM)-Domäne^[31]) erkennen, die an dieser Stelle aber lediglich erwähnt werden.

Eine weitere Gruppe stellen PPI-Domänen dar, die bestimmte Aminosäuresequenzen erkennen. Dazu gehören Domänen, welche polyprolinhaltige Sequenzen erkennen, wie die *Src homology* (SH3)-Domänen^[25], WW-Domäne^[32] und *Enabled/VASP Homology 1* (EVH1)-Domäne^[33]. Zu dieser Gruppe werden auch die PSD-95/Discs-large/Zonula occludens-1 (PDZ)-Domänen, welche C-terminale Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten binden, gezählt^[34] (Abb. 1.2).

Eine dritte Gruppe bilden PPI-Domänen, die in der Lage sind Homo- bzw. Heterooligomere zu bilden. Zu dieser Gruppe gehören neben den bereits erwähnten PDZ-Domänen, welche dimerisieren können^[35] auch die *sterile alpha motive* (SAM)-Domänen, die Homo- und Heterooligomere bilden können^[36] (Abb. 1.2).

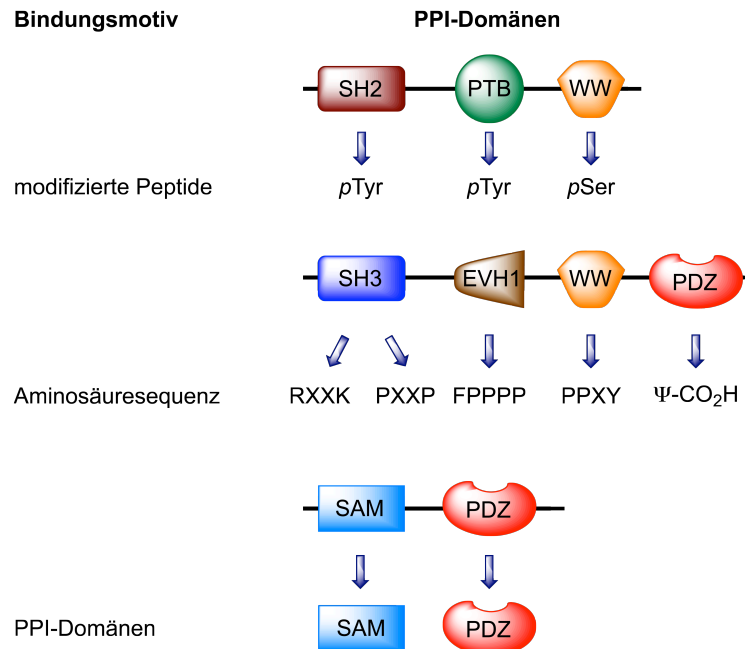


Abb. 1.2 Eine Auswahl von PPI-Domänen und deren bevorzugte Bindungsmotive bzw. Bindungspartner. (vgl. [1]; X – beliebige Aminosäure, Ψ – hydrophobe Aminosäure)

Außer den genannten Gruppen von PPI-Domänen, auf die im Weiteren noch eingegangen wird, existieren Domänen, welche mit Nukleinsäuren interagieren, wie z. B. die DNA bindende Tubby-Domäne.^[37] Phospholipide wechselwirken ebenfalls mit bestimmten PPI-Domänen wie z. B. der *pleckstrin homology* (PH)-Domäne.^[38] Die beiden letzten Gruppen von PPI-Domänen werden hier nicht näher betrachtet, sondern sind der Vollständigkeit halber genannt.

Einige PPI-Domänen können auf Grund der von ihnen bevorzugten Bindungsmotive mehr als einer Gruppe zugeordnet werden. Die WW-Domäne ist beispielsweise in der Lage sowohl phosphorylierte Serinseitenketten zu erkennen als auch mit prolinreichen Aminosäuresequenzen zu interagieren. Für PDZ-Domänen sind neben der Erkennung von C-terminalen Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette auch Dimerisierungen mit anderen PDZ-Domänen bekannt.

In den folgenden Abschnitten werden einige der genannten PPI-Domänen eingehender besprochen.

1.2.1 Phosphotyrosin und Phosphoserin bindende PPIs

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt eine der wichtigsten Möglichkeiten zur Regulation biologischer Prozesse in der Zelle dar. Bei der Phosphorylierung werden durch Proteinkinasen Phosphatgruppen auf die Seitenketten von Tyrosin, Serin bzw. Threonin übertragen. Die so modifizierten Proteine werden dann durch PPI-Domänen wie die bereits erwähnten SH2-, PTB- und WW-Domänen erkannt. Diese drei PPI-Domänen werden im Folgenden näher betrachtet.

1.2.1.1 *Src* homology (SH2)-Domänen

Die SH2-Domäne ist aus etwa 100 Aminosäuren aufgebaut. Diese bilden sieben β -Stränge (β A- β D und β D'- β F) und zwei α -Helices (α A und α B) wie in Abb. 1.3A exemplarisch für die SH2-Domäne des *v-src* Onkoproteins gezeigt.

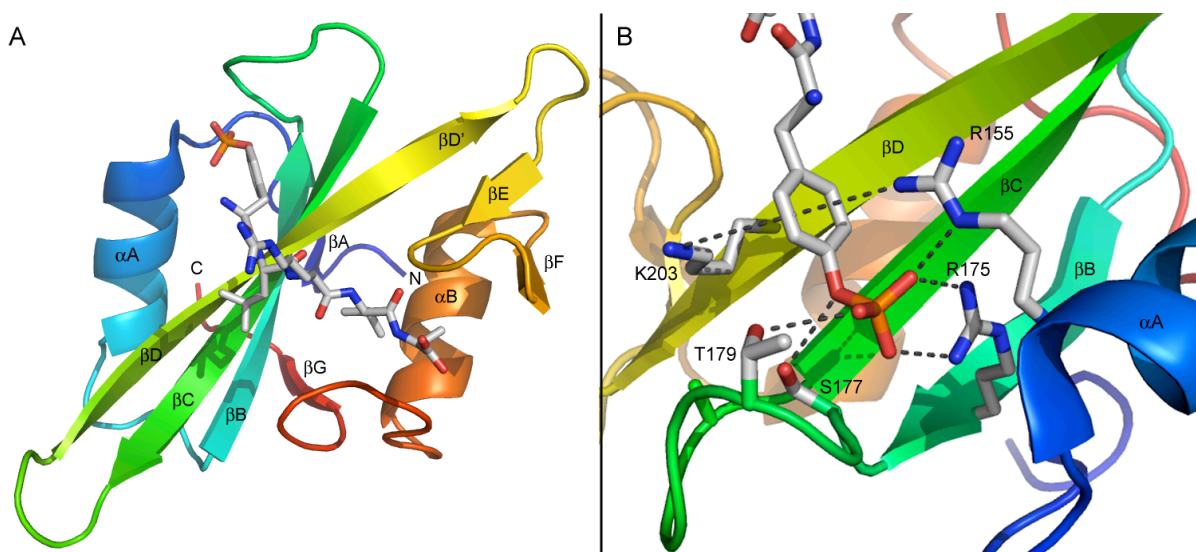


Abb. 1.3 Struktur der SH2-Domäne des *v-src* Onkoproteins im Komplex mit dem Peptid $\text{H}_2\text{N-pYLRVA-OH}$ (PDB: 1SHB). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Phosphotyrosininteraktionsstelle.

Die β -Stränge β B- β F bilden ein zentrales β -Faltblatt, welches von den beiden Helices α A und α B eingeschlossen ist. Dieses β -Faltblatt kann am zentralen β -Strang β D in zwei verbundenen β -Faltblätter unterteilt werden. Diese bestehen aus den β -Strängen β B- β D zum einen und β D'- β F zum anderen^[26] (Abb. 1.3A). Der β A- und der β G-Strang interagieren mit dem β B-Strang, bilden aber kein β -Faltblatt.^[26]

Die Bindung des Phosphopeptids erfolgt in den meisten Fällen senkrecht zum β -Faltblatt der SH2-Domäne.^[39] (Abb. 1.3A). Die Phosphotyrosinseitenkette ragt in eine Tasche, in der das

Phosphat durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken gebunden wird. Die dazu benötigten Aminosäuren sind in auf dem β B-Strang und im Schleifenbereich zwischen dem β B- und dem β C-Strang lokalisiert. Das mit dem Phosphat interagierende Arginin des β B-Strangs tritt konserviert in allen SH2-Domänen auf^[39] (Arginin R 175 in Abb. 1.3B).

In dem konkreten Beispiel der *v-src*-SH2-Domäne (Abb. 1.3) wird das Phosphat durch Interaktionen mit den Aminosäuren Serin S177 und Threonin T179 aus dem Schleifenbereich zwischen den β -Strängen β B und β C, dem konservierten Arginin R175 und dem Arginin R155 aus der α -Helix α A gebunden. Zusätzlich wird das aromatische System des Phosphotyrosins durch Interaktionen desamins von Lysin K203 aus dem β D-Strang und dem *omega*-Stickstoff des Arginins R155 fixiert^[39] (Abb. 1.3B).

Nicht-phosphorylierte Peptide werden ebenso wie Peptide, welche Phosphoserin oder Phosphothreonin beinhalten nicht durch die SH2-Domäne gebunden.^{[40]-[42]} Peptide, welche aus zum Phosphotyrosin C-terminal mindestens drei Aminosäuren bestehen, sind die kürzesten Peptide die noch von SH2-Domänen erkannt werden. Phosphotyrosin allein wird nicht durch SH2-Domänen gebunden.^[42]

1.2.1.2 Phosphotyrosine binding (PTB)-Domäne

PTB-Domänen bestehen aus etwa 150 Aminosäuren, die in zwei nahezu orthogonalen β -Faltblättern (β 1- β 7) und drei α -Helices (α 1- α 3) angeordnet sind. Die beiden β -Faltblätter werden jeweils durch vier (β 1, β 2', β 3 und β 4) bzw. drei β -Stränge (β 5- β 7) gebildet^[43] (Abb. 1.4A).

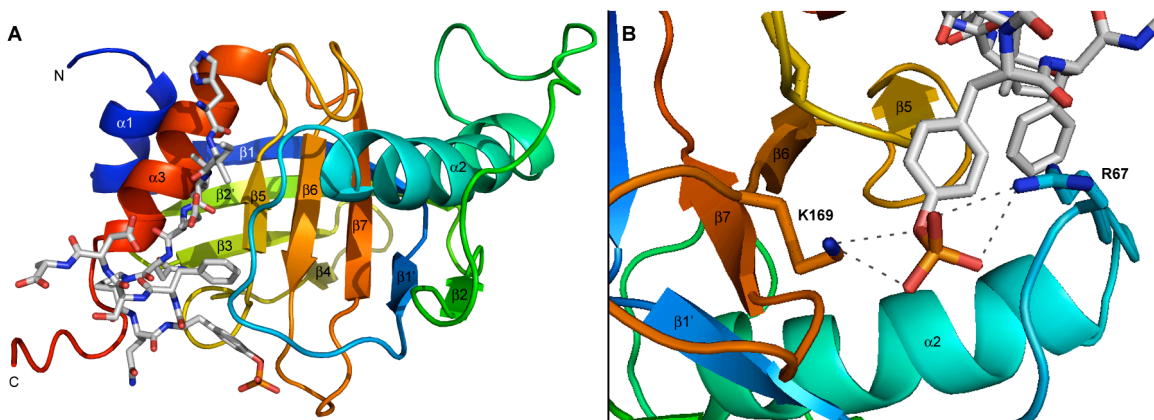


Abb. 1.4 Struktur der PTB-Domäne des *Src homology-2 / collagen homology* (Shc)-Adaptorproteins im Komplex mit dem Peptid H₂N-H I I E N P Q pY F S D A-OH (PDB: 1SHC). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Phosphotyrosininteraktionsstelle.

Das interagierende Peptid wird in einer Bindungsspalte zwischen dem β -Strang $\beta 5$ und der Helix $\alpha 3$ als antiparalleler β -Strang gebunden. Das Phosphotyrosin, welches in der β -Schleife des gebundenen Peptides lokalisiert ist, interagiert im Beispiel der Shc-PTB-Domäne mit Arginin R67 und Lysin K169^[43] (Abb. 1.4B). Die an der Bindung des Phosphotyrosin beteiligten Aminosäuren sind im Gegensatz zu den SH2-Domänen nicht konserviert.^[42] Der peptidische Ligand wird hauptsächlich durch Wechselwirkungen im Bereich des β -Strangs gebunden. Aus diesem Grund sind PTB-Domänen anders als SH2-Domänen in der Lage auch nicht-phosphorylierte Peptide zu binden.^[39] Für PTB-Domänen existiert ein gemeinsames Bindungsmotiv, welches neben dem Phosphotyrosin bzw. Tyrosin ein Asparagin und ein Prolin beinhaltet (N P X *p*Y/Y; X – eine beliebige Aminosäure).^[42]

1.2.1.3 WW-Domänen

Die WW-Domäne ist mit etwa 40 Aminosäuren eine der kleinsten PPI-Domänen. Der Name WW-Domäne leitet sich von zwei Tryptophanen, die konserviert in den WW-Domänen auftreten, ab.^[44] Ein β -Faltblatt, bestehend aus drei β -Strängen, bildet die WW-Domänen^[45] (Abb. 1.5A).

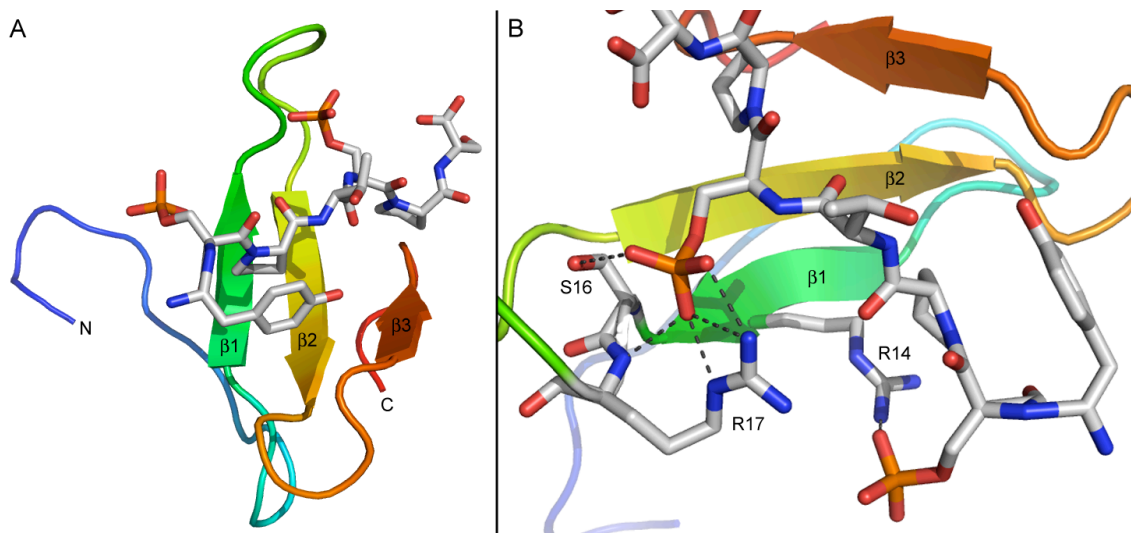


Abb. 1.5 Struktur der WW-Domäne der Pin1 Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase im Komplex mit dem Peptid H_2N -Y *p*S P T *p*S P S-OH (PDB: 1F8A). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Phosphoserin-Interaktionsstellen.

Es werden fünf Gruppen von WW-Domänen, entsprechend der bevorzugten Bindungsmotive, unterschieden. Alle fünf Gruppen erkennen prolinhaltige Aminosäuresequenzen – Gruppe I: P P X Y, Gruppe II: P P L P, Gruppe III: P G M, Gruppe IV: *p*T / *p*S P und Gruppe V: P R.^[45] Die Gruppe IV benötigt für eine Bindung des Liganden zusätzlich ein Phosphoserin bzw.

Phosphothreonin und kann deshalb zu den PPI-Domänen, welche phosphorylierte Peptide erkennen, gezählt werden.

Im Beispiel der Pin1-WW-Domäne (Abb. 1.5) wird ein Phosphoserin durch Interaktionen mit den Seitenketten von Serin S16 und Arginin R17 sowie eine Wasserstoffbrücke zum Rückgratamid von Serin S16 gebunden. Das zweite Phosphoserin interagiert mit Arginin R14 ist aber wesentlich schwächer in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden^[45] (Abb. 1.5B).

1.2.2 Polyprolin bindende PPIs

Prolinbindende Domänen treten häufig in Multidomän-Signalproteinen auf. Die Wichtigkeit dieser PPIs wird dadurch unterstrichen, dass polyprolinhaltige Proteinabschnitte zu den häufigsten Motiven im *Drosophila melanogaster*-Genom^[46] bzw. zu den zweithäufigsten Motiven im *Caenorhabditis elegans*-Genom^{[46],[48]} gehören.

Die im Gegensatz zu den anderen 19 proteinogenen Aminosäuren einzigartigen Eigenschaften des Prolins, wie das sekundäre Amid in der cyclischen Seitenkette und die relative Stabilität des *cis*-Isomers in Peptidbindungen, stellen eine Möglichkeit zur selektiven Erkennung solcher Aminosäuresequenzen dar.^[46] Außerdem bilden polyprolinhaltige Aminosäuresequenzen sogenannte Polyprolin Type II-Helices (PPII-Helix), eine linksgängige helikale Struktur mit drei Aminosäuren pro Drehung.^[46]

1.2.2.1 *Src-homology* (SH3)-Domänen

Die SH3-Domänen bestehen aus etwa 60 Aminosäuren die zwei orthogonale β -Faltblätter (β A und β E-Strang bzw. β B- bis β D-Strang) und eine kurze Helix bilden^[47] (Abb. 1.6A).

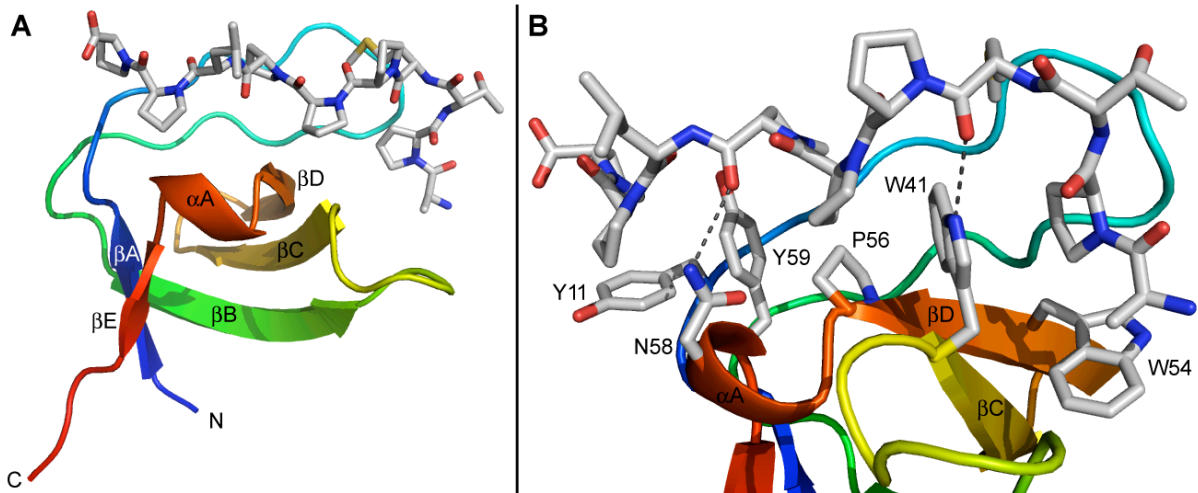


Abb. 1.6 Struktur der SH3-Domäne der *Abelson murine leukemia*(ABL)-Tyrosinkinase im Komplex mit dem Peptid H₂N-A P T M P P P L P P-OH (PDB: 1ABO). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Protein-Peptid-Interaktionsstelle.

Die Aminosäuresequenz P X X P (X-beliebige Aminosäure) ist die bevorzugte Erkennungssequenz der SH3-Domänen.^[42]

Im Beispiel der ABL-Tyrosinkinase wird das prolinhaltige Peptid als PPII-Helix gebunden. Die nahezu parallel ausgerichteten, aromatischen Aminosäureseitenketten der SH3-Domäne (Tyrosin Y11 und Y59 bzw. Tryptophan W41 und W54; Abb. 1.6B) bilden das Gegenstück zur PPII-Helix und werden in diese eingeschoben.^[46] Die Interaktionen beruhen hauptsächlich auf van-der-Waals-Kontakten.^[46] Wie am Beispiel der SH3-Domäne der ABL-Tyrosinkinase gezeigt, werden lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen (Asparagin N58 und Tryptophan W41) zwischen dem Peptidrückgrat und der SH3-Domäne beobachtet^[47] (Abb. 1.6B).

1.2.2.2 *Enabled/VASP Homology 1* (EVH1)-Domänen

Die EVH1-Domänen bestehen aus etwa 115 Aminosäuren und formen sieben β -Stränge (β 1- β 7), die eine nicht geschlossene β -Fass-Struktur bilden. Abgeschlossen wird diese Fass-Struktur durch die Helix α 1, welche nahezu parallel zur Achse der Fass-Struktur verläuft^[33] (Abb. 1.7A).

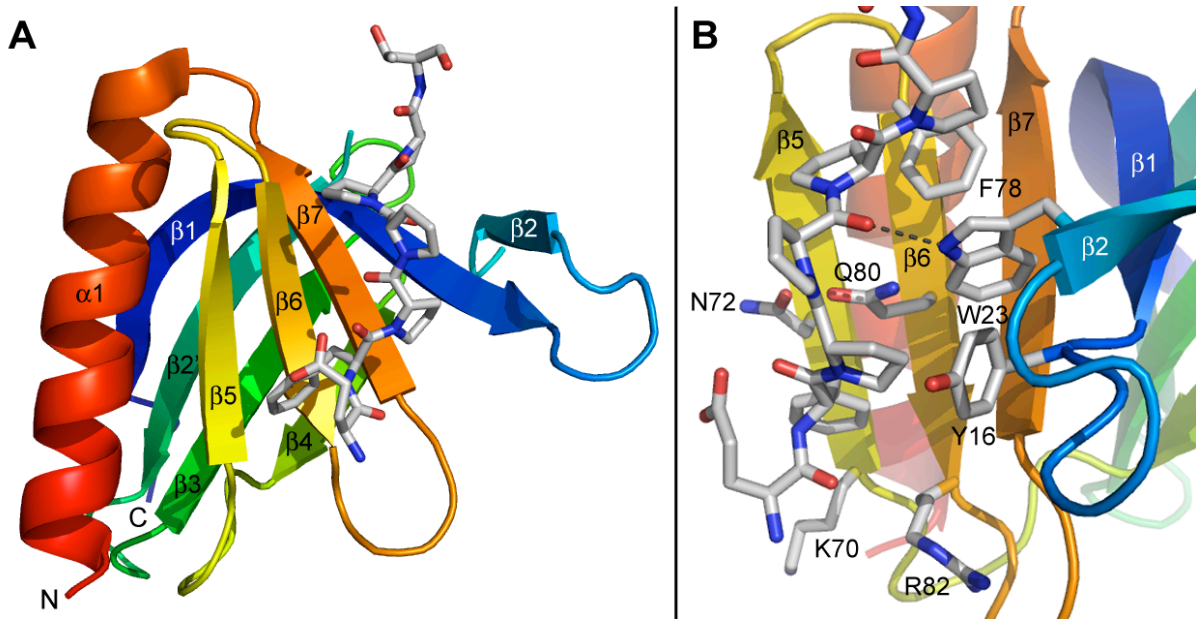


Abb. 1.7 Struktur der EVH1-Domäne des *Ena/Vasp-like*(EVL)-Proteins im Komplex mit dem Peptid H₂N-E F P P P T-OH (PDB: 1QC6). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Protein-Peptid-Interaktionsstelle.

Die PPII-Helix des interagierenden Peptides wird, wie schon für die SH3-Domäne beobachtet, durch van-der-Waals-Kontakte mit konservierten, aromatischen Aminosäuren (Tyrosin Y16, Tryptophan W23 und Phenylalanin F78) der EVH1-Domäne gebunden. Im Beispiel der EVL-EVH1-Domäne wird zusätzlich eine hydrophobe Tasche durch die Seitenketten der Aminosäuren Lysin K70, Asparagin N72, Glutamin Q80 und Arginin R82 gebildet, in die das Phenylalanin des peptidischen Liganden bindet^[33] (Abb. 1.7). Damit wird die EVL-EVH1-Domäne der ersten Klasse der EVH1-Domänen (Bindungsmotiv: F P X Ψ P; X-beliebige Aminosäure, Ψ-hydrophobe Aminosäure; jeweils häufig Prolin) zugeordnet. Die zweite Klasse der EVH1-Domänen bindet bevorzugt Peptide mit dem Motiv P P X F.^[46]

1.2.2.3 WW-Domänen

Alle WW-Domänen binden prolinhaltige Peptide und werden, wie in Abschnitt 1.2.1.3 beschrieben, entsprechend ihrer Erkennungssequenzen in fünf Gruppen eingeteilt.

Eine Phosphorylierung des Interaktionspartners wirkt sowohl negativ als auch positiv regulierend auf die Bindung. Eine Phosphorylierung kann für die Bindung essenziell sein, wie für die WW-Domäne von Pin1 beschrieben (Abschnitt 1.2.1.3). Die Interaktion wird aber im Fall der Phosphorylierung des P P X Y-Motivs der Gruppe I WW-Domänen unterbunden.^[46]

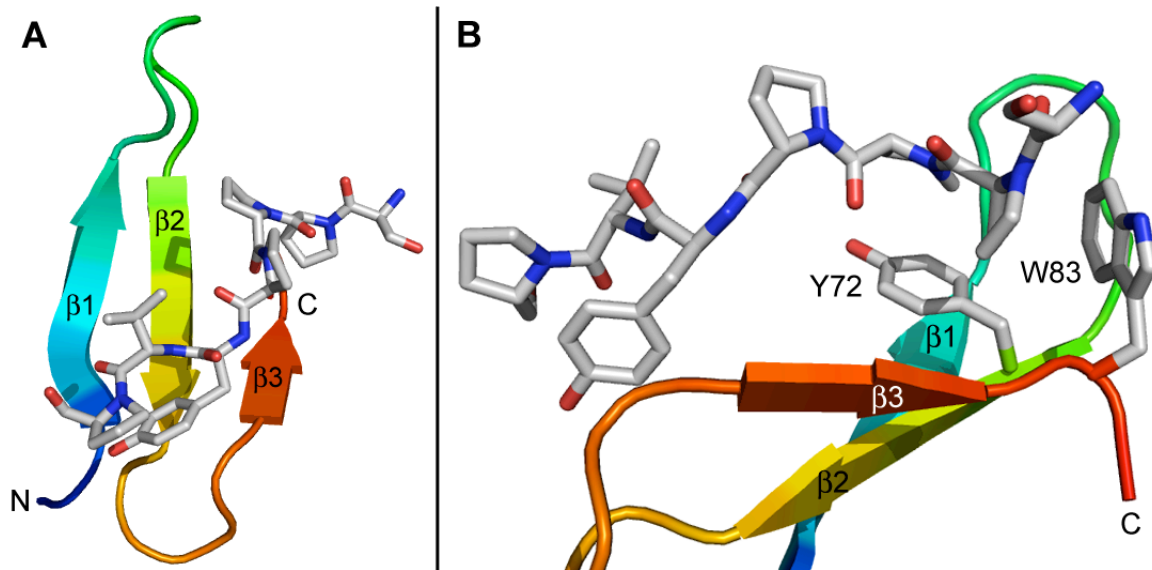


Abb. 1.8 Struktur der WW-Domäne von Dystrophin im Komplex mit dem Peptid H₂N-N M T P Y R S P P P Y V P-OH (PDB: 1EG4). **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Phosphoserininteraktionsstellen. Vom gebundenen Peptid sind nur die Aminosäuren S P P P Y V P-OH dargestellt.

In WW-Domänen wird das prolinhaltige Peptid, wie für die SH3- und EVH1-Domänen beobachtet, durch van-der-Waals-Bindungen mit der PPII-Helix gebunden. Die Bindungsstelle wird ebenfalls durch aromatische Seitenketten generiert. Im Beispiel der Dystrophin-WW-Domäne handelt es sich um Tyrosin Y72 und Tryptophan W83^[49] (Abb. 1.8B). Die Interaktionsstelle für die PPII-Helix ist im Vergleich zur SH3-Domäne aber wesentlich kleiner, so dass die für die Bindung benötigten prolinhaltigen Motive ebenfalls kleiner sind.^[46]

1.2.3 Oligomerbildende PPIs

Die Oligomerisation von Proteinen stellt die Plattform für die Bildung von Proteinkomplexen bzw. Proteinnetzwerken dar. Diese Netzwerke sind für die Organisation der Zelle und die Signalweiterleitung von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden werden zwei Beispiele für oligomerbildende PPIs beschrieben.

1.2.3.1 *Sterile alpha motive (SAM)*-Domänen

Die SAM-Domäne besteht aus etwa 70 Aminosäuren, welche in fünf α -Helices (α 1- α 5) angeordnet sind. (Abb. 1.9A)

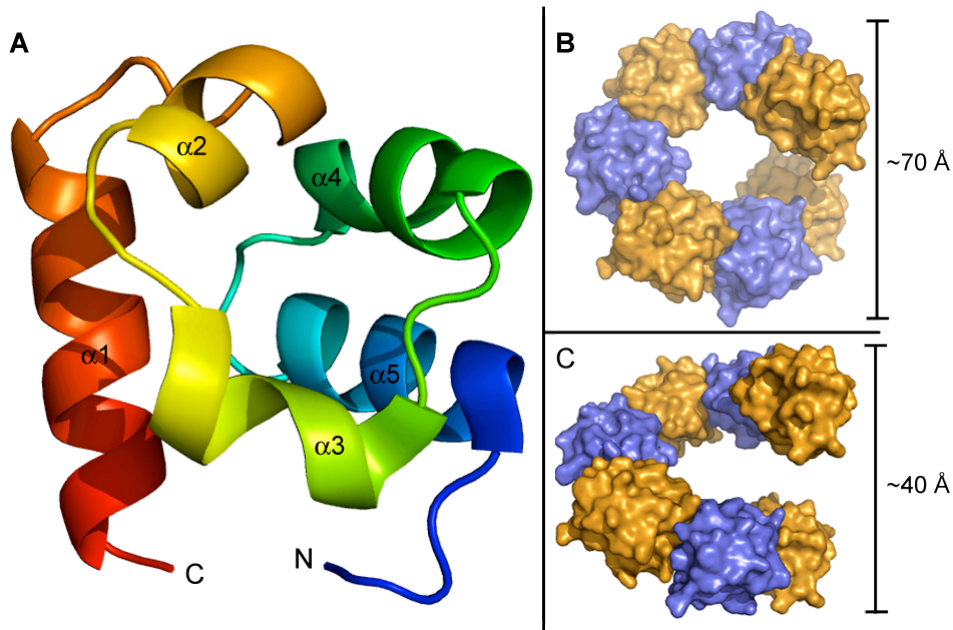


Abb. 1.9 Struktur der SAM-Domäne des Gerüstproteins Shank3 (PDB: 2F3N). **A:** Gesamtansicht. **B:** Draufsicht auf die durch die Shank3-SAM-Domäne gebildete helikale Struktur. **C:** Seitenansicht der Helix.

Es ist eine Vielzahl von Interaktionspartnern für die SAM-Domäne bekannt, wie z. B. Kinasen oder RNA. Vor allem sind diese PPI-Domänen aber in der Lage zu polymerisieren.^[50]

Ist dies der Fall, so kommt es zur Ausbildung einer helikalen Struktur.^{[50],[51]} Im Beispiel der SAM-Domäne des Gerüstproteins Shank3 handelt es sich um eine links-gängige Helix mit sechs SAM-Domänen pro Drehung, einem Anstieg von etwa 40 Å pro Drehung und einem Durchmesser von etwa 70 Å^[51] (Abb. 1.9B und C). Die Polymerbildung wird nicht durch die anderen Proteinteile von Shank3 gestört, sondern bewirkt vielmehr die Bildung einer ausgedehnten Interaktionsplattform.^[51]

1.2.4 PDZ-Domänen

Die PDZ-Domänen bilden den Fokus dieser Arbeit und werden darum im Folgenden genauer betrachtet.

Bei PDZ-Domänen handelt es sich um PPI-Domänen die typischerweise in Multidomän-Gerüstproteinen auftreten. Sie gehören zu den am weitest verbreiteten PPI-Domänen. Es sind über 450 humane PDZ-Domänen in etwa 250 Proteinen bekannt.^[52] Der Name leitet sich von den ersten entdeckten Vertretern ihrer Klasse ab (PSD-95/Discs-large/Zonula occludens-1).^[53]

PDZ-Domänen sind aus etwa 90 Aminosäuren aufgebaut, welche sechs β -Stränge (β A- β F) und zwei α -Helices (α A und α B) bilden. Die interagierenden Proteine, hauptsächlich deren C-Termini, binden zwischen dem β B-Strang und der α B-Helix. Dort bilden sie ein antiparalleles β -Faltblatt mit dem β B-Strang (Abb. 1.10A).

Die Schleife zwischen dem β A- und β B-Strang bindet das Carboxylat des interagierenden C-Terminus' über Interaktionen mit dem Protein-Rückgrat und wird deshalb als *carboxylate binding loop* bezeichnet (Abb. 1.10B).^[54]

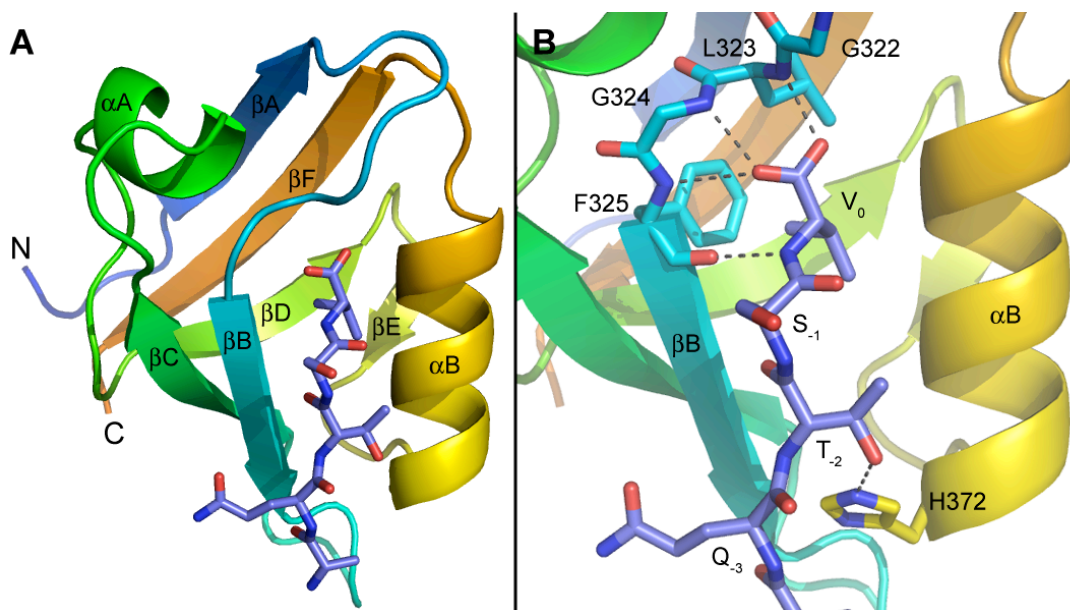


Abb. 1.10 Struktur der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 (PDB: 1BE9). **A:** Typische Struktur einer PDZ-Domäne mit peptidischem Liganden (dunkelblau) in der Bindungsspalte zwischen Strang β B und Helix α B. **B:** Interaktionen des Carboxylats des peptidischen Liganden mit dem *carboxylate binding loop* (G322 - F325). Wasserstoffbrückenbindungen sind als graue Strichlinie dargestellt.

Die Position der Aminosäuren des Liganden werden mit P₀ für die C-terminale Aminosäure und P₋₁, P₋₂ usw. für die in Richtung des N-Terminus' folgenden Aminosäuren angegeben^[54] (Abb. 1.10B).

Eine Einteilung der PDZ-Domänen in drei Klassen (Klasse I, II und III) findet auf Grund der von ihnen bevorzugten Bindungsmotive statt. Entscheidend für die Spezifität und damit für die Einteilung sind die Aminosäuren in den Positionen P₀ und P₋₂^{[53],[55]} (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Klassifikation der PDZ-Domänen entsprechend der Spezifität für C-terminale Peptide

Klasse	C-terminale Sequenz	Interagierendes Protein	PDZ-Protein	Ref.
<i>Klasse I</i>				
X-S/T-X-Ψ	E-S-D-V	NMDA-Rezeptor 2A, B	PSD-95 (PDZ 2)	[56]
	Q-T-R-L	GKAP	Shank	[57]
<i>Klasse II</i>				
X-Ψ-X-Ψ	E-Y-Y-V	Neurexin	CASK	[58]
	D-V-P-V	ErbB2	Erbin	[59],[60]
<i>Klasse III</i>				
X-D/E-X-Ψ	V-D-S-V	Melatonin Rezeptor	nNOS	[61]
	G-E-P-L	KIF17	mLIN10, Mint1, X11	[62]

X – beliebige Aminosäure; Ψ – hydrophobe Aminosäure

PDZ-Domänen der Klasse I bevorzugen ein Serin oder Threonin in der P₋₂ Position. Die Präferenz wird durch ein konserviertes Histidin in der Helix αB verursacht (Abb. 1.10B, H372).

Während die Aminosäuren in Position P₀ und P₋₂ einen Großteil der Bindungsenergie realisieren, leisten die Aminosäuren des peptidischen Liganden ab Position P₋₃ in Richtung N-Terminus (P₋₃, P₋₄ usw.) einen größeren Beitrag zur Selektivität, da diese mit nicht konservierten Resten der PDZ-Domäne interagieren.^[55]

Wie bereits erwähnt binden PDZ-Domänen hauptsächlich C-Termini interagierender Proteine.^[63] Es sind jedoch auch Beispiele für die Bindung von internen Proteinsequenzen bekannt. Hier ersetzt meist eine Glutaminsäure- bzw. Asparaginsäure-Seitenkette den C-Terminus.^{[64],[65]} Bei der Oligomerisierung von PDZ-Domänen bindet eine β-Haarnadelstruktur an die interagierende PDZ-Domäne. Diese β-Haarnadelstruktur liegt der kanonischen Peptidbindungsspalte gegenüber und imitiert das Bindungsmotiv der entsprechenden PDZ-Domäne.^{[35],[64]} Auf diese Weise kommt es zu einer sogenannte *head-to-tail* Oligomerisierung. Die Bindung von Lipiden an PDZ-Domänen wurde ebenfalls beobachtet^{[66],[67]} (Abb. 1.11).

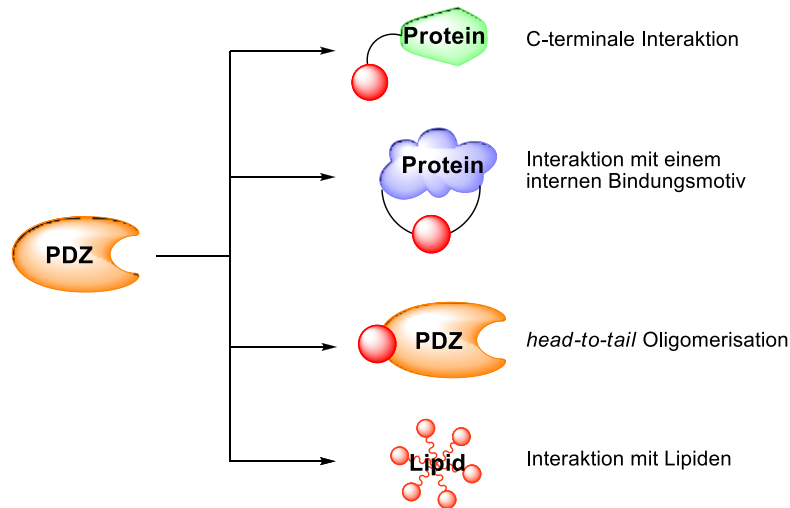


Abb. 1.11 Bindungsmodi der PDZ Domänen.

1.3 Liganden von PPI-Domänen

1.3.1 Überblick

In diesem Abschnitt wird ein kurzer Überblick über Liganden für eine Auswahl der bereits beschriebenen PPI-Domänen gegeben.

Wie bei Enzymen auch existieren diverse Möglichkeiten, um kleine Moleküle als Liganden für PPI-Domänen zu identifizieren. Die Strategien zur Entwicklung von Inhibitoren können in vier Gruppen gegliedert werden.^[68] Dazu gehören zum einen die Modifizierung bereits bekannter, aktiver Substanzen und zum anderen das Screening von Substanzbibliotheken. Der dritte Ansatz beruht auf der Beobachtung von biologischen Effekten im Mensch oder Tier die durch vorher verabreichte Substanzen hervorgerufen wurden. Diese Effekte werden beispielsweise in der Ethnopharmakologie bzw. der Volksmedizin oder auch als Nebenwirkungen bei Medikamenten festgestellt. Bei der vierten Variante handelt es sich um das gezielte Entwerfen (*rational design*) von Liganden. Diese computergestützten Methoden der Inhibitorentwicklung beruhen auf der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Wirkstoffziels bzw. eines Liganden.^[68]

Eine zusätzliche Alternative um Liganden für PPI-Domänen zu erhalten stellen Peptide dar, deren Aminosäuresequenzen nativen Interaktionspartnern entsprechen bzw. durch den Austausch einzelner Aminosäuren aus diesen hervorgingen.

Bedingt durch das große Molekulargewicht und die Polarität sind peptidische Liganden aber nur begrenzt für den Einsatz in lebenden Systemen geeignet. So werden Peptide, abhängig von ihrer Aminosäuresequenz schnell verstoffwechselt. Der Abbau erfolgt durch Proteasen in Blut, Gastrointestinaltrakt und diversen Geweben. Zudem werden Peptide über Leber und

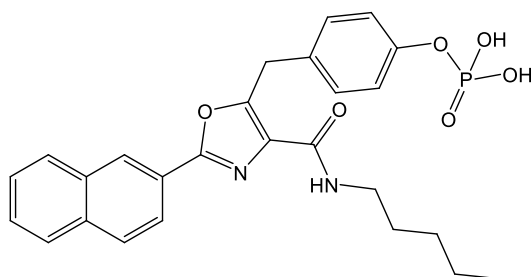
Nieren schnell wieder ausgeschieden und die Überwindung der Zellmembran ist ebenfalls problematisch.^{[69],[70]}

Die schlechte Zellgängigkeit von Peptiden kann durch das Verbinden mit sogenannten zellpenetrierenden Peptiden verbessert werden. Prominente Vertreter der zellpenetrierenden Peptide sind Nona-Arginin (R R R R R R R R R), Penetratin (R Q I K I W F Q N R R M K W K K) abgeleitet aus der Antennapedia Homöodomäne von *Drosophila melanogaster* und das Tat-Peptid (Y G R K K R R Q R R R) dessen Aminosäuresequenz dem Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) entspricht.^[71]

Das Tat-Peptid wurde unter anderem verwendet, um das Peptid **IV**, ein potentieller Wirkstoff bei Ischämien, zellpermeabel zu machen. Dieses Nonapeptid **IV** (K L S S I E S N V-OH) entspricht der C-terminalen Aminosäuresequenz der NR2-Untereinheit des *N*-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptors. Diese ist ein Bindungspartner der zweiten PDZ-Domäne des neuronalen Gerüstproteins PSD-95.^[72] Der Ligand **IV** könnte zur Behandlung von Schlaganfällen eingesetzt werden und befindet sich bereits in klinischen Studien.^{[72],[73]} Die potenzielle Einsetzbarkeit zur Verhinderung von ischämischen Gehirnschäden ergibt sich durch die Inhibition der Interaktion der PSD-95 PDZ-Domänen mit dem NMDA-Rezeptor bzw. der PDZ-Domäne der neuronalen Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS).

Bei einer neuronalen Ischämie, wie z. B. hervorgerufen durch einen Schlaganfall, kommt es zu einer starken Ausschüttung von Glutamat. Das führt zu einer Aktivierung des NMDA-Rezeptors und damit zum Einströmen von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Durch die Ca^{2+} -Ionen wird nNOS aktiviert und bildet Stickstoffmonoxid, welches bei längerer Einwirkung die Zellen schädigt.^{[72],[73]}

Die Verbindung **V** (S31-M2001, Abb. 1.12), ein potenzieller Wirkstoff in der Krebstherapie, ist ein Ligand der SH2-Domäne des Proteins *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3). Die STAT-Proteine bilden nach der Phosphorylierung bestimmter Tyrosinseitenketten Dimere durch Interaktion des Phosphotyrosins mit der SH2 Domäne. Das Dimer transloziert in den Zellkern und initiiert dort die Gentranskription. Eine Hyperaktivierung von STAT3 wird bei verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet. Die Verbindung **V** (Abb. 1.12) wurde ausgehend von dem Peptid V/P *p*T L-OH am Computer entworfen. Das Peptidmimetikum **V** stellt folglich ein Beispiel für die vierte Möglichkeit der Ligandenentwicklung (*rational design*) dar.^[74]

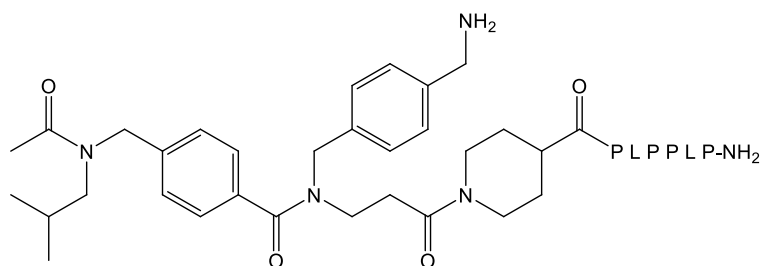


V; $IC_{50} = 79 \mu\text{M}$

Abb. 1.12 Struktur des Liganden S31-M2001 (V) der STAT3-SH2-Domäne.^[74]

Der Ligand V (Abb. 1.12) bindet an die SH2-Domäne ($IC_{50} = 79 \mu\text{M}$) und inhibiert die Dimerisierung des STAT3-Proteins. Die Aktivität der Verbindung V konnte bereits in Zellversuchen mit STAT3 abhängigen Krebszelllinien bestätigt werden.^[74]

Für SH3-Domänen existieren bisher nur peptidische Liganden, die durch die Untersuchung von speziellen Substanzbibliotheken gefunden wurden.^{[75],[76]} Ein Beispiel für einen peptidischen Liganden (VI, Abb. 1.13) der SH3-Domäne des *Src*-Proteins ist in Abb. 1.13 gezeigt. Das *Src*-Protein ist maßgeblich an der Resorption von Knochengewebe durch Osteoklasten beteiligt und damit ein potenzielles Ziel der Osteoporoseforschung.^[77]

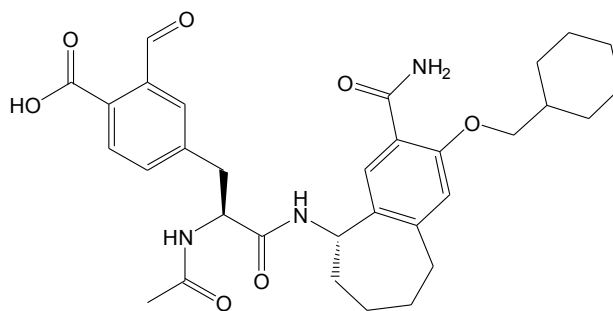


VI; $K_D = 3.4 \mu\text{M}$

Abb. 1.13 Ligand VI der SH3-Domäne des *Src*-Proteins (P = Prolin, L = Leucin).^[78]

Der Ligand VI bindet selektiv an die *Src*-SH3-Domäne ($K_D = 3.4 \mu\text{M}$) im Vergleich zur SH3-Domäne der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ($K_D = 170 \mu\text{M}$).^[78]

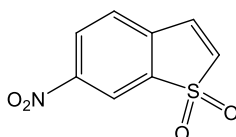
Ein weitere Verbindung, die das *Src*-Protein, allerdings die SH2-Domäne, adressiert, ist die Verbindung VII (AP22161; Abb. 1.14). Für den Liganden VII wurde ein IC_{50} -Wert von $0.24 \mu\text{M}$ gemessen. Außerdem war die Verbindung VII auch in Zellversuchen ohne Anzeichen für eine Toxizität in einem Bereich von $1.2 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$, aktiv.^[77]



VII (AP22161); $IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$

Abb. 1.14 Ligand AP22161 (VII) der *Src*-SH2-Domäne.^[77]

Durch das Screening einer Substanzbibliothek wurde die Verbindung VIII (Stattic, Abb. 1.15) ebenfalls als Ligand einer SH2-Domäne identifiziert.^[79] Das Molekül ist ein selektiver Inhibitor der SH2-Domäne von STAT3 ($IC_{50} = 5.1 \mu\text{M}$), wie bereits beschrieben einem potenziellen Ziel in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen.^[79]



VIII (Stattic); $IC_{50} = 5.1 \mu\text{M}$

Abb. 1.15 Struktur des selektiven Inhibitors VIII der STAT3-SH2-Domäne.^[79]

1.3.2 Liganden für PDZ-Domänen

Nachdem exemplarisch Liganden für einige der in Abschnitt 1.2 beschriebenen PPI-Domänen gezeigt wurden, wird im Folgenden ausführlicher auf Inhibitoren von PDZ-Domänen eingegangen.

PDZ-Domänen gelten wegen ihrer langen und flachen Bindungsspalte als schwierige Wirkstoffziele.^{[80],[81]} Bisher sind relativ wenige Liganden für diese PPI-Domänen bekannt.^{[52],[72],[73],[82]-[97]} Bei einem Großteil der beschriebenen Verbindungen handelt es sich um Peptide bzw. modifizierte Peptide.^{[72],[73],[82]-[87]}

Kleine Moleküle, welche an PDZ-Domänen binden, adressieren in den meisten Fällen sowohl der *carboxylate binding loop* als auch die hydrophobe Tasche in direkter Nähe zur Carboxylatbindungsstelle. Das ging aus Kristall- oder NMR-Strukturen der Proteine im Komplex mit den Liganden bzw. aus Dockingexperimenten hervor. Eine Auswahl von PDZ-Domänen-Liganden (IX - XIII) ist in Abb. 1.16 dargestellt.

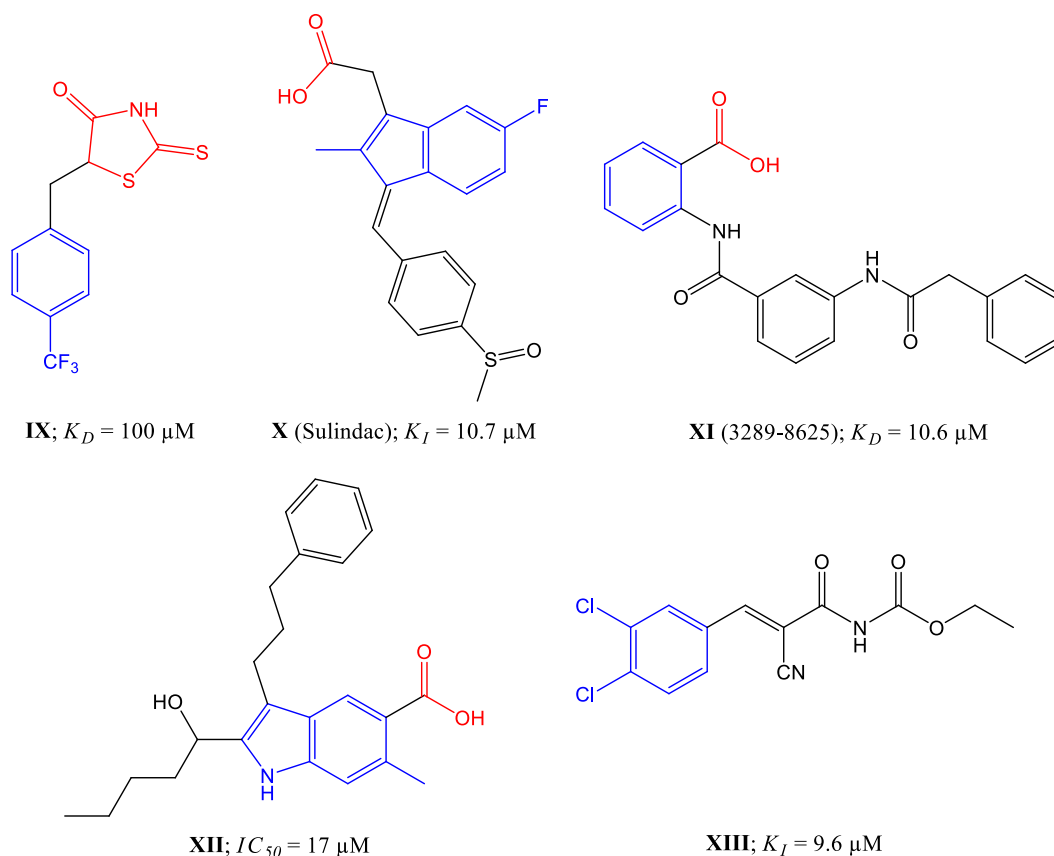


Abb. 1.16 Strukturen bekannter Liganden von PDZ-Domänen. Der mit dem *carboxylate binding loop* interagierende Teil ist rot gekennzeichnet, eine blaue Markierung zeigt Molekülteile an, die in die hydrophobe Tasche zeigen. Die Verbindung **IX** bindet an die *ALL-1 fusion partner on chromosome 6* (AF6)-PDZ-Domäne^[52], die Substanzen **X**^[93], **XI**^[94] und **XII**^[95] sind Liganden für Dishevelled-PDZ-Domänen. Die Verbindung **XIII**^{[96],[97]} interagiert mit der PDZ-Domäne des Proteins *protein interaction with protein C kinase C α* (PICK1).

Die Interaktion mit der *carboxylate binding loop* erfolgt in den meisten Fällen durch ein Carboxylat (**X** – **XII**) oder wie in Verbindung **IX** durch einen Heterocyclus der als Carboxylatisoster fungiert.^[52] Die mit der Carboxylatbindungsstelle wechselwirkenden Teile der Liganden **IX** – **XII** sind in Abb. 1.16 rot dargestellt.

Eine Ausnahme bildet die Verbindung **XIII**, da diese kein Carboxylat bzw. keine isostere Gruppe aufweist. Nach Dockingexperimenten mit dieser Verbindung (**XIII**) füllt der aromatische Teil, in Abb. 1.16 blau dargestellt, die hydrophobe Tasche der PDZ-Domäne. Die anderen Molekülteile interagieren mit Aminosäuren, die sich im weiteren Verlauf der Bindungsspalte befinden.^{[96],[97]} Eine Wechselwirkung mit dem *carboxylate binding loop* wurde durch die Dockingexperimente ausgeschlossen.^{[96],[97]}

Für Liganden mit der größten Affinität zur jeweiligen PDZ-Domäne (**X**, **XI** und **XIII**) wurden K_D - bzw. K_I -Werte von etwa $10 \mu\text{M}$ bestimmt.^{[93],[94],[96],[97]} Es sind aber auch Liganden mit K_D -Werten von bis zu $100 \mu\text{M}$ (**IX**) beschrieben^[52] (Abb. 1.16).

2 Aufgabenstellung

Die Entwicklung von Liganden bzw. Inhibitoren für PPI-Domänen stellt eine Herausforderung in der medizinischen Chemie dar.^[98] Es besteht dennoch ein intensives Interesse an der Entwicklung von Liganden für PPI-Domänen, da mit diesen gezielt die Bildung von Proteinnetzwerken, die beispielsweise in der Signaltransduktion von Bedeutung sind, beeinflusst werden kann.^[99]

Ziel dieser Arbeit war es Liganden für PDZ-Domänen zu identifizieren. Dazu wurden speziell die PDZ-Domänen der Proteine Shank3 und DVL3 untersucht. Das Shank3-Protein ist maßgeblich an der Organisation der postsynaptischen Dichte (PSD) in exzitatorischen Synapsen beteiligt. Mutationen des *Shank*-Gens werden mit neuronalen Krankheiten, wie beispielsweise Autismus^{[100],[101]}, in Verbindung gebracht. Das DVL3-Protein ist ein wichtiges Protein im Wnt-Signalweg. Eine übermäßige Aktivierung dieser Signalkaskade korreliert mit diversen Krebserkrankungen, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom.^[102]

Für die Untersuchung einer Substanzbibliothek an der Shank3-PDZ-Domäne war es erforderlich einen hochdurchsatzfähigen Assay zu entwickeln. Die durch das Screening dieser Bibliothek identifizierten Verbindungen sollten hinsichtlich der Affinität gegenüber der Shank3-PDZ-Domäne optimiert werden. Aus diesem Grund war es obligatorisch eine fokussierte Bibliothek zu synthetisieren. Diese sollte es zusätzlich erlauben Aussagen über die für die Bindung relevanten Gruppen zu treffen. Eine weitere Aufgabe stellten die Selektivitätsuntersuchungen der aktiven Verbindungen mit anderen PDZ-Domänen dar.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Untersuchung der DVL3-PDZ-Domäne im Fokus. Dazu war es nötig, wie für die Shank3-PDZ-Domäne, einen FP-Assay zu etablieren, um anschließend Liganden zu entwickeln bzw. zu optimieren. Für die Ligandenoptimierung konnte auf bereits bekannte Inhibitoren der DVL3-PDZ-Domäne (Vorarbeiten durchgeführt von N. KAMDEM, AG Oschkinat und A. KREUCHWIG, AG Krause, FMP, Berlin, D. KOWALSKI, Enamine Ltd., Kiew) zurückgegriffen werden. Die Aufgabe der Affinitätssteigerung dieser Liganden sollte durch strukturelle Untersuchungen unterstützt werden (in Kooperation mit Y. ROSKE, AG Heinemann, MDC, Berlin). Für die Steigerung der Affinität war es nötig, Derivate der bereits bekannten Liganden zu synthetisieren und diese hinsichtlich ihrer Bindung an die DVL3-PDZ-Domäne zu untersuchen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Synapse

Das Shank-Protein, dessen PDZ-Domäne einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet, wird hauptsächlich im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert. Da das Protein für die Organisation der Synapsen im ZNS wesentlich ist, wird im Folgenden insbesondere auf diese eingegangen. Die Kommunikationsprozesse im ZNS beruhen auf der Interaktion von Neuronen. Neuronen sind polare Zellen mit verschiedenen Fortsätzen für eingehende Informationen, den Dendriten, und für die Signalweiterleitung, den Axonen.^{[103],[104]}

Die Signalweiterleitung erfolgt an sog. Synapsen, den Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen. Diese sind selten direkt miteinander verbunden (elektrische Synapse). Ist das doch der Fall, so spricht man von der elektrischen Synapse.

Die Weiterleitung der Signale wird im Allgemeinen durch Neurotransmitter, die in Vesikeln der präsynaptischen Zelle gespeichert sind, realisiert. Diese werden durch Exocytose in den synaptischen Spalt freigesetzt, wenn ein eingehendes Aktionspotenzial zur Öffnung von spannungsregulierten Calciumkanälen führt und es somit zu einer Spannungsänderung in der Zelle kommt.^[103] Auf Grund der Signalweiterleitung durch Neurotransmitter werden solche Synapsen als chemische Synapsen bezeichnet.^[103]

Im ZNS existieren inhibitorische Synapsen mit Rezeptoren für die Neurotransmitter Glycin und γ -Aminobuttersäure (GABA) und exzitatorische Synapsen mit Rezeptoren für den Neurotransmitter Glutamat. Glycin und GABA binden an Chlorid-Kanal-Rezeptoren und verursachen das Einströmen von Chloridionen. Das führt zu einer lokalen Hyperpolarisation der Zelle, die damit schwerer erregbar wird. Die Rezeptoren von Glutamat in exzitatorische Synapsen wirken als Liganden für Natrium- oder Calciumkanäle. Durch das Einströmen von Natrium- bzw. Calciumionen kommt es zu einer Depolarisierung und damit Erregung der Zelle.^[103]

Die Rezeptoren in exzitatorischen Synapsen werden in metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) und ionotrope Glutamatrezeptoren unterschieden. Die mGluRs vermitteln Signale über die Bindung von G-Proteinen an die Zelle. Im Vergleich zu ionotropen Glutamatrezeptoren, die durch das Öffnen eines Ionenkanals unmittelbar zu einem Effekt in der Zelle führen (im Bereich von Mikrosekunden), ist die Wirkung von mGluRs langsamer (im Bereich von Millisekunden).^[103]

Ionotrope Glutamaterezeptoren werden entsprechend ihrer spezifischen, exogenen Agonisten in NMDA- und α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat (AMPA)-Rezeptoren unterschieden.^{[103],[105]}

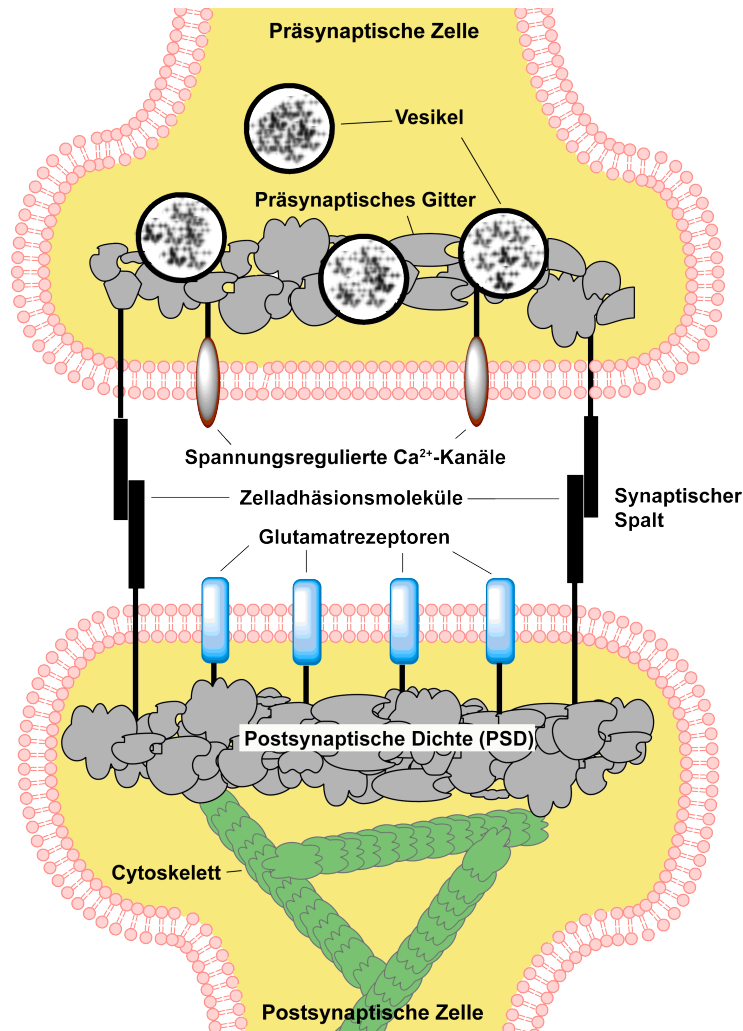


Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer exzitatorischen Synapse.

Die korrekte Anordnung der Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle usw. wird durch ein Proteinnetzwerk direkt unterhalb der Zellmembran gewährleistet. In der präsynaptischen Zelle wird dieses Proteinnetzwerk präsynaptisches Gitter genannt. Auf der postsynaptischen Seite wird es als postsynaptische Dichte (*postsynaptic density*, PSD) bezeichnet^{[103],[106]} (Abb. 3.1). Bei der PSD handelt es sich um ein Proteinnetzwerk aus mehreren hundert Proteinen von etwa 40 nm Stärke^[106], welches hauptsächlich durch Interaktionen von PDZ-Domänen gebildet wird.^[103] Schematisch ist die PSD und auch das Proteinnetzwerk auf der präsynaptischen Seite in Abb. 3.2 dargestellt. Wie aus dieser Abbildung (Abb. 3.2) hervorgeht, ist das zentrale Protein bei der Organisation der PSD das Gerüstprotein Shank^[107], welches im Weiteren genauer besprochen wird.

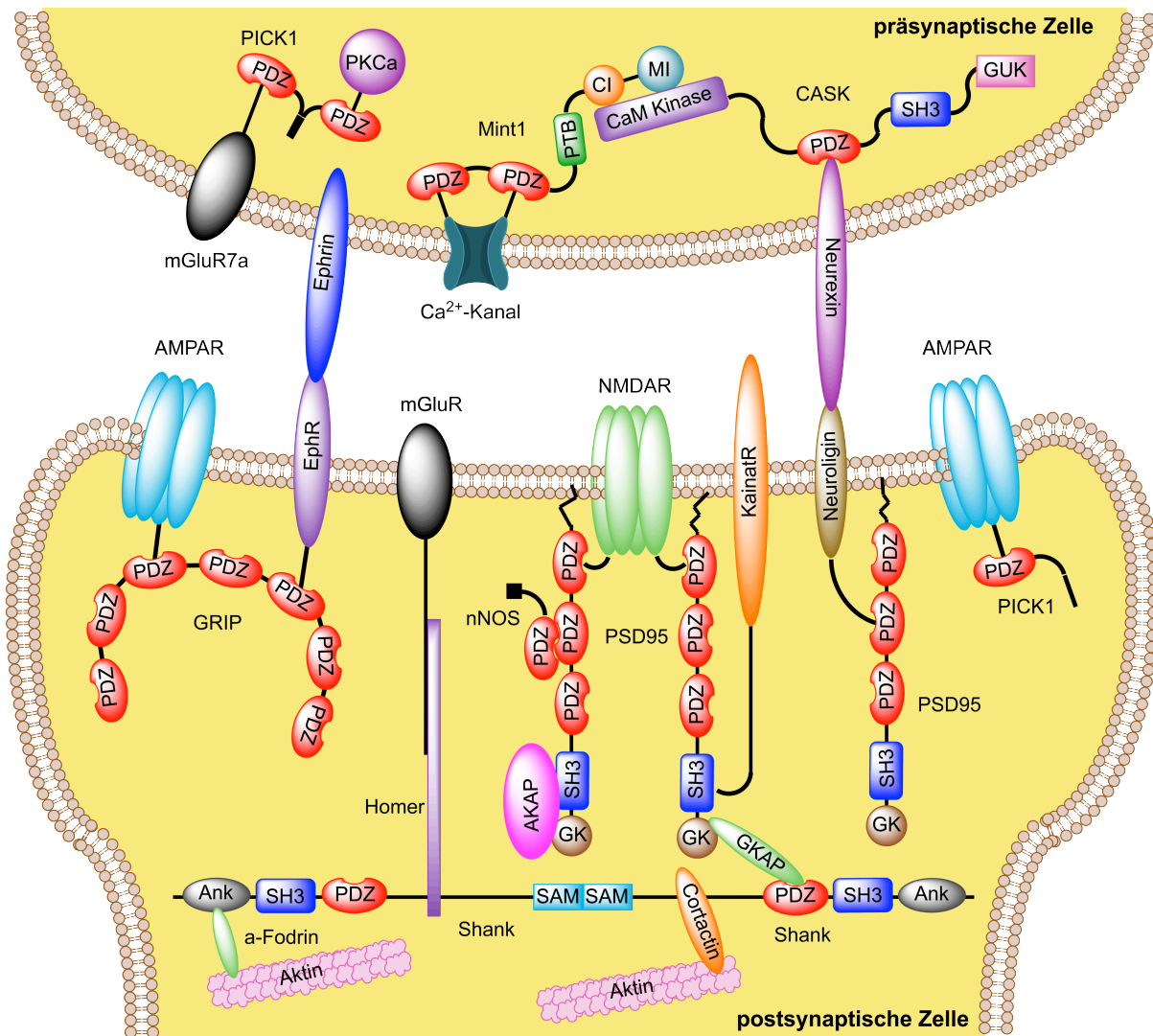


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des Proteinnetzwerkes einer exzitatorischen Synapse.^[108]

3.2 Das Gerüstprotein Shank

Die Mitglieder der Shank-Proteinfamilie, es existieren drei Isoformen (Shank1, Shank2 und Shank3), werden hauptsächlich im ZNS exprimiert und sind in der PSD von exzitatorischen Synapsen lokalisiert.^[6] Als typisches Gerüstprotein besitzt Shank eine Vielzahl von PPI-Domänen. Bei den Interaktionsdomänen handelt es sich, vom N-Terminus zum C-Terminus, um multiple *Ankyrin repeats* (Ank), eine SH3-Domäne, eine PDZ-Domäne, eine ausgedehnte, prolinreiche Region und eine SAM-Domäne^[109] (Abb. 3.3).



Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Shank-Proteins

Für jede dieser Domänen sind diverse Interaktionspartner bekannt. So wurde mit Hilfe von *pull-down*-Experimenten eine Wechselwirkung der SH3-Domäne mit dem Protein GRIP nachgewiesen.^[109] Die SAM-Domäne bildet wie in Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben Oligomere.^[109] Für das Shank3-Protein konnte die Bildung von ausgedehnten Ebenen, durch die Polymerisation der SAM-Domänen (vgl. Abschnitt 1.2.3.1), nachgewiesen werden.^[51] Die prolinreichen Proteinabschnitte sind potenzielle Bindungsstellen für eine Reihe von PPI-Domänen wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben. So wechselwirkt die C-terminale SH3-Domäne des Proteins Cortactin mit dem prolinreichen Abschnitt des Shank-Proteins. Außerdem bindet Cortactin direkt an Aktin und verankert damit Shank und dessen Bindungspartner am Cytoskelett.^[110] Ein weiterer Anknüpfungspunkt an das Zellskelett stellt α -Fodrin dar. Dieses bindet einerseits an die *Ankyrin repeats* des Shank-Proteins und andererseits an Aktin.^[111] Das Protein Homer bindet durch eine EVH1-Domäne an die prolinreiche Region von Shank. Über Homer, welches als „Brückenmolekül“ fungiert, werden mGluRs mit Shank verknüpft.^[112] Eine direkte Interaktion von mGluRs mit der Shank-PDZ-Domäne wurde ebenfalls beschrieben.^[113] Ein weiterer Interaktionspartner der Shank-PDZ-Domäne ist das *guanylate kinase-associated protein* (GKAP), welches den PSD-95/NMDA-Rezeptor Komplex an Shank bindet.^[111] Schematische sind die Interaktionen des Shank Proteins in Abb. 3.4 dargestellt (siehe auch Abb. 3.2).

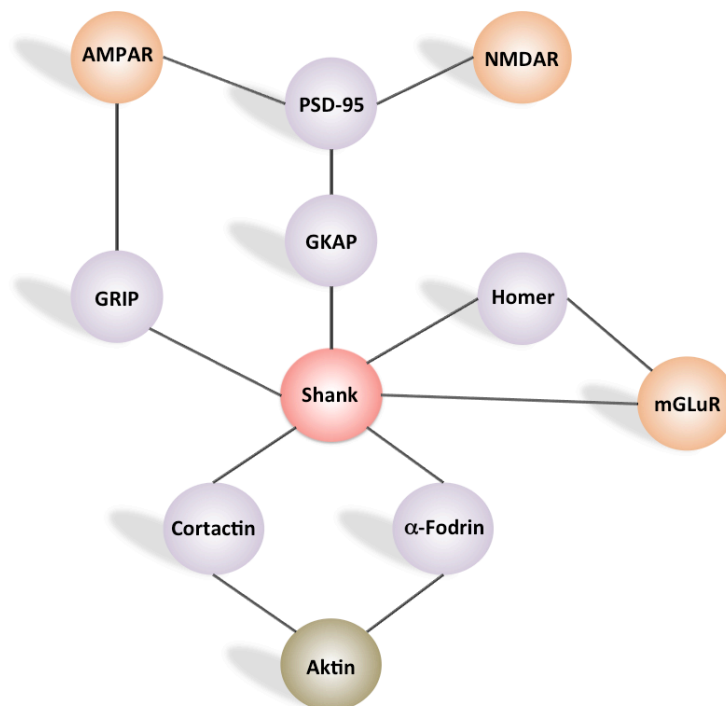


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Interaktion des Shank-Proteins.

Shank fungiert demnach nicht nur als zentrales Gerüstprotein der PSD, der Schnittstelle zwischen membrangebundenen Rezeptoren und dem auf Aktin basierendem Cytoskelett.^[107]

Es verbindet auch verschiedene Typen von Rezeptoren, wie mGlu-, NMDA- und AMPA-Rezeptoren und verankert diese am Cytoskelett.^[111] (Abb. 3.2 und Abb. 3.4)

Außerdem spielt das Shank-Protein eine entscheidende Rolle bei der Reifung dendritischer Dornfortsätze, Ausstülpungen auf Dendriten von Nervenzellen an deren Spitze sich in den meisten Fällen eine Synapse befindet. Speziell die Interaktion der Shank PDZ-Domäne mit dem Protein *dendrite arborization and synapse maturation 1* (Dasm1) ist für diese Reifung essenziell.^{[114],[115]}

Um eine effektive Informationsweiterleitung in der chemischen Synapse zu gewährleisten, unterliegt diese ständig strukturellen Änderungen.^[116] Folglich kommt es ständig zu Modifikationen der PSD bzw. des Cytoskeletts. Diese morphologische Plastizität exzitatorischer Synapsen ist direkt mit Erinnerungs- und Lernprozessen korreliert.^{[117]-[120]} Bei Fehlfunktionen im Aufbau der PSD kann es zu Störungen in der Signalweiterleitung kommen. Diese Störungen sind Ursache diverser psychiatrischer und neurologischer Krankheiten, wie mentale Retardierung^[121], Schizophrenie^[122], Autismus^[123], Alzheimererkrankung^[124] und Suchterkrankungen.^[125] Eine direkte Beteiligung des Shank-Proteins ist für Autismus^{[100],[101]} und die Alzheimererkrankung^[126] belegt.

Im Falle von Autismus wurden Mutationen im *Shank*-Gen festgestellt.^{[100],[101]} Während bei Alzheimerpatienten eine signifikant geringere Anzahl an NMDA- und AMPA-Rezeptoren beobachtet wurde. Diese Reduzierung beruht auf einem geringeren Gehalt an Shank3 in den Synapsen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.^[126]

Da die PDZ-Domäne für die Lokalisation von Shank in der Synapse essentiell ist^[127], stellt Inhibition dieser PPI-Domäne ein interessantes Ziel dar. Durch eine systematische Blockade der Shank-PDZ-Domäne könnte die Rolle des Shank-Proteins bei der Organisation der PSD untersucht werden. Des Weiteren können solche Liganden ein wichtiges Werkzeug bei der Untersuchung der oben genannten psychiatrischen und neurologischen Krankheiten sein. So wäre es eventuell möglich den Beitrag des Shank-Proteins an der Alzheimererkrankung zu klären. Aus diesen Gründen war es interessant Liganden der Shank3-PDZ-Domäne zu identifizieren. Dementsprechend wird im folgenden Abschnitt genauer auf die Shank3-PDZ-Domäne eingegangen.

3.2.1 Shank-PDZ-Domäne

Wie bereits beschrieben ist die PDZ-Domäne bedeutend für die Lokalisation von Shank in der exzitatorischen Synapse.^[127]

Die PDZ-Domänen der drei Shank-Isoformen sind, wie die Proteine insgesamt, stark konserviert. Das wird durch die 85 %ige bzw. 76 %ige Sequenzidentität von Shank1- zur Shank2-PDZ-Domäne bzw. Shank1- zur Shank3-PDZ-Domäne belegt. (Abb. 3.5)

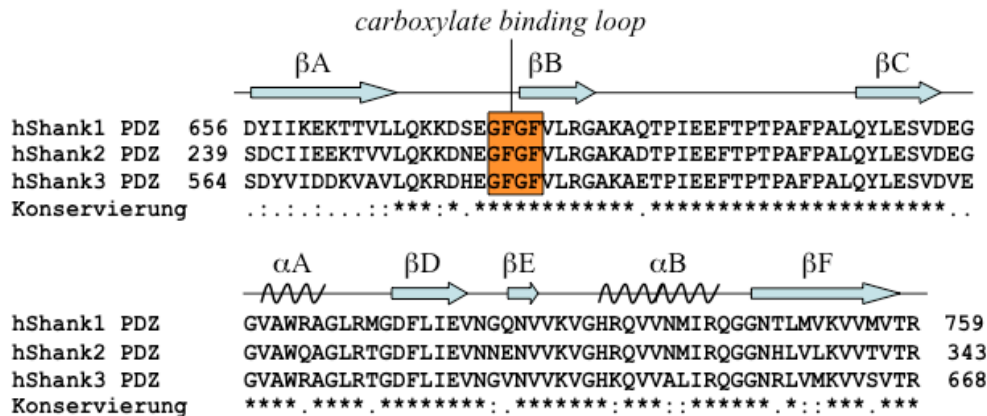


Abb. 3.5 Sequenzalignment und Sekundärstruktur der humanen PDZ-Domänen von Shank1, 2 und 3 (UNIPROT Code: Shank1: Q9Y566, Aminosäuren 654-757; Shank2: Q9UPX8, Aminosäuren 247-341 und Shank3 Q9BYB0, Aminosäuren 572-666). Der Grad der Ähnlichkeit ist gekennzeichnet durch ,*' - identisch, ,:' - ähnlich, ,.' - verschieden.

Die Shank-PDZ-Domänen können auf Grund ihres Bindungsmotivs X S/T X Ψ -OH (siehe Abschnitt 1.2.4, Tabelle 1.1) den Klasse I PDZ-Domänen zugeordnet werden.

Ein grundlegender Unterschied zu anderen PDZ Domänen ist der lange Schleifenbereich zwischen den β -Strängen β B und β C sowie die verlängerten C- bzw. N-terminalen β -Stränge β A und β F. Durch die verlängerten β -Stränge am C- und N-Terminus kommt es zur Bildung eines Homodimers, wie es in der Kristallstruktur der Shank1-PDZ-Domäne (PDB: 1Q3P und 1Q3O) beobachtet wurde.^[129] Diese Art der Dimerisierung sollte exklusiv für die isolierte PDZ-Domäne zu beobachten sein. Da die Dimerbildung durch Interaktionen der C- bzw. N-terminalen β -Stränge stattfindet, werden die der PDZ-Domäne folgenden Proteinteile im vollständigen Shank Protein die Dimerisierung wahrscheinlich verhindern. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden mit der Shank3-PDZ-Domäne des Maus-Proteins durchgeführt.

3.2.2 Assayentwicklung

Um ein Hochdurchsatzscreening (HTS) durchführen zu können, wurde ein homogener Bindungsassay entwickelt, der auf Fluoreszenzpolarisation (FP) basierte. Dieser bot sich an, da PDZ-Domänen in der Lage sind kurze Peptide zu binden. Das resultiert aus der Tatsache, dass der größte Teil der Bindungsenergie von Interaktionen an den Positionen P₀ und P₋₂ erzeugt wird^[55] (vgl. Abschnitt 1.2.4). Ein solches kurzes Peptid, markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff, kann dann als FP-Sonde genutzt werden. Weitere Vorteile des FP-Assays sind die Durchführbarkeit in Mikrotiterplatten und die geringen Proteinmengen, die zur Assaydurchführung benötigt werden.

Für die Etablierung eines FP-Assays wurden Fluoreszenzsonden, also Moleküle markiert mit einem Fluorophor, welche an das Protein binden, benötigt. Die mit Hilfe solcher Sonden ermittelte Polarisation ist definiert als Funktion der Intensitäten des parallel (I_{\parallel}) und senkrecht (I_{\perp}) polarisierten Fluoreszenzlichts, bezogen auf das eingestrahlte Licht (Gleichung (1)).^[130]

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

P – Polarisation

I_{\parallel} – Fluoreszenzintensität parallel zum Anregungslicht polarisiert

I_{\perp} – Fluoreszenzintensität senkrecht zum Anregungslicht polarisiert

Die FP-Sonden absorbieren Licht in Abhängigkeit ihrer Orientierung relativ zu Polarisation und Richtung des eingestrahnten Lichts und emittieren in der Regel ebenfalls polarisiertes Licht. Die während der Fluoreszenzlebensdauer τ , d.h. zwischen Anregung des Moleküls und Emission des Lichtes, ausgeführte Rotation der Sonde führt zu einer Reduzierung der Polarisation des Fluoreszenzlichts. Dieser Sachverhalt wird durch die PERRIN-Gleichung (2) beschrieben.^[130]

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \left(1 + \frac{R \cdot T}{\eta \cdot V} \cdot \tau \right) \quad (2)$$

P – beobachtete Polarisation

P_0 – intrinsische Polarisation

V – effektives molekulares Volumen der rotierenden Einheit

R – universelle Gaskonstante

T – absolute Temperatur

η – Viskosität

τ – Fluoreszenzlebensdauer

Die Polarisation hängt nach Gleichung (2) für ein gegebenes System, wie beispielsweise den Assay, nur vom effektiven Volumen V der rotierenden Einheit ab. Alle anderen Komponenten wie Viskosität η oder Temperatur T ändern sich nicht. Die Polarisation ist folglich direkt proportional zum molekularen Volumen.

Da der Protein-Sonden-Komplex im Vergleich zur separaten Sonde groß ist, zeigt er ein stärker polarisiertes Fluoreszenzlicht als die Sonde allein. Je größer der Unterschied der Molekülmasse bzw. Molekülvolumen von Sonde und Protein ist, desto größer sind auch die Unterschiede der gemessenen Polarisation für die an das Protein gebundene bzw. freie Sonde. Wird ein potenzieller Inhibitor zugesetzt so kommt es im Falle einer Bindung des Liganden an das Protein zu einer Verdrängung der Sonde. Das führt zu einer Reduktion der FP, wie in Abb. 3.6A und Abb. 3.6B dargestellt.^{[131],[132]}

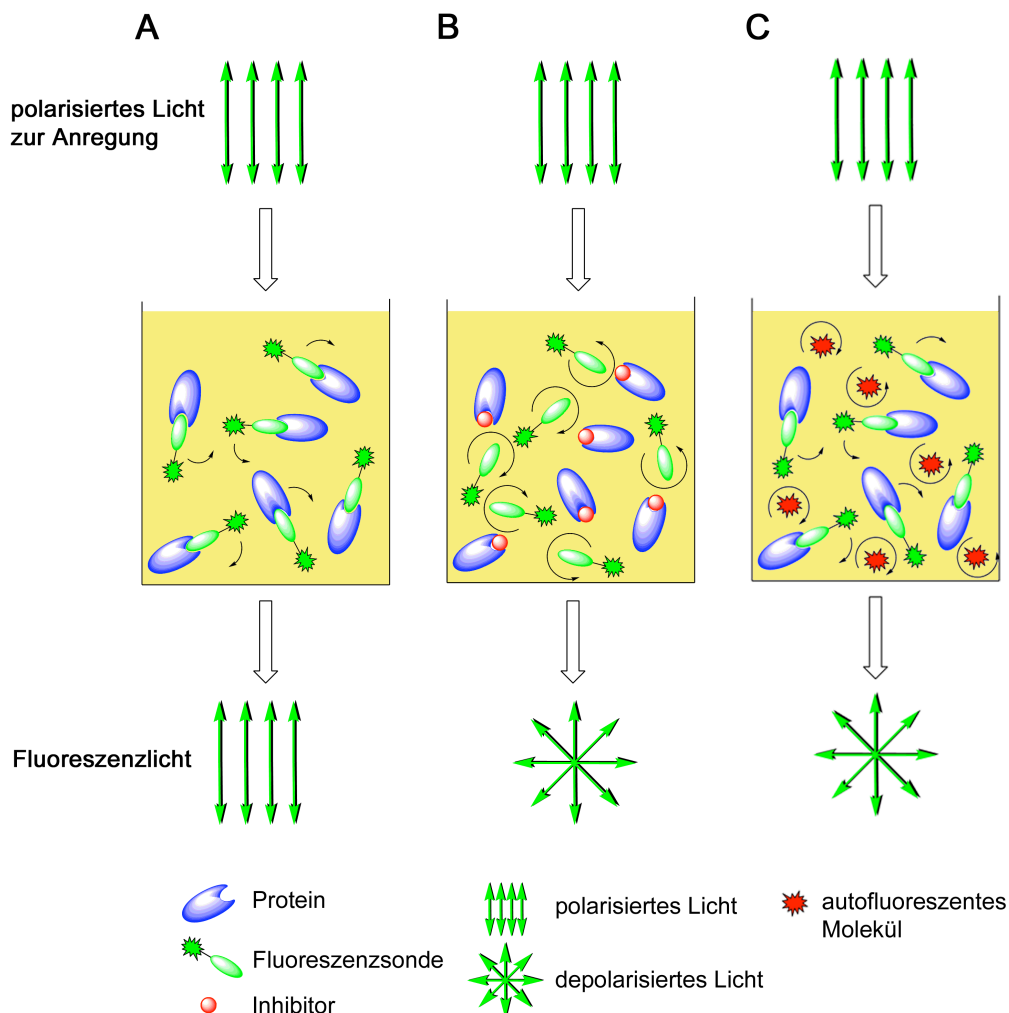


Abb. 3.6 Prinzip des FP-Assay. **A:** Protein-Sonden-Komplex mit langsamer Rotation. **B:** Durch einen Inhibitor verdrängte Sonde mit schneller Rotation. **C:** Einfluss von Substanzen mit Eigenfluoreszenz.

Ein offensichtliches Problem stellen bei diesem Assay Substanzen dar, die eine intrinsische Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des verwendeten Sondenfluorophors aufweisen. Da in diesem Falle nicht zwischen der Fluoreszenz der Sonde und der Fluoreszenz des zu untersuchenden Moleküls unterschieden werden kann, kommt es zu einer Reduktion der gemessenen FP. Die Reduktion der FP findet folglich in jedem Fall statt und lässt keine Aussagen über die Bindung der Substanz zu (Abb. 3.6C). Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich in den meisten Fällen um falsch-positive Ergebnisse handelt. Insbesondere wenn die gemessene FP unterhalb der Polarisation einer Positivkontrolle (Sonde verdrängt durch einen Überschuss an „unmarkiertem Sondenmolekül“) liegt.

Eine Möglichkeit, um die Störungen von autofluoreszenten Molekülen während der Untersuchung von Substanzbibliotheken zu minimieren, ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche im längerwelligen Bereich Licht emittieren.^[133] Dennoch ist Fluorescein der vorrangig verwendete Farbstoff.^[130] Die Vorteile des Fluoresceins liegen im verhältnismäßig niedrigen Preis. Es kann aber vor allem einfach und durch verschiedene funktionelle Gruppen, z.B. als Thioisocyanat oder Carbonsäure an Thiole oder Amine angebunden werden.^[130] Da Carboxyfluorescein standardmäßig in der Festphasen-Fmoc-Peptidsynthese verwendet wird, wurde dieser Farbstoff zur Markierung der Fluoreszenzsonden für die Shank3-PDZ-Domäne verwendet.

Um diese Fluoreszenzsonden zu erhalten, wurden verschiedene mit Fluorescein (Fluo) markierte Peptide synthetisiert. Die dazu verwendeten Aminosäuresequenzen stammten von literaturbekannten Bindungspartnern der Shank3-PDZ-Domäne.

Die optimale Länge der Sonden wurde anhand von Peptiden entsprechend der Aminosäuresequenz des Proteins GKAP^[134] bestimmt. Die Tetra- bis Heptapeptide (**1** – **4**) wurden durch Standard-Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese (Fmoc-SPPS) unter Verwendung von HOBt/DIC als Kupplungsreagenzien hergestellt.^[135] Die Synthesen wurden an 2-Chlortritylchlorid-Harz durchgeführt, um C-terminal die freie Säure zu erhalten und so den C-Terminus von GKAP zu imitieren.

Die auf diesem Wege erhaltenen Peptide (**1** – **4**) wurden in einer Konzentration von 10 nM gegen steigende Konzentration des Proteins (0 – 100 μ M) titriert. Die gemessene FP wurde gegen den dekadischen Logarithmus der Proteinkonzentration aufgetragen und mittels nicht-linearer Regression die Dissoziationskonstante K_D , also der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, bestimmt.

Für das Tetrapeptid **1** wurde eine Bindungskonstante von $K_D = 3.4 \mu$ M ermittelt. Eine Verlängerung der potenziellen Sonde zum Pentapeptid **2** führt zur Reduktion der Affinität (K_D

= 10.4 μM), während eine weiter Verlängerung zum Hexa- bzw. Heptapeptid (**3** bzw. **4**) zu einer wesentlich besseren Bindung mit K_D -Werten von jeweils 430 und 510 nM führte (Tabelle 3.1). Für das Hexapeptid **3** wurde eine ähnlich hohe Affinität wie für das literaturbekannte Dekapeptid **5** (Fluo-I Y I P E A Q T R L-OH, $K_D = 198 \text{ nM}$)^[136] gemessen. Die Aminosäuresequenz des Peptides **5** entspricht ebenfalls dem C-Terminus von GKAP.

Tabelle 3.1 Aminosäuresequenzen und Affinitäten der von GKAP abgeleiteten Peptide.

Nr.	Sequenz	$K_D \pm \text{SD}$ [μM]
1	Fluo-Q T R L-OH	3.39 ± 0.27
2	Fluo-A Q T R L-OH	10.40 ± 0.65
3	Fluo-E A Q T R L-OH	0.43 ± 0.05
4	Fluo-P E A Q T R L-OH	0.51 ± 0.04

Auf Grund der hohen Affinität des Hexapeptides **3** wurden weitere fluoreszenzmarkierte Hexapeptide, deren Aminosäuresequenzen den C-Termini der Interaktionspartner *receptor tyrosine kinase subtype 9* (Ret9, Fluo-H A F T R F-OH, **6**) und *somatostatin receptor subtype 2* (SSTR2, Fluo-D L Q T S I-OH, **7**) entsprechen, synthetisiert. Für beide Peptide konnte eine Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne festgestellt werden. Diese war schwächer als die des von GKAP abgeleiteten Peptides **3**. Für das dem Ret9 C-Terminus entsprechende Peptid **6** wurde eine Affinität von 2.1 μM gemessen. Diese war vergleichbar mit dem für das Tetrapeptid **1** gemessenen K_D -Wert ($K_D = 3.4 \mu\text{M}$). Der K_D -Wert des Peptides **7** mit der Aminosäuresequenz von SSTR2 ($K_D = 13,7 \mu\text{M}$) entsprach dem des Pentapeptides **2** ($K_D = 10.4 \mu\text{M}$) (Diagramm 3.1).

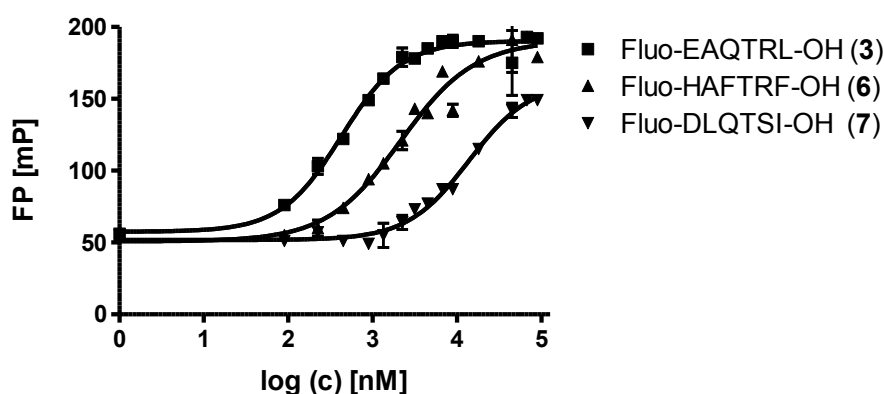


Diagramm 3.1 K_D -Werte der Hexapeptide **3**, **6** und **7**. Die Aminosäuresequenzen entsprechen den C-Termini der Proteine GKAP (**3**, $K_D = 0.43 \pm 0.05 \mu\text{M}$), Ret9 (**6**, $K_D = 2.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$) und SSTR2 (**7**, $K_D = 13.7 \pm 2.6 \mu\text{M}$).

Das Hexapeptid **3** besaß die höchste Affinität der hier getesteten Peptide (**1** – **7**) zur Shank3-PDZ-Domäne. Somit bestätigten die gemessenen K_D -Werte die von STIFFLER *et al.* gemachten Beobachtungen bei der Selektivitätsuntersuchung von 157 Maus-PDZ-Domänen. Diese wurden mit Dekapeptiden, die den C-Termini von 217 Maus-Proteinen entsprachen vermessen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der GKAP-C-Terminus der bevorzugte Bindungspartner der Shank3-PDZ-Domäne ist.

Auf Grund der hohen Affinität des Peptids **3** zur Shank3-PDZ-Domäne wurde **3** auf die Verwendbarkeit als Sonde in einem HTS-Assay untersucht. Dazu musste ermittelt werden, ob es möglich ist, die Sonde **3** vom Protein zu verdrängen. Diese Untersuchung ist insofern von Bedeutung, als dass beim Screening eben diese Verdrängung der Fluoreszenzsonde durch den Inhibitor detektiert wird.

Für das Konkurrenzexperiment wurden 10 nM der Sonde **3** in Anwesenheit von 500 nM Shank3-PDZ-Domäne mit steigenden Konzentrationen des nicht mit Fluorescein markierten Peptides **8** (Ac-E A Q T R L-OH) verdrängt. Aus der gemessenen FP wurde der IC_{50} -Wert bestimmt und dieser nach Gleichung (3)^[137] in den K_I -Wert transformiert.

$$K_I = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[S]_{50}}{K_D} + \frac{[P]_0}{K_D} + 1 \right)} \quad (3)$$

$[I]_{50}$ – Konzentration des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition
 $[S]_{50}$ – Konzentration der freien Sonde bei 50 % Inhibition
 $[P]_0$ – Konzentration des freien Proteins bei 0 % Inhibition

Die für die Bestimmung des K_I -Wertes notwendigen Konzentrationen des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition $[I]_{50}$, der freien Sonde bei 50 % Inhibition $[S]_{50}$ und des freien Proteins, wenn keine Inhibition stattfindet $[P]_0$, konnten berechnet werden. Alle dafür benötigten Werte konnten ausgehend von der Konzentration des eingesetzten Proteins $[P]_T$, der Konzentration der eingesetzten Sonde $[S]_T$, des K_D -Wertes des Protein-Sonden-Komplexes K_D und des gemessenen IC_{50} -Werte für den Liganden IC_{50} berechnet werden. (siehe Beispielrechnung im Appendix, Abschnitt I.1)

Lässt sich die Sonde **3** verdrängen, sollte der berechnete K_I -Wert für das Peptid **8** mit dem gemessenen K_D -Wert des Sonde **3** identisch sein. Der K_I -Wert des unmarkierten Peptides **8** betrug 438 nM und entsprach damit sehr gut dem K_D -Wert der Sonde **3** ($K_D = 430$ nM). Die Fluoreszenzsonde **3** ließ sich folglich problemlos von der Bindungsstelle des Proteins verdrängen und erfüllte damit eine grundlegende Voraussetzung für den Assay.

Des Weiteren wurde der Z' -Wert des Assays bestimmt.^[138] Dieser gibt die Qualität und damit die Eignung des Assays für Hochdurchsatzuntersuchungen an. Der Z' -Wert berechnet sich nach Gleichung (4)^[138] aus der FP bei gebundener Sonde (FP_{gebunden}) und der dazugehörigen Standardabweichung (SD_{gebunden}) sowie der FP bei verdrängter Sonde (FP_{frei}) und der dazugehörigen Standardabweichung (SD_{frei}).

$$Z' = 1 - \frac{3 \cdot (SD_{\text{gebunden}} + SD_{\text{frei}})}{FP_{\text{gebunden}} - FP_{\text{frei}}} \quad (4)$$

SD – Standardabweichung
FP – Fluoreszenzpolarisation

Um die Polarisationswerte für die gebundene Sonde zu bestimmen, wurden 500 nM Shank3-PDZ-Domäne mit 10 nM Fluoreszenzsonde (**3**) vermessen. Für den ungebundenen Zustand wurden zusätzlich 10 μ M unmarkiertes Peptid **8** zugegeben. Die Messung wurde in einer 384-Well Mikrotiterplatte, jeweils 192 Mal, durchgeführt. Aus den Messwerten wurden die Mittelwerte, 88 mP für die freie Sonde und 125 mP für die gebundene Sonde, sowie die entsprechenden Standardabweichungen ermittelt. In Diagramm 3.2 sind die gemessenen Polarisationswerte, die Mittelwerte und die dazu gehörigen dreifachen Standardabweichungen angegeben.

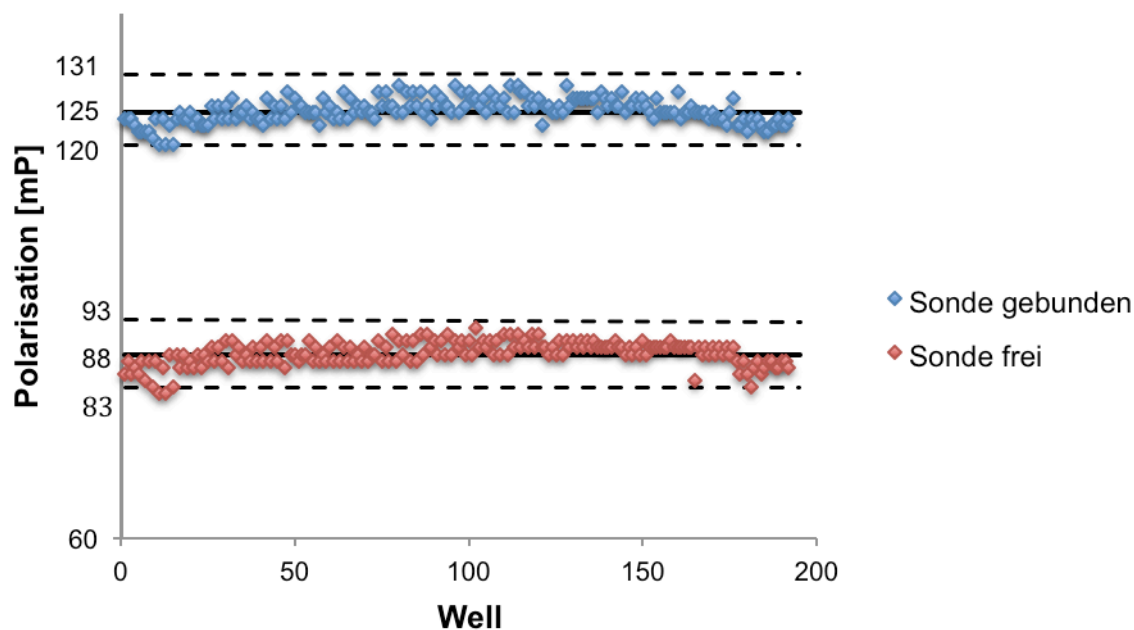


Diagramm 3.2 Werte der Fluoreszenzpolarisation für die gebundene und verdrängte Sonde **3**.

Nach Gleichung (3) betrug der Z' -Wert = 0.71. Ab einem $Z' \geq 0.5$ wird von einem robusten Assay gesprochen, der für das HTS geeignet ist.^[138] Dem zufolge ist der hier entwickelte Assay für solche Untersuchungen verwendbar.

3.2.3 Screening und Validierung der Hits

Der in Abschnitt 3.2.2 beschriebene Assay wurde eingesetzt, um die ChemBioNet-Bibliothek^[139], bestehend aus etwa 17000 Substanzen, zu untersuchen.

Um die Bindung der Substanzen aus der Bibliothek zu detektieren, wurden 500 nM Shank3-PDZ-Domäne, 10 nM Fluoreszenzsonde **3** und 10 μ M der jeweiligen Verbindung in insgesamt 10 μ L Puffer in Mikrotiterplatten pipettiert und die entsprechende FP gemessen. Es wurde eine Konzentration von 10 μ M für die Verbindungen der ChemBioNet-Bibliothek gewählt, da Substanzen gefunden werden sollten, die in diesem Konzentrationsbereich eine Aktivität zeigen. Bei höheren Konzentrationen wäre eine größere Anzahl an Primärhits zu erwarten gewesen, die aber auf Grund der geringen Affinität nicht für weitere Untersuchungen geeignet gewesen wären.

Da die Substanzen der ChemBioNet-Bibliothek als Lösungen in DMSO vorlagen, wurde der Assay in Gegenwart von 1 % DMSO durchgeführt. Als Bezugspunkt befanden sich auf jeder Mikrotiterplatte zusätzliche Negativkontrollen, d.h. das Protein und die Fluoreszenzsonde **3** in den oben genannten Konzentrationen. Dadurch konnte individuell für jede Mikrotiterplatte ein Standard für eine vollständige Bindung der Sonde **3** an das Protein festgelegt werden. Eine geringere FP als die der Negativkontrolle sollte durch Konkurrenz um die Bindungsstelle erzeugt werden und somit eine für die Shank3-PDZ-Domäne aktive Verbindung anzeigen.

Die meisten der untersuchten Verbindungen der ChemBioNet-Bibliothek wiesen eine Polarisation von etwa 100 % relativ zur Kontrolle auf (Diagramm 3.3). Für einen Teil der Verbindungen wurde jedoch eine erhöhte FP gemessen. Die Erhöhung der Polarisation könnte auf Streulicht, verursacht durch Präzipitation der Substanzen aus der Bibliothek bzw. des Proteins, zurückgeführt werden.^[133]

Eine reduzierte FP wurde für 27 Verbindungen der ChemBioNet-Bibliothek ermittelt (siehe Appendix I.2, Tabelle I.1). Als aktiv wurden Substanzen definiert, welche die FP um mindestens 15 % relativ zur Negativkontrolle reduzierten und deren Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 75 % bis 110 % der Negativkontrolle lag. In diesem Fenster, in Diagramm 3.3 braun unterlegt, lagen 13 Verbindungen.

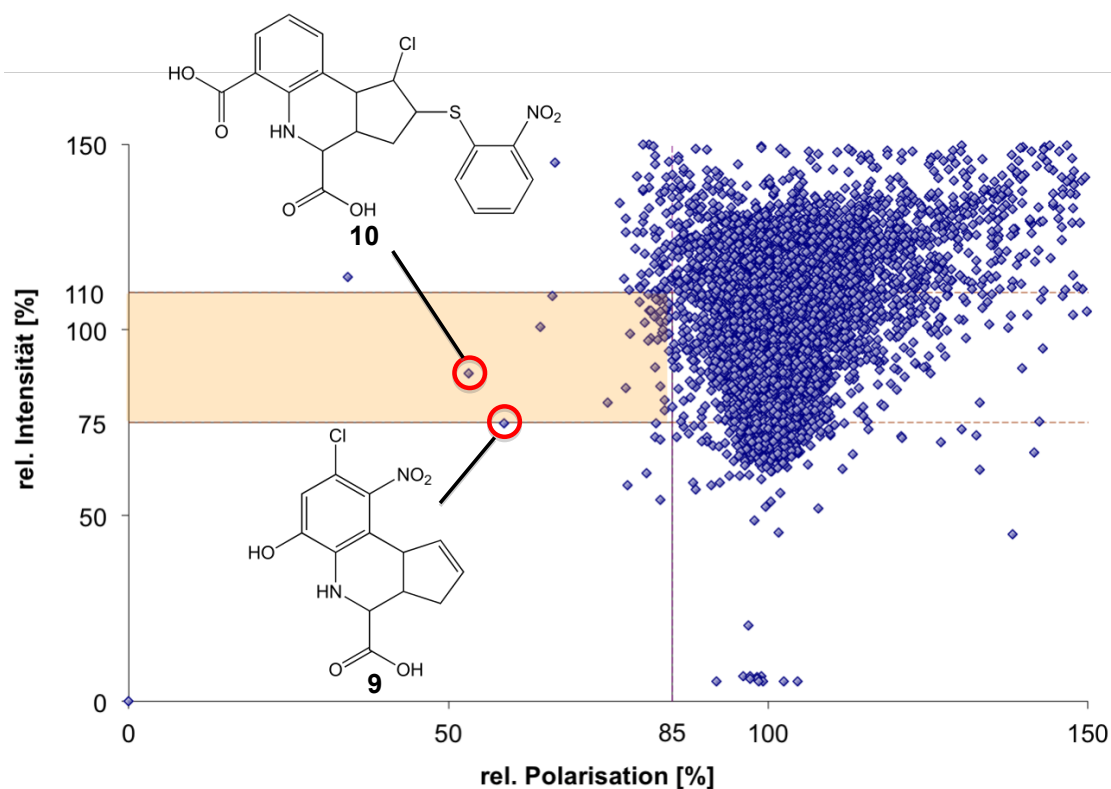


Diagramm 3.3 Ausschnitt der Auftragung von relativer Intensität gegen die relative Polarisation gemessen während des Screenings der ChemBioNet-Bibliothek. Die Strukturen der Primärhits (**9**, $K_I = 10.9 \pm 4.4 \mu\text{M}$ und **10**, $K_I = 8.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$) sind den jeweiligen relativen Intensitäten und Polarisationen zugeordnet.

Da eine intrinsische Fluoreszenz der zu untersuchenden Substanzen generell zur Depolarisation führt und somit, wie in Abschnitt 3.2.2 diskutiert, keine Aussagen zum Bindungsverhalten möglich sind, wurden 14 Verbindungen mit einer Fluoreszenzintensität von mehr als 110 % der Negativkontrolle nicht weiter untersucht (siehe Appendix I.2, Tabelle I.1).

Die verbleibenden 13 Primärhits wurden in einem konzentrationsabhängigen FP-Assay vermessen (10 nM Fluoreszenzsonde **3**, 500 nM Shank3-PDZ-Domäne und steigende Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz). Nur für die Verbindungen **9** und **10** (Diagramm 3.3) wurden IC_{50} -Werte kleiner als $250 \mu\text{M}$ gemessen.

Die aus den IC_{50} -Werte berechneten K_I -Werte^[137] (siehe auch Beispielrechnung Appendix, Abschnitt I.1) betragen $10.9 \pm 4.4 \mu\text{M}$ für Verbindung **9** und $8.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$ für Verbindung **10**. Die Aktivität der Primärhits **9** und **10** wurde in einem unabhängigen Assay validiert. Dazu wurden $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -heteronuclear single quantum correlation (HSQC) NMR-Messungen durchgeführt (in Kooperation mit N. KAMDEM, AG Oschkinat, FMP, Berlin).

Für $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Messungen wird ^{15}N -markiertes Protein verwendet, da im Spektrum die Korrelation zwischen Protonen und Stickstoff (nur die ^{15}N -Kerne sind im NMR aktiv)

wiedergegeben wird. Die gemessenen Signale werden durch die Rückgratamide des Proteins bis auf Prolin, da dort keine Protonen am Stickstoff vorhanden sind, erzeugt. Außerdem entstehen durch die $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -Korrelation der Tryptophan-, Asparagin-, Glutamin- und Argininseitenketten zusätzliche Signale.^[140] Die Bindung eines Liganden wird detektiert indem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren in Abwesenheit und in Gegenwart des Liganden aufgenommen werden. Bindet der Ligand an das Protein werden in der Superposition der beiden Spektren Verschiebungen von Signalen des Spektrums mit Ligand im Vergleich zum Spektrum ohne Ligand beobachtet. Die Verschiebung der Signale wird durch den gebundenen Liganden hervorgerufen, da diese Bindung zu einer Änderung der chemischen Umgebung am Protein führt.

Die $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren wurden in Abwesenheit und in Gegenwart eines achtfachen Überschusses der Verbindung **9** bzw. **10** aufgenommen. Die Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne konnte durch die Verschiebung diverser Signale in Anwesenheit der Primärhits **9** und **10** bestätigt werden (Abb. 3.7).

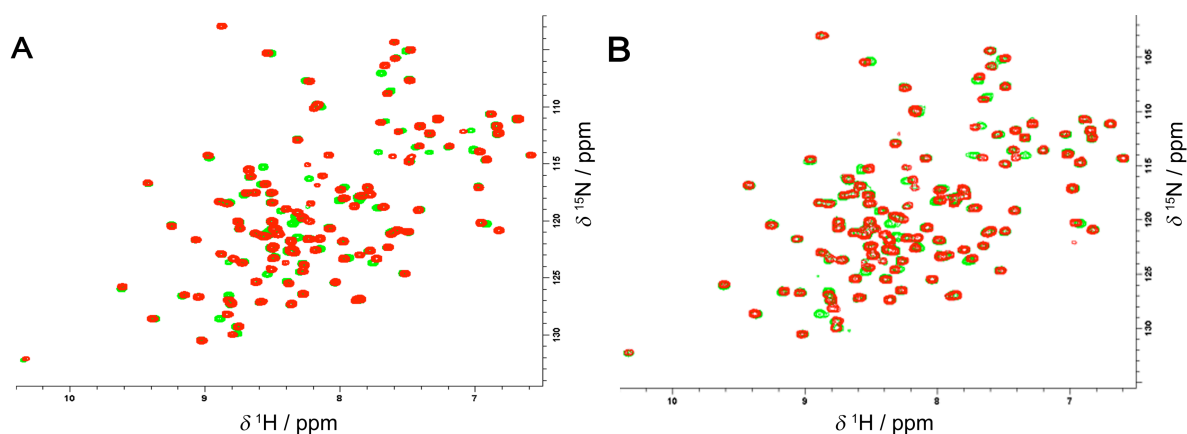
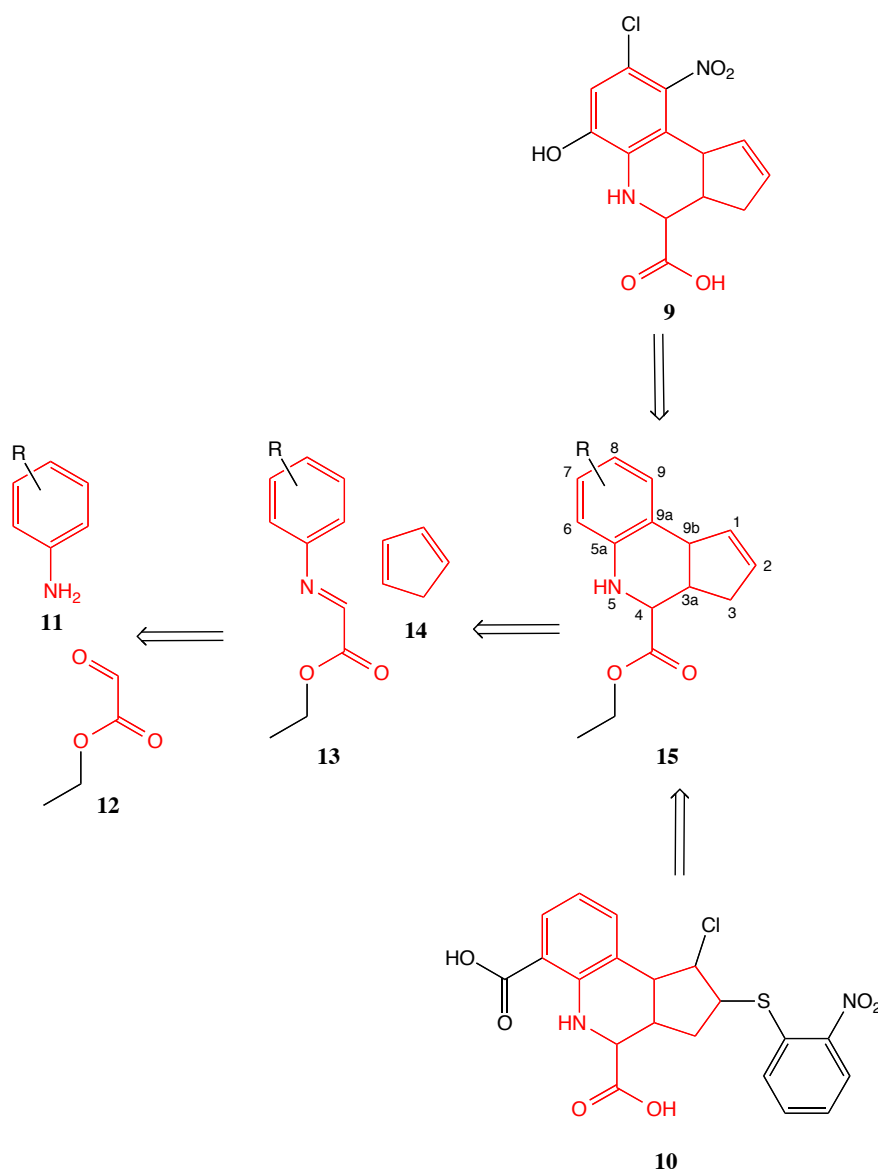


Abb. 3.7 Superposition der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne ohne Ligand in grün und mit achtfachem Überschuss an Verbindung **9** (A) bzw. **10** (B). Die verschobenen Signale zeigten die Bindung des Liganden an.

3.2.4 Synthese der fokussierten Tetrahydrochinolin-Bibliothek

Bei beiden validierten Primärhits handelte es sich um hydrierte Derivate des Cyclopenta[*c*]chinolins. Außerdem war ihnen gemein, dass sich in 4-Position eine Carbonsäurefunktionalität befand. Eine retrosynthetische Analyse ergab, dass das tricyclische Grundgerüst durch eine Cycloaddition von Cyclopentadien (**14**) an das Imin (**13**) hergestellt wird. Das Imin (**13**) wurde aus Glyoxylsäure (**12**) und dem entsprechenden Anilin (**11**) gebildet.^{[141],[142]} Die finale Verseifung des Esters in 4-Position lieferte dann das gewünschte

Produkt **9**. Die Verbindung **10** wurde durch Addition von 2-Nitrophenylsulfenylchlorid (**16**) an die Doppelbindung des Cyclopentenrings erhalten. (Schema 3.1)



Schema 3.1 Retro-Synthese der Primärhits **9** und **10**.

Bei der Cycloaddition handelte es sich um eine Lewis-Säure katalysierte Aza-Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf. Das heißt, ein elektronenreiches Dienophil reagiert mit einem elektronenarmen Dien. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Diels-Alder Reaktion mit normalem Elektronenbedarf zur Reaktion des HOMO eines elektronenreichen Diens mit dem LUMO eines elektronenarmen Dienophils (Abb. 3.8).

Im Fall der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf führt eine Verringerung der $LUMO_{\text{Dien}}$ -Energie zu einer gesteigerten Reaktivität, da der energetische Abstand zwischen $LUMO_{\text{Dien}}$ und $HOMO_{\text{Dienophil}}$ kleiner wird (Abb. 3.8). Eine solche energetische Absenkung

des $\text{LUMO}_{\text{Dien}}$ bzw. der Grenzorbitale im Allgemeinen erfolgt durch elektronenziehende Gruppen, wie beispielsweise die Esterfunktionalität am Imin und auch durch die Komplexbildung des Imins mit einer Lewis-Säure.

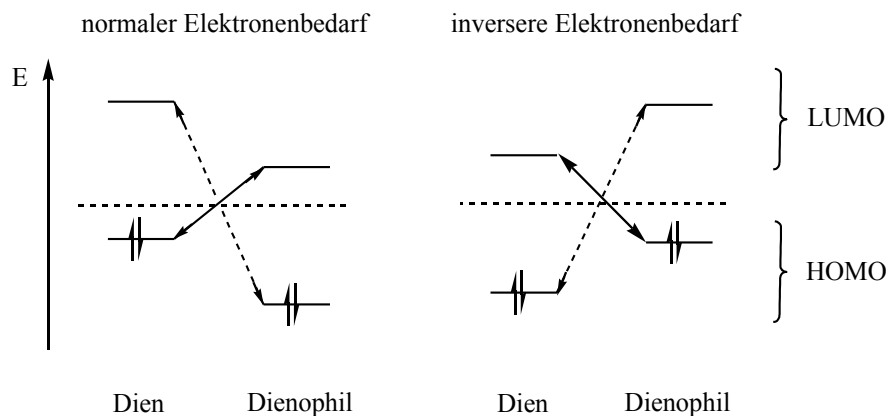


Abb. 3.8 Grenzorbital-Modell (FMO-Modell) der Diels-Alder-Reaktion mit normalem und inversem Elektronenbedarf.

Die Katalyse durch eine Lewis-Säure ist für diese Synthese essenziell, wie für die Reaktion von Anilin (**17**) mit einem Äquivalent Glyoxylsäureester **12** und 1.5 Äquivalenten Cyclopentadien (**14**) gezeigt wurde (Tabelle 3.2). Somit wurde die Annahme unterstrichen, dass es sich um eine Aza-Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf handelte.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass jede der verwendeten Lewis-Säuren in der Lage ist diese Reaktion zu katalysieren. Weichere Lewis-Säuren wie Kupfer(II)-triflat (Ausbeute: 48 %) oder Zink(II)-chlorid (Ausbeute: 45 %) katalysieren die Reaktion effektiver als harte Lewis-Säuren wie Magnesiumiodid (Ausbeute: 24 %) oder Titan(IV)-chlorid (Ausbeute: 18 %) (Tabelle 3.2). Das korreliert auch mit dem weichen Charakter des Iminstickstoffs als Lewis-Base. Eine Ausnahme bildet das Bortrifluorid-Etherat, welches als harte Lewis-Säure die Reaktion genauso gut wie Zink(II)-chlorid katalysiert. Dieser Effekt kann wahrscheinlich auf Löslichkeitseffekte zurückgeführt werden.

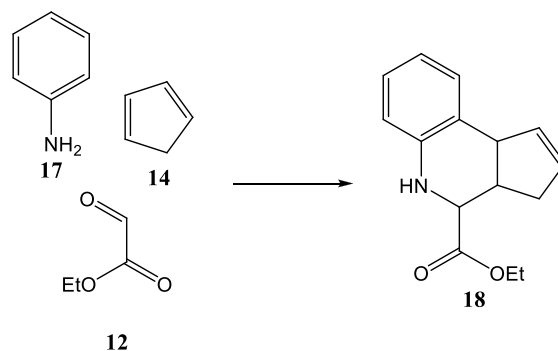
Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel wurde ebenfalls anhand dieser Reaktion unter Verwendung von 5 mol% Kupfer(II)-triflat untersucht. Kupfer(II)-triflat wurde eingesetzt, da diese Lewis-Säure die Reaktion in den vorangegangenen Versuchen am effektivsten katalysierte.

Der Einfluss der Lösungsmittel auf die Reaktion ist gering. Es wurden nahezu identische Ausbeuten für Chloroform (Ausbeute: 49 %) und Acetonitril (Ausbeute: 48 %) erreicht. Ein geringfügige Abnahme der Ausbeute war für die Verwendung von Toluol als Lösungsmittel zu verzeichnen (Ausbeute: 41%). (Tabelle 3.2) Im Weiteren wurde Acetonitril auf Grund der

besseren Lösungseigenschaften gegenüber den verwendeten Anilinen und Lewis-Säuren eingesetzt.

Der Einfluss der Lewis-Säure-Menge wurde ebenfalls anhand von Kupfer(II)-triflat bestimmt. Die Untersuchung ergab einen optimalen Anteil Lewis-Säure von 5 mol%. Eine weitere Erhöhung des Kupfer(II)-triflat-Anteils führte zu einer verminderten Ausbeute. (Tabelle 3.2)

Tabelle 3.2 Optimierung der Aza-Diels-Alder Reaktion. Die optimalste Bedingung ist Blau unterlegt.

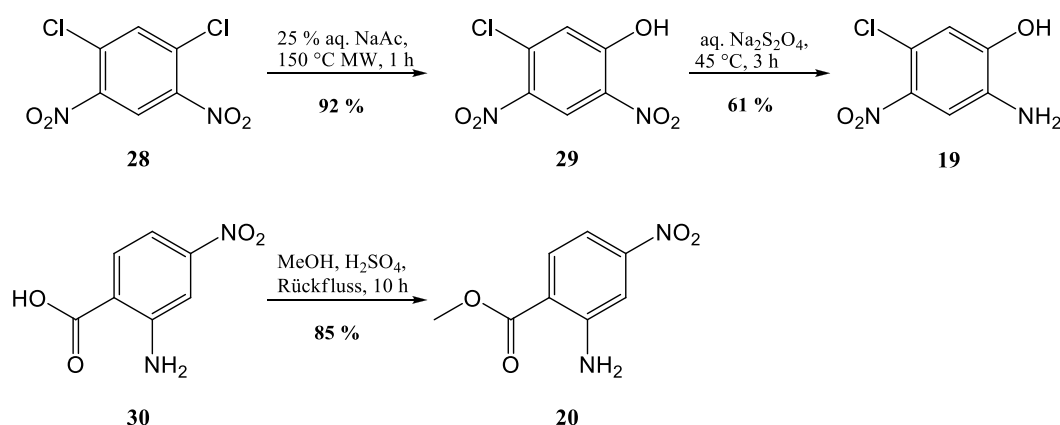


Lewis-Säure	mol%	Lösungsmittel	Ausbeute (%) ^a
Cu(OTf) ₂	0	MeCN	0
Cu(OTf) ₂	5	MeCN	48
Cu(OTf) ₂	10	MeCN	43
Cu(OTf) ₂	25	MeCN	34
Cu(OTf) ₂	5	Toluol	41
Cu(OTf) ₂	5	CHCl ₃	49
BF ₃ OEt ₂	5	MeCN	45
ZnCl ₂	5	MeCN	45
Sc(OTf) ₃	5	MeCN	40
MgI ₂	5	MeCN	24
TiCl ₄	5	MeCN	18

^anach Säulenchromatographie isolierte Ausbeuten

Zusammenfassend ergab sich, dass die Reaktion von Anilin (17) mit einem Äquivalent Ethylglyoxylat (12) und 1.5 Äquivalenten Cyclopentadien (14) in Acetonitril unter Katalyse von 5 mol% Kupfer(II)-triflat am effektivsten verlief. Aus diesem Grund wurde die Tetrahydrochinolin-Bibliothek unter identischen Bedingungen synthetisiert.

Die zur Bibliothekssynthese verwendeten Aniline (**17**, **19** - **27**) wurden größtenteils erworben. Lediglich die Verbindungen **19** und **20** wurden hergestellt. Im Falle des Anilins **19** wurde von 1,5-Dichlor-2,4-dinitrobenzol (**28**) ausgegangen. Ein Chlorsubstituent wurde gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht.^[143] An dem so synthetisierte 5-Chlor-2,4-dinitrophenol (**29**) wurde anschließend die Nitrogruppe in Position 2 mit Natriumdithionit zum 2-Amino-5-chlor-4-nitrophenol (**19**) reduziert.^[144] Bei Synthese des Anilins **20** handelte es sich um eine säurekatalysierte Veresterung des Anthranilsäurederivates **30** (Schema 3.2).



Schema 3.2 Synthese der Anilinderivate **19** und **20**.

Die synthetisierten bzw. erworbenen Anilinderivate (**17**, **19** – **27**) wurden, wie oben beschrieben, umgesetzt um die entsprechenden Tetrahydrochinolin-Verbindungen **18**, **31** – **42** mit einer als Ester geschützten Carbonsäurefunktionalität in 4-Position zu erhalten. Die Produkte wurden in Ausbeuten von 14 % bis 81 % isoliert. Das entspricht den Literaturangaben für ähnliche Verbindungen.^[145]

Da es sich um eine Diels-Alder-Reaktion handelte stellen lediglich die Verbindungen **15a/b** und **43a/b**, in Abb. 3.9 grau eingerahmt, mögliche Reaktionsprodukte dar. Die Verbindungen **15b/c** und **43b/c** (Abb. 3.9), bei denen der Cyclopentenring und die Esterfunktionalität auf entgegengesetzten Seiten des Tetrahydrochinolins angeordnet sind, repräsentieren lediglich theoretisch mögliche Reaktionsprodukte. Die Cycloaddition lieferte aber nur die in Abb. 3.9 im schwarzen Rahmen dargestellt Verbindungen **15a** und **15b**, welche als Racemat isoliert wurden. Alle anderen in Abb. 3.9 dargestellten Verbindungen **15c/d** und **43a** – **d** konnten nicht isoliert werden.

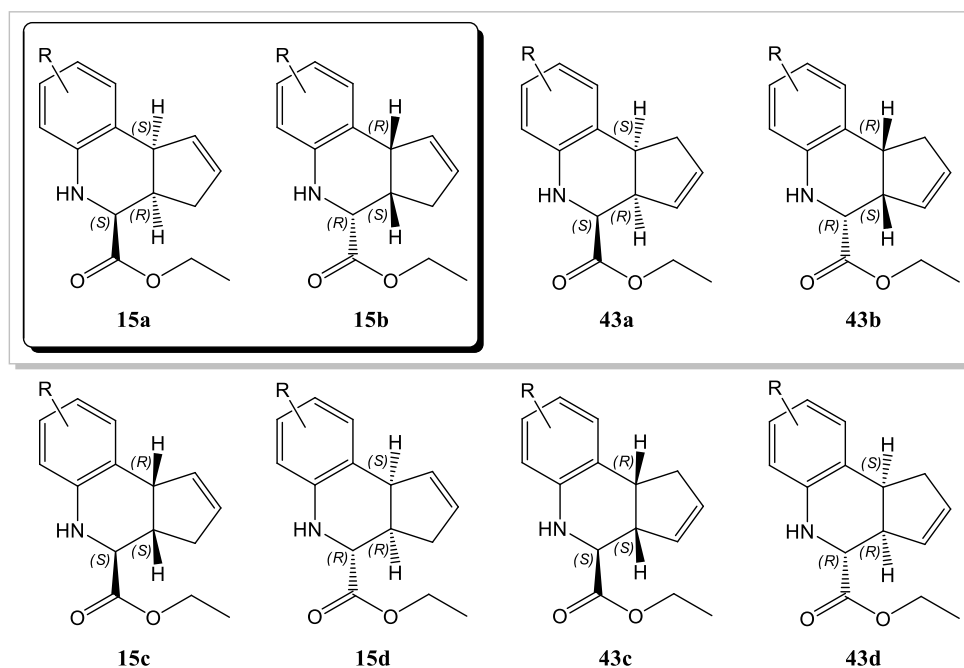


Abb. 3.9 Theoretisch mögliche Produkte der Cycloaddition. Die isolierten Produkte **15a/b** (schwarzer Rahmen) sind neben den durch die Diels-Alder Reaktion möglichen Isomeren **43a/b** (grauer Rahmen) dargestellt. Die Verbindungen **15c/d** und **43c/d** sind lediglich theoretisch möglich.

Die Regio- und Stereoselektivität bei der Entstehung des Racemats **15a/b** lässt sich sowohl durch einen konzertierten, als auch durch einen ionischen Mechanismus (vorgeschlagen von HERMITAGE *et al.*^[146]) erklären.

Die Stereoselektivität kann für den konzertierten Mechanismus durch sekundäre Orbitalwechselwirkungen – Orbitalwechselwirkungen die nicht zu einer Bindungsbildung führen – erklärt werden. Durch diese sekundären Orbitalwechselwirkungen kommt es zu einer Orientierung des Cyclopentadiens (**14**) unterhalb des Imins (**13**), dargestellt in Abb. 3.10A. Die anschließende Bindungsbildung führt dazu, dass der Cyclopentenring und der Carbonsäureester auf der gleichen Seite des Tetrahydrochinolins (**15a/b**) angeordnet sind. Die Regioselektivität kann mit Hilfe der Atomorbitalkoeffizienten der an der Bindungsbildung beteiligten Atome erklärt werden. Diese werden durch quantenmechanische Berechnung bestimmt. Je ähnlicher die Atomorbitalkoeffizienten der potenziellen Reaktionszentren sind, desto wahrscheinlicher ist die Wechselwirkung dieser Atome miteinander und damit die Reaktion. In Abb. 3.10B sind die entsprechenden Koeffizienten für das LUMO des Diens und das HOMO des Dienophils dargestellt.^[148] Die Größe der Kreise entspricht näherungsweise der Größe der Atomorbitalkoeffizienten, die Vorzeichen werden durch die Färbung wiedergegeben. Aus diesen Betrachtungen geht hervor, dass die Bildung des *3H*-Isomers **15a/b** bevorzugt ist.^[148]

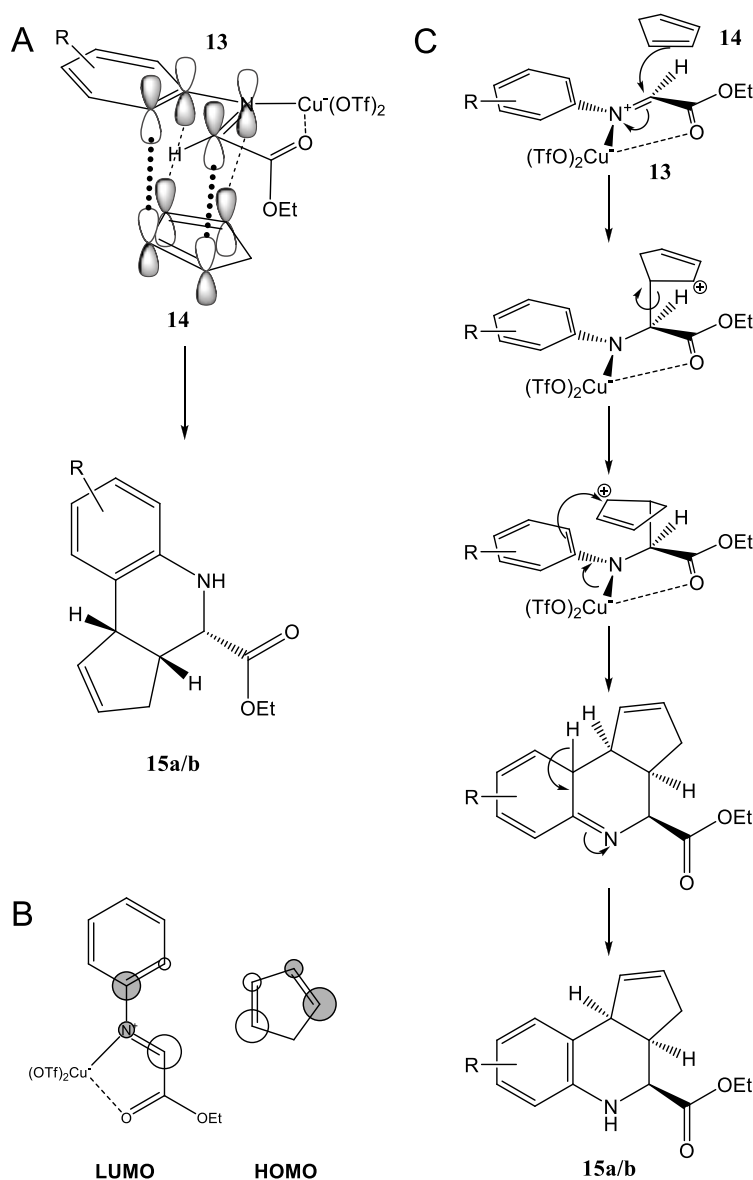


Abb. 3.10 Mögliche Reaktionsmechanismen der Aza-Diels-Alder-Reaktion. **A:** Konzertierter Mechanismus. (Punktlinie – primäre Orbitalwechselwirkung, Strichlinie – sekundäre Orbitalwechselwirkungen) **B:** Darstellung der Atomorbitalkoeffizienten vom LUMO des Diens (**13**) und HOMO des Dienophils (**14**). (grau gefärbter Kreis – negative Orbitalkoeffizienten; weißer Kreis – positive Orbitalkoeffizienten)^{[147],[148]} **C:** Postulierter ionischer Mechanismus.^[146]

Im Falle des ionischen Mechanismus, wie ihn HERMITAGE *et al.*^[146] beschreibt, kommt es zu einer Annäherung des Cyclopentadiens (**14**) über den sterisch am wenigsten anspruchsvollen Weg an das Dien **13**. Das Dien **13** liegt in der E-Konfiguration vor, was neben sterischen Gründen, durch die Komplexbildung des Carbonylsauerstoffs und des Iminstickstoffs mit der Lewis-Säure gewährleistet wird. Anschließend addiert das Cyclopentadien (**14**) an den Kohlenstoff des durch die Lewis-Säure ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$) aktivierten Imins (**13**). Dadurch entsteht ein mesomeriestabilisiertes Kation, welches dann um die neu gebildete C-C-Bindung rotiert. Darauf folgt der Angriff des Aromaten. Dieser führt zum Ringschluss. Nach der Rearomatisierung und damit Abspaltung der Lewis-Säure entsteht das Produkt **15a/b**.^[146]

Die Racematbildung ist ebenfalls durch beide Reaktionsmechanismen zu erklären, da die Annäherung des Cyclopentadiens (**14**) sowohl von der in Abb. 3.10 gezeigten Seite, als auch von der entgegengesetzten Seite erfolgen kann.

Die Frage, nach welchem Mechanismus die Cycloaddition stattfindet, ist in der Literatur umstritten.^{[146],[148]} Der Einfluss der zur Optimierung der Reaktion verwendeten Lösungsmittel lässt keinen Rückschluss auf den Reaktionsmechanismus zu. So sollte ein ionischer Ablauf der Reaktion durch polare Lösungsmittel, auf Grund der Stabilisierung der Ladung, begünstigt werden. Diese Tendenz ist aber nicht, bzw. nur geringfügig beobachtet worden (Tabelle 3.2). Die Ausbeuten für polare Lösungsmittel (Acetonitril: Ausbeute 48 %) und unpolare Lösungsmittel unterschieden sich nicht bzw. nur geringfügig (Chloroform: Ausbeute 49 %; Toluol: Ausbeute 41 %).

Werden aber die Ausbeuten im Zusammenhang mit den zur Synthese verwendeten Dienophilen **14**, **44** – **46** (Abb. 3.11) betrachtet, weist die Menge des isolierten Produkts auf einen ionischen Mechanismus hin.

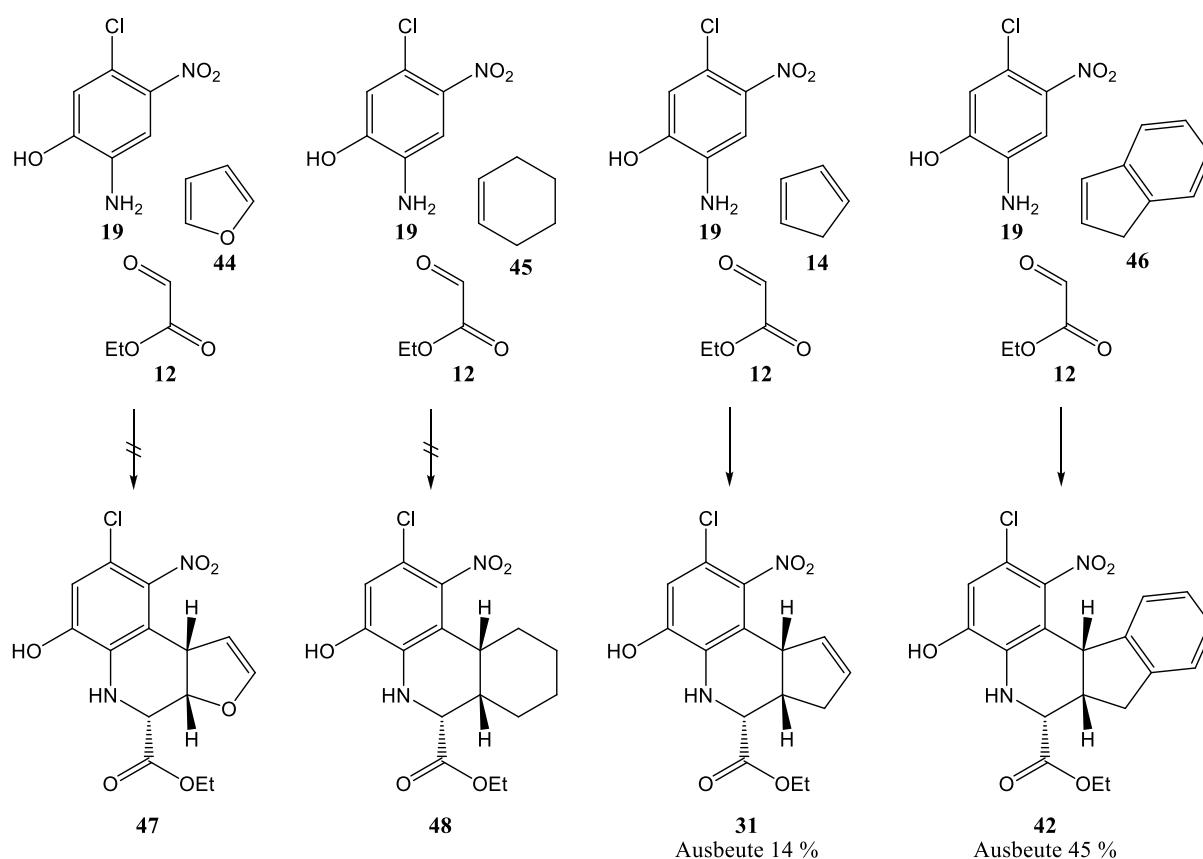


Abb. 3.11 Strukturen der erwarteten Produkte bei der Verwendung der Dienophile **14**, **23** – **25**. (Reaktionsbedingungen: 1 Äquivalent **12**, 1 Äquivalent **19**, 1.5 Äquivalente **14**, **44** – **46**, 5 mol% Cu(OTf)₂, MeCN, Molsieb 4 Å)

Das Furan (**44**) reagiert nicht als Dienophil, es ist zwar elektronenreich, aber für eine Reaktion müsste die Aromatizität aufgehoben werden. Die dafür benötigte Energie konnte offenbar nicht durch die Cycloaddition zum Tetrahydrochinolin **47** kompensiert werden, so dass diese Reaktion nicht stattfand. Inden (**46**) ist im Vergleich zu Cyclohexen (**45**) und Cyclopentadien (**14**) elektronenärmer. Das $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}$ des Indens sollte somit energetisch tiefer liegen als beispielsweise das $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}$ des Cyclopentadiens (**14**). Damit sollte die Reaktion schlechter ablaufen und entsprechend mit einer geringeren Ausbeute einhergehen. Für die Reaktion mit Inden (**46**) wurde aber eine signifikant höhere Ausbeute (Ausbeute 45 %) im Vergleich zu Cyclopentadien (**14**; Ausbeute 14 %) erreicht. Für die Reaktion mit Cyclohexen (**45**) wurde keine Produktbildung beobachtet (Abb. 3.11). Eine Erklärung für die Zunahme der Ausbeute vom Cyclohexen (**45**) über Cyclopentadien (**14**) zum Inden (**46**) liefert ein ionischer Reaktionsmechanismus. Die Möglichkeit, eine positive Ladung zu delokalisieren und damit den Übergangszustand zu stabilisieren, nimmt vom Cyclohexen (**45**) zum Inden (**46**) immer weiter zu. Durch diese Stabilisierung wird der Übergangszustand und dadurch auch die Reaktion wahrscheinlicher. Auf Grund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion schrittweise unter Bildung einer ionischen Zwischenstufe abläuft.

Die bereits beschriebene Regio- und Stereoselektivität wurde durch NMR-Messungen überprüft. So konnte die Anordnung des Cyclopentenrings *cis* zur Esterfunktion durch die vicinalen Kopplungskonstanten zwischen den Protonen H-4 und H-3a $^3J_{4,3}$ belegt werden. Diese lagen zwischen 3.5 Hz und 3.9 Hz, soweit sie aus den NMR-Spektren bestimmbar waren. Aus den Kopplungskonstanten $^3J_{4,3}$ ließ sich der Diederwinkel (H-4 – C-4 – C-3a – H-3a) für die Protonen H-4 und H-3a von 50 ° (für $^3J_{4,3a} = 3.9$ Hz) bis 54 ° (für $^3J_{4,3a} = 3.5$ Hz), mit Hilfe des Programms *Sweet J* (Version 2.2)^[149] basierend auf der KARPLUS-Beziehung, abschätzen. Damit konnte die Stellung des Cyclopentenrings zum Ester bestimmt werden.

Außerdem konnten durch Umkristallisieren der Verbindung **32** aus Ethylacetat und Hexan Einkristalle gewonnen werden, die durch Röntgenkristallstrukturanalyse die eindeutige Bestimmung der relativen Konfiguration ermöglichten (Abb. 3.12). Der in dieser Kristallstruktur gemessene Diederwinkel beträgt 50 ° und stimmte mit dem anhand der Kopplungskonstanten $^3J_{4,3}$ abgeschätzten Winkel überein (Abb. 3.12).

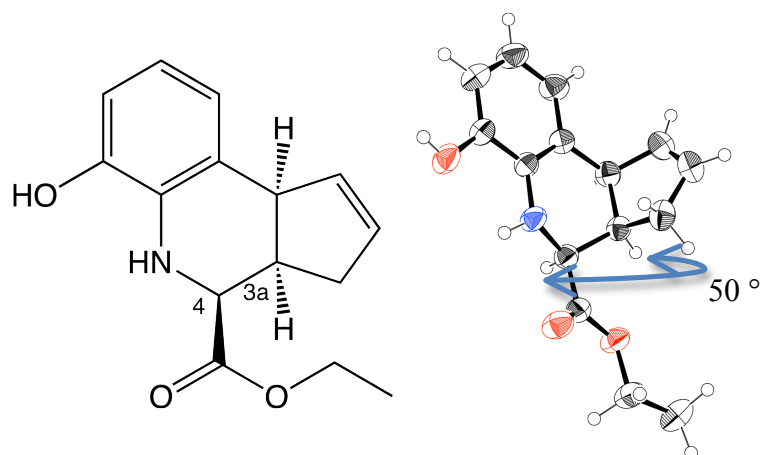
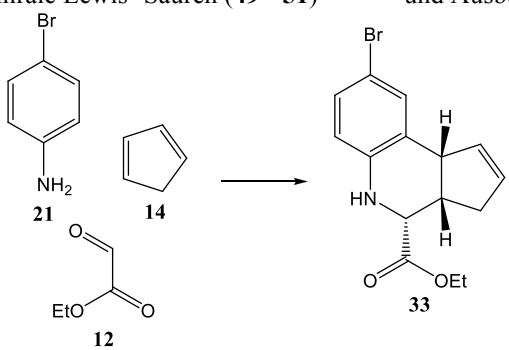


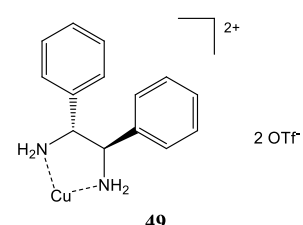
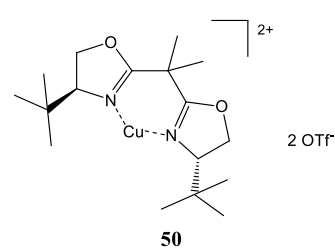
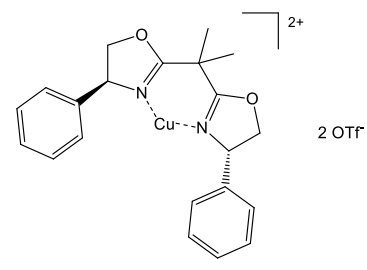
Abb. 3.12 Struktur und Kristallstruktur der Verbindung **32**.

Um bestimmen zu können, ob ein Enantiomer bevorzugt an das Protein bindet, wurde versucht, bei der Reaktion ein Enantiomer im Überschuss zu erhalten. Dazu wurden verschiedene chirale Lewis-Säuren (**49** – **51**), die bereits erfolgreich für asymmetrische Diels-Alder^[150] bzw. Aza-Diels-Alder Reaktionen^[151] eingesetzt wurden, zur Synthese verwendet (Tabelle 3.3). Durch große, chirale Liganden der Lewis-Säure sollte eine Stereoselektivität induziert werden. Um den Einfluss der verwendeten Lewis-Säuren (**49** – **51**) zu untersuchen, wurde die Synthese des Tetrahydrochinolins **33** unter Verwendung von 5 mol% Lewis-Säure, einem Äquivalent 4-Bromanilin (**21**) und 1.5 Äquivalenten Cyclopentadien (**14**) bezogen auf das Glyoxylat **12** in Acetonitril analysiert. Die verwendeten chiralen Lewis-Säuren (**49** – **51**) wurden direkt vor der Reaktion durch Lösen von 1.1 Äquivalenten des entsprechenden Liganden bezogen auf das Kupfer(II)-triflat in trockenem Acetonitril hergestellt.

Auf Grund ihrer Größe und der daraus resultierenden sterischen Hinderung bewirkten die verwendeten Lewis-Säuren eine Reduzierung der Ausbeute um mindestens die Hälfte im Vergleich zum Kupfer(II)-triflat. Die durch die Liganden verursachte sterische Hinderung war offenbar verantwortlich für die Verminderung der Ausbeute, sie hatte aber keinen Einfluss auf die Stereochemie (Tabelle 3.3). Es war folglich nicht möglich, auf diesem Weg einen Enantiomerenüberschuss zu generieren.

Tabelle 3.3 Verwendete chirale Lewis- Säuren (**49 - 51**)^{[150],[151]} und Ausbeuten der Synthese von **26**.



Lewis-Säure	Ausbeute ^a [%]	ee [%]
Cu(OTf) ₂	68	0
	34	0
	29	0
	21	0

^aNach Säulenchromatographie isolierte Ausbeuten

Die Enantiomerenverhältnisse wurden durch HPLC an einer chiralen Säule (CHIRALPACK 1A der Firma DIACEL) bestimmt. In Abb. 3.13 ist beispielhaft das Chromatogramm der durch die Lewis-Säure **49** katalysierten Reaktion zu Verbindung **33** dargestellt. Die HPLC-Untersuchungen der durch die Lewis-Säuren **50** und **51** katalysierten Reaktionen zeigten ebenfalls, dass das Racemat erhalten wurde.

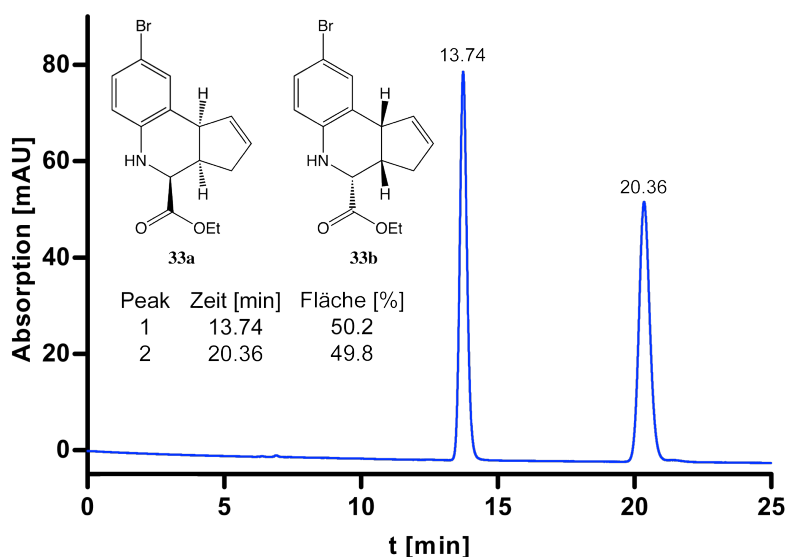


Abb. 3.13 Chromatogramm der Verbindung **33** nach durch **49** katalysierter Reaktion bei einer Wellenlänge von 254 nm über eine chirale HPLC-Säule.

Die verwendeten Lewis-Säuren **49** – **51** führten nicht zur bevorzugten Bildung eines Enantiomers **33a** bzw. **33b**. Um eine erfolgreiche asymmetrische Synthese durchzuführen könnte der kürzlich beschriebenen Liganden **52** verwendet werden (Abb. 3.14). XIE *et al.* waren damit in der Lage ein Aza-Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronebedarf enantiomerenrein (ee = 99 %) durchzuführen.^[152]

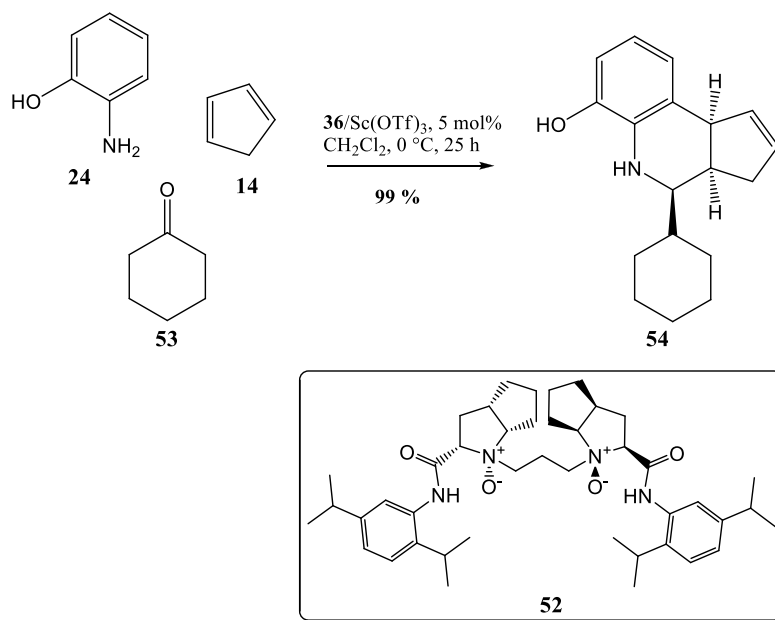
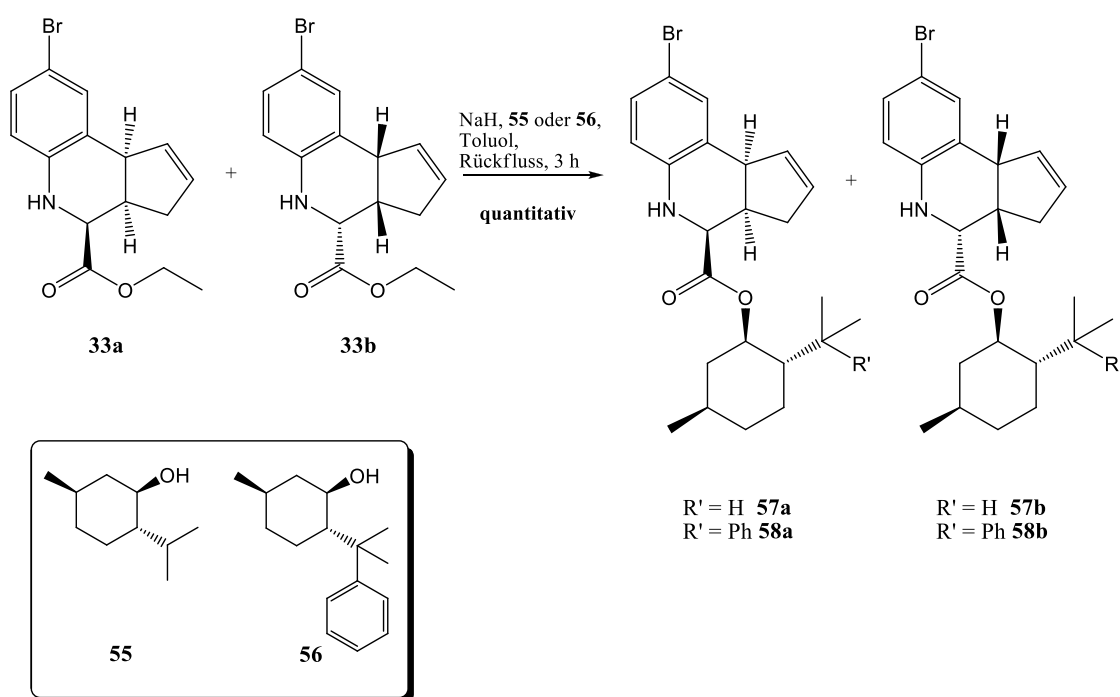


Abb. 3.14 Enantioselektive Synthese (ee = 99 %) des Tetrahydrochinolinderivats **54** unter Verwendung des Liganden **52**.^[152]

Allerdings scheint die aromatische Hydroxygruppe für die Synthese essenziell zu sein, da bei Verbindungen ohne die phenolische Hydroxygruppe das entsprechende Tetrahydrochinolin

nur in Spuren isoliert werden konnte.^[152] Außerdem wurde bisher nur für aromatische bzw. aliphatische Aldehyde die Enantioselektivität nachgewiesen.^[152]

Da die stereoselektive Synthese nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde versucht durch Veresterung mit chiralen Alkoholen, wie beispielsweise Menthol (**55**) oder Phenylmenthol (**56**), Diastereomere (**57a/b** bzw. **58a/b**) zu erzeugen und diese anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel zu trennen. In Schema 3.3 ist dieses Verfahren am Beispiel des Racemats der Verbindung **33** in dargestellt.



Schema 3.3 Umesterung des Racemats der Verbindung **33** zu den Diastereomeren **57a/b** bzw. **58a/b**.

Für die Racematspaltung wurde der Menthylester des Racemats von **33** hergestellt. Um den diastereomeren Ester zu erhalten, wurde der Ethylester **33** in Toluol mit (1R,2S,5R)-Menthol (**55**) und Natriumhydrid unter Rückfluss erhitzt bis mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kein Edukt mehr feststellbar war. Das so erhaltene Diastereomerengemisch ließ sich allerdings weder durch Säulenchromatographie an Kieselgel noch durch HPLC an C18-funktionalisiertem Kieselgel trennen. Aus diesem Grund wurde die Reaktion mit (1R,2S,5R)-8-Phenylmenthol (**56**) erneut durchgeführt. Der so gebildete Phenylmenthylester (**58a/b**) konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel getrennt werden.

Die isolierten Diastereomere **58a** und **58b** wurden, insbesondere hinsichtlich der Anordnung von Esterfunktion zu Cyclopentenring NMR-spektroskopisch untersucht. Dazu wurde die vicinale Kopplungskonstante für das Proton H-4 zum Proton H-3a $^3J_{4,3}$ bestimmt. Diese betrug 4.2 Hz und war damit geringfügig größer als die für die Verbindungen **18** und **31 – 41**

(3.5 - 3.9 Hz) gemessenen Kopplungskonstanten $^3J_{4,3}$. Die Änderung der Kopplungskonstante wies auf einen ebenfalls veränderten Diederwinkel hin.

Durch Umkristallisation aus Ethylacetat und Hexan war es möglich für röntgenkristallographische Untersuchungen geeignete Kristalle der Verbindung **58b** zu erhalten. Die Kristallstruktur des Diastereomers **58b** zeigte eine Konfigurationsumkehr am Kohlenstoff C-4, d.h. der Cyclopentenring und die Esterfunktionalität sind auf entgegengesetzten Seiten des Tetrahydrochinolins angeordnet. Der Diederwinkel zwischen den Protonen H-4 und H-3 betrug 70° und erklärte damit die veränderte Kopplungskonstante $^3J_{4,3}$.

Die Konfigurationsumkehr wurde offenbar durch die starken Basen, Natriumhydrid bzw. das aus dem Phenylmenthol gebildete Alkoholat, verursacht. Diese deprotonierten wahrscheinlich den Kohlenstoff C-4. Durch den erhöhten Platzbedarf des Phenylmenthylester, im Vergleich zum Ethylester, bildet sich dann das sterischer günstigere *trans*-Produkt **58b** (Abb. 3.15).

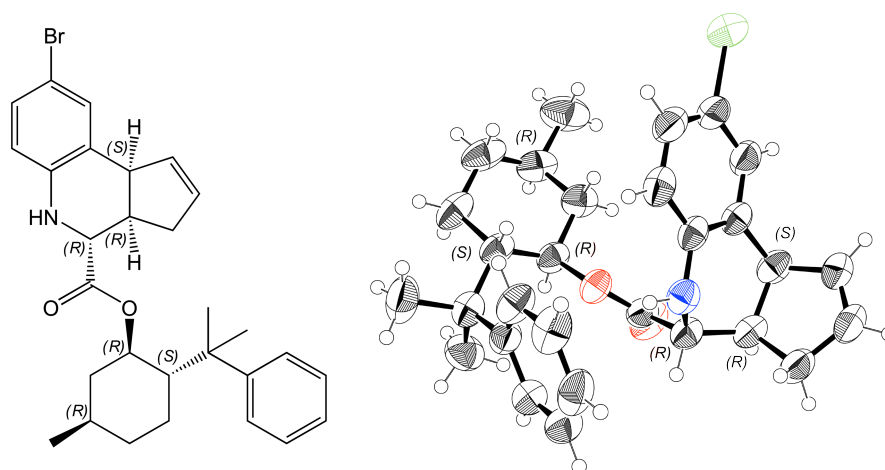
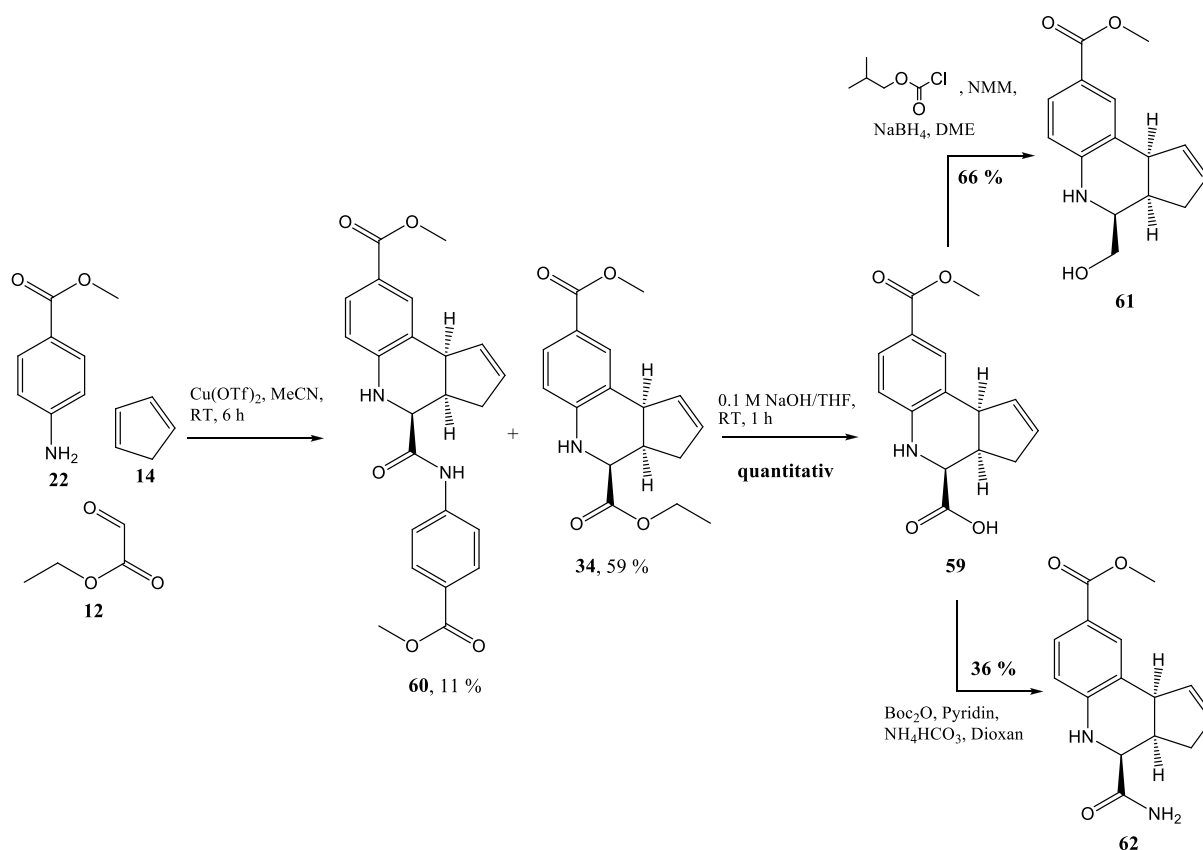


Abb. 3.15 Struktur und Kristallstruktur der Verbindung **58b**.

Da die Konfiguration des Phenylmenthols bekannt war, konnte die Stereochemie der asymmetrischen Kohlenstoffatome des Tetrahydrochinolinderivats **58b** ebenfalls bestimmt werden. Wie in Abb. 3.15 dargestellt handelt es sich um die R-Konfiguration der Kohlenstoffe C-3a und C-4 sowie um den S-konfigurierten Kohlenstoff C-9b (Abb. 3.15).

Das zweite Diastereomer (**58a**) lag als farbloses Öl vor und konnte somit nicht kristallographisch untersucht werden. Es war aber auf Grund der zum Ester **58b** identischen Kopplungskonstante von Proton H-4 zu Proton H-3a $^3J_{4,3}$ davon auszugehen, dass die Stereochemie am Kohlenstoff C-4 ebenfalls zu einer *trans*-Konfiguration verändert vorlag. Da

es nicht möglich war eine enantioselektive Synthese zu etablieren bzw. das Racemat zu trennen, wurde für alle Weiteren Untersuchungen mit den racemischen Gemischen gearbeitet. Der aromatische Teil der Zielstruktur, wurde wie bereits beschrieben, durch die Verwendung verschiedener Anilinderivate (**17**, **19** – **30**) variiert. Um auch den Substituenten in 4-Position zu verändern, wurde ausgehend vom Diester **34** die nur an der aromatischen Säurefunktion geschützte Verbindung **59** hergestellt. (Schema 3.4)



Schema 3.4 Synthese des Alkohols **61** bzw. des Amids **62** und dabei isoliertes Nebenprodukt **60**.

Dabei ist zu bemerken, dass während der Synthese von **34** aus dem Glyoxylat **12**, Cyclopentadien (**14**) und 4-Aminobenzoesäuremethylester (**22**) das Nebenprodukt **60** isoliert wurde. Dieses entsteht durch Amidbildung des gewünschten Produkts **34** mit dem Anilin **22** in einer Ausbeute von 11 % (Schema 3.4). Entsprechende Verbindungen sind auch bei der Synthese der Tetrahydrochinoline **18** und **31** – **42** zu erwarten, wurden aber nicht isoliert.

Die selektiv entschützte Verbindung **59** wurde durch die Reaktion von **44** in einem Gemisch aus 0.1 M wässriger Natronlauge und THF erhalten. Die freie Säure wurde als Anhydrid aktiviert und durch Reduktion mit Natriumborhydrid zum Alkohol **61** bzw. durch Reaktion mit Ammoniumhydrogencarbonat zum Amid **62** umgesetzt (Schema 3.4).

Die für die Untersuchung am Protein verwendeten Verbindungen **9**, **63** – **75** (Tabelle 3.4) wurden durch Verseifen der als Ester geschützten Säurefunktionalitäten mit 0.5 M wässriger Lithiumhydroxid-Lösung in Gemischen mit THF oder Methanol hergestellt. Nach dem Gefriertrocknen wurden die Verseifungsprodukte **9**, **63** – **75** in quantitativen Ausbeuten erhalten.

Die Synthese der Verbindung **10** erfolgte durch Addition von 2-Nitrophenylsulfenylchlorid (**16**) an die Cyclopentenyl-doppelbindung der Verbindung **66**. Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte das Reaktionsprodukt **10** in einer Ausbeute von 87 % isoliert werden (Abb. 3.16).

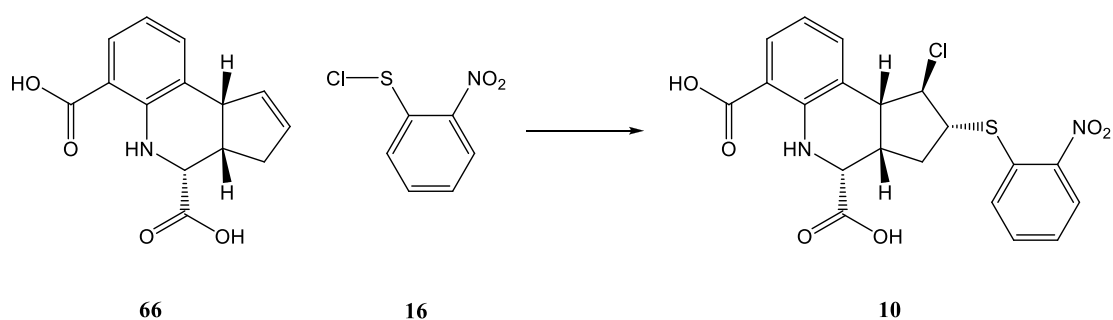


Abb. 3.16 Synthese der Verbindung **10**, durch Sulfenylchloridaddition an die Cyclopentenyl-doppelbindung der Disäure **66**.

NMR-spektroskopische Untersuchungen der Verbindung **10** ergaben, dass lediglich ein Isomer gebildet wurde. Die Sulfenylchloridaddition verläuft demnach Regio- und Stereoselektiv. Die Addition von Sulfenylchloriden verläuft über Bildung eines Thiiranium-Ions **76** (Abb. 3.17), welches durch den nukleophilen Angriff des Chloridions geöffnet wird. Die Regioselektivität ist ein Resultat des Zusammenspiels sterischer Faktoren und elektronischer Effekte.^{[153],[154]} Für die Reaktion des Sulfenylchlorids **16** konnte anhand der NMR-Spektren eindeutig die Bildung des Tetrahydrochinolinderivats mit dem Chlorsubstituenten in Position 1 nachgewiesen werden.

Die beobachtete Stereoselektivität beruht möglicherweise auf positiven Wechselwirkungen der π -Systeme der eingesetzten Edukte **66** und **16**. Diese könnte zu der in Abb. 3.17 gezeigten Ausrichtung des Sulfenylchlorids **16** zum Tetrahydrochinolin **66** führen. Nur die in Abb. 3.17A dargestellte Anordnung der Edukte würde zum Produkt **10** führen und so die Stereoselektivität erklären.

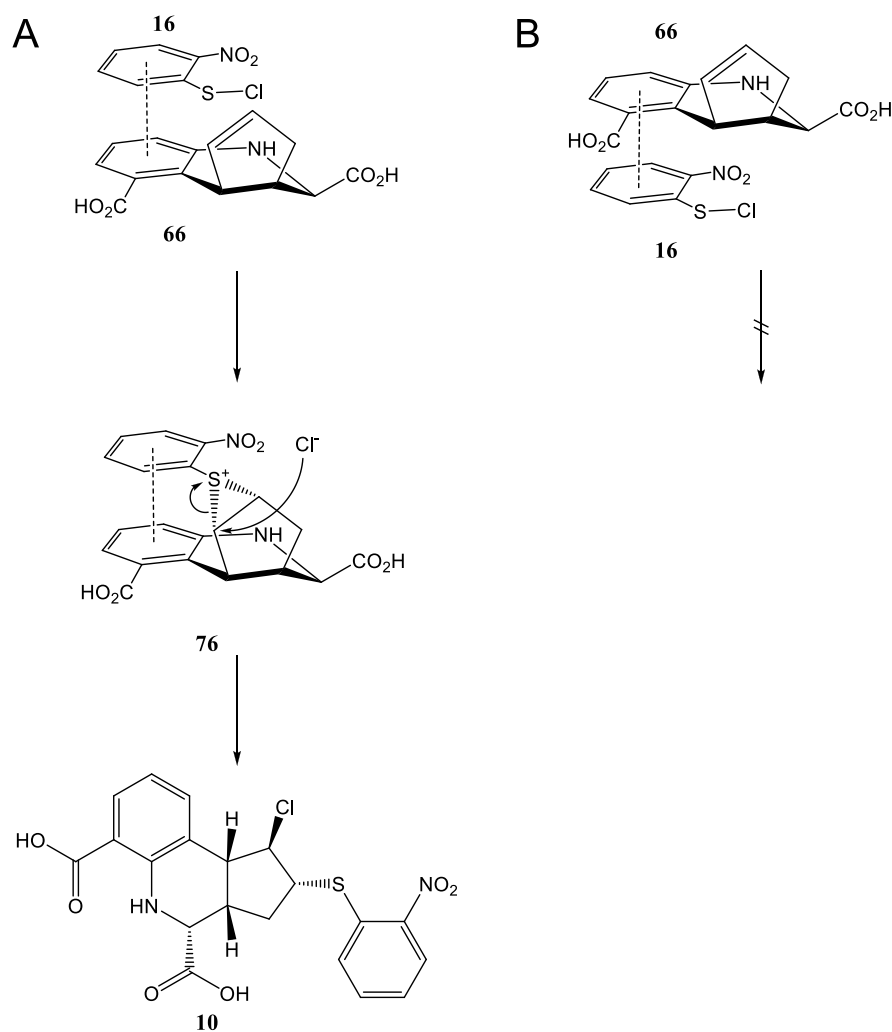


Abb. 3.17 Mögliche Anordnungen der Edukte 16 und 66 während der Sulfenylchloridaddition.

Die so synthetisierten Verbindungen 9, 10 und 63 – 75 wurden dann an der Shank3-PDZ-Domäne vermessen. Aus den so gewonnenen Daten wurde eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt. Diese ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.5 Untersuchung der fokussierten Bibliothek und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR)

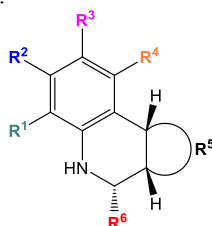
Alle synthetisierten Verbindungen 59, 63 – 75, einschließlich der resynthetisierten Primärhits 9 bzw. 10 und die in hauseigenen Substanzbibliotheken vorhandenen und erworbenen Tetrahydrochinolinderivate 77 – 83 wurden hinsichtlich ihrer Aktivität am Protein untersucht. Dazu wurde ein FP-Verdrängungsassay mit der peptidischen Sonde 3 genutzt. Die K_I -Werte des resynthetisierten Primärhits 9 und 10 im Vergleich zu den K_I -Werten, bestimmt mit den Lösungen aus der ChemBioNet-Bibliothek, waren im Falle von Verbindung 9 nahezu identisch (10.9 μM für die Bibliotheksverbindung; 10.1 μM für die resynthetisierte Substanz).

Für Verbindung **10** wurde eine Abweichung etwa 5 μM gemessen (8.1 μM Bibliotheksverbindung und 13.2 μM für die resynthetisierte Substanz). In jedem Fall ist der K_I -Wert bestimmt mit der resynthetisierten Substanz reliabler, da dieser mehrfach und unabhängig bestimmt wurde.








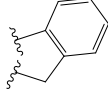





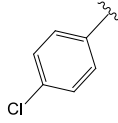

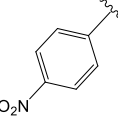




Da alle untersuchten Verbindungen **9**, **10**, **59**, **63** – **75** und **77** – **83** als Racemat verwendet wurden, besteht die Möglichkeit, dass lediglich ein Enantiomer aktiv ist. Das hätte zur Folge, dass die Konzentration der aktiven Substanz nur halb so groß wie bisher angenommen war und somit die K_I -Werte halb so groß wären.

Durch die Untersuchung der Tetrahydrochinolinderivate **9**, **10**, **59**, **63** – **75** und **77** – **83** wurden zusätzlich zu den aus dem Screening bekannten Verbindungen **9** und **10** zwei weitere aktive Substanzen **63** und **64** mit K_I -Werten von 17.1 μM und 69.5 μM identifiziert. Die anderen am Protein vermessenen Verbindungen **59**, **65** – **75** und **77** – **83** waren mit K_I -Werten von über 250 μM inaktiv (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Strukturen und K_I -Werte von den an der Shank3-PDZ-Domäne vermessenen Verbindungen **9**, **10**, **59**, **63** – **75** und **77** – **83**.



Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	K_I (μM)
9	OH	H	Cl	NO ₂		CO ₂ H	10.1 ± 4.3
10	CO ₂ H	H	H	H		CO ₂ H	13.2 ± 2.1
63	CO ₂ H	H	H	NO ₂		CO ₂ H	17.1 ± 2.6
64	H	H	CO ₂ H	H		CO ₂ H	69.5 ± 23.7
59	H	H	CO ₂ CH ₃	H		CO ₂ H	>250
65	H	H	CONH ₂	H		CO ₂ H	>250

Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	K _I (μM)
66	CO ₂ H	H	H	H		CO ₂ H	>250
67	H	H	H	H		CO ₂ H	>250
68	OH	H	H	H		CO ₂ H	>250
69	H	H	Br	H		CO ₂ H	>250
70	OH	H	H	NO ₂		CO ₂ H	>250
71	H	NO ₂	H	H		CO ₂ H	>250
72	H	H	H	NO ₂		CO ₂ H	>250
73	OH	H	Cl	NO ₂		CO ₂ H	>250
74	H	H	CO ₂ H	H		CH ₂ OH	>250
75	H	H	CO ₂ H	H		CONH ₂	>250
77	H	Cl	H	Cl		CO ₂ H	>250
78	CH ₃	H	NO ₂	H		CO ₂ H	>250
79	H	H	CO ₂ H	H			>250
80	OH	H	Cl	NO ₂			>250
81	H	H		H		CO ₂ H	>250
82	OCH ₃	H	H	H		CO ₂ H	>250
83	H	H	CH ₃	H		CO ₂ H	>250

Die untersuchten Tetrahydrochinolinderivate **9**, **10**, **59**, **63** – **75** und **77** – **83** wurden genutzt um eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) aufzustellen. Für die SAR-Untersuchung sind Verbindungen interessant, die inaktiv sind, aber Strukturelemente mit aktiven Verbindungen teilen, da diese Moleküle Aussagen über die Wichtigkeit der jeweils geänderten Funktionalität hinsichtlich der Bindung erlauben.

Beispielsweise gleicht das Tetrahydrochinolin **73** der aktiven Struktur **9** bis auf den Cyclopentenring, ist aber inaktiv. Der Cyclopentenring ist somit essenziell für eine Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne. Wesentlich für die Bindung an das Protein ist außerdem die Carbonsäurefunktionalität in Position 4, wie durch die Moleküle **74**, **75**, **79** und **80** gezeigt wurde (Tabelle 3.4). Selbst geringfügige Veränderungen der Carbonsäure zum Alkohol **74** bzw. Amid **75** wurden nicht toleriert und hatten gänzlich inaktive Verbindungen zur Folge. In Position 6 wurde ebenfalls ein Carboxylat bevorzugt, wie durch den Vergleich der inaktiven Substanzen **72** mit der aktiven Verbindung **63** deutlich wurde. Eine Hydroxygruppe in Position 6 (Verbindung **55**) bewirkte auf Grund des geringeren Potenzials zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen Aktivitätsverlust, wenn dieser nicht durch einen Chlorsubstituenten in Position 8 (Verbindung **9**) kompensiert wurde. Die Nitrogruppe in Position 9 (Verbindungen **9** und **63**) bzw. verbrückt in Position 2 (Verbindung **10**) ist für die Bindung ebenfalls essenziell, da das Fehlen zu inaktiven Substanzen, wie beispielsweise Verbindung **66**, führte.

Das Tetrahydrochinolinderivat **64**, welches eine geringere Affinität zur Shank3-PDZ-Domäne als die Verbindungen **9**, **10** und **48** aufwies, ist wahrscheinlich anders als diese in der Bindungsspalte lokalisiert. Der Cyclopentenring und das Carboxylat in Position 4 sind zwar identisch zu den wesentlich besser bindenden Liganden **9**, **10** und **63** aber die anderen Strukturmerkmale, wie die Nitrogruppe (Position 9) und das zweite Carboxylat bzw. die Hydroxygruppe (Position 6) sind in diesem Molekül nicht vorhanden. Allerdings sind für die Bindung die beiden im Molekül **64** vorhandenen Carboxylate von Bedeutung. Eine Variation führte zu inaktiven Verbindungen, wie durch die Chinolinderivate **59**, **65**, **74** und **75** gezeigt wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne ein Cyclopentenring, zwei Carboxylate in Position 4 und 6 sowie eine Nitrogruppe in Position 9 von Bedeutung sind, wie in Abb. 3.18 illustriert ist.

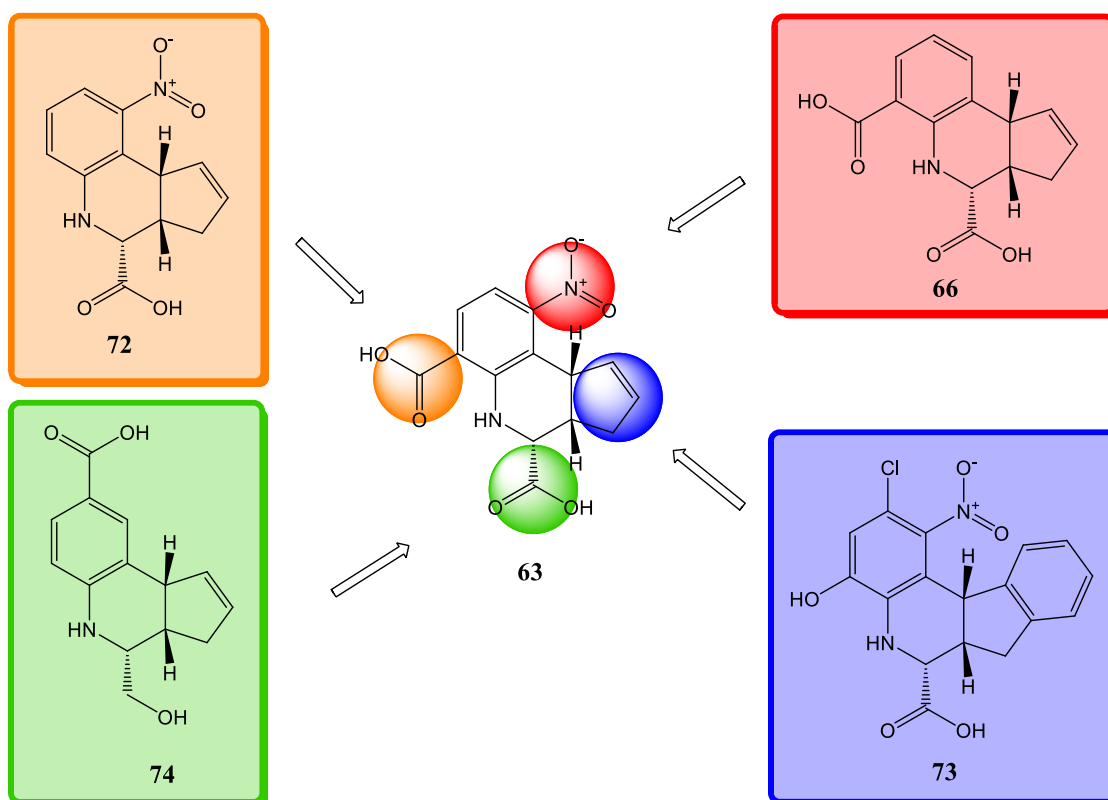


Abb. 3.18 Für die Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne wichtige Substituenten (mit farbigen Kreisen markiert) und Beispiel für inaktive Verbindungen die zu diesem Schluss führten (im farbigen Rahmen).

Wie durch die Verbindungen **9**, **63** und **70** deutlich wurde, war ein Chlorsubstituent in Position 8 in der Lage den Aktivitätsverlust, Hydroxygruppe im Vergleich zu einem Carboxylat, zu kompensieren. Aus diesem Grund wäre es in weiterführenden Arbeiten von Interesse eine Verbindung zu synthetisieren, die sowohl ein Carboxylat in Position 6 als auch einen Chlorsubstituenten in Position 8 trägt. Die Verbindung **84** (Abb. 3.19) zeigt durch die Kombination des bevorzugten Carboxylats in Position 6 und des Chlorids in Position 8 möglicherweise eine größere Affinität zur Shank3-PDZ-Domäne. Außerdem könnte der Einfluss der Größe des Halogenids in Position 9 auf die Bindung untersucht werden, d. h. es müsste das Chlorid durch Fluorid (**85**), Bromid (**86**) bzw. Iodid (**87**) substituiert werden. Möglicherweise kann durch die Vergrößerung des Substituenten eine bessere Bindung erzeugt werden.

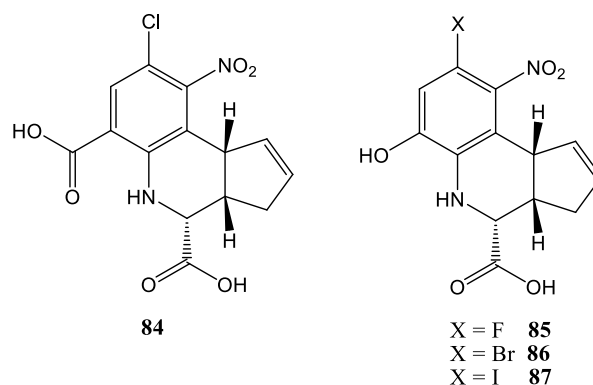


Abb. 3.19 Strukturen der Verbindungen 84 – 87.

Die aktiven Verbindungen **9**, **10**, **63** und **64** werden derzeit in elektrophysiologischen Experimenten an Pyramidenzellen aus dem Hippocampus von Mäusen untersucht (in Kooperation mit S. WEGENER, AG Schmitz, Charité, Berlin).

Bei dem für die Untersuchungen verwendeten *patch-clamp* Verfahren wird über zwei Elektroden eine Spannung im Millivolt-Bereich angelegt und der entsprechende Antwortstrom im Pikoampere-Bereich gemessen.^{[115],[155]} Die eine Elektrode befindet sich mit der Zelle in einer physiologischen Lösung. Bei der anderen Elektrode auf der Zelloberfläche handelt es sich um eine Pipette, gefüllt mit einer Lösung des Inhibitors. Durch Ansaugen der Zellmembran wird diese aufgerissen und der Inhibitor gelangt durch Diffusion in das Zellinnere. Somit kann die Aktivität des Liganden in der Zelle untersucht werden.^[155] Der gemessene Antwortstrom sollte bei Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne eine Verringerung der Amplitude des gemessenen Stroms, im Vergleich zu Referenzneuronen bewirken.^{[115],[155]} Dieser Effekt konnte bereits für ein Peptid mit der Aminosäuresequenz des C-Terminus von Dasm1 gezeigt werden konnte.^[115]

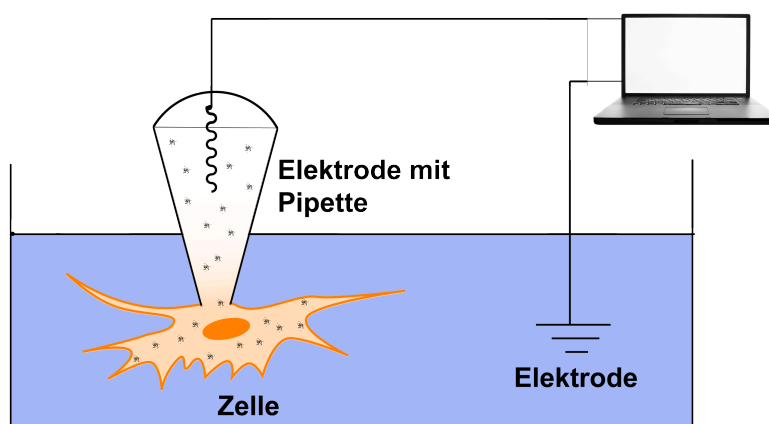


Abb. 3.20 Prinzip der *patch-clamp*-Messung.

3.2.6 Kristallstruktur der Shank3-PDZ-Domäne im Komplex mit Liganden **63**

(in Kooperation mit Y.ROSKE, AG Heinemann, MDC-Berlin)

Die Verbindung **63** konnte mit der Shank3-PDZ Domäne kokristallisiert werden. Es war möglich, den Liganden **63** in einem der acht Proteinmoleküle pro asymmetrische Einheit zu identifizieren (Abb. 3.21). In der Bindungstasche eines weiteren Proteins war zusätzlich eine erhöhte Differenzdichte zu erkennen. Diese Bindungsstelle im Kristall war aber offenbar nur teilweise besetzt und die resultierende Differenzdichte zu gering, um den Liganden **63** dort einzupassen.

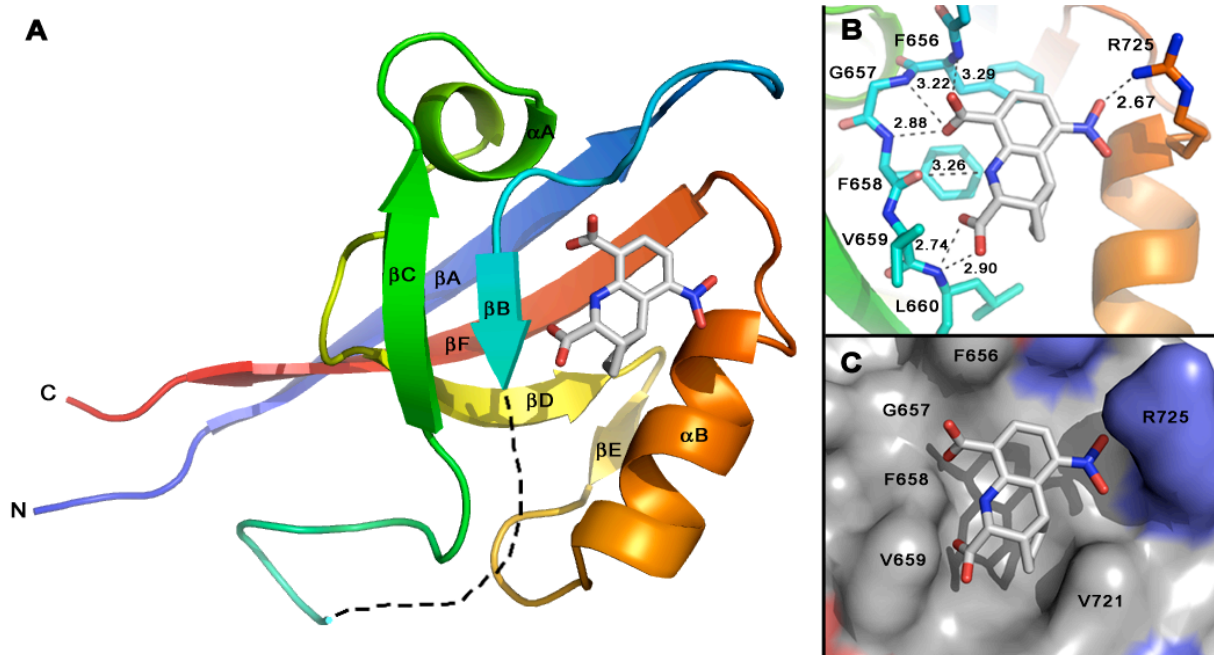


Abb. 3.21 Struktur der Shank3-PDZ-Domäne im Komplex mit **63**. **A:** Gesamtansicht der PDZ-Domäne mit Ligand **63**. Die Strichlinie stellt eine ungeordnete Schleife, Aminosäuren 661 – 673, dar. **B:** Vergrößerung der Bindungstasche. Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein sind als graue Strichlinien dargestellt. Die Abstände sind in Å angegeben. **C:** Oberflächendarstellung der Shank3-PDZ-Domäne. Farbcode: blau – positiv geladene Aminosäuren, rot – negativ geladene Aminosäuren.

Die Kristallstruktur zeigte die typische Faltung von PDZ-Domänen, zwei α -Helices (α A und α B) sowie sechs β -Stränge (β A – β F). Die Schleife zwischen β B- und β C-Strang ist sehr flexibel und deshalb in der Kristallstruktur nicht definiert. Der Ligand **63** war in der Peptidbindungsspalte zwischen dem β B-Strang und der α B-Helix gebunden (Abb. 3.21A). Verbindung **63** bildete mit dem Carboxylat in Position 6 drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidfunktionen des *carboxylate binding loop* (F583, G584 und F585). Das zweite Carboxylat und das sekundäre Amin des Liganden **63** interagierten mit Rückgratamiden des β B-Strangs (V586) bzw. des *carboxylate binding loop* (F585). Die Nitrogruppe in Position 9 wechselwirkte mit der Seitenkette des Arginins R652 (Abb. 3.21B). Durch π - π -Interaktionen mit den Seitenketten der Phenylalanine F583 und F585 wurde der Ligand **63** zusätzlich in der

Bindungsstelle fixiert. In der Oberflächendarstellung des Proteins war erkennbar, dass die für PDZ-Domänen charakteristische hydrophobe Tasche durch den Cyclopentenring von Verbindung **63** ausgefüllt wurde (Abb. 3.21C).

Die Kristallstruktur lieferte eine Erklärung der Beobachtungen aus der SAR-Studie (siehe Abschnitt 3.2.5). Die war hydrophobe Tasche war bereits durch den Cyclopentenring ausgefüllt. Eine weitere Vergrößerung dieses Restes zum Inden bewirkte, dass das Molekül **73** nicht mehr in die Bindungstasche passte. Auch die Variation der Carbonsäurefunktionen führte zu einem Affinitätsverlust, da der Hauptteil der Bindung (fünf Wasserstoffbrückenbindungen) über diese beiden funktionellen Gruppen realisiert wurde. Die Nitrogruppe in Position 9 interagiert mit der Seitenkette des Arginin R652 und sorgte somit für eine weitere Fixierung des Moleküls **63** in der Bindungstasche.

Beim Vergleich der Strukturen der Shank3-PDZ-Domäne mit gebundenem Liganden **63** und der Struktur der Shank1-PDZ-Domäne im Komplex mit dem Hexapeptid H₂N–E A Q T R L–OH (PDB: 1Q3P), wurde die große Ähnlichkeit der Shank-PDZ-Domänen deutlich. Diese wiesen nahezu identische Strukturen auf, wie in der Superposition in Abb. 3.22A dargestellt ist.

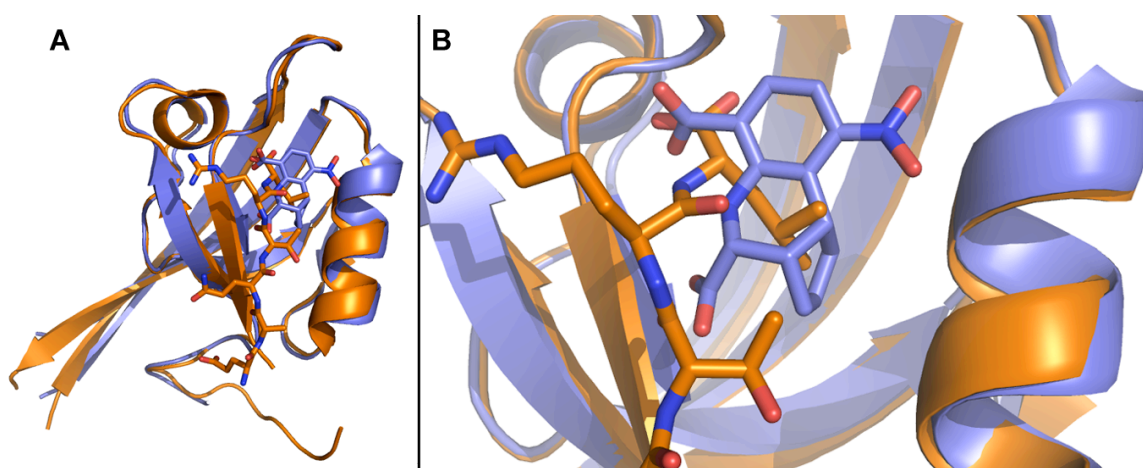


Abb. 3.22 Superposition der Strukturen der PDZ-Domänen von Shank1 (Orange) und Shank3 (Blau), jeweils mit Peptid bzw. Ligand **63**. **A:** Gesamtansicht. **B:** Vergrößerung der Bindungsspalte.

Außerdem war erkennbar, dass die Verbindung **63** das C-terminale Leucin des Peptidliganden imitierte. Die Funktion der hydrophoben Seitenkette des Leucins wurde durch den Cyclopentenring übernommen. Das Carboxylat in Position 6 interagiert wie das C-terminale Carboxylat des Peptides mit dem *carboxylate binding loop*. Die zweite Carboxylat befand sich ungefähr an der Stelle des zweiten Peptidamids der Shank1-Struktur. Eine Wechselwirkung des Peptides mit dem Arginin R652, wie durch die Nitrogruppe des Liganden **63** eingegangen, wurde nicht beobachtet. Diese im Vergleich zum Peptid

zusätzliche Interaktion und die π - π -Interaktionen des Liganden mit den Phenylalaninen F583 und F585 kompensierten offensichtlich einen Großteil der Bindungsenergie, welche durch die anderen Aminosäuren des Peptids zur Bindung beigetragen wurden (Abb. 3.22B).

Die Kontaktstelle zwischen Ligand **63** und der Shank3-PDZ-Domäne war 274 \AA^2 groß und war damit nur etwa halb so groß wie das Interface zwischen der Shank1-PDZ-Domäne und dem Hexapeptid (523 \AA^2).^[128] Die Interaktionsfläche zwischen Ligand **63** und der PDZ-Domäne war also wesentlich kleiner als die durchschnittliche PPI-Fläche (1600 \AA^2 ^[13]). Diese Interaktion stellte folglich ein weiteres Beispiel für die Inhibition von PPIs mit kleinen Molekülen dar, die nur einen Bruchteil der durchschnittlichen Interaktionsfläche zur Bindung nutzen (siehe auch Abschnitt 1.1).

Aus der Kristallstruktur wurde außerdem ersichtlich, dass, wie für die Shank1-PDZ-Domäne beobachtet^[129], der verlängerte β -Strang des N-Terminus' (β A) ein Homodimer bildete. Das Dimer wurde durch Interaktionen der Proteinerückgrate gebildet und umfasst in beiden Fällen in etwa die gleiche Größe, 566 \AA^2 für Shank1-PDZ-Domäne und 492 \AA^2 für die Shank3-PDZ-Domäne^[128] (Abb. 3.23).

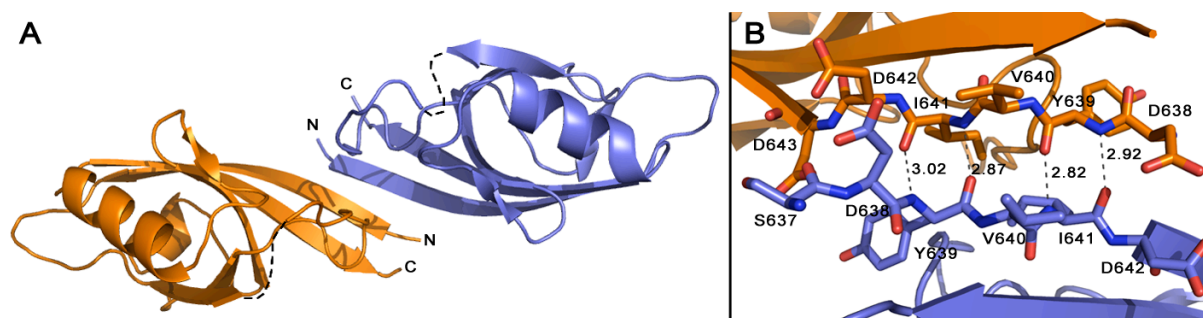


Abb. 3.23 Homodimer der Shank3-PDZ-Domäne. **A:** Gesamtansicht des Homodimers. Die Monomere sind blau bzw. orange gefärbt. Die schwarzen Strichlinien stellen ungeordnete Schleifen dar. **B:** Vergrößerung der Interaktionsstelle. Wasserstoffbrückenbindungen sind als graue Strichlinien dargestellt und die Längen in Å angegeben.

Nachdem der Bindungsmodus für den Liganden **63** aufgeklärt werden konnte, wurden alle aktive Verbindungen **9**, **10**, **63** und **64** hinsichtlich ihrer Selektivität gegenüber anderen PDZ-Domänen untersucht. Die Ergebnisse sind in dem folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.7 Selektivitätsuntersuchung der aktiven Verbindungen

Alle aktiven Verbindungen **9**, **10**, **63** und **64** wurden durch ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Experimente validiert (Appendix, I.5.1). Diese Technik wurde ebenfalls verwendet, um die Selektivität gegenüber den PDZ-Domänen von Syntrophin, DVL3 sowie den drei PDZ-Domänen von PSD-95 zu untersuchen. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Verschiebung der Signale

(*chemical shift perturbation*, ΔCSP) im Vergleich der Spektren in Abwesenheit und in Gegenwart des Liganden von mehr als 0.02 ppm als signifikant anzusehen und damit als Verschiebung zu betrachten ist. Die gewichtete, mittlere chemische Verschiebung ΔCSP berechnet sich nach Gleichung (5).^{[156],[157]}

$$\Delta\text{CSP} = \sqrt{\frac{\Delta\delta_H^2 + \frac{\Delta\delta_N^2}{25}}{2}} \quad (5)$$

$\Delta\delta$ – Differenz der chemischen Verschiebung der Spektren mit und ohne Ligand [ppm]

Die Anzahl und Größe der chemischen Verschiebungen kann mit der Affinität korreliert werden.^{[158],[159]} Aus diesem Grund wurde eine Abstufung der Affinität zum Protein anhand dieser Kriterien vorgenommen. Mehr als fünf verschobene Signale wurden als hohe Affinität in der Tabelle 3.5 grün markiert. Eine geringe Affinität, zwei bis fünf verschobene Signale, ist gelb gekennzeichnet. Die rot unterlegten Felder in der Tabelle 3.5 repräsentieren keine Affinität der untersuchten Verbindung zur jeweiligen PDZ-Domäne (ein oder kein verschobenes Signal).

Tabelle 3.5 Zusammenfassung der Bindungsstudie, durchgeführt mittels $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektroskopie ($\Delta\text{CSP} < 0.02$ ppm wurden als inaktiv definiert. Kein bzw. ein verschobenes Signal sind rot gekennzeichnet; zwei bis fünf verschobene Signale sind gelb markiert; mehr als fünf verschobene Signale sind grün unterlegt; in Klammern: Anzahl der verschobenen Signale / größte ΔCSP [ppm])

Nr.	PDZ domain					
	Shank3	Syntrophin	DVL3	PSD-95		
				1. PDZ	2. PDZ	3. PDZ
9	(20 / 0.11)	(12 / 0.12)	(14 / 0.07)	(3 / 0.03)	(14 / 0.08)	(2 / 0.02)
10	(8 / 0.09)	(4 / 0.07)	(2 / 0.02)	(0 / -)	(6 / 0.06)	(0 / -)
48	(15 / 0.16)	(10 / 0.11)	(3 / 0.04)	(1 / 0.03)	(7 / 0.07)	(0 / -)
49	(7 / 0.04)	(3 / 0.04)	(1 / 0.02)	(0 / -)	(0 / -)	(0 / -)

Alle Verbindungen, die der Shank3-PDZ-Domäne gegenüber aktiv waren, zeigten ebenfalls eine Affinität zur Syntrophin-PDZ-Domäne. Die Wechselwirkung mit der Syntrophin-PDZ-Domäne war allerdings weniger ausgeprägt, belegt durch die geringere Anzahl verschobener Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektrum. Die aktivste Verbindung (9) zeigte keinerlei Selektivität, sondern wechselwirkte stark mit den PDZ-Domänen von Syntrophin, DVL3 und

der zweite PDZ-Domäne von PSD-95 (mehr als fünf verschobene Signale). Für die erste und dritte PDZ-Domäne von PSD-95, wurde eine geringere Wechselwirkung (drei bzw. zwei verschobene Signale) festgestellt. Die Verbindungen **10** und **63** zeigten zusätzlich zur Interaktion mit der Shank3- und der Syntrophin-PDZ-Domäne Wechselwirkungen mit den PDZ-Domänen von DVL3 und der zweiten PDZ-Domäne von PSD-95. Es wurden aber keine verschobenen Signale und damit auch keine Bindung an die erste und dritte PDZ-Domäne von PSD-95 festgestellt.

Die Verbindung **64** mit der geringsten Affinität gegenüber der Shank3-PDZ-Domäne ($K_I = 69.5 \mu\text{M}$), zeigte eine schwache Wechselwirkung mit der Syntrophin-PDZ-Domäne, für alle anderen untersuchten Proteine wurde keine Interaktion detektiert.

Die geringe Selektivität der Verbindungen **9**, **10** und **63** kann dadurch erklärt werden, dass die Hauptinteraktion am *carboxylate binding loop* stattfand, belegt durch die Kristallstruktur des Komplexes der Shank3-PDZ-Domäne mit **63** (Abschnitt 3.2.6). Da der *carboxylate binding loop* innerhalb der PDZ-Domänen ein konserviertes Strukturelement ist, kann durch Interaktionen an dieser Stelle keine Selektivität erzeugt werden. Auch die hydrophobe Tasche, welche durch den Cyclopentenring adressiert wurde, konnte nicht für Selektivität sorgen, da eine hydrophobe Tasche in allen PDZ-Domänen auftritt. Die Interaktion des zweiten Carboxylats mit den Amidgruppen aus dem Proteinerückgrat im β B-Strang bewirkte keine Selektivität. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der PDZ Domänen sollte eine Wechselwirkung mit diesen Amidgruppen des Proteinerückgrates immer möglich sein. Diese Interaktionen sind aber für die Bindung des Liganden essentiell.

Lediglich die Wechselwirkungen mit der Seitenkette des Arginins R652 in der α B-Helix der Shank3-PDZ-Domäne (Abschnitt 3.2.6, Abb. 3.21) könnte für Selektivität sorgen. Jedoch trat in allen untersuchten PDZ-Domänen an dieser Stelle ein Arginin (DVL3 PDZ-Domäne) bzw. ein Lysin (PSD-95 1. bis 3. PDZ-Domäne und SNTA1-PDZ-Domäne) auf, welches ebenfalls mit der Nitrogruppe wechselwirken kann (Abb. 3.24). Die Interaktion mit der Seitenkette des Lysins war aber offensichtlich nicht so stark wie die Wechselwirkung mit dem Arginin, was sich in der geringeren Anzahl verschobener Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Experiment (Tabelle 3.5) und damit einer geringeren Wechselwirkung des Liganden mit dem Protein ausdrückte.

mShank3 PDZ	645	VAILQKRDHEG FGFV LRGAKAETPIEEFTPTPAFPALQYLESVDVEGVAVRAGLRTGDFL	
hDVL3 PDZ	249	TVTLNMEKYNFLGISIVG---QS-----NERGDGGIYIGSIMKGGAVAADGRIEPGDML	
hPSD95 1. PDZ	65	EITLERGNS-GLGFSIAGGTDNP-----HIGDDPSIFITKIIIPGGAAAQDGRLRVND SI	
hPSD95 2. PDZ	160	EIKLIKGPK-GLGFSIAGGVGNQ-----HIPGDNSIYVTKIEGGAAHKDGR LQIGDKI	
hPSD95 3. PDZ	313	RIVIHGSGT-GLGFNIVGG-EDG-----E-----GIFISFILAGGPADLSGELRKG DQI	
hSNTA1 PDZ	87	RVTVRKADAGGLGISIKGGRENK-----M-----PILISKIFKGLAADQTEALFVGD AI	
Konservierung	:	::*::* :	: . . . : * :
mShank3 PDZ		IEVNGVNVVKGHGKQVVGLI RQ GGNRLVMKVSVT	739
hDVL3 PDZ		LQVNEINFENMSND DAVRVLRE-----	321
hPSD95 1. PDZ		LFVNEVDVREVTHSAAVEALKEAGSIVRLYVMRR-	151
hPSD95 2. PDZ		LAVNSVGLLEDVMHEDAVAALKNTYDVVYLKVAKP-	246
hPSD95 3. PDZ		LSVNGVDLRNASHEQAAIALKNAGQTVTIIAQYK-	393
hSNTA1 PDZ		LSVNGEDLSSATHDEAVQLKKTGKEVVLEV KYMK	170
Konservierung	:	** . . . : . . . : :	

Abb. 3.24 Sequenzalignment^[160] der für die Selektivitätsuntersuchung verwendeten PDZ Domänen, DVL3, PSD-95 PDZ1, 2 und 3, Alpha-1-syntrophin (SNTA1). Rot markiert sind die mit Verbindung **63** interagierenden Aminosäuren der Shank3-PDZ-Domäne. ‚*‘ – identisch, ‚:‘ – sehr ähnlich, ‚.‘ – ähnlich

Das Tetrahydrochinolinderivat **64** wurde, wie in Abschnitt 3.2.5 diskutiert, wahrscheinlich in einem anderen Modus gebunden, im Vergleich zu den Liganden **9**, **10** und **63**. Der andere Bindungsmodus könnte sowohl eine Erklärung für die geringere Affinität als auch für die höhere Selektivität darstellen.

Eine potenzielle Möglichkeit um affinere Verbindungen zu erhalten wird im folgenden Abschnitt besprochen.

3.2.8 Alternative Methoden der Inhibitorentwicklung

3.2.8.1 Bioisostere

Um zu selektiven Verbindungen zu erhalten, besteht generell die Möglichkeit Peptide, die selektiv an das Protein von Interesse binden, zu modifizieren. Dieser Prozess wird unter dem Begriff *peptide to drug* zusammengefasst.^[161]

Zur Entwicklung eines selektiven Liganden wurde das hochaffine Peptid **8** modifiziert. Durch diese Modifikationen sollten die Nachteile, welche ein Peptid mit sich bringt, eliminiert werden. Die hervorstechendsten Nachteile von Peptiden sind, auf Grund ihrer Größe und Polarität, geringe Stabilität in biologischen Systemen durch den Abbau mittels Proteasen, schlechter Transport vom Gastrointestinaltrakt ins Blut bzw. Gewebe und schnelles Ausscheiden über Leber und Nieren.^[162] Um Eigenschaften von Molekülen gezielt zu beeinflussen, besteht die Möglichkeit sogenannte Bioisostere einzuführen. Dabei handelt es sich um die Substitution von Teilen eines Moleküls durch Moleküle bzw. Molekülgruppen,

welche eine ähnliche chemische und physikalische Charakteristik aufweisen und damit gleiche biologische Eigenschaften erzeugen.^[163]

Um diesem rationalen Ansatz der Wirkstoffentwicklung zu folgen, wurde der Bindungsanteil der einzelnen Aminosäuren des Peptides **8** bestimmt. Dazu wurde nacheinander jede Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht und so deren Wichtigkeit für die Bindung bestimmt.

Tabelle 3.6 Affinitäten der im Alaninscan verwendeten Peptide **88** – **93**.

Nr.	Sequenz	$K_I \pm SD$ [μ M]
8	Ac— E — A — Q — T — R — L —OH	0.44 ± 0.06
88	Ac— E — A — Q — T — R — L —NH ₂	> 500
89	Ac— E — A — Q — T — R — A —OH	> 500
90	Ac— E — A — Q — T — A — L —OH	2.84 ± 0.21
91	Ac— E — A — Q — A — R — L —OH	> 500
92	Ac— E — A — A — T — R — L —OH	2.03 ± 0.35
93	Ac— A — A — Q — T — R — L —OH	6.73 ± 0.63

Die für die Bindungen essenziellen Aminosäuren waren, wie zu erwarten (siehe Abschnitt 1.2.4), das C-terminale Leucin (P₀) und das Threonin in Position P₂. Ein Austausch gegen ein Alanin in diesen Positionen führte zu einem nahezu inaktiven Peptid (Peptide **89** und **91**). Die Variation der anderen Aminosäuren (Peptide **90**, **92** und **93**) bewirkte zwar einen Anstieg des K_I -Werts auf maximal 6.7 μ M, wurde aber toleriert.

Das Peptid **80** zeigte keine Affinität zur Shank3-PDZ-Domäne (Tabelle 3.6), da das Amid am C-Terminus offensichtlich nicht mit dem *carboxylate binding loop* der PDZ-Domäne interagiert. Aus diesem Grund wurde ein Bioisoster für die Carbonsäurefunktionalität gesucht, welches die Interaktion mit dem Protein ermöglicht aber gleichzeitig die Polarität des Peptides senkt.

Als Bioisoster wurde das Tetrazol verwendet, welches bereits mehrfach erfolgreich als Substitut für Carboxylate eingesetzt wurde.^{[164],[165]} Die Verwendung von Tetrazolen bietet sich an, da ihre Acidität der von Carbonsäuren entspricht. Außerdem handelt es sich in beiden Fällen um planare Systeme, die im deprotonierten Zustand über eine delokalisierte, negative Ladung verfügen^[163] (Abb. 3.25).

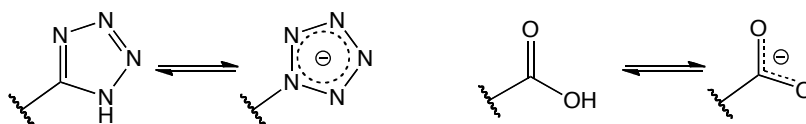
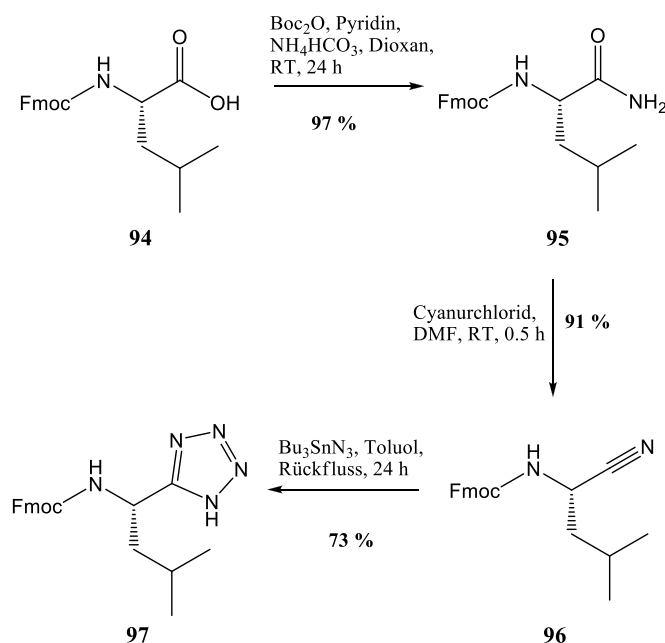


Abb. 3.25 Vergleich von Tetrazol und Carbonsäure im protonierten und deprotonierten Zustand.

Auf Grund der Ähnlichkeit zu Carbonsäuren sollte es auch möglich sein, Tetrazole in der Fmoc-Peptid-Festphasensynthese einzusetzen.^[166] Deshalb wurde, ausgehend von Fmoc-geschütztem Leucin (**94**), ein ebenfalls Fmoc-geschütztes Tetrazol-Leucin (**97**), synthetisiert. Nach Anhydridaktivierung wurde das Fmoc-geschützte Leucin zum Amid^[167] **95** und anschließend mit Cyanurchlorid zum Nitril **96** umgesetzt.^[168] Durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azides an das Nitril **96** wurde das Tetrazol-Leucin **97** synthetisiert^{[169],[170]} (Schema 3.5).



Schema 3.5 Synthese des Fmoc-geschützten Tetrazol-Leucins **97**.

Die Synthesen des Amids **95** bzw. Nitrils **96** gelangen in Ausbeuten von 97 % bzw. 91 %. Das Tetrazols **97**, ausgehend von Nitril **98** und Natriumazid unter Lewis-Säure-Katalyse, wie in der Literatur^{[169]-[171]} beschrieben, zu synthetisieren scheiterte. Das Edukt (**96**) wurde unter den beschriebenen Bedingungen^{[169]-[171]} nicht umgesetzt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Optimierung der Tetrazolsynthese. (Die Ausbeuten wurden mittels LC-MS bestimmt.)

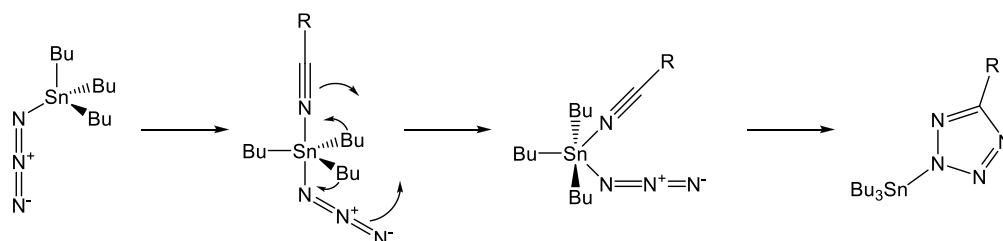
Lösungsmittel	NaN ₃ [Äq.]	ZnCl ₂ [Äq.]	Rkt.-zeit	T [°C]	Ausbeute ^a [%]
2-PrOH/H ₂ O (2:1)	2.0	0.5	17 h	80	0
2-PrOH/H ₂ O (1:1)	2.0	0.5	23 h	80	0
DMSO	1.1	0.5	30 min	140 (MW)	0
DMF	1.1	0.5	30 min	140 (MW)	0
Dioxan	1.1	0.5	30 min	140 (MW)	4
2-PrOH/H ₂ O (2:1)	1.1	0.5	10 min	140 (MW)	7
2-PrOH/H ₂ O (2:1)	1.1	0.5	20 min	140 (MW)	12
2-PrOH/H ₂ O (2:1)	1.1	0.5	30 min	140 (MW)	20
2-PrOH/H ₂ O (2:1)	1.1	0.5	60 min	140 (MW)	18
2-PrOH	1.1	0.5	30 min	140 (MW)	32
2-PrOH	1.1	0.5	60 min	140 (MW)	30
2-PrOH	2.0	0.5	30 min	140 (MW)	34
2-PrOH	1.1	1.0	30 min	140 (MW)	35
2-PrOH	2.0	1.0	30 min	140 (MW)	48

Durch die Verwendung der Mikrowelle als Heizquelle, war es möglich eine Ausbeute von 7 % bis 20 % in Abhängigkeit von der Reaktionszeit, 10 bis 60 min, zu erreichen. Für Reaktionszeiten von 30 und 60 min wurden nahezu die gleichen Ausbeuten (20 % und 18 %) bestimmt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf mehr als 30 min führte demnach nicht zu einer erhöhten Produktbildung.

Die Verwendung anderer Lösungsmittel bewirkte, dass die Reaktion nicht (für DMF und DMSO) bzw. sehr viel schlechter (für Dioxan: Ausbeute 4 %) ablief. Isopropanol als Lösungsmittel führte zu einer Erhöhung der Ausbeute auf 32 %. Eine weitere Verbesserung der Reaktion wurde durch die Erhöhung der eingesetzten Mengen an Natriumazid auf zwei Äquivalente bzw. Zinkchlorid auf ein Äquivalent erreicht. Dabei war es irrelevant ob die eine oder die andere Komponente variiert wurde. Die Ausbeuten betragen 34 % bzw. 35 % und waren somit nahezu identisch. Erhöhte man den Anteil beider zur Reaktion benötigter Partner – Azid und Lewis-Säure – so wurde eine Ausbeute von 48 % erreicht (Tabelle 3.7). Die Ausbeuten lagen aber deutlich unter den in der Literatur^[170] beschriebenen Ausbeute von mehr als 90 %.

Aus diesem Grund wurden alternative Azide für die Cycloaddition verwendet. Eine Steigerung der Ausbeute gelang durch den Einsatz von Tributylzinnazid an Stelle von Natriumazid und einer Lewis-Säure. Es wird dabei postuliert, dass das Tributylzinnazid selbst

als Lewis-Säure fungiert und das Nitril koordiniert. Durch BERRY-Pseudorotation nähern sich anschließend die Reaktionspartner an, wie in Schema 3.6 dargestellt.



Schema 3.6 Möglicher Reaktionsmechanismus der Tetrazolbildung mit Tributylzinnazid-Nitril-Addukt und BERRY-Pseudorotation.

Die Reaktion wurde in Toluol unter Rückfluss mit 1.5 Äquivalenten Tributylzinnazid durchgeführt und lieferte nach Abspaltung des Tributylzinn-Restes mit Salzsäure das Fmoc-geschützte Tetrazol-Leucin **97** in 73 %iger Ausbeute. Der Einsatz von kleineren Mengen Tributylzinnazid (1.3 Äquivalente) führte ebenso zu einer Reduktion der Ausbeute (Ausbeute 63 %) wie die Verwendung von THF als Lösungsmittel (Ausbeute 36 %).

Die Bildung des Tetrazolrings konnte auf Grund fehlender im NMR aktiver Kerne nicht mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Es war zwar zu beobachten, dass sich die chemische Verschiebung δ und somit auch die chemische Umgebung des C-1 Kohlenstoffatoms änderte (Tabelle 3.8); das ist jedoch nur ein Hinweis auf die Bildung des Heterozyklus’.

Tabelle 3.8 Chemische Verschiebungen des C-1 Kohlenstoffs (rot markiert) der Aminosäurederivate **94** – **97** im ^{13}C NMR-Spektrum

Nr.	Struktur	Signal [ppm]	Lösungsmittel
94		174.3	DMSO- d_6
95		174.4	DMSO- d_6
96		118.7	CDCl_3
97		158.5	DMSO- d_6

Da nach einer Umkristallisation Einkristalle der Verbindung **97** erhalten wurden, war es möglich diese Substanz röntgenkristallographisch zu untersuchen. Die so ermittelte Struktur bestätigte die Bildung des Tetrazolrings. Des Weiteren wurde eine Fehlordnung der Fmoc-Gruppe im Kristall beobachtet (Abb. 3.26).

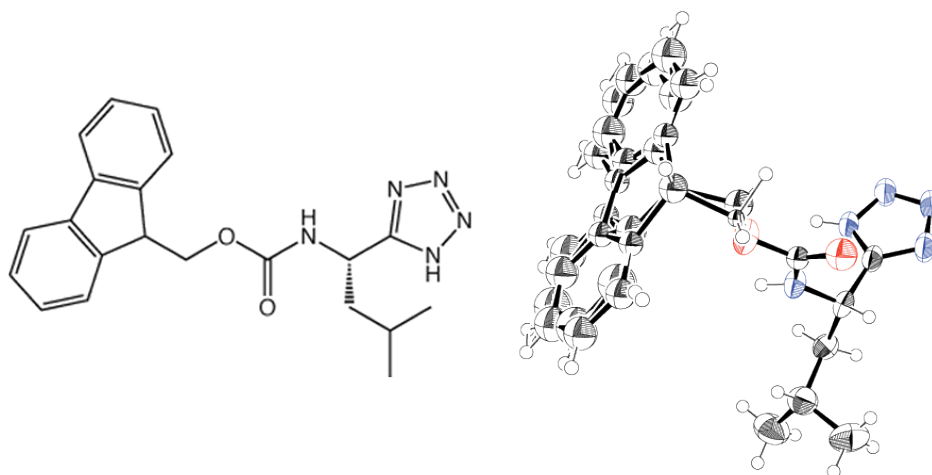
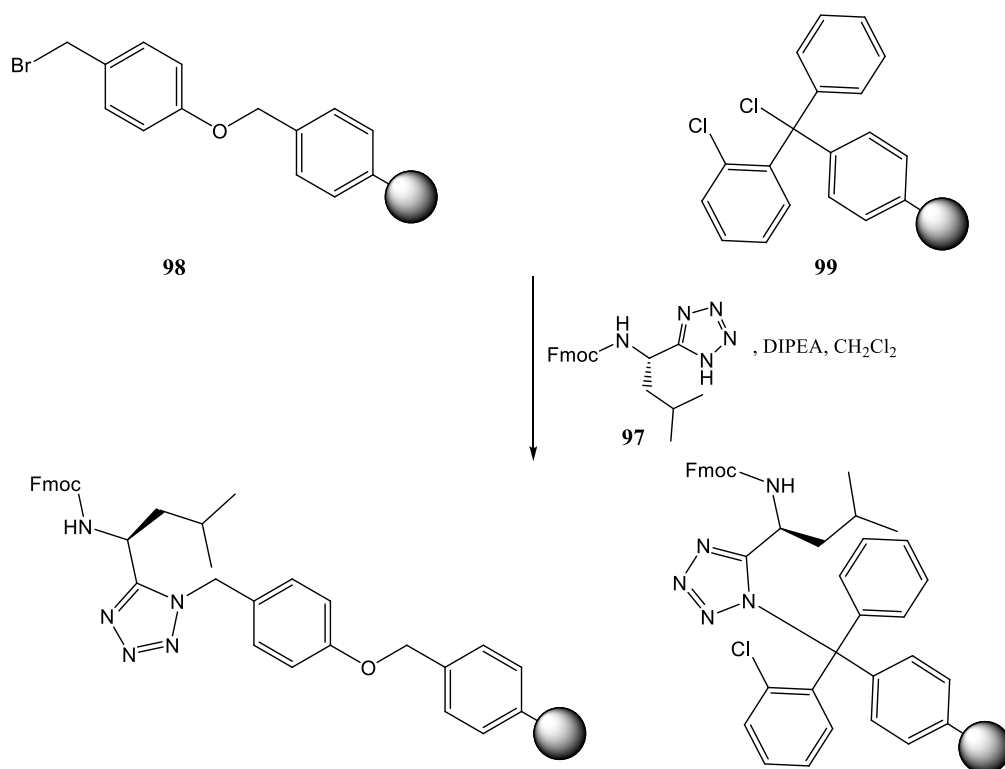


Abb. 3.26 Struktur und Kristallstruktur des Tetrazolleucins **97** mit Fehlordnung der Fmoc-Gruppe.

Das synthetisierte Aminosäurederivat **97** wurde für die Fmoc-Peptidsynthese an der Festphase unter Verwendung zweier verschiedener Linkersysteme (**98** und **99**) eingesetzt. Sowohl der 4-Brommethylphenoxymethyl-Linker (**98**) als auch der 2-Chlortritylchlorid-Linker **99** finden zur Immobilisierung von Säuren, Alkoholen und Aminen breite Verwendung in der Festphasensynthese.^[135] Es sollte daher auch möglich sein, das Tetrazol **97** mit Hilfe dieser Linkersysteme (**98** und **99**) zu immobilisieren (Schema 3.7).

Die Beladung der Harze wurde durch Absorptionsmessungen, der von einer definierten Harzmenge abgespaltenen Fmoc-Gruppe, bestimmt. Für den 4-Brommethylphenoxymethyl-Linker **98** wurde eine Beladung des Harzes von 0.3 mmol/g ermittelt während für den Chlortrityl-Linker **99** eine Beladung von 0.5 mmol/g erreicht wurde. Bezogen auf die theoretisch mögliche Beladung (1.6 mmol/g für **98** bzw. 1.3 mmol/g **99**) ergab das eine Beladung von 19 % bzw. 38 %. Es wurde trotz des größeren sterischen Anspruchs der Tritylgruppe **99**, im Vergleich zum 4-Brommethylphenoxymethyl-Linker (**98**), eine doppelt so hohe Belegung des Harzes mit dem Tetrazol **97** erreicht. Aus diesem Grund wurde das Chlortritylharz (**99**) für die weitere Synthese verwendet.



Schema 3.7 Für die Tetrazol-Peptidsynthese verwendete Linkersysteme. (Zur besseren Übersicht ist die Trityl-Tetrazol-Bindung gedehnt dargestellt. Die grauen Kugeln repräsentieren das Polystyrolharz.)

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom Tetrazol-Leucin **97** unter Standardbedingungen, d.h. mit 20 % Piperidin in DMF für zweimal zehn Minuten führte zu einer Zersetzung des Tetrazol-Leucins (**97**). Die Entschützung gelang aber mit 25 % Piperidin in DMF für zweimal zwei Minuten.^[166] Die Kupplung aller weiteren Aminosäuren zum Peptidanalogen Ac-E A Q T R L-Tetrazol **100** erfolgte nach dem Standardprotokoll SPPS mit DIC/HOBt als Kupplungsreagenzien.^[135] Nach der Aufreinigung durch HPLC wurde das Produkt **100** in 82 %iger Ausbeute erhalten. Der C-terminale Tetrazolring konnte durch die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Verbindung **100** nachgewiesen werden. Analog zu Leucin-Tetrazol **97** wurde im ¹³C NMR-Spektrum ein für das Tetrazol charakteristisches Kohlenstoffsignal (ca. 160 ppm; Abb. I.5) beobachtet.

Die Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne wurde im FP-Verdrängungsassay (siehe Abschnitt 3.2.2) bestimmt. Der ermittelte betrug K_I -Wert von $372.3 \pm 19.3 \mu\text{M}$. Durch die Änderung der C-terminalen Säurefunktionalität in ein Tetrazol sank die Affinität des Peptides **100** um drei Größenordnungen. Im Fall der Shank3-PDZ-Domäne fungierte das Tetrazol, bewiesen durch den Affinitätsverlust, nicht als Isooster zum Carboxylat. Das ist wahrscheinlich durch den erhöhten Platzbedarf des Tetrazols erklärbar.

Aus diesem Grund wäre es in weiterführenden Arbeiten von Interesse den C-Terminus zu modifizieren und beispielsweise Hydroxamsäuren **101** oder Acylsulfonamide **102** (Abb. 3.27)

als mögliche Isostere einzuführen. Sowohl die Hydroxamsäuren **101**^[173] als auch die Acylsulfonamide **102**^[174] sind bereits erfolgreich als Carbonsäureisoster eingesetzt worden.

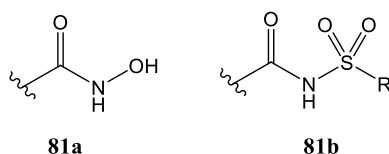


Abb. 3.27 Vorschläge für mögliche Carboxylisostere.

3.2.8.2 Fragmentbasierte Inhibitorentwicklung

Eine weitere Möglichkeit um Inhibitoren zu entwickeln, stellt der fragmentbasierte Ansatz dar. Diese Variante der Entwicklung von Liganden bietet den Vorteil, dass durch die Verknüpfung einzelner Fragmente die Wahrscheinlichkeit steigt selektive Inhibitoren zu erhalten.

Zur fragmentbasierten Inhibitorentwicklung muss ein Fragment identifiziert werden, welches in die zu untersuchende Tasche bindet. Dieses wird dann mit einem weiteren Fragment, welches in der Nähe bindet, verknüpft und so eine affinere Verbindung generiert.^[175] Die dafür in Frage kommenden Fragmente können durch Screening einer Fragmentbibliothek bzw. durch virtuelle Screenings identifiziert werden.

Für die Shank3-PDZ-Domäne wurden sowohl die Untersuchung einer Fragmentbibliothek als auch das virtuelle Screening von kommerziell erhältlichen kleinen Molekülen genutzt. Da ein Carboxylat für die Interaktion mit der Shank3-PDZ-Domäne unerlässlich ist, wurde eine Carboxylatbibliothek mit 1615 Verbindungen im FP-Verdrängungsassay (siehe Abschnitt 3.2.2) untersucht. Im Gegensatz zum Screening der ChemBioNet-Bibliothek wurde eine wesentlich höhere Konzentration der zu untersuchenden Verbindungen, hier 1 mM im Vergleich zu 10 μ M bei der ChemBioNet-Bibliothek, eingesetzt. Die Verbindungen der Carboxylatbibliothek wurden in höheren Konzentrationen untersucht, da für die Fragmente auf Grund ihrer Größe von einer wesentlich geringeren Affinität auszugehen war. Die zehn Primärhits (Appendix, Tabelle I.2) wurden im konzentrationsabhängigen FP-Assay (siehe Abschnitt 3.2.2) vermessen. Für drei Verbindungen (**103** – **105**, Abb. 3.28) wurden IC_{50} -Werte von jeweils etwa 300 μ M bestimmt. Diese wurden daraufhin im ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Experiment untersucht.

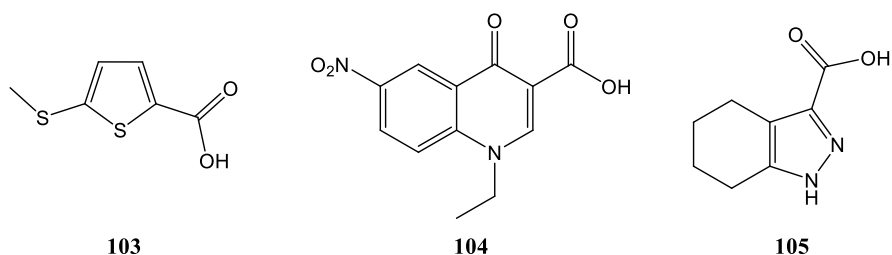


Abb. 3.28 Strukturen der drei Verbindungen (**103** – **105**) aus dem Screening der Carboxylatbibliothek mit IC_{50} -Werten von jeweils etwa 300 μ M.

Zusätzlich zu den Substanzen, die durch das Screening der Carboxylatbibliothek gefunden wurden, sind noch fünf weitere Verbindungen (Abb. 3.29) getestet worden. Diese fünf Verbindungen stammen aus einem virtuellen Screening, durchgeführt von C. SCHILLINGER (AG G. Krause, FMP, Berlin).

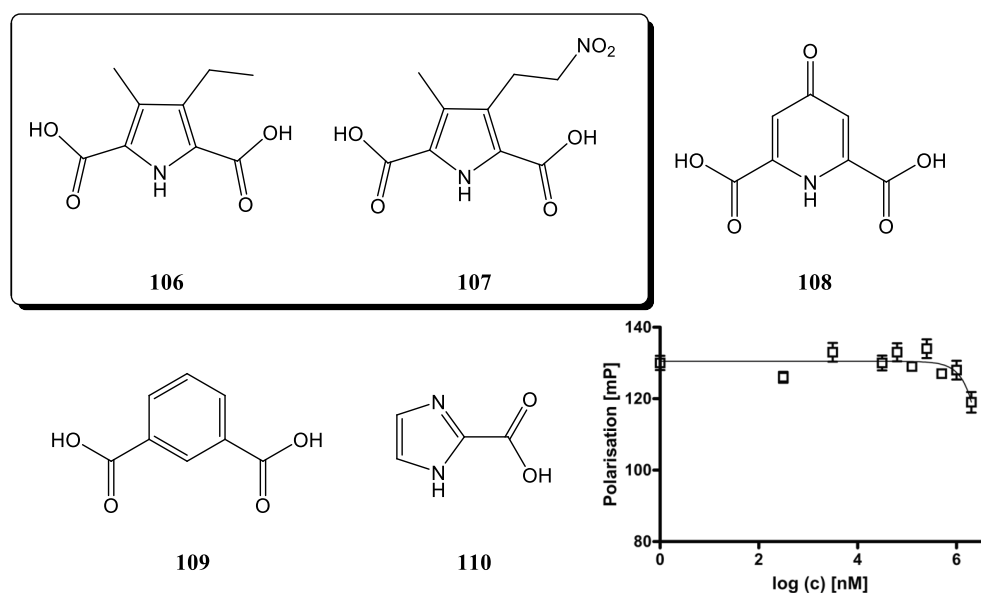


Abb. 3.29 Die im virtuellen Screening aktiven Verbindungen **106** – **110** und Auftragung der FP gegen den Logarithmus der Konzentration von Verbindung **106**.

Für die Verbindungen **106** – **110** konnten im FP-Assay keine Bindung an die PDZ-Domäne bestimmt werden. Die Fragmente **108** – **110** zeigten keinen Effekt im FP-Verdrängungsassay und konnten somit als inaktiv angesehen werden. Die beiden sehr ähnlichen Verbindungen **106** und **107** zeigen bei hohen Konzentrationen (bis 1 mM) eine verringerte FP. Diese Pyrrole (**106** und **107**) waren folglich in hohen Konzentrationen in der Lage die Fluoreszenzsonde **3** vom Protein zu verdrängen. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen **106** und **107** zusammen mit den drei Molekülen **103** – **105** in $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Experimenten untersucht. Durch diese Messungen konnte bestätigt werden, dass die Verbindungen **106** und **107** an die Shank3-PDZ-Domäne banden (Abb. I.3, Abb. I.4 im Anhang).

Des Weiteren wurde das Tetrahydroindazol **105** als aktiv gegenüber der Shank3-PDZ-Domäne bestätigt (Abb. 3.31A). Die anderen Verbindungen (**104** und **104**), die durch das Screening der Carboxylatbibliothek identifiziert wurden, zeigten in den NMR-Experimenten keine Aktivität.

Um, von den aktiven Fragmenten (**105** – **107**) ausgehend, zu affineren Liganden zu kommen, sollte das dynamische Ligationscreening (DLS) verwendet werden. Beim DLS wird ein aktives Fragment mit einer Aldehyd- oder Aminfunktionalität benötigt.^{[176],[177]} Um solche Strukturen zu finden, wurden weiter Fragmente (**111** – **116**, Abb. 3.30) untersucht. Die Verbindungen **111** – **116** waren kommerziell erhältlich bzw. konnten aus den jeweiligen Estern hergestellt werden.

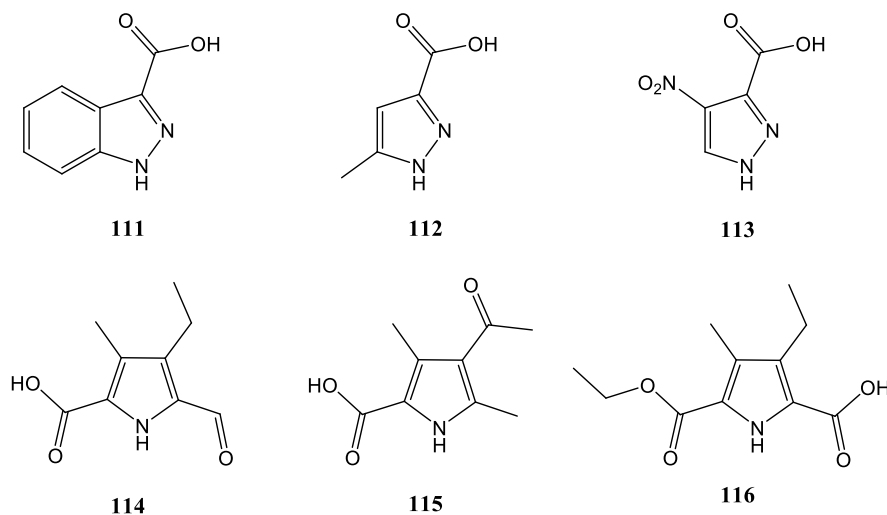


Abb. 3.30 Untersuchte Derivate **111** - **116** der aktiven Fragmente **105** – **107**.

Keine der Substanzen **111** - **116** zeigte im FP-Assay eine Aktivität gegenüber der Shank3-PDZ-Domäne. In den HSQC NMR-Experimenten konnte keine (**112** – **116**) Aktivität bzw. nur eine wesentlich geringere Aktivität (**111**), im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen **105** und **106**, nachgewiesen werden. Das wurde durch eine geringere Anzahl und geringere Distanzen der verschobenen Signale impliziert.

Zu einer inaktiven Verbindung führte z.B. das Substituieren des Sechsrings der Verbindung **105** durch eine Methylgruppe in Position 5 (Fragment **112**). Das Weglassen des Cyclohexylrings und Einführen einer Nitrogruppe in Position 4 ergab ebenfalls eine inaktive Verbindung (**113**). Das Indazol **111**, bei der der flexible Cyclohexylring des Fragments **105** durch den aromatischen Sechsring ersetzt wurde, zeigte einen erheblichen Affinitätsverlust, illustriert durch die geringer ausgeprägte Verschiebung der Signale in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren (Abb. 3.31).

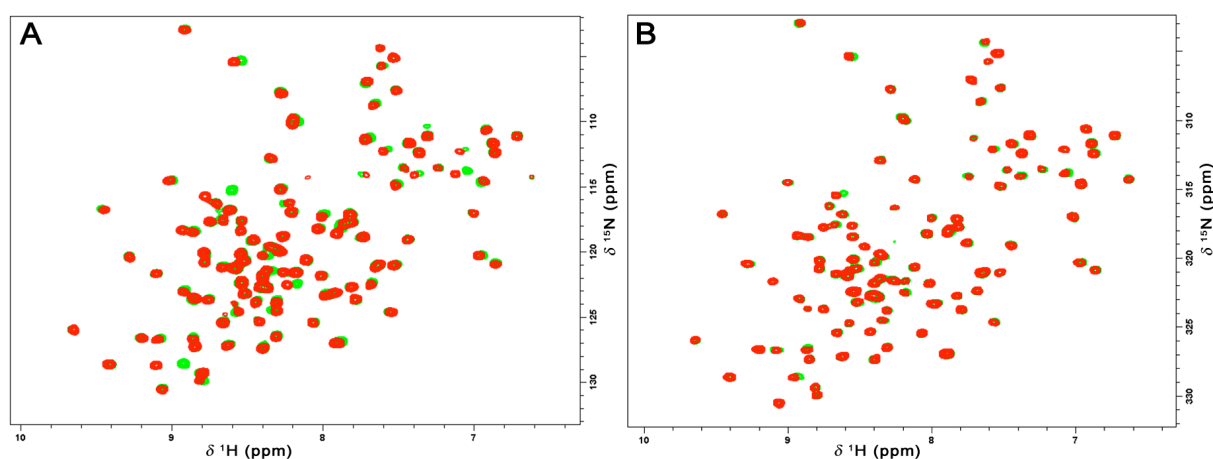


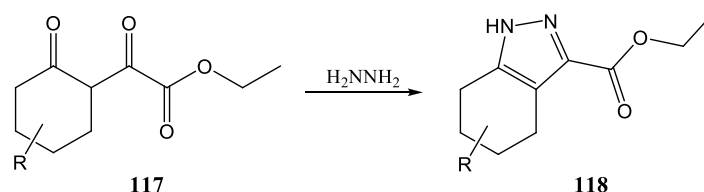
Abb. 3.31 Superposition der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren ohne Ligand (grün) und mit achtfachem Überschuss an Ligand **105** (A) und **111** (B).

Die für das DLS geeigneten Fragmente **114** und **115** zeigten keine Bindung an das Protein. Selbst die Verbindung **116**, die bis auf eine Esterfunktionalität in Position 5 identisch mit dem aktiven Pyrrol **106** ist, zeigte keine Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne.

Eine Erklärung dafür gab das virtuelle Screening. Dadurch war bekannt, dass die Alkylreste in Position 3 und 4 (Verbindung **106**) bzw. in Position 3 (Verbindung **107**) in die hydrophobe Tasche der PDZ-Domäne zeigen. Deshalb wurde keine weitere Variation an dieser Stelle der Moleküle **106** und **107** durchgeführt. Die Nitrogruppe des Pyrrols **107** interagiert, ebenfalls bestimmt durch das virtuelle Screening, mit dem Arginin R652 der Shank3-PDZ-Domäne. Die Kombination aus den zwei Carboxylaten in Position 2 und 5 und der im Ring befindlichen Aminofunktion wechselwirkten mit dem *carboxylate binding loop* und weiteren Rückgratamiden. Aus diesem Grund schien eine weitere Funktionalisierung dieser Substituenten ohne einen starken Affinitätsverlust zu erzeugen nur schwer möglich.

3.2.9 Ausblick

Weiterführend zu den gezeigten Arbeiten bietet es sich an, den fragmentbasierten Ansatz auszubauen und so möglicherweise selektivere Verbindungen zu erhalten. Speziell Verbindung **105** ist in dieser Hinsicht vielversprechend. Es sollte möglich sein eine Position am Cyclohexylrest zu ermitteln, an der weitere Modifikationen bzw. Vergrößerungen des Fragments möglich sind. Dazu muss eine fokussierte Bibliothek mit Modifikationen am Alkylrest der Verbindung **105** synthetisiert werden. Ein möglicher Syntheseweg wurde von SCHMIDT *et al.*^[178] beschrieben. Das Pyrazol **118** wird durch die Kondensation von Hydrazin mit dem Dieketoester **117** unter sauren Bedingungen, wie in Schema 3.8 dargestellt, erhalten.



Schema 3.8 Syntheschema für die Herstellung der fokussierten Bibliothek auf Grundlage von **84**.

Wenn auf diesem Weg eine Position am Cyclohexylyring ermittelt wurde an der Modifikationen toleriert werden, kann das Fragment z.B. durch DLS erweitert werden. So sollte es möglich sein zu selektiven Liganden zu erhalten.

3.3 Das Dishevelled-Protein

Die zweite PPI-Domäne, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde, ist die PDZ-Domäne des Proteins Dishevelled (DVL). Deshalb wird auf das DVL-Protein und die DVL-PDZ-Domäne in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

Das DVL-Protein wird in drei Isoformen (DVL1, DVL2 und DVL3) exprimiert. Vier Bereiche des Proteins sind potenziell für PPIs geeignet. Diese Interaktionsdomänen sind vom N- zum C- Terminus eine DIX-Domäne (benannt nach ihrem Vorkommen ausschließlich in Dishevelled und Axin), eine PDZ-Domäne gefolgt von einer prolinreichen Region und einer Dishevelled/egl-10/pleckstrin (DEP)-Domäne^{[179],[180]} (Abb. 3.32).

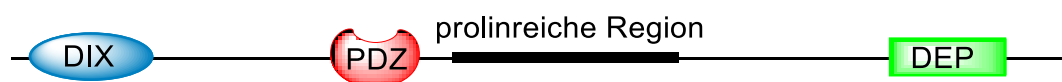


Abb. 3.32 Schematischer Aufbau des DVL-Proteins

DVL ist eines der Schlüsselproteine des Wnt-Signalwegs.^[181] Dieser Signalweg ist nach dem Wnt-Liganden benannt. Bei den Wnt-Liganden handelt es sich um eine Proteinfamilie. Für deren Aktivität ist ein Palmitinrest an einem konserviert auftretenden Cystein essenziell.^[182] Bei der Signalweiterleitung unterscheidet man eine kanonische, β -Catenin abhängige und eine nicht-kanonische, β -Catenin unabhängige Signalübertragung. Wann es nach der Aktivierung des *Frizzled*-Rezeptors durch den Wnt-Liganden zur kanonischen bzw. nicht-kanonischen Signalkaskade kommt ist nicht geklärt. Es wird aber vermutet, dass sowohl der zelluläre Kontext als auch spezifische Wnt/*Frizzled*-Kombinationen dafür entscheidend sind.^[183] Es sind derzeit zehn Mitglieder der *Frizzled*-Rezeptorefamilie im Menschen sind bekannt.^[184]

Im kanonischen Fall, welcher weitaus besser untersucht ist, bindet der Wnt-Ligand an den *Frizzled*-Rezeptor und an *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP 5) bzw. LRP 6. Das führt zu einer Interaktion der DVL-PDZ-Domäne mit dem *Frizzled*-Rezeptor. Der C-Terminus von LRP 5/6 wird dann durch die *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) und *casein kinase 1 γ* (CK1 γ) phosphoryliert. Die Phosphorylierung schafft Bindungstellen für Axin, das dann an LRP 5/6 und die DIX-Domäne von DVL bindet. Dadurch wird der Degradationskomplex, bestehend aus Axin, dem *Adenomatous polyposis coli protein* (APC), GSK3 β und CK3 α , desaktiviert. Die Auflösung dieses Proteinkomplexes führt zu einer Akkumulation des β -Catenins, gefolgt von einer Translokation in den Nukleus. Im Zellkern initiiert β -Catenin durch die Verdrängung des Co-Repressors Groucho von einem Komplex, bestehend aus *lymphoid enhancer factor* (LEF) und *T-cell factor* (TCF), die Transkription von TCF-Zielgenen, beispielsweise *c-MYC*^{[185]-[187]} (Abb. 3.33B).

Im inaktiven Fall, d.h. es ist kein Wnt-Ligand gebunden, kommt es nicht zu einer Bindung von Axin an LRP 5/6. Der Degradationskomplex bleibt intakt und phosphoryliert β -Catenin. Durch die Phosphorylierung wird β -Catenin vom *β -transducin repeat-containing protein* (β -TrcP) erkannt und ubiquitinyliert. Anschließend wird das ubiquitinylierte β -Catenin durch das Proteasom abgebaut wird^[188] (Abb. 3.33A).

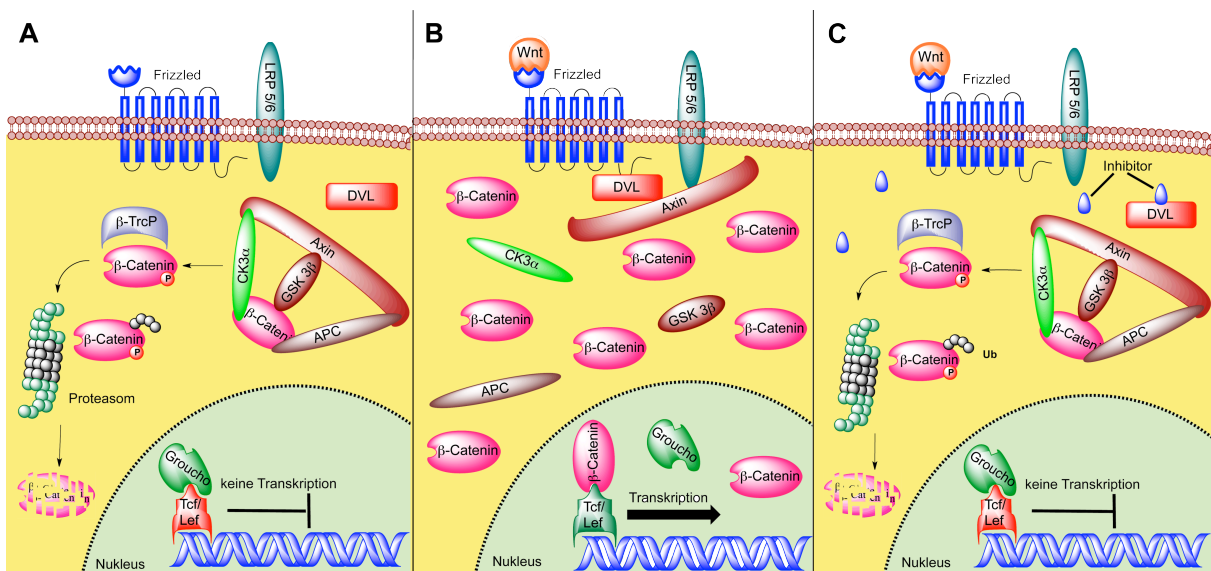


Abb. 3.33 Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs. **A:** Inaktiver Signalweg. **B:** Aktiver Signalweg. **C:** Aktiver Signalweg mit durch einen Liganden blockiertem Dishevelled. Ub – Ubiquitin

Der Wnt-Signalweg ist während der embryonalen Entwicklung essenziell für die Ausbildung der Körperachse in Vertebraten. Eine Funktionsstörung dieses Signalwegs führt zu Fehlbildungen des Embryos.^[189] Des Weiteren wird eine permanente Aktivierung des Wnt-

Signalwegs bei verschiedenen Krebserkrankungen bzw. deren Vorstufen beobachtet, z. B. familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)^[190] und Kolonkrebs^[191]. Eine Überexprimierung von DVL wurde bei Prostatakrebs^[192], Lungenkrebs, speziell dem nicht-kleinzelligem Karzinom (*non-small cell lung cancer*, NSCLC)^[102] und dem Mesotheliom^[193] festgestellt.

Es ist bekannt, dass es in Zelllinien, die durch Transfektion DVL1-Proteine ohne PDZ-Domäne exprimieren, zu einer Absenkung des β -Cateningehalts kommt.^[193] Des Weiteren existieren Untersuchungen mit Inhibitoren der DVL-PDZ-Domänen, die zu einer Herunterregulation des Wnt/ β -Catenin Signalwegs führen.^{[194]-[196]} Aus diesem Grund können Inhibitoren der DVL-PDZ-Domäne als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Krebsmedikamenten fungieren. Die DVL-PDZ-Domäne stellt somit ein attraktives Wirkstoffziel dar. Im nächsten Abschnitt wird aus diesem Grund genauer auf die DVL-PDZ-Domäne eingegangen.

3.3.1 Die Dishevelled-PDZ-Domäne

Die drei DVL Homologen und speziell die PDZ-Domänen weisen eine starke Konservierung auf. Zwischen den PDZ-Domänen von DVL1 und DVL2 bzw. DVL3 besteht eine Sequenzidentität von jeweils 88 %. Die Identität der DVL2-PDZ-Domäne zur DVL3-PDZ-Domäne beträgt 96 % (Abb. 3.34).

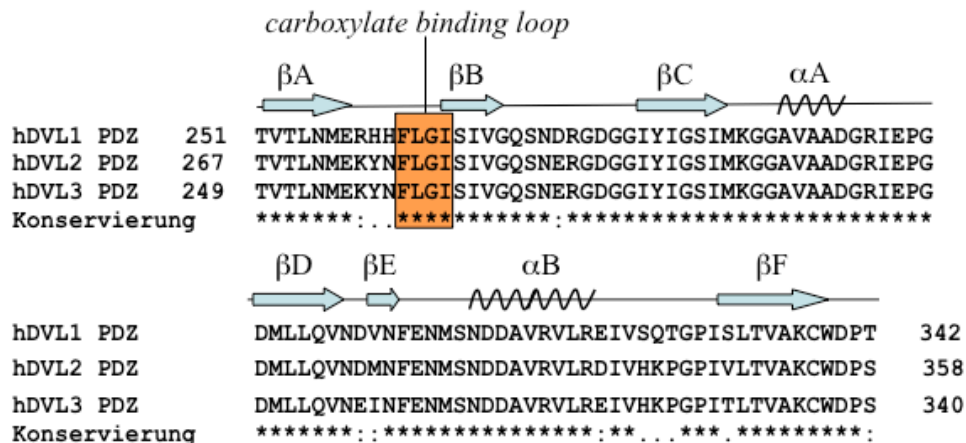


Abb. 3.34 Sequenzalignment und Sekundärstruktur der humanen PDZ-Domänen von DVL1, 2 und 3 (UNIPROT Code: DVL1: O14640, Aminosäuren 251-342; DVL2: O14640, Aminosäuren 267-358; DVL3: Q92997, Aminosäuren: 249-340). Der Grad der Ähnlichkeit ist gekennzeichnet durch ,*' - identisch, ,?' - sehr ähnlich, ,.' - verschieden.

Eine besondere Eigenschaft der DVL-PDZ-Domänen ist, dass diese nicht eindeutig einer Klasse von PDZ-Domänen zugeordnet werden können. Es sind zwar native Interaktionspartner bekannt, wie beispielsweise das Protein Dapper mit der Sequenz S L K L M T T V-OH^[197], welches für die Zuordnung zur Klasse I der PDZ-Domänen

(Bindungsmotiv: X S/T X Ψ -OH) spräche, aber es werden auch interne Bindungsmotive erkannt z.B. K T X X X W des *Frizzled*- Rezeptors.^{[198],[199]} Die folgenden Arbeiten wurden mit der human DVL3-PDZ-Domäne durchgeführt.

3.3.2 Assayentwicklung

Für die DVL3-PDZ-Domäne sollte, wie für die Shank3-PDZ-Domäne beschrieben (Abschnitt 3.2.2), ein FP-Assay entwickelt werden. Dazu wurden mit Fluorescein markierte Peptide synthetisiert. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen stammten von nativen Bindungspartnern und Peptiden, die in der Literatur^{[197]-[201]} als Bindungspartner für die DVL-PDZ-Domänen beschrieben wurden.

Die in der Literatur^{[197]-[201]} angegebenen Bindungskonstanten konnten im FP-Assay nicht reproduziert werden (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 An der DVL3-PDZ-Domäne vermessene potenzielle Fluoreszenzsonden

Nr.	Herkunft	AA-Sequenz	K_D gem. [μ M]	K_D Lit. [μ M]	Lit.
118	Protein: Dapper	Fluo-KLMTTV-OH	inaktiv	-	[197]
119	Protein: Dapper	Fluo-LKLMTTV-OH	inaktiv	-	[197]
120	Protein: Dapper	Fluo-SLKLMTTV-OH	inaktiv	-	[197]
121	Peptidbibliothek	Fluo-WKWYGGWF-OH	inaktiv	0.7 ± 0.2	[200]
122	Peptidbibliothek	TAMRA-WKDYWIDGK-NH ₂	inaktiv	1.2 ± 0.3	[200]
123	<i>rational design</i>	Fluo-VVV-OH	inaktiv	71	[201]
124	<i>rational design</i>	Fluo-VWV-OH	50.9 ± 3.4	2	[201]

Ein möglicher Grund für die schlechten Affinitäten könnte ein störender Einfluss des Fluoreszenzmarkers sein. Die Affinitäten der Peptide in der Literatur wurden im Fall von **119** und **121** zwar auch durch FP-Messungen bestimmt^{[197],[200]}, allerdings war nicht das Peptid sondern das Protein markiert. Bei der Bestimmung der Bindungskonstanten der Peptide **123** und **124** im Fluoreszenzassay wurde ebenfalls die PDZ-Domäne markiert.^[201]

Ein weiterer Grund für die Abweichung von den Literaturangaben könnte die Verwendung der unterschiedlichen Homologen von Dishevelled sein; die Affinität der Peptide **121** und **122** wurde für die DVL2-PDZ-Domäne bestimmt.^[200] Die Peptide **123** bzw. **124** wurden mit der DVL1-PDZ-Domäne vermessen.^[201] Allerdings weisen DVL1 bis 3 und speziell die PDZ-Domänen, wie bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, untereinander eine sehr große

Ähnlichkeit auf. Außerdem konnte die Gruppe um FUJII zeigen, dass Peptide, deren Sequenz dem Bindungsmotiv des nativen Bindungspartner *Frizzled* entsprach, mit geringfügigen Affinitätsunterschieden an alle drei DVL-PDZ-Domänen banden.^[205] Folglich ist nicht davon auszugehen, dass die Verwendung der DVL3-PDZ-Domäne der Grund für die signifikanten Affinitätsunterschiede ist, sondern dass der Fluoreszenzmarker zu den Affinitätsverlusten führte.

Das Tripeptid **124** war das einzige Peptid, für das eine Bindung an die DVL3-PDZ-Domäne durch FP-Messungen bestimmt werden konnte. Deshalb wurde das Peptid **124** als Ausgangspunkt für die Entwicklung von längeren und möglicherweise affineren Peptiden genutzt. Dazu wurde **124** mit jeweils einer der 20 proteinogenen Aminosäuren verlängert und die Affinität der resultierenden Tetrapeptide (**125** bis **144**) bestimmt (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Aminosäuresequenzen und K_D -Werte der Tetrapeptide **103** – **123**.

Nr.	AA-Sequenz	K_D [μM]
125	Fluo-A V W V-OH	inaktiv
126	Fluo-R V W V-OH	inaktiv
127	Fluo-N V W V-OH	inaktiv
128	Fluo-D V W V-OH	38
129	Fluo-C V W V-OH	inaktiv
130	Fluo-Q V W V-OH	inaktiv
131	Fluo-E V W V-OH	35
132	Fluo-G V W V-OH	50
133	Fluo-H V W V-OH	81
134	Fluo-I V W V-OH	inaktiv
135	Fluo-L V W V-OH	inaktiv
136	Fluo-K V W V-OH	inaktiv
137	Fluo-M V W V-OH	inaktiv
138	Fluo-F V W V-OH	inaktiv
139	Fluo-P V W V-OH	inaktiv
140	Fluo-S V W V-OH	35
141	Fluo-T V W V-OH	34
142	Fluo-W V W V-OH	inaktiv
143	Fluo-Y V W V-OH	inaktiv
144	Fluo-V V W V-OH	inaktiv

Lediglich sechs Verbindungen (**128**, **131** – **133**, **140** und **141**) der untersuchten Tetrapeptide **125** - **144** zeigten gegenüber der DVL3-PDZ-Domäne eine Affinität. Alle anderen Verbindungen waren inaktiv (Tabelle 3.10).

Das Peptid **133**, mit einem Histidin als vierte Aminosäure, zeigte eine schwächere Affinität als das zu Grunde liegende Tripeptid **124**. Ebenfalls keinen Affinitätsgewinn wurde durch die Verlängerung des Peptides **124** mit Glycin zum Tetrapeptid **132** bewirkt. Die Bindungskonstante entspricht mit 50 μM dem K_D -Wert des Tripeptides **124**. Eine stärkere Bindung wurde für die Tetrapeptide **128**, **131**, **140** und **141** beobachtet. Diese vier Peptide gingen aus der Verlängerung des Tripeptides **124** jeweils mit Asparaginsäure (**128**), Glutaminsäure (**131**), Serin (**140**) und Threonin (**141**) hervor. An der Bindungsstelle P₃ wurde demnach eine Carbonsäure oder Hydroxygruppe bevorzugt gebunden (Tabelle 3.10).

Um die Affinität weiter zu steigern, wurde das Tetrapeptid **140** wiederum um jeweils eine der 20 proteinogenen Aminosäuren verlängert. Die resultierenden Pentapeptide **145** - **164** zeigten jedoch eine schwächere Bindung an die DVL3-PDZ-Domäne. Bis zu einer Konzentration von 100 μM Protein konnte keine Sättigung der Titrationskurve erreicht werden. Wie beispielhaft für das Peptid Fluo-A S V W V-OH (**145**) in Diagramm 3.4 gezeigt.

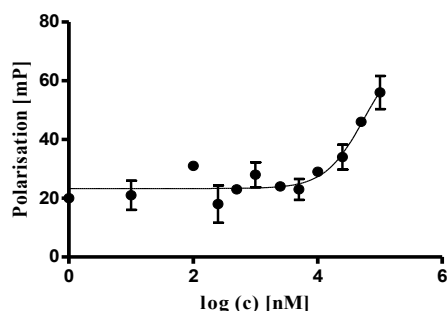


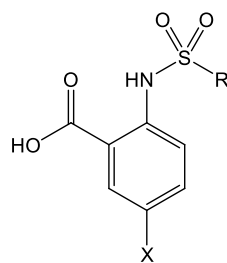
Diagramm 3.4 Auftragung der FP gegen den Logarithmus der Konzentration an DVL3-PDZ-Domäne bei der Titration des Pentapeptids **145**.

Eine Verlängerung des Tetrapeptides **140** führte somit nicht zu einer verstärkten Bindung an das Protein. Die Pentapeptide **145** – **164** konnten nicht als Sonden für einen FP-Assay verwendet werden. Die Bindungskonstanten der im folgenden Abschnitt wurden daher in ITC-Messungen bestimmt.

3.3.3 Optimierung von Liganden für die DVL3-PDZ-Domäne

(in Kooperation mit N. KAMDEM, AG Oschkinat und A. KREUCHWIG, AG G. Krause, FMP Berlin, Y. ROSKE, AG Heinemann, MDC, Berlin, D. KOWALSKI, Enamine Ltd., Kiew)

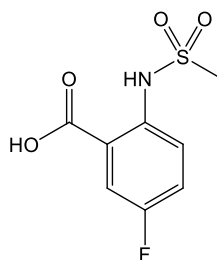
In Vorarbeiten von N. KAMDEM (AG Oschkinat, FMP, Berlin), A. KREUCHWIG (AG G. Krause, FMP, Berlin) und D. KOWALSKI (Enamine Ltd., Kiew) wurden 2-(Sulfonamido)-benzoesäuren (**165**; Abb. 3.35) als Liganden für die DVL3-PDZ-Domäne identifiziert. Die Bindung an das Protein wurde durch ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die K_D -Werte dieser Verbindungen wurden durch ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Titrationsen bestimmt und lagen im moderaten bis unteren mikromolaren Bereich. Bei allen bisher untersuchten Derivaten **165** handelte es sich um Verbindungen mit Arylsulfonamidresten. (Abb. 3.35)



165

Abb. 3.35 Grundstruktur (**165**) der Liganden für die DVL3-PDZ-Domäne (X = Halogen; R = Aromat)

Um die Wichtigkeit des aromatischen Sulfonamidrests (R in Abb. 3.35) für die Bindung an das Protein zu untersuchen, wurde dieser Rest durch eine Methylgruppe ersetzt. Die Affinität der Verbindung **166** (Abb. 3.36) zur DVL3-PDZ-Domäne wurde durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt.



166

Abb. 3.36 Struktur der Verbindung **166**.

In ITC-Messungen wird die Enthalpieänderung bei der Zugabe eines Liganden zu einer Proteinelösung gemessen. Es wird also bestimmt, wie viel Wärme an die Umgebung abgegeben wird (exotherme Reaktion) oder aus der Umgebung aufgenommen wird

(endotherme Reaktion).^{[202],[203]} Der Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters ist in Abb. 3.37A dargestellt.^[204]

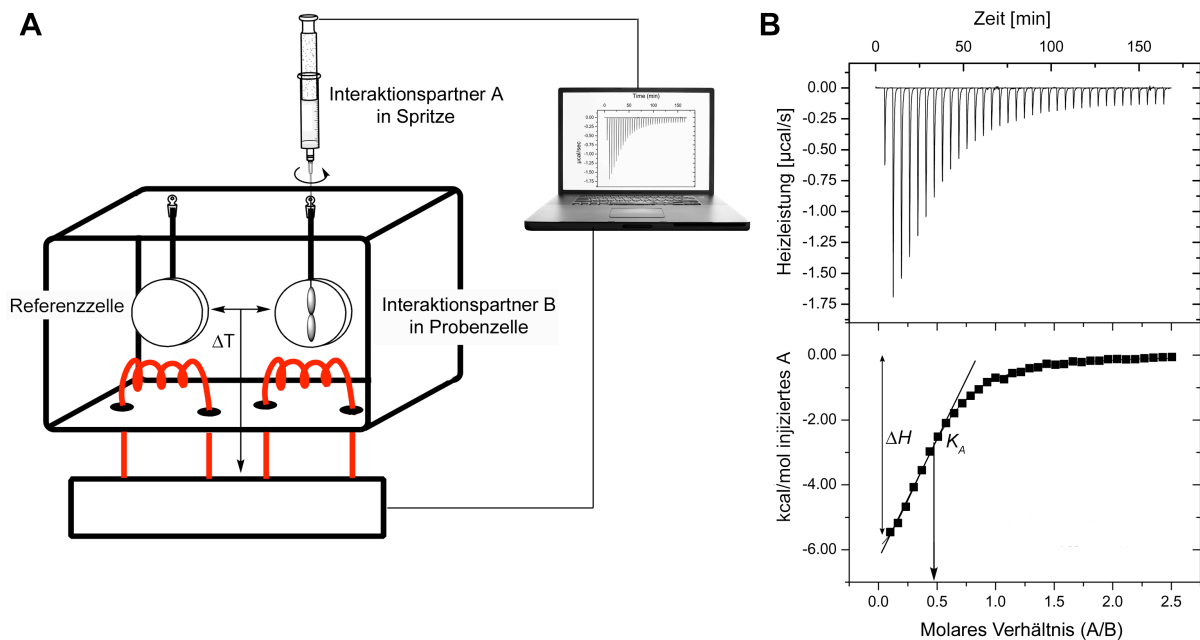


Abb. 3.37 Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters (A; vgl. [204]) und exothermes ITC-Experiment mit einem Verhältnis von 0.5 des Interaktionspartner A zu Interaktionspartner B (B).

Das Kalorimeter besteht aus zwei Zellen, einer Referenzzelle, gefüllt mit Puffer oder Wasser und einer Probenzelle, gefüllt mit einer Lösung des Interaktionspartners B. Dazu wird schrittweise eine Lösung des Interaktionspartners A aus der Spritze injiziert. Die durch die Komplexbildung von A und B verursachten Wärmeänderungen in der Probenzelle wird im Vergleich zur Referenzzelle gemessen. Durch Heizen bzw. Kühlen wird die Temperatur konstant gehalten. Die dazu durchgeführten Erhöhungen bzw. Absenkungen der Heizleistung werden gemessen und sind im oberen Teil der Abb. 3.37B als Spitzen (Peaks) aufgetragen gegen das Verhältnis der Konzentrationen von A und B erkennbar. Durch Integration der einzelnen Peaks wird die benötigte oder freiwerdende Energie pro Injektion bestimmt. Diese Energie wird durch die Punkte der Kurve im unteren Teil der Abb. 3.37B wiedergegeben.

Der Anstieg einer theoretischen Kurve, angepasst an die Messpunkte, ergibt die Assoziationskonstante K_A . Durch den Wendepunkt der Kurve ist das Verhältnis des Interaktionspartners A zum Interaktionspartner B bestimmbar und der maximale Abstand zur X-Achse ergibt ΔH .^{[202]-[204]} Aus den so ermittelten Werten lassen sich die thermodynamischen Parameter freie Enthalpie ΔG , Entropie ΔS und die Dissoziationskonstante K_D bestimmen. Die freie Enthalpie ΔG und die Entropie ΔS werden nach Gleichung (6) berechnet.^[204]

$$-RT \cdot \ln K_A = \Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (6)$$

Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus der reziproken Assoziationskonstante K_A (Gleichung 7).

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad (7)$$

Der so ermittelte K_D -Wert für die Verbindung **166** betrug 1.34 ± 0.07 mM und ist damit um zwei Größenordnungen schlechter als die beste Ausgangsverbindung. Der aromatische Teil des Sulfonamids trägt offenbar stark zur Bindung bei und sollte deshalb erhalten bleiben.

Trotz der geringen Affinität des Anthranilsäurederivats **166** zu DVL3-PDZ-Domäne war es möglich die Kristallstruktur der PDZ-Domäne im Komplex mit dem Liganden **166** zu lösen. (Abb. 3.38)

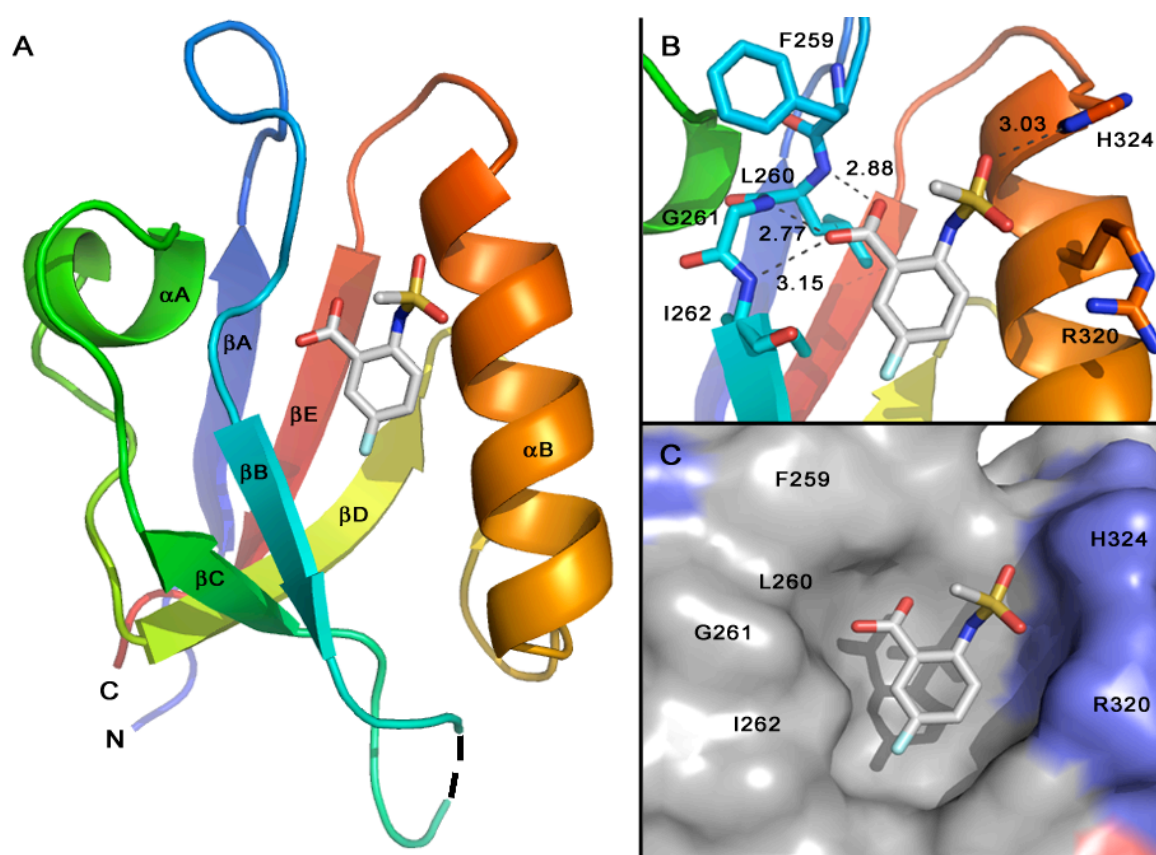


Abb. 3.38 Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne im Komplex mit **166**. **A:** Gesamtansicht. Die schwarze Strichlinie stellt eine ungeordnete Schleife, Aminosäuren 268 – 272, dar. **B:** Vergrößerung der Bindungsspalte mit *carboxylate binding loop* (F259 – I262) in hellblau. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch graue Strichlinien gekennzeichnet. Die Abstände sind in Å angegeben. **C:** Oberflächenansicht der Bindungsstelle. Farbcode: blau - positiv geladene Aminosäuren; rot - negativ geladene Aminosäuren.

Wie in der Abb. 3.38A dargestellt ist, war die Verbindung **166** in der Bindungsspalte zwischen dem β B-Strang und der α B-Helix gebunden. Das Carboxylat des Anthranilsäurederivats **166** interagiert mit dem *carboxylate binding loop* und ein Sauerstoffatom der Sulfonamidgruppe bildete eine Wasserstoffbrückenbindung zum Histidin H324 aus (Abb. 3.38B). Die Interaktionen mit dem *carboxylate binding loop* auf der einen Seite und dem Histidin H326 der Helix α B auf der anderen Seite sorgten für die Lokalisation des Benzolrings der Verbindung **166** in der hydrophoben Tasche der PDZ-Domäne (Abb. 3.38C).

Da der Ligand **166** mit dem Histidin H324 interagiert und an dieser Stelle der DVL1-PDZ-Domäne ein Serin (S326) vorliegt wurde untersucht, inwiefern eine Interaktion der Verbindung **166** mit der DVL1-PDZ-Domäne stattfindet.

Um die Bindung an die DVL1-PDZ-Domäne zu bestimmen wurden ebenfalls die ITC-Messungen durchgeführt. Wie aus Abb. 3.39 ersichtlich ist, war die Bestimmung einer Dissoziationskonstante der Verbindung **166** gegenüber der DVL1-PDZ-Domäne auf Grund der geringen Affinität nicht möglich. Der Inhibitor **166** zeigte folglich eine Selektivität gegenüber der DVL1-PDZ-Domäne.

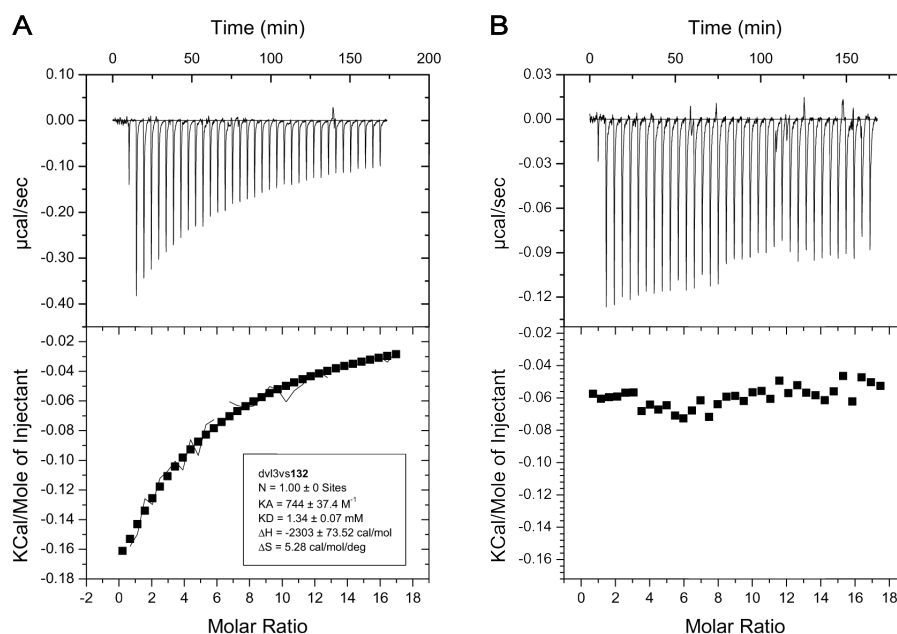


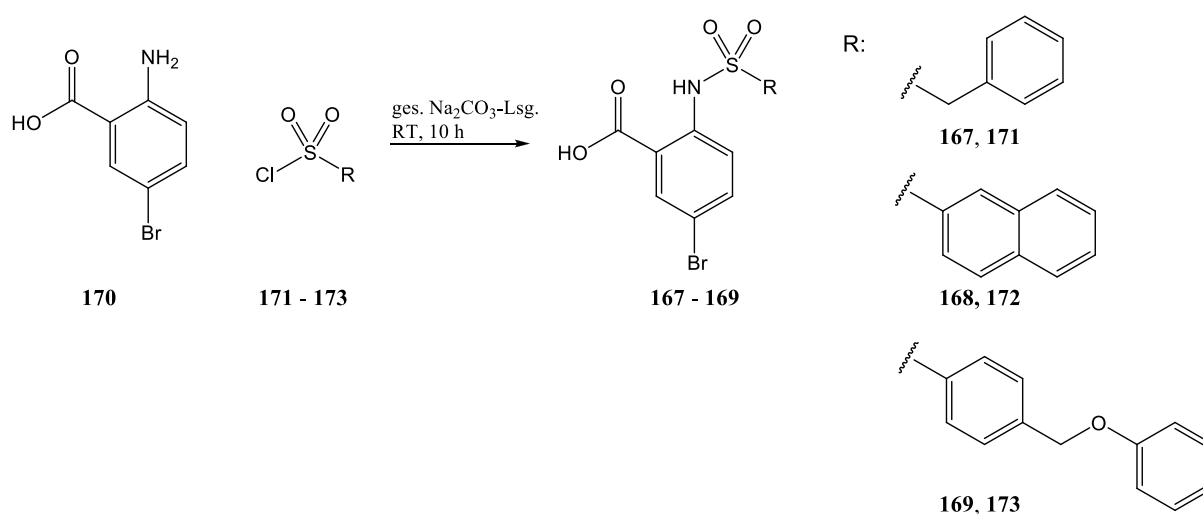
Abb. 3.39 ITC-Messungen der Verbindung **166** mit **A**: DVL3-PDZ-Domäne. **B**: DVL1-PDZ-Domäne.
 (c(DVL) = 103 μM , c(**166**) = 8.4 mM)

Um die Affinität der Liganden zur DVL3-PDZ-Domäne, basierend auf der Grundstruktur **165** (Abb. 3.35), zu erhöhen, wurde der Sulfonamidrest variiert. Da Arylsulfonamide bevorzugt gebunden werden, wurden Derivate der Grundstruktur mit verschiedenen aromatischen

Sulfonamidresten (**167** – **169**) synthetisiert. Das Ziel dabei war, durch π - π -Interaktion der Seitenkette des Phenylalanins F259 zusätzlich positive Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein zu generieren. Aus diesem Grund wurde der Abstand zwischen der Sulfonamidfunktionalität und den aromatischen Systemen variiert.

Außerdem wurde nicht die Fluoranthranilsäure, sondern das Bromderivat **170** verwendet, da die Substitution des Fluors durch Brom ebenfalls einen Affinitätsgewinn zur Folge hatte (untersucht von N. KAMDEM, AG Oschkinat, FMP, Berlin).

Die Synthese erfolgte durch die Kondensation des entsprechenden Sulfonylchlorids (**171** – **173**) mit dem Anthranilsäurederivat **170** (Schema 3.9).



Schema 3.9 Synthese der Verbindungen **167** – **169**.

Die Verbindungen **167** – **169** wurden ebenfalls im ITC-Experiment untersucht. Durch die ITC-Messungen wurde ein Verhältnis von 0.5 Liganden je Protein ermittelt, d.h. ein Ligand bindet an zwei PDZ-Domänen bzw. induziert eine Dimerisierung. Eine andere Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass das Protein zur Hälfte „inaktiv“ vorlag. Da in der Kristallstruktur (*vide infra*) nicht zu beobachten war, dass ein Ligand an zwei PDZ-Domänen band oder eine Dimerisierung auslöste, konnte davon ausgegangen werden, dass etwa die Hälfte des eingesetzten Proteins nicht richtig gefaltet und damit inaktiv war.

Die durch die ITC-Messungen ermittelten Enthalpie- und Entropie-Werte sind in Diagramm 3.5 zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass die Verbindung **166** ($K_D = 1.34$ mM) und **169** ($K_D = 7.2$ μ M) sowohl eine positive Entropie als auch eine negative Enthalpie aufwiesen. Die Verbindungen **167** und **168** kompensierten durch eine starke Abnahme der Enthalpie eine negative Entropie. Für die Liganden **167** und **168** wurden jeweils K_D -Werte von 58.5 (**167**) und 13.8 μ M (**168**) gemessen (Diagramm 3.5).

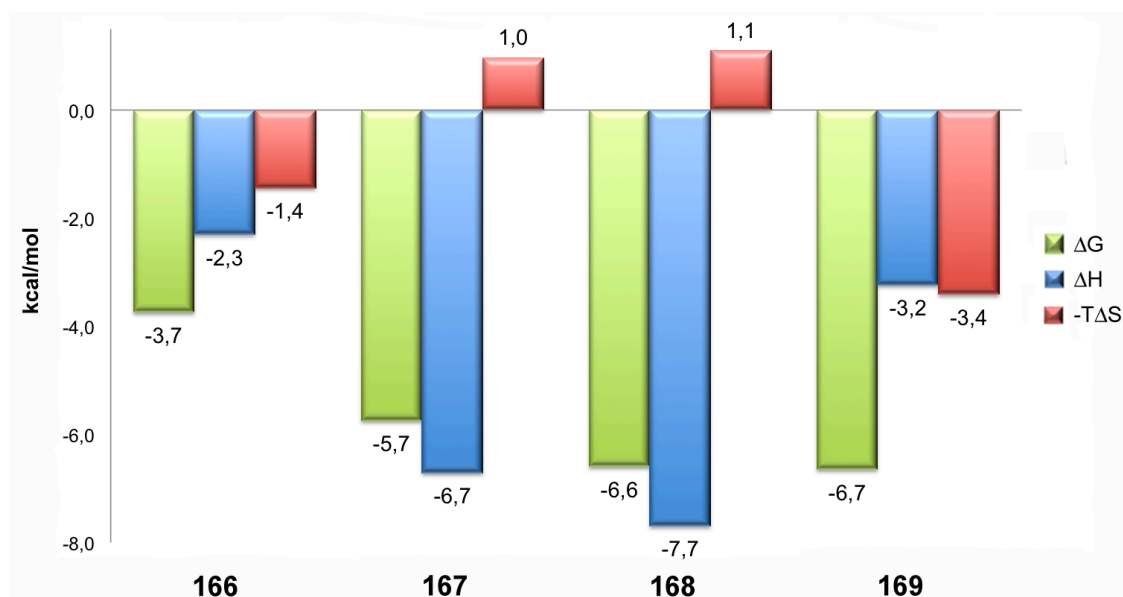


Diagramm 3.5 Auftragung der Enthalpie ΔH , des Entropieterms $-T\Delta S$ und der freien Enthalpie ΔG für die Verbindungen **166** – **169** bestimmt durch ITC-Messungen.

Die Verbindungen **167** – **169** wurden zur Kokristallisation mit der DVL3-PDZ-Domäne verwendet. Für den Liganden **167** konnte die Struktur des Proteins im Komplex mit **167** gelöst werden.

Der Inhibitor **167** war erwartungsgemäß im gleichen Modus, wie für die Verbindung **166** beobachtet, gebunden (Abb. 3.40). Das Carboxylat des Anthranilsäurederivats **167** interagiert mit dem *carboxylate binding loop* und ein Sauerstoff des Sulfonamids mit dem Histidin H324. Es war zu beobachten, dass die aromatischen Systeme des Phenylalanins F259 und des Sulfonamids sich zueinander ausrichteten. Das spricht für eine geringe Wechselwirkung der π -Systeme des Phenylalanins F259 und des Sulfonamids **167** (Abb. 3.40B). Eine größere Überlappung der beiden π -Systeme konnte aber nicht festgestellt werden.

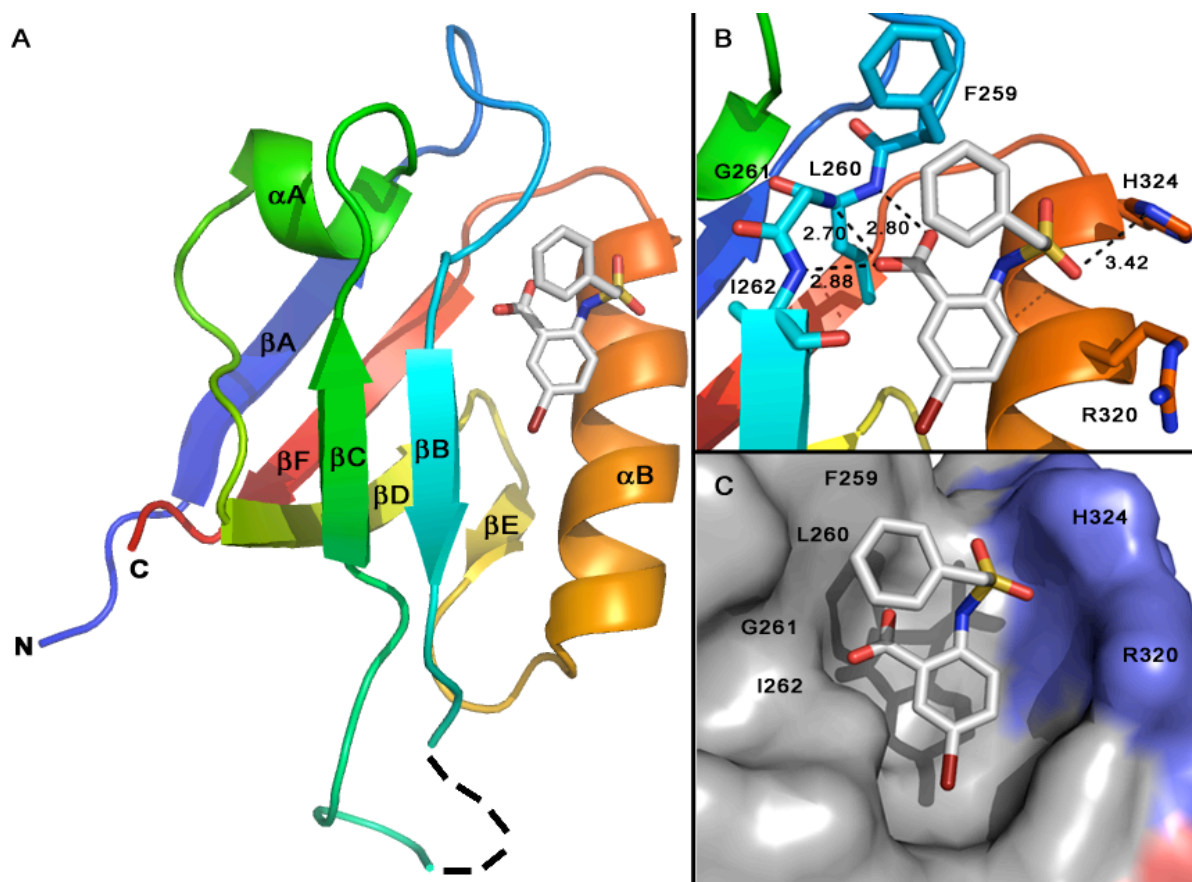


Abb. 3.40 Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne im Komplex mit **167**. **A**: Gesamtansicht. Die schwarze Strichlinie stellt eine ungeordnete Schleife, Aminosäuren 268 – 270, dar. **B**: Vergrößerung der Bindungsspalte mit *carboxylate binding loop* (F259 – I262) in hellblau. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch graue Strichlinien gekennzeichnet. **C**: Oberflächenansicht der Bindungsstelle. Farbcode: blau – basische Aminosäuren; rot – saure Aminosäuren.

Die zusätzliche Interaktion der π -Systeme des Phenylalanins F259 und des Liganden **167** erklärte die Abnahme der Enthalpie im Vergleich zu Verbindung **166**.

Durch diese π - π -Interaktion des Proteins (Phenylalanin F259) mit dem Arylsulfonamid der Verbindung **167** kommt es außerdem zu einer Fixierung des Proteins am *carboxylate binding loop*. Damit konnte die beobachtete Entropieabnahme ebenfalls erklärt werden. Dieses Phänomen ist auch für die Verbindung **168** zu erwarten. Da aber mutmaßlich eine bessere π - π -Interaktion zwischen Ligand **168** und Phenylalanin F259 stattfand, welche die Entropieabnahme kompensierte, ist eine stärkere Bindung zu beobachten ($K_D = 13.8 \mu\text{M}$).

In der Überlagerung der Kristallstrukturen der DVL3-PDZ-Domäne im Komplex mit **166** bzw. **167** war zu beobachten, dass die Proteine nahezu kongruent sind. Die Liganden (**166** und **167**) interagierten mit den gleichen Aminosäuren des Proteins, lagen jedoch um den Carbonylkohlenstoff des Carboxylats als Fixpunkt geringfügig verdreht vor (Abb. 3.41).

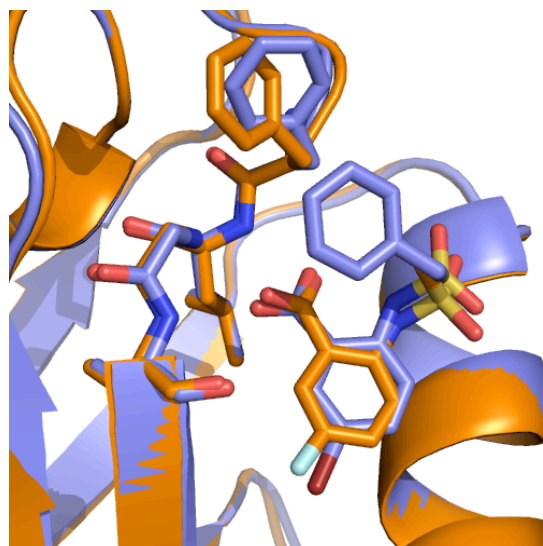


Abb. 3.41 Superposition der Kristallstrukturen der DVL3-PDZ-Domänen im Komplex mit **166** (orange) und **167** (blau).

Diese Drehung, bedingt durch die Interaktion des aromatischen Sulfonamids mit der Seitenkette des Phenylalanins F259, führte zu einer Verkürzung der Wasserstoffbrücken des Carboxylats von **166** mit dem *carboxylate binding loop* und damit zu einer stärkeren Bindung. Allerdings wird die Bindung zwischen der Seitenkette des Histidins H324 mit dem Sauerstoff des Sulfonamids geschwächt (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 Abstände zwischen interagierenden Atomen der Liganden **166** und **167** zur DVL3-PDZ-Domäne, ermittelt aus der jeweiligen Kristallstruktur.

Aminosäure	Abstand zu 133 [Å]	Abstand zu 134 [Å]
L262 (Amid)	2.88	2.80
G262 (Amid)	2.77	2.70
I264 (Amid)	3.15	2.88
H324 (Seitenkette)	3.03	3.42

Die bessere Interaktion des Inhibitors **167** mit dem *caroxylate binding loop* und die, wenn auch schwache, Wechselwirkung der Phenylalaninseitenkette (F259) mit dem aromatischen Sulfonamid führte dazu, dass der Enthalpie-Term der Verbindung **167** im Vergleich zum Liganden **166** stark abnahm. Die noch stärkere Verringerung der Enthalpie für die Verbindung **168** wurde wahrscheinlich durch eine bessere Interaktion der π -Systeme des Phenylalanins F259 und des Sulfonamids von **168** erreicht.

Die Lage der π -Systeme des aromatischen Sulfonamidrests der Verbindung **169** war offensichtlich nicht ideal für eine Wechselwirkung mit dem Phenylalanin F259, wie durch den geringeren Enthalpiegewinn (im Vergleich zu **167** und **168**) offensichtlich wurde. Allerdings

kam es zu einer Zunahme der Entropie, wahrscheinlich durch die Verdrängung von Wassermolekülen aus dem Protein. In der Summe führte das zu einer, verglichen mit dem Liganden **168**, etwas geringeren freien Enthalpie und damit zu einer geringfügig stärkeren Bindung.

Die aktiven Verbindungen **167** bis **169** wurden in ersten zellulären Experimenten untersucht (in Kooperation mit L. FANG, AG Birchmeier, MDC, Berlin). Für die Liganden **167** und **168** konnte allerdings keine Inhibition des Wnt-Signalwegs nachgewiesen werden. Die Verbindung **169** zeigte in diesen Versuchen die Tendenz zur konzentrationsabhängigen Inhibition des Wnt-Signalwegs. Allerdings in einem Konzentrationsbereich (bis 150 μM) der außerdem zum Absterben der Zellen (HEK 293) führte. Demnach konnten über die Aktivität in Zellen keine belastbaren Aussagen getroffen werden.

3.3.4 Ausblick

3.3.4.1 FP-Assay

Eine Alternative zur Entwicklung einer Fluoreszenzsonde für den FP-Assay besteht in der Verknüpfung eines bekannten Inhibitors, wie beispielsweise die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Liganden **166** – **169**, über einen Linker dem Fluoreszenzfarbstoff zu verknüpfen (Abb. 3.42).

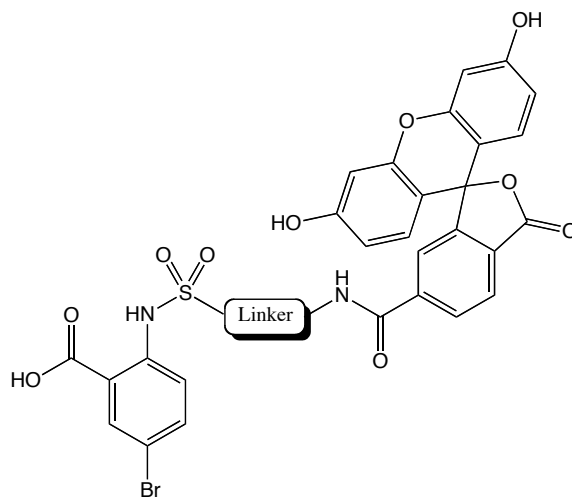


Abb. 3.42 Vorschlag für eine nicht-peptidische Fluoreszenzsonde auf Grundlage von Inhibitoren der DVL3-PDZ-Domäne.

Auf diese Weise sollte es möglich sein, eine Fluoreszenzsonde zu erhalten und damit einen FP-Assay für die DVL3-PDZ-Domäne zu etablieren.

3.3.4.2 Ligandenoptimierung

Für die weitere Optimierung der Liganden **166** – **169** könnte von Verbindung **168** ausgegangen werden. Der Entropiebeitrag wirkte sich zwar nicht positiv auf die Bindung aus, aber auf Grund des großen Enthalpiegewinns war davon auszugehen, dass eine Interaktion der π -Systeme des Sulfonamidrests und der Seitenkette des Phenylalanins F259 stattfand.

Um diese Interaktion weiter zu verbessern scheint, ausgehend von der Kristallstruktur der Verbindung **167** im Komplex mit der DVL3-PDZ Domäne (Abb. 3.43A), die Verwendung des Naphthalinyl-2-methanesulfonyl-Restes sinnvoll. Die daraus resultierende Verbindung **174** (Abb. 3.43B) sollte durch die bessere Interaktion der π -Systeme von Sulfonamid und Phenylalaninseitenkette (F259), wie in Abb. 3.43A gezeigt, einen stärkeren Enthalpiegewinn zur Folge haben und damit besser an das Protein binden.

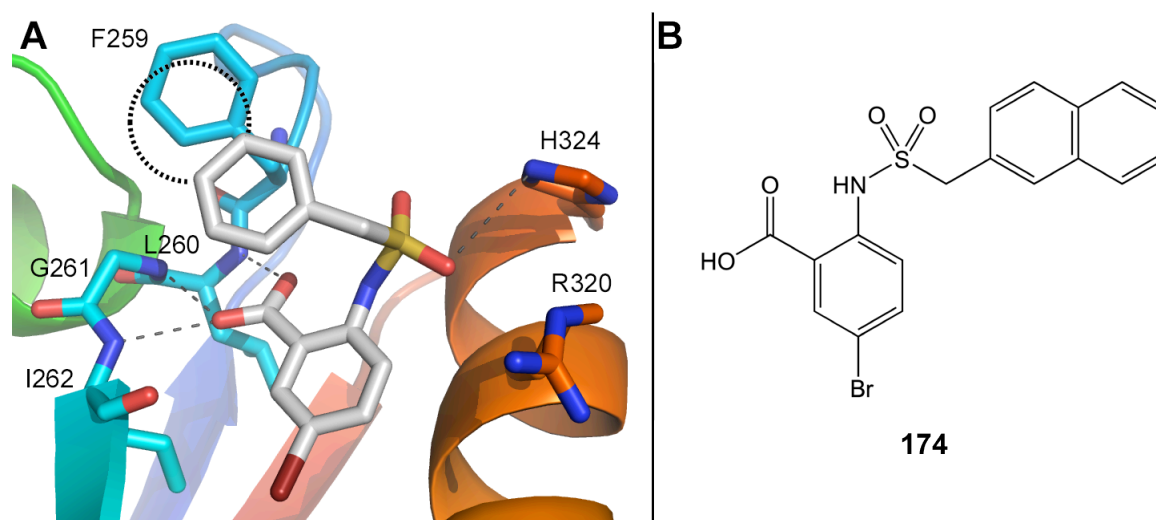


Abb. 3.43 A: Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne mit der Verbindung **167**. Der gestrichelte Kreis gibt die wahrscheinliche Lage des Naphtylrestes der Verbindung **174** an. B: Struktur der Verbindung **174**.

Des Weiteren zielten die bisherigen Modifikationen des Sulfonamidrestes auf Interaktionen außerhalb der Bindungsspalte der DVL3-PDZ-Domäne ab. Um die Affinität der Liganden weiter zu erhöhen, bietet es sich an, das Molekül in der Bindungsspalte zwischen β B-Strang und α B-Helix, zu verlängern.

Aus diesem Grund wurde die Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne im Komplex mit Verbindung **167** mit der Struktur der DVL2-PDZ-Domäne im Komplex mit dem Peptid E I V L W S D I P (PDB: 3CC0) überlagert. Dabei fällt auf, dass die Helix α B flexibel ist (Abb. 3.44A) und dadurch die hydrophobe Tasche weiter geöffnet werden kann, so dass dort wesentlich mehr Platz für hydrophobe Teile eines Moleküls vorhanden ist.

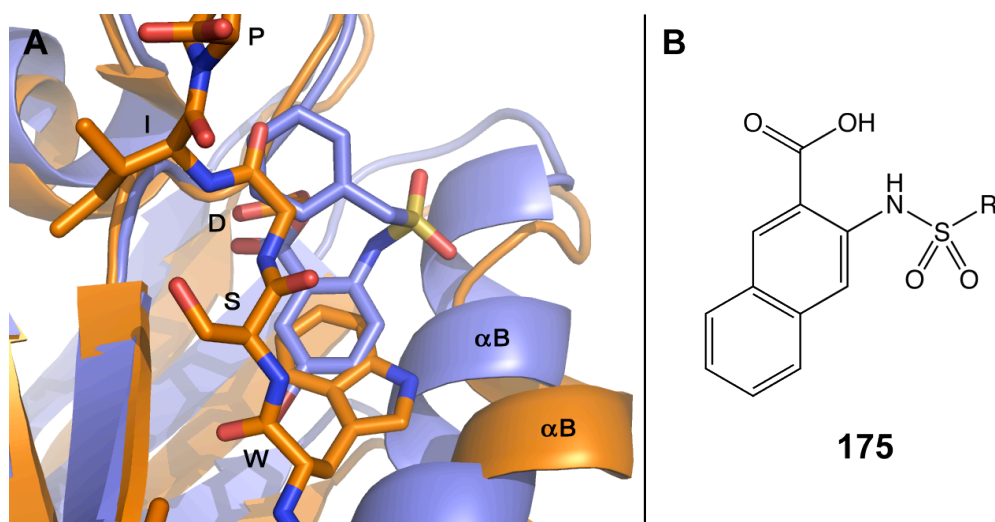


Abb. 3.44 A: Superposition der Kristallstrukturen der DVL-PDZ-Domäne im Komplex mit **167** (blau) und dem Peptid E I L W S D I P (orange; PDB 3CC0). B: Struktur der Verbindung **175**.

Im Falle des Peptids E I L W S D I P liegt die Seitenkette des Tryptophans in der vergrößerten hydrophoben Tasche (Abb. 3.44A). Aus diesem Grund scheint eine Vergrößerung der Anthranilsäure zur *ortho*-Aminonaphthalinsäure **175** (Abb. 3.44B) sinnvoll.

Eine weitere Möglichkeit um zusätzliche Bindungsenergie zu generieren, ergibt sich aus der Überlagerung der Kristallstruktur von **167** im Komplex mit der DVL3-PDZ-Domäne und der Struktur der DVL1-PDZ-Domäne im Komplex mit Sulindac (PDB: 2KAW).

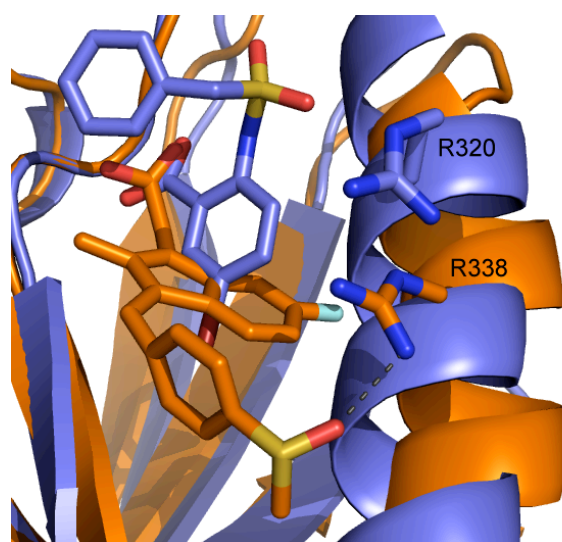


Abb. 3.45: Superposition der Kristallstrukturen der DVL-PDZ-Domäne im Komplex mit **167** (blau) und Sulindac (orange; PDB 2KAW).

Sulindac bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Arginin R338 der DVL2-PDZ-Domäne. In der gleichen Position befindet sich in der PDZ-Domäne von DVL3 ebenfalls ein Arginin (R320). Um dieses zu adressieren, müsste ein Wasserstoffbrückenakzeptor, wie

beispielsweise eine Carbonylgruppe, in die Grundstruktur **165** eingeführt werden. Die Art und Position des Wasserstoffbrückenakzeptors sollte durch Dockingexperimente bestimmt werden.

Um die Interaktion mit der Phenylalaninseitenkette F259 zu gewährleisten, bietet es sich an, auf Seiten des Sulfonamides entweder den Naphthalinyl-2-methanesulfonyl- (vgl. **174**, Abb. 3.43) oder den Naphthalin-2-sulfonyl-Rest (**172**, Schema 3.9) zu verwenden.

4 Fazit

Wie in der Literatur beschrieben und auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt wurde, ist es möglich Inhibitoren für PPI-Domänen, speziell PDZ-Domänen, zu entwickeln. Diese erreichten Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich ($K_I = 10 \mu\text{M}$ für die Shank3- und $K_D = 7 \mu\text{M}$ für DVL3-PDZ-Domäne). Durch Optimierungen der Liganden, wie für die Inhibitoren der DVL3 PDZ-Domäne vorgeschlagen (Abschnitt 3.3.4), sollte es möglich sein die Affinität weiter zu steigern.

Für die Bindung eines nicht peptidischen Liganden an eine PDZ-Domäne scheint eine Interaktion mit dem *carboxylate binding loop* und zusätzlich eine Wechselwirkung mit einer Aminosäure der Helix αB essenziell zu sein. Dies wurde z.B. für die oben beschriebenen Liganden **63**, **166** und **167** oder auch Sulindac, in den entsprechenden Strukturen beobachtet (Abb. 4.1).

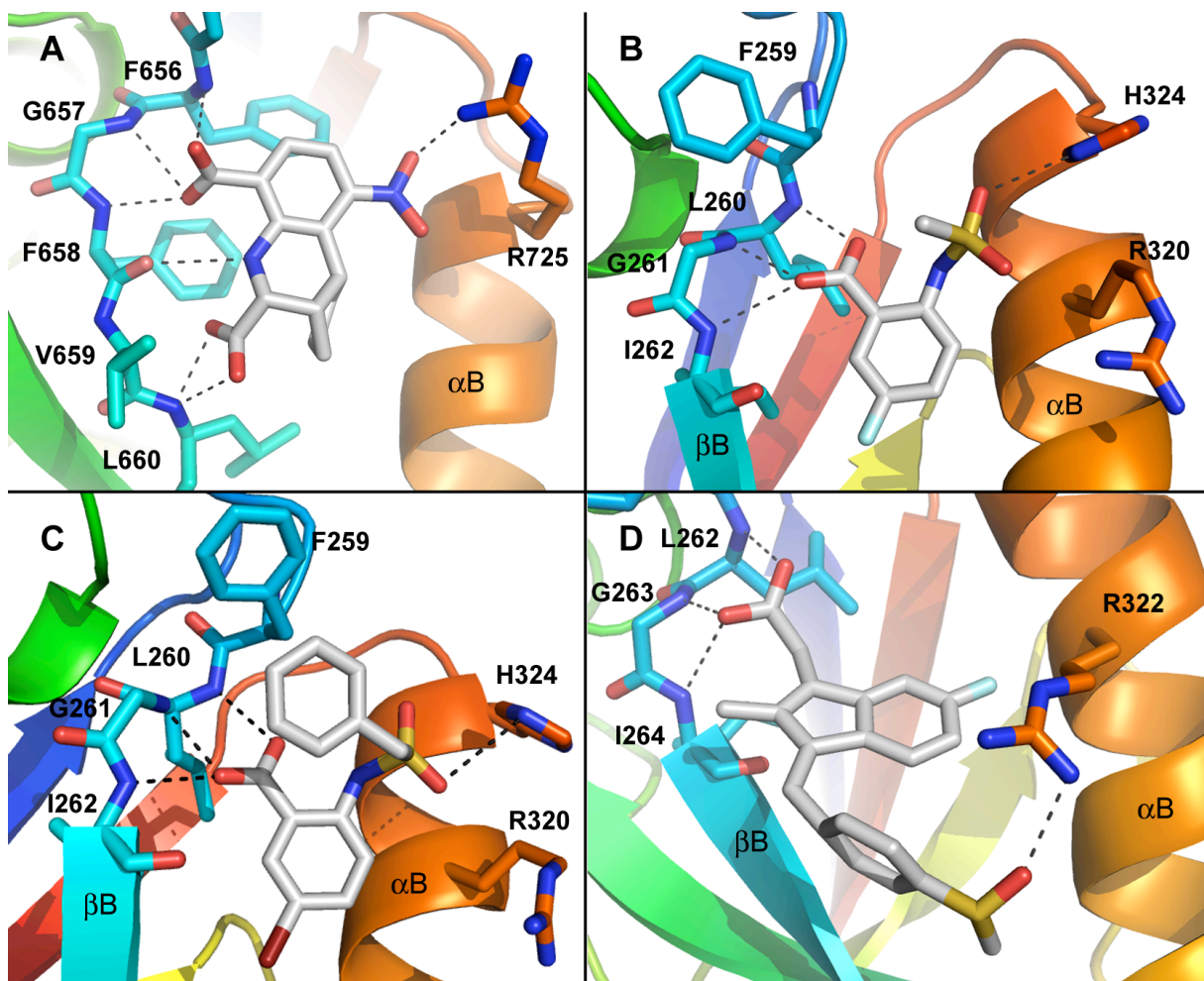


Abb. 4.1 Vergleich der Strukturen des Inhibitors **63** gebunden an die mShank3-PDZ-Domäne (**A**), der Liganden **166** (**B**) und **167** (**C**) im Komplex mit der hDVL3-PDZ-Domäne und Sulindac gebunden an die mDVL1-PDZ-Domäne (PDB: 2KAW) (**D**).

Findet diese Interaktion nicht statt, so erhält man nicht-bindende Substanzen wie in den SAR-Untersuchungen für die Shank3-PDZ-Domäne gezeigt wurde. Außerdem konnte dieser Sachverhalt auch für die DVL-PDZ-Domäne beobachtet werden. Hier ist die fehlende Interaktion mit einer Aminosäure aus der α B Helix ausschlaggebend für die Selektivität der Verbindung **166** gegenüber der DVL1-PDZ-Domäne.

Zwischen diesen Ankerpunkten lag bei den untersuchten Verbindungen ein hydrophober Molekülteil, der zum einen als Gerüst diente, um die funktionellen Gruppen in die „richtige“ Position zu bringen, und zum anderen direkt über der hydrophoben Tasche lokalisiert war. Die Lage des hydrophoben Molekülteils in bzw. über der hydrophoben Tasche sorgte zum einen für eine zusätzliche Stabilisation des Protein-Ligand-Komplexes, zum anderen wurde die hydrophobe Tasche dadurch abgeschirmt.

Abschließend ist festzuhalten, dass für die Bindung eines Liganden an eine PDZ-Domäne sowohl die Interaktion mit dem *carboxylate-binding-loop* und der hydrophoben Tasche als auch mit einer Aminosäure aus der gegenüberliegenden Helix α B nötig ist.

Gelingt es zusätzliche Interaktionen, beispielsweise entlang der Peptidbindungsspalte, zu generieren, sollte eine Erhöhung der Affinität bis in den nanomolaren Bereich möglich sein.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemein

Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angemerkt, ohne weitere Reinigung verwendet. Das Molekularsieb (*Acros Organics*, Geel, Belgien) wurde für mindestens 30 min im Vakuum mit der Heißluftpistole getrocknet.

Der Reaktionsverlauf wurde durch Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminium, *Merck*, Darmstadt, Deutschland) überwacht. Die chromatographische Reinigung wurde an Kieselgel mit der Korngröße 0.040 – 0.063 mm (*Merck*, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Für die LC-MS-Analysen diente ein Agilent 1100 System (*Agilent Technologies*, Böblingen, Deutschland) ausgestattet mit RP-Säule (Nucleosil LC-MS 100 C-18, 5 µm, 2 × 250 mm, *Grom*, Herrenberg, Deutschland), *diode array detector* (DAD) und Single Quadrupol Massenspektrometer (Elektrospray-Ionisation) bzw. mit einem Agilent 1200er Serie der Firma *Agilent* ausgestattet mit RP-Säule (Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 50 × 4.6 mm), DAD und einem *AccurateMass Time-of-Flight*-Massenspektrometer (Elektrospray-Ionisation) durchgeführt. Das *AccurateMass Time-of-Flight*-Massenspektrometer wurde ebenfalls für die Bestimmung der exakten Massen verwendet. Als Eluent dienten Wasser-Acetonitril-Mischungen mit 0.1% Ameisensäure.

Die NMR-Spektren wurden am 300 MHz Spektrometer Avance der Firma *Bruker* (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen (¹H-NMR: 300 MHz; ¹³C-NMR: 75 MHz). Die Proben wurden in CDCl₃ (interner Standard: CHCl₃, δ = 7.26 ppm), DMSO-*d*₆ (interner Standard Me₂SO; δ = 2.50 ppm), DMF-*d*₇ (interner Standard Me₂NCHO δ = 2.75 ppm) oder MeOH-*d*₄ (interner Standard CHD₂OD, δ = 3.31 ppm) gelöst. Die chemischen Verschiebungen sind auf die δ-Skala bezogen und in ppm angegeben. Die Multiplizitäten sind wie folgt angegeben: s - Singulett, d - Dublett, t - Triplett, q - Quartett, sep - Septett, dd - Doppeldublett, ddd - Dublett eines Doppeldubletts, dt - Dublett eines Triplets, m - Multiplett. Der Zusatz b zeigt breite Signale an. Diastereomere Protonen wurden – sofern eine Unterscheidung möglich war – mit den Indizes A bzw. B gekennzeichnet. Der Index Ar kennzeichnet Signale aromatischer Wasserstoff- bzw. Kohlenstoffatome. Die

Substitutionsgrade der Kohlenstoffatome wurde mit C – quartär, CH – tertiär, CH₂ – sekundär und CH₃ – primär bezeichnet. Die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgte in Hz. Die Zuordnung der Signale im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum erfolgte durch die Aufnahme und Auswertung von H,H-COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren. Die Rohdaten wurden mit dem Programm TopSpin ausgewertet.

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrometer Vector 22 der Firma *Bruker* ausgestattet mit SplitPea[®]-ATR-Einheit der Firma *Harrik* (Pleasantville, USA) aufgenommen. Die Intensitäten der Signale sind mit ss – sehr stark, s – stark, m – mittelstark und w – schwach angegeben.

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Melting Point B545 (*Büchi*, Essen, Deutschland) gemessen und sind unkorrigiert.

Für Reaktionen im Mikrowellenreaktor wurde die *Biotage* (Uppsala, Schweden) Mikrowelle Initiator verwendet.

Die Reinigung von Substanzen mittels HPLC erfolgte an der semipräparativen HPLC-Säule (Grom-SIL 300 ODS-5 ST RP-C18, 250 × 20 mm). Mit verschiedenen Gradienten, welche aus analytischen HPLC-Läufen adaptiert wurden. Als Eluent dienten Wasser-Acetonitril-Gemische mit 0.1 % TFA.

Peptide wurden entweder manuell in Plastikspritzen mit PE-Filtern oder mit einem Parallelsyntheseroboter Sophas GXXL der Firma *Zinsser Analytic* (Frankfurt am Main, Deutschland) hergestellt. Zur Synthese wurde 2-Chlortritylchlorid-Harz (*Novabiochem*, Darmstadt, Deutschland; 1.3 mmol/g) für die freie Säure am C-Terminus bzw. Rinkamid-Harz (*Novabiochem*, Darmstadt, Deutschland; 0.65 mmol/g) für Amide am C-Terminus verwendet. Die Synthese erfolgte unter Standard-Fmoc-Peptidfestphasen-Synthese Bedingungen mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DIC/HOBt) als Kupplungsreagenzien.^[135] Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch zweimalige Behandlung des Harzes mit 20 % Piperidin in DMF für jeweils 10 min abgespalten. Im Anschluss an die Kupplung der Aminosäuren und das Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurden die fluoreszenzmarkierten Peptide mit 5(6)-Carboxyfluorescein (5 Äquivalent), DIC (5 Äquivalente) und HOBt (5 Äquivalente) acyliert. Das so acylierte Harz wurde anschließend

30 min mit 20 % Piperidin in DMF behandelt. Die Acetylierung der Peptide ohne Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch Behandlung des geschützten N-Terminus mit DMF/Ac₂O/DIPEA (8 : 1 : 1) für 10 min. Die Abspaltung der Peptide vom Harz wurde mit 95 %iger Trifluoressigsäure (TFA) unter Zugabe der entsprechenden Substanzen zum Abfangen der abgespaltenen Seitenkettenschutzgruppen durchgeführt.^[135] Die Peptide wurden, wenn nötig, mittels präparativer RP-HPLC unter der Verwendung von Wasser-Acetonitril-Gemischen mit dem Zusatz von 0.1 %TFA aufgereinigt.

5.2 *Shank3-PDZ-Domäne*

5.2.1 Assays

Fluoreszenzpolarisations-Assay

Der FP-Assay wurde in unbehandelten, schwarzen 384-well Mikrotiterplatten (*Corning B.V. Life Sciences*, Schipol-Rijk, Niederlande) in einem finalen Volumen von 10 µL durchgeführt. Dazu wurde 1 × PBS Puffer (pH 7.2) mit 0.25 % TWEEN verwendet. Die Messungen wurden im *microplate reader* Safire II (*Tecan*, Crailsheim, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm durchgeführt. Die Peptide **1** – **6** wurden in einer Konzentration von 10 nM gegen verschiedene Konzentrationen (0 – 100 µM) der His-tag mShank3-PDZ-Domäne titriert. Die so ermittelten FP-Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 für Windows bzw. GraphPad Prism 5 für Windows (*GraphPad*, La Jolla, USA) durch nichtlineare Regression (*curve fit*) analysiert.

Berechnung des Z'-Wertes^[138]

Zur Bestimmung des Z'-Werts wurde die FP für die gebundene und ungebundene FP-Sonde **3** bestimmt. Um die FP für den gebundenen Zustand zu bestimmen wurden die His-tag mShank3 PDZ-Domäne (500 nM) und Fluoreszenzsonde **3** (10 nM) in PBS (pH 7.2) mit 0.25 % TWEEN in einem finalen Volumen von 10 µL vermessen. Zur Ermittlung der FP für den ungebundenen Zustand wurden 10 µL einer Lösung aus His-tag mShank3 PDZ-Domäne (500 nM), Fluoreszenzsonde **3** (10 nM) und unmarkiertes Peptid **8** (10 µM) in PBS (pH 7.2) mit 0.25 % TWEEN vermessen. Die FP für den gebundenen und ungebundenen Zustand der Sonde **3** wurden jeweils 192mal bestimmt und der entsprechende Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Der Z'-Wert wurde entsprechend Gleichung (1) berechnet ($Z' = 0.71$).

Fluoreszenzpolarisations-Screening Assay

Das Screening wurde in unbehandelten, schwarzen, 384-well Mikrotiterplatten (*Corning B.V. Life Sciences*, Schipol-Rijk, Niederlande) durchgeführt. In jedem Well befanden sich 10 μ L einer Lösung aus His-tag mShank3-PDZ-Domäne (500 nM), Fluoreszenzsonde **3** (10 nM) und eine der Verbindungen (10 μ M im Falle der ChemBioNet-Bibliothek und 1 mM im Falle der Carboxylat-Bibliothek) in PBS Puffer (pH 7.2) mit 0.25 % TWEEN und 1 % DMSO. Auf jeder Platte befanden sich zusätzlich 32 Negativkontrollen (500 nM His-tag mShank3-PDZ-Domäne und 10 nM Fluoreszenzsonde **3** in 10 μ L PBS (pH 7.2) mit 0.25 % TWEEN und 1 % DMSO).

Bestimmung der IC_{50} -Werte

Um die IC_{50} -Werte der Verbindungen zu bestimmen, wurden His-tag mShank3-PDZ-Domäne (500 nM) und Fluoreszenzsonde **3** (10 nM) in einem finalen Volumen von 10 μ L gegen verschiedene Konzentrationen (0 – 500 μ M) der zu untersuchenden Verbindung titriert. Die Messung wurde in unbehandelten, schwarzen, 384-well Mikrotiterplatten (*Corning B.V. Life Sciences*, Schipol-Rijk, Niederlande) durchgeführt und die gemessenen FP-Daten wurden mittels GraphPad Prism 4 für Windows bzw. GraphPad Prism 5 für Windows (*GraphPad*, La Jolla, USA) durch nichtlineare Regression (*curve fit*) analysiert.

5.2.2 Synthese

Peptide

CF-QTRL-OH (**1**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{42}H_{51}N_8O_{13}^+$ [M+H]⁺: 874.3497 gef.: 874.3494.

CF-AQTRL-OH (**2**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{45}H_{56}N_9O_{14}^+$ [M+H]⁺: 945.3869 gef.: 945.3868.

CF-EAQTRL-OH (**3**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{50}H_{63}N_{10}O_{17}^+$ [M+H]⁺: 1074.4294 gef.: 1074.4294.

CF-PEAQTRL-OH (**4**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{55}H_{70}N_{11}O_{18}^+$ [M+H]⁺: 1171.4822 gef.: 1171.4819.

CF-HAFTRF-OH (**6**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{58}H_{62}N_{11}O_{14}^+$ [M+H]⁺: 1135.4400 gef.: 1135.4408.

CF-DLQTSI-OH (**7**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{49}H_{60}N_7O_{18}^+$ [M+H]⁺: 1033.3917 gef.: 1033.3912.

Ac-EAQTRL-OH (**8**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{31}H_{55}N_{10}O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 759.3995
gef.: 759.3995.

Ac-EAQTRL-NH₂ (**88**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{31}H_{56}N_{11}O_{11}^+$ $[M+H]^+$:
758.4155 gef.: 758.4181.

Ac-EAQTRA-OH (**89**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{28}H_{49}N_{10}O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 717.3526
gef.: 717.3543.

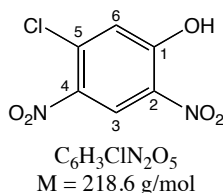
Ac-EAQTAL-OH (**90**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{28}H_{28}N_7O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 674.3355
gef.: 674.3376.

Ac-EAQARL-OH (**91**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{30}H_{53}N_{10}O_{11}^+$ $[M+H]^+$: 729.3890
gef.: 729.3915.

Ac-EAATRL-OH (**92**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{29}H_{52}N_9O_{11}^+$ $[M+H]^+$: 702.3781
gef.: 702.3796.

Ac-AAQTRL-OH (**93**): HR-ESI-MS: exakte Masse ber. für $C_{29}H_{53}N_{10}O_{10}^+$ $[M+H]^+$: 701.3941
gef.: 701.3948.

5-Chlor-2,4-dinitro-phenol (**29**)^[143]

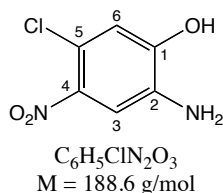


1, 5-Dichlor-2, 4-dinitro-benzol (**28**, 500 mg, 2.11 mmol) wird in 25% aq. Natriumacetat-Lösung (6 mL) suspendiert. Anschließend wird in der Mikrowelle für 60 min. auf 150 °C erhitzt. Die dadurch erhaltene kristalline Masse wird in warmem Wasser (50 mL) gelöst und filtriert. Das Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und für 2 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und einige Stunden im Vakuum getrocknet.

Graue Kristalle (424 mg, 92%). Schmp. = 87 °C. $R_f = 0.28$ ($CHCl_3/MeOH$, 9 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3255$ (w), 3102 (w), 3063 (w), 1575 (s), 1525 (s), 1311 (s), 1271 (s), 983 (s), 915 (m), 872 (w), 834 (s), 769 (s), 720 (m), 652 (ss), 626 (ss) cm^{-1} . – **¹H-NMR** (300 MHz; $DMSO-d_6$): $\delta = 8.74$ [s, 1 H, 3- H_{Ar}], 7.31 [s, 1 H, 6- H_{Ar}] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz; $DMSO-d_6$): $\delta = 156.1$ (C, C_{Ar-1}), 137.0 (C, C_{Ar-4}), 135.1 (C, C_{Ar-5}), 132.0 (C, C_{Ar-2}), 124.8 (CH, C_{Ar-3}),

121.5 (CH, C_{Ar}-6) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₆H₂ClN₂O₅⁻ + [M-H]⁻: 216.9658, gef.: 216.9652.

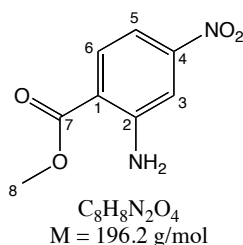
2-Amino-5-chlor-4-nitro-phenol (19)^[144]



29 (500 mg, 2.29 mmol) wird in Wasser (2.5 mL) gelöst. Dann wird 85% Natriumdithionit (1.5 g, 7.32 mmol) in kleinen Portionen zugegeben und anschließend 3 h bei 45 °C gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch für 5 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Das rot-braune Präzipitat wird abfiltriert und einige Stunden im Vakuum getrocknet.

Rot-brauner Feststoff (264 mg, 61%). Schmp. = 155 °C (Zersetzung). *R_f* = 0.34 (EE/*n*-Hexan, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3354 (w), 1520 (s), 1328 (s), 1278 (s), 1223 (s), 1191 (s), 1131 (m), 1042 (m), 999 (m), 943 (m), 893 (m), 873 (m), 753 (m), 725 (m), 674 (m), 620 (s) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 7.33 [s, 1 H, 3-H_{Ar}], 6.76 [s, 1 H, 6-H_{Ar}] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 150.4 (C, C_{Ar}-1), 137.9 (C, C_{Ar}-4), 137.2 (C, C_{Ar}-2), 115.3 (CH, C_{Ar}-6), 113.6 (C, C_{Ar}-5), 109.4 (CH, C_{Ar}-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₆H₆ClN₂O₃⁺ [M+H]⁺: 189.0061, gef.: 189.0060.

2-Amino-4-nitro-benzoesäure-methylester (20)



Eine Lösung aus 2-Amino-4-nitrobenzoesäure (**30**, 2.00 g, 10.98 mmol) und konz. Schwefelsäure (1 mL) in Methanol (20 mL) wird 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend werden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und vorsichtig mit gesättigter aq. NaHCO₃-Lösung (50

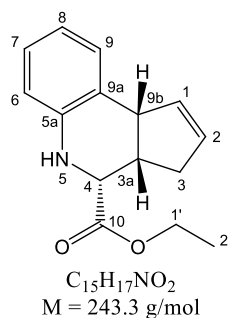
mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na_2SO_4) und ergibt nach dem Einengen bis zur Trockne das reine Produkt.

Orangefarbener Feststoff (1.84 g, 85%). Schmp. = 156 °C. $R_f = 0.65$ (*n*-Hexan/EE, 3 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3378$ (m), 2952 (w), 1699 (s), 1584 (s), 1508 (s), 1345 (s), 1246 (ss), 1084 (s), 896 (m), 821 (s), 808 (m), 779 (m), 730 (ss), 683 (m) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.91$ [d, $^3J_{6,5} = 8.8$ Hz, 1 H, 6- H_{Ar}], 7.66 [d, $^4J_{3,5} = 2.4$ Hz, 1 H, 3- H_{Ar}], 7.25 [dd, $^3J_{5,6} = 8.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 2.4$ Hz, 1 H, 5- H_{Ar}], 7.12 [bs, 2 H, NH_2], 3.84 [s, 3 H, 8-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 166.5$ (C, C-7), 151.4 (C, $\text{C}_{\text{Ar-4}}$), 150.8 (C, $\text{C}_{\text{Ar-2}}$), 132.5 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-6}}$), 113.1 (C, $\text{C}_{\text{Ar-1}}$), 110.8 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-3}}$), 108.0 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-5}}$), 51.9 (CH_3 , C-8) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 197.0557, gef.: 197.0551.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von 3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopentyl[c]chinolin-4-carbonsäureethylestern (17, 24 - 33) and 6,6a,7,11b-Tetrahydro-5H-indeno[2,1-c]chinolin-6-carbonsäureethylester (23)

Zu einer Lösung des Anilinderivats (**17**, **19** – **27**, 2.15 mmol) in trockenem MeCN (2 mL) mit Molekularsieb (4 Å, 500 mg) wird eine 50 %ige Ethylglyoxylat-Lösung in Toluol (**12**, 426 μL , 2.15 mmol) gegeben. Zu dem Reaktionsgemisch wird frisch destilliertes Cyclopentadien (**14**, 178 μL , 3.22 mmol) – im Falle von **42** Inden (**46**, 376 μL , 3.22 mmol) – und eine Lösung aus $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (64 mg, 0.11 mmol) in trockenem MeCN (0.5 mL) gegeben. Anschließend wird für 6 h unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Molekularsieb abfiltriert und mit EE gewaschen (15 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter aq. NaHCO_3 -Lösung (2×20 mL) gewaschen. Dann werden die wässrigen Phasen mit EE extrahiert (2×20 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na_2SO_4) und anschließend bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (18)

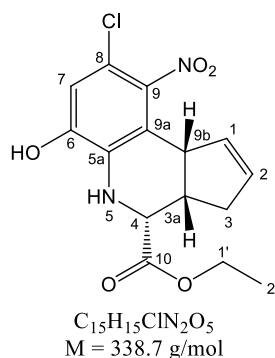


Anilinderivat: Anilin (**17**, 196 μ L). Säulenchromatographie: Eluent: n-Hexan / Ethylacetat = 5:1.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 254 mg (48 %), Schmp. 66°C, R_f = 0.77 (n-Hexan / EE, 3 : 1).

– **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3379 (m), 3050 (w), 2983 (w), 2940 (w), 2921 (w), 2904 (w), 2847 (w), 1739 (m), 1716 (s), 1600 (m), 1499 (m), 1478 (m), 1287 (s), 1223 (s), 1189 (m), 1164 (s), 1114 (m), 1034 (s), 962 (w), 932 (w), 912 (w), 893 (w), 870 (w), 855 (w), 842 (w), 801 (w), 750 (s), 720 (m), 687 (m), 647 (w) cm^{-1} . – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.95 [d, $^3J_{9,8}$ = 7.4 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.86 [dd, $^3J_{7,6}$ = 7.8 Hz, $^3J_{7,8}$ = 7.3 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.76 [d, $^3J_{6,7}$ = 7.8 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 6.58 [dd, $^3J_{8,9}$ = 7.4 Hz, $^3J_{8,7}$ = 7.3 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.77 [dd, $^3J_{1,2}$ = 4.9 Hz, J = 2.3 Hz 1 H, 1-H], 5.60 [bd, $^3J_{2,1}$ = 4.9 Hz, 1 H, 2-H], 5.35 [s, 1 H, 5-H], 4.28 – 4.09 [m, 2 H, 1'-H], 4.04 [d, $^3J_{4,3a}$ = 3.5 Hz, 1 H, 4-H], 4.01 [d, J = 9.8 Hz, 1 H, 9b-H], 3.14 [m, 1 H, 3a-H], 2.35 [dd, $^2J_{\text{gem}}$ = 16.0 Hz, 3J = 8.7 Hz, 3J = 1.9 Hz, 1 H, 3-H_A], 2.18 [dd, $^2J_{\text{gem}}$ = 16.0 Hz, 3J = 8.9 Hz, 1 H, 3-H_B], 1.24 [t, $^3J_{2',1'}$ = 7.2 Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.4 (C, C-10), 144.5 (C, C_{Ar}-5a), 134.8 (CH, C-1), 128.9 (CH, C-2), 128.2 (CH, C_{Ar}-9), 125.8 (CH, C_{Ar}-7), 124.7 (C, C_{Ar}-9a), 117.8 (CH, C_{Ar}-8), 115.5 (CH, C_{Ar}-6), 60.3 (CH₂, C-1'), 55.4 (CH, C-4), 45.3 (CH, C-9b), 40.4 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₈NO₂ [M + H]⁺: 244.1332; gef.: 244.1329.

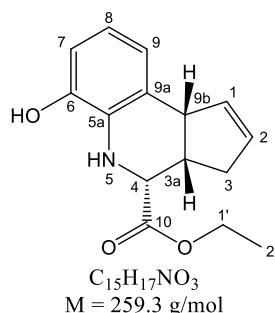
8-Chlor-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (31)



Anilinderivat: 2-Amino-5-chlor-4-nitrophenol (**19**, 405 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 2:1.

gelber Feststoff, Ausbeute: 99 mg (14 %), Schmp. = 179 °C (Zersetzung). $R_f = 0.52$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3387$ (m), 3291 (w), 2980 (w), 2926 (w), 2850 (w), 1702 (s), 1523 (s), 1367 (s), 1233 (s), 1214 (ss), 862 (w), 837 (m), 800 (w), 751 (w), 713 (m), 623 (m) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 6.72$ [s, 1 H, 7- H_{Ar}], 5.73 [bd, $^3J_{1,2} = 5.4$ Hz, 1 H, 1-H], 5.39 [dd, $^3J_{2,1} = 5.4$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 2-H], 5.07 [s, 1 H, 5-H], 4.23 – 4.07 [m, 4 H, 1'-H, 4-H, 9b-H], 3.24 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.20 [m, 2 H, 3-H], 1.21 [t, $^3J_{2,1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.8$ (C, C-10), 146.6 (C, $\text{C}_{\text{Ar-6}}$), 141.2 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9}}$), 133.6 (C, $\text{C}_{\text{Ar-5a}}$), 132.2 (CH, C-1), 130.6 (CH, C-2), 118.0 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9a}}$), 112.2 (C, $\text{C}_{\text{Ar-8}}$), 111.5 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-7}}$), 60.8 (CH_2 , C-1'), 54.5 (CH, C-4), 42.5 (CH, C-9b), 39.9 (CH, C-3a), 32.3 (CH_2 , C-3), 14.0 (CH_3 , C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_5^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 339.0742; gef.: 339.0742.

6-Hydroxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**32**)

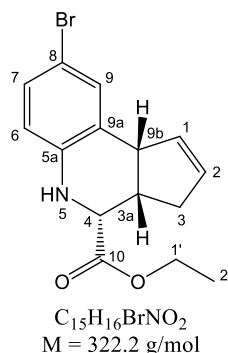


Anilinderivat: 2-Aminophenol (**24**, 117 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 5:1.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 208 mg (76 %), Schmp. = 110°C, $R_f = 0.59$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3385$ (m), 3058 (w), 3041 (w), 2983 (w), 2921 (w), 2885 (w), 2852 (w), 2360 (w), 2342 (w), 1710 (s), 1592 (m), 1510 (m), 1485 (m), 1376 (m), 1354 (m), 1259 (m), 1225 (s), 1199 (s), 1149 (s), 1025 (m), 801 (w), 746 (s), 724 (s), 669 (w), 625 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.37$ [s, 1H, OH], 6.52 – 6.43 [m, 3 H, 7- H_{Ar} , 8- H_{Ar} und 9- H_{Ar}], 5.74 [dd, $^3J_{1,2} = 4.9$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, 1 H, 1-H], 5.59 [bd, $^3J_{2,1} = 4.9$ Hz, 1 H, 2-H], 4.49 [s, 1 H, 5-H], 4.30 – 4.10 [m, 2 H, 1'-H], 4.02 – 3.99 [m, 2 H, 4-H, 9b-H], 3.17 [m, 1 H, 3a-H], 2.37 – 2.17 [m, 2 H, 3-H], 1.24 [t, $^3J_{2,1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.4$ (C, C-10), 144.1 (C, $\text{C}_{\text{Ar-6}}$), 134.7 (CH, C-1), 132.6 (C, $\text{C}_{\text{Ar-5a}}$), 128.9 (CH, C-2), 125.6 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9a}}$), 118.9 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-9}}$), 117.7 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-8}}$), 111.1 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-7}}$), 60.4

(CH₂, C-1'), 55.5 (CH, C-4), 45.6 (CH, C-9b), 40.2 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₈NO₃ [M + H]⁺: 260.1281; gef.: 260.1279.

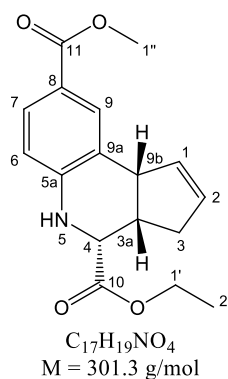
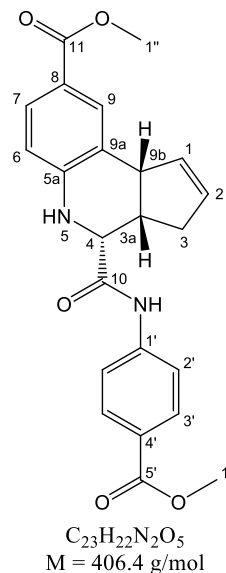
8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (33)



Anilinderivat: 4-Bromphenylamin (**21**, 370 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 3:1.

Grüner Feststoff, Ausbeute: 469 mg (68 %), Schmp. = 104°C, *R*_f = 0.78 (*n*-Hexan/EE, 1 : 1).

– **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3384 (m), 3056 (w), 2995 (w), 2979 (w), 2925 (w), 2851 (w), 2826 (w), 1720 (s), 1489 (s), 1289 (m), 1213 (s), 1162(m), 1033 (m), 878 (w), 815 (s), 787 (w), 758 (w), 710 (m), 693 (w), 629 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.14 [d, ⁴*J*_{9,7} = 2.2 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.00 [dd, ³*J*_{7,6} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{7,9} = 2.2 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.74 [d, ³*J*_{6,7} = 8.6 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.80 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.2 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1 H, 1-H], 5.65 [s, 1 H, 5-H], 5.62 [bd, ³*J*_{1,2} = 5.2 Hz, 1 H, 2-H], 4.27 – 4.09 [m, 2 H, 1'-H], 4.04 – 3.97 [m, 2 H, 4-H, 9b-H], 3.11 [m, 1 H, 3a-H], 2.35 – 2.13 [m, 2 H, 3-H], 1.22 [t, ³*J*_{2',1'} = 7.1 Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.1 (C, C-10), 143.9 (C, C_{Ar}-5a), 134.4 (CH, C-1), 130.5 (CH, C_{Ar}-9), 129.3 (CH, C-2), 128.4 (CH, C_{Ar}-7), 127.1 (C, C_{Ar}-9b), 117.4 (CH, C_{Ar}-6), 108.5 (C, C_{Ar}-8), 60.4 (CH₂, C-1'), 55.0 (CH, C-4), 45.1 (CH, C-9b), 40.0 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₇BrNO₂ [M + H]⁺: 322.0437; gef.: 322.0433.

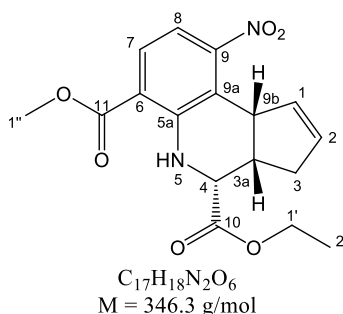
3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4,8-dicarbonsäure-4-ethyl-8-methylester (34) und
4-(4-Methoxycarbonyl-phenylcarbamoyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-8-carbonsäure-methylester (60)

34

60

Anilinderivat: 4-Aminobenzoesäure-methylester (**22**, 325 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 1:1.

34: Farbloser Feststoff, Ausbeute: 346 mg (54 %), Schmp. = 114°C (Zersetzung), $R_f = 0.77$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3374$ (m), 3052 (w), 2983 (w), 2948 (w), 2921 (w), 2902 (w), 2845 (w), 1742 (s), 1685 (s), 1603 (s), 1513 (m), 1435 (m), 1330 (m), 1290 (m), 1270 (s), 1213 (s), 1193 (s), 1135 (s), 1039 (m), 842 (m), 802 (w), 772 (s), 728 (m), 702 (s), 639 (w), 614 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.57$ [d, $^4J_{9,7} = 2.3 \text{ Hz}$, 1 H, 9- H_{Ar}], 7.49 [dd, $^3J_{7,6} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{7,9} = 2.3 \text{ Hz}$, 1 H, 7- H_{Ar}], 6.82 [d, $^3J_{6,7} = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 6- H_{Ar}], 6.31 [s, 1 H, 5-H], 5.84 [dd, $^3J_{1,2} = 5.4 \text{ Hz}$, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1 H, 1-H], 5.62 [bd, $^3J_{2,1} = 5.4 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H], 4.25 – 4.12 [m, 3 H, 1'-H, 4-H], 4.78 [bd, $^3J_{9b,3a} = 8.7 \text{ Hz}$, 1 H, 9b-H], 3.75 [s, 3 H, 1''-H], 3.13 [m, 1 H, 3a-H], 2.34 – 2.15 [m, 2 H, 3-H], 1.23 [t, $^3J_{2,1'} = 7.1 \text{ Hz}$, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.0$ (C, C-10), 166.1 (C, C-11), 149.1 (C, C_{Ar} -8), 134.7 (CH, C-1), 130.1 (CH, C_{Ar} -9), 129.2 (CH, C-2), 127.6 (CH, C_{Ar} -7), 123.5 (C, C_{Ar} -5a), 117.9 (C, C_{Ar} -9a), 114.7 (CH, C_{Ar} -6), 60.5 (CH_2 , C-1'), 54.3 (CH, C-4), 51.2 (CH_3 , C-1''), 44.6 (CH, C-9b), 40.1 (CH, C-3a), 32.0 (CH_2 , C-3), 14.0 (CH_3 , C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $C_{17}H_{20}NO_4$ [$M + H$] $^+$: 302.1387; gef.: 302.1384.

43: Grauer Feststoff, Ausbeute 96 mg (11 %), Schmp. = 244 °C (Zersetzung). $R_f = 0.58$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu} = 3373$ (w), 3299 (w), 3051 (w), 2946 (w), 1700 (ss), 1672 (s), 1605 (s), 1596 (s), 1533 (s), 1510 (s), 1433 (s), 1282 (ss), 1259 (s), 1180 (s), 852 (m), 837 (m), 769 (ss), 728 (w), 704 (s), 694 (s), 648 (m), 613 (m) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.04$ [d, $^3J_{3',2'} = 8.5$ Hz, 1 H, 3'-H_{Ar}], 7.75 [bs, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.71 [dd, $^3J_{7,6} = 8.3$ Hz, $^4J_{7,9} = 1.3$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 7.65 [d, $^3J_{2',3'} = 8.5$ Hz, 1 H, 2'-H_{Ar}], 6.71 [d, $^3J_{6,7} = 8.3$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.94 [bs, 1 H, 1-H], 5.70 [d, $^3J_{2,1} = 5.1$ Hz, 1 H, 2-H], 4.28 [d, $^3J_{4,3a} = 3.3$ Hz, 1 H, 4-H], 4.09 [bd, $^3J_{9b,3a} = 8.9$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.91 und 3.87 [$2 \times$ s, $2 \times$ 3 H, 1''-H und 1'''-H], 3.24 [m, 1 H, 3a-H], 2.54 [m, 1 H, 3-H_A], 2.32 [m, 1 H, 3-H_B] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 170.1$ (C, C-10), 166.2 (C, C-5'), 165.7 (C, C-11), 149.3 (C, C_{Ar}-5a), 143.1 (C, C_{Ar}-1'), 134.4 (CH, C-1), 130.1 ($2 \times$ CH, C_{Ar}-9 und C_{Ar}-3'), 129.5 (CH, C-2), 127.7 (CH, C_{Ar}-7), 124.1 (C, C_{Ar}-4'), 123.5 (C, C_{Ar}-8), 118.8 (CH, C_{Ar}-2'), 117.8 (C, C_{Ar}-9a), 114.7 (CH, C_{Ar}-6), 56.1 (CH, C-4), 51.8 und 51.2 ($2 \times$ CH₃, C-1'' und C-1'''), 44.7 (CH, C-9b), 40.9 (CH, C-3a), 31.4 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS:** exakte Masse ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺: 407.1601; gef.: 407.1595.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-9-nitro-3H-cyclopenta[*c*]quinoline-4,6-dicarbonsäure-4-ethyl-6-methyl-ester (36)



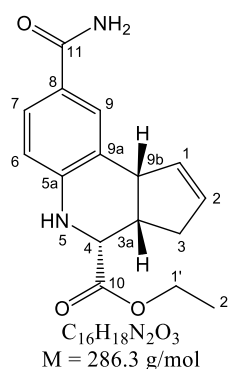
Anilinderivat: 2-Amino-4-nitrobenzoesäuremethylester (**20**, 211 mg).

Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 3:1.

Orangefarbenes Öl, Ausbeute: 202 mg (62 %), $R_f = 0.77$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu} = 3345$ (w), 2955 (w), 2926 (w), 2850 (w), 1733 (s), 1682 (s), 1526 (ss), 1263 (s), 1217 (ss), 1194 (s), 1169 (s), 1142 (s), 865 (w), 816 (m), 784 (m), 738 (m), 704 (m) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.83$ [d, $^3J_{7,8} = 8.7$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 7.06 [d, $^3J_{8,7} = 8.7$ Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.73 [bd, $^3J_{2,1} = 5.4$ Hz, 1 H, 2-H], 5.41 [dd, $^3J_{1,2} = 5.4$ Hz, $^3J_{1,9b} = 2.3$ Hz, 1 H, 1-H], 4.75 [dd, $^3J_{9b,3a} = 9.1$ Hz, $^3J_{9b,1} = 2.3$ Hz, 1 H, 9b-H], 4.36 [d, $^3J_{4,3a} = 3.8$ Hz, 1 H, 4-H], 4.30 – 4.15 [m, 2 H, 1'-H], 3.85 [s, 3 H, 1''-H], 3.32 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.19 [m, 2 H, 3-H], 1.25 [t, $^3J_{2,1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 170.3$ (C, C-10),

166.6 (C, C-11), 152.4 (C, C_{Ar}-9), 148.8 (C, C_{Ar}-5a), 132.1 (CH, C-1), 130.8 (CH, C-2), 129.9 (CH, C_{Ar}-7), 118.9 (C, C_{Ar}-9a), 113.3 (C, C_{Ar}-6), 110.7 (CH, C_{Ar}-8), 61.1 (CH₂, C-1'), 53.7 (CH, C-4), 52.2 (CH₃, C-1''), 42.3 (CH, C-9b), 39.2 (CH, C-3a), 32.3 (CH₂, C-3), 13.9 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₇H₁₉N₂O₆⁺ [M + H]⁺: 348.1269; gef.: 348.1272.

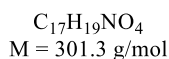
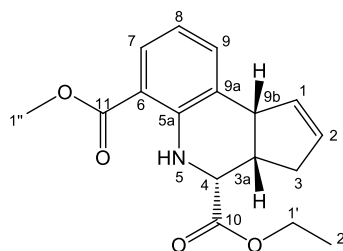
8-Carbamoyl-3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (37)



Anilinderivat: 4-Aminobenzamid (**23**, 293 mg). Säulenchromatographie: Eluent: CHCl₃ / EtOH = 10:1.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 495 mg (81 %), Schmp. = 196°C, *R_f* = 0.71 (CHCl₃/EtOH = 10:1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3389 (m), 3348 (m), 3186 (m), 2977 (w), 2923 (w), 2885 (w), 2850 (w), 1718 (s), 1636 (s), 1606 (s), 1515 (m), 1473 (m), 1395 (s), 1287 (m), 1225 (s), 1037 (m), 832 (m), 802 (w), 768 (w), 739 (w), 706 (m), 617 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.56 [s, 1 H, NH₂], 7.53 [bs, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.42 [dd, ³*J*_{7,6} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{7,9} = 1.8 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.90 [s, 1 H, NH₂], 6.76 [d, ³*J*_{6,7} = 8.4 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.93 [s, 1 H, 5-H], 5.84 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.3 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, 1-H], 5.62 [bd, ³*J*_{1,2} = 5.3 Hz, 1 H, 2-H], 4.29 – 4.10 [m, 3 H, 1'-H, 4-H], 4.02 [bd, ³*J*_{9b,3a} = 8.8 Hz, 1 H, 9b-H], 3.13 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.15 [m, 2 H, 3-H], 1.24 [t, ³*J*_{2,1'} = 7.1 Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.2 (C, C-10), 167.8 (C, C-11), 147.3 (C, C_{Ar}-9b), 134.7 (CH, C-1), 129.0 (CH, C-2), 128.3 (CH, C_{Ar}-9), 125.7 (CH, C_{Ar}-7), 123.3 (C, C_{Ar}-8), 123.1 (C, C_{Ar}-9a), 114.5 (CH, C_{Ar}-6), 60.4 (CH₂, C-1'), 54.7 (CH, C-4), 44.9 (CH, C-9b), 40.2 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₆H₁₉N₂O₃⁺ [M + H]⁺: 287.1390; gef.: 287.1389.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-4,6-dicarbonsäure-4-ethyl-6-methylester (38)

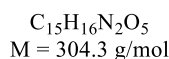
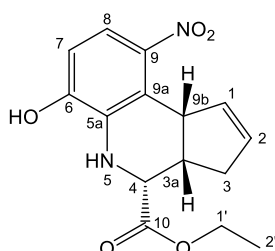


Anilinderivat: 2-Aminobenzoesäure-methylester (**25**, 664 µL). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 3:1.

farbloser Feststoff, Ausbeute: 93 mg (14 %), Schmp. = 91°C, *R*_f = 0.52 (*n*-Hexan/EE, 3 : 1). –

ATR-IR: $\tilde{\nu}$ = 3343 (m), 3080 (w), 3045 (w), 3001 (w), 2986 (w), 2951 (w), 2931 (w), 2891 (w), 2841 (w), 1724 (s), 1685 (s), 1493 (m), 1427 (m), 1255 (s), 1214 (s), 1182 (s), 1151 (m), 1133 (s), 1044 (m), 1022 (m), 850 (w), 840 (w), 821 (w), 748 (s), 732 (w), 714 (m), 695 (w), 639 (w), 617 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.82 [s, 1 H, 5-H], 7.61 [d, ³*J*_{7,8} = 7.8 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 7.25 [d, ³*J*_{9,8} = 7.3 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.63 [dd, ³*J*_{8,7} = 7.8 Hz, ³*J*_{8,9} = 7.3 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.76 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.3 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1 H, 1-H], 5.62 [bd, ³*J*_{2,1} = 5.3 Hz, 1 H, 2-H], 4.32 – 4.09 [m, 4 H, 1'-H, 4-H, 9b-H], 3.80 [s, 3 H, 1''-H], 3.23 [m, 1 H, 3a-H], 2.26 [bd, ³*J*_{3,3a} = 8.7 Hz, 2 H, 3-H], 1.25 [t, ³*J*_{2,1'} = 7.2 Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.8 (C, C-10), 167.6 (C, C-11), 147.3 (C, C_{Ar}-5a), 134.9 (CH, C-1), 133.8 (CH, C_{Ar}-9), 129.2 (CH, C-2), 128.2 (CH, C_{Ar}-7), 126.5 (C, C_{Ar}-9a), 116.2 (CH, C_{Ar}-8), 110.7 (C, C_{Ar}-6), 60.8 (CH₂, C-1'), 54.4 (CH, C-4), 51.5 (CH₃, C-1''), 45.3 (CH, C-9b), 39.5 (CH, C-3a), 32.3 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS:** exakte Masse ber. für C₁₅H₁₈NO₂ [M + H]⁺: 302.1387; gef.: 302.1387.

6-Hydroxy-9-nitro-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (39)



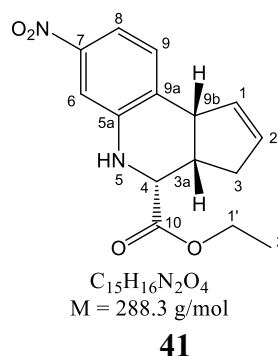
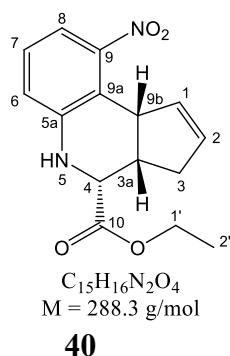
Anilinderivat: 2-Amino-4-nitrophenol (**26**, 166 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 3:1 → 2:1.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 144 mg (44 %), Schmp. = 173 °C, $R_f = 0.59$ (*n*-Hexan/EE, 1 : 1).

– **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3401$ (m), 3184 (w), 2983 (w), 2934 (w), 2869 (w), 2852 (w), 1703 (s), 1584 (m), 1515 (s), 1490 (m), 1324 (m), 1295 (m), 1284 (m), 1230 (s), 1182 (m), 1157 (m), 1017 (m), 983 (m), 865 (w), 816 (m), 769 (w), 743 (m), 727 (m), 705 (w), 683 (w), 619 (w), 476 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.1$ [s, 1 H, OH], 7.36 [d, $^3J_{8,7} = 8.8$ Hz, 1 H, 8- H_{Ar}], 6.70 [d, $^3J_{7,8} = 8.8$ Hz, 1 H, 7- H_{Ar}], 5.78 [bd, $^3J_{2,1} = 5.3$ Hz, 1 H, 2-H], 5.47 [dd, $^3J_{1,2} = 5.3$ Hz, $^3J_{1,9b} = 2.2$ Hz, 1 H, 1-H], 4.97 [s, 1 H, 5-H], 4.75 [dd, $^3J_{9b,3a} = 9.1$ Hz, $^3J_{9b,1} = 2.2$ Hz, 1 H, 9b-H], 4.29 – 4.14 [m, 2 H, 1'-H], 4.12 [d, $^3J_{4,3a} = 3.7$ Hz, 1 H, 4-H], 3.26 [m, 1 H, 3a-H], 2.39 – 2.21 [m, 2 H, 3-H], 1.24 [t, $^3J_{2,1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.0$ (C, C-10), 149.3 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9}}$), 140.6 (C, $\text{C}_{\text{Ar-6}}$), 134.2 (C, $\text{C}_{\text{Ar-5a}}$), 132.0 (CH, C-1), 131.1 (CH, C-2), 120.1 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9a}}$), 116.4 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-8}}$), 116.2 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-7}}$), 60.7 (CH_2 , C-1'), 54.3 (CH, C-4), 43.6 (CH, C-9b), 39.8 (CH, C-3a), 32.4 (CH_2 , C-3), 14.0 (CH_3 , C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 305.1132; gef.: 305.1133.

9-Nitro-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (40)
und

7-Nitro-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (41)



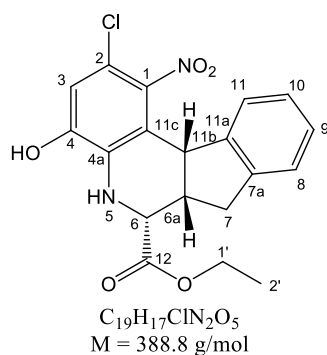
Anilinderivat: 3-Nitrophenylamin (**27**, 297 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 3:1.

40: Brauner Feststoff, Ausbeute: 285 mg (46 %), Schmp. = 80°C, $R_f = 0.52$ (*n*-Hexan/EE, 3 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3382$ (m), 3076 (w), 3057 (w), 3014 (w), 2977 (w), 2941 (w), 2852 (w), 1712 (s), 1522 (s), 1492 (m), 1468 (m), 1344 (m), 1328 (m), 1292 (s), 1228 (s), 1034 (m), 864 (w), 834 (w), 815 (m), 792 (m), 738 (m), 724 (m), 703 (s), 640 (w), 608 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.17$ – 7.10 [m, 3 H, 6- H_{Ar} , 7- H_{Ar} , 8- H_{Ar}], 6.24 [s, 1 H, 5-H], 5.70

[bd, $^3J_{2,1} = 5.4$ Hz, 1 H, 2-H], 5.44 [dd, $^3J_{1,2} = 5.4$ Hz, $^3J_{1,9b} = 2.4$ Hz, 1 H, 1-H], 4.55 [dd, $^3J_{9b,3a} = 8.9$ Hz, $^3J_{9b,1} = 2.4$ Hz, 1 H, 9b-H], 4.26 – 4.12 [m, 3 H, 1'-H, 4-H], 3.22 [m, 1 H, 3a-H], 2.39 – 2.18 [m, 2 H, 3-H], 1.23 [t, $^3J_{2',1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.8$ (C, C-10), 149.7 (C, C_{Ar}-9), 146.8 (C, C_{Ar}-5a), 131.5 und 131.3 (2 × CH, C-1 und C-2), 126.7 (CH, C_{Ar}-7), 120.1 (C, C_{Ar}-9a), 117.3 (CH, C_{Ar}-6), 113.2 (CH, C_{Ar}-8), 60.6 (CH₂, C-1'), 54.2 (CH, C-4), 42.4 (CH, C-9b), 40.1 (CH, C-3a), 32.1 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₇N₂O₄ [M + H]⁺: 289.1183; gef.: 289.1182.

41: Gelber Feststoff, Ausbeute: 73 mg (12 %), Schmp. = 178 °C, $R_f = 0.61$ (*n*-Hexan/EE, 3 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3373$ (m), 3077 (w), 3059 (w), 2989 (w), 2922 (w), 2899 (w), 2847 (w), 1711 (s), 1525 (s), 1478 (m), 1338 (s), 1314 (m), 1293 (s), 1251 (m), 1222 (s), 1164 (m), 1035 (s), 882 (m), 854 (w), 834 (w), 824 (w), 767 (m), 736 (s), 722 (m), 697 (w), 638 (w), 605 (m) cm⁻¹. – $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.70$ [d, $^4J_{6,8} = 2.3$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 7.40 [dd, $^3J_{8,9} = 8.4$ Hz, $^4J_{8,6} = 2.3$ Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 7.23 [d, $^3J_{9,8} = 8.4$ Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.29 [s, 1 H, 5-H], 5.81 [dd, $^3J_{1,2} = 5.3$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 1-H], 5.66 [bd, $^3J_{2,1} = 5.3$ Hz, 1 H, 2-H], 4.28 – 4.10 [m, 4 H, 1'-H, 4-H, 9b-H], 3.18 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.19 [m, 2 H, 3-H], 1.24 [t, $^3J_{2',1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.8$ (C, C-10), 146.0 (C, C_{Ar}-7), 145.6 (C, C_{Ar}-5a), 133.7 (CH, C-1), 132.1 (C, C_{Ar}-9a), 129.9 (CH, C-2), 129.3 (CH, C_{Ar}-9), 111.8 (CH, C_{Ar}-8), 109.4 (CH, C_{Ar}-6), 60.6 (CH₂, C-1'), 54.7 (CH, C-4), 45.4 (CH, C-9b), 39.9 (CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3), 14.0 (CH₃, C-2') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₇N₂O₄ [M + H]⁺: 289.1183; gef.: 289.1183.

2-Chloro-4-hydroxy-1-nitro-5,6a,7,11b-tetrahydro-6H-indeno[2,1-c]chinolin-6-ethylester (42)

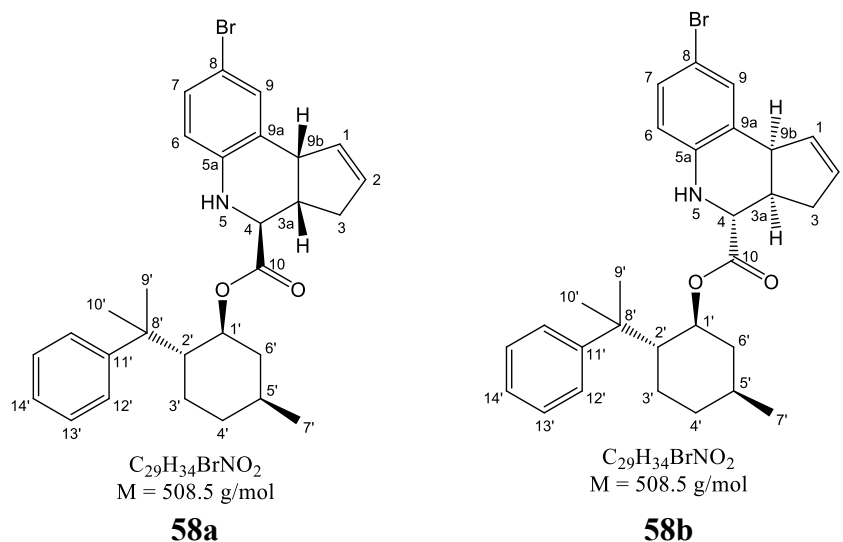


Anilinderivat: 2-Amino-5-chlor-4-nitrophenol (**19**, 405 mg). Säulenchromatographie: Eluent: *n*-Hexan / Ethylacetat = 2:1 → 1:1.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 372 mg (45 %), Schmp. = 222 °C (Zersetzung), $R_f = 0.77$ (EE/n-Hexan, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3302$ (w), 3285 (w), 2984 (w), 2940 (w), 1710 (s), 1520 (s), 1504 (s), 1218 (ss), 852 (m), 798 (m), 783 (m), 752 (s), 735 (m), 611 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.00$ [s, 1 H, OH], 7.17 [d, $^3J_{11,10} = 7.0$ Hz, 1 H, 11- H_{Ar}], 7.11 [dd, $^3J_{10,11} = 7.0$ Hz, $^3J_{10,9} = 7.8$ Hz, 1 H, 10- H_{Ar}], 7.05 [ddd, $^3J_{9,8} = 7.4$ Hz, $^3J_{9,10} = 7.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1 H, 9- H_{Ar}], 6.90 [d, $^3J_{8,9} = 7.4$ Hz, 1 H, 8- H_{Ar}], 6.77 [s, 1 H, 3- H_{Ar}], 5.65 [bs, 1 H, 5-H], 4.71 [d, $^3J_{11b,6a} = 7.3$ Hz, 1 H, 11b-H], 4.07 [d, $^3J_{6,6a} = 4.9$ Hz, $^3J_{6,5} = 1.8$ Hz, 1 H, 6-H], 3.69 [q, $^3J_{1',2'} = 7.1$ Hz, 2 H, 1'-H], 3.25 [m, 1 H, 6a-H], 3.09 – 2.94 [m, 2 H, 7-H], 1.07 [t, $^3J_{2',1'} = 7.1$ Hz, 3 H, 2'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 170.9$ (C, C-12), 146.4 (C, $\text{C}_{\text{Ar-4}}$), 143.0 und 141.7 ($2 \times$ C, $\text{C}_{\text{Ar-7a}}$ und $\text{C}_{\text{Ar-11b}}$), 141.4 (C, $\text{C}_{\text{Ar-1}}$), 133.8 (C, $\text{C}_{\text{Ar-4a}}$), 126.9 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-10}}$), 126.2 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-9}}$), 124.8 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-11}}$), 123.9 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-8}}$), 115.0 (C, $\text{C}_{\text{Ar-11c}}$), 112.1 (C, $\text{C}_{\text{Ar-2}}$), 111.8 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-3}}$), 60.4 (CH_2 , C-1'), 53.7 (CH, C-6), 41.8 (CH, C-11b), 40.7 (CH, C-6a), 32.9 (CH_2 , C-7), 13.7 (CH_3 , C-2') ppm. **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}_5^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 389.0899; gef.: 389.0906.

Umesterung des 8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäureethylester (33)

(3aS,4S,9bR)-8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure (1S,2R,5S)-5-methyl-2-(1-methyl-1-phenyl-ethyl)-cyclohexyl ester (58a) und **(3aR,4R,9bS)-8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure (1S,2R,5S)-5-methyl-2-(1-methyl-1-phenyl-ethyl)-cyclohexyl ester (58b)**



Zu einer Lösung aus 8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäureethylester (**33**; 231 mg, 0.72 mmol) und (–)-8-Phenylmenthol (**56**) in Toluol (20 mL) wird NaH 60 %ig in Öl (29 mg, 0.72 mmol) gegeben und anschließend drei Stunden am Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit gesättigter aq. NaCl-Lösung gewaschen (2×20 mL),

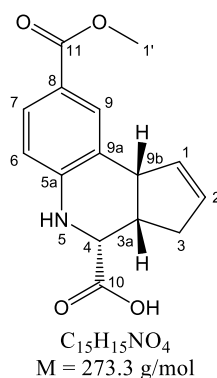
getrocknet (Na₂SO₄) und säulenchromatographisch (n-Hexan / Toluol = 7 : 3 → 100 % Toluol) gereinigt.

58a: Farbloses Öl, Ausbeute: 157 mg (43 %), $R_f = 0.42$ (Toluol). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu} = 3381$ (w), 3052 (w), 2952 (m), 2921 (m), 2849 (w), 1721 (s), 1487 (s), 1266 (m), 1210 (s), 1127 (m), 810 (s), 764 (s), 700 (ss) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.31 - 7.24$ [m, 4 H, 12'-H_{Ar}, 13'-H_{Ar}], 7.09 [dd, ³ $J_{14',13'} = ^3J_{14',15'} = 6.6$ Hz, 1 H, 14'-H_{Ar}], 7.04 [d, ⁴ $J_{9,7} = 2.4$ Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.98 [dd, ³ $J_{7,6} = 8.5$ Hz, ⁴ $J_{7,9} = 2.4$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.61 [d, ³ $J_{6,7} = 8.5$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.83 [d, ³ $J_{5,4} = 2.7$ Hz, 1 H, 5-H], 5.78 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 1-H], 5.60 [bd, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, 1 H, 2-H], 4.67 [ddd, ³ $J_{1',2'} = 10.7$ Hz, ³ $J = 10.7$ Hz, ³ $J = 3.8$ Hz, 1 H, 1'-H], 3.52 [bd, ³ $J_{9b,3a} = 8.5$ Hz, 1 H, 9b-H], 2.82 [dd, ³ $J_{4,3a} = 4.2$ Hz, ³ $J_{4,5} = 2.7$ Hz, 1 H, 4-H], 2.41 [m, 1 H, 3a-H], 2.31 – 2.05 [m, 3 H, 3-H, 2'-H], 1.69 [m, 1 H, 3'-H_A], 1.63 – 1.59 [m, 2 H, 4'-H_A, 6'-H_A], 1.22 [s, 3 H, 9'-H], 1.14 – 1.03 [m, 5 H, 3'-H_B, 5'-H, 10'-H], 0.98 – 0.86 [m, 2 H, 4'-H_B, 6'-H_B] 0.82 [d, ³ $J_{7',5'} = 6.4$ Hz, 3 H, 7'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.8$ (C, C-10), 151.5 (C, C_{Ar}-11'), 143.4 (C, C_{Ar}-5a), 134.2 (CH, C-1), 130.5 (CH, C_{Ar}-9), 129.3 (CH, C-2), 128.4 (CH, C_{Ar}-7), 127.7 (2 × CH, C_{Ar}-13'), 125.9 (C, C_{Ar}-9a), 125.1 (2 × CH, C_{Ar}-12'), 124.7 (CH, C_{Ar}-14'), 116.9 (CH, C_{Ar}-6), 107.7 (C, C_{Ar}-8), 74.1 (CH, C-1'), 54.5 (CH, C-4), 49.4 (CH, C-2'), 42.6 (CH, C-9b), 41.0 (CH₂, C-6'), 39.1 (CH, C-3a), 38.7 (C, C-8'), 35.6 (CH₂, C-3), 33.8 (CH₂, C-4'), 30.6 (CH, C-5'), 28.5 (CH₃, C-9'), 25.7 (CH₂, C-3'), 23.5 (CH₃, C-10'), 21.5 (CH₃, C-7') ppm. **HR-ESI-MS:** exakte Masse ber. für C₂₉H₃₅BrNO₂ [M + H]⁺: 508.1846; gef.: 508.1843.

58b: Farbloser Kristalle, Ausbeute: 167 mg (46 %), Schmp. = 168 °C, $R_f = 0.55$ (Toluol). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu} = 3371$ (m), 3049 (w), 2947 (m), 2918 (w), 2864 (w), 1717 (s), 1483 (s), 1260 (s), 1224 (s), 1208 (s), 820 (s), 796 (w), 769 (s), 718 (s), 703 (ss), 664 (w), 612 (s) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.29 - 7.25$ [m, 4 H, 12'-H_{Ar}, 13'-H_{Ar}], 7.12 [m, 1 H, 14'-H_{Ar}], 6.98 [d, ⁴ $J_{9,7} = 2.3$ Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.97 [dd, ³ $J_{7,6} = 8.5$ Hz, ⁴ $J_{7,9} = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.47 [d, ³ $J_{6,7} = 8.5$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.77 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 1-H], 5.60 [bd, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 2-H], 5.05 [d, ³ $J_{5,4} = 2.7$ Hz, 1 H, 5-H], 4.64 [ddd, ³ $J_{1',2'} = 10.6$ Hz, ³ $J = 10.6$ Hz, ³ $J = 4.1$ Hz, 1 H, 1'-H], 3.70 [bd, ³ $J = 8.5$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.02 [dd, ³ $J_{4,3a} = 4.2$ Hz, ³ $J_{4,5} = 2.7$ Hz, 1 H, 4-H], 2.68 [m, 1 H, 3a-H], 2.46 [m, 1 H, 3-H_A], 2.21 [m, 1 H, 3-H_B], 1.99 [ddd, ³ $J_{2',3'A} = 11.6$ Hz, ³ $J_{2',1'} = 10.6$ Hz, ³ $J_{2',3'B} = 2.8$ Hz, 1 H, 2'-H], 1.62 – 1.53 [m, 2 H, 3'-H_A, 4'-H_A], 1.47 [m, 1 H, 6'-H_A], 1.22 [s, 3 H, 9'-H], 1.13 [s, 3 H, 10'-H], 1.09 – 0.99 [m, 2 H, 3'-H_B, 5'-H], 0.85 – 0.68 [m, 5 H, 4'-H_B, 6'-H_B, 7'-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.3$ (C, C-10), 151.3 (C, C_{Ar}-11'), 143.1 (C, C_{Ar}-5a), 134.5 (CH, C-1), 130.5 (CH, C_{Ar}-9), 129.2 (CH, C-2), 128.3 (CH, C_{Ar}-7), 127.8 (2 × CH, C_{Ar}-13' und C_{Ar}-15'), 126.6

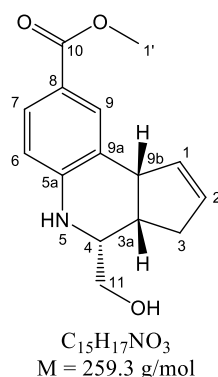
(C, C_{Ar}-9a), 125.2 (2 × CH, C_{Ar}-12' und C_{Ar}-16'), 124.9 (CH, C_{Ar}-14'), 117.0 (CH, C_{Ar}-6), 108.2 (C, C_{Ar}-8), 74.1 (CH, C-1'), 55.2 (CH, C-4), 49.3 (CH, C-2'), 42.9 (CH, C-9b), 40.8 (CH₂, C-6'), 39.3 (C, C-8'), 37.7 (CH, C-3a), 36.2 (CH₂, C-3), 33.8 (CH₂, C-4'), 30.5 (CH, C-5'), 27.8 (CH₃, C-9'), 25.9 (CH₂, C-3'), 24.5 (CH₃, C-10'), 21.6 (CH₃, C-7') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₂₉H₃₅BrNO₂ [M + H]⁺: 508.1846; gef.: 508.1847.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4,8-dicarbonsäure-8-methylester (59)



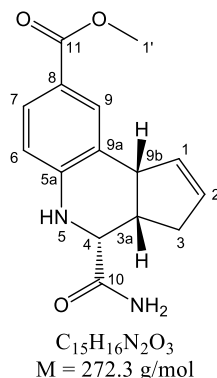
34 (400 mg, 1.24 mmol) wird in 0.1 M aq. NaOH Lösung (15 mL) suspendiert. Anschließend wird THF zugegeben, bis eine klare Lösung entsteht und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Amberlite® IR-120 H⁺ Form wird verwendet um das Reaktionsgemisch zu neutralisieren. Das Ionenaustauscherharz wird abfiltriert und mit Wasser (20 mL) gewaschen. Lyophilisation des Filtrats ergibt das reine Produkt.

Farbloser Feststoff (224 mg, 99%). Schmp. = 115 °C (Zersetzung). R_f = 0.83 (EE/n-Hexan, 3:1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 2951 (w), 1715 (s), 1605 (s), 1435 (m), 1278 (ss), 1224 (s), 1195 (s), 1106 (s), 918 (w), 770 (ss), 710 (m), 685 (w), 640 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 7.55 [s, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.47 [dd, ³*J*_{7,6} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{7,9} = 1.9 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.82 [d, ³*J*_{6,7} = 8.5 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 6.18 [s, 1 H, 5-H], 5.83 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.0 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1 H, 1-H], 5.62 [d, ³*J*_{2,1} = 5.0 Hz, 1 H, 2-H], 4.07 [d, ³*J*_{4,3a} = 3.5 Hz, 1 H, 4-H], 4.03 [bd, ³*J*_{9b,3a} = 9.0 Hz, 1 H, 9b-H], 3.74 [s, 3 H, 1'-H], 3.16 [m, 1 H, 3a-H], 2.34 - 2.17 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 172.5 (C, C-11), 166.2 (C, C-10), 149.4 (C, C_{Ar}-5a), 134.7 (CH, C-1), 130.1 (CH, C_{Ar}-9), 129.4 (CH, C-2), 127.6 (CH, C_{Ar}-7), 123.7 (C, C_{Ar}-9a), 117.6 (C, C_{Ar}-8), 114.6 (CH, C_{Ar}-6), 54.4 (CH, C-4), 51.2 (CH₃, C-1'), 44.8 (CH, C-9b), 40.2 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3) ppm. **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₅H₁₆NO₄⁺ [M+H]⁺: 274.1074, gef.: 274.1070.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-4-(hydroxymethyl)-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-8-methylester (61)


Zu einer Lösung aus 3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4,8-dicarbonsäure-8-methylester (**59**, 150 mg, 0.55 mmol) in 1,2-Dimethoxyethan (7.5 mL) wird bei -15°C unter einer Stickstoffatmosphäre *N*-Methylmorpholin (61 μL , 0.55 mmol) und Isobutylchlorformiat (75 μL , 0.55 mmol) getropft. Anschließend wird 10 min bei dieser Temperatur und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert. Zu dem Filtrat wird bei -15°C eine Lösung aus NaBH_4 (31 mg, 0.82 mmol) in H_2O (300 μL) gegeben und 1 min gerührt. Dann wird dem Reaktionsgemisch Wasser zugesetzt (14 mL) und mit CH_2Cl_2 ($3 \times 20 \text{ mL}$) extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na_2SO_4), eingeeengt und säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat / *n*-Hexan = 4:1) gereinigt.

Farbloses Öl, Ausbeute: 91 mg (64 %), $R_f = 0.57$ (Ethylacetat/*n*-Hexan = 4:1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3367 \text{ (m)}$, 3050 (w), 2923 (m), 2848 (w), 1686 (m), 1604 (s), 1510 (m), 1435 (m), 1277 (s), 1253 (m), 1221 (s), 1193 (m), 1106 (m), 1017 (m), 926 (w), 832 (w), 769 (m), 708 (s) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.53$ [bs, 1 H, 9- H_{Ar}], 7.46 [dd, $^3J_{7,6} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{7,9} = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H, 7- H_{Ar}], 6.69 [d, $^3J_{6,7} = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, 6- H_{Ar}], 5.91 – 5.88 [m, 2 H, 5-H, 1-H], 5.65 [bd, $^3J_{1,2} = 5.2 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H], 3.91 [bd, $^3J_{9b,3a} = 8.6 \text{ Hz}$, 1 H, 9b-H], 3.74 [s, 3 H, 1'-H], 3.52 – 3.41 [m, 3 H, 4-H, 11-H], 2.78 [m, 1 H, 3a-H], 2.31 – 2.12 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 166.2$ (C, C-10), 150.3 (C, $\text{C}_{\text{Ar-5a}}$), 134.6 (CH, C-1), 130.4 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-9}}$), 129.7 (CH, C-2), 127.5 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-7}}$), 124.1 (C, $\text{C}_{\text{Ar-8}}$), 117.3 (C, $\text{C}_{\text{Ar-9a}}$), 114.4 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-6}}$), 63.1 (CH_2 , C-11), 53.8 (CH, C-4), 51.1 (CH_3 , C-1'), 44.6 (CH, C-9b), 39.5 (CH, C-3a), 30.6 (CH_2 , C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_3^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 260.1281; gef.: 260.1279.

4-Carbamoyl-3a,4,5,9b,tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-8-carbonsäuremethylester (62)


3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4,8-dicarbonsäure-8-methylester (**59**, 150 mg, 0.549 mmol), Boc₂O (132 mg, 0.60 mmol) und Ammoniumhydrogencarbonat (260 mg, 3.29 mmol) werden in trockenem Dioxan suspendiert. Anschließend wird unter einer Stickstoffatmosphäre trockenes Pyridin (44 μ L, 1.21 mmol) zugetropft und 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

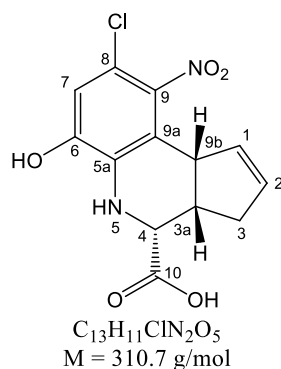
Das Reaktionsgemisch wird in Ethylacetat (15 mL) aufgenommen und mit Wasser (1 \times 20 mL) und 5 %iger Salzsäure (2 \times 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄) und eingeeengt. Der Rückstand wird aus Ethylacetat / *n*-Hexan umkristallisiert.

Grauer Feststoff, Ausbeute: 54 mg (36 %), Schmp. = 228 °C (Zersetzung). $R_f = 0.50$ (EE/*n*-Hexan, 2 : 1). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu} = 3375$ (m), 3227 (w), 3053 (w), 2941 (w), 2913 (w), 2850 (w), 1598 (ss), 1667 (ss), 1606 (s), 1432 (m), 1290 (ss), 1277 (m), 1225 (m), 1103 (m), 981 (w), 839 (m), 800 (w), 770 (s), 721 (m), 706 (m), 673 (w), 626 (m) cm^{-1} . – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.55$ [bs, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.48 – 7.45 [m, 2 H, 7-H_{Ar}, 1 \times NH₂], 7.23 [s, 1 H, 1 \times NH₂], 6.78 [d, ³ $J_{6,7} = 8.5$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 6.13 [s, 1 H, 5-H], 5.84 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 1-H], 5.63 [bd, ³ $J_{1,2} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-H], 3.99 [bd, ³ $J_{9b,3a} = 8.7$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.93 [d, ³ $J_{4,3a} = 3.6$ Hz, 1 H, 4-H], 3.74 [s, 3 H, 1'-H], 3.16 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.26 [m, 1 H, 3-H_A], 2.18 – 2.10 [m, 1 H, 3-H_B] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 172.3$ (C, C-11), 166.2 (C, C-10), 149.4 (C, C_{Ar}-5a), 134.5 (CH, C-1), 130.1 (CH, C_{Ar}-9), 129.6 (CH, C-2), 127.6 (CH, C_{Ar}-7), 123.6 (C, C_{Ar}-9b), 117.5 (CH, C_{Ar}-6), 114.6 (C, C_{Ar}-8), 54.9 (CH, C-4), 51.2 (CH₃, C-1'), 44.7 (CH, C-9b), 40.8 (CH, C-3a), 32.5 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS:** exakte Masse ber. für C₁₅H₁₇N₂O₃⁺ [M + H]⁺: 273.1234; gef.: 273.1228.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entschützung der 3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-carbonsäureester 18, 31 – 42.

Die Tetrahydrochinolinester (**18, 31 – 42**, 50 mg) werden in 0.5 M aq. LiOH (5 mL) Lösung suspendiert. THF (Gemisch A) oder Methanol (Gemisch B) wird zugegeben bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und mit Amberlite® IR 120 H⁺-Form neutralisiert. Das Ionenaustauscherharz wird abfiltriert und mit Wasser (20 mL) gewaschen. Das reine Produkt wird durch Lyophilisation des Filtrats erhalten.

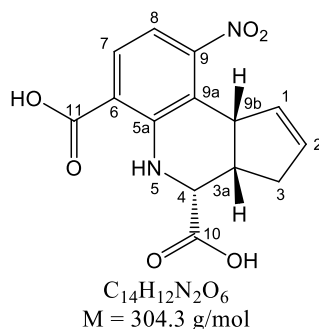
8-Chlor-3a,4,5,9b-tetrahydro-6-hydroxy-9-nitro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure (9)



8-Chlor-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**31**; 0.15 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 45 mg (99 %), Schmp. = 150 °C (Zersetzung), $R_f = 0.41$ (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3403$ (w), 3081 (w), 2922 (w), 2853 (w), 1715 (s), 1525 (ss), 1493 (s), 1363 (s), 1235 (ss), 848 (w), 829 (w), 811 (s), 717 (s), 615 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.00$ [s, 1 H, OH], 6.72 [s, 1 H, 7-H_{Ar}], 5.74 [bd, ³*J*_{2,1} = 5.5 Hz, 1 H, 2-H], 5.40 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.5 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, 1-H], 4.93 [s, 1 H, 5-H], 4.16 [d, ³*J*_{9b,3a} = 9.2 Hz, 1 H, 9b-H], 4.01 [d, ³*J*_{4,3a} = 3.5 Hz, 1 H, 4-H], 3.28 [m, 1 H, 3a-H], 2.29 [d, ³*J*_{3,3a} = 8.9 Hz, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 172.1$ (C, C-10), 146.4 (C, C_{Ar}-6), 141.2 (C, C_{Ar}-9), 133.7 (C, C_{Ar}-5a), 132.3 (CH, C-2), 130.4 (CH, C-1), 118.3 (C, C_{Ar}-9a), 112.0 (C, C_{Ar}-8), 111.5 (CH, C_{Ar}-7), 54.5 (CH, C-4), 42.8 (CH, C-9b), 39.9 (CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₂ClN₂O₅⁺ [M + H]⁺: 311.0429; gef.: 311.0423.

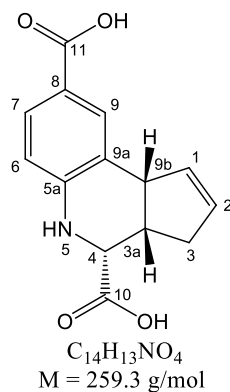
9-Nitro-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4,6-dicarbonsäure (63)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-9-nitro-3H-cyclopenta[c]quinoline-4,6-dicarbonsäure-4-ethyl-6-methyl-ester (**36**, 0.14 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Brauner Feststoff, Ausbeute: 40 mg (99 %), Schmp. = 202 °C (Zersetzung), $R_f = 0.32$ (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3346$ (w), 2981 (w), 2883 (w), 1714 (s), 1585 (m), 1524 (ss), 1438 (m), 1345 (m), 1227 (ss), 1170 (s), 900 (m), 823 (s), 734 (s), 704 (s), 616 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 7.86$ [d, ³ $J_{7,8} = 8.6$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.92 [d, ³ $J_{8,7} = 8.6$ Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.70 [bd, ³ $J_{2,1} = 5.1$ Hz, 1 H, 2-H], 5.47 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.1$ Hz, ³ $J_{1,9b} = 2.1$ Hz, 1 H, 1-H], 4.62 [d, ³ $J_{9b,3a} = 9.7$ Hz, 1 H, 9b-H], 4.19 [d, ³ $J_{4,3a} = 3.4$ Hz, 1 H, 4-H], 3.40 [m, 1 H, 3a-H], 2.47 – 2.30 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, MeOH-*d*₄): $\delta = 174.0$ (C, C-10), 170.1 (C, C-11), 154.6 (C, C_{Ar}-9), 151.1 (C, C_{Ar}-5a), 133.0 (CH, C-1), 132.3 (CH, C-2), 131.8 (CH, C_{Ar}-7), 120.7 (C, C_{Ar}-9a), 115.8 (C, C_{Ar}-6), 111.8 (CH, C_{Ar}-8), 55.5 (CH, C-4), 44.6 (CH, C-9b), 41.7 (CH, C-3a), 33.7 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₃N₂O₆ [M + H]⁺: 305.0768; gef.: 305.0774.

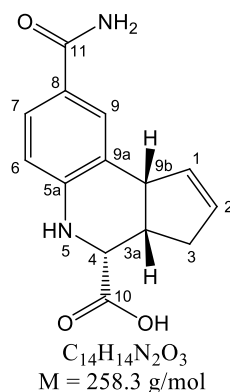
3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4,8-dicarbonsäure (64)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[c]chinolin-4,8-dicarbonsäure-4-ethyl-8-methyl-ester (**34**, 0.17 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Grauer Feststoff, Ausbeute: 43 mg (99 %), Schmp. = 241 °C (Zersetzung), $R_f = 0.23$ (CHCl₃/MeOH/H₂O, 65 : 25 : 4). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3403$ (w), 3058 (w), 2935 (w), 2842 (w), 1599 (s), 1397 (m), 1291 (m), 1270 (m), 1222 (s), 1129 (m), 1108 (m), 963 (w), 830 (w), 791 (m), 776 (m), 701 (s), 643 (w), 624 (w), 605 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.49$ [s, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.41 [d, ³ $J_{7,6} = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.67 [d, ³ $J_{6,7} = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.76 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.9$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 1-H], 5.60 [bd, ³ $J_{2,1} = 5.9$ Hz, 1 H, 2-H], 3.92 [bd, ³ $J_{9b,3a} = 8.8$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.64 [d, ³ $J_{4,3a} = 3.6$ Hz, 1 H, 4-H], 3.19 [m, 1 H, 3a-H], 2.20 [bd, ³ $J_{3,3a} = 3.6$ Hz, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173.3$ (C, C-10), 168.1 (C, C-11), 149.5 (C, C_{Ar}-5a), 135.0 (CH, C-1), 130.3 (CH, C_{Ar}-9), 129.9 (CH, C-2), 127.7 (CH, C_{Ar}-7), 123.8 (C, C_{Ar}-9a), 119.0 (C, C_{Ar}-8), 113.6 (CH, C_{Ar}-6), 56.1 (CH, C-4), 45.5 (CH, C-9b), 41.3 (CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₄NO₄ [M + H]⁺: 260.0917; gef.: 260.0914.

8-Carbamoyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (65)

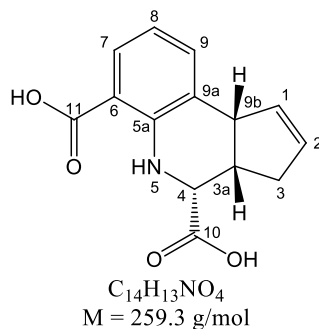


8-Carbamoyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (37, 0.17 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Grauer Feststoff, Ausbeute: 45 mg (99 %), Schmp. = 241 °C (Zersetzung), $R_f = 0.30$ (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3369$ (m), 3347 (w), 3048 (w), 2885 (w), 2797 (w), 1619 (s), 1587 (m), 1554 (m), 1512 (m), 1428 (m), 1244 (m), 1223 (s), 1160 (m), 1149 (m), 1098 (s), 1061 (s), 830 (w), 804 (w), 766 (m), 718 (w), 682 (m), 663 (m), 616 (s) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.54$ [s, 1 H, NH₂], 7.51 [bs, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.40 [dd, ³ $J_{7,6} = 8.4$ Hz, ⁴ $J_{7,9} = 1.4$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.87 [s, 1 H, NH₂], 6.75 [d, ³ $J_{6,7} = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.82 – 5.80 [m, 2 H, 1-H, 5-H], 5.61 [bd, $J = 5.1$ Hz, 1 H, 2-H], 4.03 – 3.99 [m, 2 H, 4-H, 9b-H], 3.14 [m, 1 H, 3a-H], 2.35 – 2.15 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 172.7$ (C, C-10), 167.8 (C, C-11), 147.5 (C, C_{Ar}-8), 134.8 (CH, C-

1), 129.2 (CH, C-2), 128.3 (CH, C_{Ar}-9), 125.7 (CH, C_{Ar}-7), 123.5 (C, C_{Ar}-9a), 122.9 (C, C_{Ar}-5a), 114.4 (CH, C_{Ar}-6), 54.6 (CH, C-4), 45.2 (CH, C-9b), 40.3 (CH, C-3a), 32.0 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₅N₂O₃⁺ [M + H]⁺: 259.1077; gef.: 259.1074.

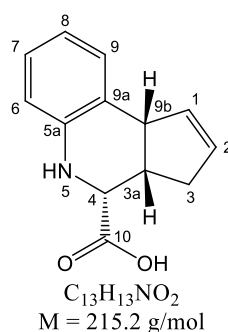
3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4,6-dicarbonsäure (66)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4,6-dicarbonsäure-4-ethylester-6-methylester (**38**, 0.17 mmol) wird in Gemisch A gelöst.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 42 mg (99 %), Schmp. = 184 °C (Zersetzung), *R_f* = 0.19 (EE/*n*-Hexan, 10 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3370 (m), 3051 (w), 2940 (w), 2849 (w), 1660 (s), 1558 (s), 1433 (s), 1382 (m), 1253 (s), 1216 (s), 1147 (s), 982 (w), 862 (w), 740 (s), 691 (s) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.56 [d, ³*J*_{7,8} = 7.5 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 7.02 [d, ³*J*_{9,8} = 7.2 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.43 [dd, ³*J*_{8,7} = 7.5 Hz, ³*J*_{8,9} = 7.2 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.69 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.5 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1 H, 1-H], 5.58 [d, ³*J*_{2,1} = 5.5 Hz, 1 H, 2-H], 3.99 [d, ³*J*_{9b,3a} = 9.0 Hz, 1 H, 9b-H], 3.74 [d, ³*J*_{4,3a} = 3.2 Hz, 1 H, 4-H], 3.22 [m, 1 H, 3a-H], 2.25 [bd, ³*J*_{3,3a} = 9.0 Hz, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.4 (C, C-10), 170.3 (C, C-11), 148.2 (C, C_{Ar}-5a), 135.3 (CH, C-1), 131.8 (CH, C_{Ar}-9), 129.6 (CH, C-2), 128.7 (CH, C_{Ar}-7), 126.2 (C, C_{Ar}-9a), 114.7 (CH, C_{Ar}-8), 114.4 (C, C_{Ar}-6), 56.0 (CH, C-4), 46.1 (CH, C-9b), 40.6 (CH, C-3a), 32.7 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₄NO₄ [M + H]⁺: 260.0917; gef.: 260.0919.

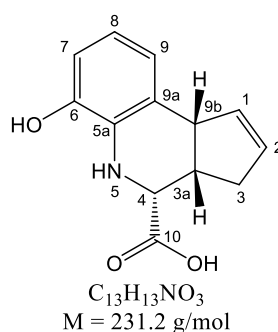
3a,4,5,9b-Tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (67)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**18**, 0.21 mmol) wird in Gemisch A gelöst.

Hellgrüner Feststoff, Ausbeute: 44 mg (99 %), Schmp. = 114°C (Zersetzung), $R_f = 0.57$ (CHCl₃/MeOH, 5 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3365$ (m), 3045 (w), 2934 (w), 2844 (w), 1586 (s), 1402 (m), 1294 (m), 1231 (s), 1151 (m), 1110 (m), 988 (w), 963 (w), 929 (w), 880 (w), 842 (w), 804 (w), 751 (s), 710 (m), 682 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.91$ [d, ³ $J_{9,8} = 7.4$ Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.82 [dd, ³ $J_{7,6} = 7.7$ Hz, ³ $J_{7,8} = 7.4$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.68 [d, ³ $J_{6,7} = 7.7$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 6.51 [dd, ³ $J_{8,9} = \text{}^3J_{8,7} = 7.4$ Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 5.71 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.7$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1 H, 1-H], 5.69 [d, ³ $J_{2,1} = 5.7$ Hz, 1 H, 2-H], 3.93 [d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, 9b-H], 4.01 [d, ³ $J_{4,3a} = 3.2$ Hz, 1 H, 4-H], 3.14 [m, 1 H, 3a-H], 2.24 – 3.14 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173.6$ (C, C-10), 145.6 (C, C_{Ar}-5a), 134.9 (CH, C-1), 129.5 (CH, C-2), 128.3 (CH, C_{Ar}-9), 125.6 (CH, C_{Ar}-7), 125.2 (C, C_{Ar}-9a), 116.9 (CH, C_{Ar}-8), 115.0 (CH, C_{Ar}-6), 56.4 (CH, C-4), 46.0 (CH, C-9b), 41.0 (CH, C-3a), 32.3 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₄NO₂ [M + H]⁺: 216.1019; gef.: 216.1019.

6-Hydroxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (**68**)

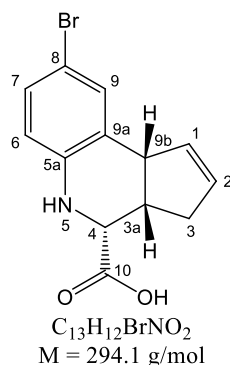


6-Hydroxy-3a,4,5,9b-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**32**, 0.19 mmol) wird in Gemisch B gelöst

Beigefarbener Feststoff, Ausbeute: 44 mg (99 %), Schmp. = 123 °C (Zersetzung), $R_f = 0.45$ (CHCl₃/MeOH/H₂O, 65 : 25 : 4). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3388$ (w), 3050 (w), 2939 (w), 2844 (w), 1590 (s), 1477 (m), 1364 (s), 1280 (s), 1246 (s), 1159 (m), 960 (w), 870 (w), 795 (m), 750 (s), 655 (w), 619 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.49 - 6.37$ [m, 3 H, 7-H_{Ar}, 8-H_{Ar} und 9-H_{Ar}], 5.70 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.2$ Hz, ³ $J_{1,9b} = 2.8$ Hz, 1 H, 1-H], 5.58 [d, ³ $J_{2,1} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-H], 3.95 [d, ³ $J_{4,3a} = 8.9$ Hz, 1 H, 4-H], 3.77 [d, ³ $J_{9b,1} = 2.9$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.19 [m, 1 H, 3a-H], 2.35 – 2.18 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173.2$ (C, C-10), 144.0 (C, C_{Ar}-6), 134.8 (CH, C-1), 133.6 (C, C_{Ar}-5a), 129.2 (CH, C-2), 125.8 (C, C_{Ar}-9a), 118.9 (CH, C_{Ar}-9), 117.0 (CH, C_{Ar}-8), 111.0 (CH, C_{Ar}-7), 56.0 (CH, C-4), 46.0 (CH, C-9b),

40.6 (CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₄NO₃ [M + H]⁺: 232.0968; gef.: 232.0968.

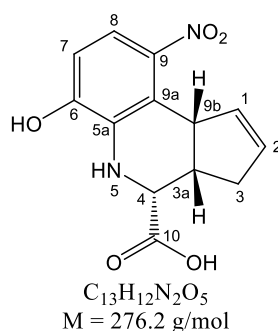
8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (69)



8-Brom-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**33**, 0.16 mmol) wird in Gemisch A gelöst.

Grüner Feststoff, Ausbeute: 45 mg (99 %), Schmp. = 109°C (Zersetzung), *R_f* = 0.45 (CHCl₃/MeOH, 5 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3381 (w), 3064 (w), 2971 (w), 2859 (w), 2949 (w), 1704 (s), 1488 (s), 1284 (m), 1259 (m), 1233 (m), 1123 (s), 1086 (m), 893 (m), 875 (s), 808 (s), 752 (w), 715 (s), 614 (s), 528 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.09 [d, ⁴*J*_{9,7} = 2.0 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.96 [dd, ³*J*_{7,6} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{7,9} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.71 [d, ³*J*_{6,7} = 8.5 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.76 [dd, ³*J*_{1,2} = 5.3 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1 H, 1-H], 5.61 [bd, ³*J*_{2,1} = 5.3 Hz, 1 H, 2-H], 3.94 [bd, ³*J*_{9b,3a} = 8.9 Hz, 1 H, 9b-H], 3.79 [d, ³*J*_{4,3a} = 3.2 Hz, 1 H, 4-H], 3.15 [m, 1 H, 3a-H], 2.32 – 2.14 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0 (C, C-10), 144.7 (C, C_{Ar}-5a), 134.5 (CH, C-1), 130.5 (CH, C_{Ar}-9), 129.8 (CH, C-2), 128.2 (CH, C_{Ar}-7), 127.6 (C, C_{Ar}-9a), 117.1 (CH, C_{Ar}-6), 107.7 (C, C_{Ar}-8), 55.7 (CH, C-4), 45.6 (CH, C-9b), 40.5 (CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₃BrNO₂ [M + H]⁺: 294.0124; gef.: 294.0124.

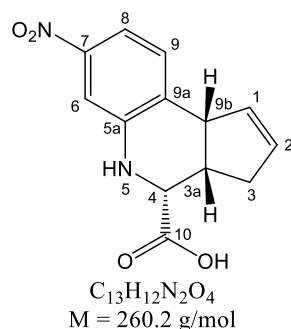
3a,4,5,9b-Tetrahydro-6-hydroxy-9-nitro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (70)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-6-hydroxy-9-nitro-3*H*-cyclopenta[*c*]quinoline-4-carbonsäure-ethylester (**39**, 0.16 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Orangefarbener Feststoff, Ausbeute: 45 mg (99 %), Schmp. = 103°C, R_f = 0.25 (CHCl₃/MeOH, 85 : 15). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3352 (m), 2932 (w), 2849 (w), 1578 (m), 1511 (m), 1479 (m), 1403 (m), 1317 (m), 1290(s), 1248 (s), 1179 (m), 1148 (m), 821 (m), 791 (w), 748 (m), 720 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.26 [d, ³ $J_{8,9}$ = 8.7 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 6.62 [d, ³ $J_{7,8}$ = 8.7 Hz 1 H, 7-H_{Ar}], 5.63 [bs, 1 H, 2-H], 5.45 [bs, 1 H, 1-H], 4.68 [d, ³ $J_{9b,3a}$ = 9.1 Hz, 1 H, 9b-H], 3.74 [d, ³ $J_{4,3a}$ = 3.4 Hz, 1 H, 4-H], 3.28 [m, 1 H, 3a-H], 2.26 [bd, ³ $J_{3,3a}$ = 9.2 Hz, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.2 (C, C-10), 151.9 (C, C_{Ar}-6), 139.4 (C, C_{Ar}-9), 135.9 (C, C_{Ar}-5), 132.4 (C, C_{Ar}-5a), 132.4 (CH, C-2), 131.5 (C, C-1), 119.5 (C, C_{Ar}-9a), 116.0 (CH, C_{Ar}-8), 110.2 (CH, C_{Ar}-7), 55.5 (CH, C-4), 44.6 (CH, C-9b), 41.1 (CH, C-3a), 32.6 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₁N₂O₅ [M – H]⁻: 275.0674; gef.: 275.0665.

3a,4,5,9b-Tetrahydro-7-nitro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (**71**)

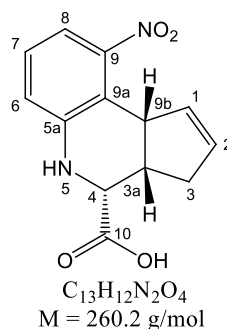


3a,4,5,9b-Tetrahydro-7-nitro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**41**, 0.17 mmol) wird in Gemisch A gelöst.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 48 mg (99 %), Schmp. = 204°C (Zersetzung), R_f = 0.31 (EE/*n*-Hexan, 1 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3363 (m), 2964 (w), 2943 (w), 2842 (w), 1701 (m), 1510 (s), 1342 (s), 1252 (s), 1152 (s), 875 (s), 824 (w), 739 (s), 691 (w), 655 (w), 587 (w), 518 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.69 [d, ⁴ $J_{6,8}$ = 2.2 Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 7.35 [dd, ³ $J_{8,9}$ = 8.3 Hz, ⁴ $J_{8,6}$ = 2.2 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 7.19 [d, ³ $J_{9,8}$ = 8.3 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 6.11 [s, 1 H, 5-H], 5.77 [dd, ³ $J_{1,2}$ = 5.1 Hz, J = 2.3 Hz, 1 H, 1-H], 5.65 [bd, ³ $J_{2,1}$ = 5.1 Hz, 1 H, 2-H], 4.08 [bd, ³ $J_{9b,3a}$ = 8.8 Hz, 1 H, 9b-H], 3.98 [d, ³ $J_{4,3a}$ = 3.2 Hz, 1 H, 4-H], 3.21 [m, 1 H, 3a-H], 2.36 – 2.18 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.5 (C, C-10), 146.1 und 146.0 (2 x C, C_{Ar}-5a und C_{Ar}-7), 133.7 (CH, C-1), 132.4 (C, C_{Ar}-9a), 130.3 (CH, C-2), 129.2 (CH, C_{Ar}-9), 111.3 (CH, C_{Ar}-8), 109.2 (CH, C_{Ar}-6), 55.1 (CH, C-4), 45.7 (CH, C-9b), 40.3

(CH, C-3a), 32.2 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₁N₂O₄ [M – H][–]: 259.0724; gef.: 259.0723.

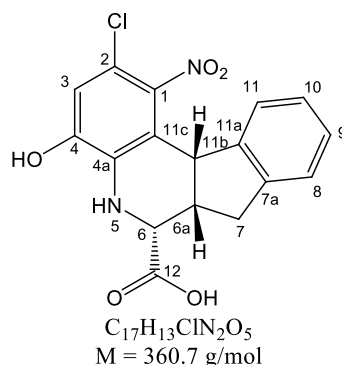
3a,4,5,9b-Tetrahydro-9-nitro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure (72)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-9-nitro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**40**, 0.17 mmol) wird in Gemisch A gelöst.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 48 mg (99 %), Schmp. = 209 °C (Zersetzung), *R_f* = 0.23 (CHCl₃/MeOH, 85 : 15). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3355 (m), 2913 (w), 2846 (w), 2577 (w), 2552 (w), 1708 (s), 1606 (m), 1513 (s), 1411 (m), 1345 (s), 1289 (s), 1279 (s), 1239 (s), 1159 (m), 919 (m), 831 (w), 814 (m), 790 (s), 773 (w), 753 (s), 703 (s), 663 (w) cm^{–1}. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.17 – 7.06 [m, 3 H, 6-H_{Ar}, 7-H_{Ar}, 8-H_{Ar}], 6.09 [s, 1 H, 5-H], 5.70 [bd, ³*J*_{2,1} = 5.1 Hz, 1 H, 2-H], 5.42 [dd, ³*J*_{2,1} = 5.1 Hz, ³*J*_{1,9b} = 2.4 Hz, 1 H, 1-H], 4.53 [dd, ³*J*_{9b,3a} = 9.0 Hz, ³*J*_{9b,1} = 2.4 Hz, 1 H, 9b-H], 4.03 [d, ³*J*_{4,3a} = 3.3 Hz, 1 H, 4-H], 3.28 [m, 1 H, 3a-H], 2.38 – 2.18 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.4 (C, C-10), 149.8 (C, C_{Ar}-9), 147.1 (C, C_{Ar}-9), 131.8 (CH, C-2), 131.2 (CH, C-1), 126.6 (CH, C_{Ar}-7), 120.1 (CH, C_{Ar}-6), 117.5 (C, C_{Ar}-9a), 113.0 (CH, C_{Ar}-8), 54.3 (CH, C-4), 42.7 (CH, C-9b), 40.3 (CH, C-3a), 32.1 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₃H₁₁N₂O₄ [M – H][–]: 259.0724; gef.: 259.0721.

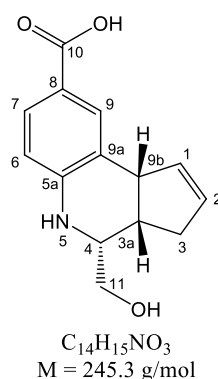
2-Chloro-4-hydroxy-1-nitro-5,6a,7,11b-tetrahydro-6H-indeno[2,1-c]chinolin-6-carbonsäure (73)



8-Chlor-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-4-carbonsäure-ethylester (**42**, 0.09 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 46 mg (99 %), Schmp. = 143 °C (Zersetzung), $R_f = 0.43$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH/H_2O$, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3067$ (w), 2932 (w), 1716 (m), 1579 (m), 1525 (ss), 1353 (s), 1231 (s), 1157 (m), 851 (w), 812 (w), 751 (ss), 728 (m), 616 (w) cm^{-1} . – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.12$ [s, 1 H, OH], 7.17 – 7.10 [m, 2 H, 10- H_{Ar} , 11- H_{Ar}], 7.06 [ddd, $^3J_{9,8} = 7.5 \text{ Hz}$, $^3J_{9,10} = 7.0 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H, 9- H_{Ar}], 6.94 [d, $^3J_{8,9} = 7.5 \text{ Hz}$, 1 H, 8- H_{Ar}], 6.74 [s, 1 H, 3- H_{Ar}], 5.26 [s, 1 H, 5-H], 4.80 [d, $^3J_{11b,6a} = 8.2 \text{ Hz}$, 1 H, 11b-H], 4.04 [d, $^3J_{6,6a} = 3.9 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H], 3.41 [m, 1 H, 6a-H], 3.01 [dd, $^2J_{gem} = 15.9 \text{ Hz}$, $^3J_{7A,7a} = 7.8 \text{ Hz}$, 1 H, 7- H_A], 2.85 [dd, $^2J_{gem} = 15.9 \text{ Hz}$, $^3J_{7B,7a} = 7.8 \text{ Hz}$, 1 H, 7- H_B] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 172.1$ (C, C-12), 146.4 (C, C_{Ar} -4), 142.6 und 142.5 (2 x C, C_{Ar} -7a and C_{Ar} -11a), 141.1 (C, C_{Ar} -1), 134.3 (C, C_{Ar} -4a), 127.3 und 124.8 (2 x CH, C_{Ar} -10 und C_{Ar} -11), 126.3 (CH, C_{Ar} -9), 124.6 (CH, C_{Ar} -8), 117.1 (C, C_{Ar} -11c), 113.1 (C, C_{Ar} -2), 111.8 (CH, C_{Ar} -3), 54.5 (CH, C-6), 42.6 (CH, C-11b), 42.0 (CH, C-6a), 32.2 (CH₂, C-7) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $C_{17}H_{14}ClN_2O_5$ [M + H]⁺: 361.0586; gef.: 361.0584.

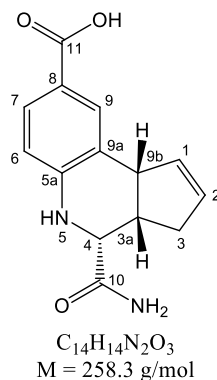
3a,4,5,9b-Tetrahydro-4-(hydroxymethyl)-3H-cyclopenta[*c*]chinolin-8-carbonsäure (74)



3a,4,5,9b-Tetrahydro-4-(hydroxymethyl)-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-8-methylester (**61**, 0.19 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 45 mg (99 %), Schmp. = 86 °C (Zersetzung), $R_f = 0.43$ (CHCl₃/MeOH, 9 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3366$ (w), 3051 (w), 2927 (w), 2846 (w), 2361 (m), 2342 (m), 1670 (m), 1603 (s), 1399 (m), 1274 (m), 1221 (s), 1185 (m), 1035 (m), 1011 (m), 830 (w), 802 (w), 774 (m), 699 (s), 630 (m) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.52$ [s, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.43 [d, ³ $J_{7,6} = 8.4$ Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 6.66 [d, ³ $J_{6,7} = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 5.88 [dd, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1 H, 1-H], 5.76 [s, 1 H, 5-H], 5.65 [d, ³ $J_{1,2} = 5.5$ Hz, 1 H, 2-H], 3.91 [bd, ³ $J_{9b,3a} = 8.4$ Hz, 1 H, 9b-H], 3.48 – 3.41 [m, 3 H, 4-H, 11-H], 2.77 [m, 1 H, 3a-H], 2.32 – 2.11 [m, 2 H, 3-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 167.7$ (C, C-10), 149.6 (C, C_{Ar}-5a), 134.7 (CH, C-1), 130.5 (CH, C_{Ar}-9), 129.6 (CH, C-2), 127.7 (CH, C_{Ar}-7), 123.9 (C, C_{Ar}-8), 119.5 (C, C_{Ar}-9a), 114.2 (CH, C_{Ar}-6), 63.1 (CH₂, C-11), 54.0 (CH, C-4), 44.8 (CH, C-9b), 39.6 (CH, C-3a), 30.6 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₆NO₃⁺ [M + H]⁺: 246.1125; gef.: 246.1121.

4-Carbamoyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-8-carbonsäure (**75**):

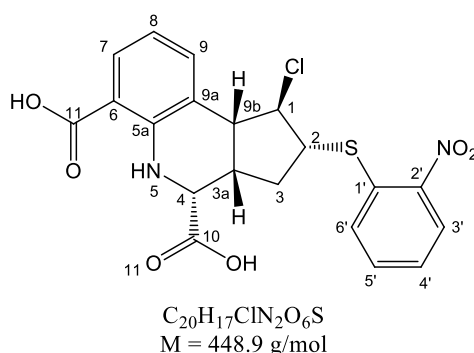


4-Carbamoyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-8-carbonsäure (**62**, 0.18 mmol) wird in Gemisch B gelöst.

Grauer Feststoff (47 mg, 99%). Schmp. = 266 °C (Zersetzung). $R_f = 0.21$ (CHCl₃/MeOH, 9 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3368$ (w), 3049 (w), 2924 (w), 1671 (s), 1604 (ss), 1422 (m), 1274 (s), 1222 (ss), 1132 (s), 1012 (s), 928 (w), 831 (w), 775 (m), 700 (s), 628 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz; DMSO-*d*₆): $\delta = 7.53$ [bs, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.46 – 7.43 [m, 2 H, 7-H_{Ar}, 1 × NH₂], 7.22 (s, 1 H, 1 × NH₂), 6.75 (d, ³ $J_{6,7} = 8.5$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}), 6.03 (s, 1 H, 5-H), 5.84 (dd, ³ $J_{1,2} = 5.2$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 1-H), 5.63 (d, ³ $J_{2,1} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-H), 3.99 (d, ³ $J_{9b,3a} = 8.8$ Hz, 1 H, 9b-H), 3.92 (d, ³ $J_{4,3a} = 3.3$ Hz, 1 H, 4-H), 3.16 (m, 1 H, 3a-H), 2.36 – 2.27 (m, 1 H, 3-H_A), 2.18 – 2.07 (m,

1H, 3-H_B) ppm. – ¹³C-NMR (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ = 172.4 (C, C-10), 167.3 (C, C-11), 149.1 (C, C_{Ar}-5a), 134.6 (CH, C-1), 130.3 (CH, C_{Ar}-9), 129.5 (CH, C-2), 127.7 (CH, C_{Ar}-7), 123.5 (C, C_{Ar}-9b), 118.7 (CH, C_{Ar}-6), 114.6 (C, C_{Ar}-8), 55.0 (CH, C-4), 44.8 (CH, C-9b), 40.8 (CH, C-3a), 31.5 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₁₄H₁₅N₂O₃⁺ [M+H]⁺: 259.1077, gef.: 259.1080.

1-Chlor-2-(2-nitro-phenylsulfanyl)-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-cyclopenta[*c*]chinolin-4,6-dicarbonsäure (10)



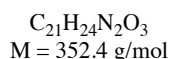
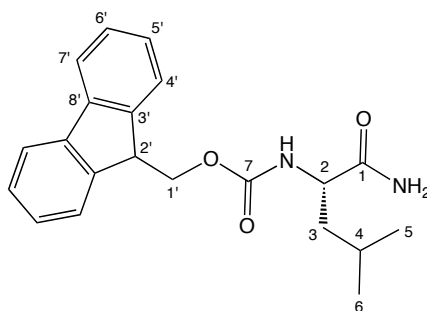
3a,4,5,9b-Tetrahydro-3*H*-cyclopenta[*c*]chinolin-4,6-dicarbonsäure (**66**, 25 mg, 0.10 mmol) werden in trockenem Acetonitril (2 mL) gelöst. Dazu wird unter einer Stickstoffatmosphäre eine Lösung aus 2-Nitrobenzylsulfenylchlorid (**16**, 22 mg, 1.2 eq., 0.12 mmol) in trockenem Acetonitril (1 mL) getropft. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für 30 min gerührt.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch bis zur Trockne eingedunstet und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 75 : 15 : 5) gereinigt.

Gelber Feststoff, Ausbeute: 36 mg (87 %), Schmp. = 171 °C (Zersetzung), *R*_f = 0.45 (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 75 : 15 : 5). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3384 (w), 1714 (m), 1509 (s), 1339 (m), 1246 (s), 1216 (s), 943 (w), 855 (w), 781 (w), 756 (s), 731 (ss), 718 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, DMF-*d*₇): δ = 8.37 [s, 1 H, 5-H], 8.19 [dd, ³*J*_{3',4'} = 7.5 Hz, ⁴*J*_{3',5'} = 1.1 Hz, 1 H, 3'-H_{Ar}], 7.83 [dd, ³*J*_{7,8} = 7.7 Hz, ⁴*J*_{7,9} = 0.9 Hz, 1 H, 7-H_{Ar}], 7.75 - 7.76 [m, 2 H, 5'-H_{Ar} und 6'-H_{Ar}], 7.59 [d, ³*J*_{9,8} = 7.8 Hz, 1 H, 9-H_{Ar}], 7.51 [ddd, ³*J*_{4',3'} = 7.5 Hz, ³*J*_{4',5'} = 7.0 Hz, ⁴*J*_{4',6'} = 1.9 Hz, 1 H, 4'-H_{Ar}], 6.67 [dd, ³*J*_{8,7} = 7.7 Hz, ³*J*_{8,9} = 7.8 Hz, 1 H, 8-H_{Ar}], 4.45 [ddd, ³*J*_{2,1} = 4.6 Hz, ³*J*_{2,3A} = 7.6 Hz, ³*J*_{2,3B} = 7.6 Hz, 1 H, 2-H], 4.19 [d, ³*J*_{4,3a} = 4.1 Hz, 1 H, 4-H], 4.05 [dd, ³*J*_{1,2} = 4.6 Hz, ³*J*_{1,9b} = 4.6 Hz, 1 H, 1-H], 3.66 [dd, ³*J*_{9b,3a} = 8.3 Hz, ³*J*_{9b,1} = 4.6 Hz, 1 H, 9b-H], 3.31 [m, 1 H, 3a-H], 2.58 [ddd, ²*J*_{gem.} = 12.9 Hz, ³*J*_{3A,2} = 7.6 Hz, ³*J*_{3A,3a} = 5.4 Hz, 1 H, 3-H_A], 2.03 [m, 1 H, 3-H_B] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMF-*d*₇): δ = 172.3 (C, C-10), 170.0 (C, C-11), 148.8 (C, C_{Ar}-2'), 148.0 (C, C_{Ar}-5a), 134.1 und 134.1 (2 × CH, C_{Ar}-5' und C_{Ar}-7), 133.6 (C,

$C_{Ar-1'}$), 130.7 (CH, C_{Ar-7}), 130.6 (CH, $C_{Ar-6'}$), 127.1 (CH, $C_{Ar-4'}$), 125.9 (CH, $C_{Ar-3'}$), 124.5 (C, C_{Ar-9a}), 116.2 (CH, C_{Ar-8}), 112.4 (C, C_{Ar-6}), 63.2 (CH, C-1), 63.1 (CH, C-2), 54.8 (CH, C-4), 45.8 (CH, C-9b), 39.8 (CH, C-3a), 36.4 (CH₂, C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $C_{20}H_{18}ClN_2O_6S$ [$M + H$]⁺: 449.0569; gef.: 449.0561.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (1-amino-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamat (95)



Fmoc-geschütztes Leucin (**94**, 3.00 g, 8.50 mmol), Ammoniumhydrogencarbonat (4.025 g, 50.98 mmol) und Boc_2O (2.04 g, 9.35 mmol) werden in trockenem Dioxan (40 mL) suspendiert. Zu der Suspension wird unter einer Stickstoffatmosphäre trockenes Pyridin (1.511 mL, 18.691 mmol, 2.2 eq.) getropft. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur für 20 h gerührt.

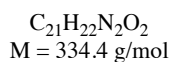
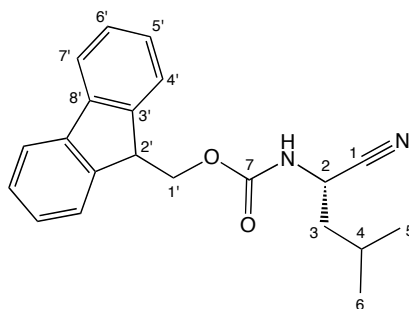
Anschließend wird in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit Wasser (2×50 mL) und 5 %iger Salzsäure (2×50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet. Danach werden die Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck abdestilliert.

Der Rückstand wird aus Ethylacetat / n-Hexan umkristallisiert.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 2.90 g (97 %), Schmp. = 175 °C (Zersetzung), R_f = 0.44 (CH_2Cl_2/EE , 3 : 1). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3315 (w), 2960 (w), 1685 (s), 1666 (s), 1527 (s), 1271 (s), 1250 (s), 1051 (m), 1032 (m), 757 (s), 735 (ss), 635 (w), 621 (w) cm^{-1} . – **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.89 [d, $^3J_{7,6'}$ = 7.5 Hz, 2H, 7'-H_{Ar}], 7.72 [d, $^3J_{4',5'}$ = 7.2 Hz, 2 H, 6'-H_{Ar}], 7.42 [dd, $^3J_{6',7'}$ = 7.5, $^3J_{6',5'}$ = 7.3 Hz, 2 H, 6'-H_{Ar}], 7.35 - 7.30 [m, 3 H, 5'-H_{Ar}, NH_{Carbamate}], 7.22 [s, 1 H, 1 \times NH₂ Amid], 6.94 [s, 1 H, 1 \times NH₂ Amid], 4.34 - 4.19 [m, 3 H, 1'-H, 2'-H], 3.96 [ddd, 3J = 14.0, 3J = 5.2 Hz, 3J = 4.1 Hz, 1 H, 2-H], 1.62 [m, 1 H, 4-H], 1.54 - 1.38 [m, 2 H, 3-H], 0.88 und 0.85 [2 \times d, $^3J_{6,4}$ = $^3J_{5,4}$ = 6.6 Hz, 2 \times CH₃, 6-H und 5-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 174.3 (C, C-1), 155.8 (C, C-7), 143.7 (2 \times C, $C_{Ar-3'}$), 140.6 (2 \times C, $C_{Ar-8'}$), 127.6 (2 \times CH, $C_{Ar-6'}$), 126.9 (2 \times CH, $C_{Ar-5'}$), 125.2 (2 \times CH, $C_{Ar-4'}$), 120.0

(2 × CH, C_{Ar}-7'), 65.4 (CH₂, C-8), 52.8 (CH, C-2), 46.6 (CH, C-2'), 40.7 (CH₂, C-3), 24.2 (CH, C-4), 22.9 und 21.3 (2 × CH₃, C-5 und C-6) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₂₁H₂₅N₂O₃ [M + H]⁺: 353.1860; gef.: 353.1862.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (1-cyano-3-methylbutyl)carbammat (96)

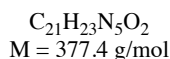
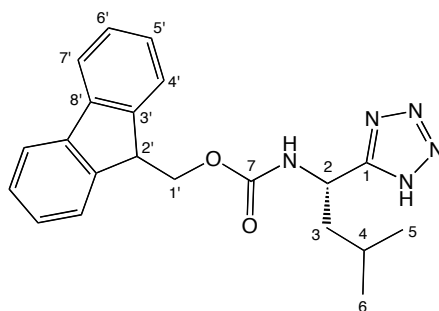


Zu einer klaren Lösung aus Fmoc-Leucinamid (**95**, 2.312 g, 6.560 mmol) in trockenem DMF (30 mL) wird 1.5 eq. Cyanurchlorid (606 mg, 3.280 mmol) gegeben und anschließend 30 min unter einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wird Wasser (150 mL) zugegeben und das ausgefallene Rohprodukt abfiltriert. Der weiße Feststoff wird mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen. Anschließend wird einige Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 2.00 g (91 %), Schmp. = 114 °C, *R_f* = 0.48 (*n*-Hexan/EE, 3 : 1).

– **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ = 3315 (w), 2971 (w), 2942 (w), 1692 (s), 1534 (s), 1255 (m), 1028 (w), 986 (w), 761 (m), 737 (s), 669 (m), 623 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 [d, ³*J*_{7',6'} = 7.4 Hz, 2H, 7'-H_{Ar}], 7.56 [d, ³*J*_{4',5'} = 7.3 Hz, 2 H, 4'-H_{Ar}], 7.40 [dd, ³*J*_{6',5'} = 7.3, ³*J*_{6',7'} = 7.4 Hz, 2 H, 6'-H_{Ar}], 7.31 [dd, ³*J*_{5',4'} = ³*J*_{5',6'} = 7.3 Hz, 2 H, 5'-H_{Ar}], 4.99 [d, ³*J*_{NH,2} = 8.3 Hz, 1 H, NH], 4.62 [dd, ³*J*_{2,NH} = 8.3 Hz, *J* = 16.1, 1 H, 2-H], 4.49 [d, ³*J*_{1',2'} = 6.8 Hz, 2 H, 1'-H], 4.22 [d, ³*J*_{2',1'} = 6.8 Hz, 1 H, 2'-H], 1.83 – 1.65 [m, 3 H, 3-H, 4-H], 0.96 [d, ³*J*_{5,4} = ³*J*_{6,4} = 6.2 Hz, 6 H, 5-H, 6-H] ppm. – **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 155.1 (C, C-7), 143.4 (2 × C, C_{Ar}-3'), 141.3 (2 × C, C_{Ar}-8'), 127.8 (2 × CH, C_{Ar}-6'), 127.1 (2 × CH, C_{Ar}-5'), 124.9 (2 × CH, C_{Ar}-4'), 120.0 (2 × CH, C_{Ar}-7'), 118.7 (C, C-1), 67.4 (CH₂, C-1'), 47.1 (CH, C-2'), 42.1 (CH₂, C-3), 41.3 (CH, C-2), 24.7 (CH, C-4), 22.1 und 21.8 (2 × CH₃, C-5 und C-6) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₂₁H₂₃N₂O₂ [M + H]⁺: 335.1754; gef.: 335.1768.

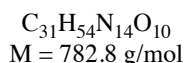
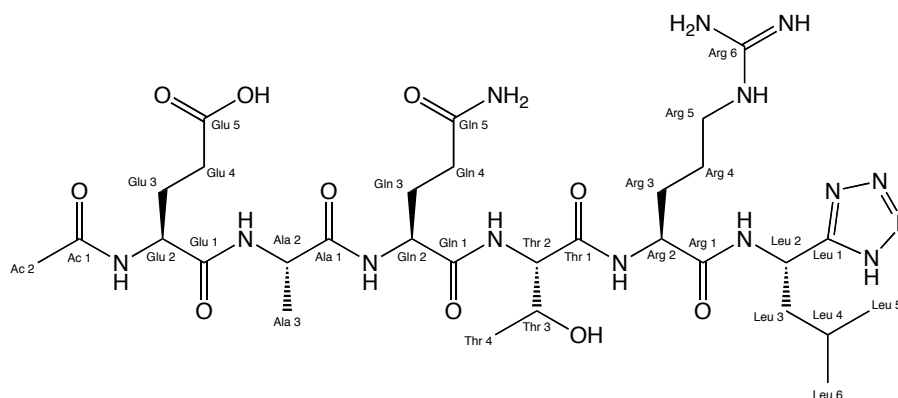
(9H-Fluoren-9-yl)methyl (3-methyl-1-(1H-tetrazol-5-yl)butyl)carbamat (97)


Zu einer klaren Lösung aus Fmoc-Leucinnitril (**96**, 714 mg, 2.136 mmol) in trockenem Toluol (30 mL) werden 1.5 eq. Tributylzinnazid (878 μL , 3.205 mmol) gegeben und anschließend 28 h unter Rückfluss erhitzt.

Nach dem Abkühlen wird mit Ethylacetat (20 mL) überschichtet, konzentrierte Salzsäure (20 mL) zugegeben und 20 min. bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat ($2 \times 30 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (80 mL) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und bis zur Trockne eingengt. Der weiße Rückstand wird aus Ethylacetat / *n*-Hexan umkristallisiert

Weißer Feststoff, Ausbeute: 589 mg (73 %), Schmp. = 192 °C, $R_f = 0.86$ (*n*-Hexan/EE, 3 : 1).

– **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 3308$ (m), 2877 (w), 1682 (ss), 1534 (s), 1320 (m), 1262 (s), 1048 (m), 879 (w), 804 (w), 761 (s), 742 (ss), 646 (m) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + 1\% \text{ MeOH-}d_4$): $\delta = 7.78$ [d, $^3J_{7',6'} = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, 7'- H_{Ar}], 7.45 [d, $^3J_{4',5'} = 7.3 \text{ Hz}$, 2 H, 4'- H_{Ar}], 7.33 [dd, $^3J_{6',5'} = ^3J_{6',7'} = 7.6 \text{ Hz}$, 2 H, 6'- H_{Ar}], 7.20 [dd, $^3J_{5',6'} = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J_{5',4'} = 7.3 \text{ Hz}$, 2 H, 5'- H_{Ar}], 6.21 [d, $^3J_{\text{NH},2} = 8.5 \text{ Hz}$, 1 H, NH], 5.10 [m, 1 H, 2-H], 4.35 [dd, $^{\text{gem}}J = 10.4 \text{ Hz}$, $^3J_{1'\text{A},2'} = 7.2 \text{ Hz}$, 1 H, 1'- H_{A}], 4.49 [dd, $^{\text{gem}}J = 10.4 \text{ Hz}$, $^3J_{1'\text{B},2'} = 6.8 \text{ Hz}$, 2 H, 1'- H_{B}], 4.17 [dd, $^3J_{2',1'\text{A}} = 7.2 \text{ Hz}$, $^3J_{2',1'\text{B}} = 6.8 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H], 1.93–1.76 [m, 2 H, 3-H], 1.59 [sep, $^3J_{4,5} = ^3J_{4,6} = 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, H-4], 0.94 und 0.92 [$2 \times$ d, $^3J_{5,4} = ^3J_{6,4} = 7.0 \text{ Hz}$, $2 \times 3 \text{ H}$, 5-H, 6-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + 1\% \text{ MeOH-}d_4$): $\delta = 158.5$ (C, C-1), 156.5 (C, C-7), 143.4 ($2 \times$ C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}3'$), 141.2 ($2 \times$ C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}8'$), 127.7 ($2 \times$ CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}6'$), 127.0 ($2 \times$ CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}5'$), 124.8 ($2 \times$ CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}4'$), 119.9 ($2 \times$ CH, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-}7'$), 67.1 (CH_2 , C-1'), 46.9 (CH, C-2'), 44.1 (CH, C-2), 42.2 (CH_2 , C-3), 24.6 (CH, C-4), 22.4 und 21.7 ($2 \times$ CH_3 , C-5 und C-6) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 378.1925; gef.: 378.1925.

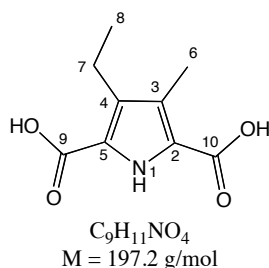
***N*-Acetyl-glutamyl-alanyl-glutaminyl-serinyl-arginyl-leucintetrazol (100)**


2-Chlortritylchlorid-Harz (100 mg, 1.3 mmol/g) wird mit einer Lösung aus Fmoc-Tetrazolleucin (**97**, 245 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) und DIPEA (276 μ L, 1.63 mmol, 12.5 eq.) in Dichlormethan (1 mL) über Nacht in einer 2 mL Plastikspritze mit PE-Filter inkubiert. Das Harz wird gewaschen (2 \times Dichlormethan, 3 \times DMF, 1 \times Dichormethan) und anschließend mit Dichlormethan/Methanol/DIPEA, 80 : 15 : 5 inkubiert (2 \times 10 min). Dann wird mit 25 % Piperidin in DMF (2 \times 2 min) die Fmoc-Gruppe abgespalten und gewaschen (3 \times DMF, 2 \times Dichlormethan). Danach wird das Harz mit einer Lösung aus Arginin (431 mg, 0.63 mmol, 5 eq.), HOBt (99 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) und DIC (101 μ L, 0.65 mmol, 5 eq.) 2 h inkubiert, gewaschen (3 \times DMF, 2 \times Dichlormethan) und mit 20 % Piperidin in DMF (2 \times 10 min) entschützt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren Threonin (258 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) Glutamin (398 mg, 0.63 mmol, 5 eq.), Alanin (202 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) und Glutaminsäure (277 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) werden jeweils in einer Lösung aus der Aminosäure, HOBt (99 mg, 0.63 mmol, 5 eq.) und DIC (101 μ L, 0.65 mmol, 5 eq.) in DMF, wie für das Arginin beschrieben, gekuppelt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vor jedem Kupplungsschritt erfolgt mit 10 % Piperidin in DMF (2 \times 10 min) gefolgt vom Waschen des Harzes (3 \times DMF, 2 \times Dichlormethan). Zur abschließenden Acetylierung wird das Harz mit DMF/Acetanhydrid/DIPEA (8 : 1 : 1) 10 min inkubiert. Das Peptidanalogen **100** wird mit TFA/H₂O/TIS/Phenol, 95 : 2 : 2 : 1 vom Harz abgespalten. Die Lösung wird eingeeengt und das Rohprodukt mit Diethylether ausgefällt. Der Rückstand wird mittels HPLC (MeCN/H₂O, 5 bis 100 % in 40 min) gereinigt. Die Produktfraktionen werden lyophilisiert.

Weißer Feststoff. Ausbeute: 32.1 mg (82 %). – ¹H-NMR (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ = 5.35 [dd, ³*J* = 9.7 Hz, ³*J* = 5.4 Hz, 1H, Leu 2-H], 4.40 [dd, ³*J* = 9.1, ³*J* = 4.7, Hz, 1 H, Arg 2-H], 4.31 – 4.17 [m, 5 H, Glu 2-H, Gln 2-H, Ala 2-H, Thr 2-H und 3-H], 3.21 – 3.15 [m, 2 H, Arg 5-H], 2.47 – 2.36 [m, 4 H, Glu 4-H, Gln 4-H], 2.16 – 1.88 [m, 9 H, Ac 2-H, Glu 3-H, Gln 3-H, Arg

3-H], 1.83 – 1.58 [m, 6 H, Arg 4-H, Leu 4-H und 3-H], 1.41 [d, $^3J_{\text{Ala3, Ala2}} = 7.2$ Hz, 3 H, Ala 3-H], 1.21 [d, $^3J_{\text{Thr4, Thr3}} = 6.2$ Hz, 3 H, Thr 4-H], 0.98 und 0.95 [$2 \times$ d, $^3J_{\text{Leu5, Leu4}} = ^3J_{\text{Leu6, Leu4}} = 6.8$ Hz, 6 H, Leu 5-H und 6-H] ppm. – $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 177.9$ (C, Glu C-5), 176.0 (C, Ala C-1), 174.1 (C, Ac C-1), 176.6, 175.0, 174.4, 173.6 und 173.0 ($5 \times$ C, Arg C-1, Thr C-1, Glu C-1, Gln C-1 und C-5), 160.1 (C, Leu C-1), 158.6 (C, Arg C-6), 68.2 (CH, Thr C-3), 61.1 (CH, Thr C-2), 55.6, 55.1 und 54.3 ($3 \times$ CH, Arg C-2, Gln C-2 und Glu C-2), 51.9 (CH, Ala C-2), 44.5 (CH, Leu C-2), 43.3 (CH₂, Leu C-3), 41.9 (CH₂, Arg C-5), 32.7 und 31.2 ($2 \times$ CH₂, Gln C-4 und Glu C-4), 29.7, 27.9 und 27.8 ($3 \times$ CH₂, Arg C-3, Gln C-3 und Glu C-3), 26.2 (CH₂, Arg C-4), 25.7 (CH, Leu C-4), 23.2 und 21.9 ($2 \times$ CH₃, Leu C-5 und C-6), 22.5 (CH₃, Ac C-2), 20.1 (CH₃, Thr C-4), 17.3 (CH₃, Ala C-3) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₃₁H₅₅N₁₄O₁₀ [M + H]⁺: 783.4220; gef.: 783.4243.

3-Ethyl-4-methyl-1H-pyrrol-2,5-dicarbonsäure (106)



3-Ethyl-4-methyl-1H-pyrrol-2,5-dicarbonsäure-5-ethylester (**116**, 10 mg, 0.044 mmol) wird in 0.75 M NaOH (10 mL) suspendiert. Dann wird Methanol zugegeben bis eine klare Lösung entsteht und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Amberlite IR 120 H⁺-Form neutralisiert. Das Ionenaustauscherharz wird abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert.

Rot-brauner Feststoff, Ausbeute: 7.9 mg (99 %), Schmp. = 199 – 205 °C (Zersetzung), $R_f = 0.31$ (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 2969$ (w), 2935 (w), 2873 (w), 1685 (ss), 1277 (ss), 1195 (s), 827 (w), 788 (m), 659 (w), 621 (w) cm⁻¹. – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2.67$ [q, $^3J_{7,8} = 7.4$ Hz, 2 H, 7-H], 2.19 [s, 3 H, 6-H], 1.01 [t, $^3J_{8,7} = 7.4$ Hz, 3 H, 8-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 162.2$ und 162.0 ($2 \times$ C, C-9 und C-10), 131.8 (C, C-4), 124.5 (C, C-3), 121.5 (C, C-5), 122.3 (C, C-2), 17.3 (CH₂, C-7), 15.2 (CH₃, C-8), 9.6 (CH₃, C-6) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₉H₁₂NO₄⁺ [M + H]⁺: 198.0761; gef.: 198.0756.

5.3 DVL3-PDZ-Domäne

5.3.1 Assays

Fluoreszenzpolarisations-Assay

Der FP-Assay wurde in unbehandelten, schwarzen, 384-well Mikrotiterplatten (*Corning B.V. Life Sciences*, Schipol-Rijk, Niederlande) in einem finalen Volumen von 10 μ L durchgeführt. Dazu wurde 20 mM HEPES Puffer (pH 7.4) mit 50 mM NaCl und 0.1 % Non-Idet verwendet. Die Messungen wurden im *microplate reader* Safire II (*Tecan*, Crailsheim, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emmisionswellenlänge von 525 nm für Fluorescein (Fluo) bzw. einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emmisionswellenlänge von 590 nm für Tetramethylrhodamin (TAMRA) markierte Peptide durchgeführt. Die Peptide **118 – 164** wurden in einer Konzentration von 10 nM gegen steigenden Konzentrationen (0 – 100 μ M) der hDVL3-PDZ-Domäne titriert. Die so ermittelten FP-Daten wurden im Programm GraphPad Prism 4 für Windows bzw. GraphPad Prism 5 für Windows (*GraphPad*, La Jolla, USA) durch nichtlineare Regression (*curve fit*) analysiert.

ITC Messungen

Die ITC-Messungen wurden in einer VP-ITC (*MicroCal*, Freiburg, Deutschland) mit einem Zellvolumen von 1.4 mL bei 20 °C durchgeführt. Die Messungen an der hDVL3-PDZ-Domäne wurden mit einer Protein Konzentration von 103 μ M und Ligandkonzentrationen von 1.24 mM bis 8.4 mM in HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 50 mM NaCl und 0.3 % bis 1.4 % DMSO durchgeführt. Für die Messung an der hDVL1-PDZ-Domäne wurde eine Proteinkonzentration von 103 μ M eingesetzt, die Ligandenkonzentration betrug 8.4 mM, in HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 50 mM NaCl und 1.4 % DMSO.

5.3.2 Synthese

Peptide

Fluo-K L M T T V-OH (**118**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{68}N_7O_{15}S$ $[M + H]^+$: 1050.4489 gef.: 1050.4516.

Fluo-L K L M T T V-OH (**119**) exakte Masse ber. für $C_{57}H_{79}N_8O_{16}S$ $[M + H]^+$: 1163.5329 gef.: 1163.5354.

Fluo-S L K L M T T V-OH (**120**) exakte Masse ber. für $C_{60}H_{84}N_9O_{18}S$ $[M + H]^+$: 1250.5650 gef.: 1250.5670.

Fluo-W K W Y G W F-OH (**121**) exakte Masse ber. für $C_{60}H_{83}N_9O_{18}S$ $[M + H]^+$: 1430.5517 gef.: 1430.5537.

TAMRA-W K D Y W I D G K-NH₂ (**122**) exakte Masse ber. für $C_{84}H_{102}N_{16}O_{18}$ $[M + 2H]^{2+}$: 811.3774 gef.: 811.3818.

Fluo-V V V-OH (**123**) exakte Masse ber. für $C_{36}H_{40}N_3O_{10}$ $[M + H]^+$: 674.2708 gef.: 674.2700.

Fluo-V W V-OH (**124**) exakte Masse ber. für $C_{42}H_{41}N_4O_{10}$ $[M + H]^+$: 761.2817 gef.: 761.2808.

Fluo-A V W V-OH (**125**) exakte Masse ber. für $C_{45}H_{46}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 832.3188 gef.: 832.3204.

Fluo-R V W V-OH (**126**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{53}N_8O_{11}$ $[M + H]^+$: 917.3828 gef.: 917.3846.

Fluo-N V W V-OH (**127**) exakte Masse ber. für $C_{46}H_{47}N_6O_{12}$ $[M + H]^+$: 875.3246 gef.: 875.3261.

Fluo-D V W V-OH (**128**) exakte Masse ber. für $C_{46}H_{46}N_5O_{13}$ $[M + H]^+$: 876.3087 gef.: 876.3101.

Fluo-C V W V-OH (**129**) exakte Masse ber. für $C_{45}H_{46}N_5O_{11}S$ $[M + H]^+$: 864.1909 gef.: 864.2934.

Fluo-Q V W V-OH (**130**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{49}N_6O_{12}$ $[M + H]^+$: 889.3403 gef.: 889.3404.

Fluo-E V W V-OH (**131**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{48}N_5O_{13}$ $[M + H]^+$: 890.3243 gef.: 890.3238.

Fluo-G V W V-OH (**132**) exakte Masse ber. für $C_{44}H_{44}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 818.3032 gef.: 818.3049.

Fluo-H V W V-OH (**133**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{48}N_7O_{11}$ $[M + H]^+$: 898.3406 gef.: 898.3399.

- Fluo-I V W V-OH (**134**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{52}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 874.3658 gef.:
874.3668.
- Fluo-L V W V-OH (**135**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{52}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 874.3658 gef.:
874.3670.
- Fluo-K V W V-OH (**136**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{53}N_6O_{11}$ $[M + H]^+$: 889.3767 gef.:
889.3762.
- Fluo-M V W V-OH (**137**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{50}N_5O_{11}S$ $[M + H]^+$: 892.3222 gef.:
892.3240.
- Fluo-F V W V-OH (**138**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{50}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 908.3501 gef.:
908.3507.
- Fluo-P V W V-OH (**139**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{48}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 858.3345 gef.:
858.3366.
- Fluo-S V W V-OH (**140**) exakte Masse ber. für $C_{45}H_{46}N_5O_{12}$ $[M + H]^+$: 848.3137 gef.:
848.3143.
- Fluo-T V W V-OH (**141**) exakte Masse ber. für $C_{46}H_{48}N_5O_{12}$ $[M + H]^+$: 862.3294 gef.:
862.3312.
- Fluo-W V W V-OH (**142**) exakte Masse ber. für $C_{53}H_{51}N_6O_{11}$ $[M + H]^+$: 947.3610 gef.:
947.3634.
- Fluo-Y V W V-OH (**143**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{50}N_5O_{12}$ $[M + H]^+$: 924.3450 gef.:
924.3430.
- Fluo-V V W V-OH (**144**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{50}N_5O_{11}$ $[M + H]^+$: 860.3501 gef.:
860.3512.
- Fluo-A S V W V-OH (**145**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{51}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 919.3509 gef.:
919.3528.
- Fluo-R S V W V-OH (**146**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{58}N_9O_{13}$ $[M + H]^+$: 1004.4149 gef.:
1004.4176.
- Fluo-N S V W V-OH (**147**) exakte Masse ber. für $C_{49}H_{52}N_7O_{14}$ $[M + H]^+$: 962.3567 gef.:
962.3599.
- Fluo-D S V W V-OH (**148**) exakte Masse ber. für $C_{49}H_{51}N_6O_{15}$ $[M + H]^+$: 963.3407 gef.:
963.3442.
- Fluo-C S V W V-OH (**149**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{51}N_6O_{13}S$ $[M + H]^+$: 951.3229 gef.:
951.3259.
- Fluo-Q S V W V-OH (**150**) exakte Masse ber. für $C_{50}H_{54}N_7O_{13}$ $[M + H]^+$: 976.3723 gef.:
976.3758.

Fluo-E S V W V-OH (**151**) exakte Masse ber. für $C_{50}H_{53}N_6O_{15}$ $[M + H]^+$: 977.3563 gef.:
977.3589.

Fluo-G S V W V-OH (**152**) exakte Masse ber. für $C_{47}H_{49}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 905.3352 gef.:
905.3377.

Fluo-H S V W V-OH (**153**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{53}N_8O_{13}$ $[M + H]^+$: 985.3727 gef.:
985.3750.

Fluo-I S V W V-OH (**154**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{57}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 961.3978 gef.:
961.3995.

Fluo-L S V W V-OH (**155**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{57}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 961.3978 gef.:
961.3989.

Fluo-K S V W V-OH (**156**) exakte Masse ber. für $C_{51}H_{58}N_7O_{13}$ $[M + H]^+$: 976.4087 gef.:
976.4103.

Fluo-M S V W V-OH (**157**) exakte Masse ber. für $C_{50}H_{55}N_6O_{13}S$ $[M + H]^+$: 979.3542 gef.:
979.3558.

Fluo-F S V W V-OH (**158**) exakte Masse ber. für $C_{54}H_{55}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 995.3822 gef.:
995.3846.

Fluo-P S V W V-OH (**159**) exakte Masse ber. für $C_{50}H_{53}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 945.3665 gef.:
945.3684.

Fluo-S S V W V-OH (**160**) exakte Masse ber. für $C_{48}H_{51}N_6O_{14}$ $[M + H]^+$: 935.3458 gef.:
935.3483.

Fluo-T S V W V-OH (**161**) exakte Masse ber. für $C_{49}H_{53}N_6O_{14}$ $[M + H]^+$: 949.3614 gef.:
1034.3934.

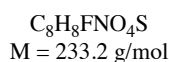
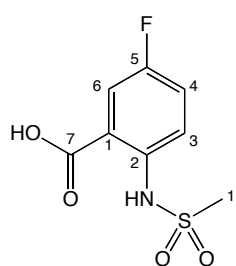
Fluo-W S V W V-OH (**162**) exakte Masse ber. für $C_{56}H_{56}N_7O_{13}$ $[M + H]^+$: 1034.3931 gef.:
947.3634.

Fluo-Y S V W V-OH (**163**) exakte Masse ber. für $C_{54}H_{55}N_6O_{14}$ $[M + H]^+$: 1011.3771 gef.:
1011.3797.

Fluo-V S V W V-OH (**164**) exakte Masse ber. für $C_{50}H_{55}N_6O_{13}$ $[M + H]^+$: 947.3822 gef.:
947.3829.

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Anthranilsäurederivate 166 - 169

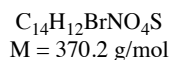
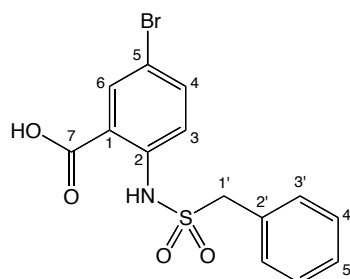
Zu einer Lösung aus 2-Amino-5-brom-benzoesäure (**170**, 100 mg, 0.46 mmol) – im Fall von **166** 2-Amino-5-fluor-benzoesäure (100 mg, 0.64 mmol) - in gesättigter Na₃CO₃ Lösung (10 mL) wird das Sulfonylchlorid (**171** – **173**; 1.2 eq.) gegeben und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Dichlormethan (10 mL) zugegeben und vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Die organische Phase wird mit 5 %iger Salzsäure gewaschen (2 × 10 mL, getrocknet (Na₂SO₄) und eingengt. Das Produkt wird, wenn nötig, durch RP-HPLC gereinigt.

5-Fluor-2-methansulfonylamino-benzoesäure (166)

Sulfonylchlorid: Methansulfonsäurechlorid (60 µL, 0.77 mmol)

Beigefarbener Feststoff, Ausbeute: 132 mg (88 %), Schmp. = 216 °C (Zersetzung), $R_f = 0.29$ (CHCl₃/MeOH/AcOH/H₂O, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 1684$ (s), 1497 (s), 1429 (s), 1339 (m), 1239 (s), 1158 (ss), 1140 (ss), 977 (s), 969 (s), 910 (s), 893 (s), 838 (ss), 764 (ss), 749 (m), 673 (ss), 639 (m), 606 (w) cm⁻¹. – **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆): $\delta = 7.72$ (dd, ³ $J_{6,F} = 9.2$ Hz, ⁴ $J_{6,4} = 3.1$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}), 7.61 (dd, ³ $J_{3,4} = 9.1$ Hz, ⁴ $J_{3,F} = 4.9$ Hz, 1 H, 3-H_{Ar}), 7.53 (ddd, ³ $J_{4,3} = 9.1$ Hz, ³ $J_{4,F} = 7.9$ Hz, ⁴ $J_{4,6} = 3.1$ Hz, 1 H, 4-H_{Ar}), 3.15 (s, 3 H, 1'-H) ppm. – **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) $\delta = 168.7$ (d, ⁴ $J_{7,F} = 2.3$ Hz, C, C-7), 157.5 (d, $J_{5,F} = 241.1$ Hz, C, C_{Ar}-5), 136.9 (d, ⁴ $J_{2,F} = 5.4$ Hz, C, C_{Ar}-2), 121.9 (d, ² $J_{4,F} = 22.7$ Hz, CH, C_{Ar}-4), 121.3 (d, ³ $J_{3,F} = 7.9$ Hz, CH, C_{Ar}-3), 119.1 (d, ³ $J_{1,F} = 6.9$ Hz, C, C_{Ar}-1), 117.7 (d, ² $J_{6,F} = 23.9$ Hz, CH, C_{Ar}-6), 39.8 (s, CH₃, C-1'). – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für C₈H₉FNO₄S⁺ [M + H]⁺: 234.0231; gef.: 234.0223.

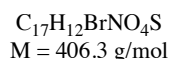
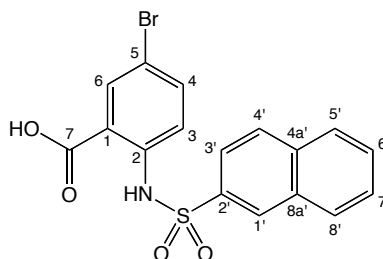
5-Brom-2-phenylmethylsulfonylamino-benzoesäure (167)



Sulfonylchlorid: Phenylmethansulfonylchlorid (**171**; 106 mg, 0.56 mmol).

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 71 mg (42 %), Schmp. = 216 °C (Zersetzung), $R_f = 0.47$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH/H_2O$, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 1654$ (s), 1477 (m), 1427 (m), 1226 (s), 1268 (m), 1155 (m), 1135 (s), 932 (s), 881 (m), 848 (s), 833 (s), 775 (s), 696 (ss), 657 (s), 625 (s) cm^{-1} . – **1H -NMR** (300 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 10.57$ [s, 1 H, COOH], 8.05 [d, $^4J_{6,4} = 2.4$ Hz, 1 H, 6- H_{Ar}], 7.75 [dd, $^3J_{4,3} = 8.9$ Hz, $^4J_{4,6} = 2.4$ Hz, 1 H, 4- H_{Ar}], 7.49 [d, $^3J_{3,4} = 8.9$ Hz, 1 H, 3- H_{Ar}], 7.33 – 7.28 [m, 3 H, 3'- H_{Ar} , 5'- H_{Ar}], 7.23 – 7.20 [m, 2 H, 4'- H_{Ar}], 5.75 [s, 1 H, NH], 4.72 [s, 2 H, 1'-H] ppm. – **^{13}C -NMR** (75 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 168.3$ (C, C-7), 139.9 (C, C_{Ar-2}), 137.0 (CH, C_{Ar-4}), 133.4 (CH, C_{Ar-6}), 130.7 (CH, $C_{Ar-3'}$), 128.6 (C, $C_{Ar-2'}$), 128.4 (CH, $C_{Ar-5'}$), 128.3 (CH, $C_{Ar-4'}$), 119.5 (CH, C_{Ar-3}), 117.5 (C, C_{Ar-1}), 113.9 (C, C_{Ar-5}), 57.4 (CH_2 , C-1') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $C_{14}H_{11}BrNO_4S^-$ [$M - H$]: 367.9598; gef.: 367.9609.

5-Brom-2-(naphthyl-2-sulfonylamino)-benzoesäure (168)

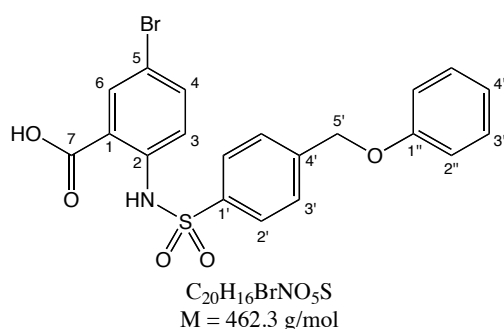


Sulfonylchlorid: Naphthylsulfonylchlorid (**172**; 126 mg, 0.56 mmol).

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 126 mg (67 %), Schmp. = 199 °C (Zersetzung), $R_f = 0.50$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH/H_2O$, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 1667$ (m), 1486 (m), 1430 (m),

1336 (m), 1234 (s), 1167 (s), 1153 (s), 1073 (m), 924 (m), 861 (s), 838 (m), 824 (s), 811 (s), 742 (s), 700 (w), 686 (w), 653 (ss), 636 (s), 617 (s) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.59$ [d, $^4J_{1',3'} = 1.4$ Hz, 1 H, 1'-H], 8.17 [d, $^3J_{8',7'} = 7.8$ Hz, 1 H, 8'-H_{Ar}], 8.10 [d, $^3J_{4',3'} = 8.8$ Hz, 1 H, 4'-H_{Ar}], 8.02 [d, $^3J_{5',6'} = 7.8$ Hz, 1 H, 5'-H_{Ar}], 7.93 [d, $^4J_{6,4} = 2.4$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 7.77 [dd, $^3J_{3',4'} = 8.8$ Hz, $^4J_{3',1'} = 1.4$ Hz, 1 H, 3'-H_{Ar}], 7.72 – 7.65 [m, 3 H, 4-H_{Ar}, 6'-H_{Ar}, 7'-H_{Ar}], 7.51 [d, $^3J_{3,4} = 8.9$ Hz, 1 H, 3-H_{Ar}] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 168.2$ (C, C-7), 138.8 (C, C_{Ar}-2), 136.8 (CH, C_{Ar}-4), 135.3 (C, C_{Ar}-4a'), 134.4 (C, C_{Ar}-8a'), 133.4 (CH, C_{Ar}-6), 131.4 (CH, C_{Ar}-6'), 129.3 (CH, C_{Ar}-4'), 128.5 (CH, C_{Ar}-8'), 127.8 und 127.8 (2 × CH, C_{Ar}-5' und C_{Ar}-7'), 121.6 (CH, C_{Ar}-3'), 120.6 (CH, C_{Ar}-3), 119.0 (C, C_{Ar}-1), 114.9 (C, C_{Ar}-5) ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrNO}_4\text{S}^-$ [M - H]⁻: 403.9598; gef.: 403.9613.

5-Brom-2-(4-phenoxyethyl-benzylsulfonylamino)-benzoesäure (169)



Sulfonylchlorid: 4-(Phenoxyethyl)benzyl-1-sulfonylchlorid (**173**; 158 mg, 0.56 mmol).

Farbloser Feststoff, Ausbeute: 62 mg (29 %), Schmp. = 175 °C (Zersetzung), $R_f = 0.58$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$, 120 : 15 : 3 : 2). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu} = 1690$ (s), 1490 (m), 1387 (m), 1316 (m), 1240 (s), 1208 (s), 1166 (ss), 1146 (m), 913 (m), 881 (w), 848 (m), 824 (m), 798 (s), 757 (ss), 694 (ss), 652 (s), 613 (w) cm^{-1} . – **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.97$ [d, $^4J_{6,4} = 2.4$ Hz, 1 H, 6-H_{Ar}], 7.85 [d, $^3J_{3',2'} = 8.3$ Hz, 2 H, 3'-H_{Ar}], 7.73 [dd, $^3J_{4,3} = 8.9$ Hz, $^4J_{4,6} = 2.4$ Hz, 1 H, 4-H_{Ar}], 7.63 [d, $^3J_{2',3'} = 8.3$ Hz, 2 H, 2'-H_{Ar}], 7.47 [d, $^3J_{3,4} = 8.9$ Hz, 1 H, 3-H_{Ar}], 7.29 [dd, $^3J_{3'',4''} = ^3J_{3'',2''} = 7.3$ Hz, 2 H, 3''-H_{Ar}], 7.00 – 6.92 [m, 3 H, 4''-H_{Ar}, 2''-H_{Ar}], 5.17 [s, s H, 5'-H] ppm. – **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 168.2$ (C, C-7), 157.9 (C, C_{Ar}-1''), 143.2 (C, C_{Ar}-4'), 138.8 (C, C_{Ar}-2), 137.5 (C, C_{Ar}-1'), 136.9 (CH, C_{Ar}-4), 133.5 (CH, C_{Ar}-6), 129.4 (CH, C_{Ar}-3''), 128.1 (CH, C_{Ar}-2'), 127.0 (CH, C_{Ar}-3'), 120.9 (CH, C_{Ar}-4''), 120.5 (CH, C_{Ar}-3), 119.0 (C, C_{Ar}-1), 114.9 (C, C_{Ar}-5), 114.7 (CH, C_{Ar}-2''), 68.0 (CH₂, C-5') ppm. – **HR-ESI-MS**: exakte Masse ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{BrNO}_5\text{S}^-$ [M - H]⁻: 459.9860; gef.: 459.9878.

6 Literatur

- [1] Pawson T., Nash P., Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **2003**, *300*, 445-452.
- [2] Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **1995**, *373*, 573-580.
- [3] Pawson T., Raina M., Nash P. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 2-10.
- [4] Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, *116*, 205-219.
- [5] Blazer, L. L.; Neubig, R. R. Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents: current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacol.* **2009**, *34*, 126-141.
- [6] Naisbitt S., Kim E., Tu J. C., Xiao B., Sala C., Valtschanoff J., Weinberg R. J., Worley P. F., Sheng M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* **1999**, *23*, 569-582.
- [7] Dübel, S.; Rohrbach, P.; Schmiedl, A. Rekombinante Antikörper. *Biol. Unserer Zeit* **2004**, *34*, 372-379.
- [8] Downing, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**. *16*, 89-111.
- [9] Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*, 194-204.
- [10] Perez, E. A. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2086-2095.
- [11] Rusan, N. M.; Fagerstorm, C. J.; Yvon, A.-M., C.; Wadsworth, P. Cell cycle dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein α tubulin. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 971-980.
- [12] Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
- [13] Conte L. L., Chothia C., Janin J., The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177-2198.

- [14] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and developmental setting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [15] Whitty, A.; Kumaraval, G. Between a rock and a hard place? *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 112-118.
- [16] Cunningham, B. C.; Wells, J. A. Comparison of a structural and a functional epitope. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554-563.
- [17] Clackson, T.; Wells, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, *267*, 383-386.
- [18] DeLano, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 14-20.
- [19] Wells, J. A. Systematic mutational analysis of protein-protein interfaces. *Method. Enzymol.* **1991**, *202*, 390-411.
- [20] Cunningham, B. C.; Wells, J. A. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **1989**, *244*, 1081-1085.
- [21] Atwell, S.; Ultsch, M.; De Vos, A. M.; Wells, J. A. Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface. *Science* **1997**, *278*, 1125-1128.
- [22] Pearce Jr., K. H.; Ultsch, M. H.; Kelley, R. F.; de Vos, A. M.; Wells, J. A. Structural and mutational analysis of affinity-inert contact residues at the Growth hormone receptor interface. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10300-10307.
- [23] Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1-9.
- [24] Schlessinger, J.; Lemmon, M. A. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE* **2003**, *191*, re12.
- [25] Nguyen, J. T.; Turck, C. W.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N.; Lim, W. A. Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science* **1998**, *282*, 2088-2092.
- [26] Waksman, G.; Kominos, D.; Robertson, S. C.; Pant, N.; Baltimore, D.; Birge, R. B.; Cowburn, D.; Hanafusa, H.; Mayer, B. J.; Overduin, M.; Resh, M. D.; Rios, C. B.; Silverman, L.; Kuriyan, J. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complex with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* **1992**, *358*, 646-653.
- [27] Zhou, M. M.; Ravichandran, K. S.; Olejniczak, E. F.; Petros, A. M.; Meadows, R. P.; Sattler, M.; Harlan, J. E.; Wade, W. S.; Burakoff, S. J.; Fesik, S. W. Structure and

- ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **1995**, 378, 584-592.
- [28] Verdecia, M. A.; Bowman, M. E.; Lu, K. P.; Hunter, T.; Noel, J. P. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 639-643.
- [29] Jacobs, S. A.; Khorasanizadeh S Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **2002**, 295, 2080-2083.
- [30] Owen, D. J.; Ornaghi, P.; Yang, J. C.; Lowe, N.; Evans, P. R.; Ballario, P.; Neuhaus, D.; Filetici, P.; Travers, A. A.; The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* **2000**, 19, 6141-6149.
- [31] Swanson, K. A.; Kang, R. S.; Stamenova, S. D.; Hicke, L.; Radhakrishnan, I. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J.* **2003**, 15, 4597-4606.
- [32] Sudol, M.; Sliwa, K.; Russo, T. Function of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* **2001**, 490, 190-195.
- [33] Fedorov, A. A.; Fedorov, E.; Gertler, F.; Aimo, S. C. Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 661-665.
- [34] Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996, 85, 1067-1076.
- [35] Brenman J. E., Chao D. S., Gee S. H., McGee A. W., Craven S. E., Santillano D. R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M. F., Froehner S. C., Bredt D. S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **1996**, 84, 757-767.
- [36] Stapleton, D.; Balan, I.; Pawson, T.; Sicheri, F. The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 44-49.
- [37] Santagata, S.; Boggon, T. J.; Baird, C. L.; Gomez, C. A.; Zhao, J.; Shan, W. S.; Myszka, D. G.; Shapiro, L. G-protein signaling through tubby proteins. *Science* **2001**, 292, 2041-2050.

- [38] Ferguson, K. M.; Lemmon, M. A.; Schlessinger, J.; Sigler, P. B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **1995**, *83*, 1037-1046.
- [39] Yaffe, M. B. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 177-186.
- [40] Lemmon, M. A.; Ladbury, J. E. Thermodynamic studies of tyrosyl-phosphopeptide binding to the SH2 domain of p56lck. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5070-5076.
- [41] Gilmer, T.; Rodriguez, M.; Jordan, S.; Crosby, R.; Alligood, K.; Green, M.; Kimery, M.; Wagner, C.; Kinder, D.; Charifson, P. Peptide inhibitors of src SH3-SH2-phosphoprotein interactions. *J. Biol. Chem.* **1994** *269*, 31711-31719.
- [42] Kuriyan, J.; Cowburn, D. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 259-288.
- [43] Zhou, M.-M.; Ravichandran, K. S.; Olejniczak, E. T.; Petros, A. M.; Meadows, R. P.; Sattler, M.; Harlan, J. E.; Wade, W. S.; Burakoff, S. J.; Fesik, S. W. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **1995**, *378*, 584-592.
- [44] Sudol, M.; Sliwa, K.; Russo, T. Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* **2001**, *490*, 190-195.
- [45] Verdica, M. A.; Bowman, M. E.; Lu, K. P.; Hunter, T.; Noel, J. P. Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 639-643.
- [46] Zarrinpar, A.; Bhattacharyya, R. P.; Lim, W. A. The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE* **2003**, *179*, re8.
- [47] Musacchio, A.; Saraste, M.; Wilmanns, M. High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 546-551.
- [48] Rubin, G. M. *et al.* Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **2000**, *287*, 2204-2215.
- [49] Huang, X.; Poy, F.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Sudol, M.; Eck, M. J. Structure of WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 634-638.
- [50] Qiao, F.; Bowie, J. U. The many faces of SAM. *Sci. STKE* **2005**, *286*, re7.
- [51] Baron, M. K.; Boeckers, T. M.; Vaida, B.; Faham, S.; Gingery, M.; Sawaya, M. R.; Salyer, D.; Gundelfinger, E. D.; Bowie, J. U. An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* **2006**, *311*, 531-535.

- [52] Joshi M., Vargas C., Boisguerin P., Diehl A., Krause G., Schmieder P., Koelling K., Hagen V., Schade M., Oschkinat H., Discovery of low-molecular-weight ligands for the AF6 PDZ domain. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3874-3879.
- [53] Sheng M., Sala C., PDZ Domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 1-29.
- [54] Doyle D. A., Lee A., Lewis J., Kim E., Sheng M., MacKinnon R. Crystal Structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **1996**, *85*, 1067-1076.
- [55] Nourry C., Grant S. G. N., Borg J.-P. PDZ domain proteins: Plug and play! *Sci.STKE* **2003**, *179*, re7.
- [56] Kornau H. C., Schenker L. T., Kennedy M. B., Seeburg P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the post synaptic density protein PSD-95. *Science* **1995**, *269*, 1737-1740.
- [57] Naisbitt S., Kim E., Tu J. C., Xiao B., Sala C., Valtschanoff J., Weinberg R. J., Worley P. F., Sheng M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* **1999**, *23*, 569-582.
- [58] Hata Y., Butz S., Sudhof T. C. CASK: A novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2488-2494.
- [59] Borg J.-P., Marchetto S., Le Bivic A., Ollendorff V., Jaulin-Bastard F., Saito H., Fournier E., Adélaïde J., Margolis B., Birnbaum D. ERBIN: A basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat. Cell. Biol.* **2000**, *2*, 407-414.
- [60] Huang Y. Z., Wang Q., Xiong W. C., Mei L. Erbin is a protein concentrated at postsynaptic membranes that interacts with PSD-95. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19318-19326.
- [61] Stricker N. L., Christopherson K. S., Yi B. A., Schatz P. J., Raab R. W., Dawes G., Bassett Jr. D. E., Brecht D. S., Li M. PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 336-342.
- [62] Setou M., Nakagawa T., Seog D. H., Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **2000**, *288*, 1796-1802.

- [63] Songyang Z., Fanning A. S., Fu C., Xu J., Marfatia S. M., Chishti A. H., Crompton A., Chan A. C., Anderson J. M., Cantley L. C., Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **1997**, *275*, 73-77.
- [64] Hillier B. J., Christopherson K. S., Prehoda K. E., Brecht D. S., Lim W. A., Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* **1999**, *284*, 812-815.
- [65] London T. B. C., Lee H.-J., Shao Y., Zheng J. Interaction between the internal motif KTXXXI of Idax and mDvl PDZ domain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2004**, *322*, 326-332.
- [66] Pan L., Wu H., Shen C., Shi Y., Jin W., Xia J., Zhang M. Clustering and synaptic targeting of PICK1 requires direct interaction between the PDZ domain and lipid membranes. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4576-4587.
- [67] Gallardo R., Ivarsson Y., Schymkowitz J., Rousseau F., Zimmermann P. Structural Diversity of PDZ-lipid interactions. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 456-467.
- [68] Wermuth, C. G., Eds.; *The practice of medicinal chemistry*. Second edition. Academic press. Amsterdam **2003**
- [69] Veber, D. F.; Freidinger, R. M. The design of metabolically-stable peptide analogs. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 392-396.
- [70] C. Borghouts, C. Kunz, B. Groner, Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 713-726.
- [71] Duchardt, F.; Fotin-Mleczek, M.; Schwarz, H.; Fischer, R.; Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **2007**, *8*, 848-866.
- [72] Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Besshoh, S.; Arundine, M.; Gurd, J. W.; Wang, Y.-T.; Salter, M. W.; Tymianski, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* **2002**, *298*, 846-850.
- [73] Bach, A.; Chi, C. N.; Pang, G. F.; Olsen, L. Kristensen, A. S.; Jemth, P.; Strømgaard, K. Design and synthesis of highly potent and plasma-stable-dimeric inhibitors of the PSD-95-NMDA receptor interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9685-9689.
- [74] Siddiquee, K. A. Z.; Gunning, P. T.; Glenn, M.; Katt, W. P.; Zhang, S.; Schroeck, C.; Sebt, S. M.; Jove, R.; Hamilton, A. D.; Turkson, J. An oxazole-based small-molecule Stat3 inhibitor modulates Stat3 stability and processing and induces antitumor cell effects. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 787-798.
- [75] Sawyer, T.; Boyce, B.; Dalgarno, D.; Iulucci, J. Src inhibitors: genomics to therapeutics. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*, 1327-1344.

- [76] Scapin, G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 601-611.
- [77] Violette S. M., Shakespeare W. C., Bartlett C., Guan W., Smith J. A., Rickles R. J., Bohacek R. S., Holt D. A., Baron R., Sawyer t. K., A Src SH2 selective binding compound inhibits osteoclast-mediated resorption. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 225-235.
- [78] Combs, A. P.; Kapoor, T. M.; Feng, S.; Chen, J. K.; Daudé-Snow, L. F.; Schreiber, S. L. Protein structure-based combinatorial chemistry: discovery of non-peptide binding elements to Src SH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 187-288.
- [79] Schust, J.; Sperl, B.; Hollis, A.; Mayer, T. U.; Berg, T. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1235-1242.
- [80] Hajduk, P. J.; Huth, J. R.; Fesik, S. W. Druggability indices for protein targets derived from NMR-based screening data. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2518-2525.
- [81] Fry, D. C.; Vassilev, L. T. Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 955-963.
- [82] Piserchio, A.; Salinas, G. D.; Li, T.; Marshall, J.; Spaller, M. R.; Mierke, D. F. Targeting specific PDZ domains of PSD-95: Structural basis for enhanced affinity and enzymatic stability of a cyclic peptide. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 469-473.
- [83] Hammond, M. C.; Harris, B. Z.; Lim, W. A.; Bartlett, P. A. β -Strand peptidomimetics as potent PDZ domain ligands. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1247-1251.
- [84] Bach, A.; Chi, C. N.; Olsen, T. B.; Pedersen, S. W.; Røder, M. U.; Pang, G. F.; Clausen, R. P.; Jemth, P.; Strømgaard, K. Modified peptides as potent inhibitors of the Postsynaptic density-95/*N*-Methyl-D-aspartate receptor interaction. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6450-6459.
- [85] Udugamasooriya, D. G.; Sharma, S. C.; Spaller, M. R. A chemical library approach to organic-modified peptide ligands for PDZ domain proteins: A synthetic, thermodynamic and structural investigation. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1587-1589.
- [86] Zhang, Y.; Appleton, B. A.; Wiesmann, C.; Lau, T.; Costa, M.; Hannoush, R. N.; Sidhu, S. S. Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 217-219.
- [87] Lee, H.-J.; Wang, N. X.; Shao, Y. Zheng, J. J. Identification of tripeptides recognized by the PDZ domain of Dishevelled. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1701-1708.
- [88] Fujii, N.; Haresco, J.J.; Novak, K. A. P.; Stokoe, D.; Kuntz, I. D.; Guy, R. K. A selective irreversible inhibitor targeting a PDZ protein interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12074-12075.

- [89] Fujii, N.; Haresco, J.J.; Novak, K. A. P.; Gage, R. M.; Pedemonte, N.; Stokoe, D.; Kuntz, I. D.; Guy, R. K. Rational design of a neuropeptide general chemical scaffold for reversible inhibition of PDZ domain interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 549-552.
- [90] Belmares, M. P.; Lu, P. S.; Mendoza, K. A. PCT WO 079406 A1, **2007**.
- [91] Mayasundari, A.; Ferreira, A. M.; He, L.; Mahindroo, N.; Bashford, D.; Fujii, N. Rational design of the first small-molecule antagonist of NHERF/EBP50 PDZ domains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 942-945.
- [92] Shan, J.; Zheng, J. J. Optimizing Dvl PDZ domain inhibitor by exploring chemical space. *J. Comp. Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 37-47.
- [93] Lee, H.-J.; Wang, N. X.; Shi, D.-L.; Zheng, J. J. Sulindac inhibits canonical Wnt signaling by blocking the PDZ domain of the protein Dishevelled. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6448-6452.
- [94] Grandy, D.; Shan, J.; Zhang, X.; Rao, S.; Akunuru, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Alpatov, I.; Zhang, X. A.; Lang, R. A.; Shi, D.-L.; Zheng, J. J. Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of Dishevelled. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16256-16263.
- [95] You, L.; Xu, Z.; Punchihewa, C.; Jablons, D. M.; Fujii, N. Evaluation of a chemical library of small-molecule Dishevelled antagonists that suppress tumor growth by down-regulating T-cell factor-mediated transcription. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1633-1638.
- [96] Thorson, T. S.; Madsen, K. L.; Rebola, N.; Rathje, M.; Anggono, V.; Bach, V.; Moreira, I. S.; Stuhr-Hansen, N.; Dyhring, T.; Peters, D.; Beuming, T.; Haganir, R.; Weinstein, H.; Mülle, C.; Strømgaard, K.; Rønn, L. C. B.; Gether, U. Identification of a small-molecule inhibitor of the PICK1 PDZ domain that inhibits hippocampal LTP and LTD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 413-418.
- [97] Bach, A.; Stuhr-Hansen, N.; Thorsen, T. S.; Bork, N.; Moreira, I. S.; Frydenvang, K.; Padrah, S.; Christensen, S. B.; Madsen, K. L.; Weinstein, H.; Gether, U.; Strømgaard, K. Structure-activity relationship of a small-molecule inhibitor of the PDZ domain of PICK1. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4281-4288.
- [98] Arkin, M. R.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2004**, *3*, 301-317.
- [99] Thorsen, T. S.; Madsen, K. L.; Rebola, N.; Rathje, M.; Anggono, V.; Bach, A.; Moreira, I. S.; Stuhr-Hansen, N.; Dyhring, T.; Teters, D.; Beuming, T.; Haganir, R.;

- Weinstein, H.; Mülle, C.; Strømgaarrd, K.; Rønn, L. C. B.; Gether, U. Identification of a small-molecule inhibitor of the PICK1 PDZ domain that inhibits hippocampal LTP and LTD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 413-418.
- [100] Durand, C. M.; Betancour, C.; Boeckers, T. M.; Bockmann, J.; Chaste, P.; Fauchereau, F.; Nygren, G.; Rastam, M.; Gillberg, I. C.; Anckarsäter, H.; Sponheim, E.; Goubran-Botros, H.; Delorme, R.; Chabane, N.; Mouren-Simeoni, M.-C.; de Mas, P.; Bieth, E.; Rogé, B.; Héron, D.; Burglen, L.; Gillberg, C.; Leboyer, M.; Bourgeron, T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 25-27.
- [101] Bourgeron, T. A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2009**, *19*, 231-234.
- [102] Uematsu, K.; He, B.; You, L.; Xu, Z.; McCormick, F.; Mark, D. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* **2003**, *22*, 7218-7221.
- [103] Tom Diek, S.; Gundelfinger, E. D. Chemische Synapsen des Zentralnervensystems. *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *34*, 140-148.
- [104] Akert, K. Struktur und Ultrastruktur von Nervenzellen und Synapsen. *Klin. Wschr.* **1971**, *49*, 509-519.
- [105] Seeburg, P. H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sciences* **1993**, *14*, 297-303.
- [106] Ziff, E. B. Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* **1997**, *19*, 1163-1174.
- [107] Boeckers, T. M. The postsynaptic density. *Cell Tissue Res.* **2006**, *326*, 409-422.
- [108] Saupe, J.; Roske, Y.; Schillinger, C.; Kamdem, N.; Radetzki, S.; Diehl, A.; Oschkinat, H.; Krause, G.; Heinemann, U.; Rademann, J.; *ChemMedChem* akzeptiert.
- [109] Sheng M., Kim E. The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1851-1856.
- [110] Du Y., Weed S. A., Xiong W. C., Marshall T. D., Parson J. T., Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 5838-5851.
- [111] Zhang, M.; Wang, W. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 530-538.
- [112] Tu J. C., Xiao B., Naisbitt S., Yuan J. P., Petralia R. S., Brakeman P., Doan A., Aakalu V. K., Lanahan A. A., Sheng M., Worley P. F. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **1999**, *23*, 583-592.

- [113] Uchino, S.; Wada, H.; Honda, S.; Nakamura, Y.; Ondo, Y.; Uchiyama, T.; Tsutsumi, M.; Suzuki, E.; Hirasawa, T.; Kohsaka, S. Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1203-1214.
- [114] Shi, S.-H.; Cox, D. N.; Wang, D.; Jan, L. Y.; Jan, Y.-N. Control of dendrite arborization by an Ig family member, dendrite arborization and synapse maturation 1 (Dasm1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13341-13345.
- [115] Shi, S.-H.; Cheng, T.; Jan, L. Y.; Jan, Y.-N. The immunoglobulin family member dendrite arborization and synapse maturation 1 (Dasm1) controls excitatory synapse maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13346-13351.
- [116] Bourne, J. N.; Harris, K. M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, *31*, 47-67.
- [117] Kasai, H.; Fukuda, M.; Watanabe, S.; Hayashi-Takagi, A.; Noguchi, J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosci.* **2010**, *33*, 121-129.
- [118] Yang, G.; Pan, F.; Gan, W. B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* **2009**, *462*, 920-924.
- [119] Xu, T.; Yu, X.; Perlik, A. J.; Tobin, W. F.; Zweig, J. A.; Tennant, K.; Jones, T.; Zuo, Y. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* **2009**, *462*, 915-919.
- [120] Hofer, S. B.; Mrsic-Flogel, T. D.; Bonhoeffer, T.; Hübener, M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* **2009**, *457*, 313-317.
- [121] Pfeiffer, B. E.; Huber, K. M. The state of synapses in fragile X syndrome. *Neuroscientist* **2009**, *15*, 549-567.
- [122] Stephan, K. E.; Baldeweg, T.; Friston, K. J.; Synaptic plasticity and disconnection in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **2006**, *59*, 929-939.
- [123] Sudhof, T. C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* **2008**, *455*, 903-911.
- [124] Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **2002**, *298*, 789-791.
- [125] Kauer, J. A.; Malenka, R. C. Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 844-858.

- [126] Gong, Y.; Lippa, C. F.; Zhu, J.; Lin, Q.; Rosso, A. L. Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **2009**, *1292*, 191-198.
- [127] Sala, C.; Piëch, V.; Wilson, N. R.; Passafaro, M.; Liu, G.; Sheng, M. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* **2001**, *31*, 115-130.
- [128] Krissinel, E.; Henrick, K. Interference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 774-797.
- [129] Im, Y. J.; Lee, J. H.; Park, S. H.; Park, S. J.; Rho, S.-H.; Kang, G. B.; Kim, E.; Eom, S. H. Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ Dimerization. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48099-48104.
- [130] Jameson, D. M., Ross, J. A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2685-2708.
- [131] Jameson, D. M.; Sawyer, W. H. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 283-300.
- [132] Pope, A. J.; Haupts, U. M.; Moore, K. J. Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: theory and practice. *Drug Disc. Today* **1999**, *4*, 350-362.
- [133] Owicki, J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: Perspectives and primer. *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*, 297-306.
- [134] Ikuko Yao, I.; Hata, Y.; Hirao, K.; Deguchi, M.; Ide, N.; Takeuchi, M.; Takai, Y. Synamon, a novel neuronal protein interacting with Synapse associated protein 90/Postsynaptic density-95-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27463-27466.
- [135] Chan, W. C.; White, P. D., Eds.; *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford **2000**.
- [136] Stiffler, M. A.; Chen, J. C.; Grantcharova, V. P.; Lei, Y.; Fuchs, D.; Allen, J. E.; Zaslavskaja, L.; MacBeth, G. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **2007**, *317*, 364-369.
- [137] Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; Wang, S. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261-273.

- [138] Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67-73.
- [139] Lisurek, M.; Rupp, B.; Wichard, J.; Neuenschwandner, M.; von Kries, J. P.; Frank, R.; Rademann, J.; Kühne, R. Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 401-408.
- [140] Cavanagh, J.; Fairbrother, W.; Palmer III, A. G.; Skleton, N. J. *Protein NMR spectroscopy – Principles and practice. Second Edition.* Elsevier Academic Press, London **2007**.
- [141] Lucchinese, V.; Prato, M.; Quintly, U.; Scorrano, G. The reaction of anils with conjugated dienes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 48-50.
- [142] Borrione, E.; Prato, M.; Scorrano, G.; Stivanello, M. Synthesis and cycloaddition reactions of ethyl glyoxylate imines. Synthesis of substituted furo-[3,2-*c*]quinolines and 7*H*-Indeno[2,1-*c*]quinolines. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 1831-1835.
- [143] Borsche, W. Über den wechselseitigen Austausch von aromatisch gebundenem Hydroxyl und Halogen. *Chem. Ber.* **1917**, *50*, 1339-1355.
- [144] Heyne, W.; Walter, L. 5-chloro-4-nitro-2-aminophenol. Patent GB911809, **1962**.
- [145] Kobayashi, S.; Ishitani, H.; Nagayama, S. Lanthanide triflate catalyzed imino Diels-Alder reactions; Convenient syntheses of pyridine and quinoline derivatives. *Synthesis* **1995**, 1195-1202.
- [146] Hermitage, S.; Howard, J. A. K.; Jay, D.; Protchard, R. G.; Probert, M. R.; Whiting, A. Mechanistic studies on the formal aza-Diels-Alder reaction of N-aryl imines: evidence for the non-concertedness under Lewis-acid catalysed conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2451-2460.
- [147] Fleming, I. *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen.* VCH, Weinheim **1990**.
- [148] Lucchini, V.; Prato, M.; Scorrano, G.; Tecilla, P. Cycloaddition reactions of α -Keto imines. Regio- and stereoselectivity in the dienic and dienophilic additions to conjugated dienes. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2251-2258.
- [149] Balacco, G. A desktop calculator for the Karplus equation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 885-887.
- [150] Sibi, M. P.; Stanley, L. M.; Nie, X.; Venkatraman, L.; Liu, M.; Jasperse, C. P. The role of achiral pyrazolidinone templates in enantioselective Diels-Alder reactions:

- Scope, limitations, and conformational insights. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 395-405.
- [151] Bromidge, S.; Wilson, P. C.; Whiting, A. A parallel combinatorial approach to locating homochiral Lewis acid catalysts for the asymmetric aza-Diels-Alder reaction of imino dienophils. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8905-8908.
- [152] Xie, M.; Chen, X.; Zhu, Y.; Gao, B.; Lin, L.; Liu, X.; feng, X. Asymmetric three-component inverse electron-demand aza-Diels-Alder reaction: Efficient synthesis of ring-fused tetrahydroquinolines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3799-3802.
- [153] Mueller, W. H. Thiiranium-Ionen als Reaktionszwischenstufen. *Angew. Chem.* **1969**, *13*, 475-506.
- [154] Vektariene, A.; Vektaris, G.; Rankin, D. W. H. DFT study of the regioselectivity of addition ao sulfenylchloride to ethenes. *Heteroatom Chem.* **2007**, *18*, 695-703.
- [155] Molleman, A. *Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology*. John Wiley & Sons, Chichester, **2003**.
- [156] Dehner, A.; Furrer, J.; Richter, K.; Schuster, I.; Buchner, J.; Kessler, H. NMR chemical shift perturbation study of the N-terminal domain of Hsp90 upon binding of ADP, AMP-PNP, Geldamycin, and Radicicol. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 870-877.
- [157] Cavanagh, J.; Fairbrother III, W. J.; Palmer, A. G.; Skelton, N. J.; Rance, M. *Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice*. Elsevier Academic Press, London **2006**.
- [158] Shan, J.; Zheng, J. J. Optimizing Dvl PDZ domain inhibitor by exploring chemical space. *J. Comput-Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 37-47.
- [159] Schleinkofer, K.; Wiedemann, U.; Otte, L., Wang, T.; Krause, G.; Oschkinat, H.; Wade, C. W. Comparative structural and energetic analysis of WW domain-peptide interactions. *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 865-881.
- [160] Larkin, M. A.; Blackshield, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947-2948.
- [161] Otvos, L. Peptide-based drug design: Here and now. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *494*, 1-8
- [162] Veber, D. F.; Freidinger, R. M. The design of metabolically-stable peptide analogs. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 392-396.

- [163] Thornber, C. W. Isosterism and molecular modification in drug design. *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 563-580.
- [164] Yee, Y. K.; Bernstein, P. R.; Adams, E. J.; Brown, F. J.; Cronk, L. A.; Hebbel, K. C.; Vacek, E. P.; Krell, R. D.; Snyder, D. W. A novel series of selective leukotriene antaonists: Exploration and optimization of acidic region in 1,6-disubstituted idols and indazoles. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2437-2451.
- [165] Schoepp, D. D.; Smith, C. L.; Lodge, D.; Millar, J. D.; Leander, J. D.; Sacaan, A. I.; Lunn, W. H. W. D,L-(Tetrazol-5-yl) glycine: a novel and highly potent NMDA receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *203*, 237-243.
- [166] Gunn, S. J.; Baker, A.; Bertram, R. D.; Warriner, S. L. A novel approach to the solid-phase synthesis of peptides with a tetrazole at the C-terminus. *Synlett* **2007**, 2643-2646.
- [167] Pozdnev, V. F. Activation of carboxylic acids by pyrocarbonates. Application of Di-*tert*-butyl pyrocarbonates as condensing reagent in the synthesis of amides of protected amino acids and peptides. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *39*, 7115-7118.
- [168] Maetz, P.; Rodriguez, M. A simple preparation of N-protected chiral α -aminonitriles from N-protected α -amino acid amides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4221-4222.
- [169] Sureshbabu, V. V.; Venkataramanarao, R.; Naik, S. A.; Chennakrishnareddy, G. Synthesis of tetrazole analogues of amino acids using Fmoc chemistry: isolation of free tetrazoles and their incorporation into peptides. *Tetrahedron. Lett.* **2007**, *48*, 7038-7041.
- [170] Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. An expedient route to the tetrazole analogues of amino acids. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2525-2527.
- [171] Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. Preparation of 5-substited 1*H*-tetrazoles from nitrils in water. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7945-7950.
- [172] Moore, D. W.; Whittaker, G. Substitution effect in nuclear magnetic resonance spectra of tetrazole and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5007.
- [173] Almquist, R. G.; Chao, W.-R.; Jennings-White, C. Synthesis and biological activity of carboxylic acid replacement analogues of the potent abgiotensin converting enzyme inhibitor 5(*S*)-Benzamido-4-oxo-6-phenylhexanoyl-L-proline. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1067-1071.
- [174] Stansfield, I.; Pompei, M.; Conte, I.; Ercolani, C.; Migliaccio, G.; Jairaj, M.; Giuliano, C.; Rowley, M.; Narjes, F. Development of carboxylic acid replacements in

- indole-*N*-acetamide inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5143-5149.
- [175] Schmidt, M. F.; Rademann, J. Dynamic template-assisted strategies in fragment-based drug discovery. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 512-521.
- [176] Schmidt, M. F.; Isidro-Llobet, A.; Lisurek, M.; El-Dashan, A.; Tan, J.; Hilgenfeld, R.; Rademann, J. Sensitized detection of inhibitory fragments and iterative development of non-peptidic protease inhibitors by dynamic ligation screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275-3278.
- [177] Schmidt, M. F.; El-Dashan, A.; Keller, S.; Rademann, J. Selective identification of cooperative binding fragments in a high-throughput ligation assay enables development of a picomolar caspase-3 inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346-6349.
- [178] Schmidt, D.; Smenton, A.; Raghavan, S.; Carballo-Jane, E.; Lubell, S.; Cieccko, T.; Holt, T. G.; Wolff, M.; Taggart, A.; Wilsie, L.; Krsmanovic, M.; Ren, N.; Blom, D.; Cheng, K. McCann, P. E.; Waters, M. G.; Tata, J.; Colletti, S. Pyrazole acids as niacin receptor agonists for the treatment of dyslipidemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4768-4772.
- [179] Warthon Jr., K. A. Runnin' with the Dvl: Proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Develop. Biol.* **2003**, *253*, 1-17.
- [180] Lee, J.-S.; Ishimoto, A.; Yanagawa, S.-I. Characterization of mouse Dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signalling pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21464-21470.
- [181] Lee, Y.-N.; Gao, Y.; Wang, H.-Y. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 443-452.
- [182] Logan, C. Y.; Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 781-810.
- [183] Van Amerongen, R.; Mikels, A.; Nusse, R. Alternative Wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Science Signal.* **2008**, *1*, re9.
- [184] Huang, H.-C.; Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 234-240.
- [185] Fuerer, C.; Nusse, R.; ten Berge, D. Wnt signalling in development and disease. *EMBO reports* **2008**, *9*, 134-138.
- [186] Klaus, A.; Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 387-398.

- [187] Turashvili, G.; Bouchal, J.; Burkadze, G.; Kolar, Z. Wnt signalling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* **2006**, *73*, 213-223.
- [188] Kimelman, D.; Xu, W. β -Catenin destruction complex: insight and questions from a structural perspective. *Oncogene* **2006**, *25*, 7482-7491.
- [189] Petersen, C. P.; Reddin, P. W. Wnt signalling and the polarity of the primary body axis. *Cell* **2009**, *139*, 1056-1068.
- [190] Nishisho, I.; Nakamura, Y.; Miyoshi, Y.; Miki, Y.; Ando, H.; Horii, A.; Koyama, K.; Utsunomiya, J.; Baba, S.; Hedge, P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **1991**, *253*, 665-669.
- [191] Korinek, K.; Barker, N.; Morin, P. J.; van Wichen, D.; de Weger, R.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Clevers, H. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **1997**, *275*, 1784-1787.
- [192] Mizutani, K.; Miyamoto, S.; Nagahata, T.; Konishi, N.; Emi, M.; Onda, M. Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the *Drosophila dishevelled* gene, in prostate cancer. *Tumori* **2005**, *91*, 546-551.
- [193] Uematsu, K.; Kanazawa, S.; You, L.; He, B.; Xu, Z.; Li, K.; Peterlin, B. M.; McCormick, F.; Jablons, D. M. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of dishevelled overexpression and transcriptional activity of β -catenin. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4547-4551.
- [194] Fujii, N.; You, L.; Xu, Z.; Uematsu, K.; Shan, J.; He, B.; Mikami, I.; Edmondson, L. R.; Neale, G.; Zheng, J.; Guy, R. K.; Jablons, D. M. An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses β -Catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 753-759.
- [195] Mahindroo, N.; PUNCHIHewa, C.; Bail, A. M.; Fujii, N. Indole-2-amide based biochemical antagonist of dishevelled PDZ domain interaction down-regulates dishevelled-driven Tcf transcriptional activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 946-949.
- [196] Grandy, D.; Shan, J.; Zhang, X.; Rao, S.; Akunuru, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Alpatov, I.; Zhang, X. A.; Lang, R. A.; Shi, D.-L.; Zheng, J. J. Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16256-16263.
- [197] Cheyette, B. N. R.; Waxman, J. S.; Miller, J. R.; Takemaru, K.-I.; Sheldahl, L. C.; Khlebtsova, N.; Fox, E. P.; Earnest, T.; Moon, R. T. Dapper, a Dishevelled-Associated

- antagonist of β -Catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev. Cell* **2002**, *2*, 449-461.
- [198] Timothy B.C. London, T. B. C.; Lee, H.-J.; Shao, Y.; Zheng, J. Interaction between the internal motif KTXXXI of Idax and mDvl PDZ domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 326-332.
- [199] Wong, H.-C.; Bourdelas, A.; Krauss, A.; Lee, H.-J.; Shao, Y.; Wu, D.; Mlodzik, M.; Shi, D.-L.; Zheng, J. direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol. Cell.* **2003**, *12*, 1251-1260.
- [200] Zhang, Y.; Appleton, B. A.; Wiesmann, C.; Lau, T.; Costa, M.; Hannoush, R. H.; Sidhu, S. S. Inhibition of Wnt signaling by disheveled PDZ peptides. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 217-219.
- [201] Lee, H.-J.; Wang, N. X.; Shao, Y.; Zheng, J. J. Identification of tripeptides recognized by the PDZ domain of Dishevelled. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1701-1708.
- [202] Nienhaus, G. U.; Editor; *Protein-ligand interactions. Methods and applications.* Humana Press, Tatowa **2005**.
- [203] Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **1999**, *19*, 213-221.
- [204] Praefcke, G. J.; Herrmann, C. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum* **2005**, *11*, 44-47.
- [205] Punchihewa, C.; Ferreira, A. M.; Cassell, R.; Rodrigues, P.; Fujii, N. Sequence requirement and subtype specificity in the high-affinity interaction between frizzled and dishevelled proteins. *Protein Sci.* **2009**, *18*, 994-1002.

Im Rahmen der Arbeit entstand folgende Publikation:

J. Saupe, Y. Roske, C. Schillinger, N. Kamdem, S. Radetzki, A. Diehl, H. Oschkinat, G. Krause, U. Heinemann, J. Rademann

Discovery, Structure–Activity Relationship Studies, and Crystal Structure of Nonpeptide Inhibitors Bound to the Shank3 PDZ Domain

ChemMedChem **2011**, *im Druck*

I. Appendix

1.1. Berechnung des K_I -Wertes

Nach NIKOLEVSKA-COLESKA *et al.*^[137] kann der K_I -Wert einer Verbindung aus dem im FP-Assay bestimmten IC_{50} -Wert, der Konzentration des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition $[I]_{50}$, der Konzentration der freien Sonde bei 50 % Inhibition $[S]_{50}$, der Konzentration des freien Proteins bei 0 % Inhibition $[P]_0$ und der Dissoziationskonstante des Sonden-Protein Komplexes K_D berechnet werden.

Im Folgenden wird beispielhaft der K_I -Wert des Peptides **8** berechnet. Dazu sind gegeben:

Gesamtkonzentration des Proteins	$[P]_T = 500 \text{ nM}$
Gesamtkonzentration der FP-Sonde	$[S]_T = 10 \text{ nM}$
Dissoziationskonstante des Sonden-Protein-Komplex	$K_D = 440 \text{ nM}$
IC_{50} -Wert des Peptides	$IC_{50} = 1,29 \text{ } \mu\text{M} = 1290 \text{ nM}$

Zuerst wird die Konzentration des freien Proteins ohne Inhibition $[P]_0$ berechnet:

$$[P]_b = \frac{-(K_D + [S]_T - [P]_T) + \sqrt{(K_D + [S]_T - [P]_T)^2 + 4 \cdot [P]_T \cdot K_D}}{2}$$

$$\underline{[P]_b = 494.65 \text{ nM}}$$

Die Konzentration des Protein-Sonden-Komplexes bei 0 % Inhibition $[PS]_0$ berechnet sich wie folgt:

$$[P]_T = [P]_b + [PS]_b$$

$$[PS]_b = [P]_T - [P]_b$$

$$\underline{[PS]_b = 5.35 \text{ nM}}$$

Dann kann die Konzentration der freien Sonde bei 0 % Inhibition $[S]_0$ ermittelt werden:

$$[S]_T = [S]_b + [PS]_b$$

$$[S]_b = [S]_T - [PS]_b$$

$$\underline{[S]_b = 4.65 \text{ nM}}$$

Die Konzentration des Protein-Sonden-Komplexes bei 50 % Inhibition $[PS]_{50}$ ergibt sich aus der Hälfte des Protein-Sonden-Komplexes bei 0 % Inhibition $[PS]_0$:

$$[PS]_{50} = \frac{[PS]_b}{2}$$

$$\underline{[PS]_{50} = 2.68 \text{ nM}}$$

Aus der so bestimmten Konzentration des Protein-Sonden-Komplexes bei 50 % Inhibition $[PS]_{50}$ kann dann die Konzentration der freien Sonde bei 50 % Inhibition berechnet werden:

$$[S]_{50} = [S]_T - [PS]_{50}$$

$$\underline{[S]_{50} = 7.32 \text{ nM}}$$

Die Konzentrationen der freien Sonde bei 50 % Inhibition $[S]_{50}$, des Protein-Sonden-Komplexes bei 50 % Inhibition $[PS]_{50}$, die Gesamtkonzentration des Proteins $[P]_T$, die Dissoziationskonstante des Protein-Sonden-Komplexes K_D und der IC_{50} -Wert des Peptides **8** werden benötigt um die Konzentration des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition $[I]_{50}$ zu bestimmen:

$$[I]_{50} = IC_{50} - [P]_T + [PS]_{50} \cdot \left(\frac{K_D}{[S]_{50}} + 1 \right)$$

$$\underline{[I]_{50} = 953.11 \text{ nM}}$$

Aus den so ermittelten Werten wird dann nach Gleichung (3) der K_I -Wert berechnet:

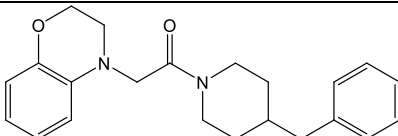
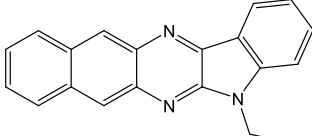
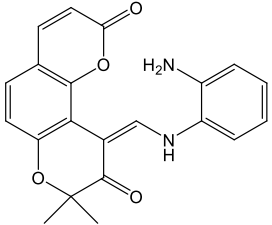
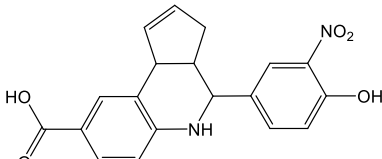
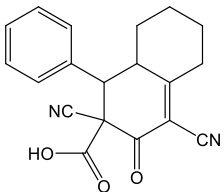
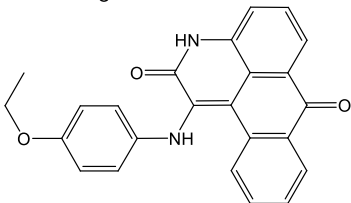
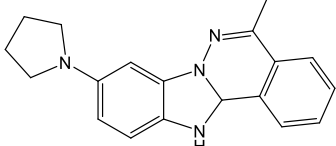
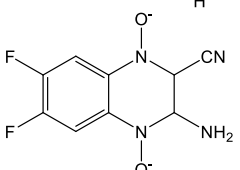
$$K_I = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[S]_{50}}{K_D} + \frac{[P]_T}{K_D} + 1 \right)} \quad (3)$$

$$\underline{\underline{K_I = 438.4 \text{ nM}}}$$

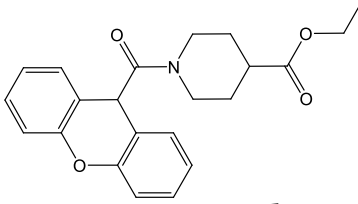
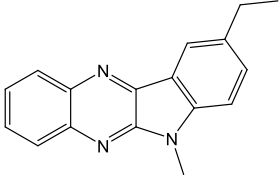
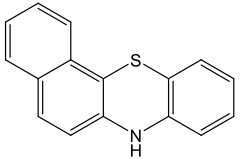
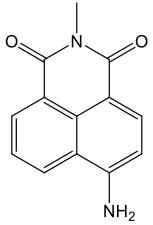
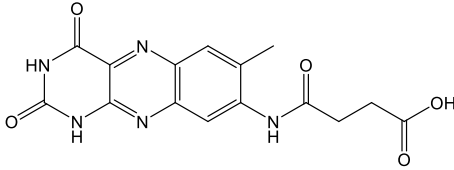
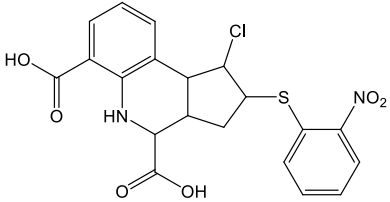
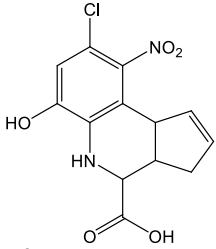
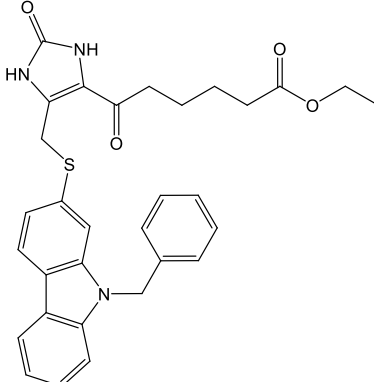
I.2. Primärhits der Screenings

I.2.1. ChemBioNet-Bibliothek

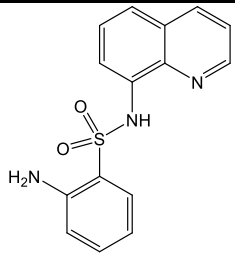
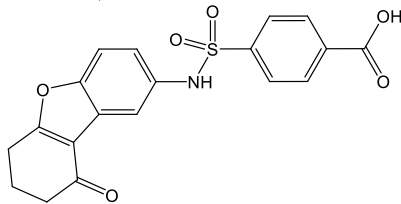
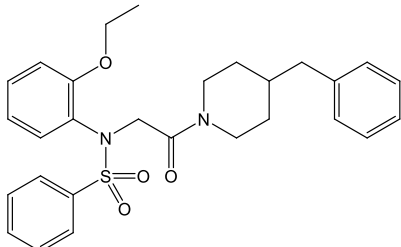
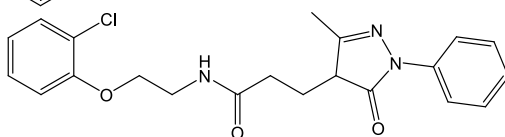
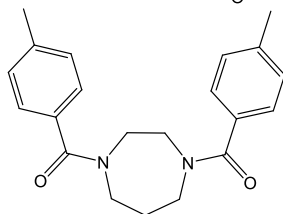
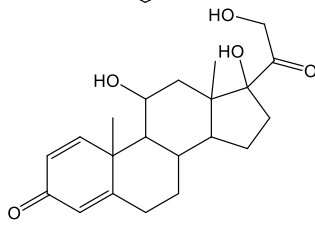
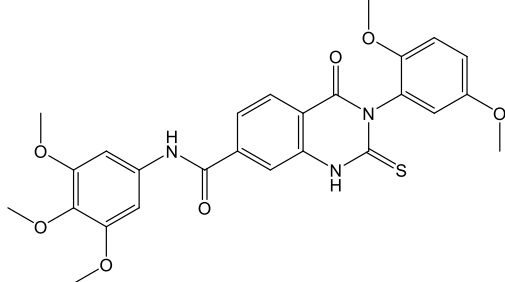
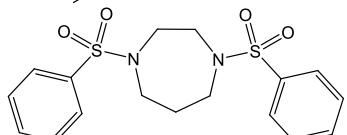
Tabelle I.1 Strukturen und Polarisationsabnahme der Primärhits des Screenings der ChemBioNet- Bibliothek im Vergleich zur Negativkontrolle

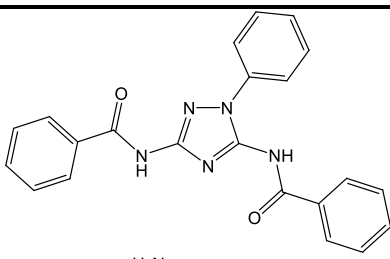
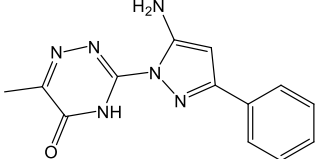
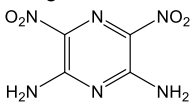
ChemBioNet Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]	Auto- Fluoreszenz
28809		76	ja
25709		74	ja
33163		73	ja
27519		66	ja
33947		65	ja
26387		63	ja
33359		63	ja
34351		62	ja

Appendix

ChemBioNet Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]	Auto- Fluoreszenz
28458		61	ja
31079		58	ja
24319		55	ja
25027		53	ja
24124		52	ja
27549		47	nein
27515		41	nein
33682		31	ja

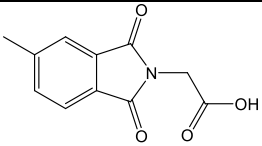
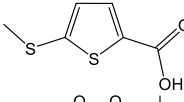
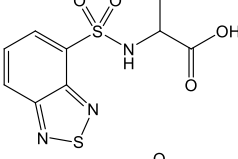
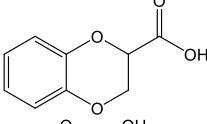
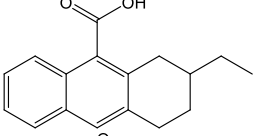
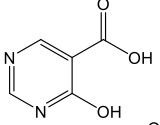
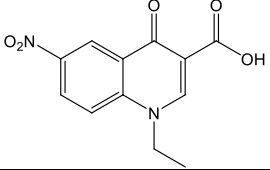
Appendix

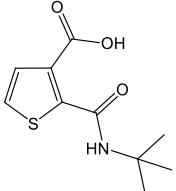
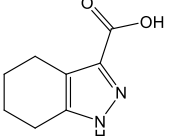
ChemBioNet Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]	Auto- Fluoreszenz
25186		20	nein
28005		19	nein
30116		19	nein
24789		18	nein
30114		18	nein
30118		17	nein
35349		17	nein
30086		16	nein

ChemBioNet Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]	Auto- Fluoreszenz
31238		16	nein
34422		16	nein
31137		15	nein

I.2.2. Carboxylat-Bibliothek

Tabelle I.2 Primärhits des Screenings der Carboxylatbibliothek

Carboxylat Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]
1408		15
161		14
1415		13
1585		13
613		12
881		12
807		12

Carboxylat Compound-ID	Struktur	Relative FP- Abnahme [%]
1144		11
1590		11

I.3. Auswertung des Screenings der ChemBioNet-Bibliothek

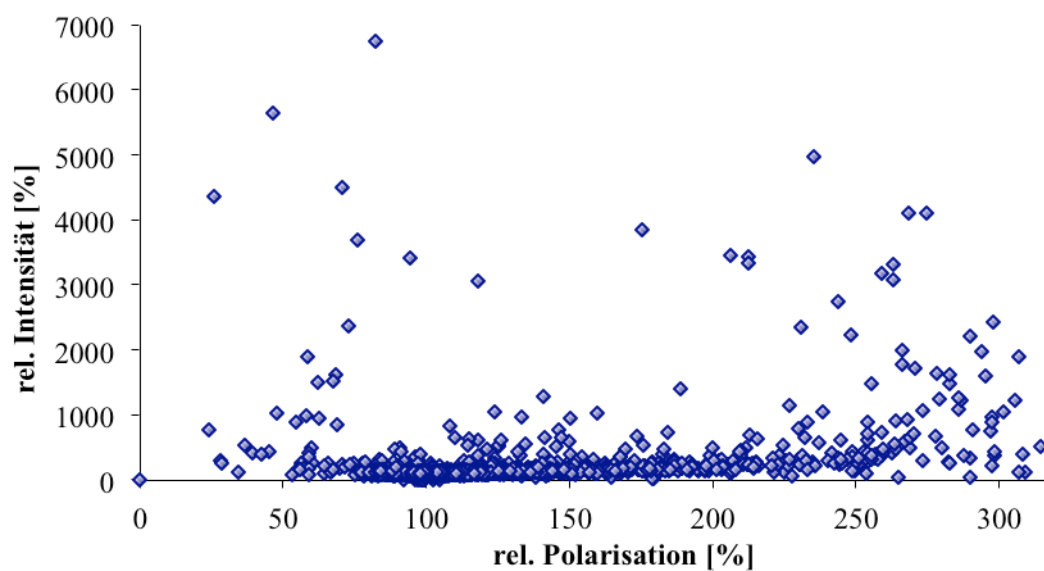


Diagramm I.1 Überblick über die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die relative Polarisation aus dem Screening der ChemBioNet-Bibliothek.

I.4. Strukturdaten

I.4.1. Strukturdaten der Verbindung 32

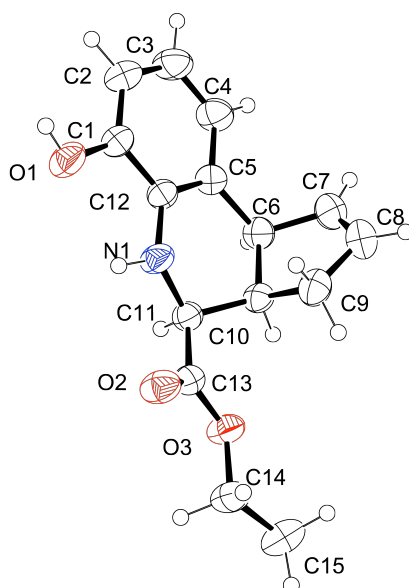


Tabelle I.3 Experimental details

Crystal data	
Chemical formula	$C_{15}H_{17}NO_3$
M_r	259.30
Crystal system, space group	Monoclinic, $p2_1/n$
Temperature [K]	293
a, b, c [Å]	13.014 (1), 4.997 (1), 20.614 (1)
β [°]	103.53 (1)
V [Å ³]	1303.3 (3)
Z	4
Radiation type	Mo $K\alpha$
μ [mm ⁻¹]	0.09
Crystal size [mm]	0.55 × 0.32 × 0.30
Data collection	
Absorption correction	—
No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections	17795, 3122, 2709
Index ranges	$-17 \leq h \leq 17, -4 \leq k \leq 6, -27 \leq l \leq 27$
R_{int}	0.025
Refinement	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.051, 0.151, 1.06
No. of reflections	3122
No. of parameters	240
No. of restraints	0
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0.24, -0.27

Tabelle I.4 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters [\AA^2]

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
C1	0.20103 (9)	-0.4256 (2)	0.54486 (6)	0.0395 (3)
C2	0.29583 (12)	-0.5206 (3)	0.58226 (7)	0.0497 (3)
C3	0.38969 (11)	-0.4303 (3)	0.56927 (8)	0.0565 (4)
C4	0.38762 (10)	-0.2490 (3)	0.51895 (7)	0.0509 (3)
C5	0.29227 (9)	-0.1508 (2)	0.48025 (6)	0.0386 (3)
C6	0.29111 (9)	0.0442 (3)	0.42365 (6)	0.0413 (3)
C7	0.35171 (12)	-0.0654 (4)	0.37554 (8)	0.0597 (4)
C8	0.28818 (15)	-0.1645 (4)	0.32155 (8)	0.0646 (4)
C9	0.17431 (12)	-0.1324 (3)	0.32280 (7)	0.0486 (3)
C10	0.18054 (9)	0.0801 (2)	0.37714 (5)	0.0370 (3)
C11	0.09181 (9)	0.0727 (2)	0.41419 (6)	0.0371 (3)
C12	0.19773 (9)	-0.2408 (2)	0.49311 (5)	0.0362 (3)
C13	-0.01597 (9)	0.0835 (2)	0.36622 (6)	0.0382 (3)
C14	-0.11889 (11)	0.3228 (3)	0.27433 (7)	0.0528 (3)
C15	-0.09909 (15)	0.5139 (4)	0.22356 (8)	0.0626 (4)
N1	0.09957 (8)	-0.1663 (2)	0.45445 (5)	0.0449 (3)
O1	0.10481 (7)	-0.5023 (2)	0.55446 (5)	0.0507 (3)
O2	-0.08942 (7)	-0.0617 (2)	0.36691 (5)	0.0504 (3)
O3	-0.01951 (7)	0.27851 (19)	0.32215 (4)	0.0467 (3)
H1	0.0475 (14)	-0.204 (4)	0.4719 (8)	0.055 (4)*
H1O	0.1086 (17)	-0.627 (5)	0.5799 (12)	0.079 (6)*
H2	0.2937 (14)	-0.659 (4)	0.6167 (9)	0.064 (5)*
H3	0.4537 (17)	-0.503 (4)	0.5938 (11)	0.075 (6)*
H4	0.4515 (16)	-0.197 (4)	0.5093 (10)	0.071 (5)*
H6	0.3220 (12)	0.216 (3)	0.4433 (8)	0.047 (4)*
H7	0.4265 (18)	-0.073 (4)	0.3853 (11)	0.080 (6)*
H8	0.3085 (18)	-0.243 (5)	0.2875 (12)	0.094 (7)*
H91	0.1283 (15)	-0.075 (4)	0.2787 (10)	0.065 (5)*
H92	0.1474 (13)	-0.299 (4)	0.3364 (9)	0.058 (5)*
H10	0.1787 (12)	0.257 (3)	0.3559 (7)	0.040 (3)*
H11	0.0979 (13)	0.236 (3)	0.4416 (8)	0.049 (4)*
H141	-0.1469 (15)	0.155 (4)	0.2546 (9)	0.067 (5)*
H142	-0.167 (2)	0.403 (5)	0.3029 (13)	0.099 (7)*
H151	-0.164 (2)	0.546 (5)	0.1876 (14)	0.099 (8)*
H152	-0.0688 (18)	0.676 (5)	0.2432 (11)	0.086 (7)*
H153	-0.052 (2)	0.416 (5)	0.2008 (12)	0.090 (7)*

Tabelle I.5 Atomic displacement parameters [\AA^2].

	U11	U22	U33	U12	U13	U23
C1	0.0426 (6)	0.0396 (6)	0.0345 (5)	-0.0029 (5)	0.0051 (4)	0.0018 (4)
C2	0.0528 (7)	0.0495 (7)	0.0418 (6)	0.0028 (6)	0.0009 (5)	0.0090 (5)
C3	0.0422 (7)	0.0652 (9)	0.0550 (8)	0.0065 (6)	-0.0032 (6)	0.0088 (7)
C4	0.0357 (6)	0.0573 (8)	0.0564 (7)	-0.0027 (5)	0.0040 (5)	0.0040 (6)
C5	0.0370 (5)	0.0375 (6)	0.0400 (5)	-0.0018 (4)	0.0064 (4)	-0.0006 (4)
C6	0.0368 (5)	0.0417 (6)	0.0465 (6)	-0.0053 (4)	0.0116 (4)	0.0019 (5)
C7	0.0477 (7)	0.0784 (11)	0.0588 (8)	0.0101 (7)	0.0240 (6)	0.0087 (7)
C8	0.0701 (10)	0.0762 (11)	0.0540 (8)	0.0164 (8)	0.0277 (7)	-0.0015 (7)
C9	0.0584 (7)	0.0464 (7)	0.0421 (6)	-0.0037 (6)	0.0140 (5)	-0.0020 (5)
C10	0.0391 (5)	0.0325 (6)	0.0399 (5)	-0.0024 (4)	0.0106 (4)	0.0056 (4)
C11	0.0368 (5)	0.0373 (6)	0.0369 (5)	0.0005 (4)	0.0079 (4)	0.0031 (4)
C12	0.0365 (5)	0.0367 (6)	0.0340 (5)	-0.0013 (4)	0.0056 (4)	0.0001 (4)
C13	0.0389 (5)	0.0376 (6)	0.0378 (5)	0.0020 (4)	0.0086 (4)	0.0037 (4)
C14	0.0451 (7)	0.0584 (9)	0.0490 (7)	0.0028 (6)	-0.0005 (5)	0.0121 (6)
C15	0.0741 (11)	0.0582 (9)	0.0473 (7)	-0.0037 (8)	-0.0028 (7)	0.0117 (6)
N1	0.0336 (5)	0.0560 (7)	0.0449 (5)	-0.0004 (4)	0.0083 (4)	0.0192 (5)
O1	0.0475 (5)	0.0579 (6)	0.0458 (5)	-0.0067 (4)	0.0093 (4)	0.0175 (4)
O2	0.0426 (5)	0.0501 (6)	0.0551 (5)	-0.0055 (4)	0.0045 (4)	0.0149 (4)
O3	0.0408 (5)	0.0481 (5)	0.0475 (5)	-0.0019 (4)	0.0026 (4)	0.0157 (4)

Appendix

Tabelle I.6 Bond length [Å] and angles [°].

C1—O1	1.3675 (15)	C9—H91	1.005 (19)
C1—C2	1.3773 (17)	C9—H92	0.969 (19)
C1—C12	1.4042 (16)	C10—C11	1.5267 (16)
C2—C3	1.386 (2)	C10—H10	0.986 (15)
C2—H2	1.00 (2)	C11—N1	1.4444 (16)
C3—C4	1.372 (2)	C11—C13	1.5163 (16)
C3—H3	0.94 (2)	C11—H11	0.985 (17)
C4—C5	1.3979 (17)	C12—N1	1.3889 (14)
C4—H4	0.94 (2)	C13—O2	1.2028 (15)
C5—C12	1.3924 (16)	C13—O3	1.3257 (14)
C5—C6	1.5174 (17)	C14—O3	1.4481 (15)
C6—C7	1.5069 (19)	C14—C15	1.483 (2)
C6—C10	1.5417 (16)	C14—H141	0.97 (2)
C6—H6	0.994 (17)	C14—H142	1.03 (3)
C7—C8	1.318 (3)	C15—H151	1.00 (3)
C7—H7	0.95 (2)	C15—H152	0.95 (3)
C8—C9	1.497 (2)	C15—H153	0.99 (3)
C8—H8	0.90 (2)	N1—H1	0.859 (19)
C9—C10	1.5319 (18)	O1—H1O	0.81 (3)
<hr/>			
O1—C1—C2	123.58 (11)	C11—C10—C6	113.03 (9)
O1—C1—C12	115.34 (10)	C9—C10—C6	104.83 (10)
C2—C1—C12	121.07 (11)	C11—C10—H10	107.6 (9)
C1—C2—C3	119.61 (12)	C9—C10—H10	107.9 (8)
C1—C2—H2	117.9 (11)	C6—C10—H10	107.6 (9)
C3—C2—H2	122.5 (11)	N1—C11—C13	109.49 (9)
C4—C3—C2	119.91 (12)	N1—C11—C10	110.38 (10)
C4—C3—H3	121.3 (13)	C13—C11—C10	111.44 (9)
C2—C3—H3	118.7 (13)	N1—C11—H11	111.6 (10)
C3—C4—C5	121.39 (13)	C13—C11—H11	106.4 (9)
C3—C4—H4	119.0 (12)	C10—C11—H11	107.4 (9)
C5—C4—H4	119.6 (12)	N1—C12—C5	122.64 (10)
C12—C5—C4	118.94 (11)	N1—C12—C1	118.21 (10)
C12—C5—C6	120.23 (10)	C5—C12—C1	119.06 (10)
C4—C5—C6	120.80 (11)	O2—C13—O3	123.45 (10)
C7—C6—C5	111.11 (11)	O2—C13—C11	125.97 (10)
C7—C6—C10	100.90 (11)	O3—C13—C11	110.58 (10)
C5—C6—C10	113.14 (9)	O3—C14—C15	107.68 (12)
C7—C6—H6	111.0 (9)	O3—C14—H141	110.0 (11)
C5—C6—H6	108.2 (9)	C15—C14—H141	111.9 (11)
C10—C6—H6	112.5 (9)	O3—C14—H142	103.5 (14)
C8—C7—C6	111.76 (13)	C15—C14—H142	112.4 (14)
C8—C7—H7	125.1 (13)	H141—C14—H142	111.0 (18)
C6—C7—H7	122.9 (13)	C14—C15—H151	111.8 (14)
C7—C8—C9	111.92 (13)	C14—C15—H152	111.7 (13)
C7—C8—H8	125.8 (15)	H151—C15—H152	112.2 (18)
C9—C8—H8	122.3 (15)	C14—C15—H153	104.4 (14)
C8—C9—C10	101.74 (12)	H151—C15—H153	104 (2)
C8—C9—H91	113.4 (11)	H152—C15—H153	112 (2)
C10—C9—H91	112.4 (11)	C12—N1—C11	118.85 (10)
C8—C9—H92	109.8 (10)	C12—N1—H1	114.3 (11)
C10—C9—H92	110.2 (10)	C11—N1—H1	117.7 (12)
H91—C9—H92	109.1 (15)	C1—O1—H1O	113.0 (15)
C11—C10—C9	115.60 (10)	C13—O3—C14	117.45 (10)
O1—C1—C2—C3	-179.59 (13)	C9—C10—C11—C13	-54.05 (14)
C12—C1—C2—C3	0.8 (2)	C6—C10—C11—C13	-174.86 (9)
C1—C2—C3—C4	-0.6 (2)	C4—C5—C12—N1	-175.92 (12)
C2—C3—C4—C5	0.4 (2)	C6—C5—C12—N1	2.20 (18)
C3—C4—C5—C12	-0.3 (2)	C4—C5—C12—C1	0.52 (18)
C3—C4—C5—C6	-178.45 (14)	C6—C5—C12—C1	178.64 (11)

C12—C5—C6—C7	-123.79 (13)	O1—C1—C12—N1	-3.80 (17)
C4—C5—C6—C7	54.29 (16)	C2—C1—C12—N1	175.83 (12)
C12—C5—C6—C10	-11.12 (16)	O1—C1—C12—C5	179.60 (11)
C4—C5—C6—C10	166.96 (12)	C2—C1—C12—C5	-0.77 (18)
C5—C6—C7—C8	101.04 (16)	N1—C11—C13—O2	9.38 (18)
C10—C6—C7—C8	-19.17 (17)	C10—C11—C13—O2	131.78 (13)
C6—C7—C8—C9	1.6 (2)	N1—C11—C13—O3	-170.66 (10)
C7—C8—C9—C10	16.83 (19)	C10—C11—C13—O3	-48.26 (13)
C8—C9—C10—C11	-152.88 (11)	C5—C12—N1—C11	-20.56 (18)
C8—C9—C10—C6	-27.73 (13)	C1—C12—N1—C11	162.96 (11)
C7—C6—C10—C11	155.14 (11)	C13—C11—N1—C12	168.45 (10)
C5—C6—C10—C11	36.37 (14)	C10—C11—N1—C12	45.42 (15)
C7—C6—C10—C9	28.39 (13)	O2—C13—O3—C14	2.49 (19)
C5—C6—C10—C9	-90.37 (12)	C11—C13—O3—C14	-177.47 (11)
C9—C10—C11—N1	67.84 (13)	C15—C14—O3—C13	-170.11 (13)
C6—C10—C11—N1	-52.97 (13)		

I.4.2. Skturdaten der Verbindung 58b

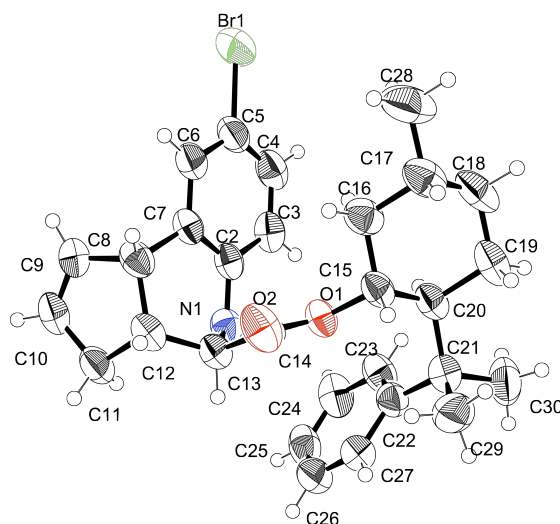


Tabelle I.7 Experimental details.

Crystal data	
Chemical formula	$C_{29}H_{34}BrNO_2$
M_r	508.48
Crystal system, space group	Monoclinic, $p2_1$
Temperature [K]	297
a, b, c [Å]	8.8318 (4), 8.9808 (3), 15.9594 (7)
β [°]	92.779 (1)
V [Å ³]	1264.36 (9)
Z	2
Radiation type	Mo $K\alpha$
μ [mm ⁻¹]	1.65
Crystal size [mm]	0.36 × 0.26 × 0.22
Data collection	
Absorption correction	Empirical (using intensity measurements) <i>SADABS</i> - Bruker/Siemens area detector absorption
T_{min}, T_{max}	0.882, 1.000
No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections	18729, 5310, 3727
Index ranges	$-11 \leq h \leq 11, -7 \leq k \leq 11, -21 \leq l \leq 21$
R_{int}	0.023

Appendix

Refinement	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.035, 0.085, 0.92
No. of reflections	5310
No. of parameters	329
No. of restraints	1
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
$\Delta\rho_{\max}, \Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0.41, -0.16
Absolute structure	Flack H D (1983), Acta Cryst. A39, 876-881
Flack parameter	0.013 (7)

Tabelle I.8 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent displacement parameters [Å²]

	x	y	z	Uiso*/Ueq
N1	-0.1808 (2)	0.9260 (3)	0.78112 (11)	0.0556 (4)
H1	-0.153 (3)	0.845 (3)	0.8037 (16)	0.058 (8)*
C2	-0.1708 (2)	0.9188 (3)	0.69354 (12)	0.0522 (5)
C3	-0.1506 (3)	0.7847 (3)	0.65230 (19)	0.0631 (7)
H3	-0.1440	0.6967	0.6829	0.076*
C4	-0.1402 (3)	0.7807 (4)	0.5662 (2)	0.0678 (8)
H4	-0.1280	0.6905	0.5387	0.081*
C5	-0.1480 (2)	0.9124 (4)	0.52164 (14)	0.0675 (6)
C6	-0.1674 (3)	1.0464 (4)	0.56138 (18)	0.0627 (7)
H6	-0.1718	1.1340	0.5303	0.075*
C7	-0.1805 (2)	1.0515 (3)	0.64800 (16)	0.0535 (6)
C8	-0.2121 (3)	1.1993 (3)	0.69148 (16)	0.0593 (6)
H8	-0.151 (3)	1.275 (3)	0.6663 (14)	0.056 (6)*
C9	-0.3760 (3)	1.2429 (3)	0.67999 (18)	0.0719 (7)
H9	-0.4227	1.2648	0.6280	0.086*
C10	-0.4466 (3)	1.2471 (3)	0.74986 (18)	0.0694 (7)
H10	-0.5484	1.2721	0.7530	0.083*
C11	-0.3464 (3)	1.2078 (3)	0.82377 (16)	0.0688 (7)
H11A	-0.3769	1.1140	0.8480	0.083*
H11B	-0.3484	1.2847	0.8663	0.083*
C12	-0.1869 (3)	1.1950 (3)	0.78836 (15)	0.0578 (6)
H12	-0.130 (3)	1.283 (3)	0.8044 (14)	0.056 (6)*
C13	-0.1038 (2)	1.0551 (3)	0.81825 (16)	0.0548 (6)
H13	-0.106 (3)	1.051 (3)	0.8780 (19)	0.067 (7)*
C14	0.0648 (2)	1.0610 (3)	0.79981 (13)	0.0540 (5)
C15	0.2670 (2)	0.9006 (3)	0.75682 (12)	0.0547 (5)
H15	0.343 (2)	0.969 (2)	0.7939 (12)	0.041 (5)*
C16	0.2644 (2)	0.9405 (3)	0.66382 (14)	0.0655 (7)
H16A	0.1813	0.8886	0.6347	0.079*
H16B	0.2468	1.0466	0.6574	0.079*
C17	0.4117 (3)	0.8998 (4)	0.62429 (15)	0.0714 (7)
H17	0.486 (2)	0.958 (3)	0.6502 (13)	0.049 (6)*
C18	0.4450 (3)	0.7386 (4)	0.63918 (19)	0.0817 (9)
H18A	0.5410	0.7141	0.6156	0.098*
H18B	0.3668	0.6793	0.6104	0.098*
C19	0.4525 (3)	0.6987 (3)	0.73199 (18)	0.0738 (7)
H19A	0.5360	0.7518	0.7601	0.089*
H19B	0.4718	0.5929	0.7382	0.089*
C20	0.3034 (3)	0.7383 (3)	0.77401 (15)	0.0569 (6)
H20	0.226 (2)	0.681 (3)	0.7488 (13)	0.046 (6)*
C21	0.3013 (3)	0.6939 (3)	0.86922 (16)	0.0639 (6)
C22	0.1372 (3)	0.6867 (3)	0.89766 (14)	0.0582 (6)
C23	0.0319 (3)	0.5941 (3)	0.85828 (18)	0.0671 (7)
H23	0.0604	0.5356	0.8136	0.080*
C24	-0.1162 (3)	0.5860 (3)	0.8837 (2)	0.0763 (8)
H24	-0.1862	0.5255	0.8546	0.092*
C25	-0.1595 (3)	0.6667 (4)	0.9513 (2)	0.0789 (9)
H25	-0.2580	0.6594	0.9690	0.095*

Appendix

C26	-0.0572 (3)	0.7579 (4)	0.99249 (18)	0.0778 (8)
H26	-0.0859	0.8128	1.0385	0.093*
C27	0.0890 (3)	0.7687 (3)	0.96599 (16)	0.0684 (7)
H27	0.1571	0.8322	0.9943	0.082*
C28	0.4070 (4)	0.9465 (5)	0.53261 (17)	0.1045 (15)
H28A	0.5021	0.9230	0.5090	0.157*
H28B	0.3892	1.0518	0.5285	0.157*
H28C	0.3268	0.8942	0.5024	0.157*
C29	0.3990 (3)	0.8055 (4)	0.92234 (18)	0.0806 (8)
H29A	0.3490	0.9005	0.9226	0.121*
H29B	0.4962	0.8162	0.8986	0.121*
H29C	0.4123	0.7692	0.9788	0.121*
C30	0.3668 (3)	0.5360 (4)	0.8844 (2)	0.0925 (10)
H30A	0.3533	0.5071	0.9414	0.139*
H30B	0.4729	0.5360	0.8738	0.139*
H30C	0.3149	0.4668	0.8472	0.139*
Br1	-0.13576 (4)	0.90574 (6)	0.402728 (16)	0.10246 (16)
O1	0.11569 (14)	0.9248 (2)	0.78619 (8)	0.0562 (4)
O2	0.14026 (19)	1.1727 (2)	0.79942 (12)	0.0763 (5)

Tabelle I.9 Atomic displacement parameters [\AA^2]

	U11	U22	U33	U12	U13	U23
N1	0.0523 (10)	0.0518 (13)	0.0636 (10)	0.0003 (10)	0.0117 (8)	0.0027 (11)
C2	0.0388 (9)	0.0499 (14)	0.0685 (11)	0.0011 (11)	0.0064 (8)	-0.0074 (14)
C3	0.0489 (13)	0.0539 (18)	0.086 (2)	0.0028 (11)	0.0014 (13)	-0.0072 (13)
C4	0.0560 (14)	0.067 (2)	0.080 (2)	0.0070 (12)	0.0019 (13)	-0.0248 (15)
C5	0.0554 (12)	0.0834 (19)	0.0639 (12)	0.0155 (15)	0.0070 (10)	-0.0144 (18)
C6	0.0551 (14)	0.0658 (18)	0.0681 (17)	0.0117 (12)	0.0120 (12)	-0.0007 (13)
C7	0.0433 (12)	0.0551 (15)	0.0631 (14)	0.0032 (10)	0.0119 (10)	-0.0046 (12)
C8	0.0623 (14)	0.0489 (15)	0.0684 (14)	-0.0015 (11)	0.0213 (11)	-0.0009 (11)
C9	0.0776 (16)	0.0657 (17)	0.0726 (16)	0.0261 (13)	0.0054 (13)	-0.0022 (13)
C10	0.0554 (14)	0.0655 (17)	0.0879 (18)	0.0150 (12)	0.0101 (13)	-0.0142 (13)
C11	0.0636 (14)	0.0749 (19)	0.0696 (15)	0.0126 (13)	0.0218 (12)	-0.0063 (13)
C12	0.0529 (12)	0.0554 (16)	0.0662 (14)	-0.0006 (12)	0.0134 (10)	-0.0121 (12)
C13	0.0495 (12)	0.0566 (15)	0.0589 (14)	0.0006 (10)	0.0085 (10)	-0.0062 (11)
C14	0.0497 (12)	0.0614 (17)	0.0511 (12)	0.0000 (12)	0.0066 (9)	-0.0077 (11)
C15	0.0405 (10)	0.0638 (15)	0.0606 (11)	-0.0016 (12)	0.0096 (8)	-0.0106 (13)
C16	0.0524 (12)	0.082 (2)	0.0628 (12)	-0.0085 (12)	0.0104 (10)	-0.0055 (13)
C17	0.0542 (13)	0.092 (2)	0.0692 (14)	-0.0183 (17)	0.0132 (11)	-0.0208 (18)
C18	0.0584 (14)	0.105 (3)	0.0847 (19)	-0.0112 (15)	0.0311 (13)	-0.0336 (17)
C19	0.0542 (13)	0.0704 (18)	0.098 (2)	0.0030 (12)	0.0218 (13)	-0.0213 (15)
C20	0.0437 (12)	0.0633 (17)	0.0645 (14)	-0.0025 (11)	0.0096 (10)	-0.0164 (12)
C21	0.0574 (13)	0.0641 (16)	0.0705 (14)	0.0084 (11)	0.0073 (11)	-0.0028 (12)
C22	0.0634 (14)	0.0524 (14)	0.0596 (13)	0.0091 (11)	0.0118 (11)	0.0045 (11)
C23	0.0663 (16)	0.0508 (16)	0.0858 (17)	-0.0015 (12)	0.0222 (13)	-0.0048 (13)
C24	0.0675 (17)	0.0548 (17)	0.108 (2)	-0.0044 (12)	0.0223 (15)	0.0106 (15)
C25	0.0731 (17)	0.069 (2)	0.097 (2)	0.0170 (15)	0.0346 (16)	0.0256 (17)
C26	0.086 (2)	0.085 (2)	0.0646 (15)	0.0218 (17)	0.0207 (14)	0.0059 (14)
C27	0.0688 (16)	0.075 (2)	0.0618 (15)	0.0122 (13)	0.0073 (12)	-0.0010 (12)
C28	0.0905 (19)	0.158 (5)	0.0676 (15)	-0.023 (2)	0.0266 (14)	-0.007 (2)
C29	0.0670 (16)	0.104 (2)	0.0702 (17)	-0.0019 (16)	-0.0048 (13)	-0.0036 (16)
C30	0.0760 (19)	0.086 (3)	0.116 (2)	0.0305 (16)	0.0158 (18)	0.0124 (18)
Br1	0.1123 (2)	0.1284 (3)	0.06733 (16)	0.0389 (3)	0.01091 (14)	-0.0209 (2)
O1	0.0426 (7)	0.0602 (11)	0.0668 (8)	0.0022 (8)	0.0141 (6)	-0.0024 (9)
O2	0.0577 (10)	0.0690 (13)	0.1034 (14)	-0.0088 (9)	0.0172 (9)	-0.0215 (10)

Appendix

Tabelle I.10 Bond length [Å] and angles [°].

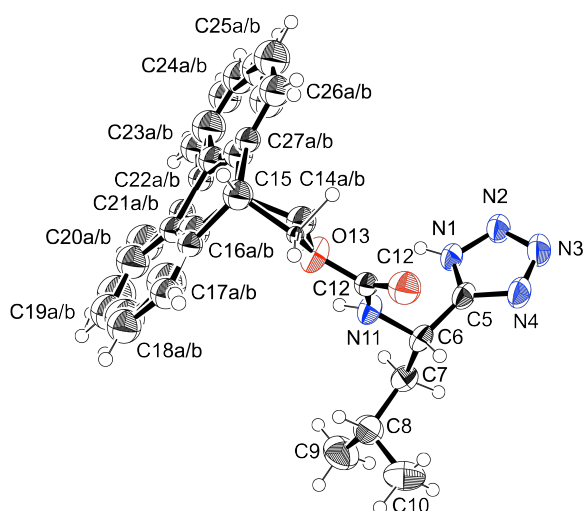
N1—C2	1.406 (3)	C16—H16B	0.9700
N1—C13	1.455 (4)	C17—C18	1.493 (5)
N1—H1	0.85 (3)	C17—C28	1.521 (4)
C2—C3	1.388 (4)	C17—H17	0.92 (2)
C2—C7	1.397 (4)	C18—C19	1.522 (4)
C3—C4	1.382 (4)	C18—H18A	0.9700
C3—H3	0.9300	C18—H18B	0.9700
C4—C5	1.380 (5)	C19—C20	1.548 (3)
C4—H4	0.9300	C19—H19A	0.9700
C5—C6	1.375 (5)	C19—H19B	0.9700
C5—Br1	1.907 (2)	C20—C21	1.572 (3)
C6—C7	1.394 (4)	C20—H20	0.93 (2)
C6—H6	0.9300	C21—C22	1.541 (3)
C7—C8	1.529 (4)	C21—C30	1.546 (4)
C8—C9	1.502 (4)	C21—C29	1.548 (4)
C8—C12	1.552 (3)	C22—C23	1.377 (4)
C8—H8	0.97 (3)	C22—C27	1.400 (4)
C9—C10	1.305 (4)	C23—C24	1.389 (4)
C9—H9	0.9300	C23—H23	0.9300
C10—C11	1.483 (4)	C24—C25	1.369 (5)
C10—H10	0.9300	C24—H24	0.9300
C11—C12	1.547 (3)	C25—C26	1.365 (5)
C11—H11A	0.9700	C25—H25	0.9300
C11—H11B	0.9700	C26—C27	1.381 (4)
C12—C13	1.520 (4)	C26—H26	0.9300
C12—H12	0.97 (3)	C27—H27	0.9300
C13—C14	1.533 (3)	C28—H28A	0.9600
C13—H13	0.96 (3)	C28—H28B	0.9600
C14—O2	1.205 (3)	C28—H28C	0.9600
C14—O1	1.325 (3)	C29—H29A	0.9600
C15—O1	1.454 (2)	C29—H29B	0.9600
C15—C20	1.515 (4)	C29—H29C	0.9600
C15—C16	1.526 (3)	C30—H30A	0.9600
C15—H15	1.06 (2)	C30—H30B	0.9600
C16—C17	1.518 (3)	C30—H30C	0.9600
C16—H16A	0.9700		
<hr/>			
C2—N1—C13	113.0 (2)	C18—C17—C28	114.6 (3)
C2—N1—H1	110.7 (18)	C16—C17—C28	110.5 (2)
C13—N1—H1	113.3 (18)	C18—C17—H17	110.6 (14)
C3—C2—C7	119.98 (19)	C16—C17—H17	106.2 (14)
C3—C2—N1	121.8 (3)	C28—C17—H17	105.1 (14)
C7—C2—N1	118.2 (2)	C17—C18—C19	112.5 (2)
C4—C3—C2	120.7 (3)	C17—C18—H18A	109.1
C4—C3—H3	119.7	C19—C18—H18A	109.1
C2—C3—H3	119.7	C17—C18—H18B	109.1
C5—C4—C3	119.1 (3)	C19—C18—H18B	109.1
C5—C4—H4	120.5	H18A—C18—H18B	107.8
C3—C4—H4	120.5	C18—C19—C20	111.7 (2)
C6—C5—C4	121.1 (2)	C18—C19—H19A	109.3
C6—C5—Br1	120.0 (3)	C20—C19—H19A	109.3
C4—C5—Br1	118.8 (2)	C18—C19—H19B	109.3
C5—C6—C7	120.3 (3)	C20—C19—H19B	109.3
C5—C6—H6	119.8	H19A—C19—H19B	107.9
C7—C6—H6	119.8	C15—C20—C19	108.7 (2)
C6—C7—C2	118.8 (2)	C15—C20—C21	114.02 (19)
C6—C7—C8	120.3 (2)	C19—C20—C21	114.2 (2)
C2—C7—C8	120.8 (2)	C15—C20—H20	107.7 (14)
C9—C8—C7	111.5 (2)	C19—C20—H20	108.2 (13)
C9—C8—C12	102.65 (18)	C21—C20—H20	103.6 (13)

Appendix

C7—C8—C12	114.2 (2)	C22—C21—C30	105.4 (2)
C9—C8—H8	108.7 (14)	C22—C21—C29	111.9 (2)
C7—C8—H8	107.7 (14)	C30—C21—C29	108.3 (2)
C12—C8—H8	112.0 (14)	C22—C21—C20	110.52 (19)
C10—C9—C8	113.7 (2)	C30—C21—C20	111.2 (2)
C10—C9—H9	123.2	C29—C21—C20	109.4 (2)
C8—C9—H9	123.2	C23—C22—C27	116.7 (2)
C9—C10—C11	112.4 (2)	C23—C22—C21	121.0 (2)
C9—C10—H10	123.8	C27—C22—C21	122.3 (2)
C11—C10—H10	123.8	C22—C23—C24	121.5 (2)
C10—C11—C12	104.2 (2)	C22—C23—H23	119.2
C10—C11—H11A	110.9	C24—C23—H23	119.2
C12—C11—H11A	110.9	C25—C24—C23	120.3 (3)
C10—C11—H11B	110.9	C25—C24—H24	119.8
C12—C11—H11B	110.9	C23—C24—H24	119.8
H11A—C11—H11B	108.9	C26—C25—C24	119.6 (3)
C13—C12—C11	112.4 (2)	C26—C25—H25	120.2
C13—C12—C8	112.1 (2)	C24—C25—H25	120.2
C11—C12—C8	105.84 (19)	C25—C26—C27	120.1 (3)
C13—C12—H12	111.1 (15)	C25—C26—H26	119.9
C11—C12—H12	108.2 (14)	C27—C26—H26	119.9
C8—C12—H12	106.9 (14)	C26—C27—C22	121.7 (3)
N1—C13—C12	108.8 (2)	C26—C27—H27	119.1
N1—C13—C14	112.85 (19)	C22—C27—H27	119.1
C12—C13—C14	111.7 (2)	C17—C28—H28A	109.5
N1—C13—H13	110.3 (17)	C17—C28—H28B	109.5
C12—C13—H13	108.1 (16)	H28A—C28—H28B	109.5
C14—C13—H13	105.0 (15)	C17—C28—H28C	109.5
O2—C14—O1	125.2 (2)	H28A—C28—H28C	109.5
O2—C14—C13	124.9 (2)	H28B—C28—H28C	109.5
O1—C14—C13	109.9 (2)	C21—C29—H29A	109.5
O1—C15—C20	105.98 (19)	C21—C29—H29B	109.5
O1—C15—C16	107.94 (17)	H29A—C29—H29B	109.5
C20—C15—C16	113.3 (2)	C21—C29—H29C	109.5
O1—C15—H15	107.4 (10)	H29A—C29—H29C	109.5
C20—C15—H15	109.2 (10)	H29B—C29—H29C	109.5
C16—C15—H15	112.6 (10)	C21—C30—H30A	109.5
C17—C16—C15	112.0 (2)	C21—C30—H30B	109.5
C17—C16—H16A	109.2	H30A—C30—H30B	109.5
C15—C16—H16A	109.2	C21—C30—H30C	109.5
C17—C16—H16B	109.2	H30A—C30—H30C	109.5
C15—C16—H16B	109.2	H30B—C30—H30C	109.5
H16A—C16—H16B	107.9	C14—O1—C15	121.0 (2)
C18—C17—C16	109.5 (2)		
<hr/>			
C13—N1—C2—C3	141.2 (2)	C12—C13—C14—O1	-148.9 (2)
C13—N1—C2—C7	-38.2 (3)	O1—C15—C16—C17	-172.4 (2)
C7—C2—C3—C4	-0.1 (3)	C20—C15—C16—C17	-55.4 (3)
N1—C2—C3—C4	-179.6 (2)	C15—C16—C17—C18	55.0 (3)
C2—C3—C4—C5	0.9 (4)	C15—C16—C17—C28	-177.9 (3)
C3—C4—C5—C6	-0.6 (3)	C16—C17—C18—C19	-56.8 (3)
C3—C4—C5—Br1	-179.33 (18)	C28—C17—C18—C19	178.5 (2)
C4—C5—C6—C7	-0.4 (3)	C17—C18—C19—C20	57.6 (3)
Br1—C5—C6—C7	178.28 (18)	O1—C15—C20—C19	171.38 (18)
C5—C6—C7—C2	1.2 (4)	C16—C15—C20—C19	53.2 (2)
C5—C6—C7—C8	-176.1 (2)	O1—C15—C20—C21	-59.9 (2)
C3—C2—C7—C6	-0.9 (3)	C16—C15—C20—C21	-178.11 (17)
N1—C2—C7—C6	178.58 (19)	C18—C19—C20—C15	-53.8 (3)
C3—C2—C7—C8	176.4 (2)	C18—C19—C20—C21	177.7 (2)
N1—C2—C7—C8	-4.1 (3)	C15—C20—C21—C22	73.5 (3)
C6—C7—C8—C9	77.7 (3)	C19—C20—C21—C22	-160.7 (2)

C2—C7—C8—C9	-99.6 (3)	C15—C20—C21—C30	-169.8 (2)
C6—C7—C8—C12	-166.5 (2)	C19—C20—C21—C30	-44.0 (3)
C2—C7—C8—C12	16.2 (3)	C15—C20—C21—C29	-50.2 (3)
C7—C8—C9—C10	115.8 (3)	C19—C20—C21—C29	75.6 (3)
C12—C8—C9—C10	-6.9 (3)	C30—C21—C22—C23	-62.6 (3)
C8—C9—C10—C11	0.1 (4)	C29—C21—C22—C23	179.9 (3)
C9—C10—C11—C12	6.7 (3)	C20—C21—C22—C23	57.7 (3)
C10—C11—C12—C13	-133.2 (2)	C30—C21—C22—C27	115.0 (3)
C10—C11—C12—C8	-10.5 (3)	C29—C21—C22—C27	-2.5 (4)
C9—C8—C12—C13	133.2 (2)	C20—C21—C22—C27	-124.7 (3)
C7—C8—C12—C13	12.4 (3)	C27—C22—C23—C24	1.8 (4)
C9—C8—C12—C11	10.3 (3)	C21—C22—C23—C24	179.6 (2)
C7—C8—C12—C11	-110.5 (2)	C22—C23—C24—C25	-2.5 (4)
C2—N1—C13—C12	66.5 (2)	C23—C24—C25—C26	1.5 (4)
C2—N1—C13—C14	-58.0 (3)	C24—C25—C26—C27	0.1 (4)
C11—C12—C13—N1	67.8 (3)	C25—C26—C27—C22	-0.8 (4)
C8—C12—C13—N1	-51.2 (3)	C23—C22—C27—C26	-0.2 (4)
C11—C12—C13—C14	-166.9 (2)	C21—C22—C27—C26	-178.0 (2)
C8—C12—C13—C14	74.0 (3)	O2—C14—O1—C15	-9.2 (3)
N1—C13—C14—O2	155.3 (2)	C13—C14—O1—C15	172.11 (17)
C12—C13—C14—O2	32.4 (3)	C20—C15—O1—C14	162.91 (18)
N1—C13—C14—O1	-26.0 (3)	C16—C15—O1—C14	-75.4 (3)

I.4.3. Strukturdaten der Verbindung



97.

Tabelle I.11 Crystal data of Tetrazol **97**.

Crystal Data	
Chemical formula	C ₂₁ H ₂₃ N ₅ O ₂
<i>M</i> _r	377.44
Crystal system, space group	monoclinic, <i>p</i> 2 ₁
Temperature (K)	293(2)
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	8.1301 (16), 9.798 (2), 13.039 (3)
α , β , γ (°)	90, 105.28 (3), 90
<i>V</i> (Å ³)	1001.9 (3)
<i>Z</i>	2
Radiation type	Mo <i>K</i> α
μ (mm ⁻¹)	0.08
Crystal size (mm)	0.6 × 0.5 × 0.3

Appendix

Data collection	
Absorption correction	–
No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections	8586, 4205, 3607
Index ranges	$-10 \leq h \leq 10, -12 \leq k \leq 10, -17 \leq l \leq 6$
R_{int}	0.023
Refinement	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.061, 0.159, 1.00
No. of reflections	4205
No. of parameters	316
No. of restraints	1
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
	2.111
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e \AA^{-3})	0.47, –0.34
Absolute structure	Flack H D (1983), Acta Cryst. A39, 876-881
Flack parameter	–1.6 (18)

Tabelle I.12 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters [\AA^2]

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$	Occ. (<1)
N1	–0.0377 (3)	0.6909 (3)	–0.03194 (18)	0.0426 (8)	1.00 (3)
H1	–0.032 (4)	0.608 (5)	–0.021 (2)	0.044 (9)*	
N2	–0.1682 (3)	0.7494 (3)	–0.10506 (19)	0.0474 (9)	0.99 (3)
N3	–0.1457 (3)	0.8785 (3)	–0.0926 (2)	0.0543 (11)	1.00 (3)
N4	–0.0045 (3)	0.9056 (2)	–0.01140 (19)	0.0474 (9)	1.00 (3)
C5	0.0603 (3)	0.7867 (3)	0.02487 (19)	0.0373 (9)	1.00 (3)
C6	0.2205 (3)	0.7597 (3)	0.11067 (18)	0.0362 (9)	1.00 (3)
H6	0.247 (4)	0.843 (4)	0.145 (3)	0.047 (8)*	
C7	0.3569 (3)	0.7021 (3)	0.0614 (2)	0.0425 (10)	1.00 (3)
H71	0.3635	0.7600	0.0022	0.051*	0.96 (7)
H72	0.3208	0.6123	0.0328	0.051*	1.00 (7)
C8	0.5356 (4)	0.6899 (4)	0.1370 (2)	0.0549 (13)	1.00 (3)
H8	0.523 (4)	0.652 (3)	0.201 (3)	0.043 (8)*	
C9	0.6439 (5)	0.5928 (6)	0.0913 (3)	0.0769 (19)	1.00 (3)
H91	0.5921	0.5040	0.0825	0.115*	1.00 (12)
H92	0.7560	0.5868	0.1389	0.115*	1.00 (10)
H93	0.6518	0.6263	0.0236	0.115*	1.00 (10)
C10	0.6187 (6)	0.8300 (6)	0.1596 (5)	0.088 (2)	0.97 (3)
H101	0.6361	0.8672	0.0951	0.132*	1.00 (13)
H102	0.7265	0.8215	0.2116	0.132*	0.91 (11)
H103	0.5458	0.8896	0.1862	0.132*	0.96 (13)
N11	0.1903 (3)	0.6649 (2)	0.18913 (17)	0.0405 (9)	1.00 (3)
H11	0.210 (4)	0.573 (5)	0.180 (2)	0.052 (9)*	
C12	0.1211 (3)	0.7029 (3)	0.26784 (17)	0.0303 (8)*	0.94 (3)
O12	0.0921 (3)	0.8198 (3)	0.28884 (16)	0.0557 (9)*	1.00 (3)
O13	0.0909 (3)	0.5924 (2)	0.31954 (14)	0.0487 (8)	1.00 (3)
C14A	0.055 (4)	0.6166 (11)	0.4217 (13)	0.015 (6)*	0.23 (6)
H141	0.108 (5)	0.656 (4)	0.459 (3)	0.051 (15)*	1.00 (14)
H142	–0.085 (5)	0.661 (4)	0.385 (3)	0.051 (9)*	
C15	0.0042 (3)	0.4729 (3)	0.4552 (2)	0.0460 (10)*	1.00 (3)
H15	–0.033 (4)	0.492 (4)	0.529 (3)	0.054 (9)*	
C16A	0.1808 (17)	0.3946 (8)	0.4841 (9)	0.032 (3)*	0.57 (6)
C17A	0.3303 (16)	0.4232 (16)	0.5574 (12)	0.047 (4)*	0.51 (8)
H17A	0.3369	0.5020	0.5978	0.057*	0.34
C18A	0.4605 (13)	0.3387 (14)	0.5721 (13)	0.059 (4)*	0.48 (5)
H18A	0.5599	0.3567	0.6248	0.071*	0.73 (8)
C19A	0.4499 (13)	0.2222 (11)	0.5088 (9)	0.068 (4)*	0.58 (4)
H19A	0.5452	0.1663	0.5184	0.082*	0.45 (9)
C20A	0.2940 (15)	0.1852 (7)	0.4281 (8)	0.061 (3)*	0.65 (4)
H20A	0.2844	0.1076	0.3859	0.073*	0.56 (10)

Appendix

C21A	0.1634 (12)	0.2765 (5)	0.4209 (6)	0.036 (2)*	0.59 (3)
C22A	-0.0670 (16)	0.2790 (7)	0.3428 (5)	0.043 (2)*	0.50 (3)
C23A	-0.158 (2)	0.1826 (9)	0.2717 (7)	0.065 (3)*	0.57 (3)
H23A	-0.1088	0.1061	0.2498	0.078*	0.29 (10)
C24A	-0.3287 (17)	0.2121 (14)	0.2374 (6)	0.061 (4)*	0.48 (3)
H24A	-0.3986	0.1548	0.1876	0.074*	0.51 (8)
C25A	-0.4049 (15)	0.3301 (16)	0.2758 (9)	0.071 (4)*	0.48 (4)
H25A	-0.5229	0.3429	0.2521	0.086*	0.64
C26A	-0.312 (2)	0.420 (2)	0.3454 (11)	0.052 (5)*	0.36 (5)
H26A	-0.3548	0.4937	0.3699	0.063*	0.30
C27A	-0.154 (4)	0.3954 (16)	0.3726 (8)	0.033 (5)*	0.28 (5)
C14B	0.013 (2)	0.6133 (5)	0.4078 (8)	0.0433 (18)*	0.74 (6)
C16B	0.143 (3)	0.3809 (14)	0.4653 (16)	0.050 (3)*	0.46 (6)
C17B	0.303 (3)	0.401 (3)	0.538 (2)	0.080 (5)*	0.52 (8)
H17B	0.3192	0.4752	0.5847	0.095*	0.97 (12)
C18B	0.4448 (15)	0.305 (2)	0.5408 (19)	0.082 (4)*	0.50 (5)
H18B	0.5531	0.3163	0.5896	0.099*	0.42
C19B	0.398 (2)	0.1955 (14)	0.4684 (14)	0.083 (5)*	0.52 (4)
H19B	0.4804	0.1301	0.4679	0.100*	0.58 (10)
C20B	0.231 (3)	0.1769 (15)	0.3947 (17)	0.076 (6)*	0.37 (4)
H20B	0.2090	0.1030	0.3483	0.091*	0.67 (9)
C21B	0.1062 (18)	0.2704 (7)	0.3953 (9)	0.037 (3)*	0.42 (3)
C22B	-0.0051 (14)	0.2664 (6)	0.3546 (5)	0.035 (2)*	0.51 (3)
C23B	-0.0862 (17)	0.1666 (9)	0.2832 (6)	0.053 (3)*	0.47 (3)
H23B	-0.0248	0.0929	0.2675	0.063*	0.71 (8)
C24B	-0.2619 (17)	0.1782 (10)	0.2350 (6)	0.062 (4)*	0.52 (3)
H24B	-0.3126	0.1114	0.1862	0.074*	0.44 (8)
C25B	-0.3669 (13)	0.2835 (16)	0.2552 (8)	0.071 (3)*	0.59 (4)
H25B	-0.4824	0.2879	0.2234	0.086*	0.47
C26B	-0.2807 (5)	0.3884 (15)	0.3300 (8)	0.065 (3)*	0.65 (5)
H26B	-0.3166	0.4738	0.3467	0.079*	0.47 (13)
C27B	-0.1079 (17)	0.3799 (8)	0.3771 (4)	0.0457 (19)*	0.74 (5)

Tabelle I.13 Atomic displacement parameters [\AA^2] of **97**.

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
N1	0.0461 (12)	0.0247 (15)	0.0540 (14)	-0.0013 (9)	0.0078 (9)	0.0045 (9)
N2	0.0488 (13)	0.0330 (15)	0.0553 (15)	0.0000 (9)	0.0046 (10)	0.0056 (10)
N3	0.0589 (16)	0.0357 (17)	0.0640 (17)	0.0071 (11)	0.0083 (11)	0.0103 (11)
N4	0.0575 (14)	0.0269 (14)	0.0568 (15)	0.0011 (10)	0.0135 (10)	0.0050 (10)
C5	0.0460 (14)	0.0244 (15)	0.0458 (14)	-0.0001 (9)	0.0197 (10)	0.0009 (9)
C6	0.0468 (14)	0.0252 (14)	0.0376 (13)	-0.0060 (10)	0.0127 (9)	0.0001 (10)
C7	0.0457 (14)	0.0433 (17)	0.0412 (14)	-0.0047 (12)	0.0163 (10)	0.0017 (11)
C8	0.0489 (16)	0.066 (2)	0.0502 (19)	0.0008 (14)	0.0144 (12)	0.0092 (15)
C9	0.058 (2)	0.098 (4)	0.081 (3)	0.016 (2)	0.0295 (19)	0.012 (2)
C10	0.056 (3)	0.092 (4)	0.102 (4)	-0.025 (2)	-0.004 (2)	-0.005 (3)
N11	0.0545 (14)	0.0277 (15)	0.0431 (12)	-0.0002 (9)	0.0193 (9)	0.0017 (8)
O13	0.0759 (15)	0.0340 (12)	0.0448 (11)	0.0005 (9)	0.0311 (9)	-0.0005 (8)

Tabelle I.14 Bond length [\AA] and angles [$^\circ$]

N1—C5	1.324 (3)	C19A—H19A	0.9300
N1—N2	1.353 (3)	C19A—H18B	1.4818
N1—H1	0.83 (4)	C20A—C21A	1.373 (11)
N2—N3	1.282 (4)	C20A—H20A	0.9300
N3—N4	1.367 (4)	C21A—C22B	1.418 (13)
N4—C5	1.314 (3)	C22A—C23A	1.394 (12)
C5—C6	1.500 (3)	C22A—C21B	1.397 (18)
C6—N11	1.450 (3)	C22A—C27A	1.45 (3)
C6—C7	1.530 (4)	C23A—C24A	1.37 (2)
C6—H6	0.93 (4)	C23A—H23A	0.9300
C7—C8	1.530 (4)	C24A—C25A	1.46 (2)
C7—H71	0.9700	C24A—H24A	0.9300

Appendix

C7—H72	0.9700	C24A—H25B	1.4234
C8—C9	1.521 (5)	C25A—C26B	1.212 (11)
C8—C10	1.524 (6)	C25A—C26A	1.34 (2)
C8—H8	0.94 (3)	C25A—H25A	0.9354
C9—H91	0.9600	C25A—H25B	0.8991
C9—H92	0.9600	C26A—C27A	1.26 (4)
C9—H93	0.9600	C26A—C27B	1.65 (3)
C10—H101	0.9600	C26A—H26A	0.8935
C10—H102	0.9600	C14B—H141	0.97 (5)
C10—H103	0.9600	C14B—H142	0.91 (4)
N11—C12	1.346 (3)	C16B—C17B	1.41 (4)
N11—H11	0.93 (4)	C17B—C18B	1.49 (2)
C12—O12	1.215 (4)	C17B—H17A	1.2410
C12—O13	1.332 (3)	C17B—H17B	0.9300
O13—C14A	1.457 (10)	C18B—C19B	1.41 (4)
O13—C14B	1.465 (6)	C18B—H18B	0.9469
C14A—C15	1.561 (13)	C19B—C20B	1.45 (3)
C14A—H141	0.68 (5)	C19B—H19B	0.9300
C14A—H142	1.20 (4)	C20B—C21B	1.367 (19)
C15—C16B	1.422 (13)	C20B—H20B	0.9300
C15—C14B	1.518 (6)	C21B—C22B	0.922 (16)
C15—C27A	1.634 (17)	C22B—C23B	1.391 (10)
C15—H15	1.09 (3)	C22B—C27B	1.466 (16)
C16A—C17A	1.36 (2)	C23B—C24B	1.406 (17)
C16A—C21A	1.405 (13)	C23B—H23B	0.9300
C17A—C18A	1.317 (12)	C24B—C25B	1.41 (2)
C17A—C18B	1.54 (3)	C24B—H24B	0.9300
C17A—H17A	0.9284	C25B—H25A	1.3861
C18A—C19A	1.40 (2)	C25B—H25B	0.9219
C18A—H18A	0.9300	C26B—C27B	1.380 (17)
C18A—H18B	0.7591	C26B—H26A	1.3641
C19A—C20A	1.464 (17)	C26B—H26B	0.9300
<hr/>			
C5—N1—N2	109.8 (2)	C20A—C21A—C16A	122.7 (10)
C5—N1—H1	127 (2)	C20A—C21A—C22B	127.0 (8)
N2—N1—H1	123 (2)	C16A—C21A—C22B	110.3 (7)
N3—N2—N1	105.6 (2)	C23A—C22A—C21B	125.3 (10)
N2—N3—N4	110.7 (2)	C23A—C22A—C27A	119.9 (14)
C5—N4—N3	106.3 (2)	C21B—C22A—C27A	114.7 (10)
N4—C5—N1	107.6 (2)	C24A—C23A—C22A	112.9 (11)
N4—C5—C6	127.7 (2)	C24A—C23A—H23A	123.5
N1—C5—C6	124.6 (2)	C22A—C23A—H23A	123.5
N11—C6—C5	111.4 (2)	C23A—C24A—C25A	122.6 (9)
N11—C6—C7	109.7 (2)	C23A—C24A—H24A	118.7
C5—C6—C7	109.58 (19)	C25A—C24A—H24A	118.7
N11—C6—H6	106 (2)	C23A—C24A—H25B	158.5
C5—C6—H6	104.6 (19)	C25A—C24A—H25B	36.3
C7—C6—H6	116 (2)	H24A—C24A—H25B	82.6
C6—C7—C8	115.4 (2)	C26B—C25A—C26A	20.8 (6)
C6—C7—H71	108.4	C26B—C25A—C24A	102.1 (14)
C8—C7—H71	108.4	C26A—C25A—C24A	122.5 (14)
C6—C7—H72	108.4	C26B—C25A—H25A	138.9
C8—C7—H72	108.4	C26A—C25A—H25A	118.6
H71—C7—H72	107.5	C24A—C25A—H25A	118.9
C9—C8—C10	111.5 (3)	C26B—C25A—H25B	165.7
C9—C8—C7	110.2 (3)	C26A—C25A—H25B	166.0
C10—C8—C7	110.6 (3)	C24A—C25A—H25B	69.5
C9—C8—H8	108.0 (19)	H25A—C25A—H25B	50.1
C10—C8—H8	109.5 (19)	C27A—C26A—C25A	114 (2)
C7—C8—H8	107.1 (18)	C27A—C26A—C27B	3.2 (7)
C8—C9—H91	109.5	C25A—C26A—C27B	111 (2)

Appendix

C8—C9—H92	109.5	C27A—C26A—H26A	121.0
H91—C9—H92	109.5	C25A—C26A—H26A	124.7
C8—C9—H93	109.5	C27B—C26A—H26A	124.2
H91—C9—H93	109.5	C26A—C27A—C22A	127.6 (14)
H92—C9—H93	109.5	C26A—C27A—C15	131.6 (18)
C8—C10—H101	109.5	C22A—C27A—C15	100.6 (18)
C8—C10—H102	109.5	O13—C14B—C15	105.7 (4)
H101—C10—H102	109.5	O13—C14B—H141	100 (2)
C8—C10—H103	109.5	C15—C14B—H141	103 (2)
H101—C10—H103	109.5	O13—C14B—H142	110 (2)
H102—C10—H103	109.5	C15—C14B—H142	118 (2)
C12—N11—C6	122.9 (2)	H141—C14B—H142	118 (3)
C12—N11—H11	119 (2)	C17B—C16B—C15	122.7 (17)
C6—N11—H11	118 (2)	C16B—C17B—C18B	120 (3)
O12—C12—O13	125.4 (2)	C16B—C17B—H17A	123.5
O12—C12—N11	125.3 (2)	C18B—C17B—H17A	116.5
O13—C12—N11	109.3 (2)	C16B—C17B—H17B	120.0
C12—O13—C14A	116.0 (5)	C18B—C17B—H17B	120.0
C12—O13—C14B	117.3 (3)	H17A—C17B—H17B	5.2
C14A—O13—C14B	13.4 (6)	C19B—C18B—C17B	113 (2)
O13—C14A—C15	103.9 (8)	C19B—C18B—C17A	126.8 (15)
O13—C14A—H141	120 (4)	C17B—C18B—C17A	13.5 (9)
C15—C14A—H141	118 (3)	C19B—C18B—H18B	125.3
O13—C14A—H142	95 (2)	C17B—C18B—H18B	121.4
C15—C14A—H142	98 (2)	C17A—C18B—H18B	107.9
H141—C14A—H142	116 (4)	C18B—C19B—C20B	125.3 (12)
C16B—C15—C14B	119.4 (8)	C18B—C19B—H19B	117.4
C16B—C15—C14A	109.7 (11)	C20B—C19B—H19B	117.4
C14B—C15—C14A	12.6 (5)	C21B—C20B—C19B	118.4 (16)
C16B—C15—C27A	103.6 (15)	C21B—C20B—H20B	120.8
C14B—C15—C27A	105.5 (8)	C19B—C20B—H20B	120.8
C14A—C15—C27A	117.1 (11)	C22B—C21B—C20B	125.7 (14)
C16B—C15—H15	115.1 (18)	C22B—C21B—C22A	8.1 (5)
C14B—C15—H15	104.7 (19)	C20B—C21B—C22A	133.6 (14)
C14A—C15—H15	104.1 (19)	C21B—C22B—C23B	129.5 (11)
C27A—C15—H15	107.8 (18)	C21B—C22B—C21A	2.8 (5)
C17A—C16A—C21A	120.9 (9)	C23B—C22B—C21A	132.0 (9)
C18A—C17A—C16A	120.4 (17)	C21B—C22B—C27B	112.2 (7)
C18A—C17A—C18B	18.8 (6)	C23B—C22B—C27B	118.2 (10)
C16A—C17A—C18B	102.0 (16)	C21A—C22B—C27B	109.6 (5)
C18A—C17A—H17A	121.1	C22B—C23B—C24B	119.3 (11)
C16A—C17A—H17A	118.5	C22B—C23B—H23B	120.4
C18B—C17A—H17A	139.5	C24B—C23B—H23B	120.4
C17A—C18A—C19A	120.4 (16)	C23B—C24B—C25B	124.8 (8)
C17A—C18A—H18A	119.8	C23B—C24B—H24B	117.6
C19A—C18A—H18A	119.8	C25B—C24B—H24B	117.6
C17A—C18A—H18B	157.0	C24B—C25B—H25A	153.9
C19A—C18A—H18B	81.0	C24B—C25B—H25B	123.1
H18A—C18A—H18B	39.9	H25A—C25B—H25B	32.0
C18A—C19A—C20A	122.2 (9)	C25A—C26B—C27B	145.6 (18)
C18A—C19A—H19A	118.9	C25A—C26B—H26A	101.2
C20A—C19A—H19A	118.9	C27B—C26B—H26A	112.1
C18A—C19A—H18B	30.4	C25A—C26B—H26B	107.2
C20A—C19A—H18B	152.3	C27B—C26B—H26B	107.2
H19A—C19A—H18B	88.6	H26A—C26B—H26B	15.0
C21A—C20A—C19A	113.3 (8)	C26B—C27B—C22B	121.6 (9)
C21A—C20A—H20A	123.4	C26B—C27B—C26A	15.0 (6)
C19A—C20A—H20A	123.4	C22B—C27B—C26A	136.1 (9)

I.4.4. Strukturdaten der Protein-Ligand-Komplexe

Tabelle I.15 Crystallographic analysis of mShank3-PDZ domain in complex with **63**. Values in parentheses are for the outer resolution shell.

Data statistics	mouse SHANK3-PDZ / compound 63
Data collection	
Space group	P2 ₁
Unit cell [Å / °]	$a = 55.9, b = 64.1, c = 101.9, \beta = 90.09$
Resolution [Å]	33.97 – 1.83 (1.88 – 1.83)
R _{r.i.m.} [%] ^a	3.4 (42.8)
Completeness [%]	89.1 (72.3)
I/σ(I)	20.0 (2.4)
Redundancy	2.1 (1.8)
Unique reflections	56826 (3406)
Solvent content [%]	39
Monomers in asymmetric unit	8
Model refinement	
R _{work} / R _{free} [%] ^b	23.3 / 28.3
No. residues	836
No. water molecules	289
Average B [Å ²]	33.7
R.m.s.d. bonds [Å]	0.013
R.m.s.d. angles [Å]	1.7
Twin target, fraction	(hkl), 0.51 (h-k-l), 0.49
Ramachandran statistics	
Core [%]	97
Generously allowed [%]	2.1
Disallowed [%]	0.9

^aR_{r.i.m.} = $100 \sum_h [n / [n-1]]^{1/2} \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$, where n is the multiplicity of observations. ^bR_{work} = $\sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, where F_o and F_c are the structure factor amplitudes from the data and the model, respectively. R_{free} is R_{work} using a 5% test set of structure factors.

Tabelle I.16 Crystallographic analysis of hDVL3-PDZ domain in complex with **166** and **167**. Values in parentheses are for the outer resolution shell

Data statistics	Human DVL3-PDZ/166	Human DVL3-PDZ/167
Data collection		
Space group	P6 ₁	P6 ₁
Unit cell [Å]	a = 87.3, b = 87.3, c = 57.84	a = 85.3, b = 85.3, c = 58.9
Resolution [Å]	34.8 – 1.67 (1.71 – 1.67)	34.6 – 1.48 (1.52 – 1.48)
R _{r.i.m.} [%] ^a	5.5 (77.4)	6.7 (80.5)
Completeness [%]	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
I/σ(I)	19.1 (2.5)	18.4 (3.2)
Redundancy	5.6 (5.6)	8.0 (8.0)
Unique reflections	29202 (2161)	40755 (3012)
Solvent content [%]	55.95	53.19
Monomers in asymmetric	2	2
Model refinement		
R _{work} [%]/R _{free} [%] ^b	17.9 / 22.0	14.9 / 17.8
No. residues	184	186
No. water molecules	204	235
Average B [Å ²]	21.4	22.7
R.m.s.d. bonds [Å]	0.018	0.019
R.m.s.d. angles [Å]	1.762	1.933
Ramachandran plot		
Core [%]	96.6	97.8
Allowed [%]	3.4	2.2
Disallowed [%]	0.0	0.0

I.5. NMR-Spektren

I.5.1. ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren

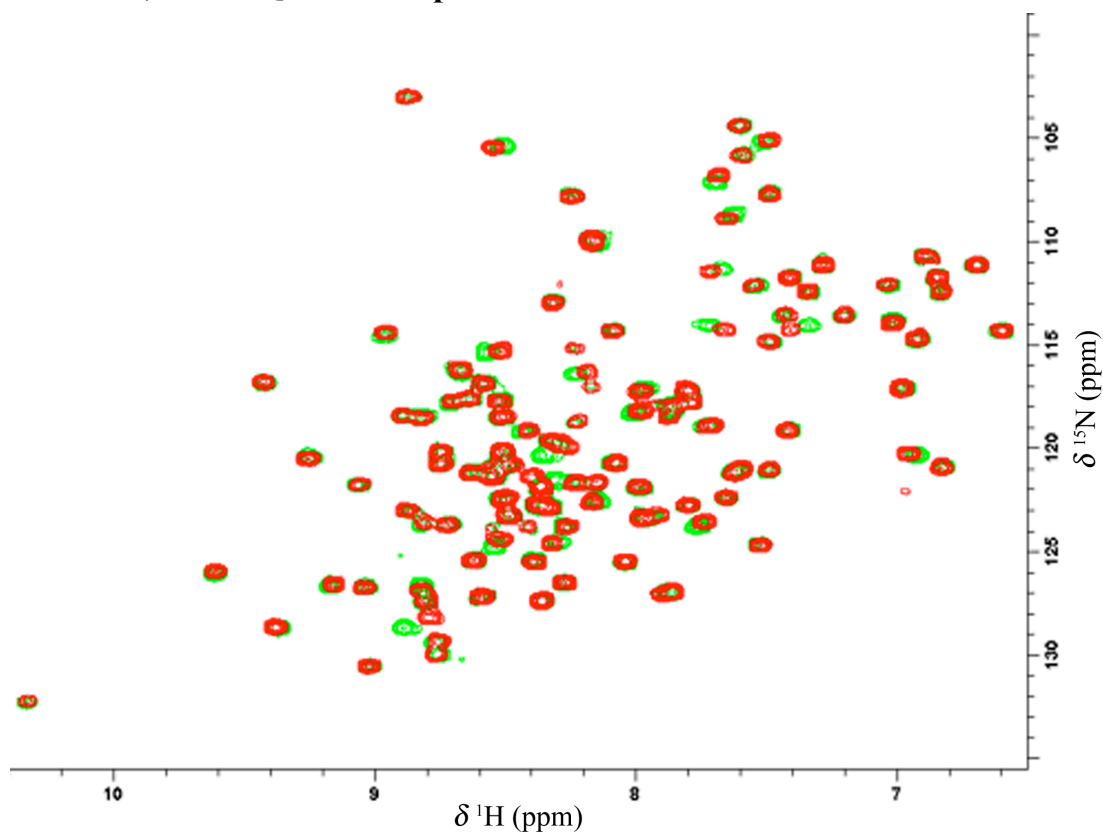


Abb. I.1 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung **63** (rot) und ohne Ligand (gün).

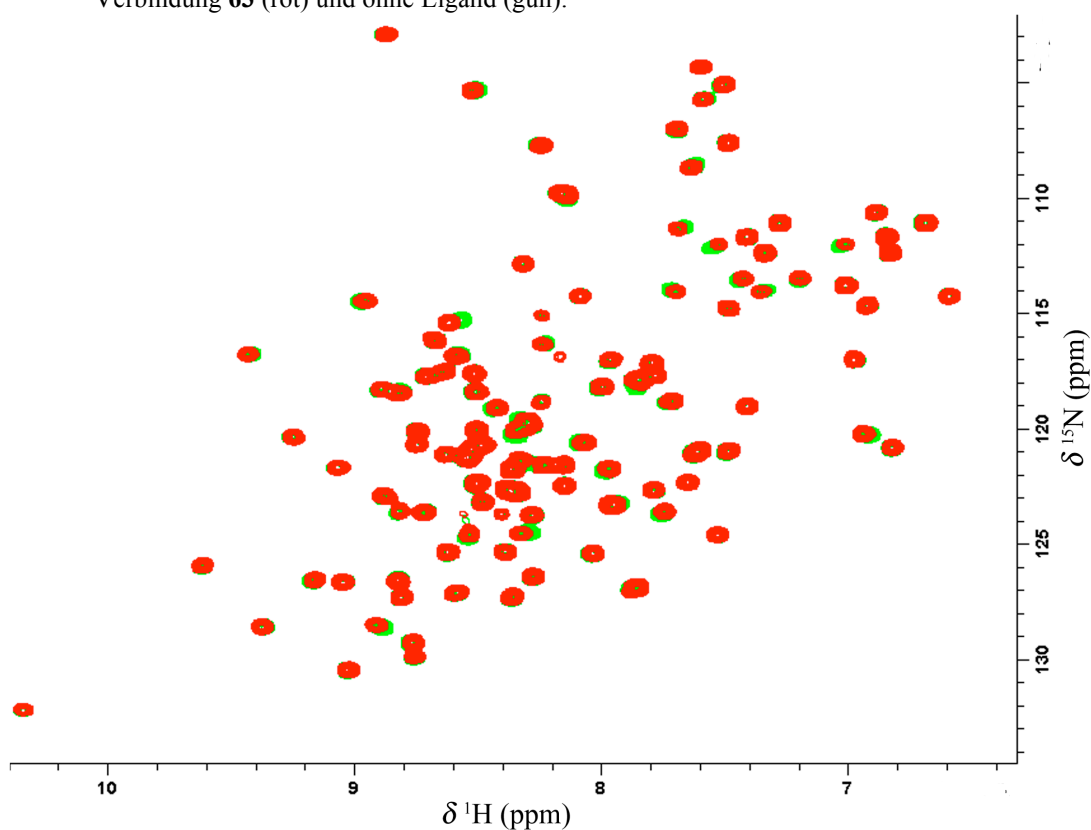


Abb. I.2 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung **64** (rot) und ohne Ligand (gün).

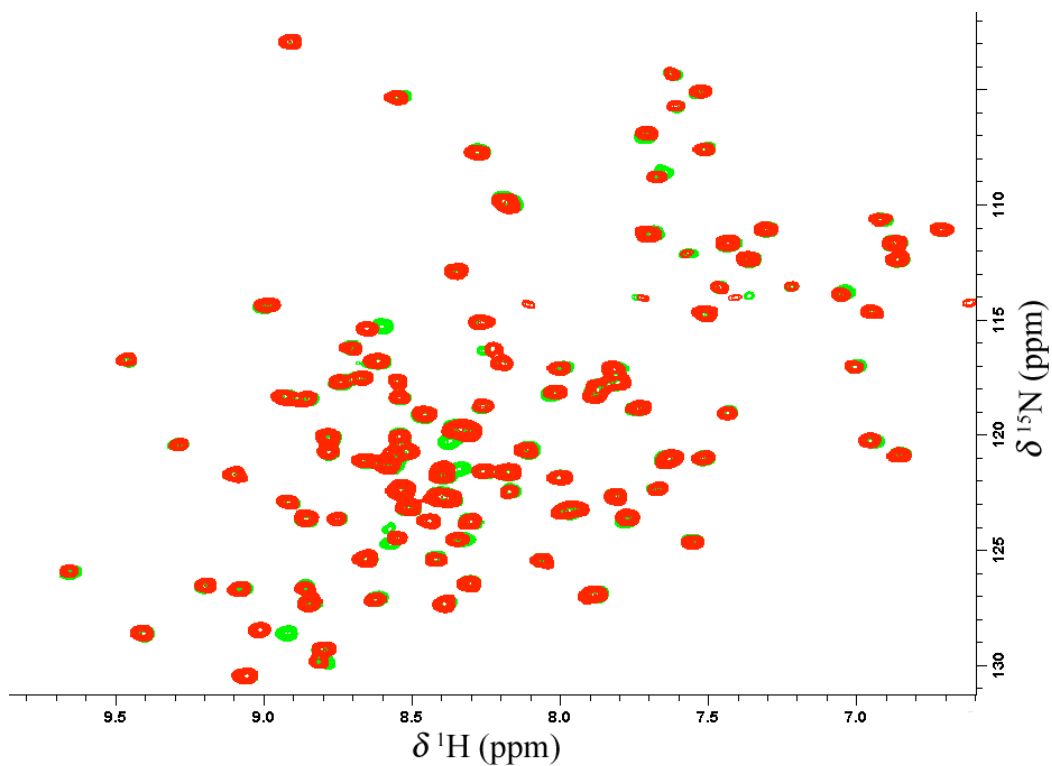


Abb. I.3 Superposition der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung **106** (rot) und ohne Ligand (gün).

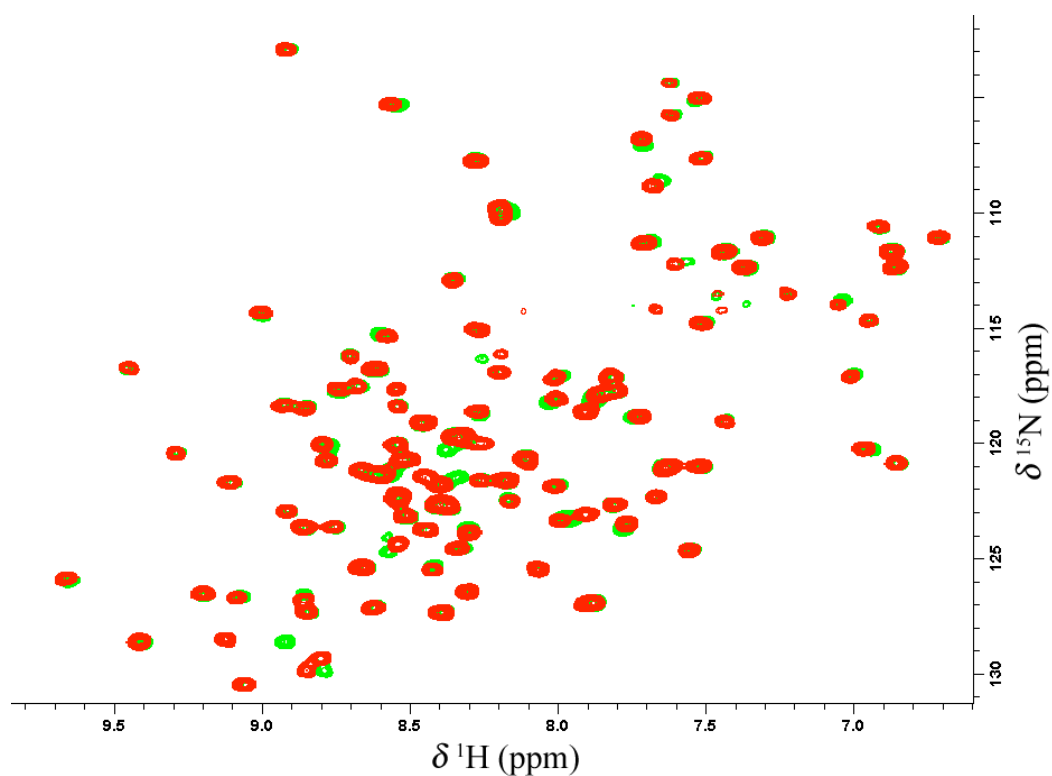


Abb. I.4 Superposition der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung **107** (rot) und ohne Ligand (gün).

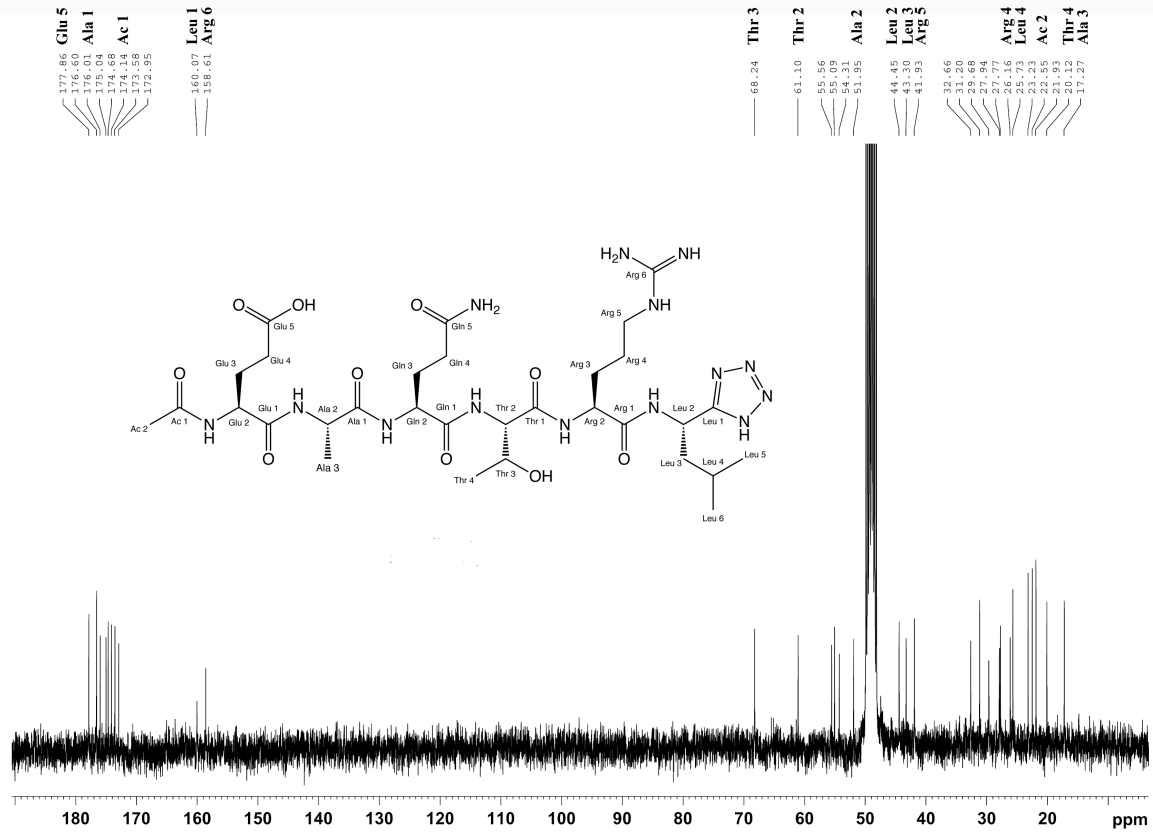
I.5.2. ^{13}C NMR-Spektrum des Tetrazolpeptids 100

Abb. I.5 ^{13}C NMR-Spektrum des Tetrazolpeptids (100). Die eindeutig zuordenbaren Signale sind entsprechend der Struktur gekennzeichnet.

I.6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Strukturen der Tubulin-Liganden Vinblastin (I) – ein Vincaalkaloid, Paclitaxel (II) – ein Taxan und Colchicin (III).	2
Abb. 1.2 Eine Auswahl von PPI-Domänen und deren bevorzugte Bindungsmotive bzw. Bindungspartner.	5
Abb. 1.3 Struktur der SH2-Domäne des <i>v-src</i> Onkoproteins im Komplex mit dem Peptid H ₂ N- <i>p</i> Y L R V A-OH (PDB: 1SHB).	6
Abb. 1.4 Struktur der PTB-Domäne des <i>Src homology-2 / collagen homology</i> (Shc)-Adaptorproteins im Komplex mit dem Peptid H ₂ N-H I I E N P Q <i>p</i> Y F S D A-OH (PDB: 1SHC).	7
Abb. 1.5 Struktur der WW-Domäne der Pin1 Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase im Komplex mit dem Peptid H ₂ N-Y <i>p</i> S P T <i>p</i> S P S-OH (PDB: 1F8A).	8
Abb. 1.6 Struktur der SH3-Domäne der <i>Abelson murine leukemia</i> (ABL)-Tyrosinkinase im Komplex mit dem Peptid H ₂ N-A P T M P P P L P P-OH (PDB: 1ABO).	10
Abb. 1.7 Struktur der EVH1-Domäne des <i>Ena/Vasp-like</i> (EVL)-Proteins im Komplex mit dem Peptid H ₂ N-E F P P P T-OH (PDB: 1QC6).	11
Abb. 1.8 Struktur der WW-Domäne von Dystrophin im Komplex mit dem Peptid H ₂ N-N M T P Y R S P P P Y V P-OH (PDB: 1EG4).	12
Abb. 1.9 Struktur der SAM-Domäne des Gerüstproteins Shank3 (PDB: 2F3N).	13
Abb. 1.10 Struktur der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 (PDB: 1BE9).	14
Abb. 1.11 Bindungsmodi der PDZ Domänen	16
Abb. 1.12 Struktur des Liganden S31-M2001 (V) der STAT3-SH2-Domäne. ^[74]	18
Abb. 1.13 Ligand VI der SH3-Domäne des <i>Src</i> -Proteins (P = Prolin, L = Leucin). ^[78]	18
Abb. 1.14 Ligand AP22161 (VII) der <i>Src</i> -SH2-Domäne. ^[77]	19
Abb. 1.15 Struktur des selektiven Inhibitors VIII der STAT3-SH2-Domäne. ^[79]	19
Abb. 1.16 Strukturen bekannter Liganden von PDZ-Domänen.	20
Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer exzitatorischen Synapse.	23
Abb. 3.2 Schematische Darstellung des Proteinnetzwerkes einer exzitatorischen Synapse.	24
Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Shank-Proteins.	24
Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Interaktion des Shank-Proteins.	25

Abb. 3.5 Sequenzalignment und Sekundärstruktur der humanen PDZ-Domänen von Shank1, 2 und 3.....	27
Abb. 3.6 Prinzip des FP-Assay.....	29
Abb. 3.7 Superposition der ¹ H, ¹⁵ N-HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne ohne Ligand in grün und mit achtfachem Überschuss an Verbindung 9 (A) bzw. 10 (B).....	36
Abb. 3.8 Grenzorbital-Modell (FMO-Modell) der Diels-Alder-Reaktion mit normalem und inversem Elektronenbedarf.....	38
Abb. 3.9 Theoretisch mögliche Produkte der Cycloaddition.....	41
Abb. 3.10 Mögliche Reaktionsmechanismen der Aza-Diels-Alder-Reaktion.....	42
Abb. 3.11 Strukturen der erwarteten Produkte bei der Verwendung der Dienophile 14 , 23 – 25	43
Abb. 3.12 Struktur und Kristallstruktur der Verbindung 32	45
Abb. 3.13 Chromatogramm der Verbindung 33 nach durch 49 katalysierter Reaktion bei einer Wellenlänge von 254 nm über eine chirale HPLC-Säule.....	47
Abb. 3.14 Enantioselektive Synthese (ee = 99 %) des Tetrahydrochinolinderivats 54 unter Verwendung des Liganden 52 . ^[152]	47
Abb. 3.15 Struktur und Kristallstruktur der Verbindung 58b	49
Abb. 3.16 Synthese der Verbindung 10 , durch Sulfenylchloridaddition an die Cyclopentenyl-doppelbindung der Disäure 66	51
Abb. 3.17 Mögliche Anordnungen der Edukte 16 und 66 während der Sulfenylchloridaddition.....	52
Abb. 3.18 Für die Bindung an die Shank3-PDZ-Domäne wichtige Substituenten (mit farbigen Kreisen markiert) und Beispiel für inaktive Verbindungen die zu diesem Schluss führten (im farbigen Rahmen).....	56
Abb. 3.19 Strukturen der Verbindungen 84 – 87	57
Abb. 3.20 Prinzip der <i>patch-clamp</i> -Messung.....	57
Abb. 3.21 Struktur der Shank3-PDZ-Domäne im Komplex mit 63	58
Abb. 3.22 Superposition der Strukturen der PDZ-Domänen von Shank1 (Orange) und Shank3 (Blau), jeweils mit Peptid bzw. Ligand 63	59
Abb. 3.23 Homodimer der Shank3-PDZ-Domäne.....	60
Abb. 3.24 Sequenzalignment ^[160] der für die Selektivitätsuntersuchung verwendeten PDZ Domänen, DVL3, PSD-95 PDZ1, 2 und 3, Alpha-1-syntrophin (SNTA1).....	63

Abb. 3.25 Vergleich von Tetrazol und Carbonsäure im protonierten und deprotonierten Zustand.	65
Abb. 3.26 Struktur und Kristallstruktur des Tetrazolleucins 97 mit Fehlordnung der Fmoc-Gruppe.	68
Abb. 3.27 Vorschläge für mögliche Carboxylatisostere.	70
Abb. 3.28 Strukturen der drei Verbindungen (103 – 105) aus dem Screening der Carboxylatbibliothek mit IC_{50} -Werten von jeweils etwa 300 μ M.	71
Abb. 3.29 Die im virtuellen Screening aktiven Verbindungen 106 – 110 und Auftragung der FP gegen den Logarithmus der Konzentration von Verbindung 106	71
Abb. 3.30 Untersuchte Derivate 111 - 116 der aktiven Fragmente 105 – 107	72
Abb. 3.31 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren ohne Ligand (grün) und mit achtfachem Überschuss an Ligand 105 (A) und 111 (B).	73
Abb. 3.32 Schematischer Aufbau des DVL-Proteins.	74
Abb. 3.33 Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs.	75
Abb. 3.34 Sequenzalignment und Sekundärstruktur der humanen PDZ-Domänen von DVL1, 2 und 3.	76
Abb. 3.35 Grundstruktur (165) der Liganden für die DVL3-PDZ-Domäne (X = Halogen; R = Aromat)	80
Abb. 3.36 Struktur der Verbindung 166	80
Abb. 3.37 Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters (A; vgl. [204]) und exothermes ITC-Experiment mit einem Verhältnis von 0.5 des Interaktionspartner A zu Interaktionspartner B (B).	81
Abb. 3.38 Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne im Komplex mit 166	82
Abb. 3.39 ITC-Messungen der Verbindung 166 mit A: DVL3-PDZ-Domäne. B: DVL1-PDZ-Domäne.	83
Abb. 3.40 Kristallstruktur der DVL3 PDZ-Domäne im Komplex mit 144	86
Abb. 3.41 Superposition der Kristallstrukturen der DVL3-PDZ-Domänen im Komplex mit 166 (orange) und 167 (blau).	87
Abb. 3.42 Vorschlag für eine nicht-peptidische Fluoreszenzsonde auf Grundlage von Inhibitoren der DVL3-PDZ-Domäne.	88

Abb. 3.43 A: Kristallstruktur der DVL3-PDZ-Domäne mit der Verbindung 167 . Der gestrichelte Kreis gibt die wahrscheinliche Lage des Naphtylrestes der Verbindung 174 an. B: Struktur der Verbindung 174 .	89
Abb. 3.44 A: Superposition der Kristallstrukturen der DVL-PDZ-Domäne im Komplex mit 167 (blau) und dem Peptid E I L W S D I P (orange; PDB 3CC0). B: Struktur der Verbindung 175 .	90
Abb. 3.45: Superposition der Kristallstrukturen der DVL-PDZ-Domäne im Komplex mit 167 (blau) und Sulindac (orange; PDB 2KAW).	90
Abb. 4.1 Vergleich der Strukturen des Inhibitors 63 gebunden an die mShank3-PDZ-Domäne (A), der Liganden 166 (B) und 167 (C) im Komplex mit der hDVL3-PDZ-Domäne und Sulindac gebunden an die mDVL1-PDZ-Domäne (PDB: 2KAW) (D).	92
Abb. I.1 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung 63 (rot) und ohne Ligand (gün).	178
Abb. I.2 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung 64 (rot) und ohne Ligand (gün).	178
Abb. I.3 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung 106 (rot) und ohne Ligand (gün).	179
Abb. I.4 Superposition der ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektren der Shank3-PDZ-Domäne in Anwesenheit von Verbindung 107 (rot) und ohne Ligand (gün).	179
Abb. I.5 ^{13}C NMR-Spektrum des Tetrazolpeptides (100). Die eindeutig zuordenbaren Signale sind entsprechend der Struktur gekennzeichnet.	180

1.7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Klassifikation der PDZ-Domänen entsprechend der Spezifität für C-terminale Peptide	15
Tabelle 3.1 Aminosäuresequenzen und Affinitäten der von GKAP abgeleiteten Peptide.	31
Tabelle 3.2 Optimierung der Aza-Diels-Alder Reaktion. Die optimalste Bedingung ist Blau unterlegt.	39
Tabelle 3.3 Verwendete chirale Lewis- Säuren (49 - 51) ^{[150],[151]} und Ausbeuten der Synthese von 26 .	46
Tabelle 3.4 Strukturen und K_I -Werte von den an der Shank3-PDZ-Domäne vermessenen Verbindungen 9, 10, 59, 63 – 75 und 77 – 83 .	53
Tabelle 3.5 Zusammenfassung der Bindungsstudie, durchgeführt mittels ^1H , ^{15}N -HSQC NMR-Spektroskopie	61

Tabelle 3.6 Affinitäten der im Alaninscan verwendeten Peptide 88 - 93	64
Tabelle 3.7 Optimierung der Tetrazolsynthese.	66
Tabelle 3.8 Chemische Verschiebungen des C-1 Kohlenstoffs (rot markiert) der Aminosäurederivate 94 – 97 im ^{13}C NMR-Spektrum	67
Tabelle 3.9 An der DVL3-PDZ-Domäne vermessene potenzielle Fluoreszenzsonden	77
Tabelle 3.10 Aminosäuresequenzen und K_D -Werte der Tetrapeptide 103 - 123	78
Tabelle 3.11 Abstände zwischen interagierenden Atomen der Liganden 166 und 167 zur DVL3-PDZ-Domäne, ermittelt aus der jeweiligen Kristallstruktur.	87
Tabelle I.1 Strukturen und Polarisationsabnahme der Primärhits des Screenings der ChemBioNet- Bibliothek im Vergleich zur Negativkontrolle	158
Tabelle I.2 Primärhits des Screenings der Carboxylatbibliothek	161
Tabelle I.3 Experimental details.....	163
Tabelle I.4 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters [\AA^2].....	164
Tabelle I.5 Atomic displacement parameters [\AA^2].....	164
Tabelle I.6 Bond length [\AA] and angles [$^\circ$].	165
Tabelle I.7 Experimental details.....	166
Tabelle I.8 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent displacement parameters [\AA^2]	167
Tabelle I.9 Atomic displacement parameters [\AA^2]	168
Tabelle I.10 Bond length [\AA] and angles [$^\circ$].	169
Tabelle I.11 Crystal data of Tetrazol 97	171
Tabelle I.12 Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters [\AA^2].....	172
Tabelle I.13 Atomic displacement parameters [\AA^2] of 97	173
Tabelle I.14 Bond length [\AA] and angles [$^\circ$]	173
Tabelle I.15 Crystallographic analysis of mShank3-PDZ domain in complex with 63	176
Tabelle I.16 Crystallographic analysis of hDVL3-PDZ domain in complex with 166 and 167	177