

**Benzoylphosphonate als  
photovernetzbare  
Phosphotyrosinmimetika**

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

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

vorgelegt von Dipl.-Chem. André Horatscheck  
aus Berlin

2011



Diese Arbeit wurde in der Zeit von März 2007 bis August 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Rademann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hackenberger

Disputationstermin: 16.11.2011



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, André Horatscheck, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine weiteren, als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

André Horatscheck



*Meinen Eltern gewidmet*



*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not “Eureka!”(I found it!) but “That’s funny...”*

(Isaac Asimov)



# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst bei Prof. Jörg Rademann für das mir entgegengebrachte Vertrauen und das interessante Dissertationsthema sowie die Betreuung bedanken.

Darüber hinaus möchte ich Prof. Christian Hackenberger für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Überaus wichtig war für mich das angenehme Arbeitsklima für das ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe herzlich bedanken möchte. Insbesondere Liudmila Perepelitchenko möchte ich für ihre stete Geduld, ihr offenes Ohr und ihre liebevolle Umsorgung ganz besonders danken. Ein besonderer Dank gilt auch meiner ersten Abzugs-WG-Partnerin Stefanie Grosskopf, meinen Abzugs- und Labornachbarn Johannes Preidl, Richard Raz, Katharina Koschek, Jörn Saupe, Sina Meyer, Keven Mallow, Martin Richter, Kai Holland-Nell und Viviane Uryga-Polowy für viele schöne und lustige Momente, aber auch interessante Diskussionen. Es ist wirklich nie langweilig mit euch geworden. Für eine ebenso lustige Atmosphäre und die stete Diskussionsbereitschaft möchte ich mich auch bei meiner Büro-WG, Adeeb El-Dahshan, Boo Geun Kim, Vera Martos Riaño, Franziska Gottschalk und Johannes Preidl bedanken.

Richard Raz möchte ich für die Diskussionen im Zusammenhang mit dem Pyrimidotriazin-Thema sowie für die Einführung in Enzymassays danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei Boo Geun Kim und Samuel Beligny für die Einführung in das Gebiet der Fluoreszenzpolarisationsassays bedanken. Mein Dank gilt auch Stefan Wagner für seine engagierte und verlässliche Unterstützung im Benzoylphosphonat-Projekt. Ein ganz besonderer Dank gilt Isabel Fernández Bachiller für viele anregende Unterhaltungen, Diskussionen und Kaffeepausen ohne Kaffee.

Bei Isabel Fernández Bachiller, Stefanie Grosskopf, Vera Martos Riaño und Richard Raz möchte ich mich für das kritische Durchlesen meiner Dissertation bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Screening Unit, insbesondere bei Dr. Jens-Peter von Kries, Carola Seyffarth und Chris Eckert für ihre besondere Hilfsbereitschaft. Bei Problemen mit Assays oder in biologischen Fragen sind sie immer zur Stelle gewesen. Darüber hinaus möchte ich mich für die Möglichkeit der Nutzung der Geräte bedanken und die Flexibilität, die manchmal dafür nötig war. Ebenso möchte ich mich bei Edgar Specker und Katy Franke für eine gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Rebecca Klingberg für die Einführung in die Methodik von SDS-PAGE.

Für seinen Einsatz und seine Hilfe bei der Auswertung der Kinetikdaten der Was-

serstoffperoxiderzeugung, sowie seine stete Diskussionsbereitschaft möchte ich Prof. Sandro Keller herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich Dr. Anne Diehl für die Expression, Aufreinigung und Bereitstellung des Proteins STAT5b danken. Matthew Groves möchte ich für die Bereitstellung des Enzyms MtpA danken.

Dr. Michael Lisurek möchte ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe und Durchführung der Docking-Experimente danken.

Ferner möchte ich Dr. Matthias Heinze für die Einführung in die Durchflusszytometrie danken.

Ein weiterer Dank gilt meinen beiden Forschungspraktikanten Nadine Herbst und Fabian Voigt für die Mitarbeit am Pyrimidotriazin-Projekt.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich zu jeder Zeit in jeder erdenklichen Weise während des Studiums und der Promotion unterstützt haben. Darüber hinaus möchte ich auch meinen Freunden und allen, die für mich da waren, danken, auch wenn durch die Promotion die Freizeit und so einiges anderes manchmal auf der Strecke blieb.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
2.1	Die Funktion von Proteinphosphorylierungen in der Signaltransduktion	3
2.2	Phosphotyrosin-erkennende Domänen . . . . .	4
2.2.1	Proteintyrosinphosphatasen . . . . .	4
2.3	Src-Homologie-2-Domänen . . . . .	10
2.3.1	Struktur von SH2-Domänen . . . . .	10
2.3.2	STAT-Proteine . . . . .	12
2.4	pTyr-Mimetika zur Entwicklung von Inhibitoren gegen PTP- und SH2-Domänen . . . . .	18
2.5	Photoaffinitätsmarkierungen . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Zielstellung Thema I</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Benzoylphosphonate als photovernetzbare Phosphotyrosinmimetika</b>	<b>27</b>
4.1	Design des photovernetzbaeren Phosphotyrosinmimetikums . . . . .	27
4.2	Synthese von $\alpha$ -Ketophosphonaten . . . . .	28
4.2.1	Synthese von Benzoylphosphonat <b>11</b> . . . . .	28
4.2.2	Synthese von Biotin-markiertem Benzoylphosphonat <b>13</b> . . . . .	28
4.3	Photochemische Untersuchungen des Benzoylphosphonats <b>11</b> . . . . .	33
4.3.1	Kurze Einfuehrung in die Photochemie . . . . .	33
4.3.2	Photodimerisierung von Benzoylphosphonat <b>11</b> . . . . .	37
4.3.3	Nachweis der Photovernetzung von Benzoylphosphonat <b>11</b> mit Peptiden . . . . .	46
4.4	Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum . . . . .	48
4.4.1	Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum fuer Proteintyrosinphosphatasen am Beispiel von MptpA . . . . .	49
4.4.2	Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum fuer SH2-Domänen am Beispiel von STAT5b . . . . .	51

4.4.3	Benzoylphosphonate als Bestandteil peptidischer Photoaffinitäts- sonden . . . . .	56
4.5	Experimente zur Photovernetzung von Benzoylphosphonatsonden mit STAT5b . . . . .	60
4.5.1	Untersuchungen zur Photostabilität der Photoaffinitäts- sonden . . . . .	61
4.5.2	Experimente zur Photovernetzung von Benzoylphosphonat- sonden mit STAT5b . . . . .	62
4.6	Ausblick . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung Thema I</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Einführung Thema II</b>	<b>81</b>
6.1	Redoxsensitivität von Proteintyrosinphosphatasen . . . . .	81
<b>7</b>	<b>Zielstellung Thema II</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Pyrimidotriazine zur <i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Generierung von Wasserstoff- peroxid</b>	<b>87</b>
8.1	Synthese der Pyrimidotriazinderivate . . . . .	88
8.1.1	Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin <b>45</b> . . . . .	88
8.1.2	N-Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin <b>57</b> und 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin <b>58</b> . . . . .	90
8.2	Untersuchungen zur Charakterisierung des Redoxzyklus der Pyrimido- triazine . . . . .	94
8.3	Quantifizierung des durch Pyrimidotriazine gebildeten Wasserstoffperoxids	97
8.3.1	Europium-Tetracyclin-Assay . . . . .	97
8.4	Experimente zur Inhibition von Proteintyrosinphosphatasen durch Py- rimidotriazine . . . . .	101
8.5	Messung intrazellulärer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Erzeugung durch Pyrimidotriazine mittels FACS . . . . .	106
8.5.1	FACS-Experimente zum Nachweis der Wasserstoffperoxid- Produktion in Jurkat-Zellen . . . . .	107
8.6	Ausblick . . . . .	111
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung Thema II</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>117</b>
10.1	Allgemeine Arbeitstechniken . . . . .	117

10.2	Analytische Methoden . . . . .	117
10.2.1	LC/MS . . . . .	117
10.2.2	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) . . . . .	119
10.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC) . . . . .	119
10.2.4	Bestimmung von Extinktionskoeffizienten . . . . .	119
10.3	Präparative Methoden . . . . .	120
10.3.1	Mikrowellenunterstützte Synthese . . . . .	120
10.3.2	Präparative HPLC . . . . .	120
10.3.3	Flash-Chromatographie . . . . .	120
10.3.4	Säulenchromatographie . . . . .	120
10.4	Methoden bei der Durchführung von Assays . . . . .	121
10.4.1	Zellkultur . . . . .	121
10.4.2	FACS . . . . .	121
10.4.3	Verwendete Proteine . . . . .	121
10.4.4	Europium-Tetracyclin-Assay zur Bestimmung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	122
10.4.5	Assays im 384-Well Mikrotiterplattenformat . . . . .	123
10.4.6	Photovernetzungsexperimente . . . . .	128
10.5	Synthese . . . . .	132
10.5.1	Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin <b>45</b> . . . . .	132
10.5.2	Synthese von $\alpha$ -Ketophosphonaten . . . . .	138
10.5.3	Peptide . . . . .	151
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>167</b>
11.1	NMR-Spektren . . . . .	167
11.1.1	Pyrimidotriazinderivate . . . . .	167
11.1.2	Benzoylphosphonatderivate . . . . .	171
11.2	Massenspektren . . . . .	179
11.2.1	Protokoll der LC/MS/MS-Analyse nach Pulldown und trypti- schem Verdau . . . . .	179
11.3	UV-Spektren . . . . .	182
11.3.1	UV-Spektrum von 3-Styrylpyrimidotriazin <b>45</b> . . . . .	182
11.3.2	UV-Spektrum von Benzoylphosphonat <b>11</b> . . . . .	182
11.4	SDS-Gele . . . . .	183
11.4.1	Zeitabhängigkeit der Photovernetzung . . . . .	183
11.4.2	Abhängigkeit der Photovernetzung von der Proteinkonzentration	184
11.4.3	Abhängigkeit der Photovernetzung von der Sondenkonzentration und Vergleich mit BSA . . . . .	185

11.4.4	Photovernetzung nach Denaturierung des Proteins mit Harnstoff	186
11.4.5	Verdrängung der PAL-Sonde mit einem kompetitiven Inhibitor .	187
11.4.6	Pulldown-Experimente . . . . .	188

# Abkürzungsverzeichnis

A	Absorbanz
A	Anisotropie
Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
Å	Angström
BSA	Bovine Serum Albumin
CDI	Carbonyldiimidazol
CML	Chronische myeloische Leukämie
DAD	Diodenarraydetektor
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
$\delta$	Chemische Verschiebung (NMR-Spektroskopie)
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DIC	<i>N, N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO(- $d_6$ )	(Deuteriertes) DMSO
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSP	Dualspezifische Proteinphosphatase
DTT	1,4-Dithiothreitol

EC <sub>50</sub>	Konzentration, die benötigt wird, um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDT	Ethandithiol
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPO	Erythropoetin
$\epsilon$	Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
ESI	Elektrospray-Ionisierung
$\eta$	Viskosität
Et	Ethyl
FACS	Fluorescence Assisted Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FSC	Forward Scatter (Detektor, FACS)
GAS	Interferon $\gamma$ -Activating Sequence
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth Hormone
GLUT4	Glucosetransporter 4
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSH	Glutathion
GTPase	Guanosintriphosphatase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (NMR)
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HOPS	Homotypic Vacuole Fusion and Vacuole Protein Sorting

HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration, die benötigt wird, um 50 % des Enzyms zu inhibieren
IC	Internal Conversion
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleukin
I <sub>p</sub> , I <sub>s</sub>	Fluoreszenzintensität parallel bzw. senkrecht zur Polarisationssebene
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISC	Intersystem Crossing
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
JAK	Januskinase
Kap.	Kapitel
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LMW-PTP	Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Maltose Binding Protein
mm	Millimeter
MO	Molekülorbital
MOPS	3-( <i>N</i> -morpholin)propansulfonsäure
MptpA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein Tyrosine Phosphatase A
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MWD	Multiwellenlängendetektor
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NES	Nuclear Export Signal
NMR-Spektroskopie	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
Nox4	NAD(P)H-Oxidase 4
nRPTP	nicht-Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase
OD	Optische Dichte
PAL	Photoaffinity Labeling
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
P	(Fluoreszenz)-Polarisation
PRLR	Prolaktinrezeptor
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPTP	Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase
R	Rydberg-Konstante
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SH2-Domäne	Src-Homologie-2-Domäne
SHP-2	SH2-Domäne-enthaltende Proteintyrosinphosphatase

SNARE	Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
SOS	Son-Of-Sevenless (Protein)
SSC	Side Scatter (Detektor, FACS)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMSBr	Trimethylsilylbromid
ToF-MS	Time-of-Flight Mass Spectrometry
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T	Temperatur
TYK2	Tyrosinkinase 2
UV	Ultraviolett
VPS33B	Vacuolar Protein Sorting 33B
V	Volumen



## Zusammenfassung

Fehlregulationen des Phosphorylierungsgrads von Proteinen führen zu zahlreichen Krankheiten, wie Krebs und Diabetes. Als Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente ist eine genaue Kenntnis der molekularen Wechselwirkungen unabdingbar. Photoaffinitätsmarkierungen stellen in diesem Zusammenhang ein äußerst wichtiges Werkzeug dar.

Der erste Teil der Arbeit bestand in der Entwicklung eines photovernetzbaaren Phosphotyrosinmimetikums basierend auf Benzoylphosphonat. Die Photoreaktivität wurde zunächst anhand der Photodimerisierung von Benzoylphosphonat **19** untersucht. Dabei konnten erstmals die Photodimerisierungsprodukte isoliert und strukturell charakterisiert werden.

Benzoylphosphonat **19** wies sehr gute Affinitäten zur PTP-Domäne von MptpA und zur SH2-Domäne von STAT5b mit  $K_i$ -Werten von 186  $\mu\text{M}$  bzw. 326  $\mu\text{M}$  auf. Die Bestrahlung bei 365 nm führte zu einer ca. zehnfachen (MptpA) bzw. zweifachen (STAT5b) Erhöhung der Aktivität. Der Einbau des Benzoylphosphonats in eine Peptidsequenz führte zu hochaffinen PAL-Sonden für STAT5b mit Bindungskonstanten zwischen 0.90  $\mu\text{M}$  und 11  $\mu\text{M}$ , wenngleich diese nicht ganz so aktiv waren wie die Phosphotyrosinpeptide. Die Bestrahlung der PAL-Sonde Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **48** in Gegenwart von STAT5b resultierte in einer Verdoppelung der Aktivität. Die Bestrahlung der Phosphotyrosinpeptide hatte hingegen keinen Effekt.

Untersuchungen der PAL-Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **45** zeigten eine zeit- und konzentrationsabhängige Sättigung der Photovernetzung mit STAT5b. Die Spezifität der Photovernetzung wurde u. a. durch Unterdrückung der Vernetzung durch einen Verdränger nachgewiesen. In ersten Experimenten mit einer Biotin-markierten Sonde konnte STAT5b photovernetzt und über Avidin-Harzkugeln isoliert werden, was nach tryptischem Verdau durch Massenspektrometrie bestätigt werden konnte.

Der Einsatz von Benzoylphosphonaten als photovernetzbaare Phosphotyrosinmimetika in PAL-Sonden bietet viele Anwendungsmöglichkeiten in der Proteomik, z. B. bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der Untersuchung des Inhibitionsmechanismus von Pyrimidotriazindionen gegenüber Proteintyrosinphosphatasen (PTPs). Diese Substanzklasse wird in Gegenwart von Reduktanden wie DTT oder NADH zu Dihydropyrimidotriazindionen reduziert. Die anschließende Reoxidation führt unter aeroben Bedingungen zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches über einen Europium-Tetracyclin-Assay quantifiziert wurde.

Inhibitionsstudien von Pyrimidotriazinen gegenüber der Proteintyrosinphosphatase MptpA zeigten  $IC_{50}$ -Werte im hohen nanomolaren Bereich. Steigende Konzentrationen von DTT hatten hingegen eine Reduktion der Inhibitionswirkung zur Folge, was auf eine Reaktivierung des durch  $H_2O_2$  oxidierten Cysteinrests schließen lässt. Ein Vergleich der durch Pyrimidotriazine erzeugten Mengen  $H_2O_2$  und der zur PTP-Inhibition benötigten Menge ließen eine alleinige Inhibition durch  $H_2O_2$  vermuten. Dies wurde durch den Verlust der Inhibitionswirkung in Gegenwart von Katalase bestätigt.

Darüber hinaus wurde die Produktion von mikromolaren Mengen Wasserstoffperoxid durch nanomolare Pyrimidotriazinkonzentrationen auch in Jurkat-Zellen ohne Reduktionsmittelzusatz durch FACS nachgewiesen. Im Gegensatz zu direkter  $H_2O_2$ -Zugabe zeigte sich bei den Pyrimidotriazinen jedoch keine Sättigung des intrazellulären Wasserstoffperoxids. Es ist denkbar, dass Pyrimidotriazine bei der Erforschung redoxregulierter Systeme zur selektiven Produktion von Wasserstoffperoxid in Zellen eingesetzt werden könnten.

## Abstract

Failure in the regulation of phosphorylation in proteins leads to a number of diseases like cancer and diabetes. As a basis for drug development, an exact knowledge of the molecular interactions is required. In this area photoaffinity labeling is a very powerful tool for the elucidation of protein function.

The first part of the thesis was concerned with the development of a photocrosslinkable phosphotyrosine mimetic based on benzoylphosphonate. The photoreactivity of benzoylphosphonate **19** was investigated through photodimerization. To my knowledge, photodimerization products could be isolated and structurally characterized for the first time.

Benzoylphosphonate **19** showed a very good affinity towards the protein tyrosine phosphatase (PTP) domain of MptpA and the SH2 domain of STAT5b with  $K_i$  values of  $186\ \mu\text{M}$  and  $326\ \mu\text{M}$  respectively. Irradiation of the samples at  $365\ \text{nm}$  led to a ten-fold (MptpA) and a two-fold (STAT5b) increase of affinity. The incorporation of the benzoylphosphonate into peptide sequences led to high affinity PAL probes for STAT5b with binding constants between  $0.90\ \mu\text{M}$  and  $11\ \mu\text{M}$ , although they were not as active as the native phosphotyrosine peptides. Irradiation of the probe Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **48** resulted in a two-fold increase of activity. Irradiation of the phosphotyrosine peptides had no effect.

Investigations of PAL probe FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **45** showed a time and concentration dependent saturation of photocrosslinking. The crosslinking specificity was proven amongst others by crosslinking inhibition upon addition of a ligand displacing the PAL probe. In trial experiments with a biotinylated probe, STAT5b could be photocrosslinked and isolated with avidin beads. STAT5b was identified by mass spectrometry after tryptic digestion of the corresponding gel band.

PAL probes based on benzoylphosphonates as photocrosslinkable phosphotyrosine mimetics provide a powerful tool in proteomics, e.g. in exploring protein ligand interactions.

In the second part of the thesis, the mechanism of inhibition for pyrimidotriazines against PTPs was examined. This class of substances is reduced by reducing agents such as DTT or NADH resulting in the formation of dihydropyrimidotriazines. The following reoxidation under aerobic conditions is accompanied by hydrogen peroxide production which was quantified using a europium-tetracycline-assay.

Inhibition studies of pyrimidotriazines against the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A (MptpA) revealed  $\text{IC}_{50}$  values in the high nanomolar range.

Increasing concentrations of DTT resulted in decreasing inhibitory activity indicating a partial reactivation of the oxidized active cysteine residue. A comparison of the amount of hydrogen peroxide produced by pyrimidotriazines with that needed for ptp inhibition led to the conclusion that inhibition is mediated solely by  $H_2O_2$ . This was confirmed by experiments in the presence of catalase which resulted in a complete loss of inhibition. Furthermore production of micromolar amounts of  $H_2O_2$  by nanomolar pyrimidotriazine concentrations was also shown to work in Jurkat cells using FACS. In contrast to direct addition of  $H_2O_2$ , pyrimidotriazines showed no saturation of intracellular  $H_2O_2$ . It is conceivable that pyrimidotriazines could be used as tools in redox regulation research to selectively produce hydrogen peroxide in cells.

# 1 Einleitung

„Die reversible Phosphorylierung von Proteinen reguliert nahezu jeden Aspekt des zellulären Lebens.“<sup>[1]</sup> Sie zählt zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und kann die Funktion von Proteinen in vielfacher Hinsicht beeinflussen. Phosphorylierung und Dephosphorylierung können Aktivierung oder Deaktivierung eines Enzyms, Markierung zur Proteolyse, Initiierung oder Inhibition der Translokation innerhalb subzellulärer Kompartimente oder Aufbau bzw. Zerstörung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Folge haben. Einige natürlich vorkommende Toxine oder Tumorpromotoren entfalten ihre Wirksamkeit durch Beeinflussung des Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsgleichgewichts. So ist beispielsweise das zyklische Heptapeptid Microcystin-LR, ein Toxin von Cyanobakterien, ein äußerst starker Phosphataseinhibitor mit  $K_i$ -Werten unterhalb 0.1 nM und wirkt als sehr potentes Lebergift und -karzinogen.<sup>[2]</sup>

Die Proteinphosphorylierung ist eine häufige Methode von Organismen zur Signalübertragung. Eine Störung im Phosphorylierungsgleichgewicht kann zu Krankheiten wie Krebs<sup>[3]</sup> oder Diabetes<sup>[4]</sup> führen, welche zu den zehn häufigsten Todesursachen gehören.<sup>[5]</sup> Als Basis zur zielgerichteten Entwicklung von Wirkstoffen müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen, insbesondere die Wechselwirkungen von verschiedenen Proteinen innerhalb eines Signaltransduktionswegs erforscht werden. In diesem Zusammenhang sind Photoaffinitätsmarkierungen ein überaus hilfreiches Werkzeug in der Proteomik. Sie ermöglichen die Lokalisierung von Proteinen in Zellen, die Identifizierung von Bindungspartnern und Bindungsorten. Darüber hinaus stellen sie auch ein nützliches Werkzeug zur Isolierung bzw. Aufreinigung dieser Konjugate dar.

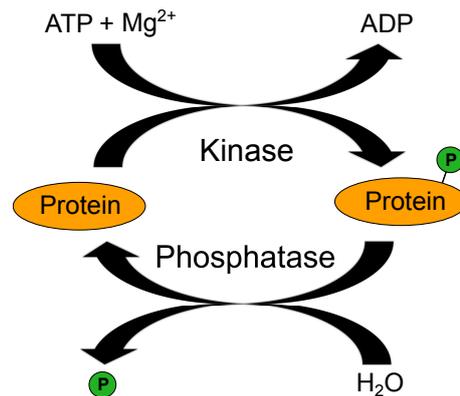


## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Die Funktion von Proteinphosphorylierungen in der Signaltransduktion

Proteinphosphorylierungen stellen einen bedeutenden Regulationsmechanismus in der Signaltransduktion dar. Zu den wichtigsten Phosphorylierungsstellen gehören Serin-, Threonin- und Tyrosinreste. Letztere wurde durch *Eckhardt et al.* 1979 vergleichsweise spät identifiziert.<sup>[6]</sup> Dies liegt vor allem daran, dass sich Tyrosinphosphorylierungen hauptsächlich an weniger abundanten Proteinen befinden. Laut *Macek et al.* entfallen 86.4% der Phosphorylierungsstellen im Menschen auf Phosphoserin (4901), 11.8% auf Phosphothreonin (670) und nur 1.8% auf Phosphotyrosin (103), basierend auf mehr als 2000 Phosphoproteinen.<sup>[7]</sup> Es ist demnach äußerst selten, dass ein Phosphoprotein nur eine Phosphorylierungsstelle enthält. Beispielsweise wird Glycogensynthase an neun verschiedenen Serinresten durch mindestens sechs verschiedene Enzyme phosphoryliert.<sup>[8]</sup>

Die präzise Regulation von Phosphorylierung durch Kinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen (Abb. 2.1) ist äußerst wichtig. Phosphorylierungen können beispielsweise direkten Einfluss auf die enzymatische Aktivität eines Proteins nehmen. Dies kann in einigen Fällen wie bei der Proteintyrosinphosphatase SHP-2 zu einer Aktivierung oder in anderen Fällen zu einer Deaktivierung wie bei der Glycogensynthasekinase-3 (GSK-3) führen. Einige Signalwege wie der MAP-Kinase-Weg bestehen aus Phosphorylierungskaskaden, in denen eine Kinase die nächste durch Phosphorylierung aktiviert. Darüber hinaus können phosphorylierte Aminosäuren auch wichtiger Bestandteil von Protein-Protein-Wechselwirkungen sein. In diesem Zusammenhang werden insbesondere durch Phosphotyrosin vermittelte Protein-Interaktionen intensiv erforscht. Dabei stehen vor allem Src-Homologie-2-(SH2)-Domänen im Mittelpunkt des Interesses.



**Abb. 2.1:** Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch Kinasen bzw. Phosphatasen

Um SH2-Domänen oder Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) gezielt adressieren zu können, ist eine detaillierte Kenntnis der essenziellen Wechselwirkungen bei der Phosphotyrosinerkennung durch die entsprechenden Domänen erforderlich.

## 2.2 Phosphotyrosin-erkennende Domänen

Die Erkennung von Phosphotyrosin ist zum einen Bestandteil der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen von PTPs, zum anderen der Protein-Protein-Interaktionen mit SH2-Domänen-beinhaltenen Proteinen. Darüber hinaus existieren auch Phosphotyrosin-bindende (PTB) Domänen. Der Anteil der Phosphotyrosinbindung an der Gesamtaffinität ist jedoch so gering, dass auch entsprechende Peptidsequenzen ohne Phosphotyrosin gebunden werden.<sup>[9]</sup> Sie werden aufgrund ihrer geringen Spezifität gegenüber Phosphotyrosin hier nicht weiter beschrieben.

### 2.2.1 Proteintyrosinphosphatasen

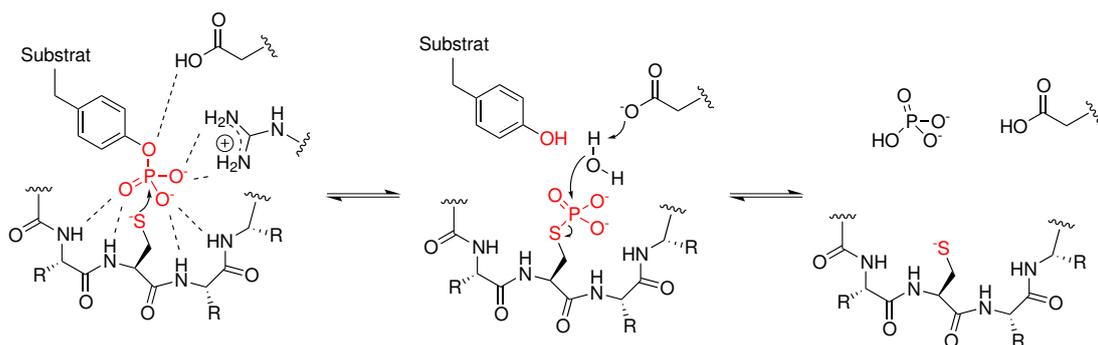
Proteintyrosinphosphatasen sind in die Regulation vieler Prozesse wie beispielsweise Zellmetabolismus, Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Immunantwort und Apoptose eingebunden.

Sie können in vier Familien eingeteilt werden:

1. klassische Rezeptor-Proteintyrosinphosphatasen (RPTPs)
2. klassische Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinphosphatasen (nRPTPs)
3. dualspezifische Phosphatasen (DSPs)
4. niedermolekulare Proteintyrosinphosphatasen (LMW-PTPs)

### 2.2.1.1 Phosphotyrosinerkennung und Katalysemechanismus

Alle Cystein-basierten Proteintyrosinphosphatasen beinhalten ein hoch konserviertes (H/V)CX<sub>5</sub>R(S/T)-Motiv, den sogenannten „P-Loop“.<sup>[10,11]</sup> Das darin enthaltene Cystein ist essenziell für die katalytische Aktivität. Es besitzt einen bemerkenswert niedrigen pK<sub>a</sub>-Wert von kleiner als 6 (freies Cystein: 8.3), dessen genauer Wert jedoch je nach Phosphatase etwas variiert.<sup>[12–15]</sup> Ursache für diesen niedrigen pK<sub>a</sub>-Wert ist, neben dem Argininrest des CX<sub>5</sub>R-Motivs, ein elektrostatisches Feld, das durch die Mikrodipole des Rückgrats erzeugt wird.<sup>[16]</sup> Dies ermöglicht eine effiziente Bildung des Thiolations, einem guten Nucleophil für den Angriff des Tyrosinphosphatrestes. Phosphotyrosin wird durch Wasserstoffbrückenbindungen über die Phosphatsauerstoffatome mit dem Argininrest und den Amidstickstoffen des Rückgrats gebunden und für einen nucleophilen Angriff des Thiolats in Position gehalten (Abb. 2.2). Dabei entsteht ein Phosphorylcysteinintermediat<sup>[17]</sup> und ein Phenolat, welches durch einen Asparaginsäurerest protoniert wird.<sup>[15]</sup> Die anschließende Hydrolyse des Phosphorsäurethioesters durch ein Wassermolekül wird durch den zuvor deprotonierten Aspartatrest als Base katalysiert.



**Abb. 2.2:** Katalysemechanismus von Proteintyrosinphosphatasen

Klassische Proteintyrosinphosphatasen wie PTP1B besitzen neben dem „P-Loop“ noch einen „Q-Loop“ und einen „WPD-Loop“. Der „Q-Loop“ beinhaltet einen Glutaminrest (Q, Einbuchstabencode), der wahrscheinlich für die Positionierung des angreifenden Wassermoleküls verantwortlich ist. Der „WPD-Loop“ hingegen enthält den Asparaginsäurerest (D).<sup>[18]</sup> Er schließt sich nach Bindung des Substrats, sodass nur noch das Substrat und das zur Hydrolyse notwendige Wassermolekül in der katalytischen Tasche enthalten sind. Es gibt somit eine offene und eine geschlossene Form bei klassischen PTPs. Berechnungen haben ergeben, dass der pK<sub>a</sub>-Wert des Cysteins in der geschlossenen Form im Gegensatz zur offenen Form nochmals geringer ist.<sup>[16]</sup> Niedermolekulare PTPs besitzen weder einen „Q-Loop“ noch einen „WPD-Loop“. Der Aspartatrest ist jedoch ebenso vorhanden und auch essenziell für die katalytische Aktivität wie durch

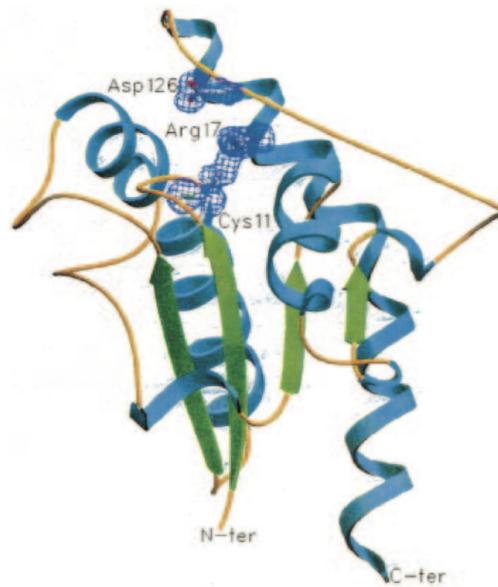
Mutationsstudien gezeigt wurde.<sup>[19]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit stand insbesondere die niedermolekulare Proteintyrosinphosphatase MptpA im Fokus der Forschung.

### **2.2.1.2 *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase A (MptpA)**

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ist der Erreger von Tuberkulose, einer Krankheit, an der weltweit ca. 14 Millionen Menschen erkrankt sind und die im Jahre 2009 zum Tod von ca. 1.7 Millionen Menschen geführt hat.<sup>[20]</sup> Etwa ein Drittel der gesamten Weltbevölkerung ist mit dem Erreger infiziert. Es erkranken jedoch laut *WHO* nur ca. 5-10% der mit dem *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Menschen im Laufe ihres Lebens an Tuberkulose, da das Immunsystem bei gesunden Menschen in der Lage ist, den Erreger unter Kontrolle zu halten.

MptpA ist eine durch *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) sezernierte, niedermolekulare Proteintyrosinphosphatase. Sie hat ein Molekulargewicht von ca. 18 kDa und beinhaltet das für alle PTPs charakteristische CX<sub>5</sub>R-Motiv. Sie besitzt zwar nur eine 37%ige Sequenzidentität, jedoch eine strukturell sehr hohe Ähnlichkeit mit der menschlichen niedermolekularen Proteintyrosinphosphatase.<sup>[21,22]</sup> Die Struktur besteht aus einer einzigen  $\alpha/\beta$ -Domäne, die durch ein zentrales, paralleles, viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt, umgeben von zwei  $\alpha$ -Helices charakterisiert ist (Abb. 2.3). MptpA besitzt einen „P-Loop“, der die katalytische Aktivität beinhaltet und einen variablen „Loop“, der in die Substraterkennung involviert ist. Gegenüber LMW-PTPs von Säugern wurden Prolin-Reste durch andere Aminosäuren ersetzt. Dadurch ist der variable „Loop“ konformativ weniger eingeschränkt, was die Erkennung verschiedener Substratarten ermöglichen könnte.<sup>[22]</sup> MptpA ist nicht in der Lage Serin- und Threoninreste zu dephosphorylieren und scheint somit spezifisch für Phosphotyrosinreste zu sein. Die spezifische Bindung des Tyrosinringes ist vornehmlich auf die Tiefe der aktiven Tasche und deren Wände mit vornehmlich hydrophobem und aromatischem Charakter zurückzuführen.<sup>[22]</sup> Durch Mutationsstudien wurde Cys11 als katalytisch aktives Cystein identifiziert.<sup>[21]</sup> Vergleiche mit der katalytischen Domäne anderer niedermolekularen PTPs legen nahe, dass Cys16 im CTGNICR-Motiv des „P-Loops“ ähnlich wie im CLGNICR-Motiv der menschlichen LMW-PTP, durch Bildung einer Disulfidbindung mit Cys11 vor Überoxidation schützt.<sup>[23]</sup>

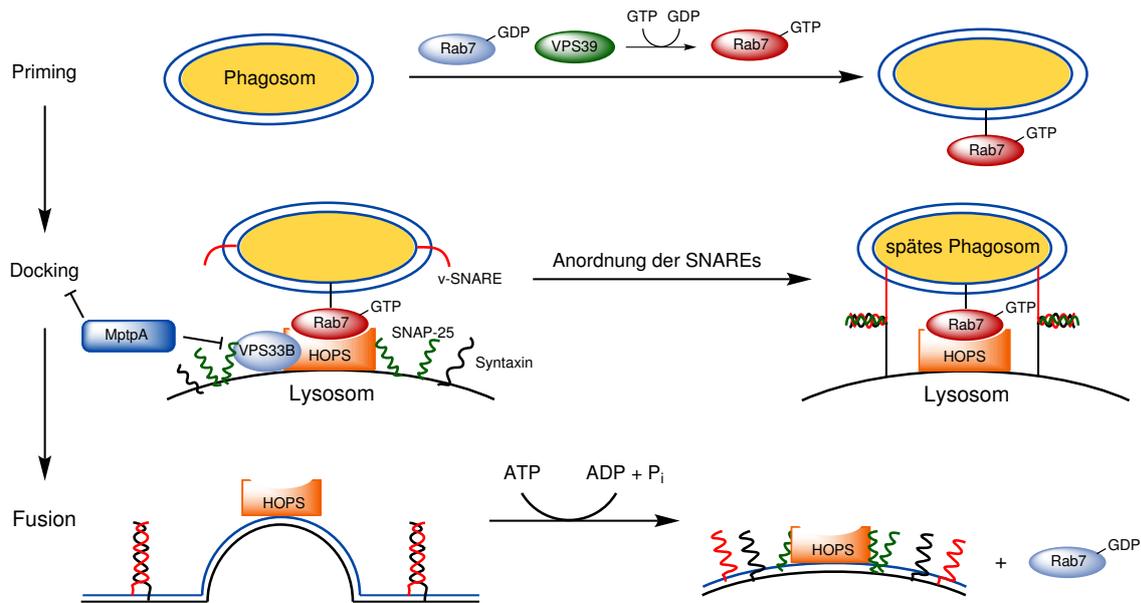


**Abb. 2.3:** Kristallstruktur von MptpA<sup>[22]</sup>

MptpA ist ein wichtiger Bestandteil der Überlebensstrategie von *Mycobacterium tuberculosis*. Durch Auslöschung des für MptpA codierenden Gens wurde festgestellt, dass MptpA nicht für das Wachstum von *Mtb* in Mäusen notwendig ist.<sup>[24]</sup> Im Gegensatz dazu führte die Auslöschung des MptpA-codierenden Gens zu einer Verminderung des Wachstums in menschlichen Makrophagen.<sup>[25]</sup> Darüber hinaus führte der Einsatz von MptpA-neutralisierenden Antikörpern im Zytosol zu einer Reduktion der Überlebensrate von *Mtb*. Wenn das Mykobakterium nach Eintritt in den Wirtsorganismus durch Makrophagen phagozytiert wurde, wird die Expression des MptpA-Gens hochreguliert.<sup>[26]</sup> Trotz fehlender Exportsignalsequenz oder bekannter Transmembrandomänen wird MptpA aus dem Mykobakterium ins Zytosol der Makrophage sezerniert.<sup>[21,25]</sup> Untersuchungen legen nahe, dass die Infektion von Makrophagen mit Mykobakterien die Produktion von Phagosomen zur Folge hat, dessen Membranen durchlässig für Moleküle bis zu einer Größe von 70 kDa sind.<sup>[27]</sup> Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum die 18 kDa schwere Phosphatase MptpA die Membran durchqueren kann. Nach der Phagozytose des Mykobakteriums erfolgt in der Regel die mit einer Absenkung des pH-Werts verbundene Reifung des Phagosoms. Die anschließende Verschmelzung von Phagosom und einem Lysosom setzt Enzyme frei, die zur Zerstörung des Mykobakteriums führen. Dieser Prozess kann jedoch durch MptpA inhibiert werden.

VPS33B (vacuolar protein sorting 33B), ein Schlüsselregulator des Membranverkehrs und der Verschmelzung wurde als Substrat von MptpA identifiziert. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass MptpA und VPS33B im Zytosol menschlicher Makropha-

gen kolokalisieren. VPS33B bildet zusammen mit anderen VPS-Proteinen den HOPS-Komplex (homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting).<sup>[28]</sup> Dieser moduliert die Aktivität von SNARE-Proteinen, die wiederum in Vesikel-SNARE- (v-SNARE) und Ziel-SNARE-Proteine (t-SNARE) unterteilt werden können. Beide bilden einen festen Komplex miteinander und bringen so Phagosom und Lysosom in unmittelbare Nähe zueinander (Abb. 2.4).<sup>[28,29]</sup>



**Abb. 2.4:** Phagosom- und Lysosomverschmelzung sowie dessen Inhibition durch MptpA<sup>[30]</sup>

Wie an diesem Beispiel gezeigt, gibt die Identifizierung von PTP-Substraten Aufschluss über die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse und zeigt dadurch mögliche Ansätze zur Bekämpfung von Krankheiten auf.

### 2.2.1.3 Proteomische Fragestellungen im Zusammenhang mit Proteintyrosinphosphatasen

#### Identifizierung von PTP-Substraten

Obwohl bereits viele Zielproteine verschiedener Proteintyrosinphosphatasen identifiziert wurden, ist ein großer Teil der Substrate noch immer unbekannt. Die Identifizierung von PTP-Substraten ist insofern problematisch, als der Enzym-Substrat-Komplex nach Hydrolyse des Phosphotyrosins wieder dissoziiert. Die Isolierung eines solchen Komplexes mit Wildtyp-Proteinen ist deshalb schwer möglich. Ein Ansatz ist daher die Entwicklung von Substrat-fangenden Mutanten, die in der Lage sind das Substrat

zu binden, jedoch nicht umzusetzen. Legt man den zuvor besprochenen Katalysemechanismus zugrunde, so werden zwei mögliche Mutationsstellen sichtbar. Zum einen bewirkt der Austausch des katalytisch aktiven Cysteins beispielsweise gegen Serin eine vollständige Deaktivierung der PTPs.<sup>[31,32]</sup> Zum anderen ist es durch Mutation des relevanten Aspartatrestes zu einem Alaninrest möglich, die Hydrolyse des Phosphotyrosins um mehrere Größenordnungen zu verlangsamen.<sup>[33]</sup> Beide PTP-Mutanten können mit einer Affinitätsmarkierung wie Glutathion-S-Transferase (GST) versehen in Zelllysaten oder Gewebeextrakten eingesetzt werden, um Substrate zu binden. Nachdem die PTP-Substrat-Komplexe über die Bindung an eine, beispielsweise durch Glutathion entsprechend modifizierte, feste Phase von den Lysaten getrennt wurden, können sie eluiert und durch Anti-Phosphotyrosin-Antikörper auf einem Western-Blot detektiert werden. Ein wesentlicher Nachteil ist, dass diese rekombinanten PTPs in Zelllysaten auch an nicht-physiologische Substrate binden können, die in Zellen sonst nicht für sie zugänglich sind.<sup>[34]</sup> Eine weitere Strategie ist daher die Expression von PTP-Mutanten in Zellen. Die Isolierung der Enzym-Substrat-Komplexe erfolgt über Immunopräzipitation. Im Allgemeinen werden hierfür Antikörper gegen das Substrat verwendet. Somit ist nur der Nachweis bekannter Substrate möglich. Bei unbekanntem Substrat ist zumindest eine konkrete Vermutung notwendig. Ein großer Nachteil der Substrat-fangenden PTP-Mutanten ist, dass zwischen Enzym und Substrat nur eine reversible Bindung besteht. Somit werden nur hochaffine Substrate in ausreichender Menge isoliert. Eine Methode, die die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Substrat und Enzym ermöglicht, wäre demnach von großem Vorteil. Darüber hinaus wäre die Aufreinigung dieser Komplexe unter denaturierenden Bedingungen realisierbar. Ein weiterer Nachteil der Methode besteht darin, dass in der Regel nur abundante Proteine als Substrate gefunden werden. Die Suche nach PTPs ausgehend von einem Substrat oder Substratmimetikum würde hingegen auch die Identifizierung von weniger häufig auftretenden Substraten ermöglichen.

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen werden häufig photoreaktive Gruppen eingesetzt, die durch die Knüpfung kovalenter Bindungen auch die Detektion schwacher Interaktionen ermöglichen. Der Einsatz von Phosphotyrosinmimetika und Photoaffinitätsmarkierungen wäre auch bei der Substratidentifizierung von großem Vorteil.

### **Aktivitätsmessungen von SHP-2**

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wird unter anderem die Funktion von SHP-2 und ihre Rolle im Zusammenhang mit dem Noonan- und dem LEOPARD-Syndrom intensiv

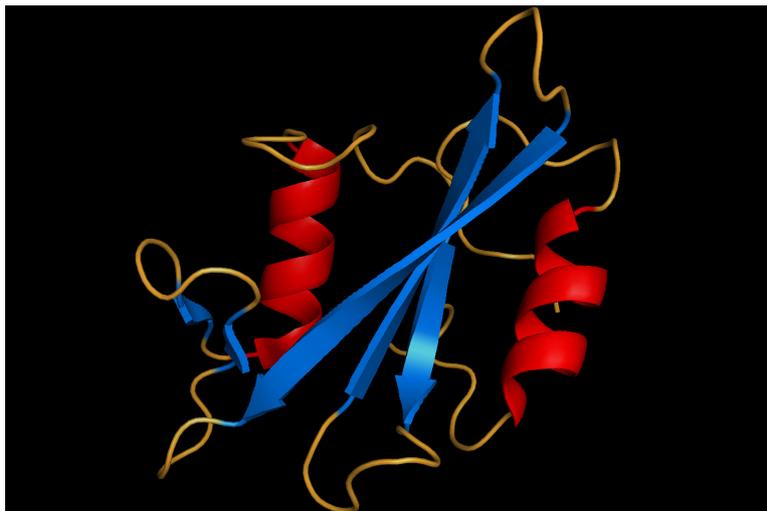
erforscht. Um Inhibitoren in Zellen testen zu können, ist es wichtig den Aktivierungszustand von SHP-2 zu kennen. SHP-2 besitzt zwei SH2-Domänen, von denen eine im inaktiven Zustand die katalytische Domäne blockiert. Die Bindung von Phosphotyrosin-enthaltenden Proteinen an beide SH2-Domänen führt zur Freilegung der katalytischen Domäne und somit zur Aktivierung des Enzyms.<sup>[35]</sup> Da der Zugang nur im aktivierten Zustand möglich ist, kann die Markierung innerhalb der katalytischen Domäne mit Photoaffinitätssonden (PAL-Sonden) zur Messung der Aktivität dienen. Die Messungen könnten sowohl über Fluoreszenz im Falle einer Fluoreszenz-markierten Sonde, als auch durch vergleichende Massenspektrometrie erfolgen. Darüber hinaus könnte die Affinität von reversiblen Inhibitoren durch die Verdrängung der PAL-Sonde gemessen werden.

### 2.3 Src-Homologie-2-Domänen

Src-Homologie-2-(SH2)-Domänen stellen eine homologe Familie von Docking-Proteinen mit einer Größe von ca. 100 Aminosäuren dar. Sie wurden erstmals in Tyrosinkinasen der Src-Familie identifiziert und haben daher ihren Namen erhalten.<sup>[36]</sup> Sie sind in zahlreichen Proteinen verschiedenster Signaltransduktionswege vertreten. So können sie beispielsweise in Enzymen wie SHP-2 zu deren Aktivitätsregulierung beitragen. In STAT-Proteinen (Signal Transducer and Activator of Transcription) wird beispielsweise die Dimerisierung der phosphorylierten STATs über SH2-Domänen vermittelt, wodurch diese als Aktivatoren der Transkription im Zellkern fungieren können.<sup>[37]</sup>

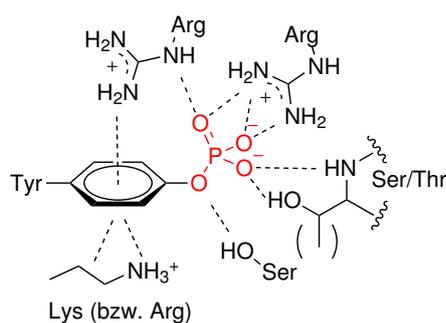
#### 2.3.1 Struktur von SH2-Domänen

SH2-Domänen binden Phosphotyrosin-beihaltende Peptidsequenzen, wobei die Höhe der Affinität auch maßgeblich von den Aminosäuren C-terminal des Phosphotyrosins abhängt. Die Strukturen der SH2-Domänen sind sehr ähnlich, obwohl sie teilweise eine Sequenzidentität von weniger als 40 % aufweisen.<sup>[38]</sup> Sie beinhalten hauptsächlich drei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter mit je einer  $\alpha$ -Helix oberhalb und unterhalb der Faltblätter, außerdem zwei kleinere  $\beta$ -Faltblätter und drei kurze Schleifen (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5:** Kristallstruktur der v-src SH2-Domäne<sup>[39]</sup>

Die Erkennung des Phosphotyrosinrestes wird neben einem komplexen Netzwerk aus Wasserstoffbrücken hauptsächlich durch zwei Argininreste gewährleistet (Abb. 2.6). Ein Argininrest bildet sowohl Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem Phenylring des Phosphotyrosins als auch Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Phosphatsauerstoff aus. Ein weiterer koordiniert ausschließlich die Sauerstoffatome.<sup>[39,40]</sup> Diese Wechselwirkung trägt aufgrund der für Phosphoserin und -threonin unerreichbaren Lage des Argininrestes maßgeblich zur Selektivität für Phosphotyrosine bei.<sup>[38,40]</sup> Weitere stabilisierende Interaktionen können abhängig von der SH2-Domäne beispielsweise von Serin- oder Threoninresten, aber auch durch einen Lysin- oder einen weiteren Argininrest gebildet werden.



**Abb. 2.6:** Erkennung von Phosphotyrosin durch SH2-Domänen

Die Selektivität eines Liganden für eine SH2-Domäne wird maßgeblich durch die Aminosäuren unmittelbar C-terminal des Phosphotyrosins und die daraus entstehenden Wechselwirkungen beeinflusst. So ist für die Src SH2-Domäne die Erkennungssequenz pYEEI charakteristisch. Während die beiden Glutamatreste elektrostatische Wechsel-

wirkungen und durch Wasser vermittelte Wasserstoffbrücken ausbilden, bindet Isoleucin (pY + 3) in eine hydrophobe Tasche der Domäne.<sup>[39,41]</sup>

Durch SH2-Domänen vermittelte Protein-Protein-Interaktionen sind Bestandteil zahlreicher Signalübertragungswege, wie zum Beispiel des JAK/STAT-Signalwegs. Konstitutiv aktivierte STAT-Proteine werden mit einer Vielzahl von Krebsarten, insbesondere Leukämien, assoziiert. In diesem Zusammenhang bildet STAT5b einen Forschungsschwerpunkt in unserer Arbeitsgruppe.

### 2.3.2 STAT-Proteine

STAT-Proteine (Signal Transducer and Activator of Transcription) sind transkriptionsregulierende Signalproteine mit einer Länge zwischen 750 und 851 Aminosäuren.<sup>[42]</sup> Bis zu ihrer Aktivierung durch Kinasen liegen sie als Monomer im Zytosol vor. STATs werden größtenteils durch Januskinasen (JAK) aktiviert, die ihrerseits mit Cytokinrezeptoren ohne eigene Kinaseaktivität assoziiert sind. Die Aktivierung von STAT-Proteinen kann jedoch ebenfalls durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK), wie beispielsweise dem EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) oder PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) erfolgen.<sup>[43–45]</sup>

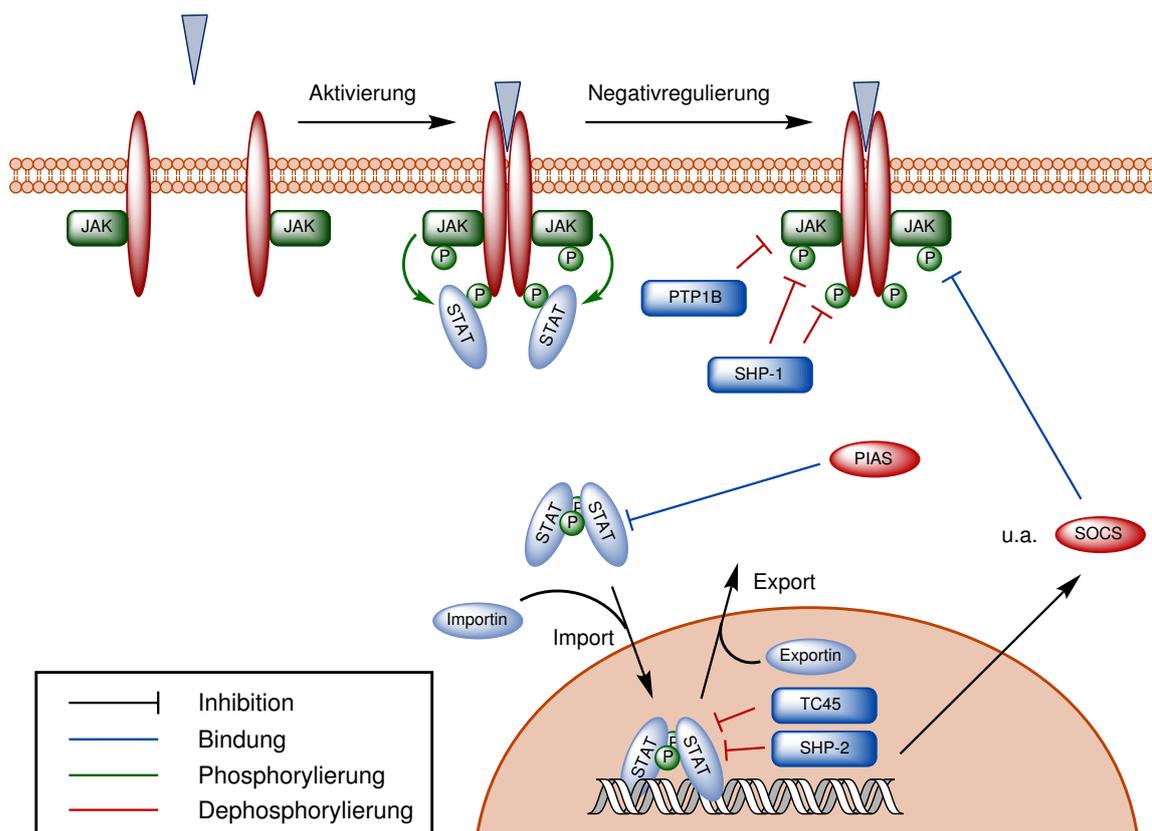
#### 2.3.2.1 Der JAK/STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg vermittelt einen großen Anteil von Signalen, die durch Bindung von Cytokinen an ihre Rezeptoren induziert werden. Dazu gehören die Interferone (IFN), Interleukine (IL) und koloniestimulierende Faktoren (CSF). Der JAK-STAT-Signalweg ist essenziell für Zellproliferation, -differenzierung, -migration und Apoptose und ist in Prozessen des Wachstums bis hin zur Immunabwehr vertreten.

In Säugetieren gibt es vier Januskinasen, JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Tyrosinkinase2), die spezifisch mit den intrazellulären, signalvermittelnden Ketten der Cytokinrezeptoren assoziiert sind. Die Bindung eines Liganden an die extrazellulären Ketten seines Rezeptors hat eine Rezeptordimerisierung zur Folge.<sup>[37]</sup> Dadurch kommt es zur Annäherung der Rezeptoruntereinheiten und der mit ihnen assoziierten JAKs. Die darauf folgende Transphosphorylierung der Januskinasen führt zu deren Aktivierung, wodurch sie in der Lage sind, Tyrosinreste der Rezeptoruntereinheiten zu phosphorylieren. Diese Phosphotyrosine dienen als Bindungsstellen für die SH2-Domäne der im Zytosol befindlichen STAT-Proteine. Durch Rekrutierung der STAT-Proteine an die Rezeptoruntereinheiten wird die Phosphorylierung eines nahe dem C-Terminus des STAT-Proteins befindlichen Phosphotyrosins durch die entsprechende Januskinase er-

möglichst. Es kommt daraufhin zur Dimerisierung von zwei STAT-Proteinen, wobei ein STAT-Protein das entsprechende Phosphotyrosin des anderen Proteins über seine SH2-Domäne bindet. [37,46,47]

Kurz nach der Dimerisierung reichern sich die STAT-Proteine im Zellkern an, [48] wo sie an eine Konsensussequenz der DNA binden und zur Aktivierung der Transkription verschiedener Gene beitragen.



**Abb. 2.7:** JAK/STAT-Signalweg mit einigen Regulationsmechanismen

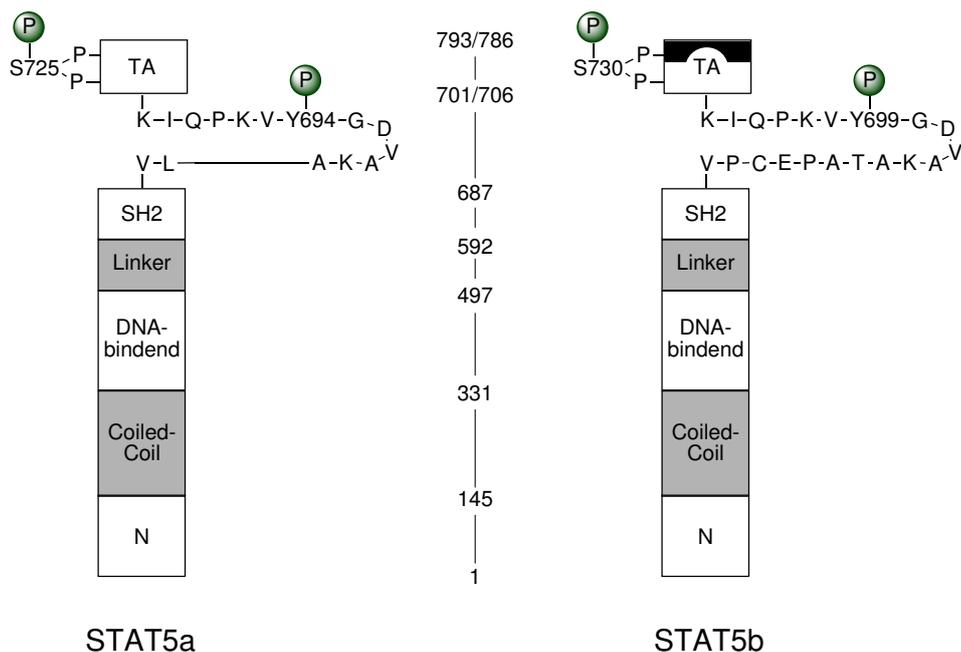
Die Regulation der STAT-Aktivität erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Ein weit verbreiteter Mechanismus ist die Inhibition der STAT-Aktivität durch SOCS-Proteine (Suppressor Of Cytokine Signaling). Sie können zum einen mit ihren SH2-Domänen an die Phosphotyrosine der Rezeptoren binden und somit die STAT-Bindungsstelle blockieren, wodurch deren Aktivierung verhindert wird. Zum anderen können sie direkt an Januskinasen binden und so deren Aktivität inhibieren. [49] Die Expression von SOCS-Genen wird durch STAT-Proteine aktiviert, sodass es zu einer inhibitorischen Rückkopplung kommt. Eine weitere Klasse von Negativregulatoren sind PIAS-Proteine (Protein Inhibitors of Activated STATs). Sie binden an aktivierte STAT-Dimere und verhindern so deren Bindung an DNA. [50] Eine ebenfalls sehr wichtige Rolle in der Regulation

des JAK/STAT-Signalwegs kommt den Proteintyrosinphosphatasen zu. So wurde beispielsweise gezeigt, dass SHP-1 an phosphorylierte JAKs<sup>[51]</sup> oder Rezeptoren<sup>[52]</sup> binden kann, um sie zu dephosphorylieren. Des Weiteren ist PTP1B in der Lage, Januskinasen zu dephosphorylieren.<sup>[53]</sup> Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass unter anderem SHP-2 Interferon-stimulierte JAK/STAT-Wege herunterreguliert.<sup>[54]</sup> SHP-2<sup>[55]</sup> und TC45, eine nukleare T-Zell-Proteintyrosinphosphatase<sup>[56]</sup> können STAT-Proteine direkt im Zellkern dephosphorylieren. Für STAT1 wurde der Nachweis erbracht, dass der für die Dimerisierung notwendige Phosphotyrosinrest dephosphoryliert wird. Danach erfolgt die Dissoziation von der DNA, wodurch eine Leucin-reiche Aminosäuresequenz im Bereich der DNA-bindenden Domäne freigelegt wird, die als nukleares Exportsignal (NES) fungiert. Sie dient als Bindungsstelle für Exportin-1, einem Rezeptor, der zwischen Zellkern und Zytosol pendelt.<sup>[57]</sup>

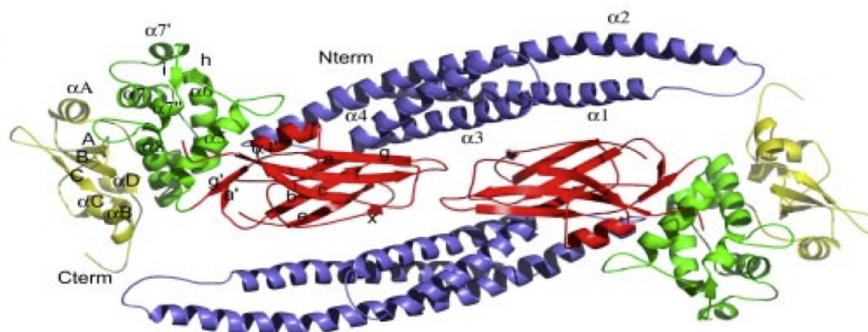
### 2.3.2.2 STAT5-Proteine

Säugetiere besitzen zwei STAT5-Proteine, STAT5a und STAT5b, die in ihrer Aminosäuresequenz zu 96 % identisch sind.<sup>[58,59]</sup> Die Molekulargewichte von 91 kDa (STAT5a) bzw. 90 kDa (STAT5b) sind so ähnlich, dass sie anfänglich durch elektrophoretische Methoden nicht trennbar waren und zunächst gemeinschaftlich als STAT5 bezeichnet wurden.<sup>[42]</sup> Sie bestehen aus 793 bzw. 786 Aminosäuren und besitzen wie alle STAT-Proteine eine Vielzahl konservierter Domänen (Abb. 2.8).<sup>[42]</sup>

Der C-Terminus beinhaltet eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die bei STAT5a und STAT5b, ebenso wie bei vielen anderen STAT-Proteinen, eine konservierte Serinphosphorylierungsstelle beinhaltet<sup>[60]</sup>, welche die Bindung von Coaktivatoren vermittelt (gezeigt für STAT1).<sup>[61]</sup> Sie ist somit wichtig für die Aktivierung der Transkription. Im Anschluss an die TA-Domäne befindet sich die SH2-Domäne, die der Bindung des Phosphotyrosins bei der Dimerisierung dient.<sup>[62,63]</sup> Zwischen TAD und SH2-Domäne befindet sich in jedem STAT-Protein der bei Aktivierung phosphorylierte Tyrosinrest, der in etwa bei Aminosäure 700 liegt (STAT5a: Y694<sup>[64]</sup>, STAT5b: Y699<sup>[65]</sup>).<sup>[42]</sup> Nach einer Linker-Domäne folgt die DNA-bindene Domäne, die einige  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist.<sup>[62,66]</sup> In Abbildung 2.9 ist die Struktur eines STAT1-Dimer-DNA-Komplexes gezeigt. Der Kontakt zur DNA erfolgt sowohl über die kleine als auch über die große Furche.<sup>[62]</sup>



(a) Übersicht der Domänen von STAT5a und STAT5b sowie deren Lage (nach<sup>[42]</sup>)



(b) Struktur eines unphosphorylierten STAT5a-Proteins.<sup>[66]</sup> Im Kristall liegen diese als antiparallele Dimere vor.

**Abb. 2.8:** Struktureller Aufbau der STAT5-Proteine

An die DNA-bindende Domäne schließt sich eine Coiled-Coil-Struktur aus vier Helices an, die verschiedene Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ermöglicht.<sup>[62,67]</sup> Neben der Coiled-Coil-Domäne befindet sich eine N-terminale Domäne, die unter anderem für die Rezeptorerkennung und die Tyrosinphosphorylierung<sup>[68]</sup> sowie für die Translokation in den Zellkern<sup>[69]</sup> und die Dephosphorylierung des für die Dimerisierung wichtigen Tyrosinrestes nahe dem C-Terminus<sup>[69,70]</sup> von Bedeutung ist. Es wurde festgestellt, dass STAT5-Proteine neben Homodimeren (STAT5a/STAT5a und STAT5b/STAT5b) auch Heterodimere (STAT5a/STAT5b) bilden.<sup>[42]</sup> In einigen Fällen kommt es durch die Wechselwirkung von zwei Dimeren auch zur Bildung von Tetrameren, die ebenfalls über die N-terminale Domäne vermittelt werden.<sup>[71]</sup>

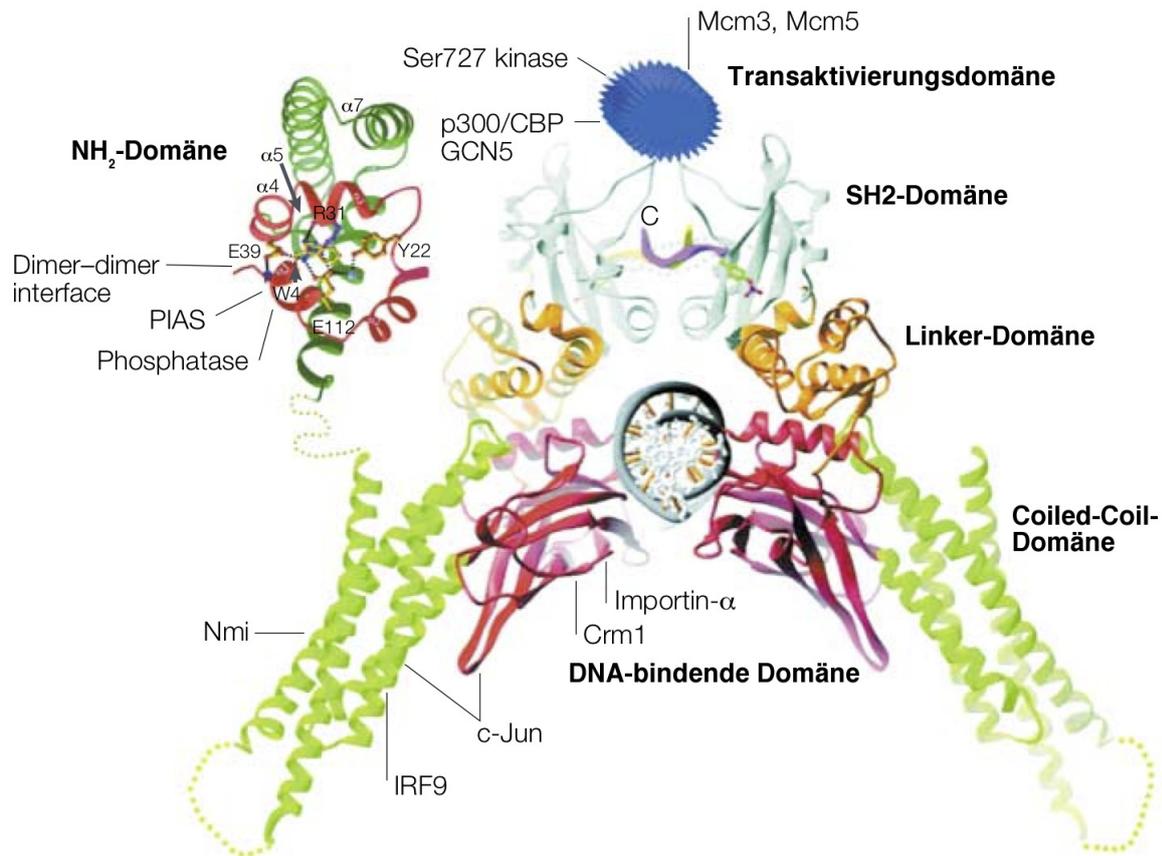


Abb. 2.9: STAT1-Dimer-DNA-Komplex<sup>[47,62]</sup>

STAT5a und STAT5b haben aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit viele redundante Funktionen. Die bevorzugte Expression eines der beiden STAT5-Proteine in bestimmten Gewebearten hat jedoch teilweise unterschiedliche Funktionen zur Folge. Die Aktivierung von STAT5a steigt beispielsweise während der Schwangerschaft in Brustdrüsen stark an, wenn die Hormone Prolaktin und Plazentalaktogene die Entwicklung der Drüsenläppchen sowie die Transkription von Milchproteingenen anregen. Beide Hormone aktivieren den Prolaktinrezeptor (PRLR) und JAK2.<sup>[72–74]</sup> Der Großteil der Signalübertragung in Hepatozyten, induziert durch Wachstumshormone (GH), wird hingegen durch STAT5b vermittelt.<sup>[75]</sup> Mit der Steuerung der IGF-1-Produktion (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) kontrolliert STAT5b einen Schlüsselregulator des körperlichen Wachstums.<sup>[76,77]</sup> Die Auslöschung von SOCS2-Genen, einem Negativregulator von STAT5, verursachte beispielsweise Gigantismus in Experimenten mit Mäusen.<sup>[78]</sup> In Übereinstimmung damit wurden bei menschlichen Patienten mit schweren Wachstumsverzögerungen Defekte in STAT5b-Genen gefunden.<sup>[77,79]</sup> STAT5a und STAT5b spielen auch eine wichtige Rolle bei der Immunregulierung und der Entwicklung von Immunzellen. Bei Mäusen wurde beispielsweise festgestellt, dass diese bei kompletter

Abwesenheit von STAT5 nicht in der Lage waren T-, B-, und natürliche Killerzellen zu bilden.<sup>[75,80,81]</sup> STAT5 ist ebenfalls an der Signalübertragung von Erythropoetin (EPO) beteiligt. Das unter anderem bei Sauerstoffarmut gebildete Hormon ist als Wachstumsfaktor an der Bildung von roten Blutkörperchen beteiligt.

Eine Vielzahl von Tumoren, Leukämien und myeloproliferativen Erkrankungen, d.h. Erkrankungen des Knochenmarks, die sich durch eine übermäßige Produktion von blutbildenden Zellen auszeichnen, ist durch die Anwesenheit von ständig aktivem STAT5 charakterisiert.<sup>[82]</sup> Darunter fallen unter anderem chronische myeloische Leukämie (CML)<sup>[83]</sup>, akute myeloische Leukämie (AML) und akute lymphoide Leukämie (ALL).<sup>[82]</sup> Unsere Arbeitsgruppe ist insbesondere an der Erforschung von konstitutiv aktiviertem STAT5b in Zusammenhang mit AML interessiert.

### **Die Bedeutung von STAT5 im Zusammenhang mit akuter myeloischer Leukämie**

Akute myeloische Leukämie ist die am häufigsten auftretende akute Leukämie bei Erwachsenen. Sie ist durch eine schnelle Vermehrung von weißen Blutkrebszellen des Knochenmarks gekennzeichnet, die die Funktion gesunder Knochenmarkzellen blockieren.<sup>[84]</sup> 25-45 % der AML-Patienten weisen Mutationen im Gen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 (FMS like tyrosine kinase 3) auf. Es tritt jedoch meist nur eine von zwei Mutationen auf. In 5-10 % der Fälle ist eine Mutation in der Tyrosinkinasedomäne zu beobachten, in 15-35 % handelt es sich um eine interne Tandemduplikation (ITD).<sup>[85]</sup> Beide Mutationen haben eine dauerhafte Aktivierung der Kinase zur Folge. ITD ist eine Mutation, in der ein Teil der Juxtamembrandomäne-codierenden Sequenz dupliziert und eingefügt wird. Die Juxtamembrandomäne ist für die Autoinhibition der katalytischen Kinasedomäne verantwortlich. Sie beinhaltet auch die Tyrosinreste, die nach Ligand-induzierter Dimerisierung des Rezeptors für die Aktivierung phosphoryliert (Transphosphorylierung) werden. Die Tyrosinreste der durch ITD verlängerten Juxtamembrandomäne gelangen in die Nähe der Kinase des eigenen Monomers und werden phosphoryliert (Cis-Phosphorylierung), was zu einer ständigen Aktivierung der Kinase führt.<sup>[84]</sup> Somit wird auch STAT5 als Substrat von FLT3/ITD dauerhaft aktiviert.<sup>[86]</sup> Die selektive Inhibition von FLT3 ist aufgrund der hohen strukturellen Homologie zu anderen Rezeptortyrosinkinasen des Typs III (z. B. FMS und PDGFR) sehr schwer. Daher werden momentan in unserer Arbeitsgruppe reversible Inhibitoren gegen STAT5 entwickelt und in FLT3/ITD-Zellen getestet. Der Einsatz von photoreaktiven Gruppen, die gezielt die SH2-Domäne adressieren und diese durch kovalente Verknüpfung blockieren, würde einen weiteren und effizienteren Weg zur Inhibition der STAT5-

Dimerisierung ermöglichen. Der zusätzliche Einsatz eines Phosphotyrosinmimetikums sollte dabei eine deutliche Steigerung der Affinität zur Folge haben.

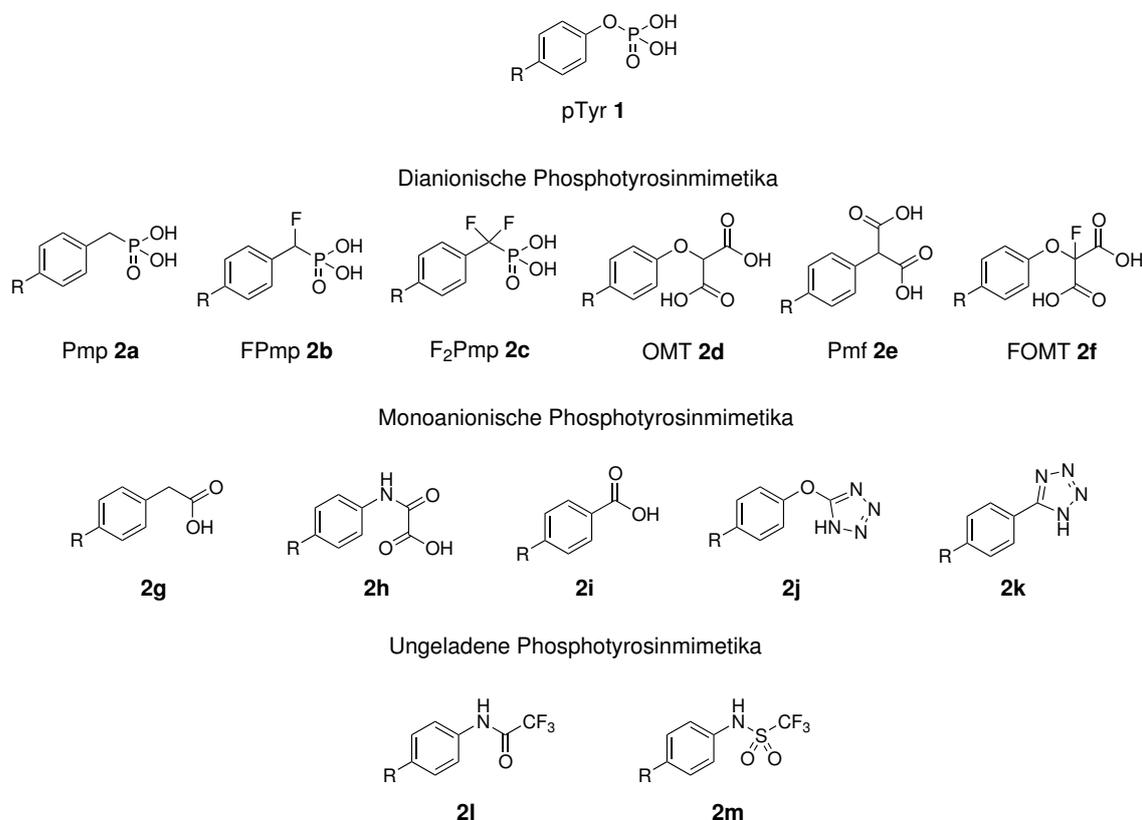
## 2.4 pTyr-Mimetika zur Entwicklung von Inhibitoren gegen PTP- und SH2-Domänen

Da Phosphotyrosine in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen von großer Bedeutung sind, sowohl bei der Regulierung, zum Beispiel durch Proteintyrosinphosphatasen, als auch bei der Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, stellen Phosphotyrosinmimetika einen guten Ansatz für das Design von Inhibitoren dar. Bei der Entwicklung dieser Mimetika steht insbesondere die enzymatische Stabilität, eine hohe Affinität und eine gute Zellgängigkeit im Vordergrund. Eine hohe Affinität und Zellgängigkeit sind bei dem Design schwer gleichzeitig zu realisieren, da diese einander oft entgegenwirken. ITC-Studien mit Phosphopeptiden an SH2-Domänen haben gezeigt, dass 50 % der freien Bindungsenergie dem Phosphotyrosinrest entstammen, 50 % davon wiederum aus der zweiten negativen Ladung des Phosphorylrestes.<sup>[87]</sup>

Phosphotyrosin (pTyr) **1** (Abb. 2.10) selbst ist aufgrund der Labilität gegenüber PTPs nicht für die Inhibitorentwicklung geeignet. Die Substitution des Estersauerstoffs durch eine Methylenbrücke war daher einer der ersten Ansätze zur Entwicklung eines Mimetikums. Das so erhaltene Phosphonomethylphenylalanin (Pmp) **2a**<sup>[88,89]</sup> wurde beispielsweise in ein Peptid zur Inhibition der SH2-Domäne von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) eingebaut. Es zeigte eine zweifach geringere Affinität als das Phosphotyrosinenthaltende Peptid.<sup>[90]</sup> Die Einführung von einem (FPmp **2b**) bzw. zwei Fluoratomen (F<sub>2</sub>Pmp **2c**) resultierte in einer deutlichen Erhöhung der Affinitäten.<sup>[91]</sup> Dies wird insbesondere auf die Fähigkeit der Fluoratome, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, zurückgeführt.<sup>[92]</sup> Es hängt jedoch mitunter vom Zielprotein ab, wie gut das Mimetikum ist. Untersuchungen eines Pmp-Peptids und eines F<sub>2</sub>Pmp-Peptids wiesen beispielsweise ähnlich starke Affinitäten zur Grb2-SH2-Domäne auf.<sup>[93]</sup> Ebenso konnte F<sub>2</sub>Pmp **2c** als gut geeignetes Mimetikum für PTPs identifiziert werden wie die Inhibition der Insulinrezeptordephosphorylierung durch ein F<sub>2</sub>Pmp-beinhaltenes Hexapeptid zeigte.<sup>[94]</sup>

Neben den Phosphonat-basierten Mimetika wurden auch zahlreiche Isostere ohne Phosphor entwickelt. Unter den dianionischen Mimetika zeigten beispielsweise *O*-Malonyltyrosin (OMT **2d**)<sup>[95,96]</sup> und *para*-Malonylphenylalanin (Pmf **2e**)<sup>[96]</sup> eine gute Affinität als Bestandteil nichtpeptidischer Inhibitoren gegenüber der Grb2-SH2-Domäne. OMT **2d**<sup>[97]</sup> und insbesondere das  $\alpha$ -Fluorderivat FOMT **2f**<sup>[98]</sup> wiesen ebenfalls eine äußerst

gute Affinität gegenüber PTP1B auf. Um das Problem der schlechten Zellgängigkeit zu adressieren, wurden Isostere mit einer geringeren Ladung entwickelt. Monoanionische Inhibitoren weisen häufig eine deutlich reduzierte Affinität auf. In Untersuchungen zeigten Carboxymethylphenylalanin **2g**<sup>[99–101]</sup> und ein Oxalylamid **2h**<sup>[101]</sup> vergleichsweise gute Affinitäten. Ein Benzoesäurederivat **2i** sowie Tetrazolderivate **2j** und **2k** zeigten als Teil eines Tetrapeptids bei 100  $\mu\text{M}$  keinerlei Bindung gegenüber der getesteten SH2-Domäne.<sup>[101]</sup> Als ungeladene Mimetika wurden im Rahmen dieser Studie unter anderem Trifluoressigsäureamide **2l** und Trifluormethylsulfonamide **2m** getestet. Es konnte jedoch unter gleichen Bedingungen ebenfalls keine Bindung festgestellt werden.



**Abb. 2.10:** Übersicht über einige Phosphotyrosinmimetika<sup>[9]</sup>

Die Anwendung von Phosphotyrosinmimetika zeigt in nichtpeptidischen Strukturen jedoch häufig deutlich andere Tendenzen als in Peptiden. So wies beispielsweise ein Benzoesäurederivat **2i** als Teil eines Peptids einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert im Millimolarbereich auf<sup>[102]</sup>, während es als Teil eines nichtpeptidischen Inhibitors einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert im mittleren Nanomolarbereich<sup>[103]</sup> gegenüber PTP1B aufwies. Mittlerweile wird deutlich mehr auf die Inhibition durch kleine organische Moleküle gesetzt, nicht zuletzt um die Stabilität gegen Proteasen in zellulären Systemen zu erhöhen. So wurden beispielsweise PTP-Inhibitoren basierend auf F<sub>2</sub>Pmp **2c**<sup>[104]</sup>, Sulfonamiden **2m**<sup>[105]</sup> und zahlreichen ande-

ren Phosphotyrosinisosteren<sup>[106]</sup> entwickelt. Um die Problematik der hohen Ladung zu umgehen, wurden für dianionische Mimetika wie F<sub>2</sub>Pmp **2c** Prodrug-Strategien entwickelt, um die Zellgängigkeit zu erhöhen. Beispielsweise wurden Pivaloyloxymethylester (POM) in Inhibitoren gegen STAT3 mit großem Erfolg eingesetzt.<sup>[107,108]</sup>

Inhibitoren basierend auf Phosphotyrosinmimetika stellen wichtige Werkzeuge zur Erforschung der komplexen Zusammenhänge in Signaltransduktionswegen dar. Ein häufiges Problem ist jedoch unter anderem die Selektivität der Inhibitoren bei der Vielzahl verschiedener Proteine in Zellen. Nur durch gezielte *in vitro*-Untersuchungen mit isolierten Proteinen kann die Affinität zu dem getesteten Inhibitor bestätigt oder ausgeschlossen werden. Die kovalente Markierung der inhibierten Proteine würde die Möglichkeit bieten, *in vivo* andere Proteine, die durch den Inhibitor adressiert werden zu identifizieren. Dadurch wären mögliche Nebenwirkungen eines Inhibitors einfacher zu analysieren. Eine überaus erfolgreiche Methode dies zu realisieren, stellen Photoaffinitätsmarkierungen dar. Im Gegensatz zu chemischen Vernetzern wie z. B. Michael-Systemen in Maleimiden oder Vinylsulfonaten können sie durch Licht gezielt angeregt und zur Reaktion gebracht werden.

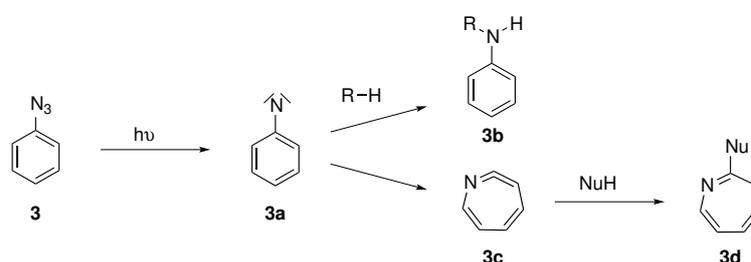
## 2.5 Photoaffinitätsmarkierungen

Photoaffinitätsmarkierungen (Photoaffinity Labeling, PAL) sind seit der erstmaligen Nutzung vor fast 50 Jahren ein äußerst häufig eingesetztes Werkzeug zur Untersuchung von Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen zwei Molekülen ermöglicht die Untersuchung selbst schwach wechselwirkender Partner. Des Weiteren ermöglicht sie den Einsatz konventioneller Analysemethoden wie SDS-PAGE oder LC/MS, durch die sonst aufgrund der denaturierenden Bedingungen jegliche Proteinkomplexe zerstört werden. Man unterscheidet zwei analytische Ansätze. Auf der Makroebene kann ein Protein oder eine Untereinheit identifiziert werden, an das die PAL-Sonde bindet. Man kann somit mögliche Interaktionspartner identifizieren. Auf der Mikroebene wird die Bindungsstelle der PAL-Sonde lokalisiert. Dies geschieht durch enzymatischen Verdau des markierten Proteins und anschließender Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie. Diese Ansätze stellen beispielsweise ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung der Mechanismen von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen dar.<sup>[109]</sup>

Photovernetzbare Gruppen sollten bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um für die Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen geeignet zu sein. Zunächst sollten sie so klein sein, dass sie die zu untersuchenden Wechselwirkungen nicht maßgeblich beeinflussen.

Des Weiteren ist es erforderlich, dass sie in Abwesenheit von Licht chemisch inert sind. Die für die Photoaktivierung erforderliche Wellenlänge sollte möglichst langwellig sein, um Schädigungen der Proteine und des Biosystems zu verhindern.

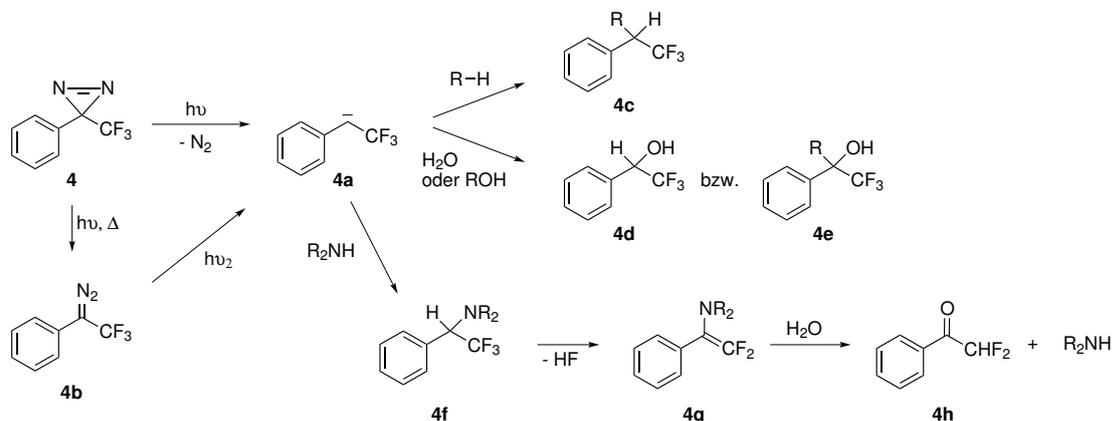
Es gibt eine Vielzahl von PAL-Gruppen, die sich im Wesentlichen in Nitren-bildende, Carben-bildende und Carbonyl-basierte Gruppen einteilen lassen. Zu den ältesten und mit am häufigsten verwendeten Nitren-bildenden Molekülen gehören die Arylazide **3**. Die Azidfunktion erfüllt beispielsweise aufgrund der geringen Größe das Kriterium der minimalen Störung wichtiger Wechselwirkungen und kann gut in einen Phenylalaninrest eingebaut werden. Durch Bestrahlung von Arylaziden zwischen 254 und 400 nm, je nach Substitution, entstehen reaktive Nitrene **3a**. Da das Maximum von Arylaziden in der Regel unterhalb von 280 nm liegt, sind durch die langwellige Bestrahlung neben dem Maximum häufig Bestrahlungszeiten von mehreren Stunden notwendig.<sup>[110]</sup> Nitrene können in benachbarte C-H- oder Heteroatom-H-Bindungen insertieren (**3b**). In Abwesenheit eines Reaktionspartners erfolgt jedoch nach ca.  $10^{-4}$  s eine rasche Umlagerung zu Ketenimininen **3c**.<sup>[111,112]</sup> Diese sind nicht mehr in der Lage, in entsprechende C-H-Bindungen zu insertieren und können unspezifisch mit Nucleophilen reagieren (**3d**) (Abb. 2.11). Die Fluorierung des Phenylrings verhindert dies.<sup>[113,114]</sup>



**Abb. 2.11:** Photoinduzierte Reaktionen von Phenylazid **3**

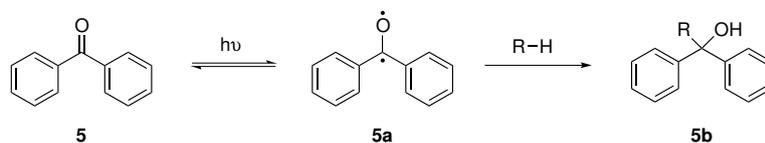
Überaus wichtige und weit verbreitete Vertreter der Carben-erzeugenden PAL-Gruppen sind die Diazirine. Sowohl Phenyldiazirine **4** als auch Alkyldiazirine können bei ca. 350 nm aktiviert werden und erzeugen nach Distickstoffeliminierung ein Carben **4a**. Carbene sind hochreaktive Spezies, reaktiver als Nitrene, und sind in der Lage im Nanosekundenbereich in C-H-Bindungen und Heteroatom-H-Bindungen zu insertieren (**4c**, Abb. 2.12).<sup>[115]</sup> In der Praxis wird jedoch häufig die Reaktion des Carbens mit Wasser beobachtet (**4d**), was einen starken Verlust der Photovernetzungeffizienz zur Folge hat. Des Weiteren kann es bei der Bestrahlung von Diazirinen zu einer Umlagerung zur entsprechenden Diazoverbindung **4b** kommen. Während Diazoverbindungen aus Alkyldiazirinen Elektrophile sind, die unspezifisch vernetzen können, sind Diazoverbindungen aus Trifluormethylphenyldiazirinen relativ stabil, machen sich jedoch ebenfalls

in einer Reduktion der Vernetzungseffizienz bemerkbar.<sup>[116]</sup> Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Insertion des Trifluormethylphenylcarbens in eine N-H-Bindung (**4f**) unter basischen Bedingungen zur Fluorwasserstoffeliminierung führen kann. Die Hydrolyse des daraus entstandenen Enamins **4g** führt zu einem Verlust der Photomarkierung (**4h**) (Abb. 2.12).<sup>[117]</sup>



**Abb. 2.12:** Photoinduzierte Reaktionen von Trifluormethylphenyldiazirin **4**

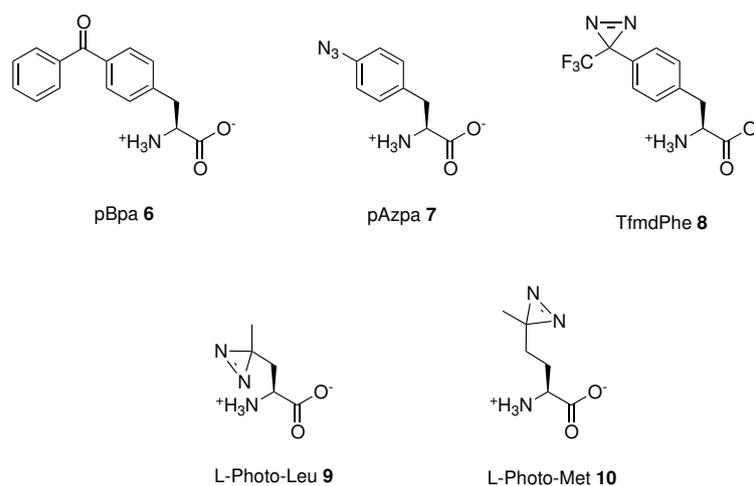
Der wichtigste Vertreter der Carbonyl-basierten PAL-Gruppen ist Benzophenon **5**. Die Aktivierung erfolgt zwischen 350 und 365 nm. Im Gegensatz zu den vorherigen PAL-Gruppen kommt es hier jedoch nicht zu einer Photodissoziation, sondern zur Bildung eines Biradikals **5a** (Abb. 2.13).<sup>[118]</sup> In Abwesenheit von zur Insertion geeigneten C-H-Bindungen kommt es zur Relaxation in den Grundzustand. Durch die Möglichkeit der daraus resultierenden, mehrfachen Anregung kann eine höhere Effizienz der Photovernetzung erreicht werden. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch der vergleichsweise hohe sterische Anspruch, wodurch dieser Photovernetzer nicht für jede Proteinoberfläche oder Bindungstasche einsetzbar ist.



**Abb. 2.13:** Photoreaktionen von Benzophenon **5**

PAL-Sonden werden zur Aufklärung von Wechselwirkungen in Peptiden, Proteinen, DNA, Lipiden und Kohlehydraten eingesetzt.<sup>[115,119]</sup> Die Möglichkeit der Synthese von peptidischen PAL-Sonden mittels Festphasensynthese führte *Kauer et al.* zum Einbau von Benzoylphenylalanin **6** in ein Calmodulin-bindendes Peptid mit einer Länge von 17 Aminosäuren. Durch Bestrahlung des Peptids in Gegenwart von Calmodulin

und Calcium gelang ihnen die spezifische Vernetzung von Peptid und Protein. In Abwesenheit von Calcium war deutlich weniger Photovernetzung zu beobachten.<sup>[120]</sup> In Verbindung mit anderen Methoden konnte somit aufgeklärt werden, wie Calmodulin an seine Zielproteine bindet.<sup>[121]</sup> Der Einbau von Diazirin-Crosslinkern in bekannte peptidische Inhibitoren gegen PTP1B ermöglichte Mitarbeitern von *Merck-Frosst* die Photovernetzung mit PTP1B.<sup>[122]</sup>



**Abb. 2.14:** Photoaktivierbare Aminosäuren

Der Einsatz in Proteinen wurde erstmals 2002 durch die Gruppe um *Peter Schultz* ermöglicht. Es gelang ihnen, Benzoylphenylalanin **6**<sup>[123]</sup>, ein Benzophenonderivat, und *p*-Azidophenylalanin **7**<sup>[124]</sup> durch Entwicklung eines entsprechenden tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paars unter Verwendung des TAG-Codons in Proteine von *E. coli* einzubauen. 2007 folgte die genetische Codierung des Phenyldiazirins TfmdPhe **8** und dessen Einbau in *E. coli*-Proteine.<sup>[125]</sup> Mittlerweile gibt es mehrere photoaktivierbare Aminosäuren, darunter Photo-Leucin **9** und Photo-Methionin **10** (Abb. 2.14). Diese beiden künstlichen Aminosäuren sind dem natürlich vorkommenden Leucin und Methionin so ähnlich, dass der normale Translationsapparat diese erkennt und in Proteine einbaut.<sup>[126]</sup> Es ist daher keine Transfektion mit Plasmiden notwendig, die veränderte tRNA und tRNA-Synthetase codieren. Durch Einbau von Benzoylphenylalanin **6** in die SH2-Domäne von Grb2 wurde beispielsweise die Bindung von Grb2 an den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor) in Gegenwart von EGF nachgewiesen.<sup>[127]</sup>

Die Entwicklung einer Bis-Mannose-PAL-Sonde ermöglichte der Gruppe um *Geoffrey Holman* die Markierung von GLUT4, einem Insulin-gesteuerten Glucosetransporter. Da die Zellmembran undurchlässig für diese Sonde war, wurden nur die Transporter an der Zelloberfläche markiert, was einen Vergleich der GLUT4-Translokation zwischen

gesunden und Typ 2-Diabetes-Patienten ermöglichte. Letztere zeigten nach Insulinstimulation deutlich weniger GLUT4 an der Zelloberfläche.<sup>[128]</sup> Ebenso konnten Kinetikuntersuchungen im Zusammenhang mit der GLUT4-Translokation durchgeführt werden.<sup>[129]</sup>

PAL-Sonden stellen in der Biochemie ein überaus hilfreiches und häufig verwendetes Werkzeug dar. Wie bereits in den Kapiteln zuvor angedeutet, gibt es insbesondere im Bereich der Phosphotyrosin-vermittelten Signalübertragung eine Vielzahl von Problemstellungen, die durch Photoaffinitätsmarkierungen bearbeitet werden können oder müssen. Ein wichtiges Kriterium bei der Wahl einer photoreaktiven Gruppe ist, wie bereits erwähnt, eine möglichst geringe Beeinträchtigung der Wechselwirkungen des untersuchten Systems. Die Entwicklung eines photovernetzbaren Phosphotyrosinmimetikums ist deshalb ein wichtiger Schritt, da der Einbau einer zusätzlichen photoreaktiven Gruppe entfällt.

## 3 Zielstellung Thema I

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Entwicklung eines photovernetzbaren Phosphotyrosinmimetikums. Die Kombination einer photoreaktiven Gruppe mit einem Phosphotyrosinmimetikum bietet vor allem den Vorteil, dass der Einbau eines zusätzlichen Photovernetzgers, der in den meisten Fällen eine Beeinträchtigung der Affinität zur Folge hat, entfällt. Da das photovernetzbare Bioisoster einen wesentlichen Anteil an der Affinität hat, sollte die Bildung der kovalenten Bindung im Vergleich mit Photovernetzern, die über einen flexiblen Linker mit einem affinen Liganden verknüpft sind, besonders effizient und definiert erfolgen.

Zunächst sollte das Design des photovernetzbaren Phosphotyrosinmimetikums festgelegt werden. Dabei war insbesondere auf den Erhalt der wesentlichen Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu Phosphotyrosin **1** zu achten, um eine möglichst hohe Affinität zu gewährleisten. Nach der Synthese des Mimetikums sollte sowohl die Affinität als auch die Photoreaktivität des Photovernetzgers überprüft und mögliche Nebenprodukte der Photoreaktionen identifiziert werden. Anschließend sollte das vernetzbare Phosphotyrosinmimetikum als Teil einer peptidischen Sonde gegenüber STAT5b evaluiert werden. Dies sollte unter anderem Affinitätsvergleiche mit dem entsprechenden Phosphotyrosin-enthaltenden Peptid und Untersuchungen zum Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Bindungskonstanten beinhalten. Wesentlicher Bestandteil sollte darüber hinaus die Charakterisierung des Photovernetzungsprozesses mit STAT5b sein. In diesem Zusammenhang sollten beispielsweise der Einfluß der Sondenkonzentration, Zeitabhängigkeiten, der Einfluß von Reduktionsmitteln und die Spezifität der Photovernetzung untersucht werden. Abschließend sollte die Sonde mit STAT5b photovernetzt, das Konjugat über eine Affinitätsmarkierung aufgereinigt und STAT5b anschließend nach tryptischem Verdau mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.



# 4 Benzoylphosphonate als photovernetzbare Phosphotyrosinmimetika

## 4.1 Design des photovernetzbaren Phosphotyrosinmimetikums

Die wesentlichen Wechselwirkungen, die zur Bindung des Phosphotyrosins **1** beitragen, werden über die zwei negativen Ladungen des Phosphats und die über diese Sauerstoffe entstehenden Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt.<sup>[87]</sup> Daher stellen dianionische Mimetika, vor allem basierend auf Phosphonaten, die Bioisostere mit den höchsten Affinitäten gegenüber Phosphotyrosin-erkennenden Domänen dar. Aus diesem Grund sollte das photovernetzbare Mimetikum ausgehend von einem Phosphonat entwickelt werden. Als photoreaktive Funktionalitäten standen im Wesentlichen drei Gruppen zur Auswahl: Azide, Diazirine und Carbonylgruppen. Azide und Diazirine erzeugen nach Bestrahlung Nitrene bzw. Carbene, hochreaktive Gruppen, die jedoch auch sehr kurzlebig sind und vergleichsweise geringe Photovernetzungsausbeuten ergeben. Die Carbonylgruppe hingegen kann, wie auch Benzophenon **5**, reversibel zu einem Biradikal angeregt werden (Abb. 4.1), was zu einer Erhöhung der Vernetzungseffizienz führt. Die Einführung der Carbonylgruppe in  $\alpha$ -Position zur Phosphonatgruppe kann darüber hinaus wie die Fluoratome von FPmp **2b** und F<sub>2</sub>Pmp **2c** als Wasserstoffbrückenakzeptor dienen, was zu einer zusätzlichen Affinitätssteigerung führen sollte. Die Anforderungen an das Design führten somit zur Substanzklasse der Benzoylphosphonate **11**.

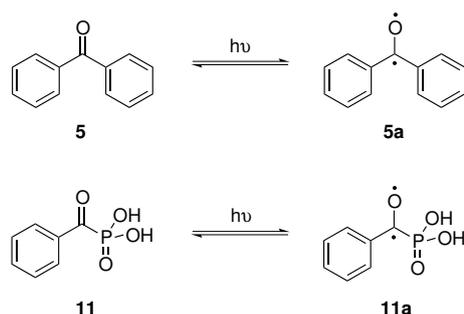
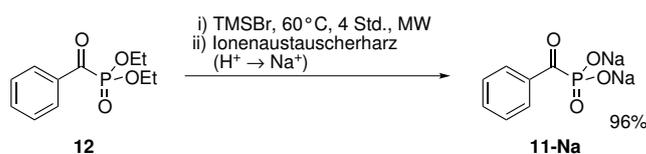


Abb. 4.1: Anregung der Carbonylgruppe zum Biradikal

## 4.2 Synthese von $\alpha$ -Ketophosphonaten

### 4.2.1 Synthese von Benzoylphosphonat 11

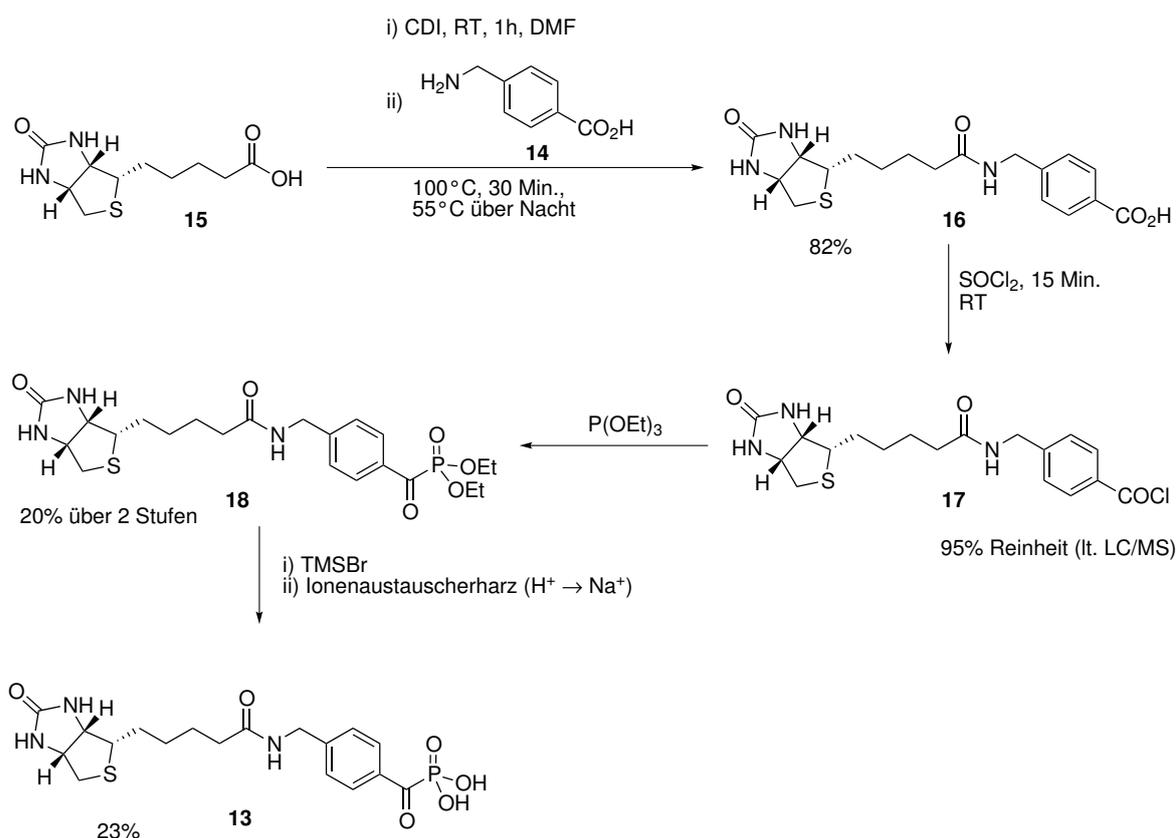
Zur Untersuchung der Photoreaktivität und ersten Affinitätsuntersuchungen wurde zunächst das einfachste Benzoylphosphonat **11** synthetisiert. Es konnte in einer Stufe aus kommerziell erhältlichem Diethylbenzoylphosphonat **12** durch Esterspaltung mit TMSBr dargestellt werden (Abb. 4.2). Dafür wurde Diethylbenzoylphosphonat **12** in trockenem Acetonitril mit 2.2 Äquivalenten TMSBr in der Mikrowelle bei 60 °C für vier Stunden umgesetzt. Überschüssiges TMSBr wurde anschließend mit einer Methanol-Wasser-Mischung (95:5 *v/v*) gequenchet und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Aufgrund der Instabilität der freien Säure des Ketophosphonats wurde die Verbindung mittels Ionenaustauscher-Harz in das stabile Natriumsalz **11-Na** überführt und mit einer Ausbeute von 96 % isoliert.

Abb. 4.2: Synthese von Benzoylphosphonat **11-Na**

### 4.2.2 Synthese von Biotin-markiertem Benzoylphosphonat 13

Für weitere Affinitäts- und Stabilitätsuntersuchungen wurde Biotin-markiertes Benzoylphosphonat **13** synthetisiert. Benzoylphosphonsäureester sind sehr instabil gegenüber Nucleophilen. Sie reagieren beispielsweise wie aktivierte Carbonsäuren mit Aminen zu Amid.<sup>[130]</sup> Hingegen wurde beobachtet, dass die freie Benzoylphosphonsäure unter sauren Bedingungen hydrolysiert. Aus diesen Gründen wurde zunächst ver-

sucht, die Phosphonsäure am Ende der Synthese einzuführen. Ausgehend von der 4-(Aminomethyl)benzoesäure **14** sollte zunächst die Kupplung von Biotin **15** durchgeführt werden. Anschließend sollte die Umsetzung zum Säurechlorid **17** erfolgen, welches dann in einer Michaelis-Arbusow-Reaktion zum Ketophosphonsäureester **18** umgesetzt werden sollte. Nach Entschützung mittels TMSBr, analog zum Benzoylphosphonat, sollte Verbindung **13** nach einer vierstufigen Synthese isoliert werden (Abb. 4.3).

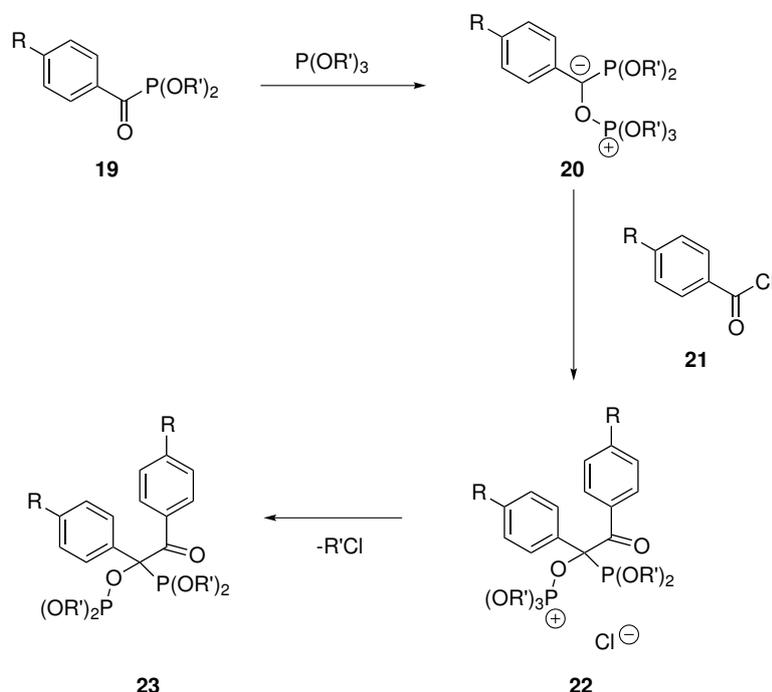


**Abb. 4.3:** Strategie I zur Synthese von *N*-Biotin-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **13**

Die Kupplung von Biotin **15** zur *N*-Biotin-4-(aminomethyl)benzoesäure **16** wurde nach einer Vorschrift von *Chindarkar et al.* durchgeführt.<sup>[131]</sup> Danach wurde Biotin **15** zunächst mit Carbonyldiimidazol (CDI) unter Bildung eines Carbonsäureimidazolids voraktiviert und anschließend mit 4-(Aminomethyl)benzoesäure **14** umgesetzt. Das bei der Aktivierung freigewordene Imidazol fungiert gleichzeitig als Base, um freigewordene Protonen abzufangen. Verbindung **16** konnte in einer Ausbeute von 82 % als weißer Feststoff isoliert werden.

Die Aktivierung des Benzoesäurederivats **16** wurde zunächst 15 Minuten in Thionylchlorid als Aktivierungsreagenz bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde überschüssiges Thionylchlorid im Hochvakuum entfernt. Der Anteil des Säurechloro-

rids **17** wurde nach Entfernung des Thionylchlorids durch Umsatz mit Methanol und anschließender Bestimmung des gebildeten Methylesters mittels LC/MS quantifiziert. Die Ausbeuten lagen in der Regel zwischen 75 und 92 %. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des im darauf folgenden Schritt eingesetzten, nucleophilen Triethylphosphits gegenüber Elektrophilen musste Thionylchlorid vollständig entfernt werden. Der Einsatz eines hohen Überschusses des Triethylphosphits, um noch vorhandenes Thionylchlorid zu quenchen, war nicht möglich. Denn wie aus der Literatur bekannt ist, führt die Reaktion von überschüssigem Triethylphosphit mit bereits gebildetem Benzoylphosphonsäureester **19** zu Diphosphorverbindungen **23** (Abb. 4.4).<sup>[132]</sup> Diese Beobachtung konnte mittels LC/MS bestätigt werden. Daher war die Entfernung des Thionylchlorids unbedingt notwendig.



**Abb. 4.4:** Nebenreaktion bei Einsatz von Phosphiten im Überschuss

Es wurde festgestellt, dass mehrstündiges Trocknen im Hochvakuum zur Entfernung des Thionylchlorids nicht ausreichend war. Auch Koevaporation mit verschiedenen Lösungsmitteln sowie die Fällung des Säurechlorids **17** führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Zusätzlich wurde versucht, das Produkt durch Gefriertrocknung zu reinigen. Dazu wurde das Rohprodukt in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Stickstoffgegenstrom mit dem Spatel pulverisiert und das Pulver anschließend im Hochvakuum getrocknet. Letztendlich konnte durch Koevaporation zunächst mit 1,2-Dichlorethan, dann mit THF und anschließender Gefriertrocknung das Säurechlorid **17** gereinigt wer-

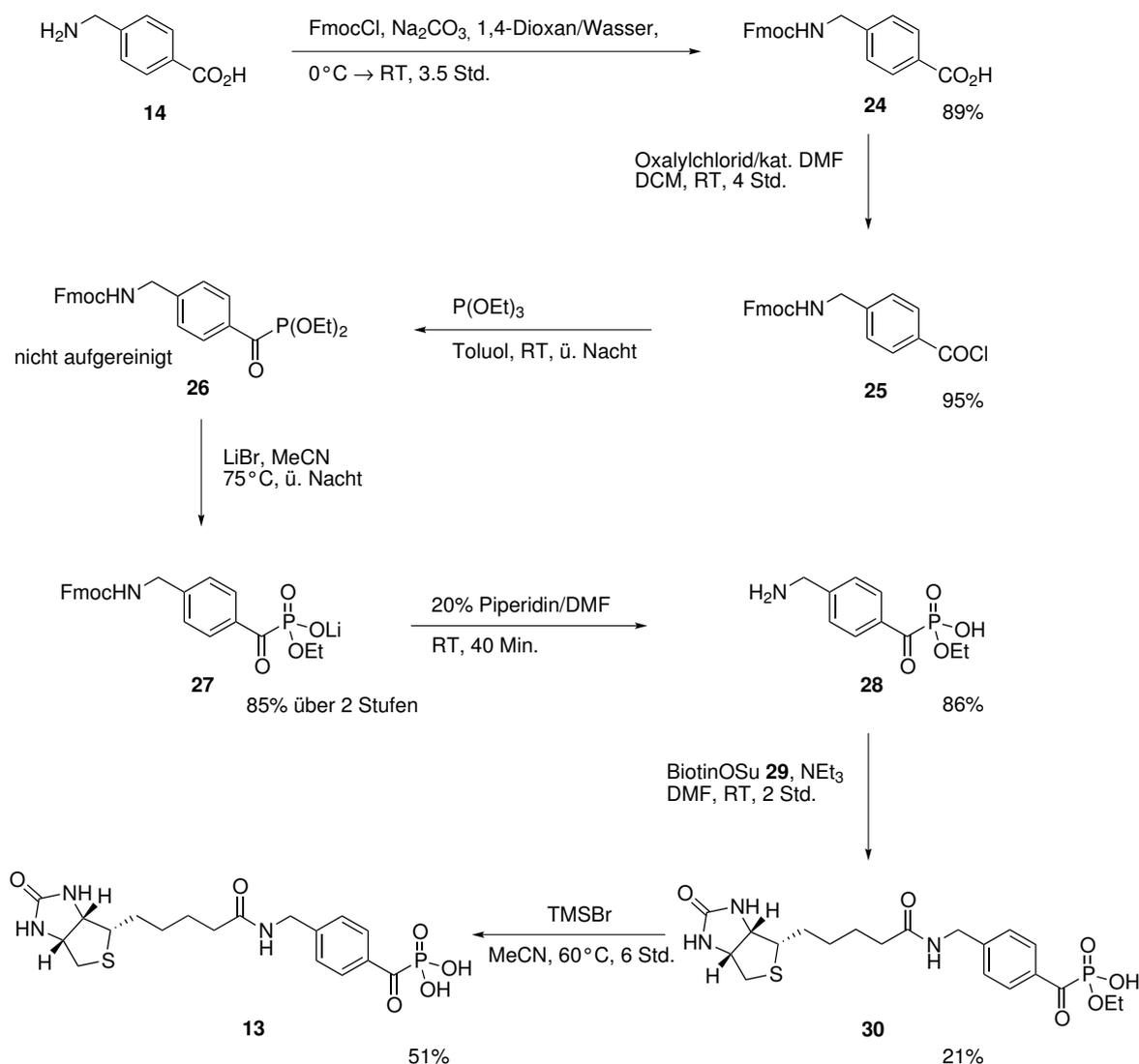
den, so dass die Umsetzung mit Triethylphosphit zumindest mit einer Ausbeute von 20 % über zwei Stufen gelang. Die anschließende Umsetzung mit 2.6 Äquivalenten TMS-Br in Acetonitril führte nach vier Stunden bei 60 °C in der Mikrowelle zum entschützten *N*-Biotin-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **13** mit einer Ausbeute von 23 %. Jedoch konnte die Reaktion in größerem Maßstab nicht reproduziert werden.

Andere Wege das Säurechlorid **17** herzustellen, z.B. mit 1-2 Äquivalenten Thionylchlorid in Chloroform, DCM oder THF, mit oder ohne katalytische Zusätze von DMF bei Temperaturen von 0-100 °C resultierten in Ausbeuten von maximal 50 %. Die Darstellung unter Verwendung von Oxalylchlorid war ebenfalls nicht erfolgreich. Der Einsatz von Dichlormethylmethylether zur Synthese von Säurechloriden resultierte auch bei hohen Überschüssen in einer maximalen Ausbeute von 53 %. Diese Reaktion wurde jedoch meist durch eine hohe Anzahl von Nebenprodukten begleitet. Die daraus resultierenden Umsetzungen mit Triethylphosphit brachten jedoch ebenfalls nicht das gewünschte Produkt. Es wurde daher eine alternative, siebenstufige Synthesestrategie entwickelt (Abb. 4.5).

Dieser Strategie zufolge wurde die Phosphonatgruppe zu Beginn eingeführt, Biotin hingegen erst am Ende der Synthese. Die späte Einführung des Biotins ist zum einen in der starken Herabsetzung der Löslichkeit in häufig verwendeten Lösungsmitteln begründet. Darüber hinaus ist Biotin **15** inkompatibel mit den Einführungsbedingungen der Phosphonatgruppe. Aufgrund der Instabilität der Benzoylphosphonsäureestergruppe gegenüber Aminen musste vor deren Einführung zunächst das freie Amin **14** geschützt werden. Als Schutzgruppe wurde die Fmoc-Schutzgruppe gewählt, da sie im Gegensatz zur Boc-Gruppe gegenüber den sauren Bedingungen bei der Säurechloridbildung stabil ist. Damit das Ketophosphonat unter den Entschützungsbedingungen der Fmoc-Gruppe intakt bleibt, war eine Monoentschützung des Phosphonsäurediesters **26** notwendig. Das verwendete Piperidin hätte sonst zur Bildung des Piperidinamids geführt.<sup>[130]</sup> Ebenso hätte das entschützte Amin mit einem weiteren Ketophosphonat reagieren können. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach *Vourloumis et al.* unter Standardbedingungen unter Verwendung von Fmoc-Chlorid in Wasser/1,4-Dioxan (1:1 *v/v*) und unter Zusatz von Natriumcarbonat eingeführt.<sup>[133]</sup> Verbindung **24** konnte mit einer Ausbeute von 89 % isoliert werden.

Die anschließende Umsetzung zum Säurechlorid **25** mit zwei Äquivalenten Oxalylchlorid in Gegenwart katalytischer Mengen DMF wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von *Wrobel et al.* durchgeführt.<sup>[134]</sup> Nachdem die Suspension nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur zu einer klaren Lösung geworden war, wurde das Lösungsmittel Toluol im Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde eine

Probe des Säurechlorids **25** mit Methanol umgesetzt und mittels LC/MS vermessen. Die Substanz wies eine Reinheit von 95 % auf und wurde daher ohne weitere Aufarbeitung für die Michaelis-Arbusow-Reaktion verwendet. Diese wurde ebenfalls nach *Wrobel et al.* durchgeführt.<sup>[134]</sup> Dazu wurde das Säurechlorid **25** mit 1.1 Äquivalenten Triethylphosphit bei Raumtemperatur über Nacht umgesetzt. Nach Entfernung des Toluols im Hochvakuum blieb ein gelbliches Öl zurück, das in Anlehnung an *Karaman et al.* mit Lithiumbromid in Acetonitril in den entsprechenden Monoethylester **27** überführt wurde.<sup>[135]</sup> Der Monoethylester **27** konnte mit einer Ausbeute von 85 % über zwei Stufen isoliert werden.



**Abb. 4.5:** Strategie II zur Synthese von *N*-Biotin-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **13**

Die anschließende Entschützung der Benzylaminposition erfolgte nach Standardbedingungen wie sie auch in der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese verwendet werden. Dazu

wurde Verbindung **27** in 20 % Piperidin in DMF gelöst und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde im Hochvakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und lyophilisiert, so dass **28** nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC mit einer Ausbeute von 86 % isoliert werden konnte.

Im Anschluss sollte das freie Amin mit BiotinOSu **29** gekuppelt werden. Letzteres wurde nach einer Vorschrift von *Li et al.* synthetisiert.<sup>[136]</sup> Biotin **15** wurde mit 1.3 Äquivalenten DCC und einem Äquivalent *N*-Hydroxysuccinimid bei Raumtemperatur über Nacht umgesetzt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde BiotinOSu **29** mit einer Ausbeute von 85 % isoliert.

Die Kupplung des Benzylaminderivats **28** mit BiotinOSu **29** wurde in DMF in Gegenwart von Triethylamin durchgeführt. Das Kupplungsprodukt **30** konnte nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC lediglich mit einer Ausbeute von 21 % isoliert werden.

Der letzte Schritt der Synthese stellte die Entschützung der Phosphonsäuregruppe **30** mittels TMSBr dar. Diese wurde wie im Falle des Diethylbenzoylphosphonats **12** mit TMSBr in Acetonitril bei 60 °C in der Mikrowelle durchgeführt. Das Endprodukt **13** wurde mit einer Ausbeute von 51 % als weißer Feststoff isoliert.

Abschließend ist zu bemerken, dass die Gesamtausbeute bei der siebenstufigen Synthese mit 7 % gegenüber der vierstufigen Synthese mit 3 % trotz drei zusätzlicher Stufen geringfügig höher ist. Die Ausbeute des Biotinkupplungsschrittes (21 %) sollte noch optimierbar sein, was die Gesamtausbeute anheben würde.

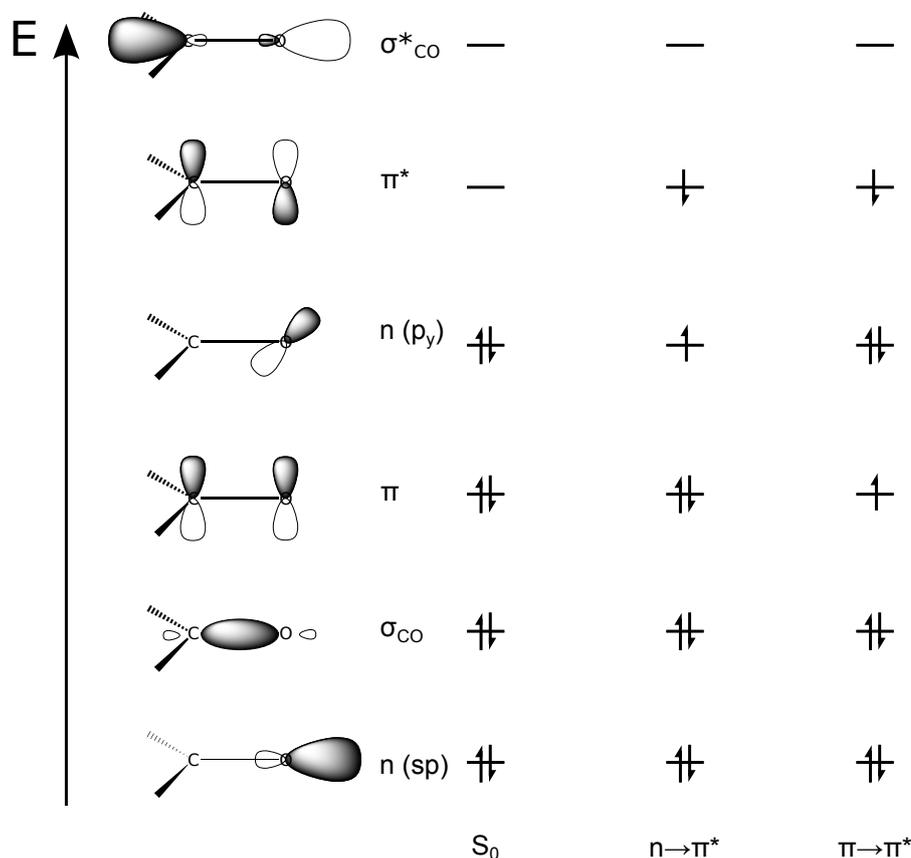
## 4.3 Photochemische Untersuchungen des Benzoylphosphonats **11**

### 4.3.1 Kurze Einführung in die Photochemie

Nach der Molekülorbitaltheorie werden Molekülorbitale aus einer Linearkombination ihrer Atomorbitale gebildet. Für den Fall der Doppelbindung eines Alkens entstehen dabei zum einen ein bindendes ( $\sigma$ ) und ein antibindendes ( $\sigma^*$ )  $\sigma$ -Orbital (rotationssymmetrisch zur Bindungsachse), zum anderen werden ein bindendes ( $\pi$ ) und ein antibindendes ( $\pi^*$ )  $\pi$ -Orbital gebildet. Diese sind im Grundzustand ( $S_0$ ) folgendermaßen besetzt:  $\sigma^2 \pi^2$ . Man bezeichnet ihn als Singulettzustand, da die Spinmultiplizität  $2N+1$ , mit  $N$  als Summe aller Spins, eins ergibt. Der erste elektronisch angeregte Zustand  $S_1$  wird erreicht, wenn das System mit einer Wellenlänge  $\lambda$  bestrahlt wird, dessen Energie

$h \cdot \nu$  der Energiedifferenz zwischen dem  $\pi$ -Orbital und dem energetisch darüberliegenden  $\pi^*$ -Orbital entspricht. Man spricht dann von einem  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang.

In einem Molekül mit einem aromatischen System sind  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge in der Regel die energieärmsten. Sind in dem Molekül außerdem Heteroatome wie beispielsweise Stickstoff oder Sauerstoff enthalten, so existieren zusätzlich freie Elektronenpaare, die meist als nichtbindende Orbitale ( $n$ ) in das MO-Schema einfließen. Sie liegen energetisch unverändert gegenüber den Atomorbitalen und befinden sich daher normalerweise zwischen  $\pi$ - und  $\pi^*$ -Orbital. In solchen Molekülen, z.B. in Carbonylverbindungen, sind daher  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge am energieärmsten. In Abbildung 4.6 ist ein qualitatives Molekülorbitalschema der Carbonylgruppe im Grundzustand sowie nach  $\pi \rightarrow \pi^*$ - und nach  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang gezeigt.



**Abb. 4.6:** Qualitatives Energieniveauschema für Elektronenübergänge in der C=O-Bindung einer Carbonylgruppe. Gezeigt sind ausschließlich die angeregten Singulettzustände.

Nach Anregung eines Elektrons kann es zu verschiedenen Prozessen kommen. Abgesehen von photochemischen Prozessen kann es zur Relaxation unter Lichtemission in den Grundzustand (Fluoreszenz) kommen oder zu strahlungslosen Relaxationsprozessen

unter Spinerhaltung (interne Konversion, IC). Im Falle von Ketonen wie Benzophenon gibt es einen weiteren effizienten intramolekularen Energietransfer. Er führt unter Spinumkehr vom ersten angeregten Singulettzustand in den ersten angeregten Triplettzustand. Dieser Vorgang wird „intersystem crossing“ (ISC) genannt und ist laut Spinerhaltungssatz eigentlich verboten. Er produziert ein Biradikal, das für den Einsatz von Benzophenon **5** als Photocrosslinker verantwortlich ist. Die Energie des Triplettzustands  $T_1$  liegt wegen der Spinkorrelation zwischen Elektronen mit parallelem Spin grundsätzlich unter der des entsprechenden Singulettzustands  $S_1$ . Die wichtigsten intramolekularen, photophysikalischen Prozesse sind im Jablonski-Diagramm (Abb. 4.7) zusammengefasst.

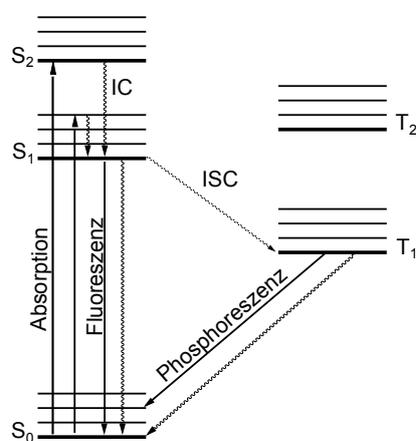
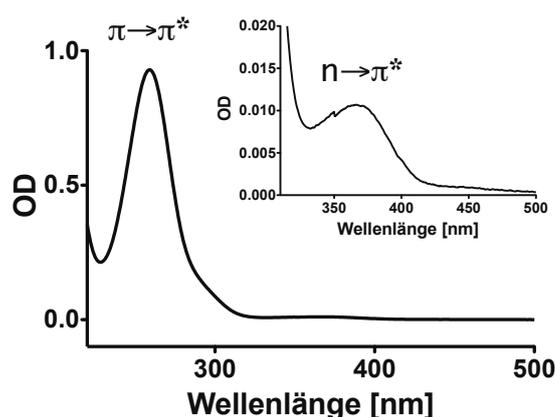


Abb. 4.7: Jablonski-Diagramm

Am Beispiel des Ketophosphonats **11** können also die Bande bei 259 nm dem  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang und die wesentlich kleinere Absorption bei 368 nm dem  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang zugeordnet werden (Abb. 4.8). Letzterer ist durch die Promotion eines n-Elektrons in das antibindende  $\pi^*$ -Orbital für die Bildung des Diradikals verantwortlich.

Im Vergleich zum Benzoylphosphonat **11** liegen die Absorptionsbanden des Benzaldehyds bei 248 nm bzw. 279 nm.<sup>[137]</sup> Dearden *et al.* vermuten, dass die starke bathochrome Verschiebung des  $n \rightarrow \pi^*$ -Überganges beim Benzoylphosphonat **11** auf  $p_\pi$ - $d_\pi$ -Wechselwirkungen zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Phosphoratom zurückzuführen sind.<sup>[138]</sup>

Überträgt man dies auf ein Absorptionsspektrum, kann man also den verschiedenen Absorptionsbanden bestimmte Elektronenübergänge zuordnen. Berücksichtigt man, dass zusätzlich zu den Elektronenübergängen noch zahlreiche Schwingungs- und Rotationsenergieniveaus existieren, so kann auch die Breite der Absorptionsbanden erklärt werden.



**Abb. 4.8:** UV-Absorptionsspektrum von Benzoylphosphonat **11** in Wasser

Die Intensität einer Absorptionsbande, d.h. deren Absorbanz  $A$ , ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz mit der Konzentration  $c$  [ $\frac{\text{mol}}{\text{l}}$ ] der gelösten Substanz oder Flüssigkeit und der Schichtdicke  $d$  [ $\text{cm}$ ] der für die Messung genutzten Küvette verknüpft:

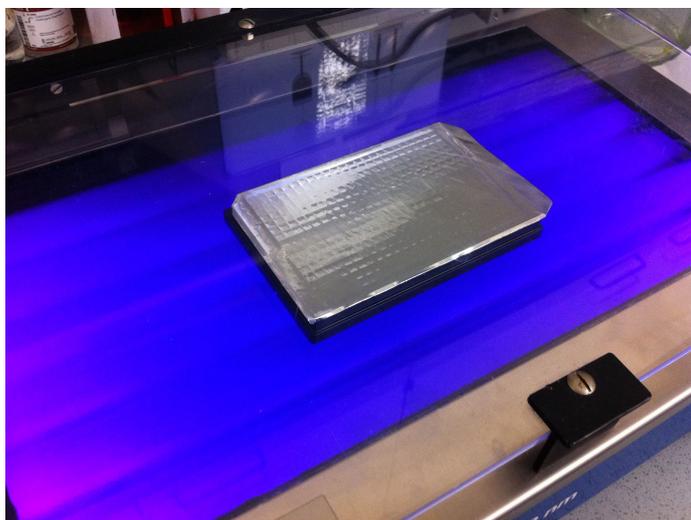
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

Die daraus resultierende Konstante  $\varepsilon$  [ $\frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ ] wird Extinktionskoeffizient genannt und ist für die betreffende Wellenlänge, bei der die Absorbanz gemessen wurde, gültig. Er spiegelt die Wahrscheinlichkeit wider, dass ein Photon absorbiert wird.  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge besitzen im Allgemeinen sehr intensive Absorptionsbanden und damit auch hohe Extinktionskoeffizienten.  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge von Carbonylgruppen besitzen hingegen sehr kleine Extinktionskoeffizienten. Dies liegt daran, dass diese Übergänge symmetrieverboten sind. Dies ist auch im Falle des Benzoylphosphonats **11** so, dessen Extinktionskoeffizient in Wasser zu  $\varepsilon_{368 \text{ nm}} = 95 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  ermittelt wurde.  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge haben typischerweise Extinktionskoeffizienten im Bereich zwischen  $1\text{-}400 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ . Da ein Vergleich mit dem am häufigsten genutzten Photovernetzer Benzophenon **5** aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser nicht möglich war, wurden beide Extinktionskoeffizienten zusätzlich in Methanol ermittelt. Unter diesen Bedingungen beträgt der Extinktionskoeffizient von Benzophenon **5**  $\varepsilon_{334 \text{ nm}} = 121 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ , der des Benzoylphosphonats **11**  $\varepsilon_{375 \text{ nm}} = 69 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ .

Die Größe des Extinktionskoeffizienten korreliert zwar mit der Wahrscheinlichkeit der Absorption eines Photons, sagt jedoch nichts darüber aus, wie viele der Photonen auch zu einer Reaktion (photochemischer Prozess) führen und wie viele nur zur Anregung mit anschließender Relaxation des Moleküls (photophysikalischer Prozess) führen. Dieser Sachverhalt wird durch die Quantenausbeute beschrieben.

### 4.3.2 Photodimerisierung von Benzoylphosphonat **11**

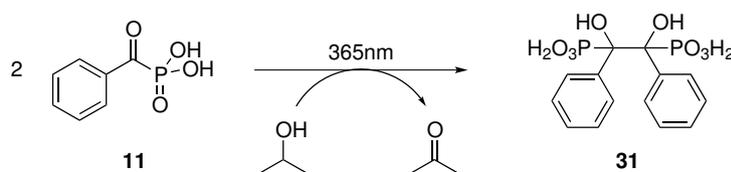
Die reproduzierbare Vernetzung von Molekülen durch Lichtanregung setzt reproduzierbare Bestrahlungsbedingungen voraus. Da dies in weiteren Experimenten im Mikrotiterplattenformat auch in Verbindung mit Quantifizierungen erfolgen sollte, ist die Auswahl einer homogenen Strahlungsquelle unabdingbar. UV-Handlampen wurden daher als ungeeignet eingestuft und besaßen auch keine ausreichend hohe Lichtintensität. Als Referenz wurden zunächst Experimente mit Benzophenon durchgeführt, da hierfür bereits entsprechende Bedingungen aus der Literatur bekannt waren.<sup>[139]</sup> Es wurden zunächst Experimente mit einem Stratalinker™ durchgeführt. Dieser gewährleistete ein hohes Maß an homogener Strahlung, jedoch war auch bei geringen Abständen von wenigen Zentimetern keine Photodimerisierung zu beobachten. Die Verwendung eines Transilluminators mit UV-Röhren der Wellenlänge 365 nm (entspricht dem  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Benzoylphosphonats **11**), der normalerweise für die Visualisierung bzw. Bestrahlung von Gelen verwendet wird, erwies sich als äußerst erfolgreich. Durch die Bestrahlung von unten in Mikrotiterplatten mit transparentem Boden wurde ein geringer Abstand zur Strahlungsquelle realisiert. Zugleich wurde die Versiegelung der Platte mit selbstklebender Aluminiumfolie ermöglicht, wodurch Konzentrationsänderungen durch die Verdampfung des Lösungsmittels minimiert werden konnten (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Bestrahlung von Proben in 384-Well Mikrotiterplatten auf einem Transilluminator

Photochemische Studien zur Dimerisierung von Aroylphosphonsäureestern **19** wurden bereits 1970 von *Terauchi et al.* durchgeführt.<sup>[140]</sup> Bislang gibt es jedoch noch keinerlei Untersuchungen zur Photodimerisierung von Benzoylphosphonaten **11**. Alle Dimerisierungsreaktionen dieser Studie wurden zudem in organischen, größtenteils apolaren

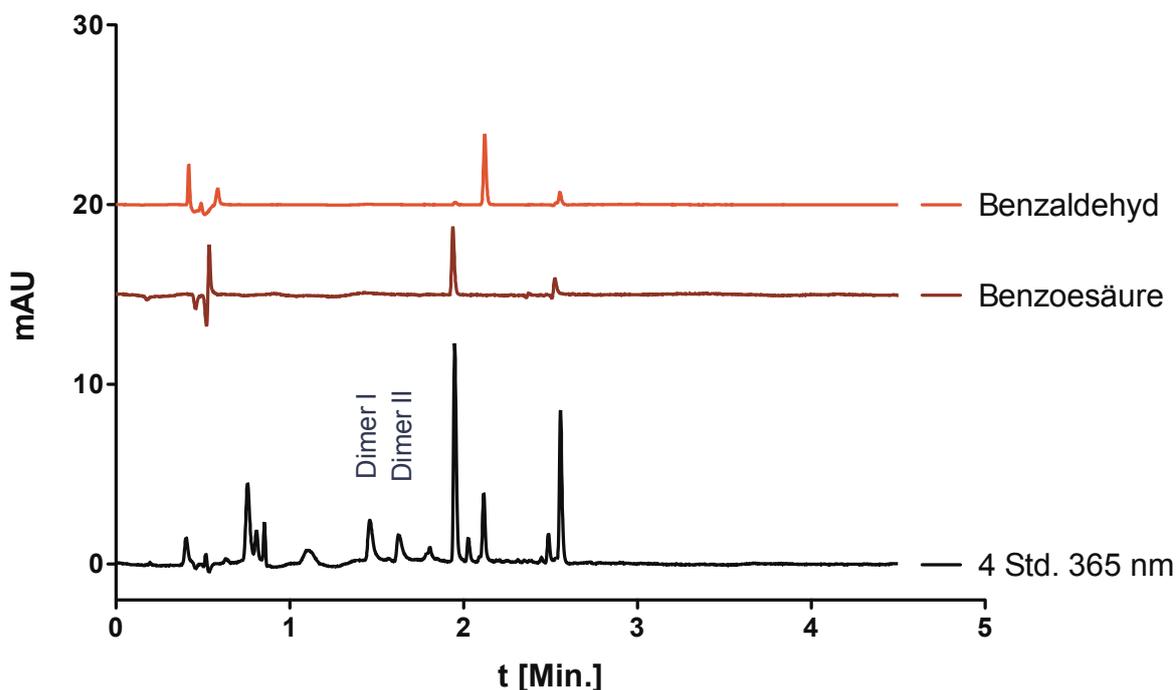
Lösungsmitteln durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass nur die freie Phosphonsäure **11** als Phosphotyrosinmimetikum eingesetzt werden konnte, musste zunächst untersucht werden, ob auch sie photoaktiv ist. Darüber hinaus musste überprüft werden, ob die Photodimerisierung auch in wässrigen Lösungen stattfindet. Erste Versuche zur Dimerisierung des Benzoylphosphonats **11** in Wasser waren jedoch nicht erfolgreich und es konnte mittels LC/ToF-MS kein Dimerisierungsprodukt **31** nachgewiesen werden. Erst der Zusatz großer Mengen *iso*-Propanol führte zu nachweisbarer Dimerisierung (Abb. 4.10). Laut *Cohen et al.* wird das *iso*-Propanol als Wasserstoffdonor benötigt.<sup>[139]</sup> Das äußerst reaktive Sauerstoffradikal abstrahiert demnach ein Wasserstoffatom vom sekundären Kohlenstoff des *iso*-Propanols, wodurch ein C-zentriertes  $\alpha$ -Hydroxybenzylphosphonatr radikal und ein tertiäres *iso*-Propanolradikal entsteht. Durch Rekombination zweier Radikale entsteht das Dimerisierungsprodukt **31**, während das *iso*-Propanolradikal durch Reaktion mit einem weiteren Biradikal des Benzoylphosphonats und anschließender Relaxation zu Aceton reagiert.



**Abb. 4.10:** Photodimerisierung von Benzoylphosphonat **11**

Zur besseren Charakterisierung der Photoreaktionsprodukte wurde die Photodimerisierung im präparativen Maßstab durchgeführt. Um eine möglichst große Bestrahlungsoberfläche bei möglichst geringem Lichtweg zu schaffen, wurde eine Kristallisierschale als Reaktionsgefäß genutzt. Das Benzoylphosphonat wurde in einer Isopropanol-Wasser-Mischung (70:30 *v/v*) gelöst und vier Stunden bei 4 °C und einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Abbildung 4.11 zeigt eine LC/MS-Analyse der Photodimerisierung.

Mit Hilfe der exakten Masse der Peaks bei Retentionszeiten von 1.41 Min. und 1.58 Min. konnten diese als Dimerisierungsprodukte identifiziert werden. Ebenso konnte bei einer Retentionszeit von 1.92 Min. Benzoesäure mittels exakter Masse als Nebenprodukt identifiziert werden. Dies konnte durch Vergleich mit der Retentionszeit der Reinsubstanz bestätigt werden. Ein weiteres mögliches Nebenprodukt, Benzaldehyd, konnte massenspektrometrisch nicht erfasst werden, konnte aber anhand der Retentionszeit identifiziert werden. Beide zuvor erwähnten Nebenprodukte wurden nach präparativer HPLC isoliert, stellten jedoch mit je zwei bis drei Milligramm trotz intensiver UV-Absorption nur je 0.7%wt der eingesetzten Menge dar.



**Abb. 4.11:** UV-Chromatogramm (254 nm) der Benzoylphosphonatbestrahlung bei 365 nm nach vier Stunden

Von Benzophenon ist bekannt, dass die Anregung zum Biradikal in Gegenwart von Wasserstoffdonoren wie Thiolen zu einer lichtinduzierten Reduktion zu Benzhydrol führt.<sup>[139]</sup> Da Thiole, wie Dithiothreitol (DTT), häufige Zusätze in Phosphataseassays darstellen, wurde auch das Benzoylphosphonat **11** auf diese Art der Photoreduktion hin untersucht. Diese Reaktion ist wichtig im Hinblick auf den Einsatz des Benzoylphosphonats **11** als Photovernetzer für biologische Targets, da sie in Konkurrenz zur Reaktion mit dem Protein steht. Bereits nach einer Bestrahlungsdauer von 30 Minuten sah man einen deutlichen UV-Peak, der Benzaldehyd zuzuordnen ist. Der Vergleich mit einer Probe ohne Zusatz von DTT verdeutlicht den Anstieg der Benzaldehydbildung (Abb. 4.12).

Die Bildung von Benzaldehyd könnte über die Photoreduktion zum  $\alpha$ -Hydroxyphosphonat und anschließender Eliminierung der Phosphonatgruppe erfolgen. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Spaltung der Phosphor-Kohlenstoff-Bindung in einer Norrish-Typ-I-ähnlichen Reaktion. Das dabei gebildete Benzoylradikal **35** könnte mit DTT als Wasserstoffdonor reagieren und so zur Bildung von Benzaldehyd führen. Diese C-P-Bindungsspaltungen wurden bisher nur für Aroylphosphonsäureester untersucht (Abb. 4.13). Im Falle von Mesitylphosphonsäureestern konnte diese Art der Bindungs-

spaltung nachgewiesen werden, für Diethylbenzoylphosphonat **12** hingegen nicht.<sup>[141]</sup> Es ist daher fraglich, ob dieser Reaktionsweg von Bedeutung ist.

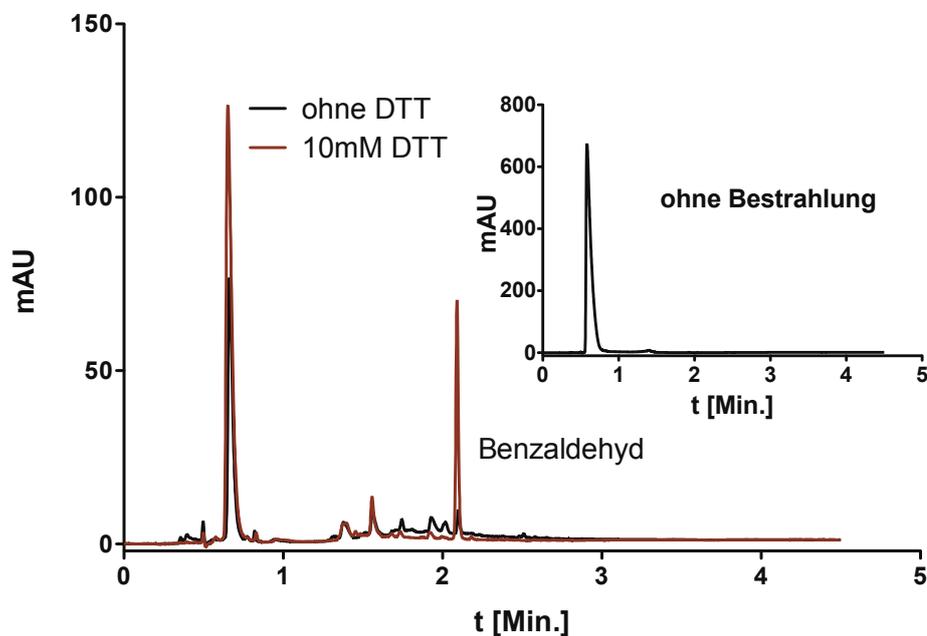


Abb. 4.12: UV-Chromatogramme (254 nm) nach dreißigminütiger Bestrahlung des Benzoylphosphonats **11** bei 365 nm

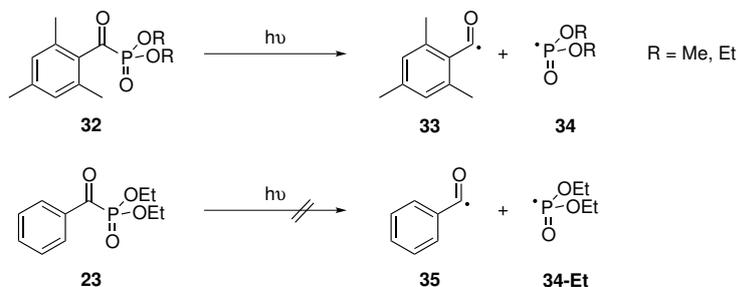
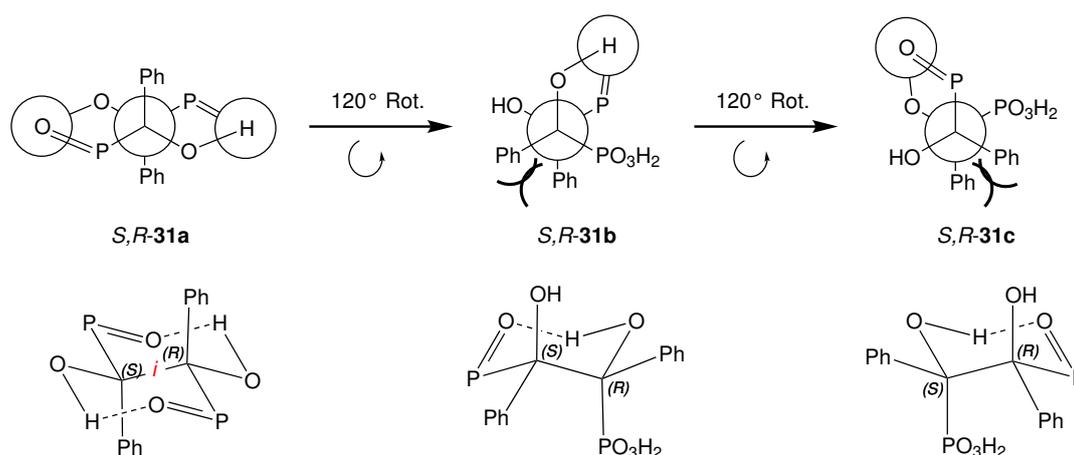


Abb. 4.13: Photolyse von Aroylphosphonsäureestern

#### 4.3.2.1 NMR-Spektren der Dimerisierungsprodukte

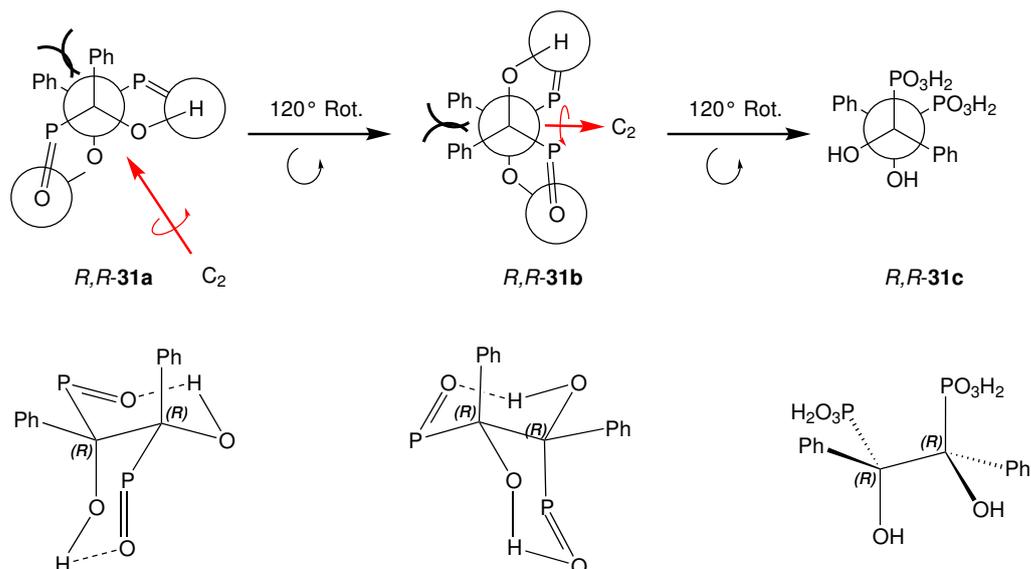
Bisher gibt es keine Charakterisierung der Dimerisierungsprodukte, weder der Aroylphosphonsäureester **19** noch der freien Phosphonsäuren **11** durch eine Strukturanalyse-methode. Dies lässt nur Vermutungen bezüglich der Struktur der Dimere zu. Um einen Aufschluß über die Verknüpfung und die Stereochemie der Dimere zu erhalten, erfolgte deren Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie. Da bei der Dimerisierung keine

der Seiten in irgendeiner Weise bevorzugt angegriffen werden sollte, sind zum einen zwei Enantiomere ( $R,R$ -**31** und  $S,S$ -**31**) zu erwarten, die durch LC/MS und NMR-Spektroskopie nicht unterscheidbar sind. Zum anderen sollte eine *meso*-Verbindung ( $S,R$ -**31**) entstehen. Es zeigte sich, dass das bezüglich der Retentionszeit in der LC/MS erste Dimer ( $\equiv$  Dimer I) scharfe NMR-Signale aufweist, während das zweite Dimer ( $\equiv$  Dimer II) ausgesprochen breite Signale in den  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigt. Die Breite der Signale von Dimer II sprechen für eine zeitabhängige Veränderung der chemischen Umgebung, während die scharfen Signale von Dimer I für eine stabile Konformation sprechen. Eine Betrachtung der Dimere unter Anwendung der Newman-Projektion zeigt, dass die *meso*-Verbindung  $S,R$ -**31** eine äußerst stabile Konformation ( $S,R$ -**31a**) einnehmen kann, in der die Phenylgruppen durch Anti-Positionierung den größtmöglichen freien Raum einnehmen. Insbesondere kann diese Konformation durch das Auftreten von zwei möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Phosphorylsauerstoff und der Hydroxygruppe unter Bildung eines Sechsringes stabilisiert werden (Abb. 4.14).



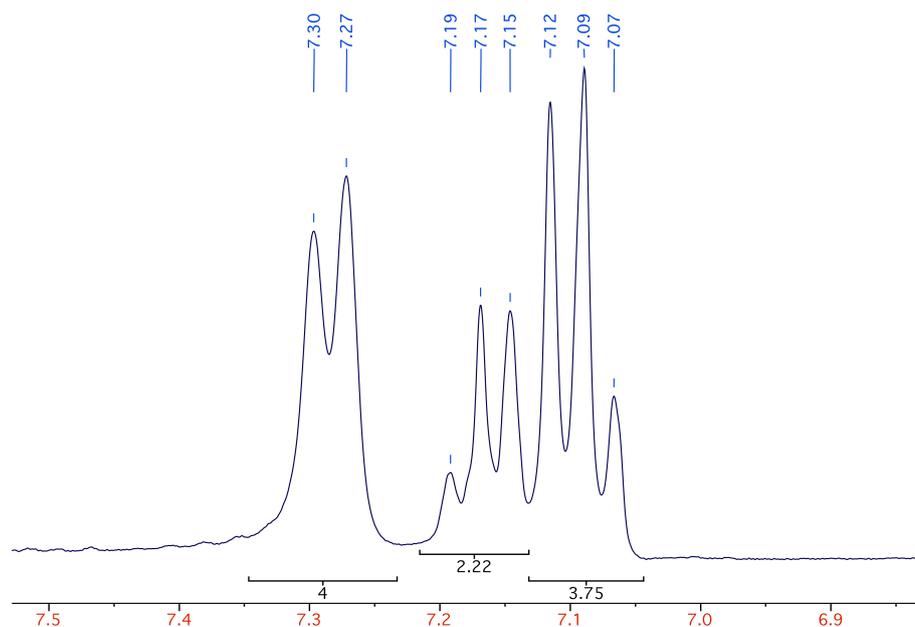
**Abb. 4.14:** Mögliche Konformere der *meso*-Verbindung  $S,R$ -**31**. Die Hydroxygruppen der Phosphonsäuren wurden aus Übersichtsgründen weggelassen.

Im Gegensatz dazu treten bei den Enantiomeren  $R,R$ -**31** und  $S,S$ -**31** in zwei ( $R,R$ -**31a** und  $R,R$ -**31b** bzw.  $S,S$ -**31a** und  $S,S$ -**31b**) von drei Konformeren sehr ungünstige *gauche*-Wechselwirkungen der sterisch überaus anspruchsvollen Phenylringe auf. Das dritte Konformer ( $R,R$ -**31c** bzw.  $S,S$ -**31c**) enthält darüber hinaus keinerlei stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 4.15). Aufgrunddessen ist anzunehmen, dass es sich bei Dimer I um die *meso*-Verbindung  $R,S$ -**31** handelt, während Dimer II dem Enantiomergemisch  $R,R$ -**31** und  $S,S$ -**31** zuzuordnen ist.



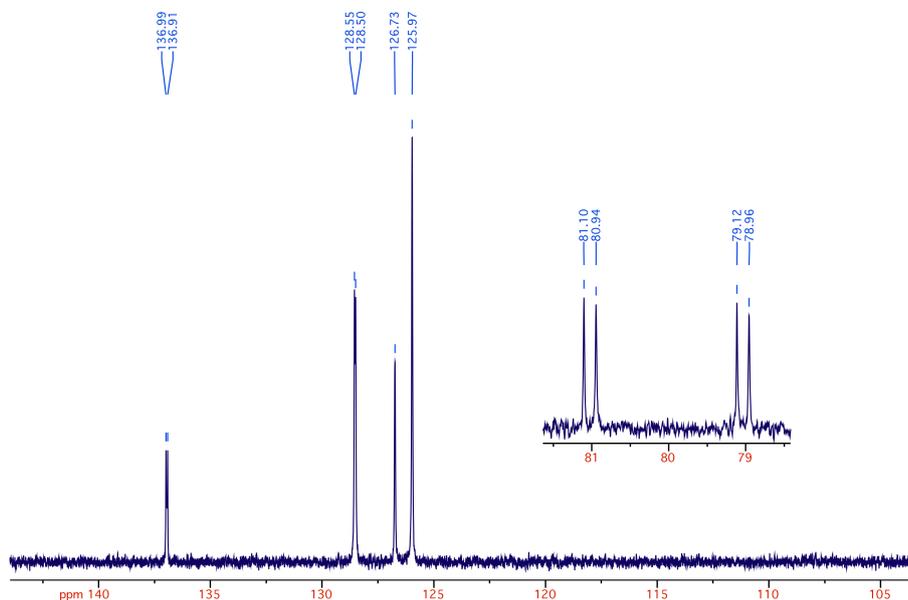
**Abb. 4.15:** Mögliche Konformere von *R,R*-31. Die Hydroxygruppen der Phosphonsäuren wurden aus Übersichtsgründen weggelassen.

Dimer I zeigt im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (in  $\text{DMSO-}d_6$  aufgenommen) aufgrund des Inversionszentrums (*i*) im stabilen Konformer *S,R*-31a (Abb. 4.14) nur einen einfachen Signalsatz (Abb. 4.16). Man erkennt das Dublett der *ortho*-Protonen des Phenylrings bei 7.28 ppm sowie die Pseudotripletts der *para*-Protonen und *meta*-Protonen bei 7.17 ppm bzw. 7.09 ppm.



**Abb. 4.16:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dimer I

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind insbesondere die Aufspaltungen der  $^{13}\text{C}$ -Signale durch die Phosphoratome hervorzuheben (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Dimer I

Sowohl die quarternären Kohlenstoffatome (137.0 ppm), als auch die Kohlenstoffatome in *ortho*-Position weisen eine Dublett-Aufspaltung auf. Die quarternären Alkylkohlenstoffatome hingegen weisen eine Dublett-Dublett-Aufspaltung bei 80.0 ppm auf, die zum einen aus der  $^1J(^{13}\text{C}, ^{31}\text{P})$ -Kopplung mit 150 Hz zum anderen aus der  $^2J(^{13}\text{C}, ^{31}\text{P})$ -Kopplung mit 12 Hz resultiert. Dies ist zudem ein wichtiger Hinweis auf die Richtigkeit der vermuteten Dimer-Struktur.

Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum weist ausschließlich ein Singulett auf (Abb. 4.18), was durch das bereits erwähnte Inversionszentrum und die damit verbundene Enantiotopie der Phosphoratome zu erklären ist.

Die Signale im  $^1\text{H}$ -Spektrum von Dimer II sind im Gegensatz zu Dimer I stark temperaturabhängig. Messungen von Dimer II (Abb. 4.19) in einer 1:1-Mischung aus  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{MeCN-}d_3$  an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer zeigen, dass bei einer Temperatur von 320 K ein scharfes Singulett bei 7.00 ppm und ein sehr breites Signal bei ca. 7.40 ppm vorliegt. Unter Berücksichtigung einer Gesamtanzahl von zehn aromatischen Protonen entfallen sechs davon auf das Singulett und vier auf das breite Signal.

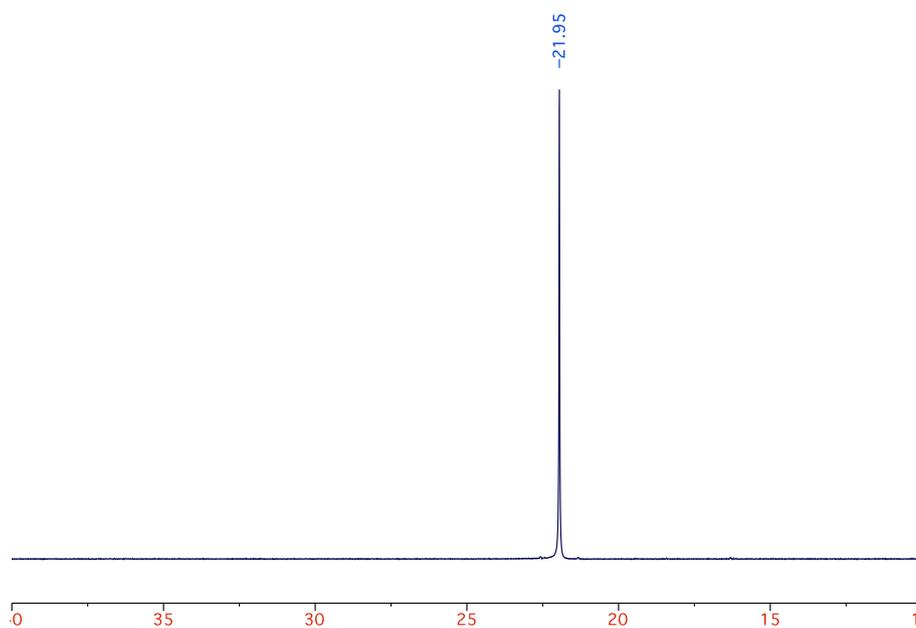


Abb. 4.18:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Dimer I

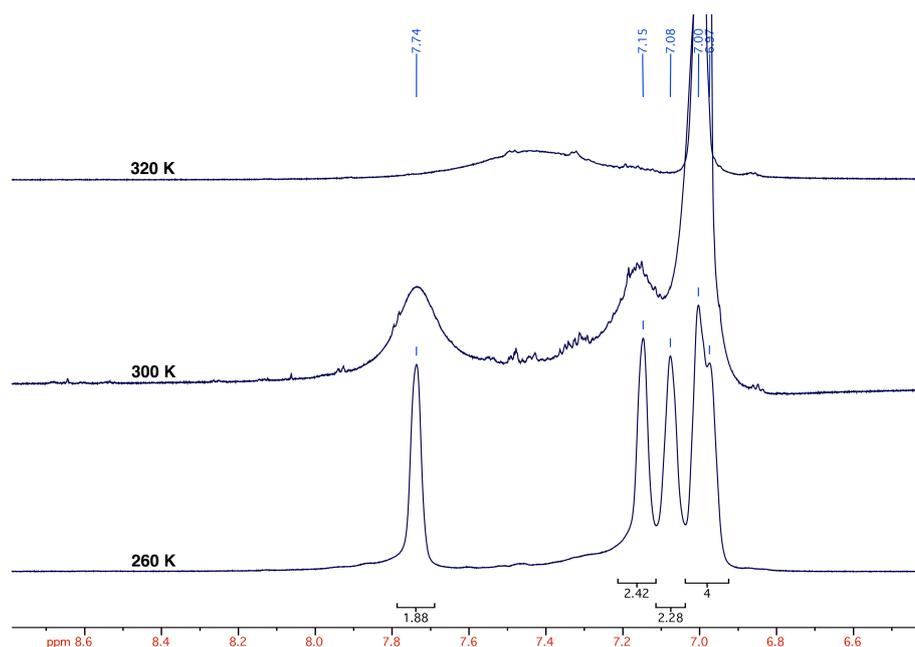


Abb. 4.19: Temperaturabhängigkeit des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von Dimer II

Bei 300 K weist das zuvor scharfe Singulett eine Schulter an der linken Flanke auf, während das breite Signal sich in zwei breite Signale bei 7.70 ppm und 7.20 ppm mit einer Integration von je zwei Protonen aufspaltet. Nach Abkühlung auf 260 K sind vier scharfe Signale zu beobachten. Dabei hat sich die Peakbreite der Signale bei 7.74 ppm und 7.15 ppm nochmals deutlich verringert. Außerdem ist ein weiteres Signal bei 7.08 ppm

mit zwei Protonen zu beobachten, während das Signal bei 7.00 ppm eine Schulter an der rechten Flanke aufweist, die zusammen in der Integration vier Protonen enthalten.

Eine eindeutige Zuordnung war mangels zweidimensionaler Spektren nicht möglich. Es ist jedoch aus der überaus starken Temperaturabhängigkeit der beiden Tieffeldsignale zu vermuten, dass diese den *ortho*-CH-Protonen des Phenylrings zuzuordnen sind, da die Breite der Signale auf eine starke zeitabhängige Änderung der chemischen Umgebung zurückzuführen ist. Dieser Umgebung sind die *ortho*-Protonen aufgrund der räumlichen Nähe zu Phosphonsäure- und Hydroxygruppe am stärksten ausgesetzt. Die bei 260 K deutlich sichtbare Aufspaltung der Protonen ist durch eine verminderte Rotation des Phenylrings um die  $C_{q,Alk}$ - $C_{q,Ar}$ -Bindungsachse zu erklären. Das tieffeldverschobenere Signal bei 7.74 ppm wäre aufgrund der existierenden  $C_2$ -Rotationsachse des Moleküls je einem *ortho*-Proton aus den Phenylringen zuzuordnen und das andere Signal dementsprechend den anderen *ortho*-Protonen. Die Existenz der  $C_2$ -Achse ist zugleich eine Erklärung für das beobachtete Singulett im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (Abb. 4.21). Als charakteristisch und ebenfalls wichtig für die Richtigkeit der vermuteten Struktur ist die Dublett-Dublett-Aufspaltung des quarternären Alkylkohlenstoffatoms im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bei 80.0 ppm anzusehen (Abb. 4.20). Sie beinhaltet die  $^1J(^{13}\text{C},^{31}\text{P})$ -Kopplung mit 148 Hz und die  $^2J(^{13}\text{C},^{31}\text{P})$ -Kopplung mit 5.7 Hz.

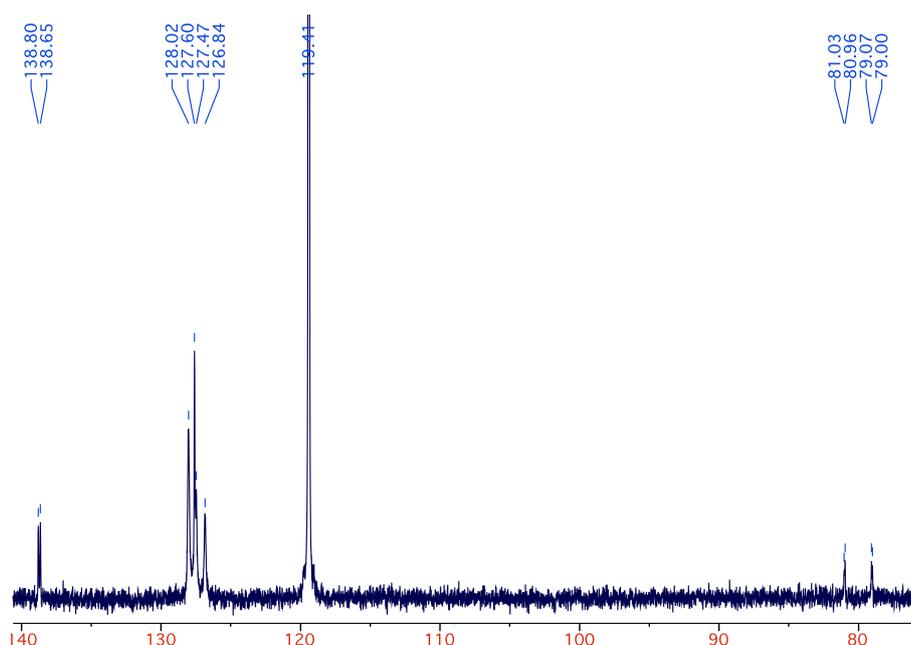
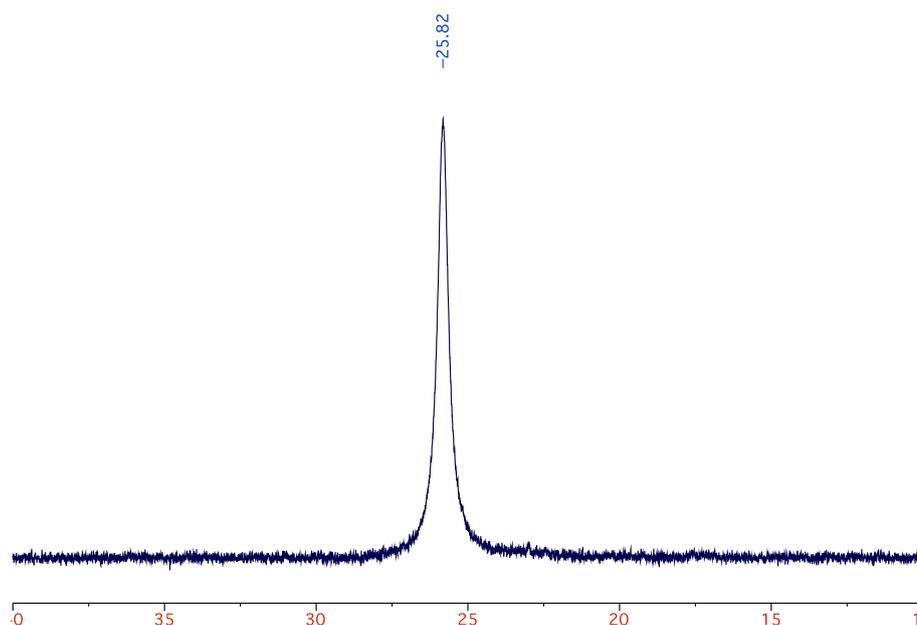


Abb. 4.20:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Dimer II bei 265 K

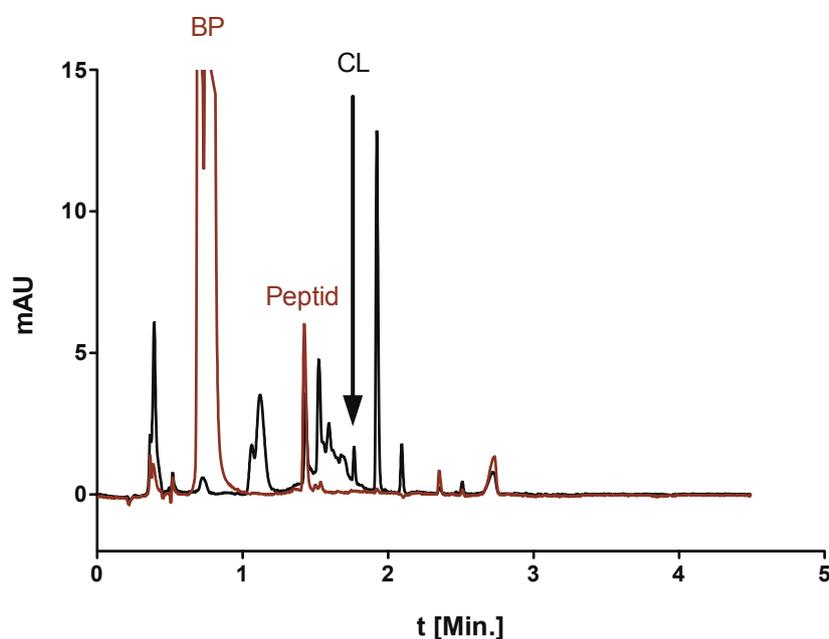
Abb. 4.21:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Dimer II bei 265 K

### 4.3.3 Nachweis der Photovernetzung von Benzoylphosphonat **11** mit Peptiden

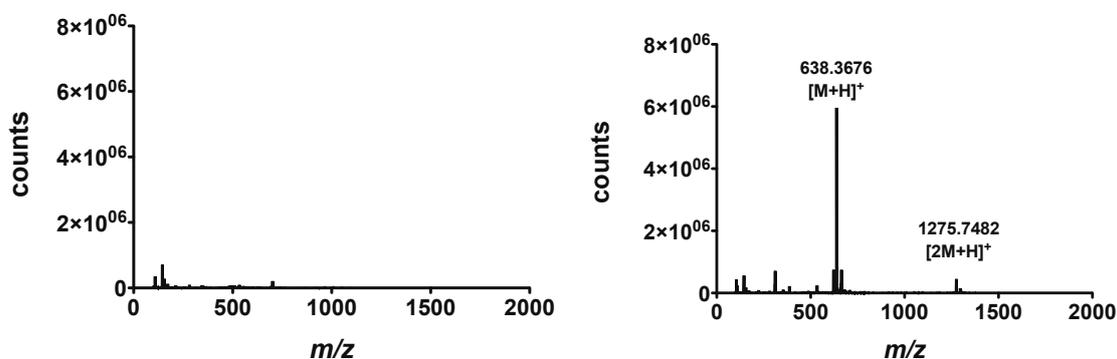
In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Benzoylphosphonat **11** bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm photodimerisiert. Der Einsatz als Photoaffinitätsmarkierung setzt jedoch voraus, dass die Photovernetzung auch mit peptidischen Strukturen möglich ist. Die fünf mittels Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese synthetisierten Peptide H-FKLAG-NH<sub>2</sub> **36-L**, H-FKIAG-NH<sub>2</sub> **36-I**, H-FKCAG-NH<sub>2</sub> **36-C**, H-FKVAG-NH<sub>2</sub> **36-V** und H-FKWAG-NH<sub>2</sub> **36-W** wurden als Modellsystem verwendet, um dies zu untersuchen. Es ist jedoch keinerlei Affinität zwischen den kurzen Peptiden **36** und Benzoylphosphonat **11** zu erwarten gewesen. Eine daraus folgende Erhöhung der lokalen Konzentration hätte eine erhöhte Reaktionswahrscheinlichkeit zur Folge. Aus diesem Grund wurden sowohl Peptide, als auch Benzoylphosphonat **11** in einer Konzentration von 10 mM in HEPES-Puffer<sup>1</sup> eingesetzt, einer für Assaybedingungen sehr hohen Konzentration. Um möglichst hohe Ausbeuten zu erhalten, wurden die Proben 24 Stunden bei 4 °C und einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt. Bereits nach vier Stunden konnte ein Photovernetzungsprodukt mit der Massendifferenz von + 104.030 mittels LC/ToF-MS nachgewiesen werden. Als Beispiel ist in Abbildung 4.22b das Chromatogramm bei 254 nm sowie das Massenspektrum des

<sup>1</sup>100 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1 % Igepal CA 630

Vernetzungsprodukts (CL) von Benzoylphosphonat (**11**, BP) und H-FKIAG-NH<sub>2</sub> **36-I** gezeigt.



(a) UV-Chromatogramme mit (schwarz) und ohne (rot) Bestrahlung

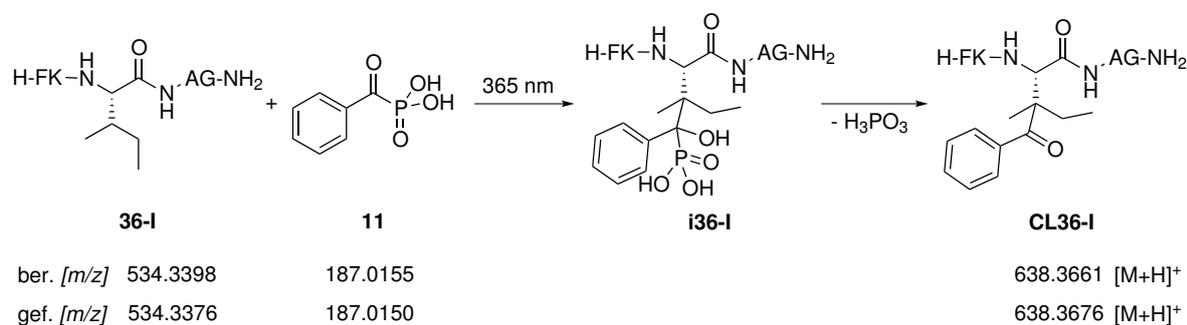


(b) Massenspektren gleicher Retentionszeiten vor (links) und nach (rechts) Bestrahlung

Abb. 4.22

Die Kontrolle zeigt, dass ohne Bestrahlung kein Vernetzungsprodukt (CL) zu sehen ist. Die Massendifferenz von +104.030 zeigt, dass allein die Benzoylgruppe übertragen wurde. Als möglicher Mechanismus ist die Eliminierung der Phosphonatgruppe aus dem intermediär gebildeten Hydroxyphosphonat **i36-I** anzunehmen (Abb. 4.23). Es ist davon auszugehen, dass wie bei der Photodimerisierung das Photoprodukt durch Rekombination zweier Radikale entsteht. Somit ist anzunehmen, dass das Photoprodukt bevorzugt an der Position gebildet wird, an der das Radikal am stabilsten ist. Im Fall

von Valin, Leucin und Isoleucin ist dies jeweils das tertiäre Kohlenstoffatom.<sup>[142]</sup>



**Abb. 4.23:** Postulierter Mechanismus der Photovernetzung am Beispiel von **36-I**

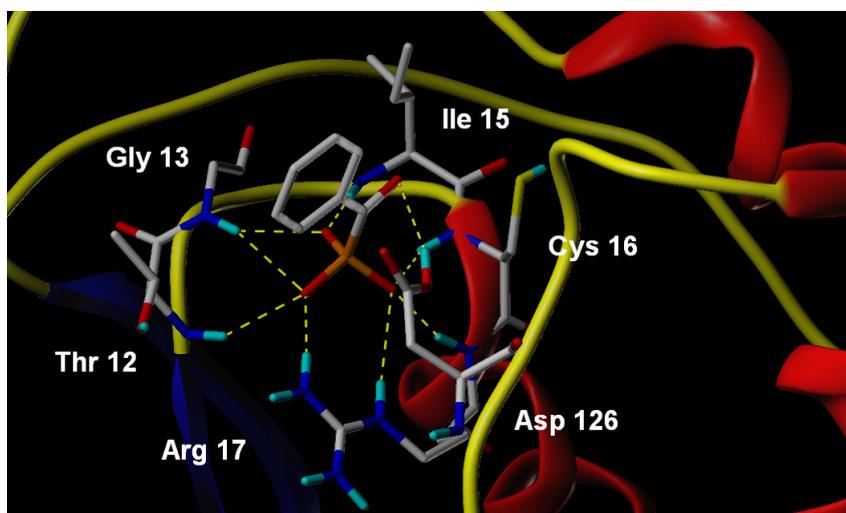
Neben diesem Addukt wurden noch viele weitere Photoprodukte gebildet. Jedes der Peptide **36** beinhaltet ein deutliches Massensignal mit der Modifikation +250.062. Ebenso waren die Modifikationen +26.017 und +42.009 zu finden. Diese Modifikationen konnten jedoch keiner Struktur zugeordnet werden, deren Bildung mechanistisch plausibel gewesen wäre. Lediglich den Modifikationen +88.031 und +106.042 könnte eine Struktur zugeordnet werden. Erstere wäre durch die Iminbildung mit Benzaldehyd, einem Nebenprodukt der Photoreaktion von Benzoylphosphonat, möglich. Zweitere wäre durch ein Hydroxybenzyladdukt, also der reduzierten Form des Benzoyladdukts **CL36-I** möglich. Beides sind jedoch nur Spekulationen, die lediglich durch die exakte Masse gestützt werden.

## 4.4 Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum

In den ersten Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Benzoylphosphonat **11** photoaktiv ist. Die Photodimerisierungsprodukte **31** wurden durch exakte Masse und NMR-Spektroskopie charakterisiert und ihre Strukturen zugeordnet. Darüber hinaus stellte der massenspektrometrische Nachweis, dass das Ketophosphonat **11** mit peptidischen Strukturen photovernetzt werden kann, einen wesentlichen Schritt in der Entwicklung eines vernetzbaren Phosphotyrosinmimetikums dar. Essenziell ist jedoch auch eine gute Affinität gegenüber PTP- und SH2-Domänen.

#### 4.4.1 Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum für Proteintyrosinphosphatasen am Beispiel von MptpA

Die Affinität des Benzoylphosphonats **11** gegenüber PTP-Domänen wurde am Beispiel von MptpA, einer niedermolekularen Proteintyrosinphosphatase aus dem *Mycobacterium tuberculosis* untersucht. Die Eignung eines Phosphotyrosinmimetikums hängt vor allem von der Ähnlichkeit bezüglich der räumlichen Orientierung von Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren im Vergleich zu Phosphotyrosin ab. Um erste Aufschlüsse über mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Ketophosphonat **11** und der PTP-Domäne zu erhalten, wurde ein Docking mit der Kristallstruktur von MptpA (PDB-Eintrag: 1U2P) erstellt.<sup>2</sup> Das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptidrückgrat des „P-Loops“ (Thr12, Gly13, Ile15, Cys16, Arg17) und den Phosphonatsauerstoffen ist gut erkennbar. Darüber hinaus ist die charakteristische Wechselwirkung zwischen der Argininseitenkette von Arg17 und einem Sauerstoff des Benzoylphosphonats **11** zu beobachten. Der Asparaginsäurerest 126, der normalerweise eine Wasserstoffbrückenbindung zum Estersauerstoff des Phosphotyrosins ausbildet und die Phenolatabgangsgruppe protoniert, bildet hier eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylfunktion des Benzoylphosphonats **11** aus. Die Dockingergebnisse weisen das Ketophosphonat **11** als sehr gutes Phosphotyrosinmimetikum aus.

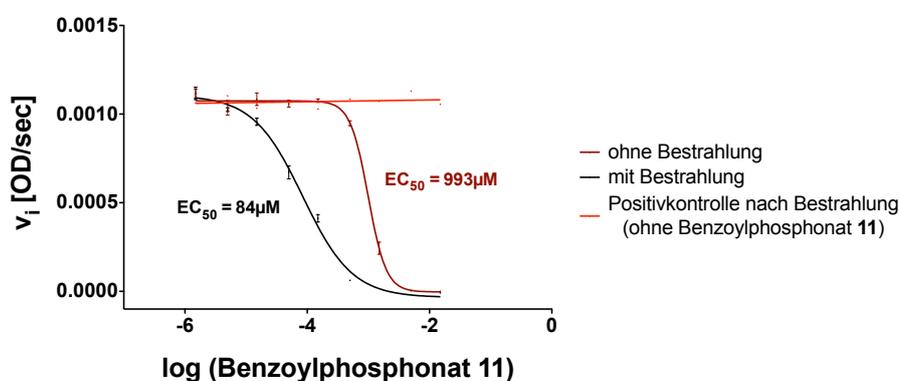


**Abb. 4.24:** Wechselwirkungen des Benzoylphosphonats **11** mit der katalytischen Domäne von MptpA. Das Docking wurde mit Sybyl basierend auf der Kristallstruktur von MptpA (PDB-Eintrag: 1U2P) durchgeführt.

Die Affinitätsmessungen wurden mit einem Inhibitionsassay unter Verwendung des Substrats *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) durchgeführt. Der Umsatz von pNPP zu

<sup>2</sup>durchgeführt von Dr. Michael Lisurek, AG G. Krause (FMP)

*para*-Nitrophenol wurde photometrisch detektiert. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des Ketophosphonats **11** ergab einen  $K_i$ -Wert von  $186 \mu\text{M}$  ( $EC_{50} = 993 \mu\text{M}$ )<sup>3</sup>. Es konnte somit gezeigt werden, dass dieses kleine Molekül bereits eine sehr gute Affinität zur PTP-Domäne von MptpA besitzt. Die zusätzliche Bestrahlung bei 365 nm sollte eine Erhöhung der Inhibition zur Folge haben, da wie bereits an Peptiden gezeigt, die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Mimetikum und PTP zu erwarten war. In der Tat zeigte sich bereits nach einer Bestrahlungszeit von 45 Minuten eine mehr als zehnfache Absenkung des  $EC_{50}$ -Werts auf  $84 \mu\text{M}$  (Abb. 4.25). Eine direkte Deaktivierung des Enzyms durch Bestrahlung bei 365 nm kann ausgeschlossen werden, da der Vergleich mit der Positivkontrolle mit Bestrahlung aber ohne Benzoylphosphonat **11** keine Reduktion der Aktivität des Enzyms aufweist.

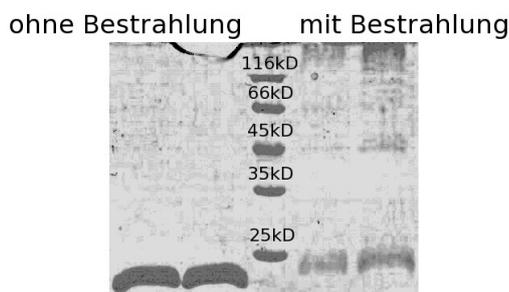


**Abb. 4.25:** Bestimmung des  $EC_{50}$ -Werts von Benzoylphosphonat **11** gegen MptpA mit und ohne UV-Bestrahlung

Der Einfluß der Bestrahlung von MptpA in Gegenwart des Ketophosphonats **11** sollte darüber hinaus mittels SDS-PAGE untersucht werden. Die Coomassie-Färbung zeigte zum einen, dass die Bestrahlung in Anwesenheit des Benzoylphosphonats **11** eine Verringerung der Intensität der niedermolekularen Bande zur Folge hatte (Abb. 4.26). Das zusätzliche Auftreten von höhermolekularen Proteinbanden bei ca. 45 kD und über 116 kD könnten die Folge von radikalischen Oligomerisierungen sein. Das in hohen Konzentrationen von 5 mM eingesetzte Benzoylphosphonat **11** könnte nach Bestrahlung als Radikalstarter und -überträger fungieren. Dennoch ist bei Vergleich der niedermolekularen Proteinbanden eine leichte Erhöhung der Masse nach Bestrahlung mit dem Benzoylphosphonat **11** zu beobachten. Dies könnte die Folge von unspezifischer und mehrfacher Photovernetzung sein. Eine definierte Photoreaktion war jedoch von Beginn

<sup>3</sup>berechnet mit der Cheng-Prusoff-Gleichung<sup>[143]</sup>:  $K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$ , mit [S] als Substratkonzentration (10 mM pNPP) und der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  (2.3 mM)

an nur bei einer höheren Affinität des photoaktiven Liganden zu erwarten.



**Abb. 4.26:** Vergleich der MptpA-Proteinbanden mit und ohne Bestrahlung in Gegenwart von Benzoylphosphonat **11** (Coomassie-Färbung)

## 4.4.2 Das Benzoylphosphonat als Phosphotyrosinmimetikum für SH2-Domänen am Beispiel von STAT5b

Nachdem eine gute Affinität des Benzoylphosphonats gegenüber der PTP-Domäne von MptpA nachgewiesen werden konnte, sollte es nun an STAT5b getestet werden, um die Eignung als Phosphotyrosinmimetikum an SH2-Domänen zu untersuchen. Die Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen wird dabei mit Hilfe eines Fluoreszenz-polarisationsassays durchgeführt.

### 4.4.2.1 Grundlagen des Fluoreszenzpolarisationsassays

Das Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsassays beruht auf der Tatsache, dass ein Fluorophor nach Anregung mit polarisiertem Licht auch wieder polarisiertes Licht emittiert. Da die einzelnen Fluorophore in Lösung jedoch frei rotieren können, kommt es in der Summe zu einer Abnahme der Polarisation. Die Fluoreszenzpolarisation  $P$  ist dabei von verschiedenen Größen abhängig und wurde 1926 von Francis Perrin durch folgende Gleichung beschrieben:<sup>[144]</sup>

$$P = \frac{P_0}{1 + (1 - \frac{1}{3}P_0)\frac{\tau}{\theta}} \quad (4.2)$$

mit  $P_0$  als intrinsischer Fluoreszenzpolarisation und der Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$ .  $\theta$  wird als Rotationskorrelationszeit des Fluorophors bezeichnet und beschreibt die Zeit, in der das Fluorophor um ein Bogenmaß rotiert. Sie ist proportional zur Viskosität  $\eta$  der Lösung und zum Volumen  $V$  des rotierenden (Fluorophor-)Moleküls, verhält sich

jedoch umgekehrt proportional zur Temperatur  $T$ .  $R$  stellt die Rydberg-Konstante dar:

$$\theta = \frac{\eta \cdot V}{R \cdot T} \quad (4.3)$$

Bei gleicher Temperatur und Viskosität der Lösung ist die Fluoreszenzpolarisation somit nur noch von dem Volumen des fluoreszierenden Komplexes abhängig, wenn vorausgesetzt werden kann, dass sich die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  nicht ändert. Kleine Fluorophore rotieren im Bereich von ca. 40 ps. Das ist bedeutend schneller als übliche Fluoreszenzlebenszeiten von 10 ns. Dadurch kommt es bei kleinen Fluorophoren in Summe zu einer Depolarisation. Die Bindung eines Fluorophors oder eines fluoreszenzmarkierten Liganden an ein Makromolekül führt zu einer Erhöhung des Volumens. Der Komplex rotiert wesentlich langsamer, was zu einer Rotationskorrelationszeit im Bereich der Fluoreszenzlebenszeit führt und damit zu einer hohen Fluoreszenzpolarisation.<sup>[145]</sup>

Gemessen wird die Fluoreszenzintensität parallel ( $I_p$ ) und senkrecht ( $I_s$ ) zum elektrischen Vektor des planar polarisierten Lichts. Definitionsgemäß unterscheidet man zwischen Fluoreszenzpolarisation (P) und Anisotropie (A):<sup>[146]</sup>

$$P = \frac{I_s - I_p}{I_s + I_p} \quad (4.4)$$

$$A = \frac{I_s - I_p}{I_s + 2 \cdot I_p} \quad (4.5)$$

Beide Größen enthalten jedoch im Prinzip die gleiche Information.

Bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen kann der Anteil des an ein Protein gebundenen, fluoreszenten Liganden durch Messung der Fluoreszenzpolarisation bestimmt werden (Abb. 4.27). In Abwesenheit eines Bindungspartners wie z. B. eines Proteins (blauer Kreis) ist die Fluoreszenzpolarisation niedrig, da das Fluorophor (gelber Stern) bzw. der fluoreszente Ligand (rotes Dreieck) zwischen Anregung und Emission stark rotieren kann (A; Abb. 4.27). Bei steigendem Zusatz des Proteins steigt auch die Fluoreszenzpolarisation, da je nach Affinität des Liganden zum Protein ein immer größerer Teil des fluoreszenten Liganden gebunden wird. Sind 50% des Fluorophors an ein Protein gebunden, ist der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve erreicht. Dies ist der  $K_d$ -Wert von Protein und Ligand (B; Abb. 4.27). Bei weiterem Zusatz von Protein wird der Ligand nach und nach gesättigt bis jedes Ligandmolekül durch ein Protein gebunden ist (C; Abb. 4.27). Bei der Wahl der Konzentration des eingesetzten, fluoreszenten Liganden muss beachtet werden, dass diese nicht viel größer sein darf

als  $2 K_d$ . Dies hätte eine stöchiometrische Titration des Fluoreszenzliganden zur Folge, wodurch eine genaue Bestimmung des  $K_d$ -Wertes nicht mehr möglich ist.

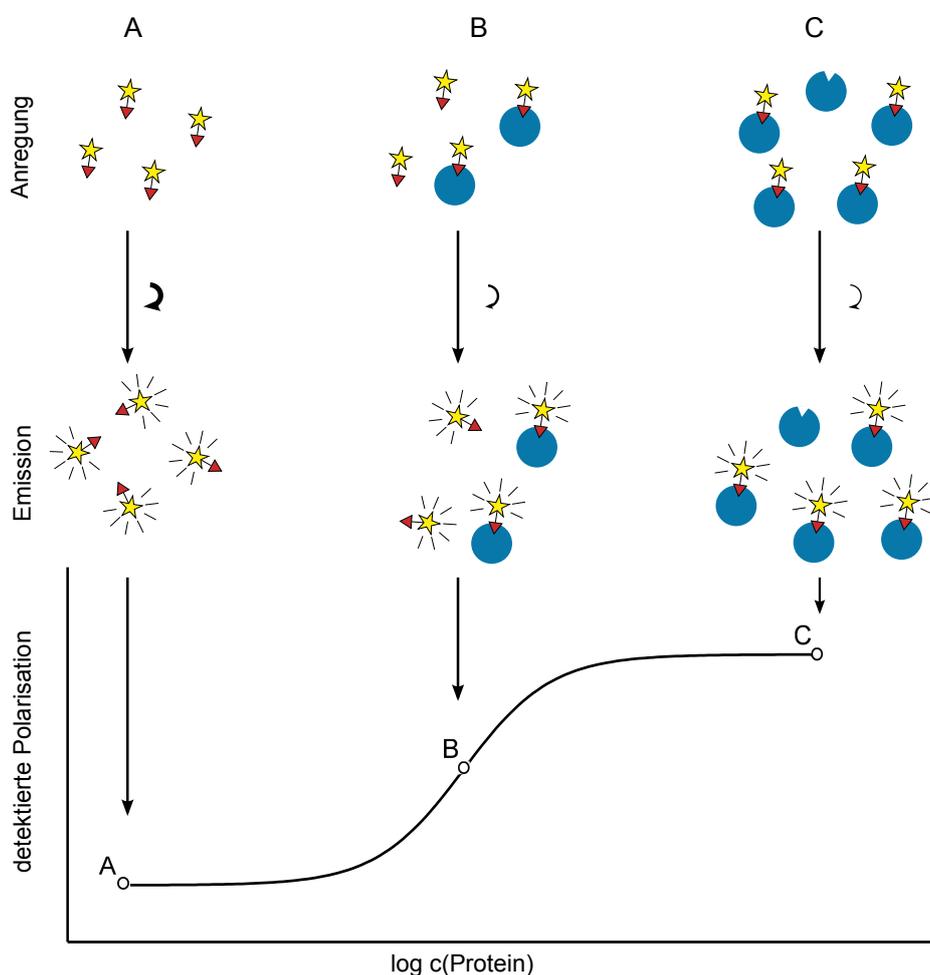


Abb. 4.27: Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsassays

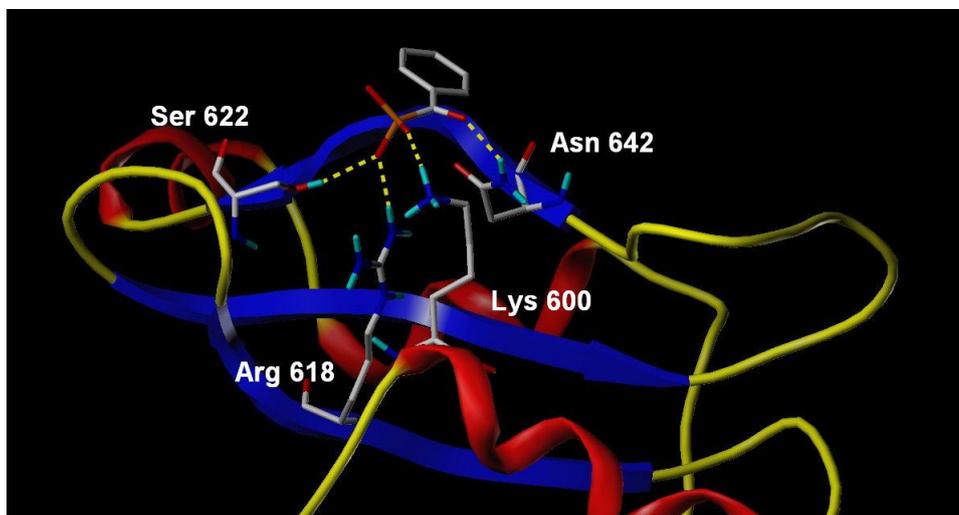
#### 4.4.2.2 Untersuchungen der Affinität des Benzoylphosphonats 11 zu STAT5b

Die Affinitätsbestimmungen der getesteten Benzoylphosphonate wurden mit Hilfe von Verdrängungsassays basierend auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen durchgeführt. Die Fluoreszenzsonde FAM-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **37** ( $K_d = 42 \text{ nM}$ ) wurde dabei in einer Konzentration von  $10 \text{ nM}$  eingesetzt. STAT5b wurde als rekombinantes Protein mit MBP (Maltose Binding Protein) in einer Konzentration von  $65 \text{ nM}$  verwendet. Durch Zusatz steigender Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz wird diese, eine gewisse Affinität vorausgesetzt, die Fluoreszenzsonde von der Bindungsstelle verdrängen. Der damit verbundene Abfall der Fluoreszenzpolarisierung wird registriert. Der aus der sigmoidalen Kurve bestimmte  $EC_{50}$ -Wert wurde mittels einer Gleichung von *Nikolovska-Coleska et al.* in einen  $K_i$ -Wert umgerechnet:<sup>[147,148]</sup>

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[S]_{50}}{K_d} + \frac{[P]_0}{K_d} + 1\right)} \quad (4.6)$$

Dabei sind  $[I]_{50}$  die Konzentration des freien Inhibitors bei 50 % Inhibition,  $[S]_{50}$  die Konzentration der freien, fluoreszenzmarkierten Sonde bei 50 % Inhibition,  $[P]_0$  die Konzentration des freien Proteins bei 0 % Inhibition und  $K_d$  die Dissoziationskonstante des Protein-Sonden-Komplexes.

Die durchgeführten Messungen zeigten mit einem  $K_i$ -Wert von  $326 \mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50} = 840 \mu\text{M}$ ) eine gute Affinität des Benzoylphosphonats **11** zu STAT5b. Mit Hilfe eines Docking-Experiments sollten mögliche Wechselwirkungen mit der SH2-Domäne von STAT5b untersucht werden (Abb. 4.28).<sup>4</sup> Das Docking zeigt Wasserstoffbrückenbindungen der Phosphonatsauerstoffe zu Lys600 und Ser622. Wesentlich wichtiger ist jedoch die Wechselwirkung mit Arg618, einem hoch konservierten Argininrest in SH2-Domänen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch der Carbonylsauerstoff zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit Asn642 in der Lage ist. Die räumliche Orientierung der Wasserstoffakzeptoren des Benzoylphosphonats **11** bietet demnach sehr gute Voraussetzungen für eine gute Affinität zu STAT5b, was durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen bestätigt werden konnte.



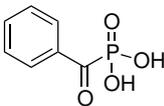
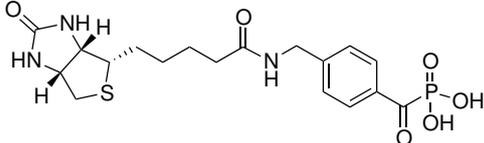
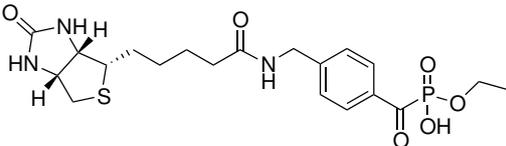
**Abb. 4.28:** Wechselwirkungen des Benzoylphosphonats **11** mit der SH2-Domäne von STAT5b. Das Docking wurde mit Sybyl durchgeführt. Die Struktur von STAT5b wurde basierend auf der Kristallstruktur von STAT5a (PDB-Eintrag: 1Y1U) modelliert.

Neben dem Benzoylphosphonat **11** wurden auch das Biotin-markierte Benzoylphosphonat **13** und das Monoethylesterderivat **30** getestet. Die Einführung des Biotinrestes

<sup>4</sup>durchgeführt von Dr. Michael Lisurek, AG G. Krause (FMP)

fürte, verglichen mit dem Ketophosphonat **11**, zu einer Steigerung der Affinität. Die Messung ergab einen  $K_i$ -Wert von  $198\ \mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50} = 509\ \mu\text{M}$ ). Der Ethylester **30** zeigte mit einem  $K_i$ -Wert von  $> 1000\ \mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50} > 3000\ \mu\text{M}$ ) eine deutlich geringere Affinität (Tab. 4.1). Dies ist in der Blockade einer der Säurefunktionen begründet, die zum Verlust einer oder sogar mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen führt.

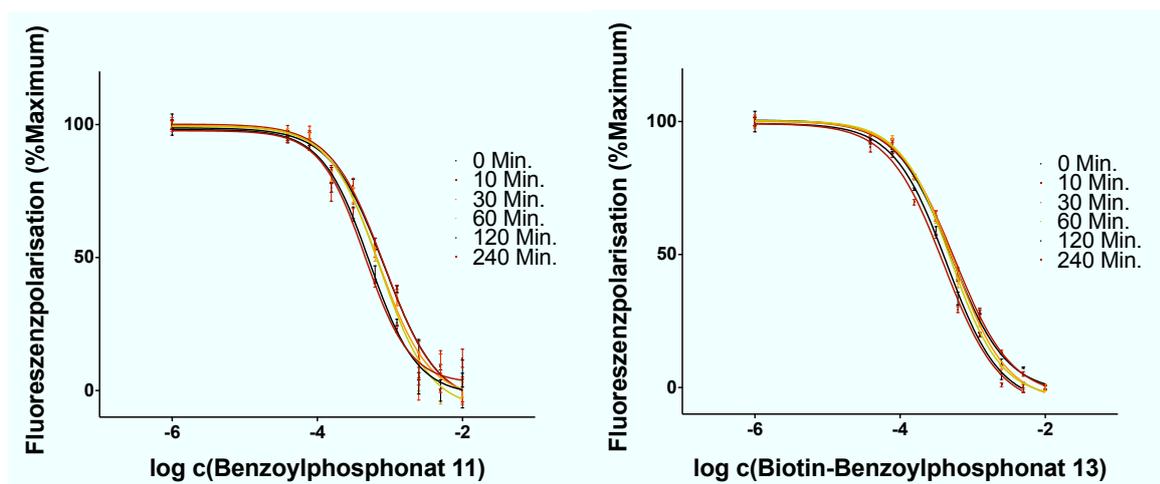
**Tab. 4.1:** Vergleich der Affinitäten der getesteten Benzoylphosphonatderivate gegenüber STAT5b

Nr.	Verbindung	$\text{EC}_{50}$	$K_i^a$
<b>11</b>		$840\ \mu\text{M}$	$326\ \mu\text{M}$
<b>13</b>		$509\ \mu\text{M}$	$198\ \mu\text{M}$
<b>30</b>		$> 3000\ \mu\text{M}$	$> 1000\ \mu\text{M}$

<sup>a</sup>berechnet aus Gleichung 4.6<sup>[147]</sup>

In weiteren Experimenten sollte der Einfluß von UV-Bestrahlung bei 365 nm auf die  $\text{EC}_{50}$ -Werte untersucht werden. Die Messungen wurden in einer schwarzen 384-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden nach Bestrahlungszeiten von 0, 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten durchgeführt. Die Bestrahlung des Benzoylphosphonats **11** und des Biotin-markierten Derivats **13** hatte eine deutliche Erhöhung der gemessenen Affinität zur Folge (Abb. 4.29, Tab. 4.2). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert des Biotinderivats **13** sank von  $509\ \mu\text{M}$  um ca. 20 % auf  $404\ \mu\text{M}$ , der des Benzoylphosphonats **11** sogar um 46 % von  $840\ \mu\text{M}$  auf  $457\ \mu\text{M}$ .<sup>5</sup> Dies kann durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu STAT5b erklärt werden, wie es bereits durch die Photovernetzung mit Peptiden gezeigt wurde.

<sup>5</sup>Die Vergleiche erfolgen anhand der  $\text{EC}_{50}$ -Werte, da  $K_i$ -Werte nur für einen reversiblen Bindungsmechanismus definiert sind.



**Abb. 4.29:** Einfluß UV-Bestrahlung auf die  $EC_{50}$ -Werte von Benzoylphosphonat **11** (links) und *N*-Biotin-4(aminomethyl)-benzoylphosphonat **13** (rechts)

**Tab. 4.2:**  $EC_{50}$ -Werte von Benzoylphosphonat **11** und *N*-Biotin-4(aminomethyl)-benzoylphosphonat **13** nach 0, 10, 30, 60, 120, und 240 Minuten Bestrahlung bei 365 nm

Nr.	Verbindung	0 Min.	10 Min.	30 Min.	60 Min.	120 Min.	240 Min.
<b>11</b>	Benzoylphosphonat	840 $\mu$ M	826 $\mu$ M	695 $\mu$ M	728 $\mu$ M	526 $\mu$ M	457 $\mu$ M
<b>13</b>	<i>N</i> -Biotin-4(aminomethyl)-benzoylphosphonat	509 $\mu$ M	561 $\mu$ M	545 $\mu$ M	497 $\mu$ M	440 $\mu$ M	404 $\mu$ M

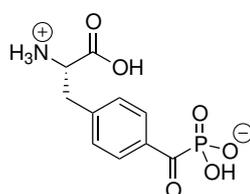
#### 4.4.3 Benzoylphosphonate als Bestandteil peptidischer Photoaffinitätssonden

Zu Beginn konnte zunächst gezeigt werden, dass Benzoylphosphonat **11** bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 365 nm photodimerisiert. Ebenso gelang es, den massenspektrometrischen Nachweis zu erbringen, dass das Ketophosphonat **11** in einem Modellsystem mit Peptiden photovernetzt werden kann. Erstmalige Untersuchungen zeigten darüber hinaus eine überaus gute Affinität zu der Proteintyrosinphosphatase MtpA und dem SH2-Domäne-enthaltenden Protein STAT5b. Des Weiteren konnte durch Bestrahlung eine deutliche Steigerung der gemessenen Affinität verzeichnet werden, die durch die Photovernetzung des Benzoylphosphonats **11** mit dem Zielprotein erklärt werden kann. Nun sollte durch den Einbau des Benzoylphosphonats in ein Peptid eine Photoaffinitätssonde (PAL-Sonde) entwickelt werden, die eine hochselektive

Markierung des Zielproteins ermöglicht. Der Fokus der Untersuchungen wurde dabei auf STAT5b gelegt.

#### 4.4.3.1 Bestimmung der $K_d$ - bzw. $K_i$ -Werte der Photoaffinitätssonden gegenüber STAT5b

Der Einbau einer Benzoylphosphonatgruppe in ein Peptid machte zunächst die Synthese eines Phenylalaninoylphosphonatbausteins **38** (Pap, kY, Abb. 4.30) notwendig.<sup>6</sup>



**38**

**Abb. 4.30:** Phenylalaninoylphosphonatbaustein **38**

Als Peptidsequenz wurden die Aminosäuren 882-888 der  $\beta$ -Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), YLSLPPW, gewählt. Durch die N-terminale Markierung des Peptids mit Fluorescein sollte die direkte Messung der Affinität in einem Fluoreszenzpolarisationsassay ermöglicht werden. Darüber hinaus sollte sie die Detektion in späteren Photovernetzungsexperimenten erleichtern. Die fluoreszenzmarkierten Sonden wurden dabei in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt und die Fluoreszenzpolarisation nach einstündiger Inkubationszeit bei 28 °C gemessen. Das Benzoylphosphonat-enthaltende Peptid FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** ist ein hochaffiner Ligand ( $K_d = 0.90 \mu\text{M}$ ), wenngleich es auch nicht ganz so aktiv wie das Phosphotyrosin-Peptid FAM-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **37** ( $K_d = 0.042 \mu\text{M}$ ) ist (Abb. 4.31).

Für spätere Pulldown-Assays wurde die Sondensequenz um ein N-terminales Lysin erweitert, so dass Biotin an der Seitenkette eingeführt werden konnte. Diese Sonde FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** besaß mit einem  $K_d$ -Wert von  $5.3 \mu\text{M}$  ebenfalls eine hohe Affinität gegenüber dem STAT5b-Konstrukt, wenngleich die Einführung des Biotin-markierten Lysinbausteins eine leichte Verringerung der Affinität zur Folge hatte.

<sup>6</sup>Masterarbeit: Stefan Wagner (AG Rademann)

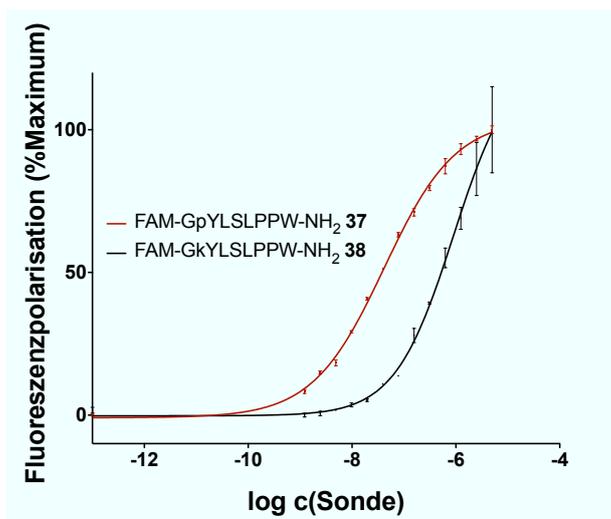
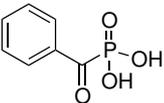
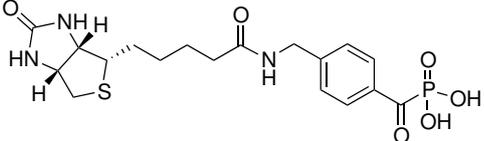
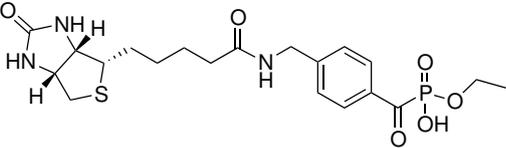


Abb. 4.31: Vergleich der  $K_d$ -Werte von FAM-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **37** und FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38**

Die PAL-Sonden ohne Fluorophor Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** und Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41** wurden in einem Verdrängungsassay auf ihre Affinität zu STAT5b untersucht. Auch hier wies die Sonde mit dem Phosphotyrosinmimetikum **41** mit einem  $K_i$ -Wert von 11  $\mu$ M ( $EC_{50} = 28 \mu$ M) eine gute Affinität zur SH2-Domäne von STAT5b auf, wenngleich auch in diesem Fall die Phosphotyrosin-enthaltende Sonde **40** mit einem  $K_i$ -Wert von 0.604  $\mu$ M ( $EC_{50} = 1.6 \mu$ M) eine etwas bessere Affinität aufwies. Die ermittelten  $K_d$ -Werte aus Abschnitt 4.4.2.2, sowie  $EC_{50}$ -Werte und die daraus berechneten  $K_i$ -Werte sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Ähnliche Studien mit STAT3 durch *Dourlat et al.* zeigen, dass der Unterschied zwischen Phosphotyrosin und verschiedenen Mimetika durchaus vergleichbar mit dem des Benzoylphosphonats ist. So band das beste Mimetikum in der erwähnten Studie, O-Malonyltyrosin **pep-2d**, um den Faktor 12 und Pmp **pep-2a** um den Faktor 15 schlechter an STAT3 als das Phosphat.<sup>[149]</sup> Untersuchungen der Bindung von Peptiden mit Phosphotyrosinmimetika an die shc-PTB-Domäne und die IRS-1-PTB-Domäne durch *Giorgetti-Peraldi et al.* zeigten, dass Pmp **pep-2a** fünfundzwanzigmal geringer an die shc-PTB-Domäne band, als F<sub>2</sub>Pmp **pep-2c**, dessen Affinität genauso gut war wie die des Phosphopeptids. Hingegen war die Affinität von **pep-2c** gegenüber der IRS-1-PTB-Domäne sechzigmal geringer als die des Phosphopeptids.<sup>[150]</sup> Es lässt sich daraus also auch ableiten, dass die Eignung eines Mimetikums von Protein zu Protein unterschiedlich sein kann.

**Tab. 4.3:** Übersicht der  $K_d$ -,  $EC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte

Nr.	Verbindung	$K_d$	$EC_{50}$	$K_i^a$
<b>11</b>			840 $\mu$ M	326 $\mu$ M
<b>13</b>			509 $\mu$ M	198 $\mu$ M
<b>30</b>			> 3000 $\mu$ M	> 1000 $\mu$ M
<b>37</b>	FAM-GpYLSLPPW-NH <sub>2</sub>	0.042 $\mu$ M		
<b>38</b>	FAM-GkYLSLPPW-NH <sub>2</sub>	0.896 $\mu$ M		
<b>39</b>	FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH <sub>2</sub>	5.3 $\mu$ M		
<b>40</b>	Ac-GpYLSLPPW-NH <sub>2</sub>		1.6 $\mu$ M	0.604 $\mu$ M
<b>41</b>	Ac-GkYLSLPPW-NH <sub>2</sub>		28 $\mu$ M	11 $\mu$ M

<sup>a</sup>berechnet aus Gleichung 4.6 auf Seite 54<sup>[147]</sup>

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch den Einbau des Benzoylphosphonats nochmals eine deutliche Affinitätssteigerung von 326  $\mu$ M für das Benzoylphosphonat **11** auf 0.896  $\mu$ M für die Fluoreszenz-markierte Sonde **38** erzielt wurde. Das entspricht einer Absenkung der Bindungskonstante von mehr als 99%! In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, wie groß der Einfluß der UV-Bestrahlung der PAL-Sonden auf die gemessene Affinität ist. Dabei zeigte sich wiederum eine deutliche Steigerung der gemessenen Affinität. Im Falle der acetylierten Sonde **41** wurde eine Absenkung der gemessenen Affinität um mehr als 50% von 28  $\mu$ M auf 13  $\mu$ M verzeichnet (Abb. 4.32, Tab. 4.4). Die Phosphotyrosin-enthaltende Sonde **40** zeigte hingegen keine zeit- oder bestrahlungsabhängige Veränderung der Affinität (Abb. 4.32). Somit ist sichergestellt, dass die Affinitätssteigerung durch Bestrahlung allein auf das Benzoylphosphonat zurückzuführen ist.

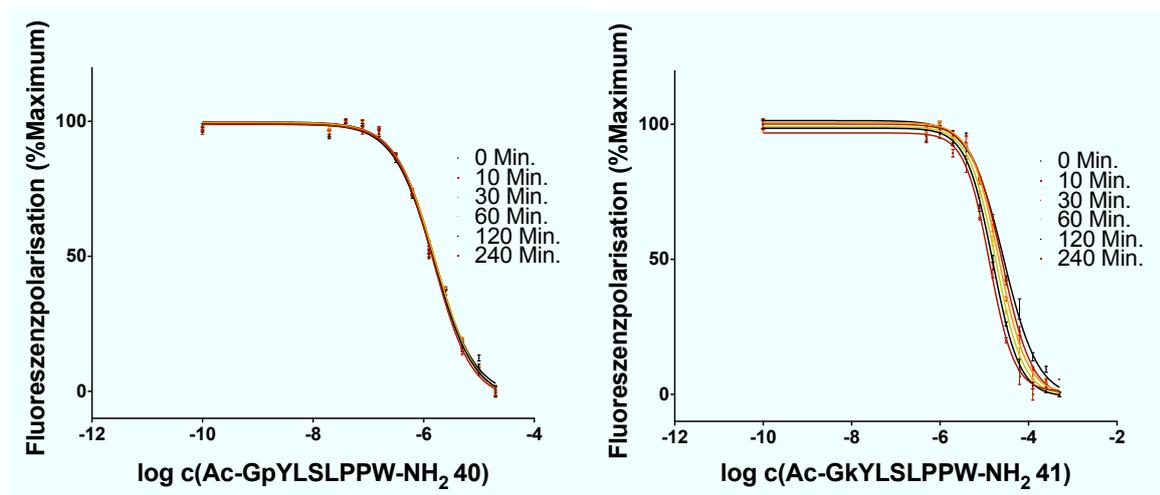


Abb. 4.32: Einfluß UV-Bestrahlung auf die  $EC_{50}$ -Werte von Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** (links) und Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41** (rechts)

Tab. 4.4:  $EC_{50}$ -Werte von Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** und Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41** nach 0, 10, 30, 60, 120, und 240 Minuten Bestrahlung bei 365 nm

Nr.	Verbindung	0 Min.	10 Min.	30 Min.	60 Min.	120 Min.	240 Min.
40	Ac-GpYLSLPPW-NH <sub>2</sub>	1.6 $\mu$ M	1.6 $\mu$ M	1.7 $\mu$ M	1.6 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M
41	Ac-GkYLSLPPW-NH <sub>2</sub>	28 $\mu$ M	25 $\mu$ M	21 $\mu$ M	18 $\mu$ M	16 $\mu$ M	13 $\mu$ M

## 4.5 Experimente zur Photovernetzung von Benzoylphosphonatsonden mit STAT5b

Bisher konnte gezeigt werden, dass Benzoylphosphonate Phosphotyrosinmimetika mit sehr hoher Affinität zu PTP- und SH2-Domänen sind. Als Bestandteil von Peptiden wie FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** stellen sie hochaffine Liganden dar, deren Affinität durch Bestrahlung deutlich gesteigert werden kann. Im Folgenden sollte daher der Nachweis erbracht werden, dass diese Peptide als PAL-Sonden kovalent an STAT5b binden. Darüber hinaus standen unter anderem die Optimierung der Photovernetzung und die Untersuchung ihrer Spezifität im Mittelpunkt.

### 4.5.1 Untersuchungen zur Photostabilität der Photoaffinitätssonden

Zunächst sollte jedoch untersucht werden, ob der Einbau eines Benzoylphosphonats in eine Peptidstruktur eine Verringerung der Photostabilität zur Folge hat. Bei der lichtinduzierten Biradikalbildung könnte es zu intramolekularen Radikalreaktionen kommen, die eine Reduktion der Photovernetzungseffizienz zur Folge hätten.

Die Verbindungen FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38**, Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41**, Benzoylphosphonat **11**, *N*-Biotin-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **13** und dessen Monoethylester **30** wurden mit einer Konzentration von 200 µM in HEPES-Puffer (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1 % Igepal CA 630) gelöst und je sechsmal in schwarze 384-Well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden pipettiert. So konnten nach 0, 10, 30, 60, 120, und 240 Minuten jeweils Proben für die Messungen mittels LC/ToF-MS genommen werden. Der Grad der Zersetzung wurde anhand der Peakflächen des UV-Chromatogramms bestimmt. Die Daten wurden normiert, da Verbindungen mit einer höheren Ausgangsabsorption bei gleicher Zersetzungsrate eine höhere Abnahme der Absorption aufweisen würden.

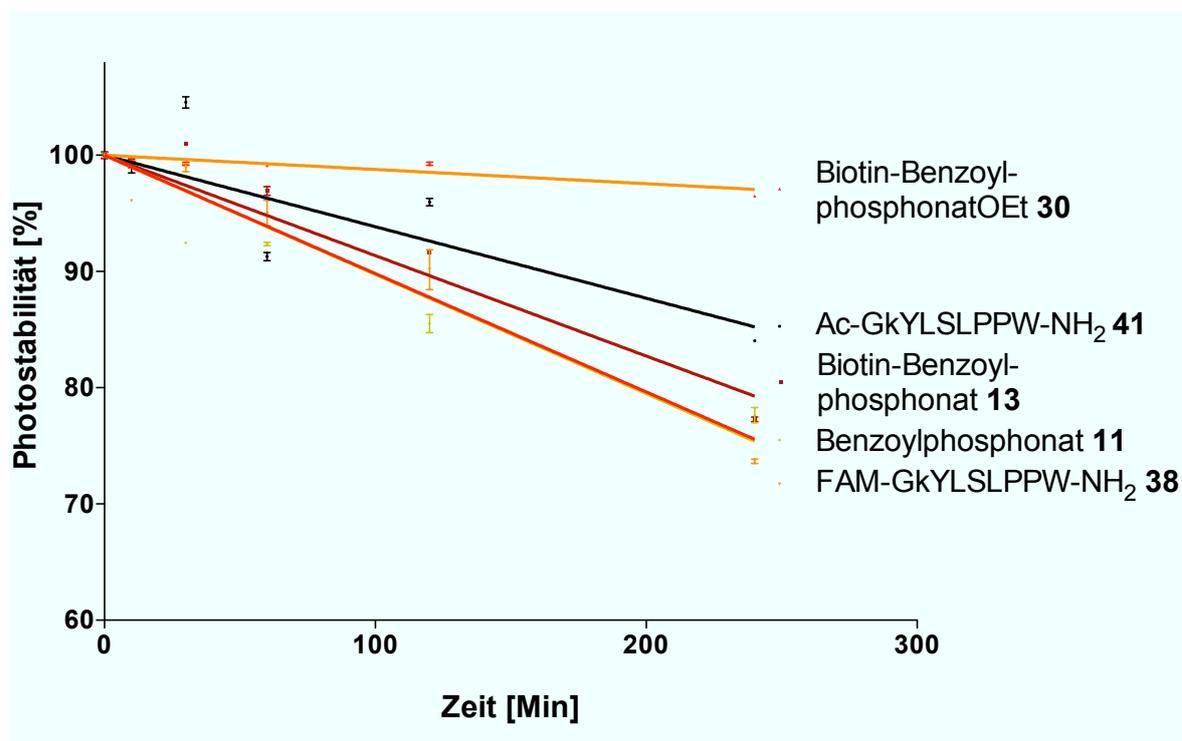


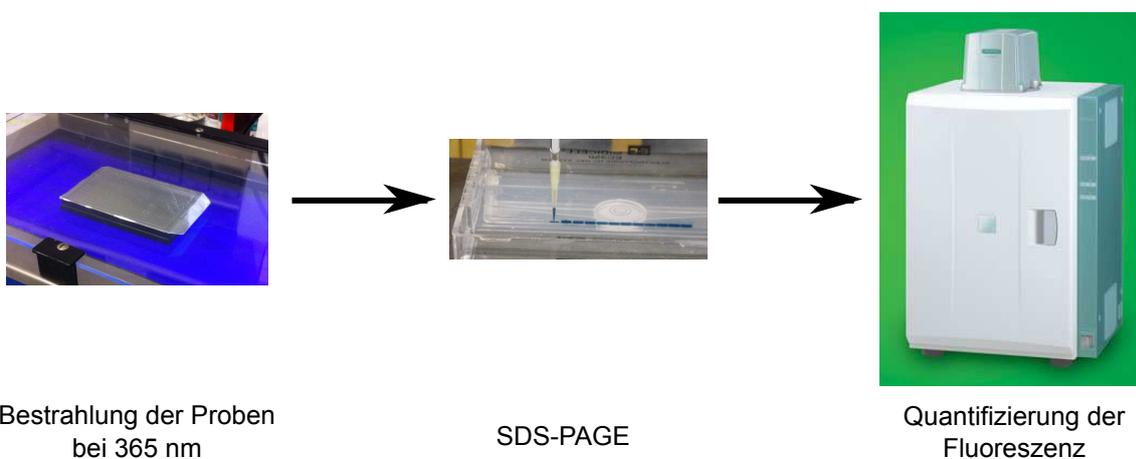
Abb. 4.33: Photostabilitätsuntersuchungen mittels HPLC

Es ist deutlich zu sehen, dass der biotinylierte Benzoylphosphonatmonoethylester **30**

unter Assaybedingungen nahezu photostabil war. Die höchsten Abbauraten wiesen Benzoylphosphonat **11** und das Fluoreszenz-markierte Peptid **38** auf. Nach vier Stunden waren jedoch noch immer ca. 75 % der Verbindungen intakt. Die dritthöchste Abbaurate wies das Biotin-markierte Benzoylphosphonat **13** auf, wovon nach vier Stunden noch ca. 80 % vorhanden waren. Vom acetylierten Peptid **41** waren hingegen noch 85 % intakt. Allgemein ist jedoch festzustellen, dass alle getesteten Verbindungen ohne Anwesenheit eines Reaktionspartners eine relativ hohe Photostabilität aufwiesen. Ein tendenzieller Unterschied zwischen den peptidischen Sonden **38** und **41** und den Benzoylphosphonaten **11** und **13** war nicht festzustellen.

### 4.5.2 Experimente zur Photovernetzung von Benzoylphosphonatsonden mit STAT5b

Die Experimente zur Photoaffinitätsmarkierung von STAT5b wurden in schwarzen 384-Well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gemische aus Protein und fluoreszenzmarkierter PAL-Sonde bei 4 °C auf einem Transilluminator bei 365 nm bestrahlt. Danach wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Quantifizierung der Photovernetzung erfolgte über Fluoreszenzmessungen der Proteinbanden auf dem Gel (Abb. 4.34). Anschließend wurden die Gele einer Coomassie-Färbung unterzogen, um auch Proteine sichtbar zu machen, die keine Fluoreszenzmarkierung aufwiesen.

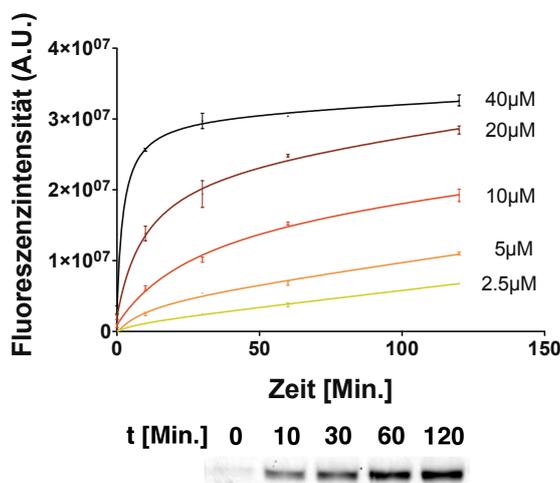


**Abb. 4.34:** Arbeitsschema der Durchführung von Experimenten zur Photoaffinitätsmarkierung von STAT5b

### 4.5.2.1 Zeitabhängigkeit der Photovernetzung

Zur Untersuchung bzw. Optimierung der Photovernetzung von Benzoylphosphonat-beinhaltenden Peptidsonden wurden zunächst Experimente zur Zeitabhängigkeit durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen 2.5, 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  der Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit 250 nM MBP-STAT5b inkubiert. Jede der Sonden-Protein-Kombinationen wurde in zehnfacher Ausführung pipettiert, sodass nach 0, 10, 30, 60 und 120 Minuten die Vertiefungen zum Schutz vor weiterem Lichteinfall von unten mit Aluminiumfolie versiegelt wurden. Jedes Experiment wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Anfangssteigungen der Photovernetzung umso höher sind, je größer die eingesetzten Sondenkonzentrationen sind (Abb. 4.35). Im Fall der niedrigsten eingesetzten Sondenkonzentration, 2.5  $\mu\text{M}$ , ist über die gesamten zwei Stunden ein nahezu linearer Verlauf zu beobachten, während ab 10  $\mu\text{M}$  bereits eine Sättigung zu erkennen ist. Bei 40  $\mu\text{M}$  ist bereits nach 30 Minuten eine Sättigung eingetreten. Um jedoch auch bei niedrigeren Sondenkonzentrationen gut sichtbare Banden zu erhalten, wurde eine Bestrahlungszeit von zwei Stunden gewählt.

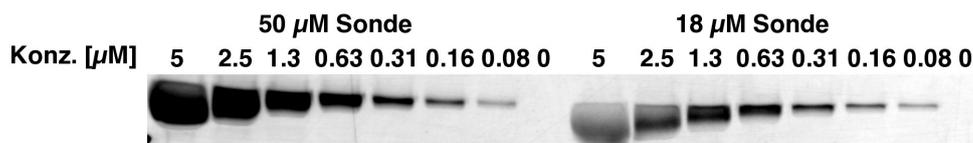


**Abb. 4.35:** Zeitabhängigkeit der Photovernetzung bei verschiedenen Konzentrationen der Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** in Gegenwart von 250 nM MBP-STAT5b. Die Fluoreszenzmessungen wurden nach SDS-PAGE aus dem Gel heraus durchgeführt. Daher ist exemplarisch das Fluoreszenzbild für die Zeitabhängigkeit bei einer Sondenkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  gezeigt.

### 4.5.2.2 Abhängigkeit der Photovernetzung von der Proteinkonzentration

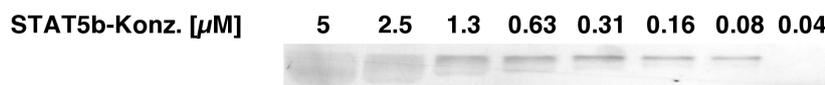
Um die optimale Proteinkonzentration für die Photoaffinitätsvernetzung zu bestimmen, wurde bei konstanter Sondenkonzentration die Proteinmenge variiert. Ziel war es,

eine Konzentration zu finden, die einerseits eine gute Detektierbarkeit der Proteinbande ermöglicht, andererseits jedoch keinen zu hohen Einsatz an Protein erfordert. Des Weiteren sollte getestet werden, wie wenig Protein mit dieser Sonde detektiert werden kann. Aufgrund der iterativ durchgeführten Optimierung sind einige Ergebnisse der folgenden Experimente bereits in vorherige eingeflossen. Die Proteinkonzentration wurde für die hier gezeigten Ergebnisse bei einer konstanten Konzentration der Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** von 18 und 50  $\mu\text{M}$  zwischen 0.08  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  variiert.



**Abb. 4.36:** Abhängigkeit der Photovernetzung von der STAT5b-Konzentration bei konstanter Konzentration der Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38**

Es ist festzustellen, dass das Protein auch bei einer Konzentration von 0.08  $\mu\text{M}$  noch einwandfrei detektiert werden konnte (Abb. 4.36). Scharfe Proteinbanden konnten nur unterhalb von 0.63  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Weitere Experimente haben gezeigt, dass die Grenze der Fluoreszenzdetektion des Proteins bei einer Konzentration zwischen 0.08 und 0.04  $\mu\text{M}$  in Gegenwart einer Sondenkonzentration von 1.6  $\mu\text{M}$  und einer Belichtungszeit von einer Minute im Detektionsschritt liegt (Abb. 4.37).

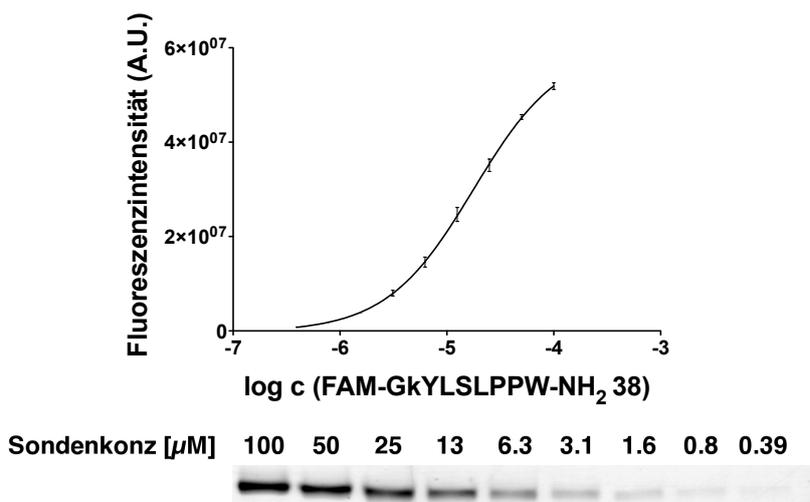


**Abb. 4.37:** Bestimmung der Detektionsgrenze

Als Kompromiss für gute Detektierbarkeit und Proteinverbrauch wurde, soweit nicht anders angegeben, eine Konzentration von 250 nM für die weiteren Experimente verwendet.

#### 4.5.2.3 Abhängigkeit der Photovernetzung von der Sondenkonzentration

Um ein Maß für die Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung zu ermitteln, wurde nach *Kawamura et al.* eine Variation der Sondenkonzentration bei konstanter Proteinkonzentration (250 nM) durchgeführt.<sup>[151]</sup> Die Konzentration bei 50 % des maximalen Markierungsgrades (EC<sub>50</sub>) wurde als Basis zum Vergleich der zwei getesteten Sonden FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** und FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** verwendet.

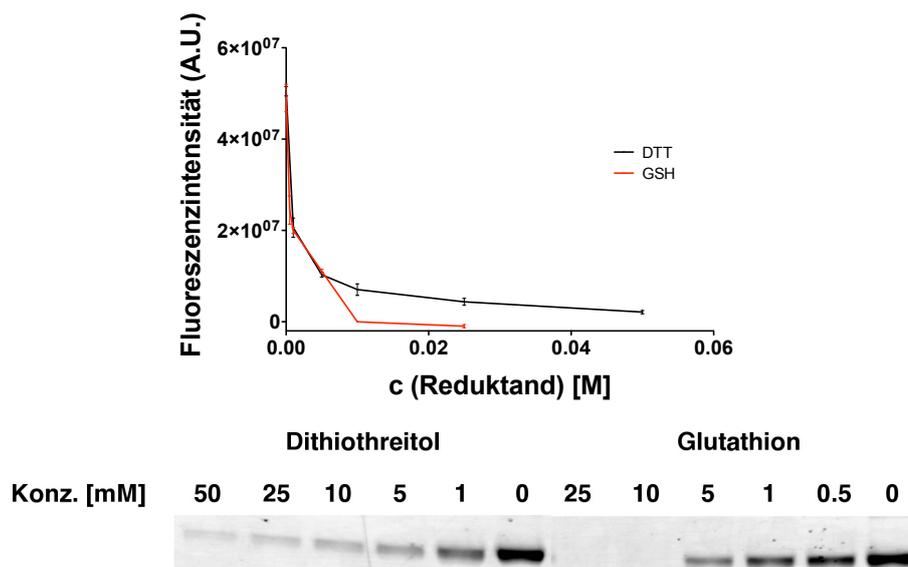


**Abb. 4.38:** Abhängigkeit zwischen der Photoaffinitätsmarkierung und der Sondenkonzentration von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38**

Für Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** wurde ein EC<sub>50</sub>-Wert von 18 μM, für FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** wurde er zu 86 μM ermittelt. Es ist somit festzustellen, dass Sonde **38** ohne zusätzliches Lysin und Biotin effizienter dazu in der Lage ist, das MBP-STAT5b-Konstrukt zu markieren. Dies ist in diesem Falle auch auf eine bessere Affinität von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** gegenüber FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** zurückzuführen wie es sich in den K<sub>d</sub>-Werten von 0.90 μM bzw. 5.3 μM (vgl. Kapitel 4.4.3.1) widerspiegelt.

#### 4.5.2.4 Einfluß von Reduktionsmitteln auf die Photovernetzung

In einer Vielzahl von *in vitro*-Assays ist es üblich, zum Erhalt der Aktivität des zu untersuchenden Proteins Reduktionsmittel wie DTT zuzusetzen. Dies ist insbesondere bei Proteintyrosinphosphatasen der Fall, da ein Cystein für ihre katalytische Aktivität verantwortlich ist. Da PTPs ein potenzielles Einsatzgebiet von PAL-Sonden auf Benzoylphosphonatbasis sind, sollte an dieser Stelle der Einfluss von DTT auf die Photovernetzung ebenso wie der Einfluss von Glutathion (GSH), einem ubiquitären Reduktionsmittel in Zellen, untersucht werden. Dabei wurde DTT bzw. GSH in verschiedenen Konzentrationen zur Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** (18 μM) mit STAT5b gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Proben zwei Stunden bei 4 °C mit einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt wurden.



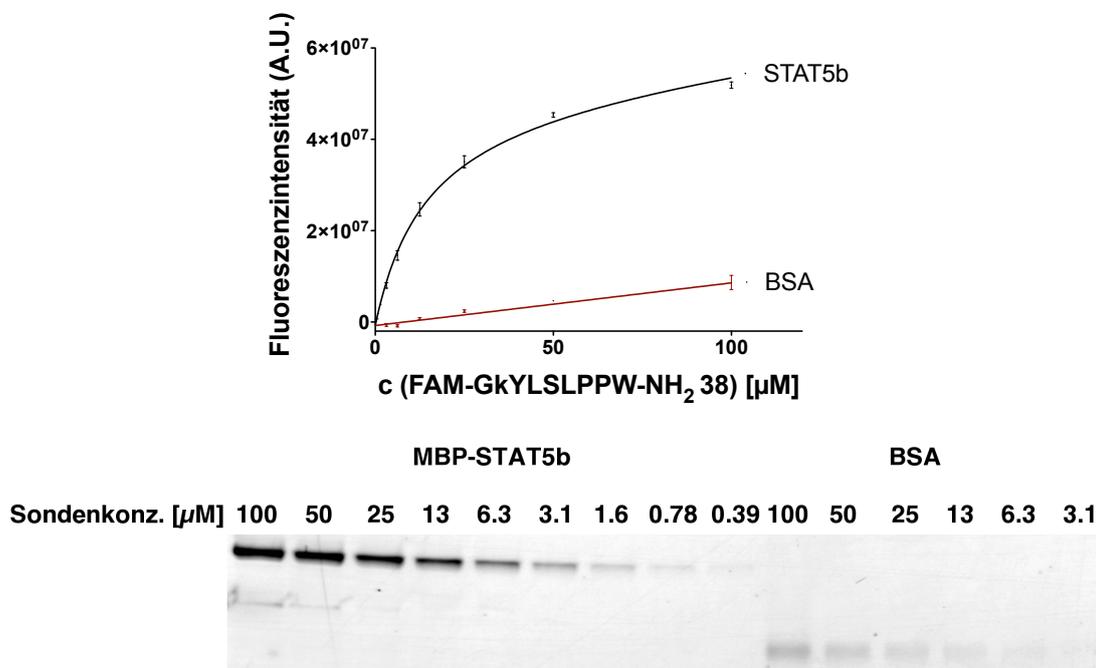
**Abb. 4.39:** Einfluss von DTT und GSH auf die Photovernetzung von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit MBP-STAT5b

In Abbildung 4.39 ist deutlich zu sehen, dass der Zusatz von Reduktionsmitteln einen erheblichen Einfluss auf die Photovernetzung hat. Schon bei Einsatz von 1 mM DTT wie es beispielsweise in Standard-pNPP-Assays üblich ist, sinkt die Photovernetzungsausbeute auf ca. ein Drittel ihres Ausgangswertes. Bei Einsatz von physiologischen Konzentrationen von GSH (1-20 mM)<sup>[152,153]</sup> reduziert sich die Vernetzungsausbeute schon bei 1 mM um mehr als die Hälfte. Während im Fall von DTT eine Abflachung der Kurve bei höheren Konzentrationen zu beobachten ist und auch bei 25 mM DTT zumindest noch ca. 10% des Ausgangswertes zu verzeichnen sind, ist im Falle von GSH schon bei einer Konzentration oberhalb von 5 mM keine Photovernetzung mehr zu beobachten. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Photodimerisierung von Benzoylphosphonat **11** in Gegenwart von DTT (s. Kapitel 4.3.2) ist anzunehmen, dass es hier ebenfalls zu einer photochemisch vermittelten Reduktion des Benzoylphosphonatrestes kommt, wie sie auch bei Benzophenon **5** bekannt ist.<sup>[139]</sup> Als Folge der Reduktion kommt es bei Benzoylphosphonaten jedoch zu einer Eliminierung des Phosphonatrestes, wodurch Benzaldehyd gebildet wird.

#### 4.5.2.5 Untersuchungen zur Spezifität der Photovernetzung

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung einer Sonde zur Photoaffinitätsmarkierung ist ihre Spezifität gegenüber dem zu untersuchenden Protein. Eine Möglichkeit die Spezifität zu testen, ist die Inkubation mit einem Protein, das keine Affinität zur getesteten Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** hat. Aufgrund der häufigen Nutzung und

der leichten Verfügbarkeit wurde BSA gewählt. Sowohl BSA als auch STAT5b wurden separat in gleicher Konzentration mit einer Reihe verschiedener Sondenkonzentrationen inkubiert und bestrahlt.



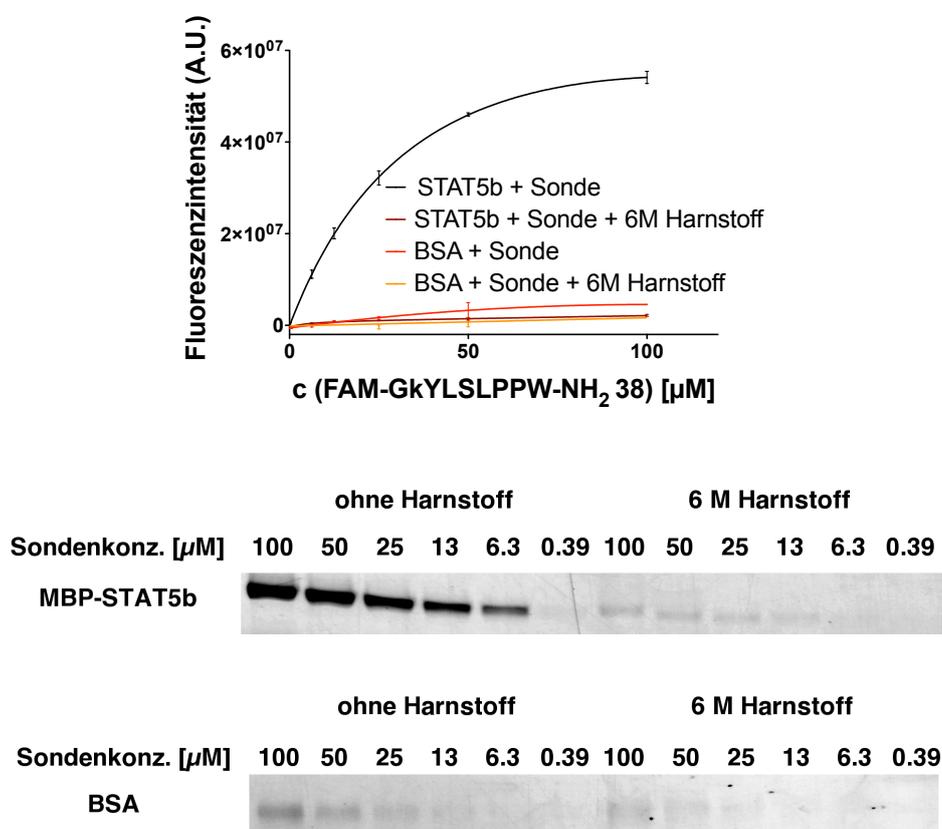
**Abb. 4.40:** Vergleich der Photovernetzung von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit STAT5b und BSA

Die Auftragung der Fluoreszenz gegen die Konzentration der eingesetzten Sonde **38** zeigt deutlich, dass die Fluoreszenz im Falle des Experiments mit STAT5b deutlich höher ist als mit BSA (Abb. 4.40). Außerdem ist deutlich der Ansatz einer Sättigung mit zunehmender Sondenkonzentration bei STAT5b zu beobachten, während bei BSA ein linearer Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten ist. Letzteres deutet auf unspezifische Photovernetzung hin. Es ist deutlich zu erkennen, dass jedoch auch im Experiment mit STAT5b keine komplette Sättigung erreicht wird. Vielmehr geht der Verlauf in eine Parallele zum Fluoreszenzanstieg des BSA-Sonden-Konjugats über. Es scheint somit auch einen, wenn auch deutlich geringeren Anteil unspezifischer Photovernetzung im Falle von STAT5b zu geben.

Eine weitere Möglichkeit die Spezifität einer Sonde zu untersuchen, besteht darin, das Zielprotein zu denaturieren. Es verliert somit jegliche dreidimensionale Struktur und sollte keine spezifischen Wechselwirkungen mehr mit der Sonde eingehen können. Jegliche Vernetzung muss demnach unspezifisch sein, vorausgesetzt, dass das Protein nicht renaturieren kann.

Die einfachste Möglichkeit ein Protein zu denaturieren ist der Einsatz von Hitze. Dies

bietet den Vorteil, dass keine Reagenzien verwendet werden müssen, die einen Einfluss auf die Photovernetzung haben könnten. Im Fall von STAT5b zeigte sich jedoch, dass das Protein bei 95 °C unter Denaturierung präzipitiert. Jegliche Resolubilisierungsversuche scheiterten. Daher wurde Harnstoff zur Denaturierung verwendet. Das Protein wurde in 12 M Harnstofflösung gelöst und nach einer Verdünnung mit der Sonde auf 6 M Harnstoff eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie in den anderen Experimenten zwei Stunden bestrahlt. Um den Einfluss von Harnstoff auf die Photovernetzung als interferierenden Faktor zu untersuchen, wurden parallel zu den Experimenten mit STAT5b auch Experimente mit BSA unter gleichen Bedingungen durchgeführt.



**Abb. 4.41:** Vergleich der Photovernetzung von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> 38 mit Harnstoffdenaturiertem STAT5b und BSA

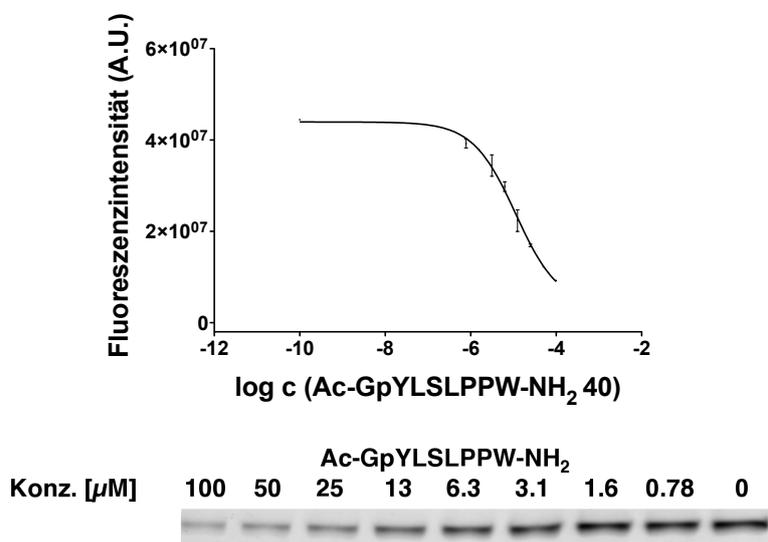
Zunächst ist festzustellen, dass die Denaturierung mit Harnstoff eine sehr deutliche Verringerung von an STAT5b gebundenem Peptid zur Folge hat (Abb.4.41). Jedoch ist auch eine Verringerung der Photovernetzung der Sonde an BSA zu beobachten. Mögliche Gründe dafür sind entweder eine, wenn auch geringe Affinität des Peptids FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> 38 zu BSA oder eine Verringerung der Vernetzung durch

Harnstoff. Ersteres kann aus den durchgeführten Experimenten weder bestätigt, noch widerlegt werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Photovernetzung auch in Gegenwart von Harnstoff noch immer abhängig von der Sondenkonzentration ist, sowohl bei STAT5b als auch bei BSA.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Experimente mit BSA und der Denaturierung der Proteine auf eine vorhandene Spezifität der Photovernetzung hinweisen, wobei ein geringer Anteil an unspezifischer Vernetzung insbesondere bei höheren Konzentrationen ebenfalls vorhanden ist.

#### 4.5.2.6 Verdrängung der PAL-Sonde mit einem kompetitiven Inhibitor

Ergänzend zu den schon erhaltenen Hinweisen auf die Spezifität der Photoaffinitätssonde, wurde noch ein weiteres Experiment durchgeführt, um die bisherigen Ergebnisse zu stützen. Wenn die Sonde spezifisch an einer Stelle des Proteins bindet, so müsste die Photovernetzung durch Zusatz eines reversibel bindenden Liganden konzentrationsabhängig unterdrückt werden. Daher wurden der PAL-Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit einer Konzentration von 40  $\mu$ M verschiedene Konzentrationen zwischen 0 und 100  $\mu$ M von Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** zugesetzt. Die STAT5b-Konzentration betrug wiederum 250 nM.



**Abb. 4.42:** Inhibition der Photovernetzung durch Zusatz verschiedener Konzentrationen des reversiblen Inhibitors Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40**

Die Auswertung der Fluoreszenzen der Gelbanden (Abb. 4.42) zeigt, dass der reversible Binder Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** in der Lage ist, die PAL-Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit steigender Konzentration zu verdrängen.

Somit ist erwiesen, dass das Benzoylphosphonat als photovernetzbares Phosphotyrosinmimetikum funktioniert und als Teil einer peptidischen Sonde zur spezifischen Markierung von Proteinen eingesetzt werden kann.

### 4.5.2.7 Untersuchungen zur Verwendung einer Benzoylphosphonat-basierten PAL-Sonde in Pulldown-Experimenten

PAL-Sonden werden häufig in Verbindung mit einer Affinitätsmarkierung wie Biotin in Pulldown-Experimenten eingesetzt.<sup>[154–156]</sup> Diese Art von Experimenten wird insbesondere bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in Zellen oder Zellysaten eingesetzt. Enthält die PAL-Sonde (Ligand) beispielsweise Biotin, so können alle Proteine, die durch die PAL-Sonde gebunden wurden, selektiv durch den Einsatz von mit Avidin überzogenen Harzkugeln isoliert werden. Dies ist möglich, weil die Bindung zwischen Biotin und Avidin sehr stark ist ( $K_d = 10^{-15}$ ). Pulldown-Experimente erleichtern die Abtrennung aller Proteine, die nicht an die PAL-Sonde gebunden sind und ermöglichen so auch eine bessere Identifizierung über enzymatischen Verdau und LC/MS/MS-Analysen. Um die prinzipielle Anwendbarkeit von Benzoylphosphonat-basierten Sonden für diesen Zweck zu überprüfen, wurde die Sonde FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** entwickelt.<sup>7</sup> MBP-STAT5b wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt, die PAL-Sonde **39** in einer Konzentration von 200  $\mu$ M. Diese vergleichsweise hohen Konzentrationen sollten sicherstellen, dass genügend Protein-Ligand-Konjugat vorliegt, um anschließend einen tryptischen Verdau durchführen zu können, dessen Peptide durch LC/MS/MS-Analyse zur Bestätigung der Identität des MBP-STAT5b-Konstrukts dienen sollten.

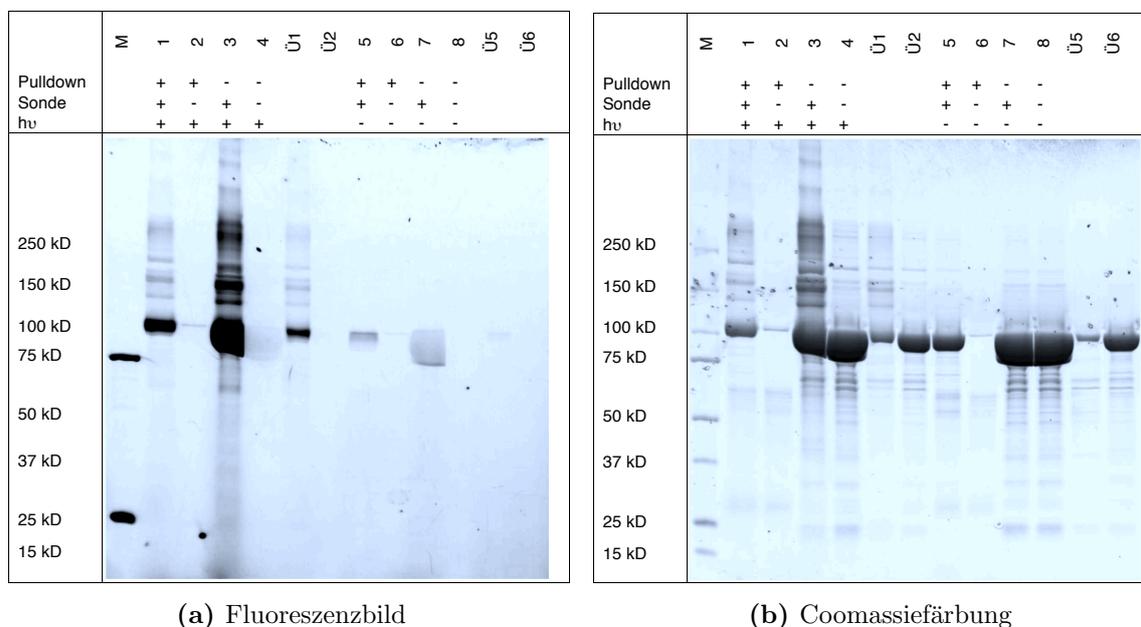
Abbildung 4.43a zeigt das Fluoreszenzbild des Polyacrylamidgels des Pulldowns inklusive aller Kontrollexperimente, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden. Bahn 1 zeigt die Banden nach Pulldown des bestrahlten Protein-Sonden-Gemisches. Die intensivste Bande stellt das MBP-STAT5b-Konstrukt dar. Dies wurde nach tryptischem Verdau der Bande mittels nano-LC/MS/MS bestätigt.<sup>8</sup> Die Peptide des Verdau wurden durch eine Nano-Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und anschließend mit einem Tandemmassenspektrometer (LTQ-Orbitrap XL) sequenziert. Dabei wird im MS-Modus die exakte Masse eines Peptids bestimmt. Im MS<sup>2</sup>-Modus wird dieses Peptid in einer Kollisionszelle zu kleineren Peptidbruchstücken fragmentiert, aus denen sich die Sequenz des fragmentierten Peptids ableiten lässt. Durch den Vergleich gefunde-

---

<sup>7</sup>synthetisiert von Stefan Wagner, AG Rademann

<sup>8</sup>Der tryptische Verdau und die LC/MS/MS-Analyse wurden durchgeführt von Dr. M. Schümann, AG E. Krause (FMP)

ner Peptide mit einer Proteindatenbank kann das Protein identifiziert werden. Im Fall von MBP-STAT5b wurde eine vergleichsweise hohe Sequenzabdeckung von 81 % erreicht (Abb. 4.44). Weitere Informationen zur Methodik sind dem experimentellen Teil (Kap. 10.4.6.3) sowie dem Analyseprotokoll im Anhang (Kap. 11.2.1) zu entnehmen.



**Abb. 4.43:** Polyacrylamidgels nach den Pull-down-Experimenten. Gezeigt sind Vergleiche mit (+) und ohne (-) Pull-down, sowohl in Anwesenheit (+), als auch in Abwesenheit (-) der PAL-Sonde sowie mit (+) und ohne (-) Bestrahlung (hv) der Probe. Darüber hinaus wurde der Überstand der Lösungen nach Inkubation der Pull-down-Sonde mit NeutrAvidin™-Harzkugeln ebenfalls durch SDS-PAGE analysiert. Dabei steht Ü1 für den Überstand der Probe von Bahn 1, Ü2 für den Überstand von Bahn 2 etc.

Die Bahnen mit den bestrahlten Protein-Sonden-Gemischen mit (Bahn 1) und ohne (Bahn 3) Pull-down sowie der Überstand von Bahn 1 (Ü1) zeigen neben dem STAT5b-Konstrukt noch weitere Banden. Es muss jedoch beachtet werden, dass auch das bestrahlte Protein allein (Bahn 4, Abb. 4.43b) sowie die unbestrahlten Protein-Sonden-Gemische mit (Bahn 5) und ohne (Bahn 7) Pull-down und das unbestrahlte Protein (Bahn 8, Abb. 4.43b) weitere Banden aufweisen. Die stärkere Coomassie-Färbung einiger Nebenbanden der bestrahlten Protein-Sonden-Gemische weist jedoch darauf hin, dass diese wahrscheinlich durch Radikal-induzierte Oligomerisierungsprodukte des Proteins zustande gekommen sind. Dies ist jedoch auch dem Einsatz sehr hoher Crosslinkerkonzentrationen geschuldet.

Das ohne Sonde bestrahlte Protein (Bahn 2) weist nach Pull-down eine schwach fluo-

rezente Bande auf. Da diese Probe keine Sonde **39** enthielt, muss Bandenfluoreszenz durch die Eigenfluoreszenz des Proteins verursacht worden sein. Auch in der Coomassiefärbung ist nur eine schwache Bande zu sehen, was darauf hinweist, dass der Anteil der unspezifischen Bindung des Proteins an die NeutrAvidin<sup>TM</sup>-Harzkugeln sehr gering ist. Sowohl dieser Fakt als auch die starke Fluoreszenz der Bande in Bahn 1 weisen auf die Anreicherung des Proteins aufgrund des Pulldowns mit Sonde **39** hin. Der Umstand, dass im Überstand des Pulldowns (Bahn Ü1, Abb. 4.43a) noch eine fluoreszente Bande mit relativ starker Intensität zu sehen ist, lässt erkennen, dass nicht ausreichend Avidin für den Pulldown verwendet wurde.

Sequence Coverage: **81%**

Matched peptides shown in **Bold Red or blue** (Statistisch nicht sichere Identifizierung der entsprechenden Peptide)

```

1 MKTEEGKLVI WINGDKGYNG LAEVGKKFEK DTGIKVTVEH PDKLEEKFPQ
51 VAATGDGPD IFWAHDRFGG YAQSGLLAEI TPKAFQDKL YPFTWDVAVRY
101 NGKLIAYPIA VEALSIIYNK DLLPNPPKTW EEIPALDKEL KAKGKSALMF
151 NLQEPYFTWP LIAADGGYAF KYENKDYDIK DVGVDNAGAK AGLTFLVDLI
201 KKNHMNADTD YSIAEAAFNK GETAMTINGP WAWSNIDTSK VNYGVTVLPT
251 FKGQPSKPFV GVLSAGINAA SPNKELAKEF LENYLLTDEG LEAVNKDKPL
301 GAVALKSYEE ELAKDPRIAA TMENAQKGEI MPNIPQMSAF WYAVRTAVIN
351 AASGRQTVDE ALKDAQTNSN FEENLYFQSG TVDAGADAGK PRPGSSENLV
401 FQGGRPMSQK HLQINQTFEE LRLVTQDTEN ELKKLQQTQE YFIIQYQESL
451 RIQAQFGPLA QLSPQERLSR ETALQQKQVS LEAWLQREAO TLQQYRVELA
501 EKHQKTLQLL RKQQTIIILD ELIQWKRQQQ LAGNGGPPEG SLDVLQSWCE
551 KLAEEIIWQNR QQIRRAEHLQ QQLPIPGPVE EMLAEVNATI TDIISALVTS
601 TFIIEKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL NVHMNPPQVK ATIISEQQAK
651 SLLKNENTRN DYSGEILNNC CVMYHQATG TLSAHFRNMS LKRIKRSDDR
701 GAESVTEEFK TILFESQFSV GGNELVFQVK TSLPVPVVIV HGSQDNNATA
751 TVLWDNAFAE PGRVPPFAVD KVLWPQLCEA LNMKFKAEVQ SNRGLTKENL
801 VFLLAQKLFNN SSSHLEDYSG LSVSWSQFNR ENLPGRNYTF WQWFDGVMEV
851 LKKHLKPHWN DGAILGFVNK QQAHDLLINK PDGTFLLRF S DSEIGGITIA
901 WKFDSQERMF WNLMPFTTRD FSIRSLADRL GDLNYLIYVF PDRPKDEVYS
951 KYITPVPCE S ATAKAVDGYV KPQIKQVPE FVNASADAGG GSATYMDQAP
1001 SPAVCPQAHY NMYPQNPAR SRSHHHHHH

```

**Abb. 4.44:** Sequenzabdeckung des MBP-STAT5b-Konstrukts nach tryptischem Verdau und LC/MS/MS-Analyse. Alle gefundenen Peptide, die mit dem theoretischen, tryptischen Verdau von MBP-STAT5b übereinstimmen, sind rot markiert.

Bahnen 3 und 4 zeigen zum Vergleich die Experimente ohne Pulldown, jedoch wie Bahnen 1 und 2 mit Bestrahlung und mit bzw. ohne Sonde **39**. Auch hier zeigt sich nach Bestrahlung in Gegenwart der Sonde eine starke Fluoreszenzmarkierung (Bahn 3, Abb. 4.43b) während ohne Sonde nur die schwache Eigenfluoreszenz des Proteins zu sehen ist.

Interessanterweise ist nach Pulldown mit Sonde **39**, jedoch ohne Bestrahlung (Bahn 5), ebenfalls eine starke Bande in der Coomassiefärbung (Abb. 4.43b) zu sehen, die auf das

Vorhandensein des Proteins hinweist. Im Fluoreszenzbild ist jedoch nur eine, verglichen mit Bahn 1 (gleiches Experiment mit Bestrahlung), äußerst schwache Bande zu sehen. Der Vergleich mit Bande 6 (nach Pulldown ohne Sonde und ohne Bestrahlung) legt nahe, dass es sich nicht um eine unspezifische Bindung des Proteins an die Neutravidin-Harzkugeln handeln kann. Vielmehr kann vermutet werden, dass es sich um einen reversiblen Bindungsmechanismus handelt. Da die Biotin-Avidin-Bindung mit einem  $K_d$ -Wert von  $10^{-15}$  äußerst stark ist, ist also die einzig entscheidende Wechselwirkung die zwischen der Benzoylphosphonatsonde und dem Protein STAT5b. Nach Denaturierung der Probe zur Lösung des Biotins von Avidin und zur Vorbereitung der Probe für die SDS-PAGE dissoziiert die Sonde wieder vom Protein. Dies würde erklären, warum nahezu keine Fluoreszenz in der Bande zu sehen ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Benzoylphosphonat-basierte Sonde FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** erfolgreich in Pulldown-Experimenten eingesetzt werden kann. Anschließend gelang die massenspektrometrische Identifizierung des markierten und affinitätsaufgereinigten Proteins STAT5b.

## 4.6 Ausblick

Bisher konnte gezeigt werden, dass Benzoylphosphonate **11** zum einen sehr gut als Phosphotyrosinmimetikum geeignet sind, zum anderen aber auch als Photovernetzer eingesetzt werden können. Sie sind daher sehr gut für den Einsatz in PAL-Sonden geeignet.

Für die Bestimmung von Bindungsstellen nach enzymatischem Verdau des kovalenten Sonden-Protein-Konjugats mittels LC/MS/MS wäre die Einführung einer Spaltstelle zwischen Benzoylphosphonat **11** und dem peptidischen Rest von großem Vorteil. Dies hängt damit zusammen, dass die Empfindlichkeit der Massendetektion nur für einen bestimmten Massenbereich optimiert werden kann. Dieser hat zumeist eine Obergrenze von ca. 3000  $m/z$  oder weniger. Peptide des verdauten Proteins, die eine PAL-Peptid-Sonde mit einer Masse von ca. 1500 bis 2000 Da tragen, können diesen Bereich leicht überschreiten und sind somit schwer detektierbar. Berücksichtigt man, dass diese Sonde innerhalb eines Peptids an mehreren Aminosäuren gebunden sein kann, so reduziert dies nochmals die Detektierbarkeit im MS/MS-Signal, das für die Sequenzierung genutzt wird. Darüber hinaus muss bei der Auswertung der Verdau von zwei Peptiden, der des Proteins und der der Sonde, berücksichtigt werden. Dies ist softwaretechnisch weitaus komplizierter als die Suche nach einer konstanten Massenmodifikation.

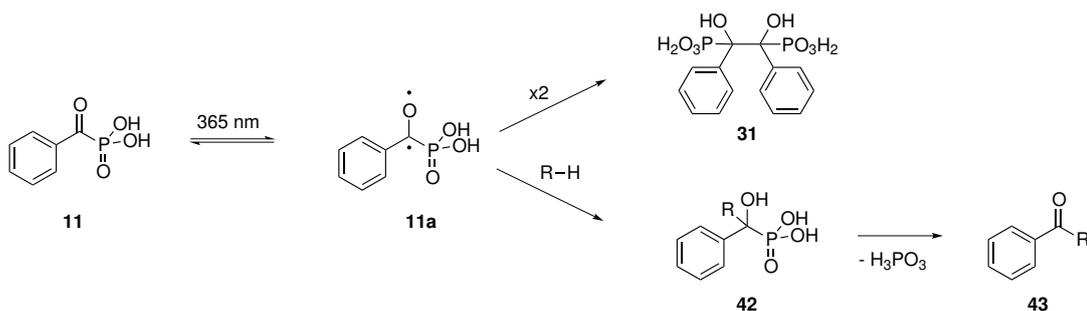
Eine weitere Anwendungsmöglichkeit bietet der Einsatz des Benzoylphosphonats als

Phosphotyrosinmimetikum in Inhibitoren mit nichtpeptidischen Strukturen. Auch hier könnte eine Funktionalisierung vorgenommen werden, die die Fluoreszenzdetektion und die Aufreinigung mittels Biotin ermöglicht. Des Weiteren wäre auch der Einsatz von Alkinen denkbar, die es ermöglichen, das photovernetzte Produkt mittels Click-Chemie mit einer Fluoreszenz- und/oder einer Affinitätsmarkierung zu koppeln.

Der nächste Schritt in der Anwendung von Benzoylphosphonat-enthaltenden PAL-Sonden wird die Erweiterung auf Zellysate sein. In diesem Zusammenhang könnte unter anderem die Messung der Aktivität von SHP-2 eine interessante Anwendung darstellen. Die PAL-Sonde sollte nur an aktives SHP-2 binden, da die katalytische Domäne im inaktiven Zustand blockiert ist (s. Kap. 2.2.1.3 auf Seite 9). Eine weitere mögliche Anwendung stellt die Inhibition der STAT5b-Dimerisierung im Zusammenhang mit akuter myeloischer Leukämie in FLT3/ITD-Zellen mit konstitutiv aktiviertem STAT5b dar (s. Kap. 2.3.2.2 auf Seite 17). Des Weiteren könnten beispielsweise Expressionslevel von Proteinen durch die Markierung mit PAL-Sonden gemessen werden. Durch die bisher einzigartige Kombination von Phosphotyrosinmimetikum und Photovernetzer lassen sich jedoch auch strukturelle Fragestellungen, wie z. B. nach dem Bindungsort eines Liganden oder Substrats, wesentlich genauer beantworten, als mit bisherigen PAL-Sonden. Insgesamt ist eine große Zahl möglicher Anwendungen für diese PAL-Sonden im Bereich der Proteomik denkbar.

## 5 Zusammenfassung Thema I

Der Einsatz von Photoaffinitätsmarkierungen ist in der Proteomik weit verbreitet. Leider gibt es bis heute im Bereich der Phosphotyrosinerkennung, beispielsweise über SH2-Domänen oder bei der Substraterkennung von Proteintyrosinphosphatasen, nur unzureichende Möglichkeiten zur direkten Verknüpfung eines Moleküls mit dem aktiven Zentrum des Proteins. Der weitaus größte Teil beschränkt sich auf die Bindung durch eine photoreaktive Gruppe an einer Stelle, die sich weit entfernt von den wesentlichen Wechselwirkungen befindet. Aus diesem Grund stand die Entwicklung eines photovernetzbaaren Phosphotyrosinmimetikums im Mittelpunkt dieses Teils der Arbeit. Die Anforderungen an das Design wurden von Benzoylphosphonaten bestens erfüllt. Die Phosphonatgruppe sollte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Phosphat eine hohe Affinität zu PTP- und SH2-Domänen aufweisen. Die Carbonylgruppe bietet zum einen den Vorteil, dass sie als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert und somit den Verlust des Estersauerstoffs im Phosphat kompensieren könnte. Zum anderen sollten die Photovernetzungsausbeuten durch die reversible Anregbarkeit der Carbonylgruppe zum Biradikal **11a** (Abb. 5.1) deutlich höher als bei Diazirinen und Aziden sein.



**Abb. 5.1:** Anregung des Benzoylphosphonats **11** zum Biradikal und weitere Dimerisierung bzw. Insertion in C-H-Bindungen

Nach der Synthese verschiedener Benzoylphosphonate musste zunächst gezeigt werden, dass Benzoylphosphonate photoaktiv sind. Daher wurden zunächst Experimente zur Photodimerisierung (Abb. 5.1), wie sie von Benzophenon und Arylphosphonsäureestern berichtet wurden, durchgeführt.<sup>[139,140]</sup> Dabei gelang erstmalig die Isolierung der

Dimerisierungsprodukte **31** sowie deren Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie. Als Dimerisierungsprodukte wurden ein Gemisch aus den Enantiomeren *R,R*-**31** und *S,S*-**31** und eine *meso*-Verbindung *S,R*-**31** erwartet. Das nach der Retentionszeit erste Dimer wies in allen NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR) scharfe Signale auf, während Dimer II in allen Spektren breite Signale und zudem eine starke Temperaturabhängigkeit zeigte.

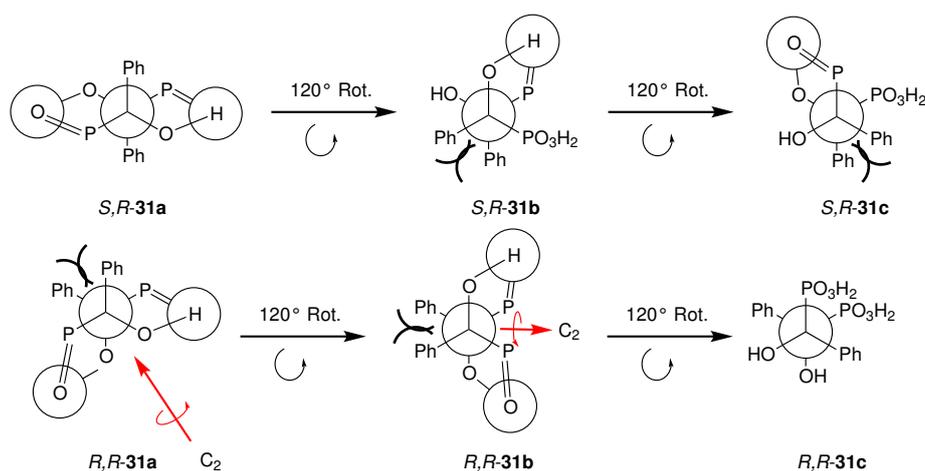


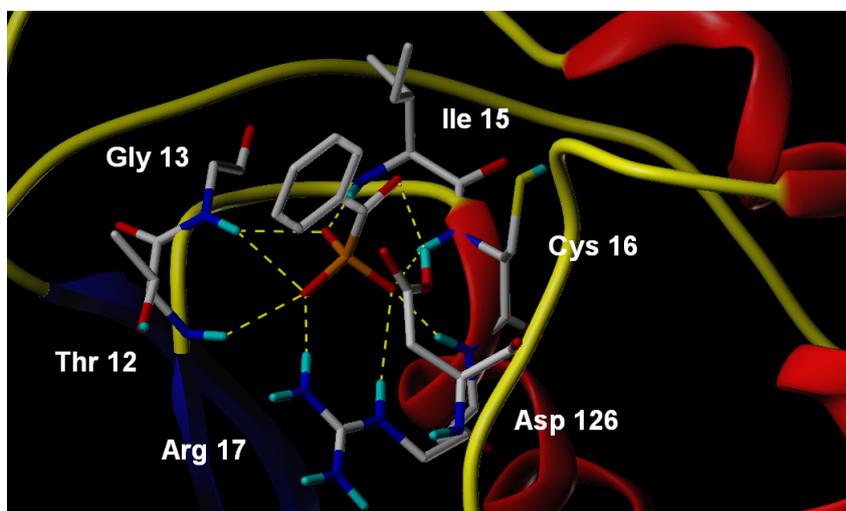
Abb. 5.2: Konformere der Dimerisierungsprodukte **31**

Basierend auf Konformationsanalysen der möglichen Produkte wurde Dimer I der *meso*-Verbindung und Dimer II dem Gemisch aus *R,R*-**31** und *S,S*-**31** zugeordnet (Abb. 5.2). Die erwartete Verknüpfung der Dimere am Carbonylkohlenstoff wurde durch die Dublett-Dublett-Aufspaltung des betreffenden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signals durch die  $^1J$ - bzw.  $^2J$ -Kopplung mit den Phosphoratomen bestätigt. Als Nebenprodukte der Photodimerisierung konnten Benzaldehyd und Benzoesäure mittels LC/ToF-MS-Analyse identifiziert werden.

Unter Verwendung von Pentapeptiden **36** (FKXAG-NH<sub>2</sub>, X = L, I, V, C, W) als Modellsystem konnte darüber hinaus der massenspektrometrische Nachweis der Photovernetzung von Benzoylphosphonat **11** mit peptischen Strukturen in wässrigen Puffersystemen erbracht werden. Es konnte durch LC/ToF-MS-Analyse gezeigt werden, dass es zu einer Modifikation der Peptide durch einen Benzoylrest kommt. Dieser entsteht durch Eliminierung der Phosphonatgruppe aus dem zunächst gebildeten Hydroxyphosphonat (Abb. 5.1). Ob diese Eliminierung bereits unter Assaybedingungen oder erst unter sauren Bedingungen in der LC/MS oder beim Ionisierungsprozess stattfindet, ist nicht bekannt.

Erste Messungen der Affinität gegenüber PTP- und SH2-Domänen wurden am Beispiel der niedermolekularen Proteintyrosinphosphatase MptpA bzw. an STAT5b durchge-

führt. Inhibitionsexperimente mit MptpA zeigten eine ausgesprochen gute Affinität des Benzoylphosphonats **11** ( $K_i = 186 \mu\text{M}$ ,  $\text{EC}_{50} = 993 \mu\text{M}$ )<sup>1</sup>, wodurch zuvor durchgeführte Dockingexperimente bestätigt wurden (Abb. 5.3). Durch Bestrahlung konnte die gemessene Inhibitionswirkung deutlich erhöht werden ( $\text{EC}_{50} = 84 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 5.3:** Wechselwirkungen des Benzoylphosphonats **11** mit der katalytischen Domäne von MptpA. Das Docking wurde mit Sybyl basierend auf der Kristallstruktur von MptpA (PDB-Eintrag: 1U2P) durchgeführt.

Durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen konnte ebenfalls eine sehr gute Affinität des Benzoylphosphonats **11** gegenüber dem SH2-Domäne-enthaltenden Protein STAT5b bestätigt werden ( $K_i = 326 \mu\text{M}$ ,  $\text{EC}_{50} = 840 \mu\text{M}$ ).<sup>2</sup> Die Einführung einer Biotin-Gruppe in *para*-Position hatte eine erhöhte Affinität des Benzoylphosphonats **13** zur Folge ( $K_i = 198 \mu\text{M}$ ,  $\text{EC}_{50} = 509 \mu\text{M}$ ). Der entsprechende Monoethylester **30** zeigte hingegen aufgrund der fehlenden Wechselwirkung über die zweite negative Ladung eine deutlich reduzierte Affinität ( $K_i > 3000 \mu\text{M}$ ,  $\text{EC}_{50} > 3000 \mu\text{M}$ ). Die Bestrahlung der Benzoylphosphonate hatte eine deutliche Erhöhung der gemessenen Aktivität zur Folge. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert des Benzoylphosphonats **11** sank auf fast 50 % ( $457 \mu\text{M}$ ) des Ausgangswertes, der des Biotin-markierten Derivats **13** auf ca. 80 % ( $404 \mu\text{M}$ ) des Wertes ohne Bestrahlung.

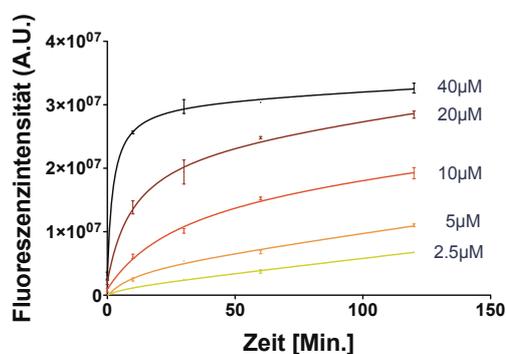
Nach den überaus guten Ergebnissen mit Benzoylphosphonat **11**, wurde nun eine peptidische PAL-Sonde entwickelt. Der Fokus der Arbeit wurde dabei auf Untersuchungen mit STAT5b gelegt. Als Peptidsequenz wurde ein Octapeptid aus der  $\beta$ -

<sup>1</sup>berechnet mit der Cheng-Prusoff-Gleichung<sup>[143]</sup>:  $K_i = \frac{\text{EC}_{50}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_m}}$ , mit [S] als Substratkonzentration (10 mM pNPP) und der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  (2.3 mM)

<sup>2</sup>Die  $K_i$ -Werte wurden mit Hilfe einer Gleichung nach *Nikolovska-Coleska et al.*<sup>[147]</sup> aus den  $\text{EC}_{50}$ -Werten berechnet.

Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors genommen. Die nach dieser Sequenz synthetisierte Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38**<sup>3</sup> mit dem Phenylalaninoylphosphonatbaustein (Pap, kY) als Phosphotyrosinmimetikum ist ein hochaffiner Ligand ( $K_d = 0.90 \mu\text{M}$ ), wenngleich sie nicht ganz so aktiv wie die Phosphotyrosin-enthaltende Sonde FAM-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **37** ist ( $K_d = 0.042 \mu\text{M}$ ). Die in einem FP-Verdrängungsassay vermessene Sonde Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41** zeigte ebenfalls eine sehr gute Affinität gegenüber STAT5b ( $EC_{50} = 28 \mu\text{M}$ ,  $K_i = 11 \mu\text{M}$ ). Auch hier war die Phosphotyrosinsonde Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** jedoch etwas affiner gegenüber dem Protein ( $EC_{50} = 1.6 \mu\text{M}$ ,  $K_i = 0.60 \mu\text{M}$ ). Die Bestrahlung der PAL-Sonden zeigte eine deutliche Verbesserung der gemessenen Aktivität. So wurde der  $EC_{50}$ -Wert im Fall von Ac-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **41** mehr als halbiert ( $13 \mu\text{M}$ ). Die Affinität der Phosphotyrosinsonde **40** blieb hingegen unverändert. Die Affinitätserhöhung war somit allein auf das Benzoylphosphonat zurückzuführen.

Nach den Affinitätsmessungen wurde die hochaffine PAL-Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** in Photovernetzungsexperimenten mit dem MBP-STAT5b-Konstrukt getestet. Nach zweistündiger Bestrahlung in 384-Well-Mikrotiterplatten wurden die Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenz der Proteinbanden quantifiziert. Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit zeigte, dass bei einer Sondenkonzentration von  $40 \mu\text{M}$  bereits nach 30 Minuten eine Sättigung eintritt, während der Verlauf bei  $2.5 \mu\text{M}$  über zwei Stunden fast linear ist (Abb. 5.4).

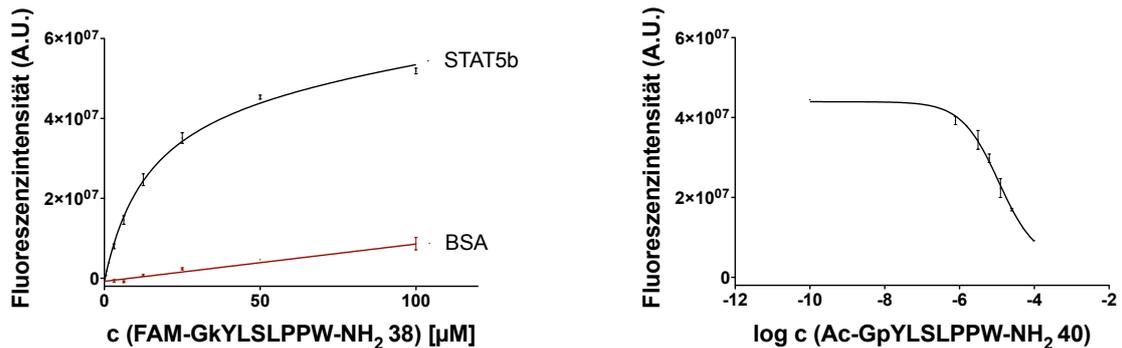


**Abb. 5.4:** Zeitabhängigkeit der Photovernetzung von FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** mit MBP-STAT5b

Untersuchungen bezüglich der Spezifität der Photovernetzung zeigten zunächst, dass bei höheren Sondenkonzentrationen eine starke Abflachung des Anstiegs in Experimenten mit STAT5b eintritt, während die gleichen Experimente mit BSA einen deutlich geringeren und linearen Anstieg aufwiesen. Es trat jedoch auch im Fall von STAT5b

<sup>3</sup>synthetisiert von Stefan Wagner, AG Rademann

keine vollständige Sättigung ein. Vielmehr ging der Verlauf in einen linearen Anstieg, parallel zu dem der BSA-Vernetzung über (Abb. 5.5a). Weitere Hinweise auf die Spezifität der Sonde FAM-GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **38** wurden beispielsweise durch Inhibition der Photovernetzung durch Einsatz von Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** als Verdränger gewonnen. Bei steigenden Konzentrationen von **40** war eine deutliche Abnahme der Photovernetzung zu verzeichnen (Abb. 5.5b).



(a) Vergleich der Photovernetzung zwischen STAT5b mit BSA

(b) Inhibition der Photovernetzung durch Verdrängung der PAL-Sonde mit Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40**

**Abb. 5.5**

Photomarkierungsexperimente in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Dithiothreitol (DTT) oder Glutathion (GSH) wie sie unter anderem in Phosphataseassays eingesetzt werden bzw. in Zellen vorhanden sind, zeigten einen deutlichen Einfluß auf die Photovernetzung. So war bereits bei Zusatz von 1 mM DTT eine Reduktion der Photovernetzung um ca. 66 % zu verzeichnen. Während auch bei 50 mM DTT noch Photovernetzung zu beobachten war, konnte bei Einsatz von Glutathion bereits oberhalb einer Konzentration von 5 mM keine Markierung mehr detektiert werden. Der Einsatz in zellulären Systemen mit GSH-Konzentrationen zwischen 1-20 mM müsste daher eingehend untersucht werden.

Der Einsatz von Biotin-markierten PAL-Sonden bietet beispielsweise bei Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen große Vorteile bei der Aufreinigung komplexer Proteingemische und erleichtert so die Analyse und Identifizierung von gebundenen Proteinen. Um die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Methodik im Zusammenhang mit Benzoylphosphonat-basierten Sonden zu überprüfen, wurde MBP-STAT5b in Gegenwart einer Sonde FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39**, die im Vergleich zu Sonde **38** um einen Lysin(Biotin)-Baustein erweitert wurde, bestrahlt. Der Pulldown mit Avidin-Beads und anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE zeigte das Vorhandensein

des Proteins. In Abwesenheit der Sonde **39** wurde kein Protein detektiert, was eine unspezifische Adsorption des Proteins an die Avidin-Beads ausschließt. Die Proteinbande wurde einem tryptischen Verdau unterzogen und die daraus resultierenden Peptide mittels LC/MS/MS dem MBP-STAT5b-Konstrukt zweifelsfrei zugeordnet.

Zusammenfassend stellen Benzoylphosphonate **11** also durchaus potente, photovernetz-  
bare Phosphotyrosinmimetika dar. Der Einsatz in Peptiden führt zu hochaffinen PAL-  
Sonden, die in vielen Bereichen der Proteomforschung eingesetzt werden könnten.

# 6 Einführung Thema II

Die funktionierende Regulation der Proteintyrosinphosphorylierung ist für einen gesunden Organismus besonders wichtig. Eine bedeutende Funktion nehmen dabei Proteintyrosinphosphatasen ein, deren Regulation wiederum auf verschiedene Arten erfolgen kann. Neben der Regulation durch Phosphorylierung wie sie am Beispiel von SHP-2 bereits erläutert wurde, bietet insbesondere die Redoxsensitivität von PTPs eine wichtige Möglichkeit zur Steuerung ihrer Aktivität.

## 6.1 Redoxsensitivität von Proteintyrosinphosphatasen

Wasserstoffperoxid wurde die längste Zeit seit seiner Entdeckung vor über 190 Jahren<sup>[157]</sup> als toxisch eingestuft.<sup>[158,159]</sup> In den letzten Jahren hat sich jedoch mehr und mehr gezeigt, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch regulatorische Funktionen besitzt. Es ist in einer Vielzahl von Signalwegen vertreten, inklusive solcher, die Zellproliferation, Differenzierung, Metabolismus und Zellmigration regulieren. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass es durch Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR) zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase Nox4 kommt.<sup>[160]</sup> Die damit verbundene Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zur Deaktivierung von PTP1B<sup>[161,162]</sup>, einer Proteintyrosinphosphatase, die durch Dephosphorylierung des IR und IRS-1 für die Negativregulierung des Insulinsignalweges verantwortlich ist.<sup>[163]</sup>

Die nachgewiesene Empfindlichkeit zahlreicher Proteintyrosinphosphatasen gegenüber oxidativer Deaktivierung ist auf die Redoxsensitivität des katalytisch aktiven Cysteinstores zurückzuführen (Abb. 6.1).<sup>[23,164,165]</sup> Aufgrund des niedrigen  $\text{pK}_a$ -Wertes der katalytisch aktiven Cysteine liegen sie hauptsächlich als Thiolat vor. Dies ermöglicht eine im Gegensatz zu freien Thiolen wesentlich schnellere Oxidation zu Sulfensäuren (R-SOH), da die Oxidation aus dem Thiolatanion heraus erfolgt.<sup>[166,167]</sup> So hat Glutathion ( $\text{pK}_a = 8.8$ ) für die Oxidation zur Sulfensäure bei  $37^\circ\text{C}$  eine Geschwindigkeitskonstante von  $0.87\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ <sup>[167]</sup>, während sie für PTP1B ( $\text{pK}_a = 5.5$ ) auch bei  $30^\circ\text{C}$  noch



Disulfide und Sulfonylamide können ebenfalls durch Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Die daraus entstehenden Thiosulfinate oder Sulfonylamide können jedoch im Gegensatz zur Sulfinsäure wieder durch biologisch verfügbare Thiole reduziert werden.<sup>[178,179]</sup>

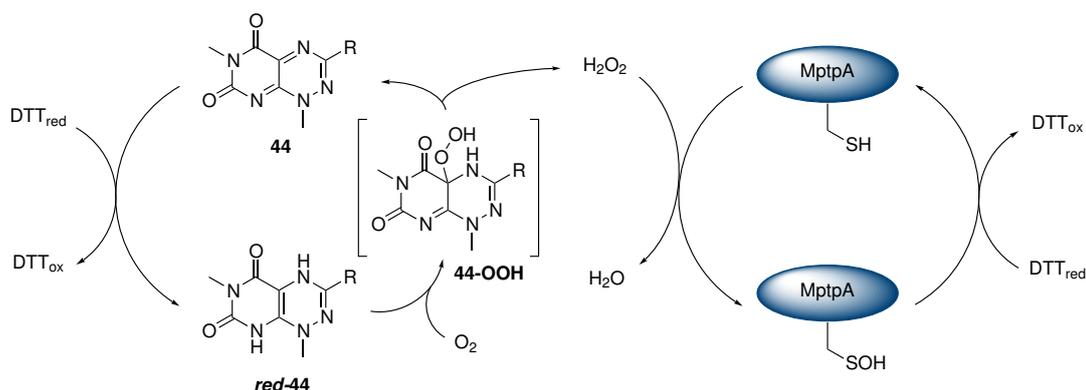
Neben Proteintyrosinphosphatasen können noch zahlreiche andere thiolabhängige Proteine durch Wasserstoffperoxid reguliert werden. Es wurde beobachtet, dass Prozesse wie Zellproliferation<sup>[180,181]</sup> und DNA-Synthese<sup>[182]</sup> durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert werden können. Viele Zusammenhänge der Redoxregulierung konnten bislang jedoch nicht geklärt werden. Ein großes Hindernis ist dabei der Mangel geeigneter Werkzeuge zur Produktion von Wasserstoffperoxid innerhalb von Zellen. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Zellmedium ist aufgrund der limitierten Aufnahme rate problematisch, da das durch die Zellmembran tretende Wasserstoffperoxid durch Katalasen schnell wieder abgebaut wird. Häufig genutzte Agenzien wie der Phorbol ester PMA (phorbol myristate acetate) führen zur Aktivierung von NADPH-Oxidasen.<sup>[183]</sup> Diese katalysieren die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ).<sup>[184]</sup> Erst in weiteren Schritten wird beispielsweise durch Superoxid-Dismutase (SOD) durch Dismutation von Superoxid neben Wasser auch Wasserstoffperoxid erzeugt.



## 7 Zielstellung Thema II

Pyrimidotriazindione sind redoxaktive Verbindungen, die in einer Vielzahl von Hochdurchsatz-Screenings als äußerst aktive Verbindungen identifiziert wurden. Ihre Wirkungsweise ist bislang jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den Inhibitionsmechanismus von Pyrimidotriazinen **44** gegenüber Proteintyrosinphosphatasen näher zu untersuchen. Die Untersuchungen sollten anhand des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** durchgeführt werden, da dies die in Vorarbeiten aktivste Verbindung war. Die Synthese dieses Pyrimidotriazins stellte dabei den Beginn der Arbeit dar. Basierend auf Vorarbeiten von Richard Raz wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pyrimidotriazine **44** wie Flavine Redoxzyklen durchlaufen, in deren Verlauf Wasserstoffperoxid erzeugt wird (Abb. 7.1). Zum einen sollten die Intermediate des Redoxzyklus identifiziert werden, zum anderen sollten die kinetischen Charakteristika der Reaktionen untersucht werden. Dazu gehörte unter anderem die Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts und die Quantifizierung des im Verlauf des Redoxzyklus gebildeten Wasserstoffperoxids. Darüber hinaus sollte der Inhibitionsmechanismus am Beispiel von MtpA, einer Proteintyrosinphosphatase aus dem *Mycobacterium tuberculosis*, aufgeklärt werden. Dies sollte unter anderem durch Derivatisierung des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** erreicht werden.



**Abb. 7.1:** Postulierter Inhibitionsmechanismus basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit zu Flavinen

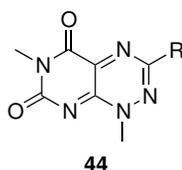
In weiteren Experimenten sollte der Einfluß des Reduktionsmittels auf die Phospha-

taseinhibition untersucht werden. Als wichtiger Bestandteil der Arbeit sollte geklärt werden, ob die Inhibition von Phosphatasen allein auf die Menge des gebildeten Wasserstoffperoxids zurückzuführen ist.

Abschließend sollten die Pyrimidotriazine in einer zellulären Anwendung auf die Fähigkeit zur Wasserstoffperoxidproduktion getestet werden.

## 8 Pyrimidotriazine zur *in vitro*- und *in vivo*-Generierung von Wasserstoffperoxid

Im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings der ChemBioNet-Fragment-Bibliothek gegen die Proteintyrosinphosphatasen SHP-2, Ptp1B und MptpA mit Verbindungen unterhalb 300 Da wurde die Klasse der Pyrimidotriazindione **44** (Abb. 8.1) als Inhibitoren im nanomolaren Bereich identifiziert. Bereits 1961 wurde durch *Latuasan et al.* von der antibiotischen Aktivität des Toxoflavins (Abb. 8.1, R = H) berichtet.<sup>[185,186]</sup> Im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisierte Richard Raz 20 Derivate, die sich als unterschiedlich potent erwiesen. Lineweaver-Burk-Plots ließen eine reversible, kompetitive Inhibition als Mechanismus vermuten. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Verbindungen ihre Inhibitionsfähigkeit in Abwesenheit von Dithiothreitol (DTT), das dem Phosphatase-Assay als Reduktionsmittel für die redoxsensitiven Phosphatasen zugesetzt wurde, verloren. Mittels NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Thiophenol als Reduktionsmittel zu einer Lösung des Styrylpyrimidotriazins **45** in deuteriertem DMSO zu einer Veränderung des Spektrums führte. Nach mehrstündiger Sättigung der Lösung mit Luftsauerstoff wies das NMR-Spektrum wieder die Signale des Ausgangszustandes auf.



**Abb. 8.1:** Pyrimidotriazindion **44**

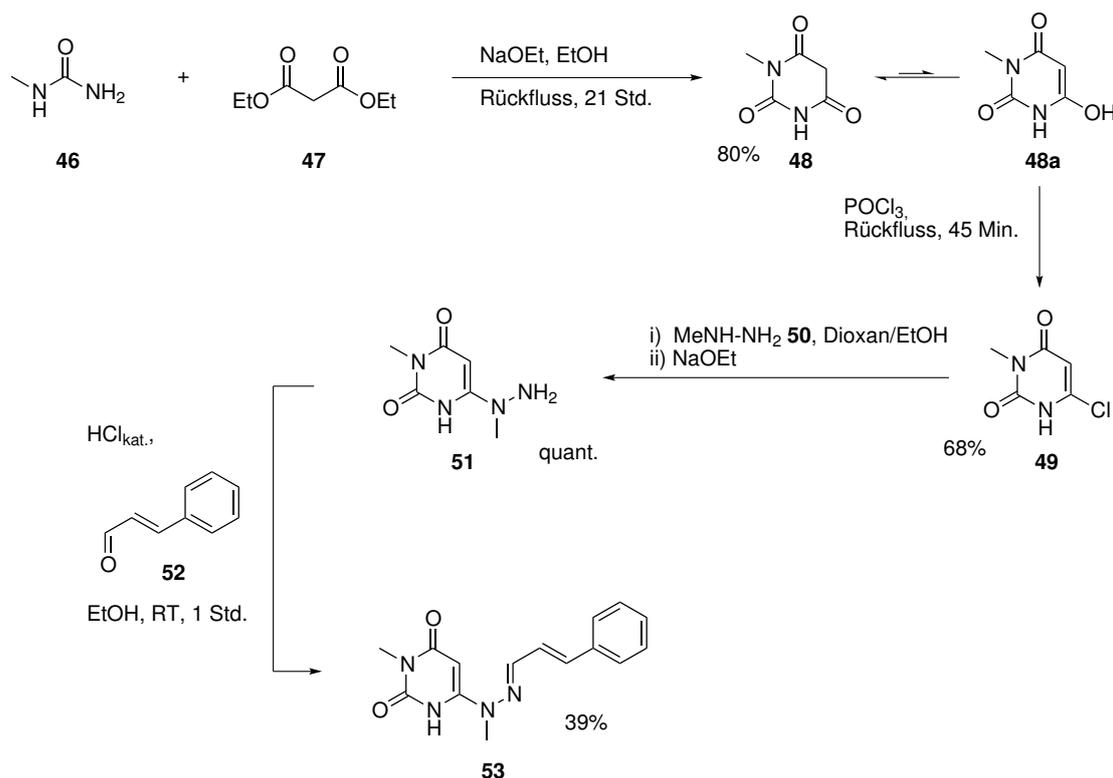
Im Rahmen von Untersuchungen der oxidativen Deaktivierung von PTP1B durch Pyridazinanaloga postulierten *Tjernberg et al.*, dass auch die Inhibition von Pyrimidotriazinen **44** auf einen oxidativen Mechanismus zurückzuführen sein könnte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Flavinen wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch

Pyrimidotriazine einen Redoxzyklus durchlaufen infolgedessen Wasserstoffperoxid gebildet wird. Diese Hypothese sollte anhand von 3-Styrylpyrimidotriazin **45** überprüft werden, da dies das in den Phosphatase-Assays aktivste Pyrimidotriazinderivat war.

## 8.1 Synthese der Pyrimidotriazinderivate

### 8.1.1 Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin **45**

Das 3-Styrylpyrimidotriazin **45** wurde in einer fünfstufigen, linearen Synthese dargestellt. Ausgehend von *N*-Methylharnstoff **46** und Malonsäurediethylester **47** wurde zunächst 1-Methylbarbitursäure **48** hergestellt. Dafür wurde Malonsäurediethylester **47** unter Zusatz von einem Äquivalent Natriumethanolat vorgelegt, dann mit einem Äquivalent *N*-Methylharnstoff **46** 21 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der nach dem Abkühlen entstandene Niederschlag wurde durch Zugabe von Wasser wieder in Lösung gebracht und mit Salzsäure angesäuert. Natriumchloridreste wurden mit Wasser/Ethanol ausgewaschen. Die so erhaltene 1-Methylbarbitursäure **48** wurde nach einer Vorschrift von *Nübel et al.* durch 45-minütiges Kochen unter Rückfluss bei 125 °C mit Phosphorylchlorid zu 6-Chlor-3-methyluracil **49** umgesetzt.<sup>[187]</sup> Die 1-Methylbarbitursäure **48** liegt dabei in einem tautomeren Gleichgewicht mit der Enolform **48a** vor. Die reaktive Spezies **48a** stellt eine vinyloge Säure dar, die durch 45minütiges Kochen in POCl<sub>3</sub> in das vinyloge Säurechlorid **49** überführt wird. Überschüssiges Phosphorylchlorid wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Rückstand verblieb ein braunes Öl, das durch vorsichtigen Zusatz von Eiswasser in einen gelben Niederschlag überführt wurde. In der dritten Synthesestufe wurde das Chloruracil **49** mit Methylhydrazin **50** nach einer von Richard Raz für die Mikrowelle adaptierten Vorschrift umgesetzt. Zunächst wurde beides in Dioxan/Ethanol durch elfminütiges Erhitzen in der Mikrowelle bei 90 °C in Lösung gebracht. Anschließend wurde eine Natriumethanolat-Suspension zugegeben und vier Minuten bei 80 °C ebenfalls in der Mikrowelle erhitzt. Durch das Ethanolat-Anion wird das in der Reaktion freiwerdende Proton abgefangen, während das Natriumion durch die Salzbildung mit dem Chloridion eine zusätzliche Triebkraft der Reaktion darstellt. Im darauf folgenden Schritt wurde durch Zusatz von Zimtaldehyd **52** und katalytischen Mengen Salzsäure nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur das entsprechende Hydrazon **53** als oranger Niederschlag gebildet.<sup>[188]</sup>



**Abb. 8.2:** Schema der Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin. Dargestellt sind alle Synthesestufen bis zum Hydrazon **53**.

In der letzten Stufe wurde das Hydrazon **53** in Essigsäure mit etwas Wasser durch Zusatz von Natriumnitrit zu einer Mischung des Nitrons **56** und dem 3-Styrylpyrimidotriazin **45** umgesetzt. Hier kann analog zu dem von *Yoneda et al.* vorgeschlagenen Mechanismus für Isoalloxazine angenommen werden, dass es zu einer Nitrosylierung der 5-Position kommt (Abb. 8.3).<sup>[189]</sup> *Goldner et al.* berichten von einem Tautomeriegleichgewicht zwischen der Nitrosoform **nitroso-54** und der Oximform **oxim-54**.<sup>[190]</sup> Aus letzterer Form sollte die Dehydratisierung wesentlich leichter ablaufen. Aus dieser Zwischenstufe entsteht durch Zyklisierung das Pyrimidotriazin **45** bzw. dessen N-Oxid **56**. Die Bildung des Nitrons **56** ist durch überschüssiges Nitrit zu erklären, das hier als Oxidationsmittel fungiert. Durch Reduktion mit zwei Äquivalenten Thiophenol wurde das Nitron **56** ebenfalls in das Endprodukt **45** überführt. Als Nebenreaktion des Zyklisierungsschritts ist die Bildung des Pyrazols **55** zu beobachten. Es kann aus der Nitrosoverbindung **54** gebildet werden, wie von *Yoneda et al.* durch Erhitzen einer entsprechenden isolierten Nitrosoverbindung gezeigt wurde.<sup>[191]</sup> Der Mechanismus der Pyrazolbildung ist bislang jedoch nicht bekannt.

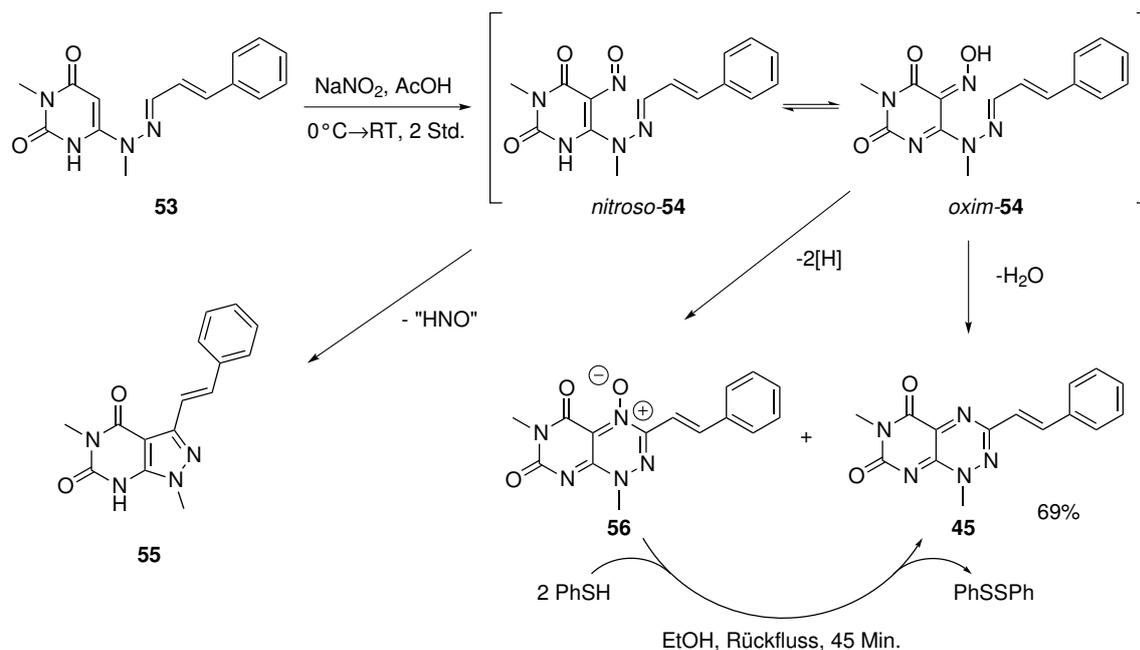


Abb. 8.3: Zyklisierungsschritt der Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin **45**, sowie Bildung des Pyrazolnebenprodukts **55**

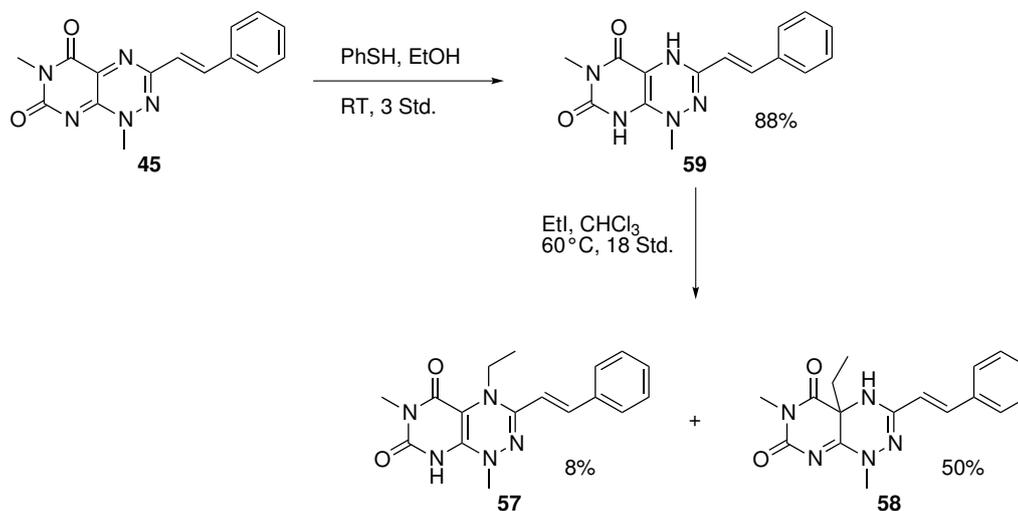
## 8.1.2 N-Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **57** und 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **58**

### 8.1.2.1 Synthese der alkylierten 3-Styrylpyrimidotriazinderivate

In Studien des Redoxzyklus von Flavinen wurde berichtet, dass die Alkylierung der  $\text{N}^5$ -Position im Flavin eine Verlangsamung des Reoxidationsschritts zur Folge hat. Laut Hypothese müsste die Verlangsamung des Redoxzyklus eine geringere Wasserstoffperoxidproduktion und somit auch eine geringere Phosphataseinhibition zur Folge haben. Die Alkylierung des C4a-Brückenkohlenstoffatoms hat hingegen eine völlige Zerstörung des Redoxsystems zur Folge, wodurch keine inhibitorische Wirkung messbar sein sollte. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Pyrimidotriazinderivate **57** und **58** synthetisiert.

Ausgehend von 3-Styrylpyrimidotriazin **45** wurde zunächst eine Reduktion mit 2.3 Äquivalenten Thiophenol in Ethanol zum 4,8-Dihydropyrimidotriazin **59** unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Aufgrund der geringeren Löslichkeit des Dihydropyrimidotriazins **59** konnte dies mit kaltem, entgastem Ethanol von nicht umgesetztem Edukt, überschüssigem Thiophenol und Diphenyldisulfid gereinigt und isoliert werden. Anschließend wurde es mit zehn Äquivalenten Ethyliodid in Chloroform bei  $60^\circ\text{C}$  in Gegenwart von zwei Äquivalenten DBU umgesetzt. Reaktionen ohne Basenzusatz zeigten

keinen Umsatz zum gewünschten Produkt. Der Einsatz einer nicht sterisch gehinderten Base wie Natriumhydroxid resultierte hauptsächlich in einer Demethylierungsreaktion der N<sup>1</sup>-Position.



**Abb. 8.4:** Synthese des N<sup>4</sup>-Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazins **57** und des 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazins **58**

Die Alkylierung mit Ethyliodid findet unter allen getesteten Bedingungen bevorzugt am 4a-Kohlenstoffatom statt. Die Nucleophilie des Brückenkopfkohlenstoffs lässt sich vor allem durch die Enaminstrukturelemente erklären, während der N<sup>4</sup>-Stickstoff strukturell eher Amidincharakter aufweist. Dies wird auch in der chemischen Verschiebung der NH-Gruppe von 6.93 ppm im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 8.9a) deutlich. Zudem ist der C4a-Kohlenstoff eine ausgesprochen „weiche“ Position. Der Stickstoff in der 4-Position besitzt aufgrund der geometriebedingten Lokalisierung des freien Elektronenpaares, die sich aus der Wannenform des 1,4-Dihydrotriazingerüsts ergibt, eher „harten Charakter“.<sup>[192,193]</sup> Die Anwendung des HSAB-Konzepts<sup>[194]</sup> bestätigt also ebenfalls, dass die Reaktion des „weichen“ Elektrophils Ethyliodid am C4a-Kohlenstoff bevorzugt sein muss. Zu diesen Ergebnissen kamen auch *Ghisla et al.* in ihrer Untersuchung zur reduktiven Alkylierung des Flavinkerns.<sup>[192]</sup> Das Produktverhältnis der isolierten Pyrimidotriazinderivate betrug ca. 6:1 zugunsten des C4a-alkylierten Produkts **58**, was auch dem Flächenverhältnis der Peaks im LC/MS-Chromatogramm bei 254 nm entspricht. Es ist daher legitim das Produktverhältnis der Reaktionen unter verschiedenen Bedingungen anhand der LC/MS-Chromatogramme zu diskutieren (Tab. 8.1). Ziel der Optimierung war neben der Erhöhung der Ausbeute auch ein ausgeglicheneres Produktverhältnis. In Testansätzen wurde die Reaktion zunächst in Chloroform bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei sich ein Produktverhältnis von 4:1 zugunsten

des C4a-alkylierten Produkts **58** ergab. Es kam jedoch zu keinem kompletten Umsatz. Eine Erhöhung der Temperatur auf 60 °C resultierte im gleichen Zeitraum in einem kompletten Umsatz und in einem Produktverhältnis von fast 2:1 bei einer erhöhten Gesamtausbeute von 71 %. Die Durchführung der Reaktion in Ethanol erhöhte die Gesamtausbeute zwar auf 80 %, verschlechterte jedoch das Produktverhältnis auf 3:1. Die Ausbeute des N<sup>4</sup>-alkylierten Produkts **57** war somit geringer als in Chloroform. Durch den Einsatz von Toluol verschob sich das Produktverhältnis auf 17:1 bei gegenüber Chloroform konstanter Gesamtausbeute. Daher wurde Chloroform als Lösungsmittel verwendet. Interessanterweise ergab sich im präparativen Maßstab wie bereits beschrieben ein Verhältnis von 6:1.

**Tab. 8.1:** Produktverhältnisse des N-alkylierten Derivats **57** und des C-alkylierten Derivats **58** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen bestimmt mittels LC/MS bei 254 nm

Lösungsmittel	Temperatur	Produktverhältnis	Gesamtausbeute ( <b>57</b> + <b>58</b> )
CHCl <sub>3</sub>	RT	4:1	68 %
CHCl <sub>3</sub>	60 °C	2:1	71 %
EtOH	60 °C	3:1	80 %
Toluol	60 °C	17:1	80 %
CHCl <sub>3</sub>	60 °C	6:1	53 % <sup>a</sup>

<sup>a</sup>präparativer Maßstab, isolierte Ausbeute

### 8.1.2.2 Strukturelle Zuordnung der Konstitutionsisomere mittels NMR-Spektroskopie

Die strukturelle Zuordnung der durch präparative HPLC getrennten Konstitutionsisomere erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Da das C-alkylierte Isomer **58** noch immer das amidinähnliche Proton am N<sup>4</sup>-Stickstoff aufweisen musste, konnte dieses unter Berücksichtigung des HMQC-Spektrums, in dem keine Kopplung zu einem Kohlenstoffatom sichtbar war, dem Spektrum in Abb. 8.5 zugeordnet werden. Im Gegensatz zum N-alkylierten Isomer **57** enthält das C-alkylierte Isomer **58** keine Doppelbindung mehr zwischen den Kohlenstoffen 4a und 8a. Dies spiegelt sich auch im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum wider. Im Gegensatz zum sp<sup>2</sup>-hybridisierten C4a-Kohlenstoff des N-alkylierten Isomers **57** ( $\delta = 101.4$  ppm) ist beim sp<sup>3</sup>-hybridisierten Brückenkopfkohlenstoff des C-alkylierten Isomers **58** eine deutliche Hochfeldverschiebung zu beobachten

( $\delta = 55.1$  ppm). Das C-alkylierte Isomer **58** konnte somit eindeutig zugeordnet werden.

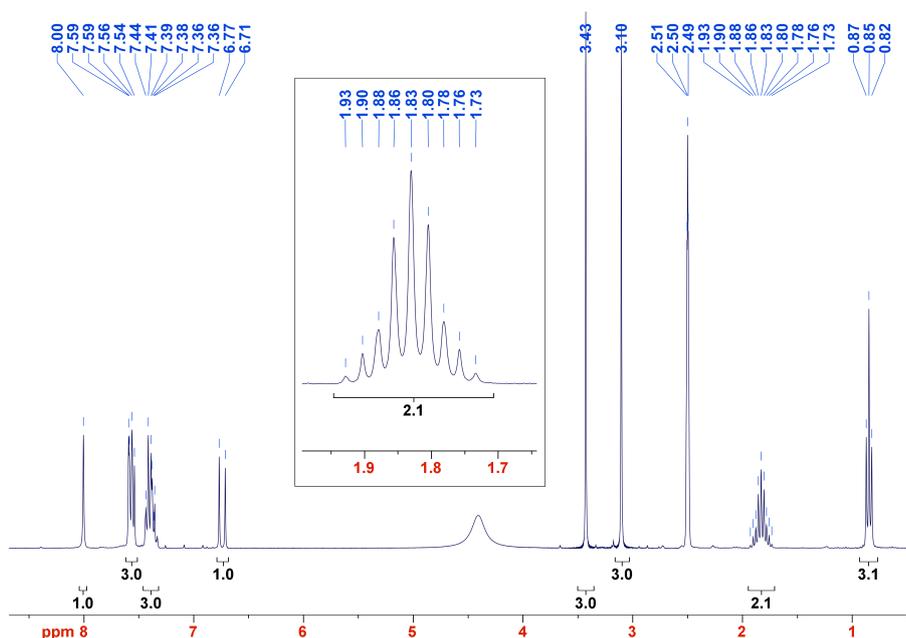


Abb. 8.5:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des C-alkylierten 3-Styrylpyrimidotriazins **58** in  $\text{DMSO-}d_6$

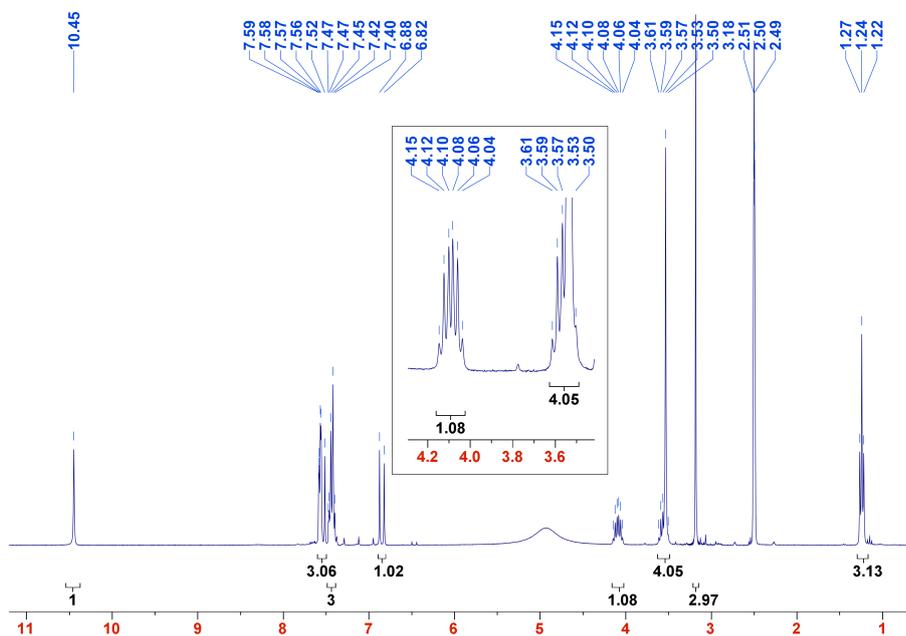


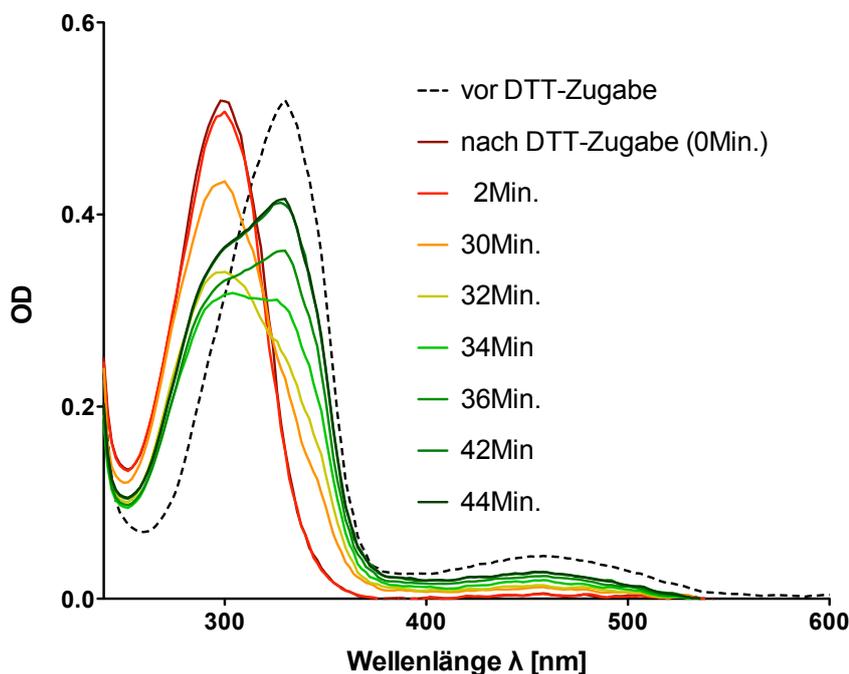
Abb. 8.6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des N-alkylierten 3-Styrylpyrimidotriazins **57** in  $\text{DMSO-}d_6$

Auffällig in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Isomere sind die Methylengruppen der Ethylgruppe. Im Fall der N-alkylierten Verbindung **57** zeigt jedes der beiden diastereotopen Methylenprotonen ein isoliertes, sechsfach aufgespaltenes Signal. Das Sextett

kommt durch die Überlappung der geminalen Kopplung der Methylenprotonen untereinander ( $^2J = 12\text{ Hz}$ ) und der vicinalen Kopplung zur Methylgruppe ( $^3J = 7.0\text{ Hz}$ ) zustande (Abb. 8.6). Hingegen ist bei der C-alkylierten Verbindung **58** als Folge des geringen Unterschiedes der chemischen Verschiebungen eine Überlappung beider Methylenprotonensignale zu beobachten.

## 8.2 Untersuchungen zur Charakterisierung des Redoxzyklus der Pyrimidotriazine

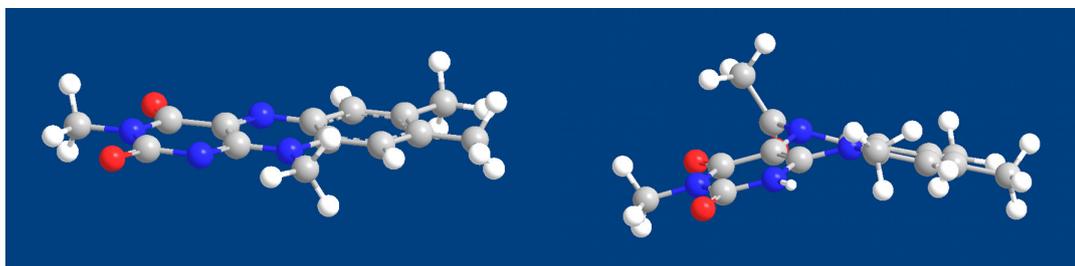
Als nächstes sollte der Redoxzyklus der Pyrimidotriazine näher charakterisiert werden. Laut Hypothese erfolgt zunächst eine Reduktion des Pyrimidotriazins. Die Reoxidation durch Sauerstoff führt zum Ausgangsprodukt unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Durch kinetische Untersuchungen mittels UV/vis-Spektroskopie sollte zunächst ermittelt werden, welcher Schritt des Redoxzyklus geschwindigkeitsbestimmend ist.



**Abb. 8.7:** UV/vis-Spektren von  $10\ \mu\text{M}$  3-Styrylpyrimidotriazin **45** in  $25\ \text{mM}$  TRIS HCl-Puffer vor und nach DTT-Zugabe, sowie der zeitliche Verlauf der Reoxidation. Alle Spektren sind durch Subtraktion des Pufferspektrum korrigiert worden.

Dazu wurde das 3-Styrylpyrimidotriazin **45** in einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  in einem

25 mM TRIS HCl-Puffer pH 7.0<sup>1</sup> gelöst. Zunächst wurde ein Spektrum ohne DTT-Zusatz aufgenommen. Nach DTT-Zugabe wurde ein zeitlicher Verlauf der Spektren in einminütigen Abständen registriert. Diese deuteten auf eine sehr schnelle Reduktion des Pyrimidotriazins hin, was durch die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 329 nm (Pyrimidotriazin) zu 298 nm ersichtlich ist. Die Rückkehr zum Ausgangsspektrum des Pyrimidotriazins **45** verlief hingegen nur langsam und war erst sichtbar, als das DTT in der Lösung aufgebraucht war. Die hypsochrome Verschiebung des Maximums im UV-Spektrum lässt sich durch eine Verkleinerung des  $\pi$ -Systems erklären. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der reduzierten Spezies um ein 4,8-Dihydropyrimidotriazin **59** handelt. Während das Pyrimidotriazin **45** nahezu planar ist<sup>[195]</sup> und damit einen hohen Grad an Delokalisation der  $\pi$ -Elektronen bietet, ist anzunehmen, dass das 4,8-Dihydropyrimidotriazin **59** aufgrund der Antiaromatizität des Dihydrotriazinringes nicht planar ist. Vielmehr ist eine Struktur ähnlich der von Dihydroflavinen anzunehmen, in der die Ringstruktur um eine Achse zwischen den Stickstoffen N<sup>1</sup> und N<sup>4</sup> gebeugt ist und der Dihydropyrazinring eine Wannenkonformation ähnlich der des 1,4-Cyclohexadiens einnimmt (Abb. 8.8, rechts).<sup>[196]</sup> Eine solche Wannenkonformation wurde durch Strukturrechnungen auch für das 1,4-Dihydro-1,2,4-triazin bestätigt.<sup>[193]</sup>

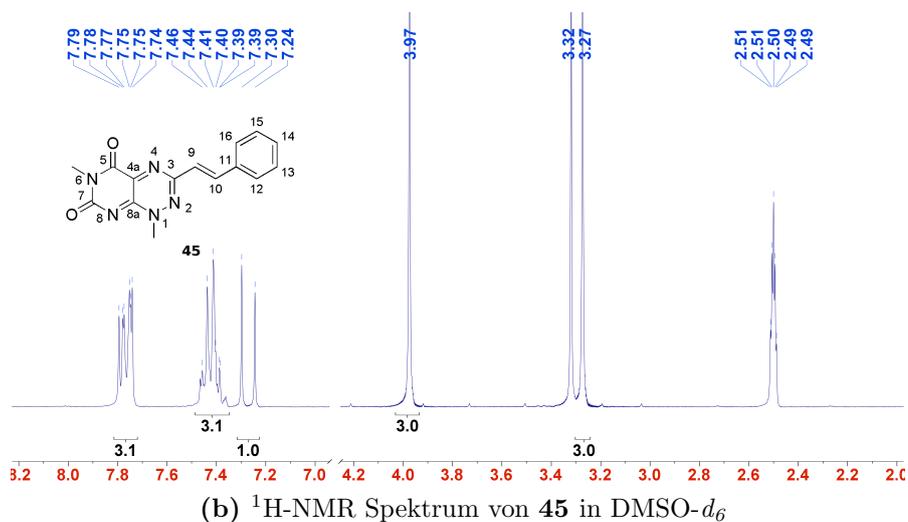
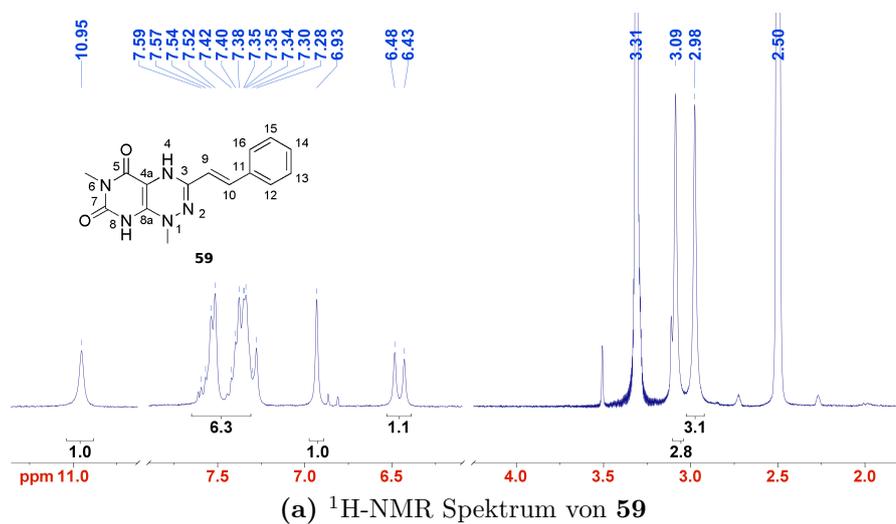


**Abb. 8.8:** Struktur des Lumiflavins<sup>[197]</sup> (links) und des *N*<sup>5</sup>-Acetyl-1,5-dihydro-lumiflavins<sup>[196]</sup> (rechts)

Um die durch UV/vis-Spektroskopie erhaltenen Hinweise auf ein Dihydropyrimidotriazin zu festigen, wurde das Zwischenprodukt des Redoxzyklus isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Dafür wurde das 3-Styrylpyrimidotriazin **53** mit zwei Äquivalenten Thiophenol in entgastem Ethanol umgesetzt und durch mehrfaches Waschen mit Ethanol von überschüssigem Thiophenol gereinigt. Mit der Reduktion des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** war eine Verfärbung von leuchtend rot nach dunkelbraun verbunden. Eine Analyse mittels LC/MS war aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit nicht möglich. Ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der reduzierten Verbindung **59** in ent-

<sup>1</sup>25 mM TRIS HCl, 50 mM NaCl, 10 % Glycerol, 2 mM EDTA, 0.01 % Brij 35 (Puffer des PTP-Assays)

gastem DMSO- $d_6$  (Abb. 8.9a) lässt deutlich die Protonen der Stickstoffe N<sup>8</sup> bzw. N<sup>4</sup> bei 10.95 ppm bzw. 6.93 ppm erkennen. Darüber hinaus kam es im Vergleich zum <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des 3-Styrylpyrimidotriazins (Abb. 8.9b) zu einer deutlichen Hochfeldverschiebung der N<sup>1</sup>-Methylgruppe.



**Abb. 8.9:** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR Spektren von 4,8-Dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **59** und 3-Styrylpyrimidotriazin **45** in DMSO- $d_6$

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass durch Reduktion des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** das 4,8-Dihydropyrimidotriazin **59** gebildet wird. Die daraus erfolgende Reoxidation mit Sauerstoff stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Redoxzyklus dar.

## 8.3 Quantifizierung des durch Pyrimidotriazine gebildeten Wasserstoffperoxids

Nachdem zunächst der Redoxzyklus und dessen Intermediate untersucht und identifiziert wurden, sollte nun das Produkt des Redoxzyklus, Wasserstoffperoxid, quantifiziert werden. Zunächst wurde dazu ein allgemein gebräuchlicher Enzym-gekoppelter Assay ausgewählt. Die Wahl fiel hierbei auf den 4-Aminoantipyrin-Assay. Dabei wird 4-Aminoantipyrin **60** in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Phenol durch Meerrettichperoxidase zu einer chinoiden Verbindung **61** umgesetzt (Abb.8.10). Deren Absorption wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen.

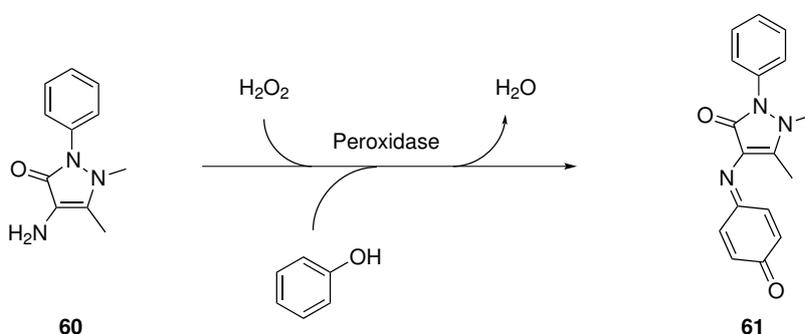


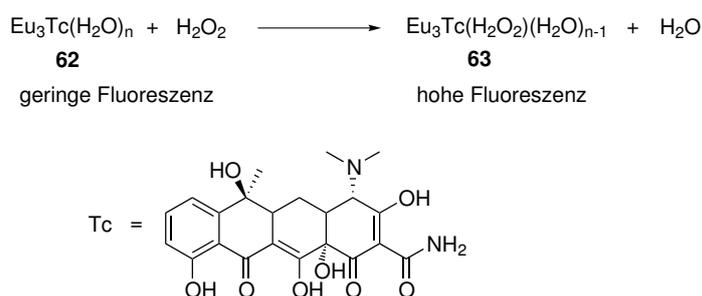
Abb. 8.10: 4-Aminoantipyrin-Assay zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Es zeigte sich jedoch, dass unter Assaybedingungen kaum Wasserstoffperoxid detektiert werden konnte. Eine Literaturrecherche bestätigte die naheliegende Vermutung, dass die Thiophilie des Eisenzentrums der Peroxidase deren Inaktivierung durch DTT zur Folge haben musste.<sup>[198]</sup>

### 8.3.1 Europium-Tetracyclin-Assay

Als alternative Methode zur Quantifizierung des gebildeten Wasserstoffperoxids musste daher ein Peroxidase-unabhängiger Assay gefunden werden, der durch den Zusatz von DTT nicht beeinflusst wird. Dadurch wurden bereits zahlreiche, häufig genutzte Methoden eliminiert, darunter auch die Detektion durch Dichlorodihydrofluorescein<sup>[199,200]</sup>, Dihydrorhodamin 123<sup>[201,202]</sup> und Luminol<sup>[203]</sup>. Die beiden erstgenannten Methoden finden im Bereich zellulärer Messungen von oxidativem Stress eine breite Anwendung.<sup>[204–206]</sup> Obwohl es eine Vielzahl verschiedener Detektionsmethoden für Wasserstoffperoxid gibt, erfüllten nur wenige die Bedingungen, die an diesen Assay gestellt wurden. Das wichtigste Kriterium war die Kompatibilität mit den Konditionen

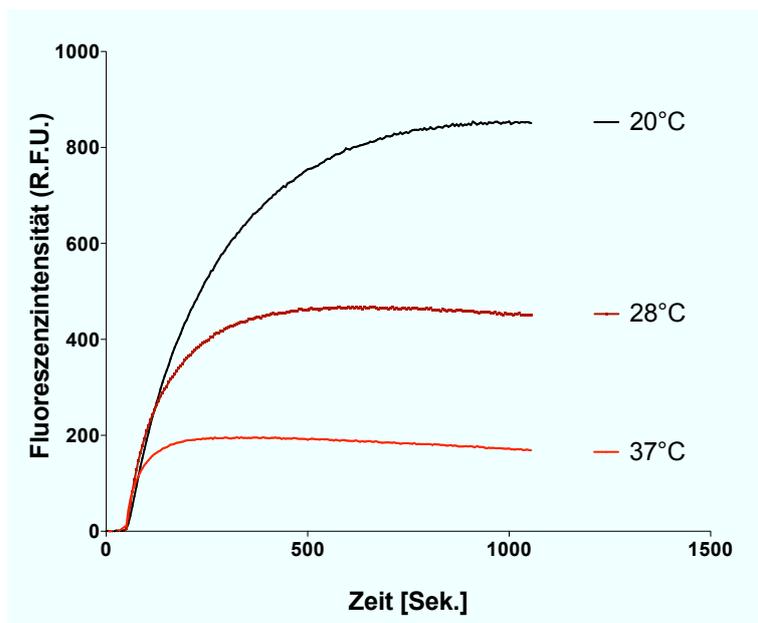
des Proteintyrosinphosphatase-(PTP)-Assays, da in weiteren Experimenten ermittelt werden sollte, ob die PTP-Inhibition allein auf Basis des gebildeten Wasserstoffperoxids erklärt werden kann. Dies setzte zunächst voraus, dass dieser Assay bei nahezu physiologischem pH-Wert funktionieren musste. Die Detektionsgeschwindigkeit stellte ebenfalls einen wichtigen Faktor dar, um die Kinetik der Wasserstoffperoxidbildung bei verschiedenen Pyrimidotriazinkonzentrationen verfolgen zu können. Im Jahr 2002 wurde von *Wolfbeis et al.* ein nichtenzymatischer Fluoreszenzassay vorgestellt, der auf der Fluoreszenzverstärkung eines Europium-Tetracyclin-Komplexes **62** ( $\text{Eu}_3\text{Tc}$ ) durch Zugabe von Wasserstoffperoxid beruht (Abb. 8.11).



**Abb. 8.11:** Europium-Tetracyclin-Assay zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

Neben der Tatsache, dass dieser Assay ohne Enzymkopplung möglich ist, sind auch die Detektion bei nahezu neutralem pH-Wert, ein großer Stokesshift von 211 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 616 \text{ nm}$ ) und eine hohe Spezifität für Wasserstoffperoxid von großem Vorteil.<sup>[207]</sup> Aufgrund der Bedingungen des Phosphatase-Assays musste der Europium-Tetracyclin-Assay jedoch etwas modifiziert werden. Im Wesentlichen betraf dies die Temperatur. Die maximale Fluoreszenzintensität des  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Komplexes **63** wird bei Messungen bei einer Temperatur von 20 °C beobachtet. Da die Inkubation für den Phosphatase-Inhibitionsassay, währenddessen der wesentliche Anteil des Wasserstoffperoxids gebildet wird, bei 37 °C stattfand, wurde auch der  $\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Assay bei dieser Temperatur durchgeführt. Dies hatte jedoch den Nachteil, dass die Fluoreszenzintensität stark abnahm, woraus eine geringere Empfindlichkeit des Assays resultierte. Die mit der Temperaturerhöhung verbundene Zunahme der Komplexbildungsgeschwindigkeit ermöglichte jedoch eine schnellere Detektion (Abb. 8.12).

Sowohl für die Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Komplexbildung als auch für die Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Erzeugung durch Pyrimidotriazine wurde die Europium-Tetracyclin-Lösung mit 1 mM DTT vorgelegt und fünf Minuten auf 37 °C bis zur Konstanz des Fluoreszenzsignals temperiert. Nach ca. 50 Sekunden Messzeit wurde entweder Wasserstoffperoxid (Messung der Komplexbildung) oder das 3-Styrylpyrimidotriazin **45** (Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Erzeugung) zugegeben.



**Abb. 8.12:** Vergleich der Fluoreszenzintensitäten und der Detektionsgeschwindigkeiten des Europium-Tetracyclin-Assays nach Zusatz von  $800\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $20^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$

Vergleicht man nun die Messungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Komplexbildung (Abb. 8.13) mit den Messungen der Wasserstoffperoxiderzeugung bei verschiedenen Konzentrationen des Styrylpyrimidotriazins **45** (Abb. 8.15), so ist festzustellen, dass der Komplexbildungsschritt schneller ist als die Bildung des Wasserstoffperoxids. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Erzeugung stellt also den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Detektion dar. Eine Auswertung über die Bestimmung der Anfangssteigungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Komplexbildung ist somit nicht möglich. Hinzu kommt, dass bei  $37^\circ\text{C}$  ein Prozess beobachtet werden kann, der für eine Abnahme der Fluoreszenz im Laufe der Zeit sorgt. Dieser Prozess ist bezüglich des Wasserstoffperoxids konzentrationsabhängig und ist umso größer, je höher die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ist. Daher wurde die Wasserstoffperoxid-Detektion nur auf den unteren Konzentrationsbereich ( $< 100\ \mu\text{M}$ ) begrenzt. Hier ist keine Fluoreszenzabnahme zu beobachten. Vielmehr wird ein stationärer Zustand erreicht. Anhand der Fluoreszenzintensitäten dieses stationären Zustands wurde nun eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 8.14). Vergleicht man die Fluoreszenzwerte der Kalibrierung mit denen der Wasserstoffperoxiderzeugung, so stellt man fest, dass nanomolare Konzentrationen des Styrylpyrimidotriazins **45** bereits ausreichen, um innerhalb von Minuten eine Wasserstoffperoxidkonzentration im zweistelligen Mikromolarbereich zu erzeugen. So wird beispielsweise von  $71\ \text{nM}$  des Pyrimidotriazins **45** nach zehn Minuten eine Wasserstoffperoxidkonzentration von  $24\ \mu\text{M}$  erreicht. Dies entspricht ca. 338 „turnover“. Jedes Pyrimidotriazinmolekül hat den Redoxzyklus nach zehn Minuten im Durchschnitt 338mal

durchlaufen und in jedem Zyklus jeweils ein Wasserstoffperoxidmolekül erzeugt.

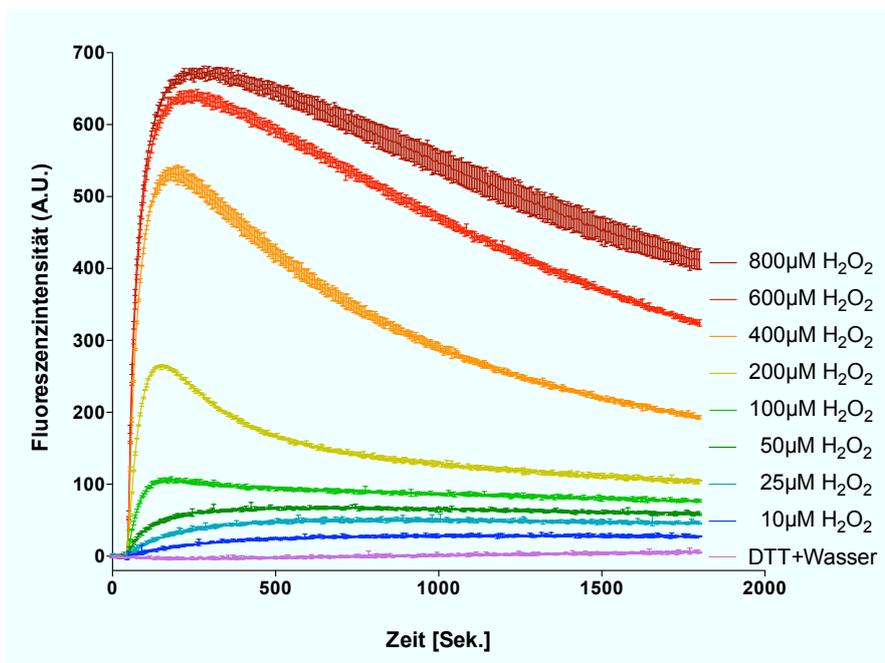


Abb. 8.13: Kinetik der Komplexbildung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Eu<sub>3</sub>Tc-Komplexes **63** bei 37°C

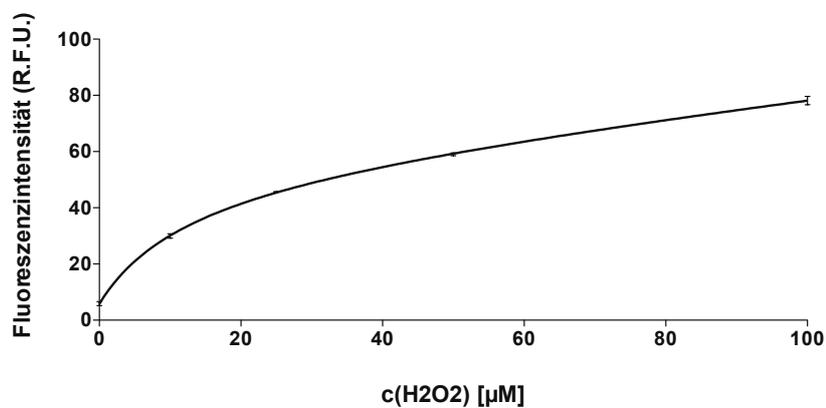


Abb. 8.14: Kalibrierkurve der Fluoreszenzabhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration im stationären Zustand

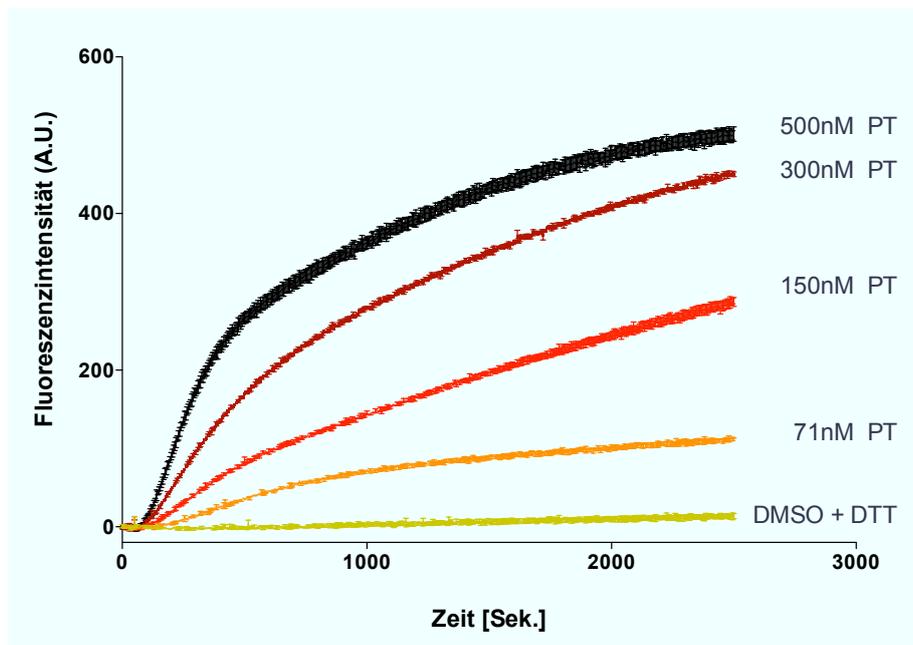


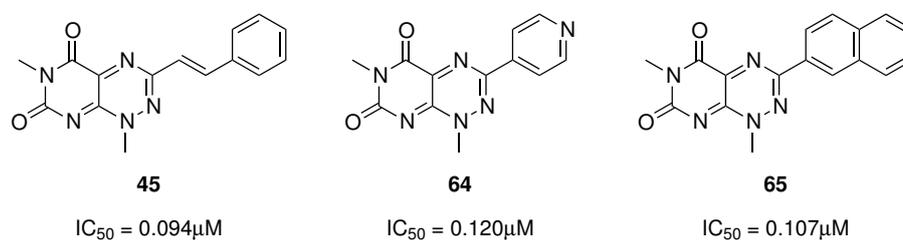
Abb. 8.15: Kinetik der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung bei  $37^\circ\text{C}$  durch Styrylpyrimidotriazindion **53** (PT)

## 8.4 Experimente zur Inhibition von Proteintyrosinphosphatasen durch Pyrimidotriazine

Die bisherigen Ergebnisse zeigten bereits bei nanomolaren Konzentrationen des Pyrimidotriazins **45** eine starke Wasserstoffperoxidentwicklung. Die mit den Pyrimidotriazinen verbundene Inhibitionswirkung auf Proteintyrosinphosphatasen sollte in weiteren Experimenten am Beispiel von MptpA untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt bei den Untersuchungen war unter anderem die Erklärung der beobachteten Kompetitivität der Inhibition aus den Lineweaver-Burk-Plots<sup>2</sup>. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Inhibition der PTPs allein durch das gebildete Wasserstoffperoxid erklärt werden kann. Für die Messung der Phosphatase-Inhibition wurden 3-Styrylpyrimidotriazin **45**, 3-(4-Pyridyl)- **64** und 3-(2-Naphthyl)pyrimidotriazin **65** in einem Standard-pNPP-Assay getestet. In einer 384-Well Mikrotiterplatte wurden 50 ng MptpA in 25 mM TRIS HCl-Puffer pro Vertiefung vorgelegt und mit verschiedenen Konzentrationen des zu testenden Pyrimidotriazins versetzt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Substrat *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) in einer Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben und die Absorption bei 405 nm über 15 Minuten aufgezeichnet. Als Blind-

<sup>2</sup>Vorarbeiten von Richard Raz

wert wurde der Absorptionsverlauf von in Puffer gelöstem pNPP subtrahiert, um eine mögliche nichtenzymatische Hydrolyse aus den Werten zu eliminieren. Die Anfangssteigungen wurden in den ersten fünf Minuten bestimmt. Dabei wurde durch Berechnung des Bestimmtheitsmaßes sichergestellt, dass die Steigung in diesem Bereich linear war. Die Auftragung der Anfangssteigungen gegen den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration ergab eine sigmoidale Kurve, deren Wendepunkt mittels *GraphPad Prism 5* ermittelt wurde. Die Umrechnung des logarithmischen Wertes am Wendepunkt ergibt den  $IC_{50}$ -Wert, d.h. die Konzentration bei der das Enzym zu 50% inhibiert ist. Für die Pyrimidotriazinderivate **45**, **64** und **65** wurden  $IC_{50}$ -Werte von  $0.094\ \mu\text{M}$ ,  $0.120\ \mu\text{M}$  und  $0.107\ \mu\text{M}$  gegen MtpA bestimmt (Abb. 8.16). In Abwesenheit des Reduktionsmittels DTT konnte hingegen keine Inhibition nachgewiesen werden.



**Abb. 8.16:** Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte der getesteten Pyrimidotriazinderivate

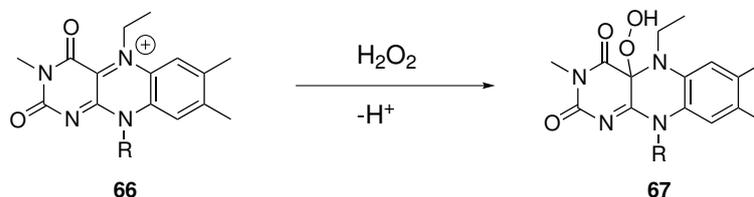
Der kompetitive Inhibitionsmechanismus, der in Vorarbeiten durch den Lineweaver-Burk-Plot impliziert wurde, konnte bislang jedoch noch nicht vollständig erklärt werden. Auf zellulärer Ebene ist die Redoxregulierung von Proteintyrosinphosphatasen mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Oxidation von katalytisch aktiven Cysteinresten zu Sulfensäuren (R-SOH) möglich. Oxidationen zu Sulfin- und Sulfonsäuren werden im Allgemeinen als irreversibel angesehen.<sup>[18]</sup> Die Empfindlichkeit von PTPs gegenüber normalen Konzentrationen ( $< 10\ \mu\text{M}$ ) von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist jedoch vergleichsweise gering.<sup>[208]</sup> Außerdem sind die Oxidationsschritte über die Sulfensäure hinaus erheblich langsamer.<sup>[165,209]</sup> In Konkurrenz zur weiteren Oxidation tritt normalerweise die Reaktion mit einem anderen Nukleophil, vorzugsweise mit einem Thiol wie Glutathion unter Bildung einer Disulfidbindung.<sup>[165,210]</sup> Diese kann wiederum mit einem weiteren Thiol unter Regeneration des aktiven Cysteins reagieren. Auf Grundlage dieser Überlegung müsste die Inhibitionswirkung ebenfalls abhängig von der DTT-Konzentration sein. Da im Redoxzyklus der Pyrimidotriazine der Reoxidationsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist, sollte die Produktion von Wasserstoffperoxid näherungsweise unabhängig von der DTT-Konzentration sein. Mit steigender DTT-Konzentration müsste somit insgesamt eine Abnahme der Inhibitionswirkung zu verzeichnen sein. Infolgedessen wurde der pNPP-Assay in Anwesenheit verschiedener DTT-Konzentrationen zwischen 1 und

25 mM durchgeführt. In der Tat stiegen die  $IC_{50}$ -Werte von  $0.094\ \mu\text{M}$  bei 1 mM DTT bis zu  $4.28\ \mu\text{M}$  bei 25 mM DTT (Tab. 8.2). Die Reaktivierung von MptpA durch DTT stellt somit eine mögliche Erklärung für die beobachtete Kompetitivität der Inhibition dar.

**Tab. 8.2:** Abhängigkeit der MptpA-Inhibition durch Styrylpyrimidotriazin **45** von der DTT-Konzentration

DTT-Konzentration	1 mM	5 mM	10 mM	25 mM
$IC_{50}$	$0.094\ \mu\text{M}$	$0.530\ \mu\text{M}$	$1.22\ \mu\text{M}$	$4.28\ \mu\text{M}$

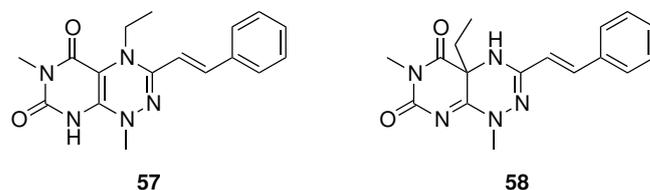
Neben der Reaktivierung des Enzyms kann die Inhibitionswirkung auch auf anderer Ebene beeinflusst werden. Wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Redoxzyklus weiter gehemmt, ist ebenfalls eine Reduzierung der Inhibition zu erwarten. Von den strukturell verwandten, ebenfalls redoxaktiven Flavinen ist bekannt, dass sie Redoxzyklen durchlaufen. Als zusätzliches Intermediat wurde hier von *Bruice et al.* ein Hydroperoxid am 4a-Brückenkopf des Flavins postuliert. Die Isolierung eines 4a-Hydroperoxylumiflavins **67** gelang der Gruppe 1976 nach Alkylierung des  $N^5$ -Stickstoffs, dem äquivalenten Stickstoff zur 4-Position des Pyrimidotriazins.<sup>[211]</sup> Dabei konnte das Hydroperoxid-Derivat durch Reaktion des  $N^5$ -Ethylflaviniumkations **66** mit Wasserstoffperoxid dargestellt werden (Abb. 8.17). Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass das Hydroperoxid ebenfalls durch Reaktion von Triplett-Sauerstoff mit  $N^5$ -Ethyl-1,5-dihydroflavinen entsteht. Die Blockierung der  $N^5$ -Position führt zu einer Verlangsamung der Reoxidation.<sup>[212]</sup> Aus diesem Grund wurde das N-alkylierte Pyrimidotriazin **57** synthetisiert. Darüber hinaus wurde ein C4a-alkyliertes Derivat **58** synthetisiert, dessen Alkylierung am Brückenkopf die Zerstörung des Redoxsystems zur Folge hatte. Dadurch ist keine oxidative Inhibition von MptpA mehr möglich.



**Abb. 8.17:** Darstellung eines 4a-Hydroperoxy- $N^4$ -ethyl-3-methylumiflavins **67** nach *Bruice et al.*<sup>[211]</sup>

Durch NMR- und LC/MS-Analyse von  $N^4$ -Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin

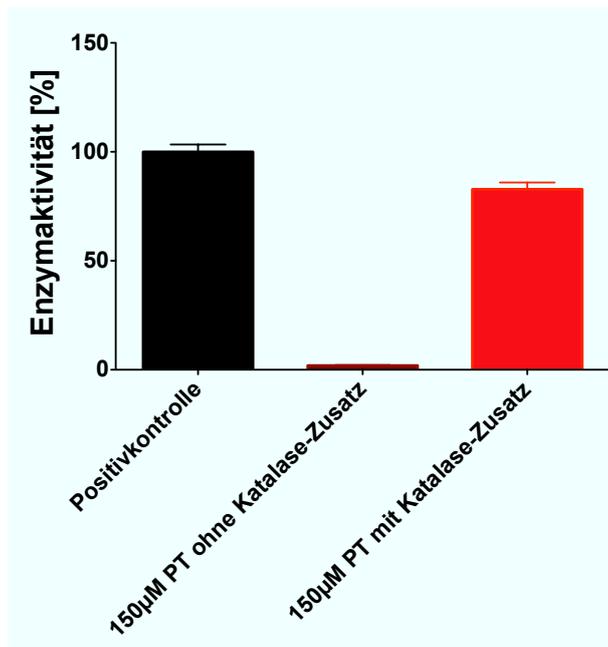
**58** wurde festgestellt, dass nicht wie im Falle des Flavins **66** das Kation gebildet wurde. Vielmehr wurde durch die N-Alkylierung eine Fixierung der reduzierten Form erreicht.



**Abb. 8.18:** Strukturen der  $N^4$ - und der C4a-alkylierten Pyrimidotriazine **57** und **58**

Untersuchungen der Inhibitionswirkung des N-alkylierten Pyrimidotriazins **57** gegenüber MptpA ergaben in Anwesenheit von 1 mM DTT einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0.438 \mu\text{M}$ . Dies ist im Gegensatz zum nichtalkylierten Pyrimidotriazin **45** ( $0.094 \mu\text{M}$ ) eine fast fünffache Reduzierung der Aktivität. Dies war in Analogie zu den Flavinen zu erwarten. Die Isolierung eines Hydroperoxidderivats gelang nicht. Wie erwartet zeigte das N-alkylierte Pyrimidotriazin **57** in Abwesenheit von DTT keine Inhibition von MptpA. Interessanterweise wurde für das C4a-alkylierte Derivat **58** ein  $IC_{50}$ -Wert von  $14 \mu\text{M}$  gegen MptpA ermittelt. Wie erwartet ist dieser unabhängig von DTT und konnte auch ohne DTT im Rahmen der Fehlergrenzen reproduziert werden. Ein Redoxmechanismus als Inhibitionsursache ist bei dieser Verbindung auszuschließen. Strukturell weicht er insofern von den inaktiven Pyrimidotriazinen ab, dass die Alkylierung am 4a-Brückenkopf eine Änderung der Hybridisierung des Kohlenstoffatoms von  $sp^2$  nach  $sp^3$  zur Folge hat. Somit wird die sonst planare Ringstruktur des Pyrimidotriazins **45** in ein konvex-konkaves Ringgerüst gezwungen (vgl. Diskussion der NMR-Spektren Kap. 8.1.2.2 auf Seite 92). Eine Untersuchung der Struktur-Aktivitätsbeziehung von C4a-alkylierten Pyrimidotriazinen wäre möglicherweise ein interessanter Ansatz zur Entwicklung weiterer Inhibitoren mit höherer Affinität gegenüber MptpA oder anderen Proteintyrosinphatasen.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Pyrimidotriazine hohe Mengen Wasserstoffperoxid produzieren können. Nun sollte durch einen Inhibitionsassay in Gegenwart von Katalase, einem Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzym, überprüft werden, ob die Inhibitionswirkung der Pyrimidotriazine allein auf Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist. Daher wurde ein Standard-pNPP-Assay mit 1 mM DTT durchgeführt, der durch den Zusatz von 5 U/mL Katalase aus Rinderleber erweitert wurde. Eine Einheit (U) wird dabei als Menge Katalase definiert, die in der Lage ist  $1.0 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  pro Minute abzubauen. Es zeigte sich, dass die Inhibitionsaktivität des Styrylpyrimidotriazins **45** in Gegenwart der Katalase nahezu aufgehoben wurde (Abb. 8.19).



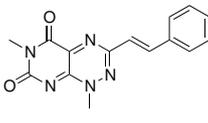
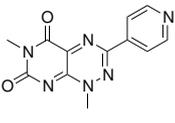
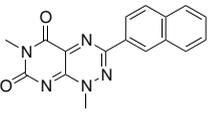
**Abb. 8.19:** Auslöschung der Inhibitionswirkung von Pyrimidotriazin **45** in Gegenwart von Katalase

Ergänzend zu dem Katalase-Experiment sollte die Inhibitionswirkung von Wasserstoffperoxid bestimmt werden, wenn es dem Inhibitionsassay als Bolus zugegeben wird. Dabei zeigte sich, dass der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert für  $H_2O_2$  bei  $47 \mu M$  lag. Berücksichtigt man, dass Konzentrationen des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** nahe dem  $IC_{50}$ -Wert unter vergleichbaren Bedingungen  $H_2O_2$ -Konzentrationen im zweistelligen Mikromolarbereich erzeugen (Kap. 8.3.1), so bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die PTP-Inhibition allein auf die Wasserstoffperoxidproduktion durch Pyrimidotriazine zurückzuführen ist.

In den nächsten Experimenten sollte die Eignung für den Einsatz von Pyrimidotriazinen in zellulären Anwendungen getestet werden. Da DTT als Reduktionsmittel in Zellen nicht zur Verfügung steht, wurden zellulär verfügbare Reduktionsmittel wie NADH und Glutathion (GSH) zusammen mit 3-Styrylpyrimidotriazin **45**, 3-(4-Pyridyl)pyrimidotriazin **64** und 3-(2-Naphthyl)pyrimidotriazin **65** im pNPP-Assay getestet. Die Inhibitionswerte für MptpA waren in Gegenwart von NADH deutlich höher als mit DTT und lagen bei  $2.8 \mu M$  (3-Styrylpyrimidotriazin **45**),  $8.3 \mu M$  (3-(4-Pyridyl)pyrimidotriazin **64**) und  $4.7 \mu M$  (3-(2-Naphthyl)pyrimidotriazin **65**). Daraus ist zu schließen, dass der Redoxzyklus auch mit NADH-Zusatz funktioniert, jedoch wesentlich langsamer abläuft, als mit DTT. Dies liegt unter anderem daran, dass DTT zwei Thioläquivalente enthält und die Oxidation unter Bildung eines Sechsringes verläuft. Der  $IC_{50}$ -Wert von  $H_2O_2$  in Gegenwart von NADH wurde zu  $20 \mu M$  bestimmt, was mit dem Wert ohne Reduktand-

zusatz identisch ist. Der  $IC_{50}$ -Wert für  $H_2O_2$  in Gegenwart von 1 mM DTT lag hingegen bei  $47 \mu M$ . Daraus lässt sich folgern, dass NADH nicht in der Lage ist, bereits oxidierte Cysteinreste zu reduzieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.3 zusammengefasst.

**Tab. 8.3:** Übersicht der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte mit und ohne Reduktand

Enzym				$H_2O_2$	
	45	64	65		
	mit DTT	$0.094 \mu M$	$0.120 \mu M$	$0.107 \mu M$	$47 \mu M$
MptpA	ohne DTT	n. a. <sup>a</sup>	n. a. <sup>a</sup>	n. a. <sup>a</sup>	$21 \mu M$
	mit NADH	$2.8 \mu M$	$8.3 \mu M$	$4.7 \mu M$	$20 \mu M$
	mit GSH <sup>b</sup>	$> 500 \mu M$	$> 500 \mu M$	$> 500 \mu M$	n. b.

<sup>a</sup> keine Inhibitionsaktivität, <sup>b</sup> durchgeführt von Richard Raz

In Gegenwart von 1 mM Glutathion lagen die  $IC_{50}$ -Werte für die MptpA-Inhibition bei über  $500 \mu M$ . Es zeigte sich bei einer Pyrimidotriazinkonzentration von  $50 \mu M$  bereits eine Verringerung der Enzymaktivität, jedoch wurde das untere Plateau der sigmoidalen Inhibitionskurve nicht erreicht, so dass keine eindeutige Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts durchgeführt werden konnte. Somit ist davon auszugehen, dass es in Gegenwart von Glutathion im Vergleich zu DTT und NADH zu einer weitaus geringeren Wasserstoffperoxidbildung kommt.

## 8.5 Messung intrazellulärer $H_2O_2$ -Erzeugung durch Pyrimidotriazine mittels FACS

Nachdem nun bereits gezeigt wurde, dass der Redoxzyklus auch mit zellulären Reduktionsmitteln wie NADH funktioniert, sollte dieser auch in zellulären Systemen untersucht werden. Es sollte nachgewiesen werden, dass die Wasserstoffperoxidproduktion durch Pyrimidotriazine auch in Zellen ohne externen Zusatz eines Reduktionsmittels wie DTT funktioniert. Es wurden daher FACS-Experimente unter Verwendung von Dihydrorhodamin 123 **64** (DHR 123) durchgeführt.

FACS-Experimente ermöglichen zum einen die Messung der Fluoreszenzintensität einer jeden einzelnen Zelle, zum anderen erhält man durch das Streuverhalten der Zelle Aufschluss über deren Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Daraus können bei Verwendung einer einzelnen Zelllinie auch Informationen über den Gesundheitszustand der Zelle abgeleitet werden. Bei toten Zellen mit beschädigter Membran kann das umgebende Medium ungehindert in die Zelle fließen. Da nun beide Medien gleich sind, findet keine Brechung mehr statt. Dies wird durch einen „side-scatter“ (SSC; seitlicher Detektor im Winkel von  $90^\circ$  zur Lichtquelle zur Detektion von stark gestreutem Licht) und einen „forward-scatter“ (FSC; Detektor in kleinem Winkel zur Lichtquelle zur Detektion von wenig gestreutem Licht) detektiert. Das Streuverhalten der Zelle wird durch die Lage in einer zweidimensionalen Darstellung von FSC und SSC charakterisiert.

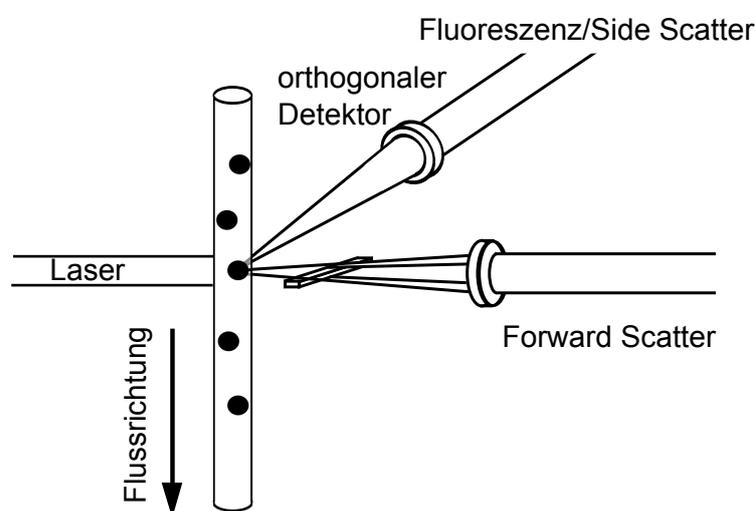
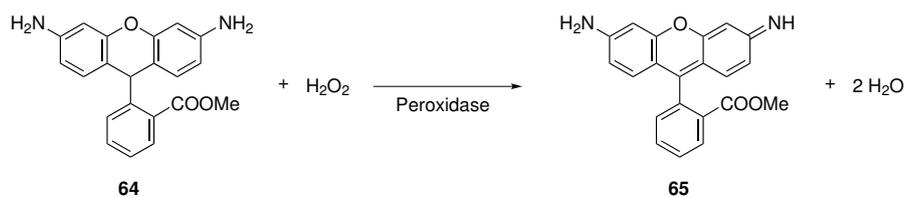


Abb. 8.20: Prinzipieller Aufbau eines Durchflusszytometers

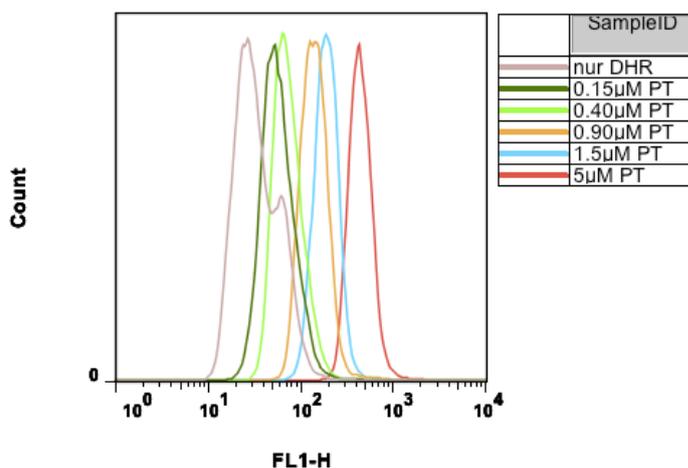
### 8.5.1 FACS-Experimente zum Nachweis der Wasserstoffperoxid-Produktion in Jurkat-Zellen

Der redox-sensitive Farbstoff Dihydrorhodamin 123 **64** wird vor allem häufig in FACS-Experimenten zur Detektion von oxidativem Stress verwendet.<sup>[201,205,213,214]</sup> Er reagiert insbesondere mit Wasserstoffperoxid<sup>[205]</sup> und bietet den Vorteil, dass er die Zellmembranen durchdringen kann, Rhodamin 123 **65**, das fluoreszente Oxidationsprodukt, jedoch an der Zellwand akkumuliert wird.<sup>[202,204,215]</sup> Die Oxidation von DHR 123 **64** durch Wasserstoffperoxid ist an die Anwesenheit einer Peroxidase geknüpft (Abb. 8.21)<sup>[201,202]</sup>, wodurch sichergestellt werden kann, dass DHR 123 **64** überwiegend in der Zelle zum fluoreszenten Rhodamin **65** umgesetzt wird.



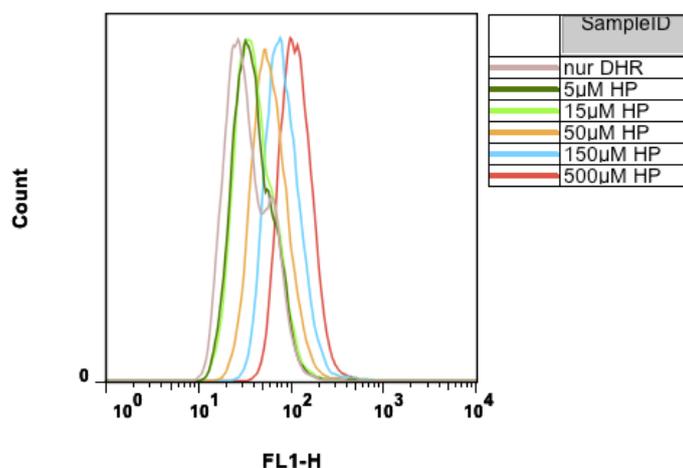
**Abb. 8.21:** Peroxidase-katalysierte Oxidation von DHR 123 **64** durch Wasserstoffperoxid

In jedem Experiment wurden  $10^6$  Jurkat-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen bei  $500\times g$  pelletiert und das RPMI 1640-Medium entfernt, um Reaktionen mit im Medium enthaltenen Komponenten zu verhindern. Es sollte so auch verhindert werden, dass die Wasserstoffperoxidbildung bereits außerhalb der Zelle stattfindet und so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Die Zellpellets wurden mit verschiedenen Konzentrationen ( $5\ \mu\text{M}$ ,  $1.5\ \mu\text{M}$ ,  $0.9\ \mu\text{M}$ ,  $0.4\ \mu\text{M}$ ,  $0.15\ \mu\text{M}$  und  $0\ \mu\text{M}$ ) des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** in PBS-Puffer versetzt, sowie mit  $1\ \mu\text{M}$  DHR 123 **64**. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei  $37\ ^\circ\text{C}$  wurden die Zellen pelletiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und nach erneuter Pelletierung in PBS/0.5% BSA resuspendiert. Die Messungen mit dem Durchflusszytometer zeigten eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz der Zellen von der eingesetzten Pyrimidotriazinkonzentration (Abb. 8.22).



**Abb. 8.22:** FACS-Experimente mit dem Styrylpyrimidotriazin **45**

Zur Abschätzung der Menge des produzierten Wasserstoffperoxids wurden parallel die gleichen Experimente unter Zusatz verschiedener Wasserstoffperoxidkonzentrationen anstelle des Pyrimidotriazins **45** durchgeführt (Abb. 8.23).



**Abb. 8.23:** FACS-Experimente mit verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (HP)

Eingesetzt wurden Konzentrationen zwischen 5 und 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entgegen der weitverbreiteten Meinung kann Wasserstoffperoxid jedoch nicht ohne Weiteres die Zellmembran durchdringen.<sup>[216–218]</sup> Vielmehr wurde durch Untersuchungen basierend auf dem Konzept der Enzymlatenz von *Antunes et al.* an Jurkat-Zellen festgestellt, dass sich das Gleichgewicht zwischen Zytosol und extrazellulärem Raum sehr schnell einstellt, ein bestimmter Gradient jedoch aufgrund des intrazellulären Abbaus nicht unterschritten wird.<sup>3</sup> Die maximale Wasserstoffperoxidkonzentration im Zytosol ist demzufolge um den Faktor 7 kleiner als im extrazellulären Raum.<sup>[216]</sup> Dies muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Betrachtet man die Abhängigkeit der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von der Pyrimidotriazinkonzentration bzw. der Wasserstoffperoxidkonzentration (Abb. 8.24), so stellt man fest, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Pyrimidotriazinkonzentration gibt.

Es besteht jedoch ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Wasserstoffperoxidkonzentration. Dies lässt auf einen limitierenden Faktor schließen. Fluoreszenzquenching ist auszuschließen, da die Intensitäten unter Verwendung des Pyrimidotriazins **45** deutlich höher sind. Da die Inkubationsbedingungen für beide Proben gleich waren, lässt sich ebenso ein Abbau des DHR 123 **64** ausschließen. Als limitierender Faktor könnte hier die bereits erwähnte Aufnahme des Wasserstoffperoxids in die Zellen eine Rolle spielen.

<sup>3</sup>Das Konzept der Enzymlatenz nutzt den Unterschied des Substratumsatzes von Enzymen in intakten Zellen und in Zellen ohne intakte Zellmembran. Die Substratzufuhr in intakten Zellen ist dabei aufgrund der Diffusion des Substrates durch die Membran limitiert. In diesem konkreten Fall wurde der Umsatz von Wasserstoffperoxid durch Katalase gemessen bzw. die damit verbundene Bildung von Sauerstoff.

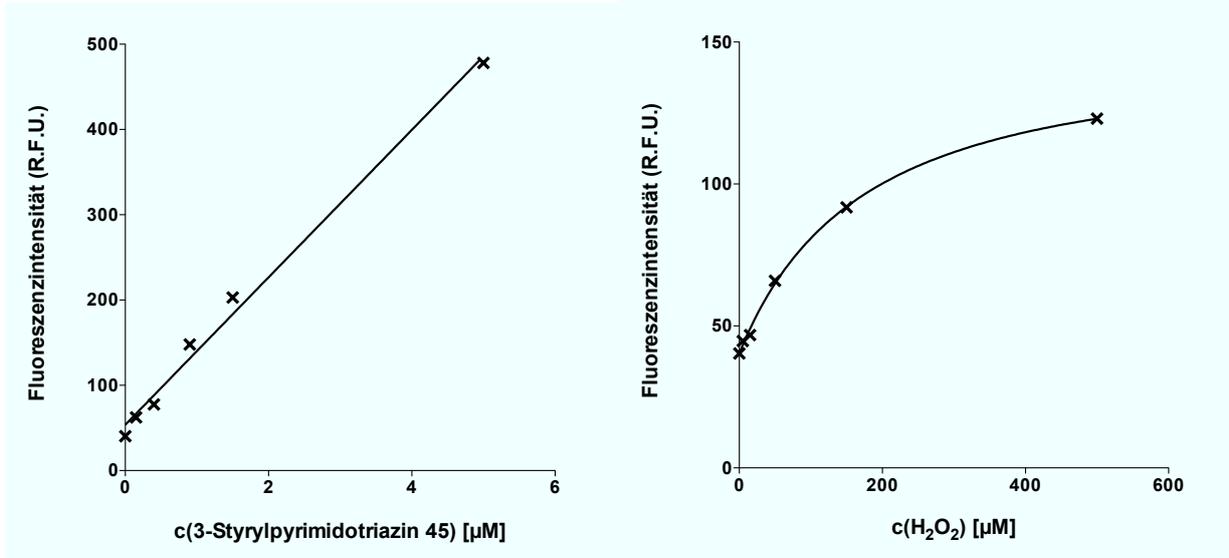
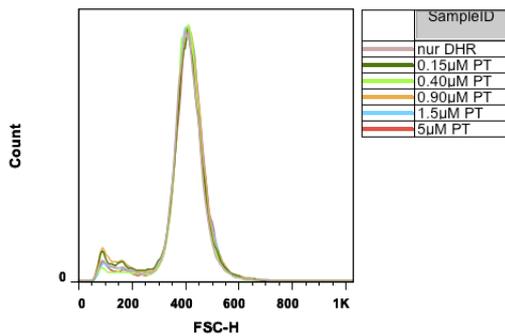
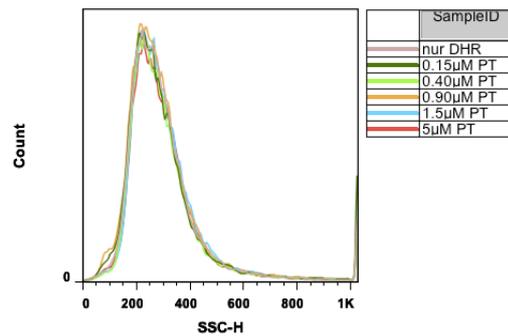


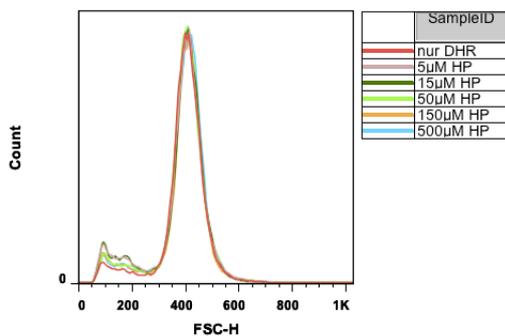
Abb. 8.24: Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Pyrimidotriazin-konzentration (links), sowie der eingesetzten Wasserstoffperoxidkonzentration (rechts)



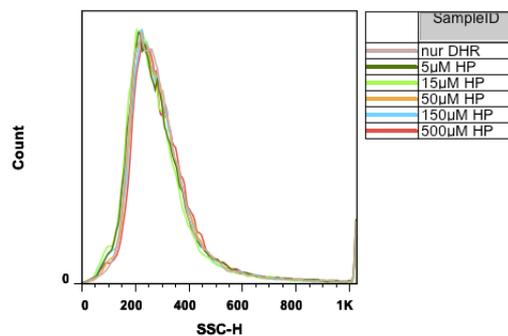
(a) FSC-Signale für verschiedene Pyrimidotriazin-konzentrationen



(b) SSC-Signale für verschiedene Pyrimidotriazin-konzentrationen



(c) FSC-Signale für verschiedene Wasserstoffperoxidkonzentrationen



(d) SSC-Signale für verschiedene Wasserstoffperoxidkonzentrationen

Abb. 8.25

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass ein Vergleich der Histogramme des FSC- und des SSC-Detektors für die verschiedenen Pyrimidotriazin- und Wasserstoffperoxidkonzentrationen keine Veränderung aufweist (Abb. 8.25). Die Struktur der Zellen scheint somit unverändert zu bleiben. Sie sind also auch nach der Wasserstoffperoxidentwicklung bzw. -behandlung noch vital.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass die Pyrimidotriazin-induzierte Wasserstoffperoxidentwicklung in Zellen ohne Zusatz eines Reduktionsmittels stattfindet. Nanomolare Konzentrationen des Styrylpyrimidotriazins **45** sind auch in Zellen in der Lage, Wasserstoffperoxid im mikromolaren Bereich zu erzeugen. Diese Verbindung stellt somit eine Möglichkeit zur *in vivo*-Generierung von Wasserstoffperoxid dar.

## 8.6 Ausblick

Viele Untersuchungen bezüglich der Redoxregulation von Proteinen durch Wasserstoffperoxid werden nicht in zellulären Systemen durchgeführt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Möglichkeiten zur Produktion von Wasserstoffperoxid in Zellen sehr beschränkt sind. Bei der Untersuchung zellulärer Systeme wird Wasserstoffperoxid häufig direkt zugegeben.<sup>[219,220]</sup> Der Nachteil der direkten Zugabe von Wasserstoffperoxid besteht in dem limitierten Transport durch die Zellmembran.<sup>[216]</sup> Andere Methoden, wie die Zugabe von Phorbolestern wie PMA (Phorbol Myristate Acetate), haben die Aktivierung von NADPH-Oxidasen zur Folge.<sup>[183]</sup> Diese wiederum produzieren Superoxid aus Sauerstoff. Erst durch Superoxid-Dismutasen wird daraus Wasserstoffperoxid erzeugt. Eine Trennung zwischen Effekten, die durch Superoxid oder anderen Reaktionsprodukten verursacht werden und denen, die eine Folge des Wasserstoffperoxids sind, ist nicht möglich. In vielen Fällen wird nur von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gesprochen, da die aktive Spezies nicht genauer spezifiziert werden kann.

Pyrimidotriazine **44** bieten einen effizienten Weg, selektiv Wasserstoffperoxid in Zellen zu produzieren. Im untersuchten Konzentrationsbereich des Pyrimidotriazins **45** war darüber hinaus keine Sättigung der intrazellulären Wasserstoffperoxidmenge festzustellen. Pyrimidotriazine könnten daher als Werkzeug zur Untersuchung von redoxregulierten Systemen in Zellen genutzt werden.



## 9 Zusammenfassung Thema II

Die Klasse der Pyrimidotriazine **44** wurde während eines Hochdurchsatz-Screenings gegen Proteintyrosinphosphatasen als Inhibitoren im nanomolaren Bereich identifiziert. Es wurde festgestellt, dass die Inhibitionswirkung in Abwesenheit des üblicherweise zugesetzten Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) erlischt. Des Weiteren wurde die Oxidation des katalytisch aktiven Cysteins von PTP1B nach Inkubation mit Pyrimidotriazinen in Gegenwart von DTT massenspektrometrisch nachgewiesen.<sup>1</sup> Trotz der nachgewiesenen Proteinoxidation wiesen die Lineweaver-Burk-Plots auf einen kompetitiven Mechanismus hin. Im Rahmen dieses Teils der Arbeit wurde die Redoxaktivität der Pyrimidotriazine und der Inhibitionsmechanismus von Proteintyrosinphosphatasen anhand von MptpA, einer niedermolekularen Proteintyrosinphosphatase aus dem *Mycobacterium tuberculosis*, untersucht. Es wurde zunächst postuliert, dass Pyrimidotriazine aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit Flavinen ebenfalls Redoxzyklen durchlaufen, in dessen Verlauf Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert wird.

Die Untersuchungen wurden anhand von 3-Styrylpyrimidotriazin **45** durchgeführt, da sich dies in Vorarbeiten als aktivster Inhibitor gegenüber MptpA erwiesen hatte. Der Redoxzyklus wurde mittels UV/vis-Spektroskopie untersucht, da die Reduktion des Pyrimidotriazins **45** aufgrund der Verkleinerung des  $\pi$ -Systems mit einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 329 nm zu 298 nm verbunden ist. Durch zeitabhängige Messungen der Spektren nach DTT-Zugabe wurde beobachtet, dass das reduzierte Pyrimidotriazin die dominante Spezies ist. Daraus wurde geschlossen, dass der Reoxidationsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Isolierung der reduzierten Spezies sowie weitere Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie bestätigten die Bildung eines 4,8-Dihydropyrimidotriazins **59**.

Pyrimidotriazine **44** werden demnach in Gegenwart von Thiolen wie DTT oder Thiofenol zu 4,8-Dihydropyrimidotriazinen **red-44** reduziert. Durch Sauerstoff erfolgt eine Reoxidation unter Bildung von Wasserstoffperoxid (Abb. 9.1).

Die Menge des durch Pyrimidotriazin **45** gebildeten Wasserstoffperoxids wurde in

---

<sup>1</sup>durchgeführt von Richard Raz und Martin Würtele, in Zusammenarbeit mit der AG E. Krause (FMP Berlin)

weiteren Experimenten quantifiziert. Da Peroxidase-abhängige Assays in diesem Zusammenhang aufgrund der Inhibitionswirkung von DTT gegenüber Peroxidasen ungeeignet waren, wurde ein rein chemischer Assay gewählt, der mit den Bedingungen des Phosphatase-Assays kompatibel war. Es handelte sich dabei um einen Europium-Tetracyclin-Assay, der von *Wolfbeis et al.* entwickelt wurde.<sup>[207,221]</sup> Messungen des gebildeten Wasserstoffperoxids ergaben, dass bei 37 °C bereits 71 nM des Pyrimidotriazins ausreichen, um nach zehn Minuten 24 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erzeugen. Das entspricht ca. 338 Durchläufen des Redoxzyklus pro Molekül Pyrimidotriazin **45**.

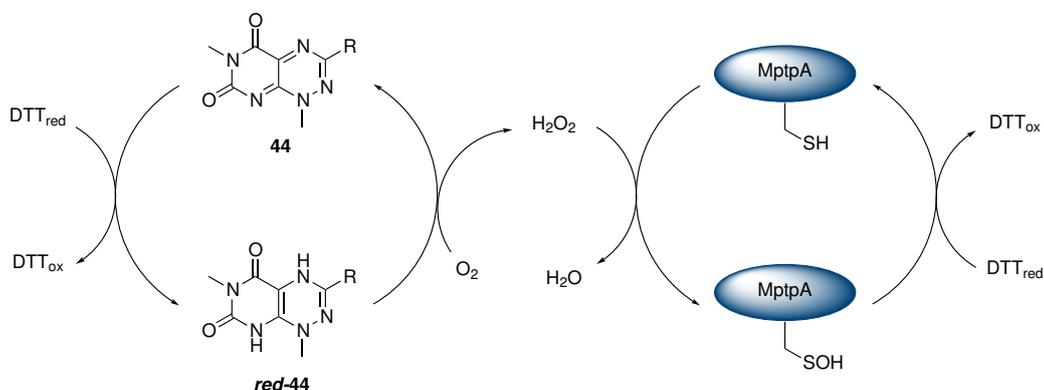
In weiteren Experimenten wurde der Inhibitionsmechanismus im Zusammenhang mit MptpA untersucht. Inhibitionsstudien mit einer Auswahl von Pyrimidotriazinen unter Verwendung des pNPP-Assays zeigten IC<sub>50</sub>-Werte um 0.1 µM in Gegenwart von 1 mM DTT. In Abwesenheit von Reduktanden war keinerlei Inhibitionswirkung messbar (Tab. 9.1). In Vorarbeiten wurde durch Lineweaver-Burk-Plots ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus für Pyrimidotriazine impliziert. Da Oxidationen des Cysteins bis zur Sulfensäure durch Thiole umkehrbar sind, wurde die Abhängigkeit der Inhibition von der DTT-Konzentration untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit steigender DTT-Konzentration auch die IC<sub>50</sub>-Werte des Pyrimidotriazins **45** von 0.094 µM (1 mM DTT) auf 4.28 µM (25 mM DTT) stiegen. Diese Abschwächung der Inhibition steht also im Einklang mit der Reduktion des durch Wasserstoffperoxid oxidierten aktiven Cysteins und bietet somit eine mögliche Erklärung für die scheinbare Kompetitivität des Mechanismus.

Die Einführung einer Ethylgruppe in 4-Position des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** führte in Übereinstimmung mit Beobachtungen bei Flavinen zu einer Verlangsamung der Reoxidation. Damit einher ging die Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes von 0.094 µM auf 0.438 µM.

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Inhibition von MptpA allein durch Wasserstoffperoxid vermittelt wird, wurde der Phosphatase-Assay in Gegenwart von Katalase durchgeführt. Wie erwartet war keine Inhibitionswirkung detektierbar. Um dieses Ergebnis weiter zu festigen, wurde der IC<sub>50</sub>-Wert von Wasserstoffperoxid direkt gemessen. In Gegenwart von 1 mM DTT wurde er zu 47 µM bestimmt. Dies entspricht dem Konzentrationsbereich wie er durch den Europium-Tetracyclin-Assay nach entsprechender Inkubationszeit für die IC<sub>50</sub>-Konzentration des 3-Styrylpyrimidotriazins **45** gemessen wurde. Daraus ist zu schließen, dass die inhibitorische Wirkung der Pyrimidotriazine gegenüber Proteintyrosinphosphatasen allein auf der Wasserstoffperoxiderzeugung beruht.

Daraus wurde ein Schema des Inhibitionsmechanismus abgeleitet (Abb. 9.1), in dem es zu einer Pyrimidotriazinreduktion durch geeignete Reduktanden wie DTT kommt. Die

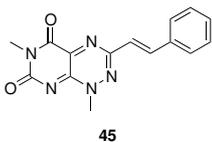
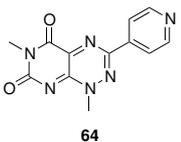
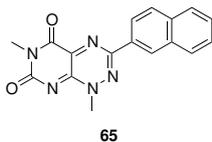
anschließende Reoxidation des Dihydropyrimidotriazins **red-44** durch Sauerstoff führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, das in der Lage ist, PTPs oxidativ zu deaktivieren. Durch Reaktion des aktiven Cysteins mit Thiol-haltigen Reduktanden kommt es zu einer Reaktivierung der PTPs, die jedoch im Vergleich zur Oxidation langsamer abläuft.



**Abb. 9.1:** Vorgeschlagener Inhibitionsmechanismus der Pyrimidotriazine **44**

Abschließend sollte gezeigt werden, dass der Redoxzyklus auch in Zellen ohne Zusatz eines Reduktionsmittels funktioniert. Daher wurde die Inhibitionswirkung der Pyrimidotriazine gegenüber MptpA in Gegenwart der zellulären Reduktionsmittel Glutathion und NADH bestimmt. In Gegenwart von Glutathion (GSH) war nahezu keine Inhibition messbar, in Gegenwart von NADH lagen die  $IC_{50}$ -Werte im einstelligen Mikromolarbereich. Der Redoxzyklus müsste demnach auch in Zellen ablaufen.

**Tab. 9.1:** Übersicht der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte mit und ohne Reduktand

Enzym				$H_2O_2$	
	<b>45</b>	<b>64</b>	<b>65</b>		
MptpA	mit DTT	0.094 $\mu$ M	0.120 $\mu$ M	0.107 $\mu$ M	47 $\mu$ M
	ohne DTT	n. a. <sup>a</sup>	n. a. <sup>a</sup>	n. a. <sup>a</sup>	21 $\mu$ M
	mit NADH	2.8 $\mu$ M	8.3 $\mu$ M	4.7 $\mu$ M	20 $\mu$ M
	mit GSH <sup>b</sup>	> 500 $\mu$ M	> 500 $\mu$ M	> 500 $\mu$ M	n. b.

<sup>a</sup> keine Inhibitionsaktivität, <sup>b</sup> durchgeführt von Richard Raz

Um dies zu untermauern wurden FACS-Experimente mit Jurkat-Zellen unter Verwendung des redoxsensitiven Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 **64** durchgeführt. Diese erbrachten den Nachweis, dass dieser Redoxzyklus ebenso in lebenden Zellen ablaufen kann. Dabei wurden durch den Einsatz nanomolarer Pyrimidotriazinkonzentrationen ebenfalls mikromolare Wasserstoffperoxidkonzentrationen erzeugt. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge des Pyrimidotriazins und des Fluoreszenzsignals. Vergleichsmessungen mit direkter Zugabe von Wasserstoffperoxid wiesen hingegen eine Sättigung auf, die nicht auf Quenchingeffekte zurückzuführen war. Im Rahmen der eingesetzten Pyrimidotriazinkonzentrationen bis  $5\ \mu\text{M}$  wurde mittels FACS keine Zellschädigung festgestellt.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass Pyrimidotriazine **44** *in vitro* und *in vivo* potente Wasserstoffperoxidgeneratoren sind. Die Menge des erzeugten Wasserstoffperoxids ist dabei von der eingesetzten Pyrimidotriazinkonzentration abhängig.

Im Bereich der Erforschung von redoxregulierten Prozessen könnten Pyrimidotriazine als Werkzeug zur selektiven Erzeugung von Wasserstoffperoxid in Zellen genutzt werden. Als Folge der limitierten Diffusion von Wasserstoffperoxid durch die Zellmembran und dem intrazellulären Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  stellt der direkte Zusatz von Wasserstoffperoxid eine mit Nachteilen behaftete Methode dar. Die intrazelluläre Produktion von Wasserstoffperoxid durch 3-Styrylpyrimidotriazins **45** erwies sich hingegen als sehr effizient.

# 10 Experimenteller Teil

## 10.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle Reaktionen in trockenen Lösungsmitteln wurden unter Wasserausschluss mittels Schlenk-Technik oder Ballon-Technik unter Stickstoff durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden kommerziell erhältliche, trockene Lösungsmittel über Molsieb eingesetzt. Bei Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden diese Lösungsmittel vor Gebrauch durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Hochvakuum entgast.

## 10.2 Analytische Methoden

### 10.2.1 LC/MS

Die Standardanalysen von Reaktionsverläufen wurden mit einer LC der 1100er Serie der Firma *Agilent Technologies* mit Diode Array Detector (DAD) durchgeführt, die mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt ist. Die Ionisation erfolgte über ein Elektrospray. Die Kapillarspannung betrug 3.5 kV, die Fragmentorspannung wurde auf 120 V eingestellt. Als Säulen wurden eine *Macherey-Nagel EC C-18ec* 30x4.0 mm mit 100 Å Porengröße und 3.5 µm Partikelgröße, *Macherey-Nagel EC C-18ec* 250x4.0 mm mit 100 Å Porengröße und 5.5 µm Partikelgröße, eine *Macherey-Nagel EC C-18ec* 125x4.0 mm mit 100 Å Porengröße und 5 µm Partikelgröße und eine *Macherey-Nagel EC Sphinx* 50x2.0 mm mit 3 µm Partikelgröße verwendet. Als Eluenten wurden Mischungen aus Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und einem organischen Eluenten, Methanol oder Acetonitril, mit jeweils 0.1 % Ameisensäure verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden Spritzenfilter aus Nylon mit 0.45 µm Porengröße der Firma *Phenomenex* verwendet.

Zur Bestimmung von exakten, hochaufgelösten Massen von kleinen, organischen Molekülen, Peptiden und intakten Proteinen, sowie für Assays mit LC/MS-Analyse wurde ein Accurate Mass Time-of-Flight-Massenspektrometer (6220) der Firma *Agilent Technologies* mit einer LC der 1200er Serie und DAD verwendet. Die chromatographische

Trennung erfolgte bei Bestimmung der exakten Masse von kleinen Molekülen über eine *Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT* 50x4.6 mm mit 1.8  $\mu\text{m}$  Partikelgröße. Als Eluenten wurden Mischungen aus Wasser mit 0.1 % Ameisensäure und einem organischen Eluenten, Methanol oder Acetonitril, mit jeweils 0.1 % Ameisensäure verwendet. Der Fluß wurde auf 1.2 mL/min eingestellt. Die Kapillarspannung der ESI-Quelle betrug 3.5 kV, die Fragmentorspannung 175 V. Im Falle der Auswertung von enzymatischen Assays oder der Bestimmung der Masse von intakten Proteinen erfolgte die chromatographische Trennung über eine *Jupiter C-18-Säule* (3  $\mu\text{m}$ , 300 Å, 150x2.0 mm) der Firma *Phenomenex*. Als Eluenten wurden hier Wasser und Acetonitril jeweils mit 0.05 % Trifluoressigsäure und einem Fluß von 0.3 mL/min eingesetzt. Die Kapillarspannung der ESI-Quelle betrug 4 kV, die Fragmentorspannung wurde auf 175V bei kleinen Molekülen und Peptiden bzw. 250 V bei Proteinen eingestellt.

**Tab. 10.1:** Übersicht der verwendeten Gradienten

	Zeit [Min.]	Anteil org. Phase
Gradient I	0	5 % MeCN
	2.5	99 % MeCN
	4.5	99 % MeCN
Gradient II	0	5 % MeCN
	12	99 % MeCN
	15	99 % MeCN
Gradient III	0	5 % MeCN
	12	50 % MeCN
	12.1	99 % MeCN
	15	99 % MeCN

Übersicht der Säulen:

- Säule I *Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT* 50x4.6 mm mit 1.8  $\mu\text{m}$  Partikelgröße (LC/ESI-ToF-MS)
- Säule II *Macherey-Nagel EC C-18ec* 30x4.0 mm mit 100 Å Porengröße mit 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße (LC/Single Quadrupol-MS)

### 10.2.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden standardmäßig an einem AV300 der Firma *Bruker* durchgeführt. Die Kalibrierung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erfolgte intern über das Lösungsmittelrestsignal. Die Referenzierung von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden extern mittels Phosphorsäure durchgeführt ( $\delta(\text{Phosphorsäure}) = 0 \text{ ppm}$ ). Die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quadruplett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet und dq = Dublett vom Quartett

Bei auffälligen Verbreiterungen der NMR-Signale wurde dies mit den Abkürzungen br (breit) oder vb (sehr breit) am jeweiligen Signal vermerkt.

Die NMR-Spektren wurden mit Top Spin der Firma *Bruker* oder iNMR der Firma *MestreLab Research* prozessiert und ausgewertet.

### 10.2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographien zur Verfolgung von Reaktionsverläufen wurden auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub> DC-Platten mit Aluminiumträger der Firma *Merck* durchgeführt. Zur Detektion der Substanzen diente UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254 \text{ nm}$  und Kaliumpermanganatlösung.

### 10.2.4 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde das Absorptionsmaximum der entsprechenden Bande des Ketophosphonats **11** in Wasser bestimmt und die Konzentration so eingestellt, dass die Absorptionsintensität 1 OD nicht übersteigt. Als höchste Konzentration wurden beispielsweise 5 mM des Ketophosphonats **11** verwendet und eine Verdünnungsreihe mit einer schrittweisen 2/3-Verdünnung erstellt. Die Absorptionsintensitäten des Maximums wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Es gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

mit der Absorbanz  $A$ , dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{\lambda} \left[ \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$  bei der Wellenlänge  $\lambda$ , der Stoffmengenkonzentration  $c \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$  und der Schichtdicke der Küvette  $d [\text{cm}]$ . Aus der Auftragung der Absorbanz gegen die Konzentration resultierte eine Gerade, aus deren Steigung und der Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$  ein Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon_{368 \text{ nm}} = 95 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  ermittelt wurde.

## 10.3 Präparative Methoden

### 10.3.1 Mikrowellenunterstützte Synthese

Mikrowellenunterstützte Synthesen wurden mit einem SmithSynthesizer™ der Firma *Biotage* unter Verwendung von druckstabilen Gefäßen mit einem Volumen zwischen 0.5 und 20 mL durchgeführt. Das verwendete Magnetron besitzt eine Leistung von 15-300 W und erzeugt Mikrowellenstrahlung mit einer Frequenz von 2.45 GHz.

### 10.3.2 Präparative HPLC

Aufreinigungen mittels präparativer HPLC wurden an einer Anlage der 1100er Serie der Firma *Agilent Technologies* durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen Multiwellenlängendetektor (MWD). Als Eluenten wurden Mischungen aus Wasser und Acetonitril oder Methanol mit jeweils 0.1 % Trifluoressigsäure eingesetzt. Als Säule wurde eine VarioPrep C-18ec (250x21 mm) mit 100 Å Porengröße und 7 µm Partikelgröße sowie eine VarioPrep C-18ec (125x32 mm) mit 100 Å Porengröße und 7 µm Partikelgröße, beide von der Firma *Macherey-Nagel*, eingesetzt.

### 10.3.3 Flash-Chromatographie

Präparative Trennungen mittels Flash-Chromatographie wurden mit einem Flash-Chromatographen der Firma *Büchi* durchgeführt. Die Detektion erfolgte über UV-Absorption mit einem C-630 UV Monitor, die Sammlung über einen Fraktionssammler C-660 der Firma *Büchi*. Dabei wurden sowohl vorgepackte Säulen als auch selbstgepackte Säulen mit Kieselgel 60 der Firma *Merck* verwendet. Als Eluenten wurden handelsübliche, organische Lösungsmittel verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels LC/MS oder Dünnschichtchromatographie analysiert.

### 10.3.4 Säulenchromatographie

Säulenchromatographien wurden unter Verwendung von Kieselgel 60 der Firma *Fluka* unter Druck mit Stickstoff durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels LC/MS oder Dünnschichtchromatographie analysiert.

## 10.4 Methoden bei der Durchführung von Assays

### 10.4.1 Zellkultur

Jurkat-Zellen wurden bei einer Konzentration von  $0.15 \cdot 10^6$  Zellen/mL in RPMI 1640 Medium bei 37 °C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem Medium wurden 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (1000 µg/mL Stammlösung) zugesetzt.

### 10.4.2 FACS

Es wurde eine 5 mM Stammlösung des Pyrimidotriazins in DMSO hergestellt und auf 5 µM in PBS-Puffer verdünnt. Durch weitere Verdünnung wurden Lösungen der Konzentrationen 1500 nM, 900 nM, 400 nM und 150 nM hergestellt. Eine 10 mM Stammlösung von Dihydrorhodamin 123 (DHR) (Calbiochem) in DMSO wurde auf 100 µM in PBS verdünnt. Für jede Probe wurden  $10^6$  Jurkat-Zellen bei 500×g für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und 495 µL der vorbereiteten Pyrimidotriazinlösungen zu den Zellpellets gegeben. 5 µL der 100 µM DHR-Lösung wurden hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 1 µM DHR zu erhalten. Die Zellen wurden bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) für 30 Minuten inkubiert, mit eiskaltem PBS mit 0.5 % BSA gewaschen, in 750 µL PBS/0.5 % BSA resuspendiert und mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert. Für die Steuerung wurde die Software CellQuest (*Becton Dickinson*) verwendet.

### 10.4.3 Verwendete Proteine

MtpA wurde von Matthew Groves (EMBL Hamburg) exprimiert und bei 1 mg/mL in 20 mM EPPS pH 8.5, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol und 10 % Glycerol gelagert. Nach Benutzung wurde es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

STAT5 wurde als menschliches MBP-STAT5b von Anne Diehl (FMP Berlin) exprimiert. Dazu wurde ein Klon von Thorsten Berg, Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) verwendet. Die Konzentration des Proteins wurde auf 27.64 µM bestimmt. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -80 °C.

Für die Experimente mit Katalasezusatz wurde Katalase aus Rinderleber als Lyophilisat von *Sigma-Aldrich* verwendet. Die Aktivität ist mit 10000 U/mg angegeben, wobei eine Einheit (U) als Katalasemenge definiert ist, die 1.0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Minute abbaut.

Für den 4-Aminoantipyrin-Assay wurde Meerrettich-Peroxidase als Lyophilisat von *Sigma-Aldrich* verwendet.

#### 10.4.4 Europium-Tetracyclin-Assay zur Bestimmung von $\text{H}_2\text{O}_2$

*MOPS Pufferlösung:* 1.09 g (5.20 mmol) 3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS) wurden in 180 mL Wasser (Milli-Q-pore) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 10 M Natriumhydroxidlösung auf pH 6.9 eingestellt und mit Wasser auf 200 mL aufgefüllt, um einen 26 mM MOPS Puffer zu erhalten.

*$\text{Eu}_3\text{Tc}$ -Lösung:* 9.1 mg (24.8  $\mu\text{mol}$ )  $\text{EuCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  und 3.8 mg (7.9  $\mu\text{mol}$ ) Tetracyclinhydrochlorid wurden in je 95 mL MOPS-Puffer gelöst. Durch Mischung beider Lösungen in gleichem Verhältnis wurde eine Lösung mit 131  $\mu\text{M}$   $\text{EuCl}_3$  und 41.6  $\mu\text{M}$  Tetracyclin in MOPS-Puffer erhalten.

*$\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibrierlösung:* 35 % wt  $\text{H}_2\text{O}_2$  (11.3 M) wurde in Wasser zu 160 mM, 80 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM und 2 mM Wasserstoffperoxid verdünnt.

**Assayprotokoll** Der Assay wurde in Küvetten mit der Grundfläche 1 cm x 1 cm durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte an einem Fluoreszenzspektrometer FP-6500 der Firma *Jasco* bei  $\lambda_{\text{em}} = 616 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ). Während der Messungen wurde die Lösung in der Küvette gerührt.

*$\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibrierung:* 10  $\mu\text{L}$  DTT (200 mM; 1 mM Endkonzentration) wurden zu 2 mL  $\text{Eu}_3\text{Tc}$  Lösung in eine UV-Küvette gegeben und im Fluoreszenzspektrometer unter Rühren 5 Minuten auf 37 °C temperiert bis die Fluoreszenz konstant war. Die Messung wurde gestartet (Messintervall 5 sec) und 50 Sekunden später 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibrierlösung hinzugegeben, sodass der Beginn der Kinetik verfolgt werden konnte. Die Kalibrierkurve wurde mit Konzentrationen von 800  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid erstellt. Alle Punkte wurden dreifach bestimmt und der Mittelwert verwendet.

*Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Erzeugung durch Pyrimidotriazindione:* 10  $\mu\text{L}$  DTT (200 mM; 1 mM Endkonzentration) wurden zu 2 mL  $\text{Eu}_3\text{Tc}$  Lösung pipettiert und im Fluoreszenzspektrometer unter Rühren 5 Minuten auf 37 °C temperiert bis die Fluoreszenz konstant war. Die Messung wurde gestartet (Messintervall 5 Sek.) und 50 Sekunden später 10  $\mu\text{L}$  Styrylpyrimidotriazinlösung hinzugegeben, sodass der Beginn der Kinetik verfolgt werden konnte. Es wurden 500 nM, 300 nM, 150 nM und 71 nM Styrylpyrimidotriazin verwendet. Die Messungen erfolgten jeweils als Dreifachbestimmung.

### 10.4.5 Assays im 384-Well Mikrotiterplattenformat

Alle Assays im 384-Well Mikrotiterplattenformat, sowohl Absorptions- als auch Fluoreszenzassays wurden mit einem Safire<sup>2</sup>-Reader der Firma *Tecan* durchgeführt.

#### 10.4.5.1 Messung von zeitabhängigen UV-Spektren im Mikrotiterplattenformat

Die Verfolgung des Redoxzyklus mittels UV-Spektroskopie im Mikrotiterplattenformat wurde wie folgt durchgeführt. 3-Styrylpyrimidotriazin **45** wurde mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M in TRIS HCl-Puffer (Zusammensetzung s. Tabelle 10.2) gelöst. 50  $\mu$ L dieser Lösung wurden in eine Vertiefung der transparenten 384-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Parallel dazu wurde der gleiche Ansatz unter Zusatz von 1 mM DTT pipettiert. Anschließend wurde in Abständen von einer Minute über 45 Minuten das Spektrum zwischen 250 und 700 nm mittels eines Safire<sup>2</sup>-Readers gemessen.

#### 10.4.5.2 4-Aminoantipyrin/Peroxidase-Assay zur Bestimmung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Phosphatpuffer:* 572 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden in 20.14 mL Wasser gelöst (200 mM). 544 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in 20 mL Wasser gelöst (200 mM) und durch Zusatz der Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 7.0 eingestellt.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kalibrierlösung:* 35 % wt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11.3 M) wurde in Phosphatpuffer zu 36 mM, 12 mM, 3.6 mM, 1.2 mM, 0.36 mM, 0.12 mM, 0.036 mM, 0.012 mM, 0.0036 mM und 0.0012 mM Wasserstoffperoxid für Messungen mit DTT und aus dieser Reihe nochmals um den Faktor 2 (18 mM, 6 mM etc.) für Messungen ohne DTT verdünnt.

Des Weiteren wurde eine Stammlösung aus 170 mM Phenol und 2.52 mM 4-Aminoantipyrin in 2.66 mL Phosphatpuffer hergestellt, sowie eine Lösung von Meerrettichperoxidase (1  $\mu$ g/mL) in Phosphatpuffer und 1.6 mL einer 24 mM Stammlösung aus DTT in Phosphatpuffer. Aus den zu vermessenden Verbindungen wurden 36 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt, die dann sukzessive verdünnt wurden (Konzentrationen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kalibrierlösungen).

**Assayprotokoll** Der Assay wurde im 384-Well Mikrotiterplattenformat durchgeführt.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kalibrierung:* 10  $\mu$ L der Phenol/4-Aminoantipyrin-Lösung (142 mM Phenol, 2.1 mM 4-Aminoantipyrin Endkonzentration) wurden vorgelegt und mit 0.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (bzw. 1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Messungen ohne DTT) in verschiedenen Konzentrationen und ggf.

0.5  $\mu\text{L}$  DTT (1mM im Assay) versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit von fünf Minuten wurde 1  $\mu\text{L}$  Meerrettich-Peroxidase (83 ng/mL im Assay) zugesetzt und die Bildung des Chinons mittels Absorptionsmessung bei 510 nm im Safire<sup>2</sup> registriert.

*Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  -Erzeugung durch Pyrimidotriazindione:* 10  $\mu\text{L}$  der Phenol/4-Aminoantipyrin-Lösung (142 mM Phenol, 2.1 mM 4-Aminoantipyrin im Assay) wurden vorgelegt und mit 0.5  $\mu\text{L}$  DTT (1mM im Assay), 0.5  $\mu\text{L}$  Pyrimidotriazin verschiedener Konzentrationen (Endkonzentrationen: 1.5 mM, 0.5 mM, 0.15 mM etc.) versetzt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde 1  $\mu\text{L}$  Meerrettich-Peroxidase-Lösung (83 ng/mL im Assay) hinzupipettiert und die Bildung des Chinons mittels Absorptionsmessung bei 510 nm im Safire<sup>2</sup> registriert.

### 10.4.5.3 pNPP-Assay

Die Zusammensetzung des verwendeten zweifachen Assaypuffers ist in Tabelle 10.2 angegeben.

**Tab. 10.2:** Zusammensetzung des zweifachen Assaypuffers

Substanz	Konzentration im zweifachen Assaypuffer
TRIS HCl, pH 7.0	50 mM
Natriumchlorid	100 mM
Glycerol	20 %
EDTA, pH 8.0	4 mM
Brij 35	0.02 %

Vor der Durchführung des Assays wurde der Puffer durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer 1 M DTT-Lösung zu 25 mL zweifachem Assaypuffer aktiviert und anschließend 1:2 mit Wasser zu einfachem Assaypuffer verdünnt. Die Herstellung der pNPP-Lösung (Substratlösung) erfolgte durch Lösen von 148.48 mg *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) in 16 mL einfachem Assaypuffer. Die Enzymlösung wurde je nach Konzentration der Stammlösung auf 5 ng/ $\mu\text{L}$  mit einfachem Assaypuffer verdünnt. Die Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen wurden in DMSO hergestellt. Der Anteil von DMSO im gesamten Assayvolumen betrug 1 %.

Die Mikrotiterplatte wurde wie folgt vorbereitet. Zunächst wurden 20  $\mu\text{L}$  einfacher Assaypuffer vorgelegt und die Platte zentrifugiert. Anschließend wurden 0.5  $\mu\text{L}$  der

zu testenden Substanz (in DMSO gelöst) hinzugegeben. Danach wurden 10  $\mu\text{L}$  Enzymlösung (5 ng/ $\mu\text{L}$  MptpA Endkonzentration) hinzugegeben und die Platte erneut zentrifugiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden 20  $\mu\text{L}$  der pNPP-Lösung mittels Dispenser zugegeben, die Lösungen in der Mikrotiterplatte nochmals kurz zentrifugiert und der Substratumsatz mithilfe eines Safire<sup>2</sup>-Readers bei 405 nm verfolgt.

**Tab. 10.3:** Übersicht der Parameter des pNPP-Assays

Substanz/Parameter	Endkonzentration im well/Wert
DTT	1 mM
pNPP	10 mM
MptpA	50 ng/well
Wellenlänge der Absorptionsmessung	405 nm
Dauer der Kinetikmessung	30 Min.

**Assay mit Katalasezusatz** Die Konzentrationen der Bestandteile entsprachen der Vorschrift des Standard-pNPP-Assays. Es wurden jedoch 5 U Katalase (100 U/mL) hinzugegeben.

**Tab. 10.4:** Methode zur Messung von pNPP-Assays mit dem Safire<sup>2</sup>-Reader

Parameter	Wert
Absorptionswellenlänge	405 nm
Anzahl der Messungen pro Well	100
Anzahl der kinetischen Zyklen	16
Kinetisches Intervall	60 Sek.
Gesamtzeit der kinetischen Messungen	15 Min.

### Auswertung der Kinetikassays

Zur Auswertung von enzymatischen Kinetikassays wurde die Anfangssteigung nach Abzug der Hintergrundabsorption (Substrat ohne Enzym) durch Berechnung mit Excel bestimmt und in GraphPad Prism 5 übertragen. IC<sub>50</sub>-Werte wurden nach Auftragung

der Anfangssteigungen gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration durch eine nichtlineare Regression ermittelt. Dabei wurde die Gleichung „Single Dose Response - Variable Slope“ verwendet. Der daraus von GraphPad Prism bestimmte Wendepunkt stellt den Logarithmus des  $IC_{50}$ -Wertes dar.

#### 10.4.5.4 Fluoreszenzpolarisationsassays mit MBP-STAT5b

Die Fluoreszenzpolarisationswerte  $P$  wurden von der Software X-Fluor der Firma *Tecan* nach folgender Gleichung berechnet:

$$P = \frac{I_s - G \cdot I_p}{I_s + G \cdot I_p}$$

mit der Intensität des senkrecht polarisierten Lichts  $I_s$ , der Intensität des parallel polarisierten Lichts  $I_p$  und dem G-Faktor  $G$ .

**G-Faktor-Bestimmung** Der G-Faktor des verwendeten Safire<sup>2</sup> wurde in einer 384 well Mikrotiterplatte bestimmt. Dazu wurden je 5  $\mu$ L einer 5 nM Fluoresceinlösung in 0.01 M wässriger Natriumhydroxidlösung in die vier Quadranten der Platte (jeweils eine Vierfachbestimmung) und daneben ein Blank aus 5  $\mu$ L 0.01 M wässriger Natriumhydroxidlösung pipettiert. Der Blank wurde von den Messwerten der Fluoresceinlösung subtrahiert und der Mittelwert aller Fluoreszenzpolarisationswerte auf einen Wert von 27 mP gesetzt. Der sich daraus ergebende G-Faktor beträgt 1.1634.

**Tab. 10.5:** Methode zur Messung der Fluoreszenzpolarisationswerte mit dem Safire<sup>2</sup>-Reader

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge	470 nm
Emissionswellenlänge	525 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung (Gain)	64
Anzahl der Messungen pro Vertiefung	10
Zeit zwischen Bewegung und Anregung	100 ms
Temperaturbereich	27.5 - 28.5 °C
G-Faktor	1.1634

**STAT5-Puffer** Der Standard-STAT5-Puffer bestand aus 10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl und 0.1 % Igepal CA 630.

**K<sub>d</sub>-Wertbestimmung** Zur Bestimmung der K<sub>d</sub>-Werte wurden schwarze Mikrotiterplatten mit niedrigem Volumen (Corning #3676) der Firma *Corning* verwendet. Zunächst wurden 5 µL HEPES-Puffer vorgelegt. In der ersten Reihe wurden 6.38 µL Puffer und 3.62 µL MBP-STAT5b (Stammlösung: 27.64 µM) vorgelegt. Durch Entnahme von 5 µL und sukzessive Verdünnung in den weiteren Wells wurde eine Verdünnungsreihe mit jeweiliger 1:2-Verdünnung erstellt. Anschließend wurden die Lösungen in den Mikrotiterplatten zentrifugiert. Danach wurden 5 µL der 20 nM Lösung des 5(6)-Carboxyfluorescein-markierten Peptids in HEPES-Puffer zugegeben, so dass in jedem Well eine Konzentration von 10 nM vorlag. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie verschlossen und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte mittels Safire<sup>2</sup>-Reader bei 28°C gemessen. Die Parameter der Methode sind in Tabelle 10.5 zusammengefasst. Zur Auswertung der Fluoreszenzpolarisationsassays wurde zunächst die senkrecht bzw. parallel polarisierten Komponenten der Hintergrundfluoreszenz von den jeweiligen Rohdaten subtrahiert und die Polarisationswerte daraus neu berechnet. Anschließend wurden die Daten mittels GraphPad Prism 5 ausgewertet. Die K<sub>d</sub>-Werte wurden durch nichtlineare Regression („Single Dose Response - Variable Slope“) ermittelt.

**Verdrängungsassay** Es wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Verdrängermoleküls in STAT5-Puffer hergestellt. Dann wurden 5 µL einer Lösung aus 130 nM STAT5 (65 nM im Assay) und 20 nM FAM-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> (10 nM im Assay) in 384er Mikrotiterplatten (Corning #3676) vorgelegt und mit 5 µL des Verdrängermoleküls versetzt. Nach Zentrifugation wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Fluoreszenzpolarisationswerte anschließend bei 28 °C im Safire<sup>2</sup>-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte wie im Falle der K<sub>d</sub>-Wertbestimmungen.

**Berechnung der K<sub>i</sub>-Werte** Die Berechnung der K<sub>i</sub>-Werte aus den gemessenen EC<sub>50</sub>-Werten erfolgte mit Hilfe der Gleichung nach *Nikolovska-Coleska et al.*:<sup>[147]</sup>

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\left(\frac{[S]_{50}}{K_d} + \frac{[P]_0}{K_d} + 1\right)}$$

mit [I]<sub>50</sub> als freier Inhibitorkonzentration bei 50 % Inhibition, der Konzentration der freien, fluoreszenzmarkierten Sonde bei 50 % Inhibition [S]<sub>50</sub>, der Konzentration des

freien Proteins bei 0 % Inhibition  $[P]_0$  und der Dissoziationskonstante für den Ligand-Protein-Komplex  $K_d$ .

### 10.4.6 Photovernetzungsexperimente

#### 10.4.6.1 Photovernetzung von Benzoylphosphonat **11** mit Peptiden

Das Benzoylphosphonat **11** wurde in einer Konzentration von 10 mM in 100 mM HEPES-Puffer pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl und 0.1 % Igepal CA 630 zusammen mit 10 mM des Peptids FKKAG-NH<sub>2</sub> (X = I, L, V, C, W) **36** in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L gelöst und 24 Stunden in einer Mikrotiterplatte auf dem Transilluminator bei 4°C bestrahlt. Nach vier und 24 Stunden wurde ein Aliquot entnommen und mittels LC/ToF-MS analysiert.

#### 10.4.6.2 Photovernetzungsexperimente mit MptpA

Der pNPP-Assay wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Vor Zugabe des Substrats wurde die Mikrotiterplatte 45 Minuten in einem Stratalinker der Firma *Stratagene* bei 365 nm bestrahlt. Die Mikrotiterplatte wurde dabei von einer UltraClear PCR-Folie der Firma *Kisker Biotech* verschlossen. Nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe des Substrats.

#### 10.4.6.3 Photovernetzungsexperimente mit STAT5b

Die UV-Bestrahlung wurde in 384-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Für die Dimerisierung des Benzoylphosphonats wurden volltransparente Platten mit flachem Boden (Corning #3702) verwendet, um den Lichteinfall zu maximieren. Für das Photocrosslinking von MBP-STAT5b wurden schwarze Platten mit flachem, transparenten Boden (Corning #3711) verwendet, um die Strahlungsdosierung zu präzisieren und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Die Bestrahlung erfolgte von unten durch Positionierung der Mikrotiterplatte auf einem Transilluminator IL-350-M der Firma *Bachofer* mit UV-Röhren der Wellenlänge 365 nm. Die Bestrahlungszeiten betragen soweit nicht anders angegeben zwei Stunden. Die Analyse erfolgte experimentabhängig über LC/MS-, Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen oder durch SDS-PAGE.

*STAT5-Puffer*: 10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1 % Igepal CA 630

**Allgemeines Vorgehen** Zunächst wurden alle Vertiefungen bis auf die erste einer Verdünnungsreihe mit 10  $\mu\text{L}$  Puffer versetzt. Die zu verdünnende Substanz (STAT5 oder Sonde) wurde in der ersten Vertiefung vorgelegt und dann sukzessive um den Faktor 1/2 verdünnt. Anschließend wurden weitere Komponenten (Sonde oder STAT5 bzw. BSA zur Kontrolle etc.) hinzugegeben. Das Assayvolumen betrug 20  $\mu\text{L}$ . Die Vertiefungen wurden mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie verschlossen, die Mikrotiterplatte zentrifugiert, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf dem Transilluminator bei 4 °C im Kühlraum bestrahlt.

**Einfluß von UV-Bestrahlung auf  $K_i$ - bzw.  $K_d$ -Werte** Die Messungen wurden in schwarzen, kleinvolumigen 384-Well-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden (Corning #3544) durchgeführt. Das Vorgehen entspricht dem wie unter  $K_d$ -Wertbestimmung bzw. Verdrängungsassay beschrieben. Nach der ersten Messung ohne Bestrahlung wurde die Mikrotiter auf dem Transilluminator bei 4 °C bestrahlt. Weitere Fluoreszenzpolarisationsmessungen erfolgten nach 0, 10, 30, 60, 120, und 240 Minuten. Dafür wurde die Platte aus dem Kühlraum genommen und zehn Minuten auf Raumtemperatur erwärmt bevor die FP-Messung erfolgte. Die Auswertung erfolgte wie zuvor beschrieben.

**Photostabilitätsassay** Zur Bestimmung der Photostabilität der Benzoylphosphonate wurden die Verbindung mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in STAT5-Puffer gelöst. Es wurden je 20  $\mu\text{L}$  pro Vertiefung pipettiert. Jeder Zeitpunkt 0, 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten wurde einzeln pipettiert und die Vertiefungen zum entsprechenden Zeitpunkt von unten mit selbstklebender Aluminiumfolie versiegelt. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Proben mit je 30  $\mu\text{L}$  Wasser verdünnt und mittels LC/ToF-MS vermessen. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen bei 254 nm.

**Pulldown-Experimente** Sowohl Probenvorbereitung als auch Bestrahlung wurde wie allgemein beschrieben durchgeführt. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und eine Sondenkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  verwendet. Als Kontrollen dienten Experimente ohne Sondenzusatz, sowie ohne Bestrahlung. Darüber hinaus wurden Vergleiche mit und ohne Pulldown durchgeführt. Für die Pulldown-Experimente wurden je 50  $\mu\text{L}$  NeutrAvidin™ Agarose Beads (Kapazität: 20  $\mu\text{g}$  Biotin pro mL Harz) der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Jede der abgenommenen Harzportionen wurde mit dreimal 500  $\mu\text{L}$  STAT5-Puffer gewaschen. Die bestrahlten Proben wurden zusammen mit 20  $\mu\text{L}$  STAT5-Puffer zu den Avidin-Beads gegeben und in einem Thermomixer bei 4 °C über Nacht geschüttelt (ca. 16 Std.). Anschließend wurden die Proben bei 2500 $\times$ g für zwei

Minuten zentrifugiert, die Überstände abgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Harzkugeln wurden fünfmal mit jeweils einem Milliliter STAT5-Puffer gewaschen und dann mit 20  $\mu\text{L}$  STAT5-Puffer und 10  $\mu\text{L}$  Ladepuffer versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 95 °C wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt, das Kondenswasser herunterzentrifugiert, erneut durchmischt und die Harzkugeln nochmals vorsichtig herunterzentrifugiert. Anschließend wurden 15  $\mu\text{L}$  jeder Probe mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Proteinbande bei ca. 120 kDa wurde ausgeschnitten und von der AG Krause einem tryptischen Verdau und anschließender Identifizierung mittels LC/MS/MS unterzogen (Protokoll s. Anhang).

**Experimente zur Zeitabhängigkeit des Photocrosslinkings** Bei Zeitvariationen wurden identische Experimente mehrmals pipettiert und nach der entsprechenden Zeit von unten mit selbstklebender Aluminiumfolie doppelt versiegelt, um weiteren Lichteinfall zu verhindern. Die Vorbereitung erfolgte wie allgemein beschrieben. Die Analysen wurden mittels SDS-PAGE und Gel-Fluoreszenz-Imaging durchgeführt.

**SDS-PAGE** Bei der Durchführung wurden Criterion TRIS HCl Gradientengele 4-20% der Firma *BIO-RAD* verwendet. Als Molgewichtreferenz wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard der gleichen Firma verwendet.

Nach der Bestrahlung wurden die Platten mit 2000 rpm zentrifugiert, um entstandenes Kondenswasser von der Folie zu entfernen und so Konzentrationsveränderungen vorzubeugen. Jede Vertiefung wurde mit fünflichem Ladepuffer versetzt, gründlich durchmischt und der Inhalt in 500  $\mu\text{L}$  Eppendorfgefäße transferiert. Jede Probe wurde fünf Minuten bei 95 °C in einem Thermoschüttler der Firma *Eppendorf* denaturiert und nach dem Abkühlen zur Entfernung des Kondenswassers wiederum zentrifugiert (13400rpm, *Eppendorf MiniSpin*). Nach anschließender Durchmischung wurden 15  $\mu\text{L}$  Substanz auf das Gel aufgetragen, sowie 0.5  $\mu\text{L}$  einer Mischung von Markerproteinen auf den äußeren Bahnen. Die Gelelektrophorese dauerte 75 Minuten bei 200 V.

Anschließend wurde das Gel kurz in Wasser abgespült und dann im Lumi-Imager (Abschnitt 10.4.6.3) analysiert. Anschließend wurde das Gel vorübergehend in einer Fixierlösung gelagert. Kolloidales Coomassie (*Rotiblu*) wurde 1:5 mit einer 25 %igen Methanollösung in Wasser verdünnt und das Gel darin über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 30 Min. in 25 % Methanol/Wasser geschwenkt und dann ca. eine Woche in Wasser entfärbt.

**Tab. 10.6:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung
Ladepuffer	240 mM TRIS HCl (pH 6.8), 40 % Glycerol, 8 % SDS, 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.04 % Bromphenolblau
Laemmli-Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0.1 % Natriumdodecylsulfat
Proteinmarker	Precision Plus Protein Dual Color Standard
Fixierlösung	10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % Wasser

**Gel-Imaging** Die Bilder der Polyacrylamidgele, sowie die Fluoreszenzmessungen der Proteinbanden wurden mit einem LAS-4000 der Firma *Fuji* aufgenommen bzw. durchgeführt. Als Einstellungen wurden „High Precision“ und „High Resolution“ verwendet. Für die Fluoreszenzbilder wurde die Anregungswellenlänge von SybrGreen ( $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ ) verwendet und eine Belichtungszeit zwischen 20 und 60 Sekunden verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Bilder und Messungen zu gewährleisten, wurden Vergleichsmessungen stets mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Coomassiegefärbte Gele wurden im DIA-Modus mit einer Belichtungszeit von sechs Sekunden fotografiert.

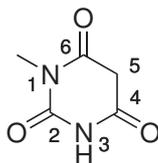
Vor der Aufnahme der Bilder wurden die Gele kurz in Wasser getaucht, um anhaftenden SDS-Puffer zu entfernen und dann auf einer transparenten Folie in den Imager gelegt.

**Auswertung** Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Software „Multi Gauge“. Die einzelnen Proteinbanden wurden markiert und deren Fluoreszenz gemessen. Für jede Bande wurde der Fluoreszenzhintergrund einer entsprechend gleichgroßen Fläche auf dem Gel gemessen und von der Bandenfluoreszenz subtrahiert. Die Fluoreszenzwerte wurden in GraphPad Prism 5 übertragen. Bei Auftragungen der Fluoreszenzen gegen den Logarithmus der Konzentration wurde „Single Dose Response - Variable Slope“ zur Regression verwendet. Im Falle des Zeitverlaufs oder bei Experimenten, in denen verschiedene Proteine zur Verdeutlichung des unspezifischen Crosslinkings verglichen wurden, wurde „Saturation Binding“ zur Regression verwendet.

## 10.5 Synthese

### 10.5.1 Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin 45

#### Synthese von 1-Methylbarbitursäure 48



12 mL Natriumethanolat (21 %wt in EtOH, 32 mmol) wurden zu 5 mL Malonsäurediethyl-ester **47** (33 mmol) gegeben, wobei ein weißer Niederschlag entstand, der durch Zugabe von 30 mL EtOH wieder in Lösung ging. Nach Zugabe von 2.4 g *N*-Methylharnstoff **46** (32 mmol) wurde die Mischung 21 Std. unter Rückfluss (Siliconölbadtemperatur 200°C) gekocht. Nach Abkühlen wurde der Niederschlag durch Zugabe von 44 mL Wasser wieder in Lösung gebracht, mit 3 mL konzentrierter Salzsäure angesäuert und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde mit Wasser und Ethanol versetzt, um das Natriumchlorid auszuwaschen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.65 g (26 mmol), 80 %

$C_5H_6N_2O_3$  (142.11 g/mol)

$^1H$ -NMR ( $D_2O$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 3.25 (s, 3H, N- $CH_3$ )

Die Methylen- und die Amidgruppe sind aufgrund des H/D-Austauschs im Spektrum nicht sichtbar.

$^{13}C$ -NMR ( $D_2O$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 170.0 (C-4), 169.7 (C-6), 153.8 (C-2), 39.5 (C-5), 28.1 (N- $CH_3$ )

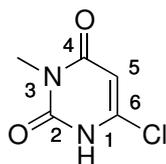
LC/MS (ESI):

$t_r$  = 0.72 Min. (Gradient II, Säule II)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 143.0  $[M+H]^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 143.2  $[M+H]^+$

### Synthese von 6-Chlor-3-methyluracil **49**



Zu einer Suspension aus 12 g 1-Methylbarbitursäure **48** (84 mmol) und 4.4 mL Wasser wurden bei 0°C vorsichtig 96 mL Phosphorylchlorid (1.1 mol, 13 Äq.) zugegeben. Die beige Suspension wurde 45 Minuten bei 125°C unter Rückfluss gekocht. Nach fünfzehnminütigem Abkühlen wurde das überschüssige Phosphorylchlorid am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückgebliebene, braune Öl vorsichtig mit Eiswasser versetzt (Reste von Phosphorylchlorid vorhanden). Der dabei entstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 9.2 g (57 mmol), 68 %

$C_5H_5ClN_2O_2$  (160.56 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 12.32 (s, br, 1H, *H-1*), 5.88 (s, 1H, *H-5*), 3.09 (s, 3H, N- $CH_3$ )

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 161.8 (C-4), 150.5 (C-2), 143.2 (C-6), 99.2 (C-5), 26.7 (N- $CH_3$ )

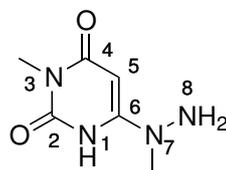
LC/MS (ESI):

$t_r$  = 1.87 Min. (Gradient III, Säule II)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 161.0 [M+H] $^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 161.2 [M+H] $^+$

### Synthese von 3-Methyl-6-(1-methylhydrazino)uracil **51**



Zu einer Lösung aus 508 mg 6-Chlor-3-methyluracil **49** (3.2 mmol) in 9.5 mL Dioxan wurde eine Lösung aus 870  $\mu$ L Methylhydrazin **50** (16 mmol, 5 Äq.) in 3.1 mL EtOH gegeben. Die Mischung wurde 11 Minuten bei 90°C in der Mikrowelle gerührt. Anschließend wurde eine Suspension aus 170 mg Natriummethanolat (3.2 mmol) in 3.1 mL MeOH zugegeben und die Reaktionslösung vier Minuten in der Mikrowelle bei 80°C

gerührt. Das ausgefallene Natriumchlorid wurde abfiltriert. Das Produkt ist bis auf Reste von Natriumchlorid sauber und wurde im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: wegen Natriumchloridresten nicht bestimmt worden

$C_6H_{10}N_4O_2$  (170.17 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 4.65 (s, 1H,  $H-5$ ), 3.04 (s, 3H,  $N^3-CH_3$ ), 3.02 (s, 3H,  $N^7-CH_3$ )

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 162.9 (C-4), 153.8 (C-6), 150.4 (C-2), 72.3 (C-5), 40.3 ( $N^7-CH_3$ ), 26.0 ( $N^3-CH_3$ )

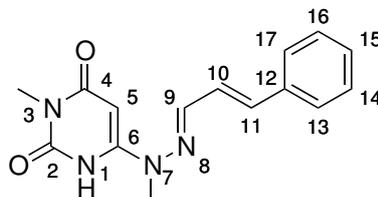
LC/MS (ESI):

$t_r$  = 1.02 Min. (Gradient III, Säule II)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 171.1 [M+H] $^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 171.2 [M+H] $^+$

### Synthese von 6-(1-Methyl-2-((styryl)methylen)hydrazinyl)-3-methyluracil **53**



Zu einer Suspension aus 654 mg 3-Methyl-6-(1-methylhydrazino)uracil **51** (3.8 mmol) in 35 mL EtOH wurden 140  $\mu$ L konzentrierte Salzsäure gegeben, wodurch eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden 725  $\mu$ L Zimtaldehyd **52** (5.8 mmol, 1.5 Äq.) und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene orange Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 423 mg (1.5 mmol), 39 %

$C_{15}H_{16}N_4O_2$  (284.31 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 10.34 (s, 1H,  $H-1$ ), 7.79 (d, 1H,  $^3J_{9,10} = 8.7$  Hz,  $H-9$ ), 7.54 (d, 2H,  $^3J_{13/17,14/16} = 7.4$  Hz,  $H-13$ ,  $H-17$ ), 7.40 (dd, 2H,  $^3J_{14/16,13/17} = 7.4$  Hz,  $H-14$ ,  $H-16$ ), 7.31 (dd, 1H,  $^3J_{15,14/16} = 7.2$  Hz,  $H-15$ ), 7.23 (dd, 1H,  $^3J_{10,11} = 16.1$  Hz,  $^3J_{9,10} = 8.7$  Hz,  $H-10$ ), 7.02 (d, 1H,  $^3J_{10,11} = 16.2$  Hz,  $H-11$ ), 5.23 (s, 1H,  $H-5$ ), 3.28 (s, 3H,  $H-7$  ( $N-CH_3$ )), 3.10 (s, 3H,  $H-3$  ( $N-CH_3$ ))

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 163.2 (C-4), 150.4 (C-2), 150.1 (C-6), 141.3 (C-9), 137.4 (C-11), 136.2 (C-12), 128.9 (C-14, C-16), 128.6 (C-15), 126.7 (C-13, C-17), 126.2 (C-10), 76.6 (C-5), 31.3 (C-7), 26.2 (C-3)

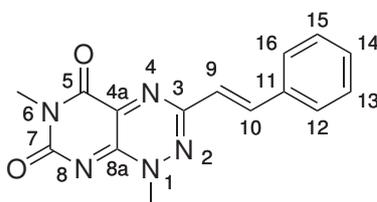
LC/HRMS (ESI):

$t_r$  = 2.14 Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 285.1346 [M+H] $^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 285.1349 [M+H] $^+$ ;  $\Delta$  = 1.19 ppm

### Synthese von 3-Styrylpyrimidotriazin 45



Zu einer Lösung von 8.0 g 6-(1-Methyl-2-((styryl)methylen)hydrazinyl)-3-methyluracil **53** (28 mmol) in 300 mL Essigsäure und 2 mL Wasser wurden bei 0 °C 2.3 g Natriumnitrit (34 mmol) zugegeben. Nach zwei Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingeeengt und mit wenig Wasser gewaschen. Der Feststoff aus dem Niederschlag (5.8 g) mit einem hohen Anteil des N-Oxids **56** (17 mmol, 91 % laut LC/MS) wurde in 380 mL EtOH suspendiert, mit 3.5 mL Thiophenol (35 mmol, 2 Äq.) versetzt und 45 Minuten bei 90 °C Badtemperatur gerührt. Der Feststoff aus dem Filtrat (3.6 g) mit einem geringeren Anteil des N-Oxids **56** (4.7 mmol, 39 %) wurde in 240 mL EtOH suspendiert, mit 970  $\mu\text{L}$  Thiophenol (9.4 mmol, 2 Äq.) versetzt und ebenfalls 45 Minuten bei 90 °C Ölbadtemperatur gerührt. Nach Abkühlen wurden die leuchtend roten Niederschläge abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5.7 g (19 mmol), 69 %

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$  (295.31 g/mol)

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 7.80-7.75 (m, 3H, H-10, H-12, H-16), 7.47-7.39 (m, 3H, H-13, H-15, H-14), 7.29 (d, 1H,  $^3J_{9,10}$  = 16 Hz, H-9), 3.98 (s, 3H, H-1), 3.28 (s, 3H, H-6)

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 158.9 (C-5 oder C-7), 154.0 (C-5 oder C-7), 151.9 (C-3), 149.3 (C-8a), 146.0

(C-4a), 137.4 (C-10), 135.0 (C-11), 129.6 (C-14), 128.9 (C-13, C-15), 127.8 (C-12, C-16), 122.0 (C-9), 42.4 (C-1), 28.3 (C-6)

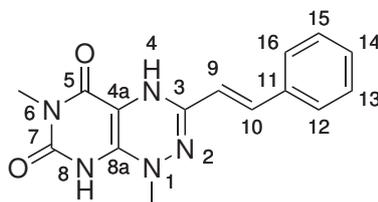
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 2.11$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 296.1142  $[M+H]^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 296.1141  $[M+H]^+$ ;  $\Delta = 0.44$  ppm

### Synthese von 4,8-Dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 59



Zu einer Suspension aus 499 mg 3-Styrylpyrimidotriazin **45** (1.7 mmol) in 17 mL entgastem EtOH wurden unter Stickstoffatmosphäre 405  $\mu$ L Thiophenol (3.9 mmol, 2.3 Äq.) gegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der tiefbraune Niederschlag wurde abfiltriert, dreimal mit entgastem EtOH unter Stickstoffatmosphäre gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 440 mg (1.5 mmol), 88 %

$C_{15}H_{15}N_5O_2$  (297.31 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 10.95 (s, 1H, *H*-8), 7.63-7.24 (m, 6H, *H*-9 oder *H*-10, *H*-12, *H*-16, *H*-13, *H*-15, *H*-14), 6.93 (s, 1H, *H*-4), 6.46 (d, 1H,  $^3J_{9,10} = 16$  Hz, *H*-9 oder *H*-10), 3.09 (s, 3H, *H*-5), 2.98 (s, 3H, *H*-1)

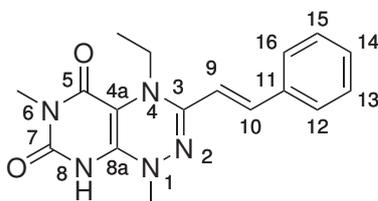
Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Verbindung konnte keine LC/MS-Analyse durchgeführt werden.

### Synthese von *N*<sup>4</sup>-Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 57 und 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 58

Zu einer Suspension aus 670 mg 4,8-Dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **59** (2.3 mmol) in 23 mL entgastem Chloroform wurden 670  $\mu$ L DBU (4.5 mmol, 2 Äq.) zugesetzt. Nach zehn Minuten wurden 1.8 mL Ethyliodid zugegeben und über Nacht bei 60 °C gerührt.

Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer eingeengt und das verbliebene Chloroform mit jeweils dreimal 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt. Die Fraktionen der Produkte wiesen jedoch noch Verunreinigungen auf, so dass diese mittels präparativer HPLC aufgereinigt wurden. Von den 60 mg Rohprodukt der N-alkylierten Spezies wurde alles aufgereinigt, wobei 54 mg reines Produkt isoliert wurden. Von den 460 mg Rohprodukt der C-alkylierten Spezies wurden nur 97 mg aufgereinigt und 71 mg reines Produkt isoliert.

### ***N*<sup>4</sup>-Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 57**



Ausbeute: 54 mg (166  $\mu$ mol), 7 %

$C_{17}H_{19}N_5O_2$  (325.37 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 10.45 (s, 1H, *H*-8), 7.59-7.52 (m, 3H, *H*-10, *H*-12, *H*-16), 7.47-7.40 (m, 3H, *H*-13, *H*-15, *H*-14), 6.85 (d, 1H,  $^3J_{9,10} = 16$  Hz, *H*-9), 4.09 (dq, 1H,  $^2J_{H_a,H_b} = 12$  Hz,  $^3J_{CH_a,CH_3} = 7.0$  Hz,  $CH_aH_b$  (Et)), 3.61-3.50 (m, 4H,  $CH_aH_b$  (Et), *H*-1), 3.18 (s, 3H, *H*-6), 1.24 (t, 3H,  $^3J_{CH_3,CH_2} = 7.0$  Hz,  $CH_3$  (Et))

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

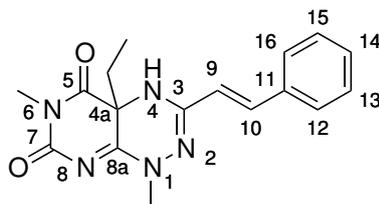
$\delta$  [ppm]: 157.9 (C-5 oder C-7), 154.2 (C-5 oder C-7), 151.2 (C-3), 137.8 (C-8a), 136.83 (C-10), 134.6 (C-11), 129.8 (C-14), 129.1 (C-13, C-15), 127.5 (C-12, C-16), 117.2 (C-9), 101.4 (C-4a), 63.7 ( $CH_2$  (Et)), 57.0 (C-1), 27.6 (C-6), 8.7 ( $CH_3$  (Et))

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.91$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 326.1612 [M+H] $^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 326.1625 [M+H] $^+$ ;  $\Delta = 4.13$  ppm

**4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 58**

Ausbeute: 71 mg (218  $\mu$ mol) von 97mg, umgerechnet auf 460 mg: 337 mg (1.0 mmol),  
46 %

$C_{17}H_{19}N_5O_2$  (325.37 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.00 (s, 1H, *H*-4), 7.59-7.54 (m, 3H, *H*10, *H*-12, *H*-16), 7.44-7.33 (m, 3H, *H*-13, *H*-15, *H*-14), 6.74 (d, 1H,  $^3J_{9,10} = 17$  Hz, *H*-9), 3.43 (s, 3H, *H*-1), 3.10 (s, 3H, *H*-6), 1.93-1.73 (m, 2H,  $CH_2$  (Et)), 0.85 (t, 3H,  $^3J_{CH_3,CH_2} = 7.5$  Hz,  $CH_3$  (Et))

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

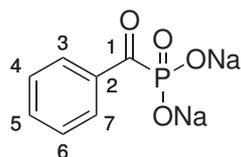
$\delta$  [ppm]: 168.0 (C-5), 155.8 (C-8a), 154.2 (C-7), 147.0 (C-3), 135.6 (C-10), 135.2 (C-11), 129.2 (C-14), 128.9 (C-13, C-15), 127.2 (C-12, C-16), 119.0 (C-9), 55.1 (C-4a), 38.7 (C-1), 32.8 ( $CH_2$  (Et)), 27.6 (C-6), 7.4 ( $CH_3$  (Et))

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 2.23$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 326.1612 [M+H] $^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 326.1622 [M+H] $^+$ ;  $\Delta = 3.22$  ppm

**10.5.2 Synthese von  $\alpha$ -Ketophosphonaten****Synthese von Dinatriumbenzoylphosphonat 11-Na**

Zu 433  $\mu$ L Diethylbenzoylphosphonat **12** (2.1 mmol) in 2 mL trockenem Acetonitril wurden unter Stickstoff 600  $\mu$ L Trimethylsilylbromid (4.5 mmol, 2.2 Äq.) gegeben und das Gemisch vier Stunden bei 60 °C in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch mit 20 mL MeOH/Wasser (95:5 *v/v*) versetzt und am Rotationsverdampfer

eingengt. Der ölige Rückstand wurde fünf Minuten im Hochvakuum getrocknet, dann mit 6 mL Wasser versetzt und über 3.0 g Amberlite-Harz (IR 120plus Natriumform) eine Stunde gerührt. Das Harz wurde abfiltriert, das Filtrat über einen Spritzenfilter mit Nylonmembran (0.45  $\mu\text{m}$ ) nochmals filtriert und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein weißes Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 453 mg (2.0 mmol), 96 %

$\text{C}_7\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{P}$  (230.07 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.21 (d, 2H,  $^3J_{3/7,4/6} = 7.4$  Hz, *H-3*, *H-7*), 7.74 (dd, 1H,  $^3J_{5,4/6} = 7.5$  Hz, *H-5*), 7.60 (dd, 2H,  $^3J_{4/6,3/7/5} = 7.5$  Hz, *H-4*, *H-6*)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 208.6 (d,  $^1J_{1,\text{P}} = 170$  Hz, C-1), 135.3 (d,  $^2J_{2,\text{P}} = 52$  Hz, C-2), 134.2 (C-5), 128.9 (d,  $^3J_{3/7,\text{P}} = 1.3$  Hz, C-3, C-7), 128.4 (C-4, C-6)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: -0.55 (s)

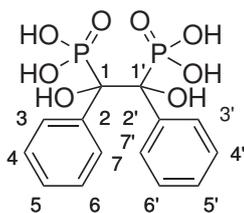
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 0.62$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 187.0155  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 187.0150  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\Delta = 2.63$  ppm

### Synthese von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31**



300 mg Dinatriumbenzoylphosphonat **11-Na** (1.3 mmol) wurden in 150 mL *iso*-Propanol/Wasser (70:30 *v/v*) gelöst und in einer Kristallisierschale bei 4 °C auf einem Transilluminator mit einer Wellenlänge von 365 nm vier Stunden bestrahlt. Das *iso*-Propanol wurde im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Gemisch wurde mittels HPLC aufgereinigt (5-100 % MeCN in 45 Min., 25 mL/Min.). Es wurden zwei Dimerisationsprodukte isoliert.

**Dimer I:** Ausbeute: 32 mg (86  $\mu\text{mol}$ ), 13 %

$C_{14}H_{16}O_8P_2$  (374.22 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 7.28 (d, 4H,  $^3J_{3/7/3'/7',4/6/4'/6'} = 7.3$  Hz,  $H-3$ ,  $H-7$ ,  $H-3'$ ,  $H-7'$ ), 7.21-7.05 (m, 6H,  $H-4$ ,  $H-6$ ,  $H-4'$ ,  $H-6'$ ,  $H-5$ ,  $H-5'$ )

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 137.0 (d,  $^2J_{2/2',P} = 5.7$  Hz, C-2, C-2'), 128.5 (d,  $^3J_{3/7/3'/7',P} = 3.9$  Hz, C-3, C-7, C-3', C-7'), 126.7 (s, C-5, C-5'), 126.0 (s, C-4, C-6, C-4', C-6'), 80.0 (dd,  $^1J_{1,P;1',P'} = 150$  Hz,  $^2J_{1,P;1',P} = 12$  Hz, C-1, C-1')

$^{31}P\{^1H\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 21.95 (s)

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.41$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 375.0393 [M+H] $^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 375.0387 [M+H] $^+$ ;  $\Delta = 1.60$  ppm

**Dimer II:** Ausbeute: 37 mg (99  $\mu$ mol), 15 %

$C_{14}H_{16}O_8P_2$  (374.22 g/mol)

$^1H$ -NMR ( $D_2O/MeCN-d_3$  1:1, 300 MHz, 265 K)

$\delta$  [ppm]: 7.74 (d, br, 2H), 7.15-6.99 (m, br, 8H)

Die Signale der Hydroxy- und Phosphonsäuregruppen sind aufgrund des H/D-Austauschs im Spektrum nicht sichtbar.

$^{13}C$ -NMR ( $D_2O/MeCN-d_3$  1:1, 75 MHz, 265 K)

$\delta$  [ppm]: 138.7 (d,  $^2J_{C,P} = 11$  Hz), 128.0 (s, br), 127.6 (s, br), 127.5 (s, br), 126.8 (s, br), 119.4 (s, vb), 80.0 (dd,  $^1J_{1,P;1',P'} = 148$  Hz,  $^2J_{1,P;1',P} = 5.7$  Hz, C-1, C-1')

Eine eindeutige Zuordnung der Signale war nicht möglich.

$^{31}P\{^1H\}$ -NMR ( $D_2O/MeCN-d_3$  1:1, 121.5 MHz, 265 K)

$\delta$  [ppm]: 25.82 (s, vb)

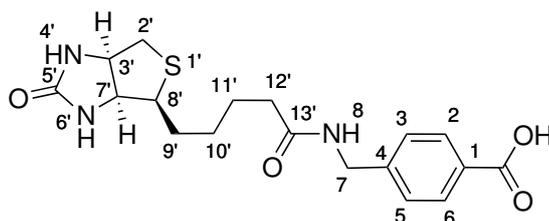
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.58$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 375.0393 [M+H] $^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 375.0396 [M+H] $^+$ ;  $\Delta = 0.80$  ppm

## Synthese von *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoesäure **16**



2.0 g D-Biotin **15** (8.4 mmol) wurden bei 80 °C in 40 mL trockenem DMF gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1.5 g Diimidazolylketon (9.3 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Nachdem sich nach einer Stunde ein Niederschlag gebildet hat, wurden 5 mL trockenes DMF und 1.3 g 4-(Aminomethyl)benzoesäure **14** (8.2 mmol) hinzugegeben und auf 100 °C erhitzt bis nach 30 Minuten eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde die Lösung auf 55 °C abgekühlt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 300 mL Dichlormethan versetzt. Dabei entstand ein gelartiger Niederschlag, der dreimal mit je 30 mL Methanol gewaschen wurde. Das Filtrat wurde eingengt und der Rückstand mit 5 mL Methanol gewaschen. Beide Feststoffe wurden miteinander vereinigt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.6 g (6.9 mmol), 82 %

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S (377.46 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.37 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 5.8 Hz, *H*-8), 7.89 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>2/6,3/5</sub> = 8.2 Hz, *H*-2, *H*-6), 7.35 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>3/5,4/6</sub> = 8.2 Hz, *H*-3, *H*-5), 6.38 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>4'/6',3'/7'</sub> = 20 Hz, *H*-4', *H*-6'), 4.33-4.28 (m, 3H, *H*-7, *H*-3'), 4.17-4.09 (m, 1H, *H*-7'), 3.14-3.05 (m, 1H, *H*-8'), 2.83 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>2a',2b'</sub> = 12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2a',3'</sub> = 5.0 Hz, *H*-2a'), 2.58 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>2b',2a'</sub> = 12 Hz, *H*-2b'), 2.16 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>12',11'</sub> = 7.3 Hz, *H*-12'), 1.70-1.40 (m, 4H, *H*-9', *H*-11'), 1.39-1.23 (m, 2H, *H*-10')

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 172.2 (C-13'), 167.2 (COOH), 162.7 (C-5'), 144.9 (C-4), 129.4 (C-2, C-6), 129.3 (C-1), 127.1 (C-3, C-5), 61.1 (C-7'), 59.2 (C-3'), 55.4 (C-8'), 41.8 (C-7), 39.8 (C-2'), 35.1 (C-12'), 28.2 (C-10'), 28.0 (C-9' oder C-11'), 25.3 (C-9' oder C-11')

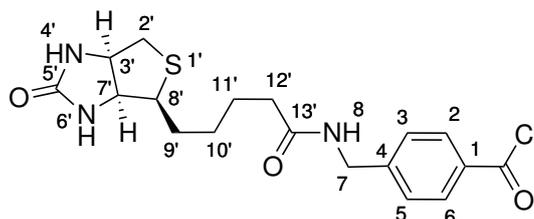
LC/HRMS (ESI):

*t<sub>r</sub>* = 1.71 Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 378.1482 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 378.1492 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta$  = 2.66 ppm

### Synthese von *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoesäurechlorid **17**



Zu 41 mg *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoesäure **16** (0.11 mmol) wurde bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre 1 mL Thionylchlorid (14 mmol) gegeben und kräftig gerührt. Nach 15 Minuten wurde das überschüssige Thionylchlorid bei Raumtemperatur im Hochvakuum über eine Kühlfalle entfernt. Zum öligen Rückstand wurden 3 mL trockenes Ethylenchlorid gegeben und wiederum im Hochvakuum entfernt. Diese Prozedur wurde mit 4 mL trockenem THF wiederholt. Der Rückstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: nicht isoliert

$C_{18}H_{22}ClN_3O_3S$  (395.11 g/mol)

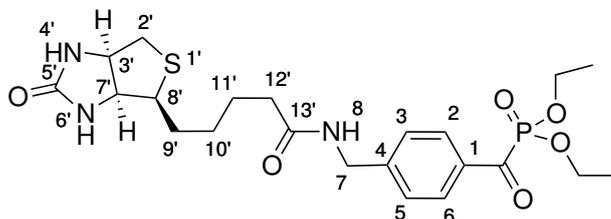
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.87$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 392.1639  $[M+H]^+$  (Methylester)

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 392.1643  $[M+H]^+$ ;  $\Delta = 1.2$  ppm (Methylester)

### Synthese von Diethyl-*N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **18**



Das Säurechlorid **17** wurde in 2 mL trockenem THF gelöst und anschließend mit 28  $\mu$ L  $P(OEt)_3$  (0.17 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach einem Tag wurde auf 50 °C erhitzt. Nach dreieinhalb Stunden wurden 19  $\mu$ L  $P(OEt)_3$  (0.11 mmol, 1 Äq.) zugegeben und weitere drei Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Hochvakuum zur Trockne eingengt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC-Methode: 40-70 % MeCN in 45 Min., 27 mL/Min.

Ausbeute: 11 mg (22  $\mu\text{mol}$ ), 20 % (bezogen auf *N*-Biotinyl-4-aminomethylbenzoesäure **16**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_6\text{PS}$  (497.17 g/mol)

Aufgrund der geringen Menge wurde diese Verbindung lediglich durch Retentionszeit und exakte Masse charakterisiert.

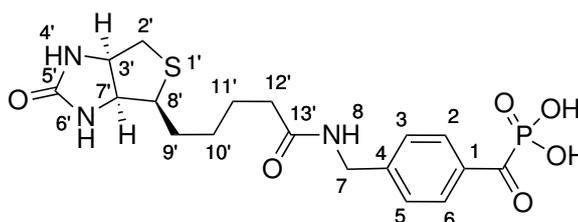
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.92$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 498.1822  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 498.1824  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\Delta = 0.41$  ppm

### Synthese von *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonsäure **13**



11 mg Diethyl-*N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **18** (22  $\mu\text{mol}$ ) wurden in 200  $\mu\text{L}$  trockenem Acetonitril suspendiert und mit 7.5  $\mu\text{L}$  TMSBr (57  $\mu\text{mol}$ , 2.6 Äq.) versetzt. Nach vierstündigem Rühren bei 60 °C in der Mikrowelle wurde das Reaktionsgemisch mit 2 mL eines Methanol-Wasser-Gemisches (95:5 *v/v*) gequenchet und zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der Rückstand mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 2 mg (4.5  $\mu\text{mol}$ ), 23 %

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{PS}$  (441.44 g/mol)

LC/HRMS (ESI):

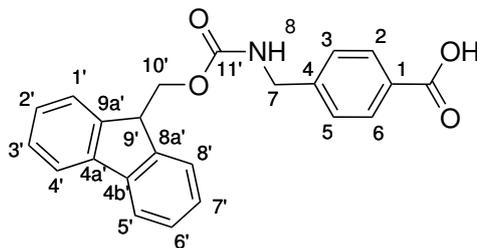
$t_r = 1.50$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 442.1196  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 442.1188  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\Delta = 1.88$  ppm

Weitere Charakterisierung: s. Seite 150

## Synthese von *N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoesäure **24**



Zu 1.0 g 4-(Aminomethyl)benzoesäure **14** (6.6 mmol) in einer Mischung aus 66 mL Wasser und 66 mL 1,4-Dioxan wurden 2.1 g Natriumcarbonat (20 mmol, 3 Äq.) gegeben und auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1.7 g Fmoc-Chlorid (6.6 mmol, 1 Äq.) zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 6 Stunden wurde mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 angesäuert, der Niederschlag abfiltriert und zweimal mit 10 mL Wasser und einmal mit 15 mL Hexan gewaschen. Der weiße Feststoff wurde im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.2 g (5.9 mmol), 89 %

$C_{23}H_{19}NO_4$  (373.40 g/mol)

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 12.86 (s, vb, 1H, COOH), 7.95-7.93 (m, 1H, *H*-8), 7.89 (d, 4H,  $^3J = 8.0$  Hz, *H*-2, *H*-6, *H*-4', *H*-5'), 7.70 (d, 2H,  $^3J_{1'/8',2'/7'} = 7.4$  Hz, *H*-1', *H*-8'), 7.42 (dd, 2H,  $^3J_{3'/6',2'/7',4'/5'} = 7.4$  Hz, *H*-3', *H*-6'), 7.35-7.31 (m, 4H, *H*-3, *H*-5, *H*-2', *H*-7'), 4.37 (d, 2H,  $^3J_{10',9'} = 6.7$  Hz, *H*-10'), 4.25 (d, 2H,  $^3J_{7,8} = 6.2$  Hz, *H*-7), 4.25-4.21 (m, 1H, *H*-9')

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 167.1 (COOH), 156.4 (C-11'), 144.9 (C-4), 143.8 (C-8a', C-9a'), 140.8 (C-4a', C-4b'), 129.34 (C-2, C-6), 129.32 (C-1), 127.6 (C-3', C-6'), 127.02 (C-2', C-7'), 126.95 (C-3, C-5), 125.1 (C-1', C-8'), 120.1 (C-4', C-5'), 65.3 (C-10'), 46.8 (C-9'), 43.5 (C-7)

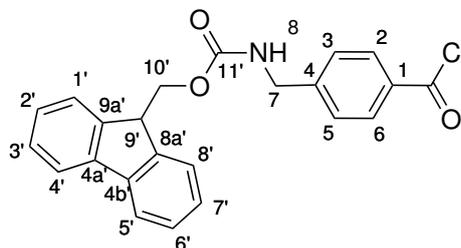
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 2.37$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $[\frac{m}{z}]$ : 374.1387 [M+H] $^+$

Gefunden  $[\frac{m}{z}]$ : 374.1384 [M+H] $^+$ ;  $\Delta = 0.84$  ppm

## Synthese von *N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoesäurechlorid **25**



Zu einer Suspension aus 1.5 g *N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoesäure **24** (4.0 mmol) in 5.5 mL trockenem Dichlormethan wurde ein Tropfen DMF gegeben. Anschließend wurden 675  $\mu$ L Oxalylchlorid (8.0 mmol, 2  $\ddot{A}$ q.) in 3.8 mL Dichlormethan zugetropft. Nach vier Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurden 45 mL Toluol zugegeben, zur Trockne einrotiert und der blassgelbe Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff besaß eine Reinheit von 95% (LC/MS, nach Umsatz mit Methanol als Methylester) und wurde ohne Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

$C_{23}H_{18}ClNO_3$  (391.85 g/mol)

$^1H$ -NMR ( $CD_2Cl_2$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.06 (d, 2H,  $^3J_{2/6,3/5} = 8.0$  Hz, *H*-2, *H*-6), 7.78 (d, 2H,  $^3J_{4'/5',3'/6'} = 7.2$  Hz, *H*-4', *H*-5'), 7.61 (d, 2H,  $^3J_{1'/8',2'/7'} = 7.0$  Hz, *H*-1', *H*-8'), 7.43-7.29 (m, 6H, *H*-3', *H*-6', *H*-3, *H*-5, *H*-2', *H*-7'), 5.30-5.22 (m, br, 1H, *H*-8), 4.49 (d, 2H,  $^3J_{10',9'} = 6.4$  Hz, *H*-10'), 4.42 (d, 2H,  $^3J_{7,8} = 5.7$  Hz, *H*-7), 4.23 (t, 1H,  $^3J_{9',10'} = 6.1$  Hz, *H*-9')

$^{13}C$ -NMR ( $CD_2Cl_2$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 168.3 (*C*OCl), 156.7 (C-11'), 147.6 (C-4), 144.3 (C-8a', C-9a'), 141.7 (C-4a', C-4b'), 132.1 (C-2, C-6), 129.3 (C-1), 128.0 (C-3', C-6'), 127.9 (C-3, C-5), 127.4 (C-2', C-7'), 125.3 (C-1', C-8'), 120.3 (C-4', C-5'), 67.0 (C-10'), 47.8 (C-9'), 44.8 (C-7)

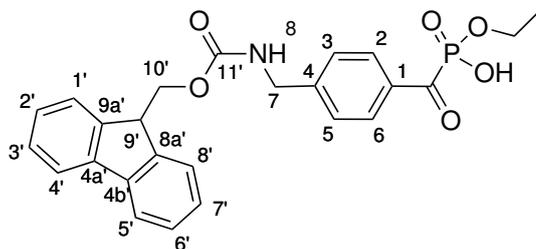
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 2.59$  Min. (Gradient I, Säule I) (Methylester)

Berechnet [ $\frac{m}{z}$ ]: 388.1543 [M+H]<sup>+</sup> (Methylester,  $C_{24}H_{21}NO_4$ )

Gefunden [ $\frac{m}{z}$ ]: 388.1539 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 1.20$  ppm (Methylester)

### Synthese von Ethyl-*N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **27**



Zu einer Suspension aus 998 mg *N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoesäurechlorid **25** (2.6 mmol) in 25 mL trockenem Toluol wurden 480  $\mu$ L Triethylphosphit (2.8 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben und 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum über eine Kühlfalle entfernt. Das leicht gelbliche Öl wurde im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Öl in 5 mL trockenem Acetonitril angelöst. Separat wurden 2.3 g Lithiumbromid (26 mmol, 10 Äq.) in 70 mL trockenem Acetonitril gelöst und zur Lösung des Phosphonats **26** gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 19 Stunden bei 75 °C gerührt und der Niederschlag nach Abkühlen abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde dreimal mit Aceton gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 184 mg des Lithium-ethyl-*N*-Fmoc-4-Aminomethylbenzoylphosphonats **30-Li** (0.39 mmol) erhalten. Der Überstand und die Waschlösungen wurden vereinigt und mit 0.2 M Salzsäure gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 823 mg (1.8 mmol) eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 2.2 mmol, 85 % (Lithium-Salz und freie Säure)

C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub>P (465.43 g/mol) freie Säure

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.18 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>2/6,3/5</sub> = 7.6 Hz, *H*-2, *H*-6), 7.95-7.92 (m, 1H, *H*-8), 7.89 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>4'/5',3'/6'</sub> = 7.4 Hz, *H*-4', *H*-5'), 7.71-7.69 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>1'/8',2'/7'</sub> = 7.1 Hz, *H*-1', *H*-8'), 7.44-7.40 (m, 2H, *H*-3', *H*-6'), 7.38-7.34 (m, 2H, *H*-2', *H*-7'), 7.28 (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>3/5,2/6</sub> = 7.9 Hz, *H*-3, *H*-5), 4.37-4.34 (m, 2H, *H*-10'), 4.24-4.22 (m, 3H, *H*-7, *H*-9'), 3.84-3.74 (dq, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>CH<sub>2</sub>,P</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub> = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub> (Et)), 1.12 (t, 3H, <sup>3</sup>*J*<sub>CH<sub>3</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub> (Et))

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 156.4 (C-11'), 144.3 (C-4), 143.9 (C-8a', C-9a'), 140.8 (C-4a', C-4b'), 136.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>1,P</sub> = 51 Hz, C-1), 129.3 (C-2, C-6), 127.6 (C-3', C-6'), 127.0 (C-2', C-7'), 126.4 (C-3, C-5), 125.1 (C-1', C-8'), 120.1 (C-4', C-5'), 65.4 (C-10'), 60.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CH<sub>2</sub>,P</sub> = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub> (Et)), 46.8 (C-9'), 43.6 (C-7), 16.9 (d,

$${}^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 6.2 \text{ Hz, } \text{CH}_3 \text{ (Et)}$$

${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: -1.15 (s)

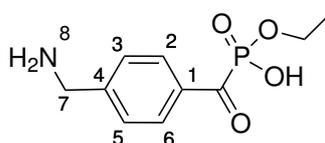
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 2.36$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 466.1414  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 466.1422  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\Delta = 1.81$  ppm

### Synthese von Ethyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat 28



Zu einer Lösung aus 90 mg Lithium Ethyl-*N*-Fmoc-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **27-Li** (191  $\mu\text{mol}$ ) in 1.6 mL DMF wurden 400  $\mu\text{L}$  Piperidin (20% *v/v*) hinzugegeben. Nach einer Stunde wurde das DMF im Hochvakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als weißer Feststoff isoliert.

HPLC-Methode: 5% isokratisch MeCN in 40 Min., 25 mL/Min.

Ausbeute: 40 mg (164  $\mu\text{mol}$ ), 86%

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{P}$  (243.20 g/mol)

${}^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.26 (d, 2H,  ${}^3J_{2/6,3/5} = 8.1$  Hz, *H*-2, *H*-6), 7.65 (d, 2H,  ${}^3J_{3/5,2/6} = 8.0$  Hz, *H*-3, *H*-5), 4.32 (s, 2H, *H*-7), 4.06 (qd, 2H,  ${}^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 8.2$  Hz,  ${}^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.0$  Hz, *CH*<sub>2</sub> (Et)), 1.31 (td, 3H,  ${}^3J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.0$  Hz,  ${}^4J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 0.9$  Hz, *CH*<sub>3</sub> (Et))

Die Signale der Amino- und Phosphonsäuregruppe sind aufgrund des H/D-Austauschs im Spektrum nicht sichtbar.

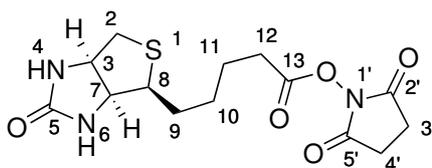
${}^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 207.88 (d,  ${}^1J_{\text{CO},\text{P}} = 169.9$  Hz, *CO*(P)), 138.65 (C-4), 136.14 (d,  ${}^2J_{1,\text{P}} = 53$  Hz, C-1), 129.77 (d,  ${}^3J_{2/6,\text{P}} = 1.0$  Hz, C-2, C-6), 128.90 (C-3, C-5), 62.73 (d,  ${}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.3$  Hz, *CH*<sub>2</sub> (Et)), 42.52 (C-7), 15.75 (d,  ${}^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 5.7$  Hz, *CH*<sub>3</sub> (Et))

${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 0.37 (s)

LC/HRMS (ESI):

 $t_r = 0.61$  Min. (Gradient I, Säule I)Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 244.0733  $[M+H]^+$ Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 244.0736;  $\Delta = 0.99$  ppm**Synthese von Biotin-*N*-hydroxysuccinimidylester 29**

998 mg D-Biotin **15** (4.1 mmol) wurden in 30 mL trockenem DMF bei 80 °C gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 1.1 g *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (5.4 mmol, 1.3 Äq.) und 472 mg *N*-Hydroxysuccinimid (4.1 mmol, 1 Äq.) versetzt. Nach 21 Stunden wurde der ausgefallene Harnstoff abfiltriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit ca. 60 mL Diethylether versetzt, eine Stunde gerührt und der Feststoff abfiltriert. Anschließend wurde mit heißem *iso*-Propanol gewaschen und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.2 g (3.5 mmol), 85 %

 $C_{14}H_{19}N_3O_5S$  (341.38 g/mol) $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 6.38 (d, 2H,  $^3J_{4/6,3/7} = 17.1$  Hz, *H*-4, *H*-6), 4.33-4.30 (m, 1H, *H*-3), 4.17-4.13 (m, 1H, *H*-7), 3.10 (dt,  $^3J = 8.5$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz, *H*-8), 2.86-2.81 (m, 1H, *H*-2a), 2.81 (s, 4H, *H*-3', *H*-4'), 2.67 (t, 2H,  $^3J_{12,11} = 7.3$  Hz, *H*-12), 2.58 (d, 1H,  $^3J_{2b,3} = 12$  Hz, *H*-2b), 1.70-1.39 (m, 6H, *H*-9, *H*-10, *H*-11)

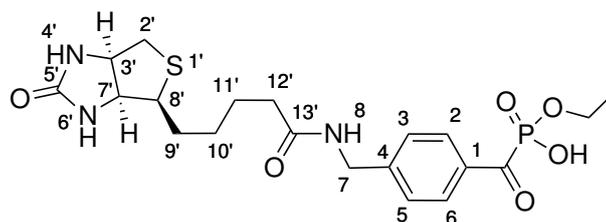
 $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 170.3 (C-2', C-5'), 169.0 (C-13), 162.7 (C-5), 61.0 (C-7), 59.2 (C-3), 55.3 (C-8), 39.9 (C-2), 30.0 (C-12), 27.9 (C-9 oder C-10), 27.6 (C-9 oder C-10), 25.5 (C-3', C-4'), 24.3 (C-11)

LC/HRMS (ESI):

 $t_r = 1.78$  Min. (Gradient I, Säule I)Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 342.1118  $[M+H]^+$ Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 342.1123;  $\Delta = 1.55$  ppm

### Synthese von Ethyl-*N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **30**



Zu 67 mg Biotinsuccinimidylester **29** (197  $\mu\text{mol}$ ) wurde eine Suspension aus 24 mg Ethyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **28** (99  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äq.) in 2.4 mL trockenem DMF gegeben. Anschließend wurden 34  $\mu\text{L}$  Triethylamin (245  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq.) hinzugegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Triethylamin und DMF wurden im Hochvakuum über eine Kühlfalle entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 13 mg (28  $\mu\text{mol}$ ), 28 %

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6\text{PS}$  (469.49 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.41 (t, 1H,  $^3J_{8,7} = 5.9$  Hz, *H*-8), 8.14 (d, 2H,  $^3J_{2/6,3/5} = 8.3$  Hz, *H*-2, *H*-6), 7.43 (d, 2H,  $^3J_{3/5,2/6} = 8.0$  Hz, *H*-3, *H*-5), 6.42 (s, br, 2H, *H*-4', *H*-6'), 4.34 (d, 2H,  $^3J_{7,8} = 6.0$  Hz, *H*-7), 4.31-4.29 (m, 1H, *H*-3'), 4.13 (dd, 1H,  $^3J = 7.7$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz, *H*-7'), 4.08-3.99 (qd, 2H,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.4$  Hz, *CH*<sub>2</sub> (Et)), 3.13-3.07 (m, 1H, *H*-8'), 2.83 (dd, 1H,  $^3J_{2a',2b'} = 13$  Hz,  $^3J_{2a',3'} = 5.1$  Hz, *H*-2a'), 2.58 (d, 1H,  $^3J_{2b',2a'} = 12$  Hz, *H*-2b'), 2.17 (t, 2H,  $^3J_{12',11'} = 7.4$  Hz, *H*-12'), 1.67-1.40 (m, 4H, *H*-9', *H*-11'), 1.39-1.27 (m, 2H, *H*-10'), 1.23 (t, 3H,  $^3J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.0$  Hz, *CH*<sub>3</sub> (Et))

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 172.3 (C-13'), 162.7 (C-5'), 146.9 (C-4), 134.3 (d,  $^2J_{1,\text{P}} = 59.4$  Hz, C-1), 129.4 (C-2, C-6), 127.4 (C-3, C-5), 62.4 (d,  $^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.6$  Hz, *CH*<sub>2</sub> (Et)), 61.1 (C-7'), 59.2 (C-3'), 55.4 (C-8'), 41.9 (C-7), 39.8 (C-2'), 35.1 (C-12'), 28.3 (C-9' oder C-10'), 28.0 (C-10' oder C-9'), 25.3 (C-11'), 16.4 (d,  $^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 5.7$  Hz, *CH*<sub>3</sub> (Et))

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: -1.38 (s)

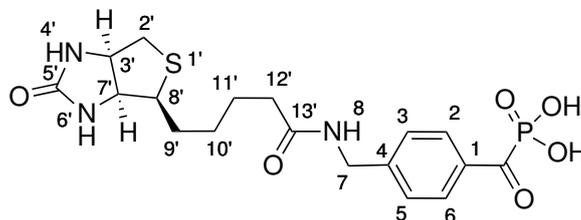
LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.60$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 470.1507 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 470.1509;  $\Delta = 0.40$  ppm

### Synthese von *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonsäure **13**



Zu einer Suspension aus 63 mg Ethyl-*N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonat **30** (134  $\mu$ mol) in trockenem Acetonitril wurden 44  $\mu$ L Trimethylsilylbromid (335  $\mu$ mol, 2.5  $\ddot{\text{A}}$ q.) gegeben. Nach dreistündigem Rühren bei 60 °C in der Mikrowelle wurde die Reaktionslösung mit 25 mL MeOH/Wasser (95:5 *v/v*) versetzt und das Methanol im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wurde mit etwas Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC-Methode: 5-40 % MeCN in 30 Min., 25 mL/Min.

Ausbeute: 30 mg (68  $\mu$ mol), 51 %

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{PS}$  (441.44 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOH-}d_4$ , 300 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 8.22 (d, 2H,  $^3J_{2/6,3/5} = 8.2$  Hz, *H*-2, *H*-6), 7.50 (d, 2H,  $^3J_{3/5,2/6} = 8.0$  Hz, *H*-3, *H*-5), 4.62-4.58 (m, 1H, *H*-3'), 4.49 (s, 2H, *H*-7), 4.37-4.33 (m, 1H, *H*-7'), 3.30-3.24 (m, 1H, *H*-8'), 3.00 (dd, 1H,  $^3J_{2a',2b'} = 13$  Hz,  $^3J_{2a',3'} = 5.0$  Hz, *H*-2a'), 2.79 (d, 1H,  $^3J_{2b',2a'} = 13$  Hz, *H*-2b'), 2.36 (t, 2H,  $^3J_{12',11'} = 7.0$  Hz, *H*-12'), 1.76-1.56 (m, 4H, *H*-11', *H*-9'), 1.46-1.38 (m, 2H, *H*-10')

Die Signale der Amid- und Phosphonsäuregruppen sind aufgrund des H/D-Austauschs im Spektrum nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOH-}d_4$ , 75 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: 209.1 (d,  $^1J_{\text{CO,P}} = 170$  Hz, *CO*(P)), 177.6 (C-13'), 166.2 (C-5'), 145.9 (C-4), 135.9 (d,  $^2J_{1,\text{P}} = 53$  Hz, C-1), 130.8 (C-2, C-6), 128.5 (C-3, C-5), 63.0 (C-7'), 61.2 (C-3'), 56.4 (C-8'), 43.7 (C-7), 40.7 (C-2'), 36.4 (C-12'), 28.9 (C-10'), 28.7 (C-9'), 26.2 (C-11')

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOH-}d_4$ , 121.5 MHz, 300 K)

$\delta$  [ppm]: -0.91 (s)

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.49$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 442.1196 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 442.1176 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 4.53$  ppm

## 10.5.3 Peptide

### 10.5.3.1 Protokoll zur manuellen Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie

Zur Synthese von Peptiden nach Fmoc-Strategie wurde Rink-Amid-Harz (100-200 mesh) mit einer Beladung von 0.74 mmol/g verwendet. Zum Quellen wurde es kurz mit Dichlormethan versetzt.

**Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe** Das Harz wurde zweimal zehn Minuten mit 3 mL 20 % Piperidin/DMF-Lösung geschüttelt. Zwischendurch und im Anschluss wurde je fünf- bis achtmal mit DMF, THF und DCM gewaschen.

**Kupplung von Fmoc-Aminosäuren** Zu einer 0.35 M Lösung einer Fmoc-Aminosäure (= 5 Äquivalente) in DMF wurden 5.1 Äquivalente HOBt und 5 Äquivalente DIC gegeben und bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung zum Harz gegeben und zwei Stunden geschüttelt. Danach wurde je fünf- bis achtmal mit DMF, THF und DCM gewaschen. Um auf Vollständigkeit der Kupplung zu prüfen wurde ein Kaisertest durchgeführt, der primäre Amine durch Blaufärbung detektiert.

**Kaisertest** Es wurden wenige Harzkrümel in einem Eppendorfgefäß mit 0.1 mL Ninhydrinlösung (500 mg Ninhydrin in 10 mL Ethanol) und 0.1 mL Kaliumcyanidlösung (2 mL 10 mM KCN<sub>(aq)</sub> und 98 mL Pyridin) versetzt und für fünf Minuten in ca. 110 °C heißen Sand gestellt. Die Blaufärbung der Harzkügelchen und der umgebenden Lösung zeigt freie, primäre Aminogruppen an.

### **Abspaltung aller permanenten Schutzgruppen und Freisetzung vom Träger**

Enthielt das Peptid schwefelhaltige Aminosäuren, so wurde das Harz drei Stunden in einer Mischung aus 94 % TFA, 2.5 % TIS, 2.5 % EDT und 1 % Wasser geschüttelt. Anschließend wurde die Abspalllösung aufgefangen und mit einem ca. fünffachen Überschuss kaltem Diethylether versetzt, wobei die Peptide ausfielen. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und fünfmal mit Diethylether gewaschen. Der Diethylether wurde

abdekantiert, das Peptid in Wasser gelöst, mittels LC/MS analysiert und lyophilisiert. Aufgrund der hohen Reinheit mussten die Peptide nicht aufgereinigt werden.

Bei Peptiden ohne schwefelhaltige Aminosäuren wurde das Harz drei Stunden mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % Wasser und 2.5 % TIS geschüttelt, anschließend mit Diethylether gefällt und fünfmal gewaschen. Die weitere Behandlung entspricht der der schwefelhaltigen Peptide.

### 10.5.3.2 Synthetisierte Sequenzen

#### H-FKLAG-NH<sub>2</sub> 36-L

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.44$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 534.3398 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 534.3421 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 4.20$  ppm

#### H-FKIAG-NH<sub>2</sub> 36-I

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.43$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 534.3398 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 534.3376 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 4.20$  ppm

#### H-FKCAG-NH<sub>2</sub> 36-C

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.56$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 524.2650 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 524.2652 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 0.45$  ppm

#### H-FKVAG-NH<sub>2</sub> 36-V

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.34$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 520.3242 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 520.3235 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 1.27$  ppm

### **H-FKWAG-NH<sub>2</sub> 36-W**

LC/HRMS (ESI):

$t_r = 1.50$  Min. (Gradient I, Säule I)

Berechnet  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 607.3351 [M+H]<sup>+</sup>

Gefunden  $\left[\frac{m}{z}\right]$ : 607.3369 [M+H]<sup>+</sup>;  $\Delta = 3.00$  ppm



# Literaturverzeichnis

- [1] P. Cohen, *Nat. Cell. Biol.* **2002**, *4*, E127–30.
- [2] C. MacKintosh, K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, G. A. Codd, *FEBS Lett.* **1990**, *264*, 187–192.
- [3] T. Matozaki, Y. Murata, Y. Saito, H. Okazawa, H. Ohnishi, *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1786–1793.
- [4] A. González-Rodríguez, J. A. Mas Gutierrez, S. Sanz-González, M. Ros, D. J. Burks, A. M. Valverde, *Diabetes* **2010**, *59*, 588–599.
- [5] WHO, *the top ten causes of death*, WHO Fact Sheet No 310, **2008**.
- [6] W. Eckhart, M. A. Hutchinson, T. Hunter, *Cell* **1979**, *18*, 925–933.
- [7] J. V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann, *Cell* **2006**, *127*, 635–648.
- [8] S. Nakielny, D. G. Campbell, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 713–722.
- [9] T. R. Burke, Z. J. Yao, D. G. Liu, J. Voigt, Y. Gao, *Biopolymers* **2001**, *60*, 32–44.
- [10] Z.-Y. Zhang, Y. Wang, L. Wu, E. B. Fauman, J. A. Stuckey, H. L. Schubert, M. A. Saper, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15266–15270.
- [11] T. R. Burke, Z. Y. Zhang, *Biopolymers* **1998**, *47*, 225–241.
- [12] Z. Y. Zhang, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9340–9345.
- [13] J. M. Denu, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5910–5914.
- [14] B. Evans, P. A. Tishmack, C. Pokalsky, M. Zhang, R. L. Van Etten, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13609–13617.
- [15] D. L. Lohse, J. M. Denu, N. Santoro, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4568–4575.
- [16] G. H. Peters, T. M. Frimurer, O. H. Olsen, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5383–5393.
- [17] K. L. Guan, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17026–17030.
- [18] J. J. Tanner, Z. D. Parsons, A. H. Cummings, H. Zhou, K. S. Gates, *Antioxid. Redox Sign.* **2011**, *15*, 1–21.
- [19] C. Madhurantakam, V. R. M. Chavali, A. K. Das, *Proteins* **2008**, *71*, 706–714.

- [20] World Health Organization, *Global Tuberculosis Control*, **2010**.
- [21] A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh, A. Ullrich, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5425–5432.
- [22] C. Madhurantakam, E. Rajakumara, P. A. Mazumdar, B. Saha, D. Mitra, H. G. Wiker, R. Sankaranarayanan, A. K. Das, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2175–2181.
- [23] A. Caselli, R. Marzocchini, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini, G. Ramponi, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32554–32560.
- [24] C. Grundner, J. S. Cox, T. Alber, *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *287*, 181–184.
- [25] H. Bach, K. G. Papavinasasundaram, D. Wong, Z. Hmama, Y. Av-Gay, *Cell Host Microbe* **2008**, *3*, 316–322.
- [26] S. C. Cowley, R. Babakaiff, Y. Av-Gay, *Res. Microbiol.* **2002**, *153*, 233–241.
- [27] R. Teitelbaum, M. Cammer, M. Maitland, N. Freitag, J. Condeelis, B. Bloom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 15190.
- [28] D. F. Seals, G. Eitzen, N. Margolis, W. T. Wickner, A. Price, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9402–9407.
- [29] B. Yang, M. Steegmaier, L. C. Gonzalez, R. H. Scheller, *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 247–252.
- [30] J. Chao, D. Wong, X. Zheng, V. Poirier, H. Bach, Z. Hmama, Y. Av-Gay, *BBA - Proteins Proteom.* **2010**, *1804*, 620–627.
- [31] K. L. Milarski, G. Zhu, C. G. Pearl, D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, D. MacLean, A. Thieme-Seffler, Z.-Y. Zhang, T. Sawyer, S. J. Decker, J. E. Dixon, A. R. Saltiel, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23634–23639.
- [32] H. Sun, C. H. Charles, L. F. Lau, N. K. Tonks, *Cell* **1993**, *75*, 487–493.
- [33] A. J. Flint, T. Tiganis, D. Barford, N. K. Tonks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1680–1685.
- [34] F. Liang, S. Kumar, Z.-Y. Zhang, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 308.
- [35] B. G. Neel, H. Gu, L. Pao, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 284–293.
- [36] T. Pawson, *Oncogene* **1988**, *3*, 491–495.
- [37] J. S. Rawlings, *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1281–1283.
- [38] B. J. Mayer, D. Baltimore, *Trends Cell Biol.* **1993**, *3*, 8–13.
- [39] G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, J. Kuriyan, *Cell* **1993**, *72*, 779–790.
- [40] G. Waksman, D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge,

- D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, *Nature* **1992**, *358*, 646–653.
- [41] T. K. Sawyer, *Biopolymers* **1998**, *47*, 243–261.
- [42] P. M. Grimley, F. Dong, H. Rui, *Cytokine Growth F. R.* **1999**, *10*, 131–157.
- [43] M. L. Vignais, H. B. Sadowski, D. Watling, N. C. Rogers, M. Gilman, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1759–1769.
- [44] D. W. Leaman, S. Pisharody, T. W. Flickinger, M. A. Commane, J. Schlessinger, I. M. Kerr, D. E. Levy, G. R. Stark, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 369–375.
- [45] M. A. Olayioye, I. Beuvink, K. Horsch, J. M. Daly, N. E. Hynes, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17209–17218.
- [46] D. S. Aaronson, C. M. Horvath, *Science* **2002**, *296*, 1653–1655.
- [47] D. E. Levy, J. E. Darnell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 651–662.
- [48] C. Schindler, K. Shuai, V. R. Prezioso, J. E. Darnell, *Science* **1992**, *257*, 809–813.
- [49] D. L. Krebs, D. J. Hilton, *Stem Cells* **2001**, *19*, 378–387.
- [50] K. Shuai, *Oncogene* **2000**, *19*, 2638–2644.
- [51] U. Klingmüller, U. Lorenz, L. C. Cantley, B. G. Neel, H. F. Lodish, *Cell* **1995**, *80*, 729–738.
- [52] M. David, H. E. Chen, S. Goelz, A. C. Larner, B. G. Neel, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 7050–7058.
- [53] M. P. Myers, J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, N. K. Tonks, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47771–47774.
- [54] M. You, D. H. Yu, G. S. Feng, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 2416–2424.
- [55] T. R. Wu, K. Y. Hong, X.-D. Wang, M. Y. Ling, A. M. Dragoi, A. S. Chung, A. G. Campbell, Z.-Y. Han, G.-S. Feng, Y. E. Chin, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47572–47580.
- [56] J. ten Hoeve, M. de Jesus Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, K. Shuai, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5662–5668.
- [57] K. M. McBride, C. McDonald, N. C. Reich, *EMBO J.* **2000**, *19*, 6196–6206.
- [58] X. Liu, G. W. Robinson, F. Gouilleux, B. Groner, L. Hennighausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8831–8835.
- [59] A. L. Mui, H. Wakao, A. M. O’Farrell, N. Harada, A. Miyajima, *EMBO J.* **1995**, *14*, 1166–1175.

- [60] H. Yamashita, J. Xu, R. Erwin, W. Farrar, R. A. Kirken, H. Rui, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30218–30224.
- [61] K. Ramsauer, M. Farlik, G. Zupkovitz, C. Seiser, A. Kröger, H. Hauser, T. Decker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2849–2854.
- [62] X. Chen, U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, *Cell* **1998**, *93*, 827–839.
- [63] S. Becker, B. Groner, C. W. Müller, *Nature* **1998**, *394*, 145–151.
- [64] F. Gouilleux, H. Wakao, M. Mundt, B. Groner, *EMBO J.* **1994**, *13*, 4361–4369.
- [65] M. Azam, H. Erdjument-Bromage, B. L. Kreider, M. Xia, F. Quelle, R. Basu, C. Saris, P. Tempst, J. N. Ihle, C. Schindler, *EMBO J.* **1995**, *14*, 1402–1411.
- [66] D. Neculai, A. M. Neculai, S. Verrier, K. Straub, K. Klumpp, E. Pfitzner, S. Becker, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40782–40787.
- [67] X. Zhang, M. H. Wrzeszczynska, C. M. Horvath, J. E. Darnell, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 7138–7146.
- [68] T. L. Murphy, E. D. Geissal, J. D. Farrar, K. M. Murphy, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 7121–7131.
- [69] I. Strehlow, C. Schindler, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28049–28056.
- [70] K. Shuai, J. Liao, M. M. Song, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4932–4941.
- [71] S. John, U. Vinkemeier, E. Soldaini, J. E. J. Darnell, W. J. Leonard, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1910.
- [72] K. Miyoshi, J. M. Shillingford, G. H. Smith, S. L. Grimm, K. U. Wagner, T. Oka, J. M. Rosen, G. W. Robinson, L. Hennighausen, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 531–542.
- [73] J. M. Shillingford, K. Miyoshi, G. W. Robinson, S. L. Grimm, J. M. Rosen, H. Neubauer, K. Pfeffer, L. Hennighausen, *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 563–570.
- [74] K.-U. Wagner, A. Krempler, A. A. Triplett, Y. Qi, N. M. George, J. Zhu, H. Rui, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5510–5520.
- [75] L. Hennighausen, G. W. Robinson, *Gene Dev.* **2008**, *22*, 711–721.
- [76] J. Woelfle, J. Billiard, P. Rotwein, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22696–22702.
- [77] R. G. Rosenfeld, A. Belgorosky, C. Camacho-Hubner, M. O. Savage, J. M. Wit, V. Hwa, *Trends Endocrinol. Metab.* **2007**, *18*, 134–141.
- [78] C. J. Greenhalgh, E. Rico-Bautista, M. Lorentzon, A. L. Thaus, P. O. Morgan, T. A. Willson, P. Zervoudakis, D. Metcalf, I. Street, N. A. Nicola, A. D. Nash, L. J. Fabri, G. Norstedt, C. Ohlsson, A. Flores-Morales, W. S. Alexander, D. J. Hilton, *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 397–406.

- [79] E. M. Kofoed, V. Hwa, B. Little, K. A. Woods, C. K. Buckway, J. Tsubaki, K. L. Pratt, L. Bezrodnik, H. Jasper, A. Tepper, J. J. Heinrich, R. G. Rosenfeld, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1139–1147.
- [80] A. Hoelbl, B. Kovacic, M. A. Kerenyi, O. Simma, W. Warsch, Y. Cui, H. Beug, L. Hennighausen, R. Moriggl, V. Sexl, *Blood* **2006**, *107*, 4898–4906.
- [81] Z. Yao, Y. Cui, W. T. Watford, J. H. Bream, K. Yamaoka, B. D. Hissong, D. Li, S. K. Durum, Q. Jiang, A. Bhandoola, L. Hennighausen, J. J. O’Shea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1000–1005.
- [82] R. A. Van Etten, *Oncogene* **2007**, *26*, 6738–6749.
- [83] R. A. Van Etten, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31704–31710.
- [84] P. M. Chan, *Protein Cell* **2011**, *2*, 108–115.
- [85] D. L. Stirewalt, J. P. Radich, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 650–665.
- [86] C. Choudhary, C. Brandts, J. Schwable, L. Tickenbrock, B. Sargin, A. Ueker, F. D. Bohmer, W. E. Berdel, C. Muller-Tidow, H. Serve, *Blood* **2007**, *110*, 370–374.
- [87] R. A. Grucza, J. M. Bradshaw, K. Fütterer, G. Waksman, *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 273–293.
- [88] I. Marseigne, B. P. Roques, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3621–3624.
- [89] S. E. Shoelson, S. Chatterjee, M. Chaudhuri, T. R. Burke, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6061–6064.
- [90] S. M. Domchek, K. R. Auger, S. Chatterjee, T. R. Burke, S. E. Shoelson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9865–9870.
- [91] T. R. Burke, M. S. Smyth, A. Otaka, M. Nomizu, P. P. Roller, G. Wolf, R. Case, S. E. Shoelson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6490–6494.
- [92] J.-P. Sun, A. A. Federov, S.-Y. Lee, X.-L. Guo, K. Shen, D. S. Lawrence, S. C. Almo, Z.-Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12406–12414.
- [93] Z. J. Yao, C. R. King, T. Cao, J. Kelley, G. W. Milne, J. H. Voigt, T. R. Burke, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 25–35.
- [94] T. R. Burke, H. K. Kole, P. P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1994**, *204*, 129–134.
- [95] B. Ye, M. Akamatsu, S. E. Shoelson, G. Wolf, S. Giorgetti-Peraldi, X. Yan, P. P. Roller, T. R. Burke, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4270–4275.
- [96] Y. Gao, J. Luo, Z. J. Yao, R. Guo, H. Zou, J. Kelley, J. H. Voigt, D. Yang, T. R. Burke, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 911–920.

- [97] H. K. Kole, M. Akamatsu, B. Ye, X. Yan, D. Barford, P. P. Roller, T. R. Burke, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1995**, *209*, 817–822.
- [98] T. R. Burke, B. Ye, M. Akamatsu, H. Ford, X. Yan, H. K. Kole, G. Wolf, S. E. Shoelson, P. P. Roller, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1021–1027.
- [99] L. Tong, T. C. Warren, S. Lukas, J. Schembri-King, R. Betageri, J. R. Proudfoot, S. Jakes, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20238–20242.
- [100] Z.-J. Yao, Y. Gao, J. H. Voigt, H. Ford, T. R. Burke, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2865–2874.
- [101] P. L. Beaulieu, D. R. Cameron, J.-M. Ferland, J. Gauthier, E. Ghio, J. Gillard, V. Gorys, M. Poirier, J. Rancourt, D. Wernic, M. Llinas-Brunet, R. Betageri, M. Cardozo, E. R. Hickey, R. Ingraham, S. Jakes, A. Kabcenell, T. Kirrane, S. Lukas, U. Patel, J. Proudfoot, R. Sharma, L. Tong, N. Moss, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1757–1766.
- [102] Y. Gao, L. Wu, J. H. Luo, R. Guo, D. Yang, Z. Y. Zhang, T. R. Burke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 923–927.
- [103] M. S. Malamas, J. Sredy, C. Moxham, A. Katz, W. Xu, R. McDevitt, F. O. Adebayo, D. R. Sawicki, L. Seestaller, D. Sullivan, J. R. Taylor, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1293–1310.
- [104] C. Dufresne, P. Roy, Z. Wang, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, C. Ramachandran, B. P. Kennedy, L. Xu, R. Gordon, C. C. Chan, Y. Leblanc, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1039–1042.
- [105] P. Huang, J. Ramphal, J. Wei, C. Liang, B. Jallal, G. McMahon, C. Tang, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1835–1849.
- [106] M. A. T. Blaskovich, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2095–2176.
- [107] P. K. Mandal, W. S.-L. Liao, J. S. McMurray, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3394–3397.
- [108] P. K. Mandal, F. Gao, Z. Lu, Z. Ren, R. Ramesh, J. S. Birtwistle, K. K. Kaluarachchi, X. Chen, R. Bast Jr, W. S. Liao, J. S. McMurray, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3549–3563.
- [109] Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271–288.
- [110] M. W. Geiger, M. M. Elliot, V. D. Karacostas, T. J. Moricone, J. B. Salmon, V. J. Sideli, M. A. S. Onge, *Photochem. Photobiol.* **1984**, *40*, 545–548.
- [111] J. R. Knowles, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 155–160.
- [112] Y. Z. Li, J. P. Kirby, M. W. George, M. Poliakoff, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8092–8098.

- [113] W. L. Karney, W. T. Borden, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3347–3350.
- [114] K. A. H. Chehade, H. P. Spielmann, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4949–4953.
- [115] Y. Tanaka, M. Bond, J. Kohler, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 473–480.
- [116] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313–3318.
- [117] M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 337–341.
- [118] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661–5673.
- [119] Y. Sadakane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 209–218.
- [120] J. C. Kauer, S. Erickson-Viitanen, H. R. Wolfe, W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10695–10700.
- [121] K. T. O’Neil, W. F. DeGrado, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 59–64.
- [122] K. Skorey, D. Waddleton, M. Thérien, T. LeRiche, *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 49–61.
- [123] J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11020–11024.
- [124] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026–9027.
- [125] E. M. Tippmann, W. Liu, D. Summerer, A. V. Mack, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2210–2214.
- [126] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 261–267.
- [127] N. Hino, Y. Okazaki, T. Kobayashi, A. Hayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 201–206.
- [128] J. W. Ryder, J. Yang, D. Galuska, J. Rincón, M. Björnholm, A. Krook, S. Lund, O. Pedersen, H. Wallberg-Henriksson, J. R. Zierath, G. D. Holman, *Diabetes* **2000**, *49*, 647–654.
- [129] H. K. R. Karlsson, A. V. Chibalin, H. A. Koistinen, J. Yang, F. Koumanov, H. Wallberg-Henriksson, J. R. Zierath, G. D. Holman, *Diabetes* **2009**, *58*, 847–854.
- [130] M. Sekine, M. Satoh, H. Yamagata, T. Hata, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4162–4167.
- [131] N. S. Chindarkar, A. H. Franz, *ARKIVOC* **2008**, *xv*, 21–33.
- [132] D. V. Griffiths, H. A. R. Jamali, J. C. Tebby, *Phosphorus Sulfur and Silicon* **1985**, *25*, 173–175.
- [133] D. Vourloumis, M. Takahashi, K. Simonsen, B. Ayida, S. Barluenga, G. Winters, T. Hermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2807–2811.

- [134] J. Wrobel, A. Dietrich, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3543–3546.
- [135] R. Karaman, A. Goldblum, E. Breuer, H. Leader, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, *1989*, 765–774.
- [136] K. Li, Y. Chen, S. Li, H. G. Nguyen, Z. Niu, S. You, C. M. Mello, X. Lu, Q. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1369–1377.
- [137] J. C. Dearden, W. F. Forbes, *Can. J. Chem.* **1958**, *36*, 1362–1370.
- [138] K. Terauchi, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 821–823.
- [139] S. Cohen, W. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1642–1647.
- [140] K. Terauchi, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 883–890.
- [141] T. Sumiyoshi, W. Schnabel, *J. Photochem.* **1985**, *30*, 63–80.
- [142] F. Patten, W. Gordy, *Radiat. Res.* **1961**, *14*, 573–589.
- [143] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [144] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **1926**, *67*, 390–401.
- [145] T. J. Burke, K. Loniello, J. Beebe, *Comb. Chem. High T. Scr.* **2003**, *6*, 183–194.
- [146] X. Huang, A. Aulabaugh, *Springer Protocols* **2009**, *565*, 127–143.
- [147] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. Roller, K. Krajewski, N. Saito, J. Stuckey, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- [148] R. Z. Cer, U. Mudunuri, R. Stephens, F. J. Lebeda, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W441–W445.
- [149] J. Dourlat, B. Valentin, W.-Q. Liu, C. Garbay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3943–3946.
- [150] S. Giorgetti-Peraldi, E. Ottinger, G. Wolf, B. Ye, T. R. Burke, S. E. Shoelson, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1180–1188.
- [151] A. Kawamura, S. Hindi, D. Mihai, L. James, O. Aminova, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8824–8829.
- [152] B. Liu, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16281–16287.
- [153] K. Piątek, A. Hartwig, W. Bal, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2009**, *389*, 265–268.
- [154] S. M. Lamos, C. J. Krusemark, C. J. McGee, M. Scalf, L. M. Smith, P. J. Belshaw, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4329–4333.
- [155] S. Yokoshima, Y. Abe, N. Watanabe, Y. Kita, T. Kan, T. Iwatsubo, T. Tomita, T. Fukuyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6869–6871.
- [156] N. B. Bongo, T. Tomohiro, Y. Hatanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1834–1836.

- [157] L. J. Thenard, *Ann. Chim. Phys.* **1818**, *2*, 830.
- [158] H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 1058–1071.
- [159] J. L. Farber, *Environ. Health Persp.* **1994**, *102*, 17.
- [160] K. Mahadev, H. Motoshima, X. Wu, J. M. Ruddy, R. S. Arnold, G. Cheng, J. D. Lambeth, B. J. Goldstein, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1844–1854.
- [161] K. Mahadev, A. Zilbering, L. Zhu, B. J. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21938–21942.
- [162] T.-C. Meng, D. A. Buckley, S. Galic, T. Tiganis, N. K. Tonks, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37716–37725.
- [163] B. J. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4283–4289.
- [164] J. M. Denu, K. G. Tanner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5633–5642.
- [165] J. Sohn, J. Rudolph, *Biochemistry* **2003**, *42*, 10060–10070.
- [166] C. A. S. Regino, D. E. Richardson, *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 3971–3977.
- [167] C. C. Winterbourn, D. Metodiewa, *Free Radical Bio. Med.* **1999**, *27*, 322–328.
- [168] R. L. M. van Montfort, M. Congreve, D. Tisi, R. Carr, H. Jhoti, *Nature* **2003**, *423*, 773–777.
- [169] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, T.-C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, D. Barford, *Nature* **2003**, *423*, 769–773.
- [170] C. Jacob, A. L. Holme, F. H. Fry, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1953–1956.
- [171] H. A. Woo, H. Z. Chae, S. C. Hwang, K.-S. Yang, S. W. Kang, K. Kim, S. G. Rhee, *Science* **2003**, *300*, 653–656.
- [172] B. J. Evans, J. T. Doi, W. K. Musker, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2337–2344.
- [173] K. Goto, M. Holler, R. Okazaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1460–1461.
- [174] L. Turell, H. Botti, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, J. M. Souza, R. Durán, B. A. Freeman, R. Radi, B. Alvarez, *Biochemistry* **2008**, *47*, 358–367.
- [175] C.-Y. Chen, D. Willard, J. Rudolph, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1399–1409.
- [176] M. Kanda, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28518–28528.
- [177] G. Buhrman, B. Parker, J. Sohn, J. Rudolph, C. Mattos, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5307–5316.
- [178] P. Nagy, K. Lemma, M. T. Ashby, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8838–8846.
- [179] S. Sivaramakrishnan, A. H. Cummings, K. S. Gates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 444–447.
- [180] N. Ohguro, M. Fukuda, T. Sasabe, Y. Tano, *Br. J. Ophthalmol.* **1999**, *83*, 1064–1068.

- [181] H. C. Pandya, V. A. Snetkov, C. H. C. Twort, J. P. T. Ward, S. J. Hirst, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2002**, *283*, L1220–L1230.
- [182] T. Djordjevic, A. Pogrebniak, R. S. BelAiba, S. Bonello, C. Wotzlaw, H. Acker, J. Hess, A. Görlach, *Free Radical Bio. Med.* **2005**, *38*, 616–630.
- [183] H. Lundqvist, P. Follin, L. Khalfan, C. Dahlgren, *J. Leukoc. Biol.* **1996**, *59*, 270–279.
- [184] B. M. Babior, *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, *16*, 42–47.
- [185] H. E. Latuasan, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *52*, 502–508.
- [186] T. Nagamatsu, H. Yamasaki, T. Hirota, M. Yamato, Y. Kido, M. Shibata, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 362–368.
- [187] G. Nübel, W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 1605–1614.
- [188] F. Yoneda, T. Nagamatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 2001–2009.
- [189] F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 830–835.
- [190] H. Goldner, G. Dietz, E. Carstens, *Liebigs Ann. Chem.* **1966**, *694*, 142–148.
- [191] F. Yoneda, T. Nagamatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 1885–1888.
- [192] S. Ghisla, U. Hartmann, P. Hemmerich, F. Müller, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, *1973*, 1388–1415.
- [193] J. Nagy, J. Nyitrai, I. Vágó, G. I. Csonka, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5824–5830.
- [194] R. G. Pearson, J. Songstad, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1827–1836.
- [195] N. Todorovic, A. Giacomelli, J. A. Hassell, C. S. Frampton, A. Capretta, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6037–6040.
- [196] R. Norrestam, P. Kierkegaard, B. Stensland, L. Torbjörnsson, *J. Chem. Soc. D* **1969**, 1250–1251.
- [197] C. J. Fritchie, B. L. Trus, *Chem. Commun.* **1968**, 1486.
- [198] R. Sariri, R. Sajedi, V. Jafarian, *J. Mol. Liq.* **2006**, *123*, 20–23.
- [199] A. Keston, R. Brandt, *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 1–5.
- [200] C. Rota, C. F. Chignell, R. P. Mason, *Free Radical Bio. Med.* **1999**, *27*, 873–881.
- [201] J. I. Takano, H. Koizumi, A. Ohkawara, N. Kamo, T. Ueda, *Arch. Dermatol. Res.* **1995**, *287*, 321–325.
- [202] J. Crow, *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **1997**, *1*, 145–157.
- [203] A. Díaz, F. Sanchez, J. García, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *327*, 161–165.
- [204] J. A. Royall, H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *302*, 348–355.
- [205] S. Walrand, S. Valeix, C. Rodriguez, P. Ligot, J. Chassagne, M. Vasson, *Clin. Chim. Acta* **2003**, *331*, 103–110.

- [206] S. Walrand, M.-C. Farges, O. Dehaese, N. Cardinault, R. Minet-Quinard, P. Grolier, C. Bouteloup-Demange, J. Ribalta, B. M. Winklhofer-Roob, E. Rock, M.-P. Vasson, *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 114–120.
- [207] O. Wolfbeis, A. Dürkop, M. Wu, Z. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4495–4498.
- [208] J. R. Stone, S. Yang, *Antioxid. Redox Sign.* **2006**, *8*, 243–270.
- [209] C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 47–62.
- [210] W. C. Barrett, J. P. DeGnore, S. König, H. M. Fales, Y. F. Keng, Z. Y. Zhang, M. B. Yim, P. B. Chock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6699–6705.
- [211] C. Kemal, T. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 995.
- [212] C. Kemal, T. Chan, T. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7272–7286.
- [213] G. Rothe, A. Oser, G. Valet, *Naturwissenschaften* **1988**, *75*, 354–355.
- [214] A. Emmendorffer, M. Hecht, M. L. Lohmann-Matthes, J. Roesler, *J. Immunol. Methods* **1990**, *131*, 269–275.
- [215] B. Kinsey, A. Kassis, F. Fayad, W. Layne, S. Adelstein, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1757–1761.
- [216] F. Antunes, E. Cadenas, *FEBS Lett.* **2000**, *475*, 121–126.
- [217] N. Makino, K. Sasaki, K. Hashida, Y. Sakakura, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 149–159.
- [218] S. G. Rhee, *Science* **2006**, *312*, 1882–1883.
- [219] S.-R. Lee, K.-S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20336–20342.
- [220] T.-C. Meng, T. Fukada, N. K. Tonks, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 387–399.
- [221] A. Dürkop, O. S. Wolfbeis, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 755–761.



# 11 Anhang

## 11.1 NMR-Spektren

### 11.1.1 Pyrimidotriazinderivate

#### 11.1.1.1 3-Styrylpyrimidotriazin 45

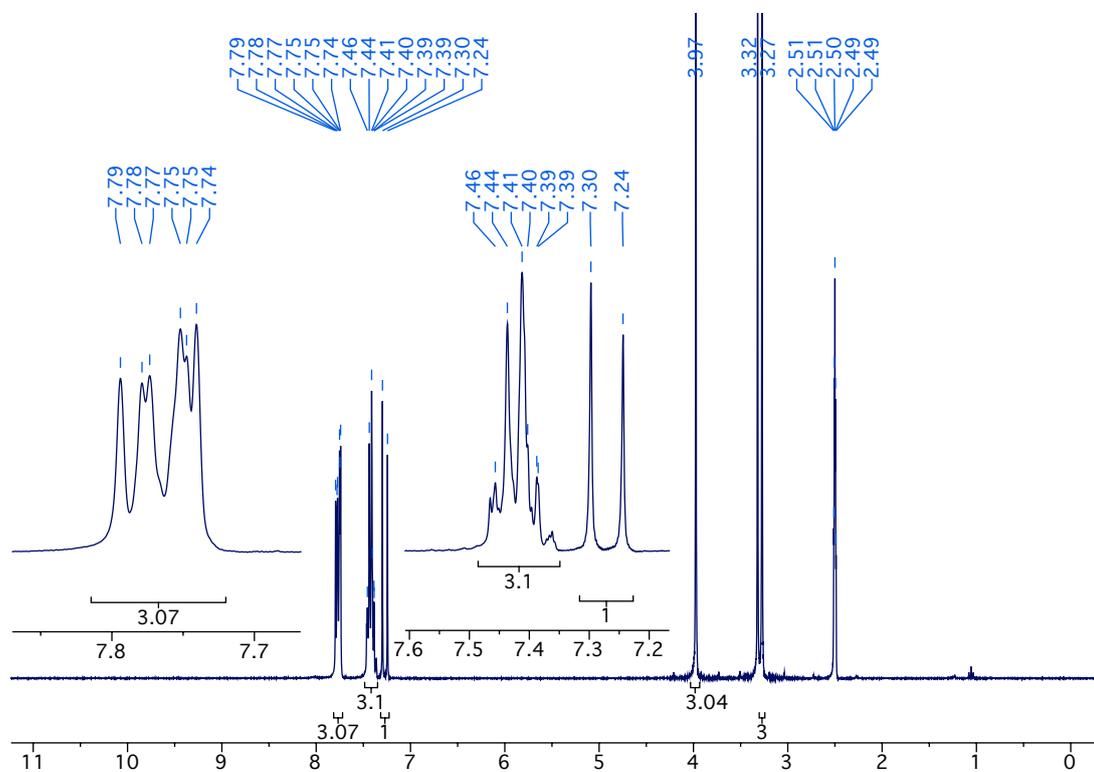


Abb. 11.1: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 3-Styrylpyrimidotriazin 45 in DMSO-*d*<sub>6</sub>

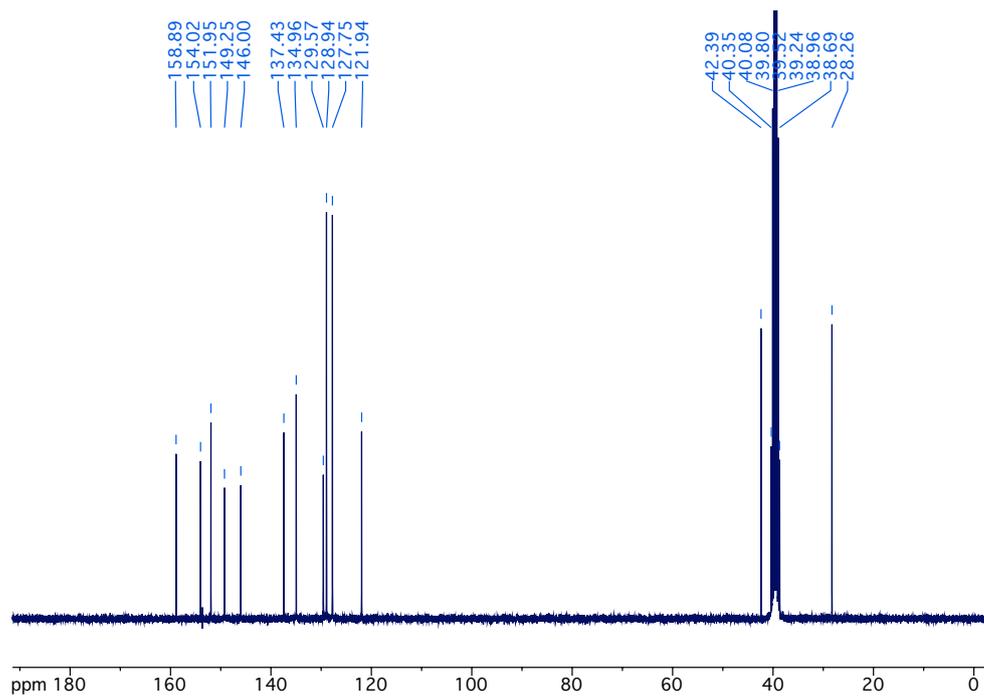


Abb. 11.2:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 3-Styrylpyrimidotriazin **45** in  $\text{DMSO-}d_6$

### 11.1.1.2 4,8-Dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **59**

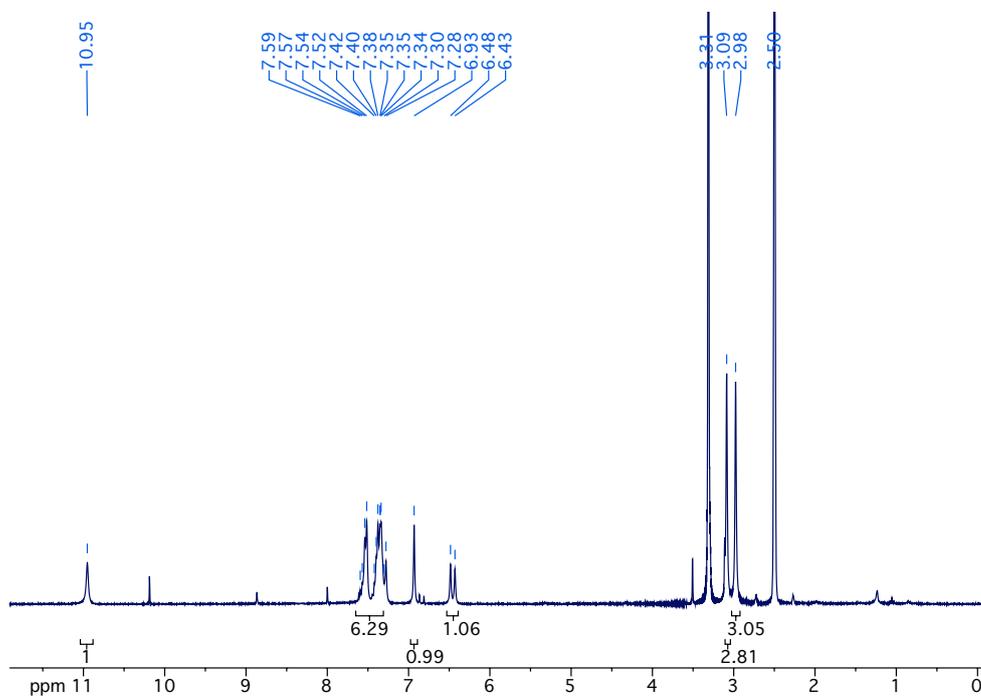


Abb. 11.3:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 4,8-Dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **59** in  $\text{DMSO-}d_6$

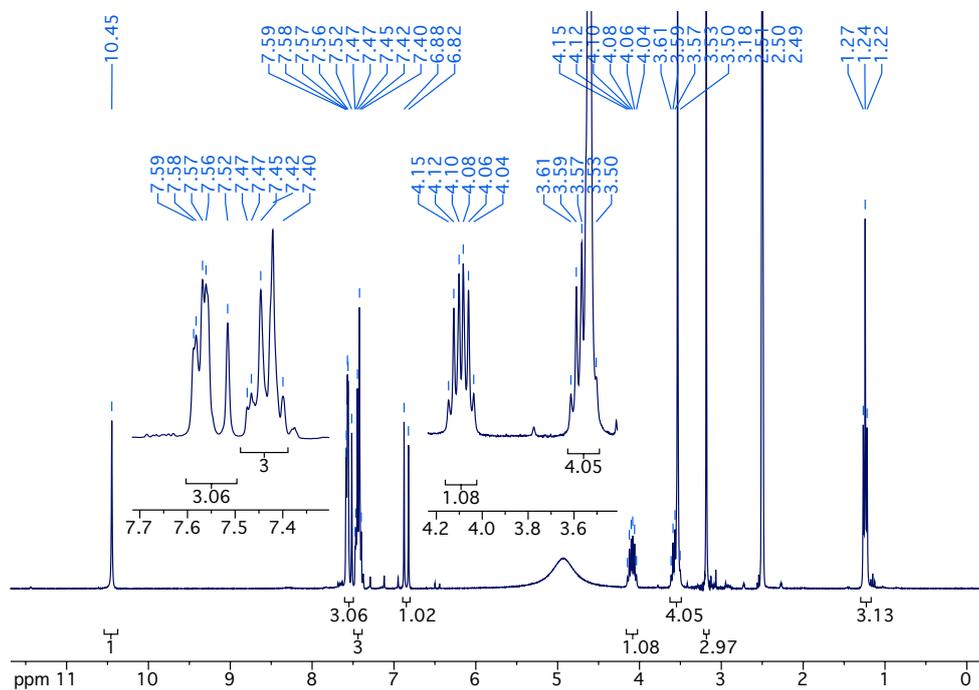
11.1.1.3  $N^4$ -Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 57

Abb. 11.4:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $N^4$ -Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 57 in  $\text{DMSO-}d_6$

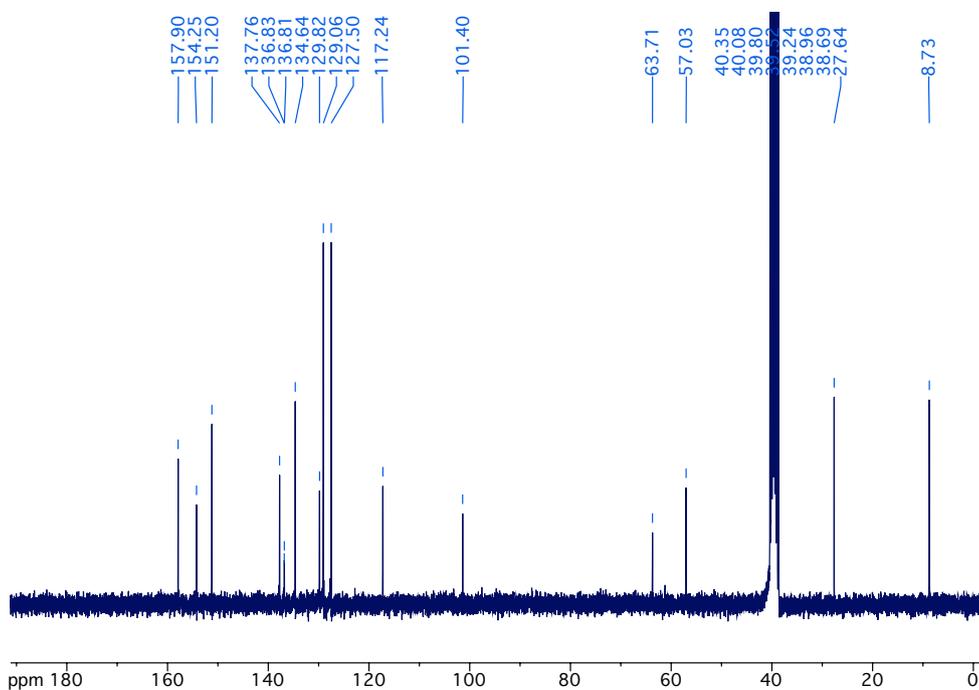


Abb. 11.5:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $N^4$ -Ethyl-4,8-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 57 in  $\text{DMSO-}d_6$

## 11.1.1.4 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin 58

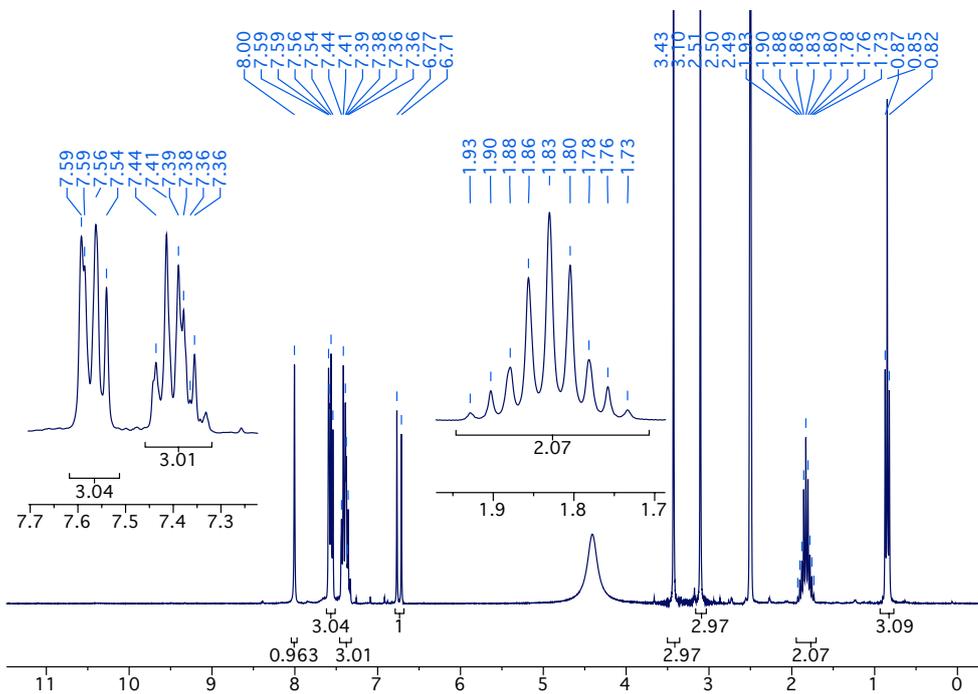


Abb. 11.6:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **58** in  $\text{DMSO-}d_6$

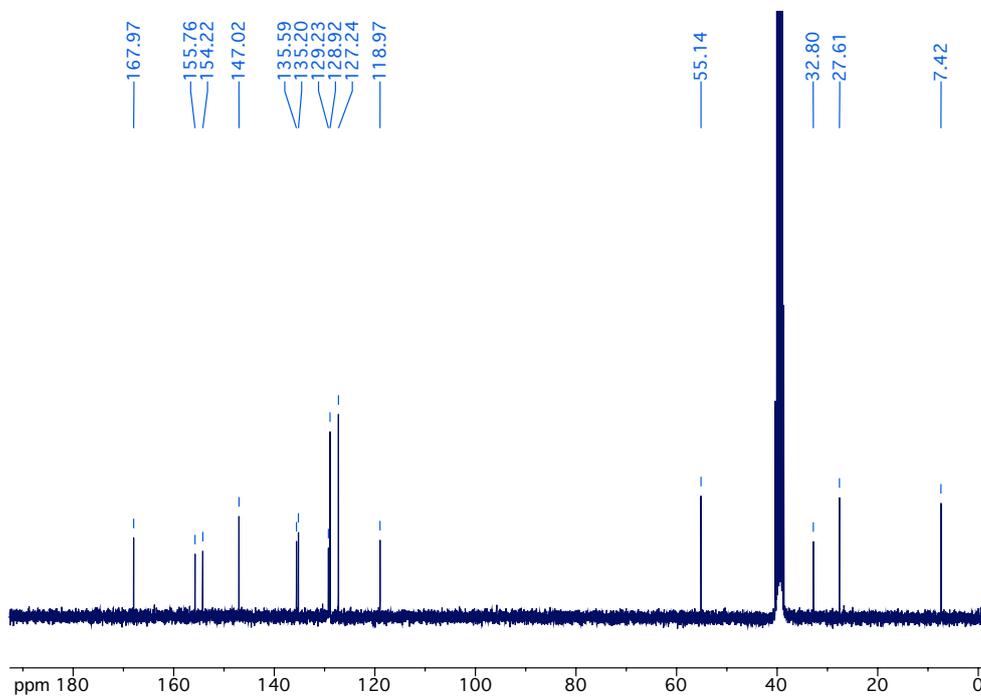


Abb. 11.7:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **58** in  $\text{DMSO-}d_6$

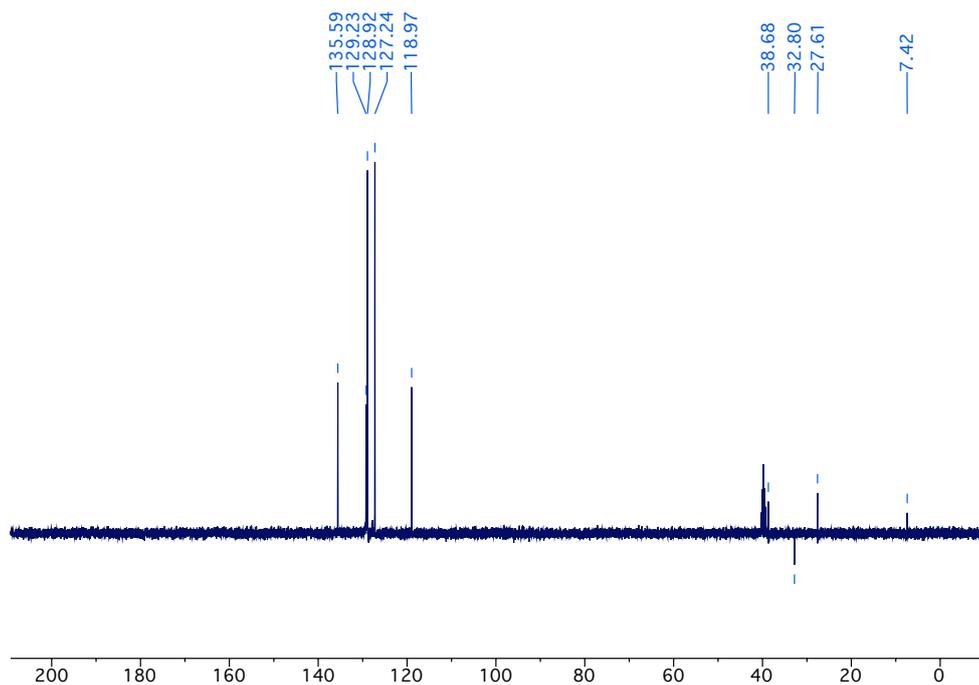


Abb. 11.8: DEPT-Experiment von 4a-Ethyl-4,4a-dihydro-3-styrylpyrimidotriazin **58** in DMSO- $d_6$

## 11.1.2 Benzoylphosphonatderivate

### 11.1.2.1 Natriumbenzoylphosphonat 11-Na

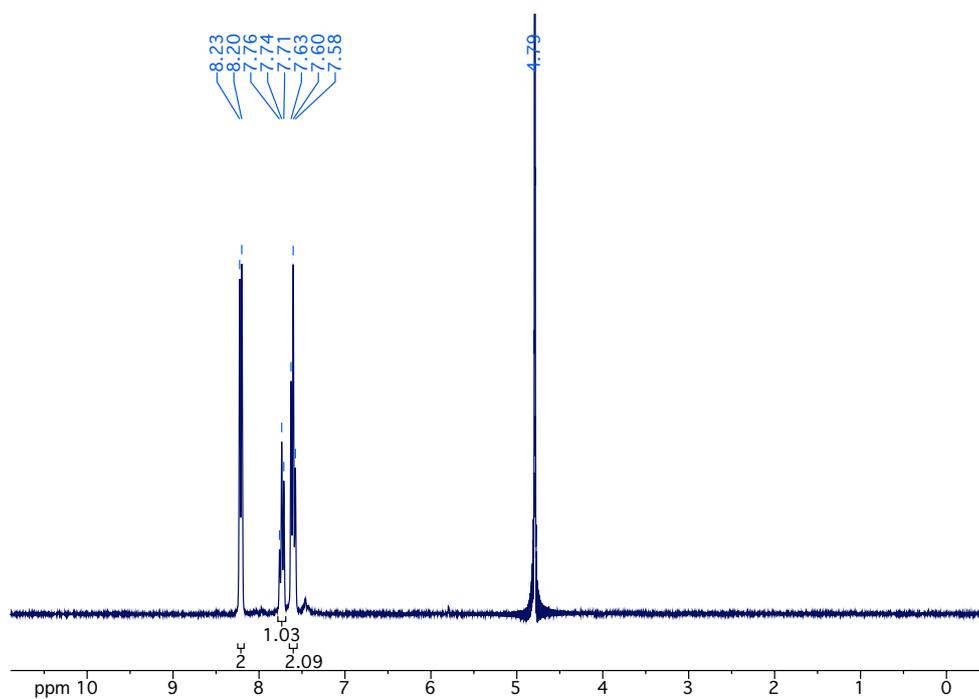


Abb. 11.9:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Natriumbenzoylphosphonat **11-Na** in  $\text{D}_2\text{O}$

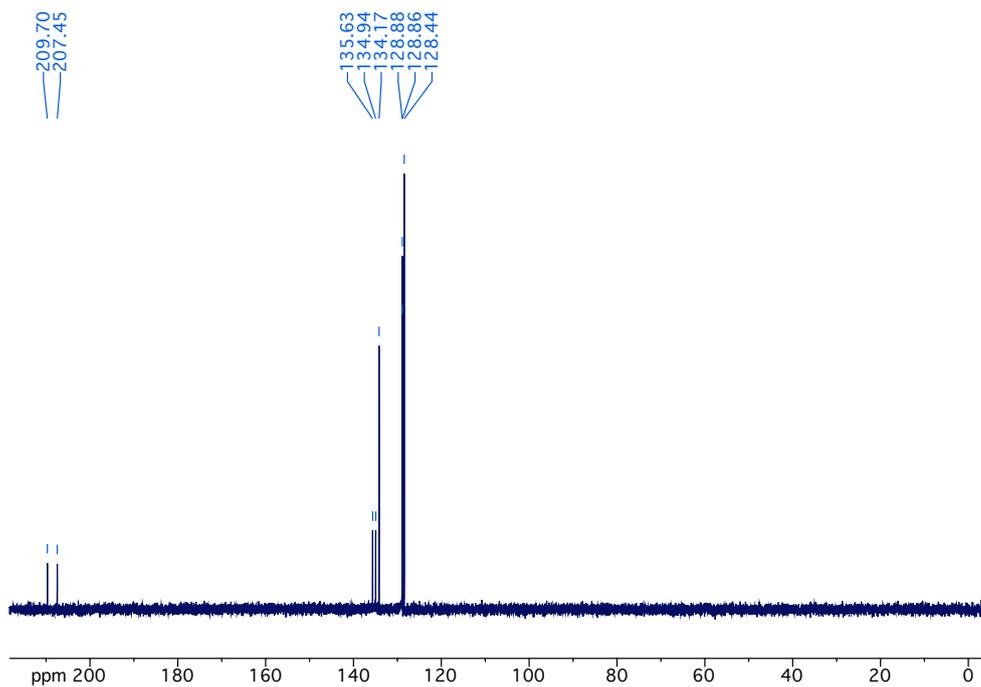


Abb. 11.10:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Natriumbenzoylphosphonat **11-Na** in  $\text{D}_2\text{O}$

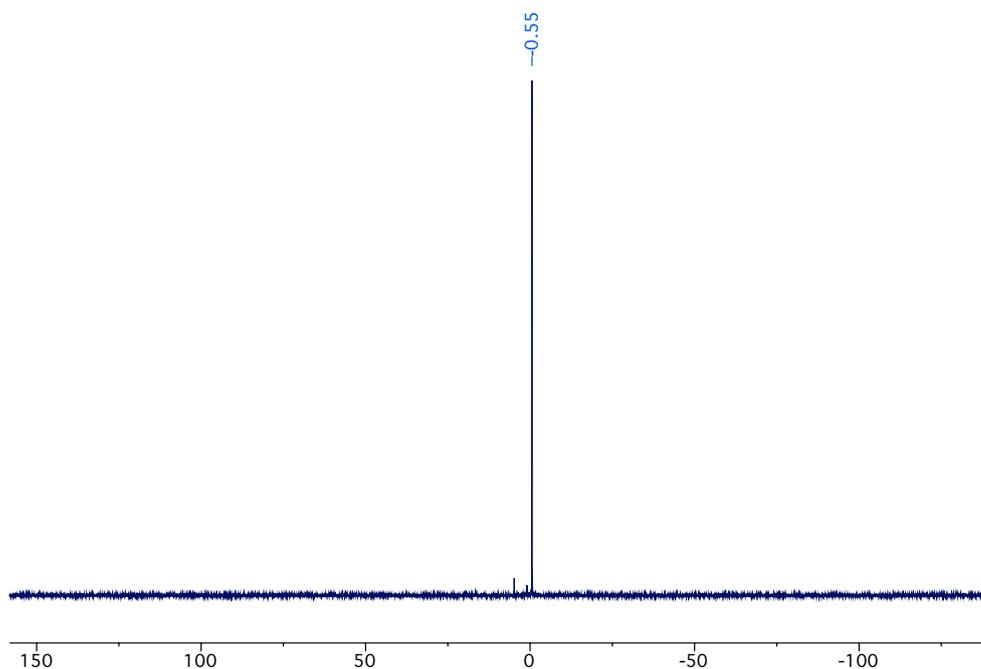


Abb. 11.11:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Natriumbenzoylphosphonat **11-Na** in  $\text{D}_2\text{O}$



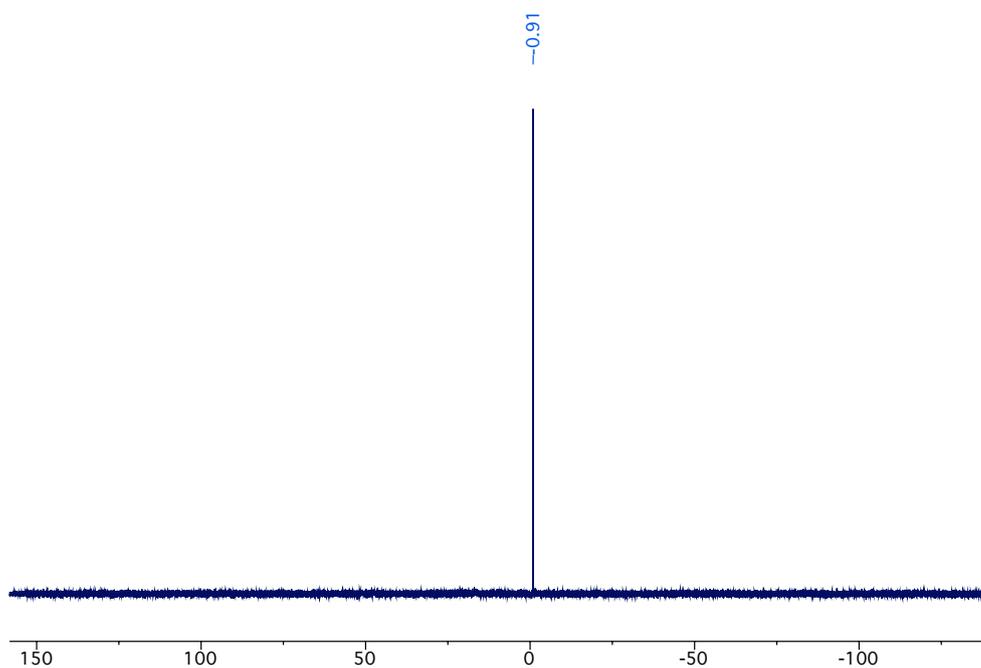


Abb. 11.14:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von *N*-Biotinyl-4-(aminomethyl)benzoylphosphonsäure **13** in  $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOH-}d_4$

### 11.1.2.3 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonat **31**

#### Dimer I

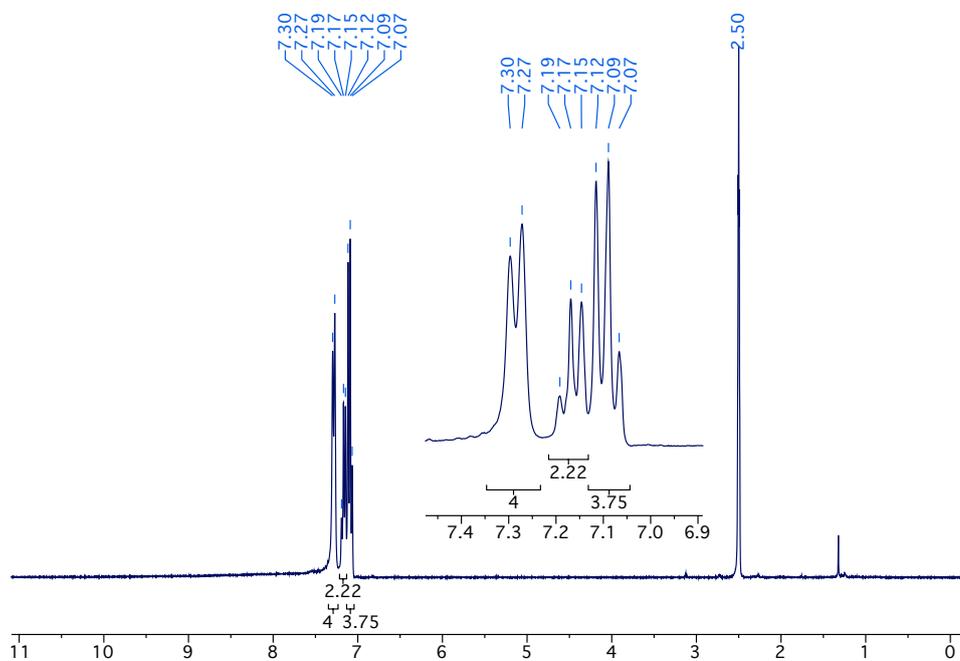


Abb. 11.15:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer I) in  $\text{DMSO-}d_6$

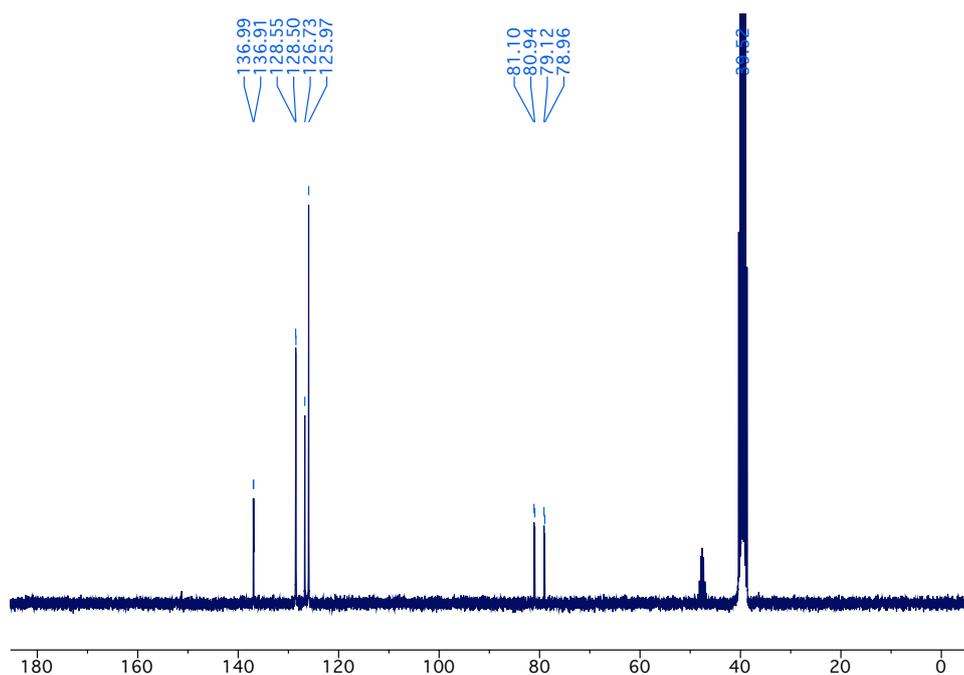


Abb. 11.16:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer I) in  $\text{DMSO-}d_6$

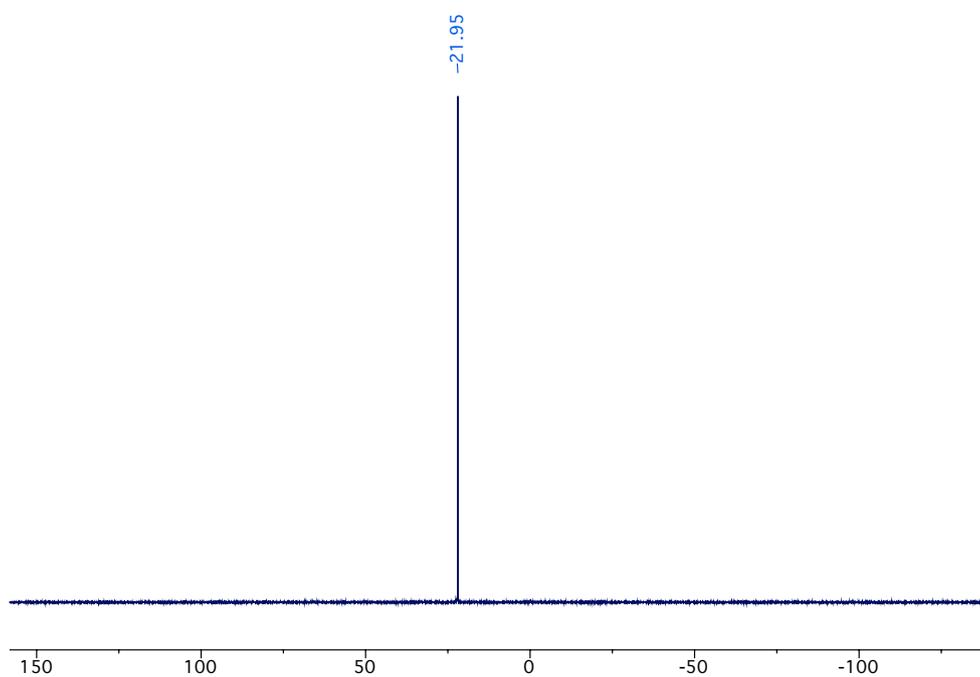


Abb. 11.17:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer I) in  $\text{DMSO-}d_6$

## Dimer II

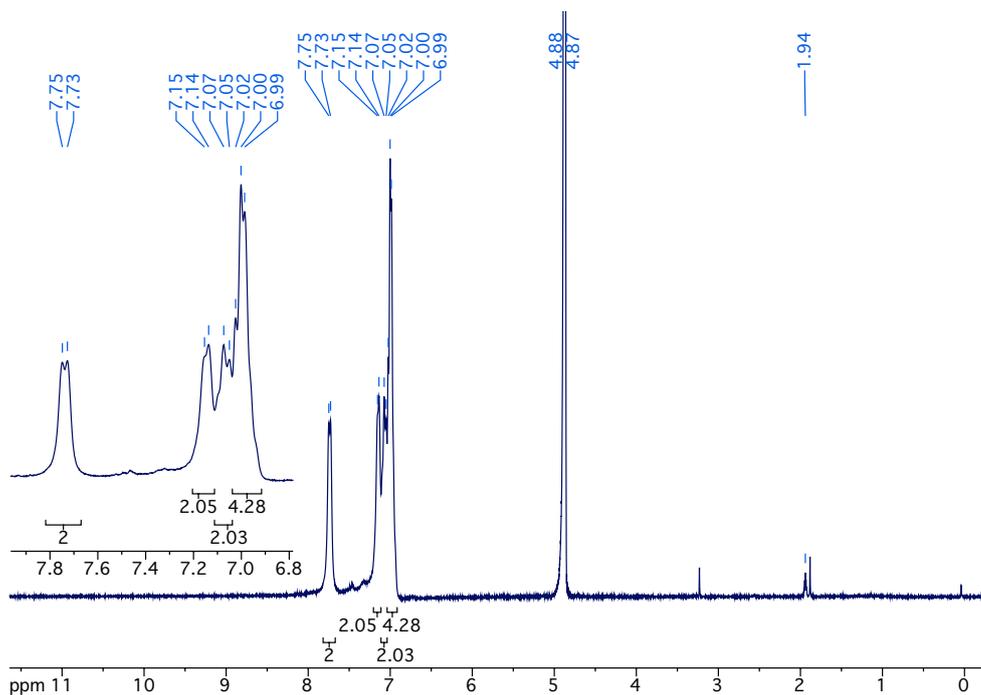


Abb. 11.18:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer II) in  $\text{D}_2\text{O}/\text{MeCN-}d_3$

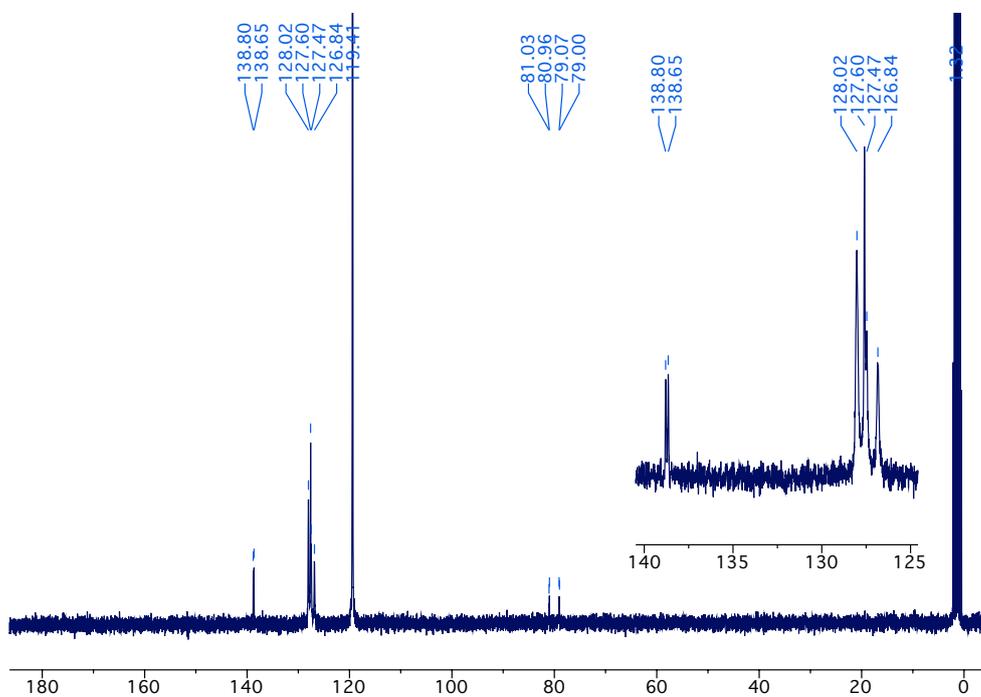
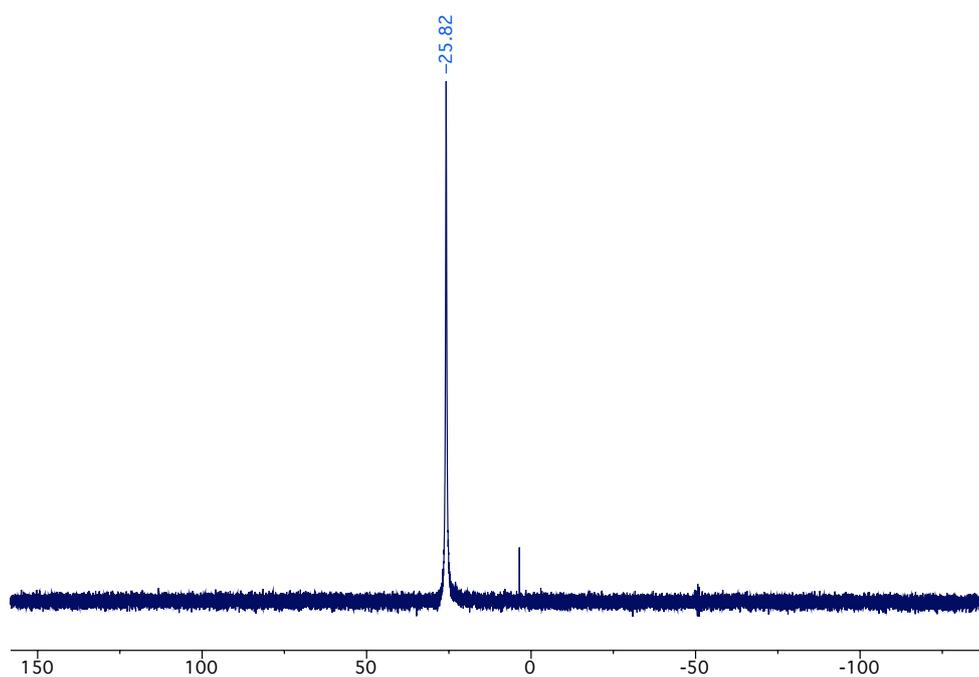


Abb. 11.19:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer II) in  $\text{D}_2\text{O}/\text{MeCN-}d_3$



**Abb. 11.20:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von 1,1'-Dihydroxy-1,1'-diphenylethan-1,1'-diyldiphosphonsäure **31** (Dimer II) in  $\text{D}_2\text{O}/\text{MeCN-}d_3$



## 11.2 Massenspektren

### 11.2.1 Protokoll der LC/MS/MS-Analyse nach Pulldown und tryptischem Verdau

MS452\_AHA113

13.04.2011

#### Identifizierung

**Proben:** AHA113 von Herrn Horatscheck FMP AG Med.Chemie  
 Kann die Bande als das folgende STAT5b Konstrukt identifiziert werden und können Peptide mit dem Linker FAM-K(Biotin)GkYLSLPPW-NH<sub>2</sub> (kY steht für das Tyrosin-Ketophosphonat, Massenaddition nach Phosphatabspaltung 1595.6795 C83H97N13O18S ) gefunden für das modifizierte Tyrosin-H (da am gebundenen Peptid ein H weggeht) entspricht 173,0477 ( Tyr +C -2H) und das modifizierte Lys am N-terminus 713.2281 (C37H37N4O9S )[-H wenn ein N-terminales H addiert wird]. Gesamte Linker Struktur -H (für das H welches am Protein weggeht) C85H100N14O19S 1652.7010

MKTEEGKLVIVINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGKIVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIIFWAHDFRGGYASQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDVAVRY  
 NGKLJAYPIAVAEALSLIYNKDLLPNPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDNAGAKAGLTFLVDLIKNNK  
 HMNADTDYSIAEAFNKGGETAMTINGPWAWNSIDTSKVN YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVL  
 LKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSNFEEENLYRQSGTVDAGADAGKPRPGSSENLRYFQGG  
 RPMSQKHLQINQTFEELRLVTQDTENELKKLQQTQYFYIIQYQESLRQAQFGPLAQLSQERLSRETALQKQVSLAEWLQREACTLQYRVLEAEKHQ  
 KTLQLLRKQQTIIIDDELQWKRQQLAGNGGPPGESLDVLSWCEKLAEDIQWNRQQIRRAEHLQQLPIPGPVEEMLAEVNATITDIIISALVSTFIEEK  
 QPPQVLKQTKFAATVRLLYGGKLNWHMNPQVKATIISEQAKSLLKNENTRNDYSGEILNOCVMIEYHQATGTLAHRNMSLKRKRSDRRGAESVT  
 EEKFTILFESQFSVGGNELVFQVKTLVSLPVVIVHGSQDNNATATVLDWNAFAEPGRVFFAVPDKVLWPQLCEALNMKFKAEVQSNRGLTKENLVFLAQKL  
 FNNSSSHLEDYSGLSVSWSQFNRENLPGRNYTFWQWFDGVMVLLKHLKPHWNDGAILGPNKQQAHDLLINKPDGTFLRFSDSEIGGITJAWKFD.SQ  
 ERMFWNLMPFTTRDFSIKSLADRLGDLNLYLWFPDRPKDEVYSKYYPVPCESATAKAVDGYVKPKQIKQVPEFVNASADAGGGSATYMDQAPSPAVCP  
 QAHYNYMPQNPARRSRSHHHHHH

**Methode:** Trypsin-Verdau im Gel ohne Alkylierung  
 nano-LC-ESI\_MSMS (Orbitrap) ,  
 LC: Nano LC 2D Ultra von Eksigent, Injektion von 5.8 µl, anal. Säule 25cm\*75µm  
 LC Packing PepMap C18 3µm, mit Vorsäule 5mm\*300µm, Gradient 2-33% ACN in 80min  
 MS: LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)  
 MS Scanbereich 375-1500 Da mit Auflösung 60000 gefolgt von MS2 der höchsten 5 doppelt oder dreifachgeladenen Ionen, dynamischer Ausschluß der gemessenen monoisotopischen Massen (Toleranz 10ppm) für 120sec. ( MS2: Isolation 2.0 Da Std. Fragmentierung)

**Auswertung:** Erstellung der Peaklisten (mgf-Datei) mit Mascot Distiller, Datenbankabgleich mit MASCOT auf einem lokalen Server,  
 Search Parameters  
 Datenbank: Special Stat5Bswiss (521017 sequences; 183901321 residues), diese Datenbank entspricht der SwissProt 2010\_10 erweitert um die übermittelte Sequenz des Konstruktes.  
 MS-Massentoleranz: ±10 ppm, MS2- Massentoleranz: ±0.35 Da,  
 Variable Proteinmodifikationen: Oxidation (M), Propionamide (C), sowie der übermittelte Linker als Modifikation „link (N-term)“ ,  
 Enzym: Trypsin (inklusive Spaltung von KP, RP) mit 2 Fehlsplattstellen

**Ergebnisse:** Die Bande wird zweifelsfrei als der übermittelte STAT5b-Konstrukt identifiziert. Außerdem Konstrukt werden 2 weitere Peptide des Maltose-binding periplasmic protein von Bakterien, Keratine Trypsin sowie einige Peptide anderer Proteine identifiziert. Weitere Informationen sind den htm-Dateien auf M:\Organis\ANYONE\SCHUEMANN\MS452\_AHA113 und der nächsten Seite zu entnehmen.  
 Die Datei Peptid\_Liste.htm enthält alle Massensignale von denen MS2 gemessen wurden und deren Masse einem Peptid des Konstruktes zu geordnet werden kann.  
 Massenabweichungen von über 4ppm weisen daraufhin, dass es wahrscheinlich ein anderes Signal ist

Protein hits :

[Stat5B Construct](#)

[MALE ENTAE](#) Maltose-binding periplasmic protein OS-Enterobacter aerogenes

[MALE SALTY](#) Maltose-binding periplasmic protein OS-Salmonella typhimurium

[K2C1 HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS-Homo sapiens GN-KRT1 PE-1 SV-6

[K1C10 HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS-Homo sapiens GN-KRT10 PE-1 SV-6

[K1C9 HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS-Homo sapiens GN-KRT9 PE-1 SV-3

[K1C14 HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 14 OS-Homo sapiens GN-KRT14 PE-1 SV-4

[TRYP PIG](#) Trypsin OS-Sus scrofa PE-1 SV-1

[K22E HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS-Homo sapiens

[K1C16 HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 16 OS-Homo sapiens GN-KRT16 PE-1 SV-4

[K2C6B HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 6B OS-Homo sapiens GN-KRT6B PE-1 SV-5

[K2C5 RAT](#) Keratin, type II cytoskeletal 5 OS-Rattus norvegicus GN-Krt5 PE-1 SV-1

[K2C5 HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 5 OS-Homo sapiens GN-KRT5 PE-1 SV-3

[K1C14 MOUSE](#) Keratin, type I cytoskeletal 14 OS-Mus musculus GN-Krt14 PE-1 SV-2

[K1C17 HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 17 OS-Homo sapiens GN-KRT17 PE-1 SV-2

[THIO ECOLI](#) Thioredoxin-1 OS-Escherichia coli (strain K12) GN-trxA PE-1 SV-2

[AVID CHICK](#) Avidin OS-Gallus gallus GN-AVD PE-1 SV-3

[DCD HUMAN](#) Dermcidin OS-Homo sapiens ( wird meist mit Keratin gefunden)

[NUOG ECOLI](#) NADH-quinone oxidoreductase subunit G OS-Escherichia coli

Identifizierte Peptide des STAT5b-Konstrukts:

Sequence Coverage: 81%

Matched peptides shown in **Bold Red or blue** (Statistisch nicht sichere Identifizierung der entsprechenden Peptide)

```

1 MKTEEGKLVI WINGDKGYNG LAEVGKKFEK DTGKVTVEH PDKLEEKFPQ
51 VAATGDGPD IFWAHDRFGG YAQSGLLAEI TEDKAFQDKL YPFTWDAVRY
101 NGKLIAYPIA VEALSLIYNK DLLPNPKTW EEIPALDKEL KARGKSALMF
151 NLQEPYFTWP LIAADGGYAF KYENGYDIK DVGVDNAGAK AGLTFLVDLI
201 KNKHMNADTD YSIAEAAFNK GETAMTINGE WAWSNIDTSK VNYGVTVLEP
251 FKGQPSKPFV GVLSAGINAA SPNKELAKEF LENYLLTDEG LEAVNKDKEL
301 GAVALKS YEE ELAKD ERIAA TMENAQKGEI MPNI PQMSAF WYAVRTAVIN
351 AASGRQTVDE ALKDAQTNSN FEENLYFQSG TVDAGADAGK PRPGSSENLY
401 FQGGREMSQK HLQINQTFEE LRLVTQDTE ELKKLQQTQE YFIIQYQESL
451 RIQAQFGPLA QLSPQERLSR ETALQQKQVS LEAWLQREAQ TLQGYRVELA
501 EKHQKTLQLL RKQQTIIILD ELIQWKRQQ LAGNGGPP EG SLDVLQSWCE
551 KLAETIWNQR QQIRRAEHL C QQLPIPGPVE EMLAEVNTI TDIISALVTS
601 TFIIEKQPPQ VLKTQTKFAA TVRLLVGGKL NVEHNPQVK ATIISEQQAK
651 SILKNENTRN DYSGEILNNC CVMEYHQATG TLSAHRNMS LKRIKRSDDR
701 GAESVTEEFK TILFESQFSV GGNELVFQVK TLSLEPVVIV HGSQDNNATA
751 TVLWDNAFAE PGRVPEAVPD KVLWPQLCEA LNMKFKAEVQ SNRGLTKENL
801 VFLAQKLFNN SSSHELDYSG LSVSWSQFNR ENLPGRNYTF WQWFDGVMEV
851 LKKHLKPHWN DGAILGFVNK QQAHDLLINK PDGTFLLRFS DSEIGGITIA
901 WKFDSQERMF WNLMPFTRD FSIRSLADRL GDLNYLIYVF EDREKDEVYS
951 KYYPVPCES ATAKAVDGYV KPQIKQVVPE FVNASADAGG GSATYMDQAP
1001 SPAVCPQAHY NMYPQNPARR SRSHHHHHH

```

Es werden 2 MS2 gemessen, deren Masse einem Peptid mit Linker entspricht.

m/z 1245.9549 z=3 bei 58,134min

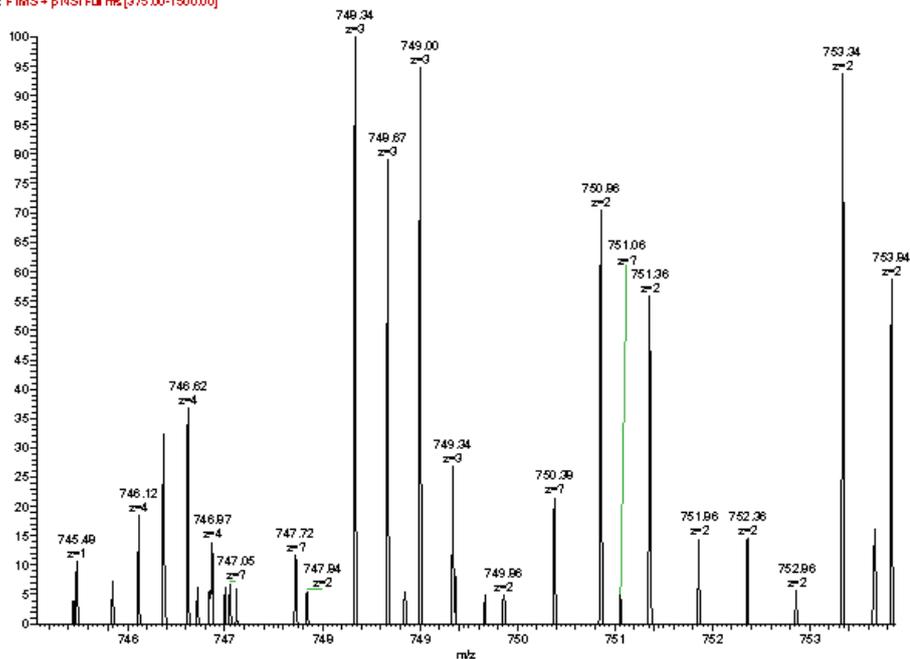
(MS ok, MS2 nur Fragment oder Precursor-Restsigal bei 1246,5 sonst keine auswertbaren Signale)

m/z 748.3354 z=3 bei 44,137min

(MS geringe Intensität, jedoch relativ gutes MS2, aber keine Fragmente, die einfach dem gesuchten Peptid zugeordnet werden können.)

Für die Zuordnung wäre ein MS2 Referenzspektrum des Linkers hilfreich.

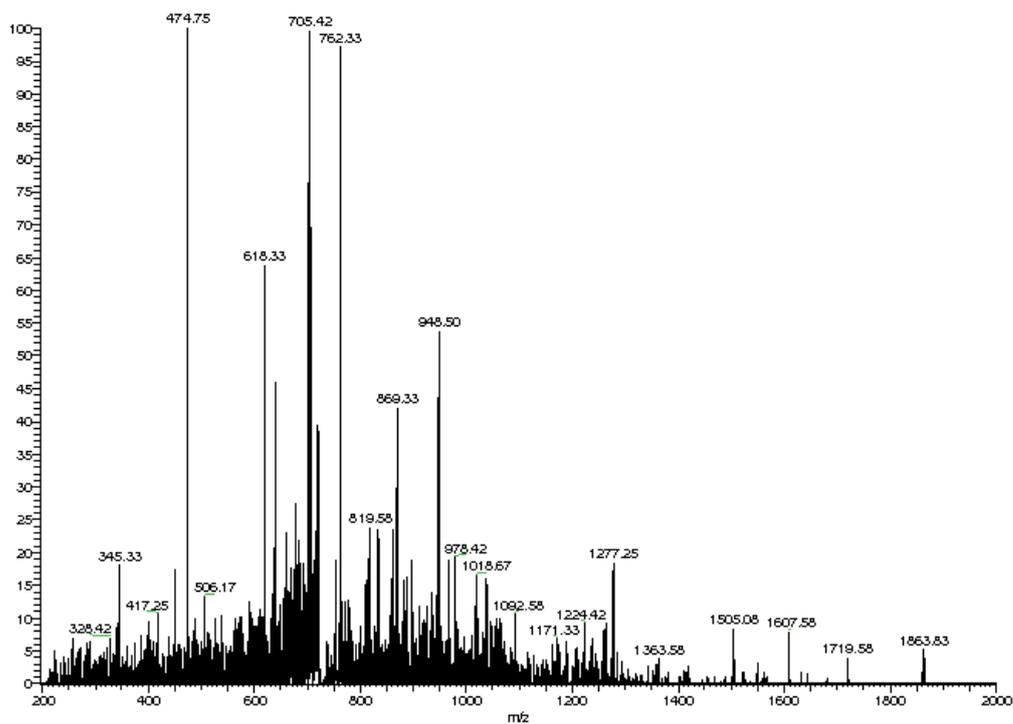
MS452\_AHA113A1 #1872-1879 RT: 44.03-44.16 AV: 2 NL: 1.98E5  
F: FTMS+p NSI Full ms [375.00-1500.00]



MS

MS2

MS452\_AHA113A1 #1877 RT: 44.14 AV: 1 NL: 6.57E1  
T: FTMS+p NSI d w Full ms2 748.67@cid35.00 [185.00-2000.00]



## 11.3 UV-Spektren

### 11.3.1 UV-Spektrum von 3-Styrylpyrimidotriazin 45

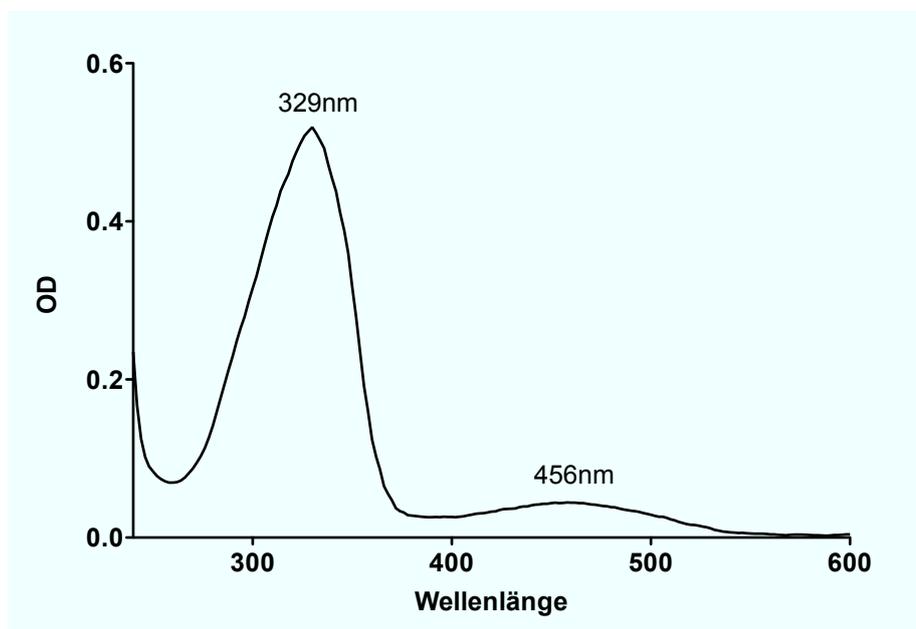


Abb. 11.21: UV-Spektrum von 3-Styrylpyrimidotriazin 45 in TRIS-HCl Puffer (Zusammensetzung s. Tab 10.2)

### 11.3.2 UV-Spektrum von Benzoylphosphonat 11

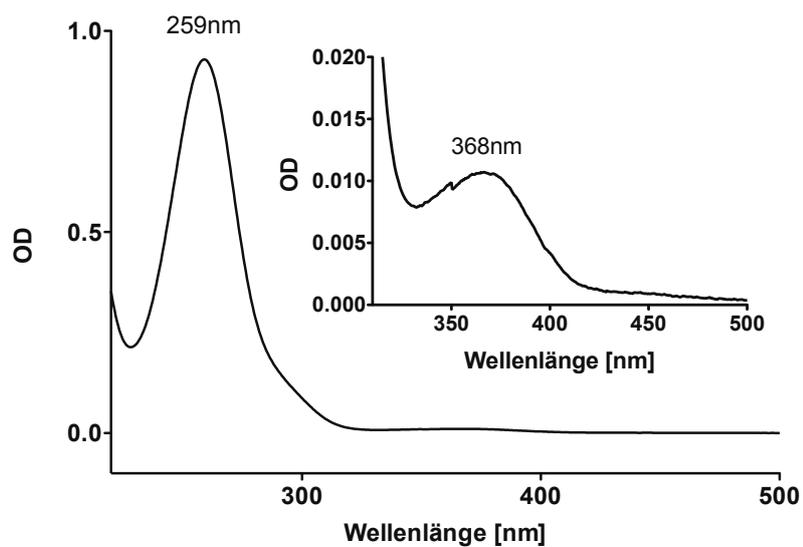


Abb. 11.22: UV-Spektrum von Benzoylphosphonat 11 in Wasser

## 11.4 SDS-Gele

### 11.4.1 Zeitabhängigkeit der Photovernetzung

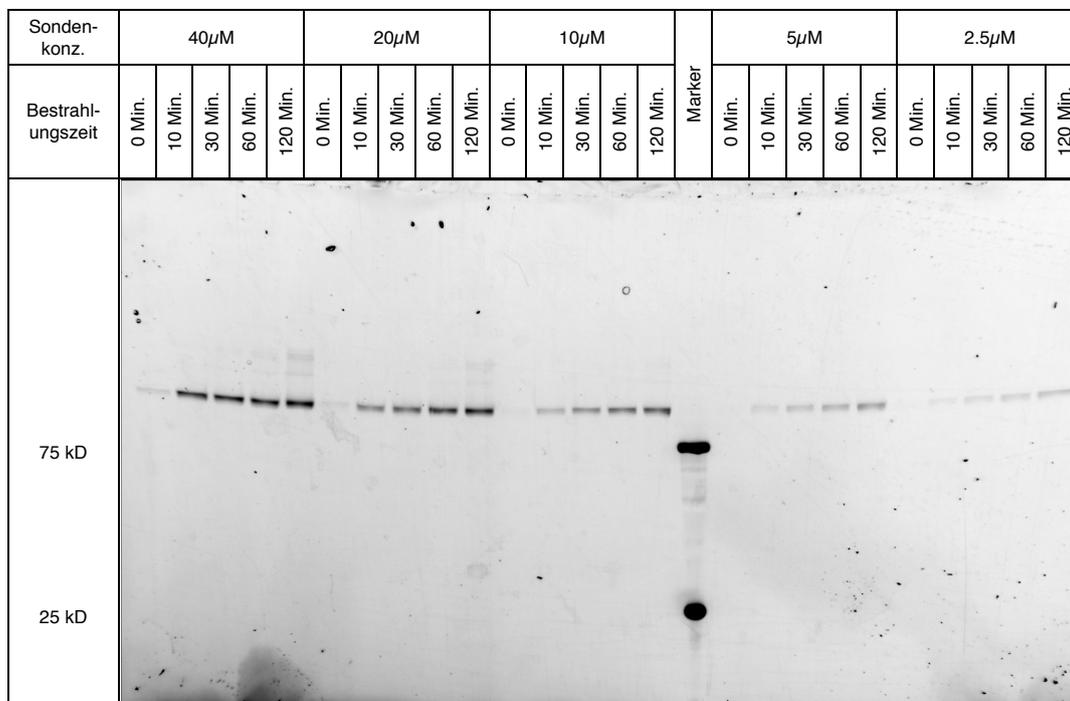


Abb. 11.23: Zeitabhängigkeit der Photovernetzung (Fluoreszenzbild)

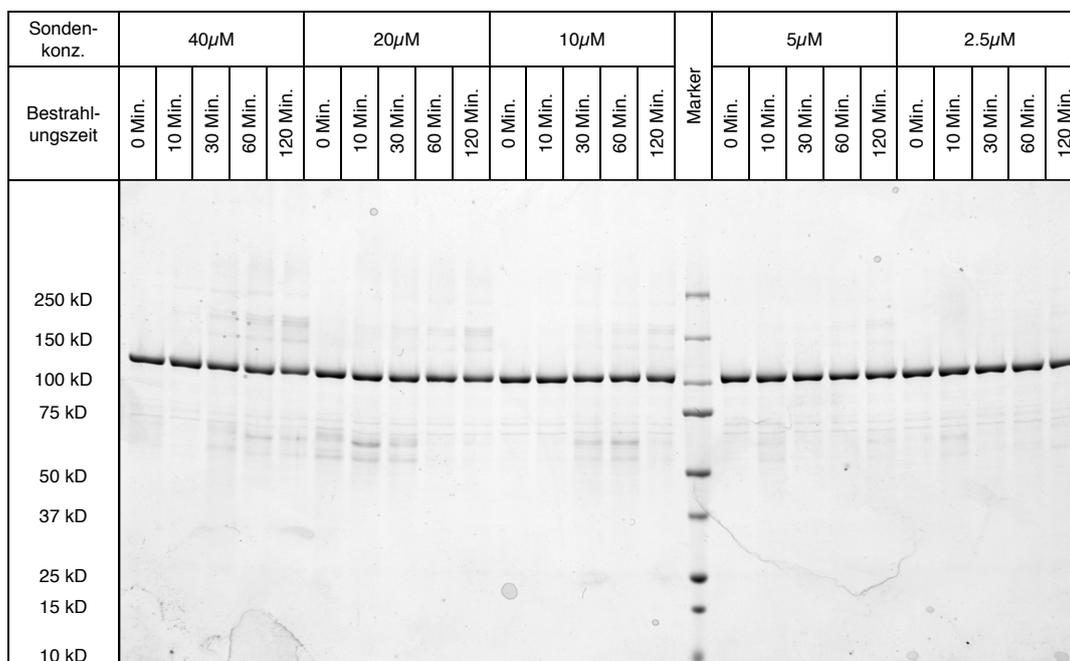
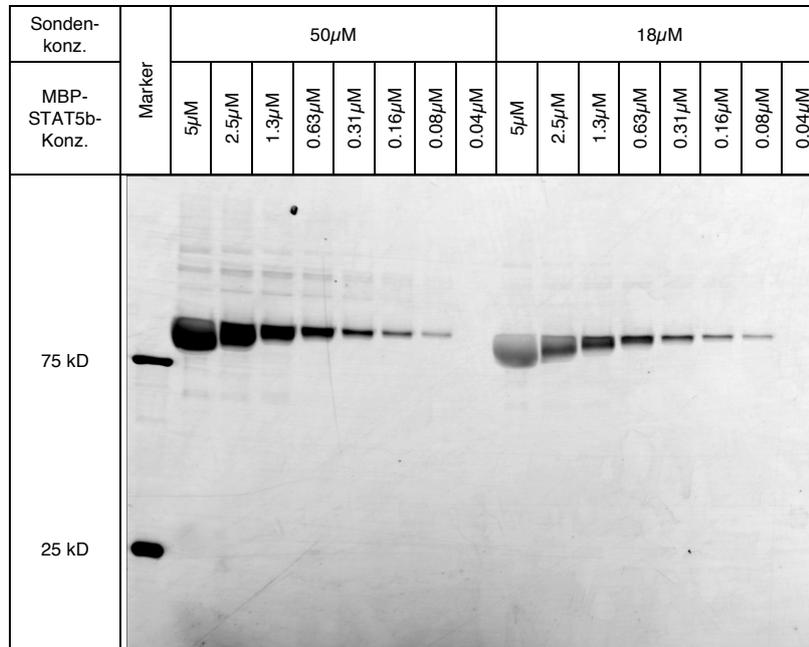
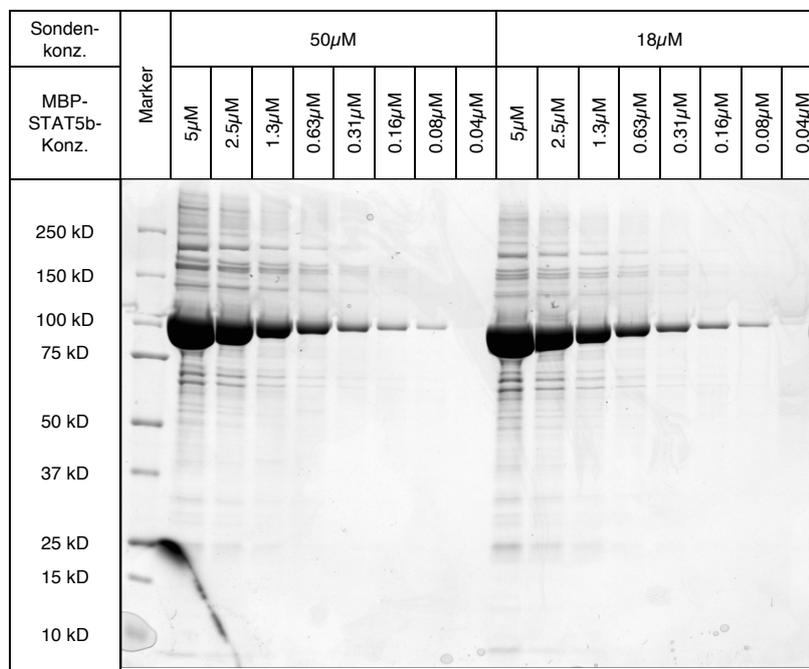


Abb. 11.24: Zeitabhängigkeit der Photovernetzung (Coomassiebild)

## 11.4.2 Abhängigkeit der Photovernetzung von der Proteinkonzentration



**Abb. 11.25:** Abhängigkeit der Photovernetzung von der Proteinkonzentration (Fluoreszenzbild)



**Abb. 11.26:** Abhängigkeit der Photovernetzung von der Proteinkonzentration (Coomassiebild)

### 11.4.3 Abhängigkeit der Photovernetzung von der Sondenkonzentration und Vergleich mit BSA

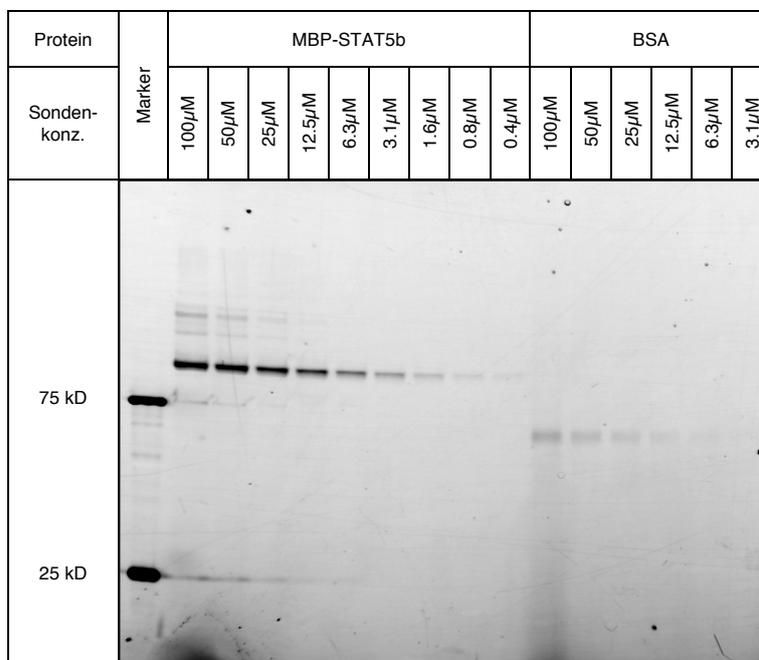


Abb. 11.27: Abhängigkeit der Photovernetzung von der Sondenkonzentration (Fluoreszenzbild)

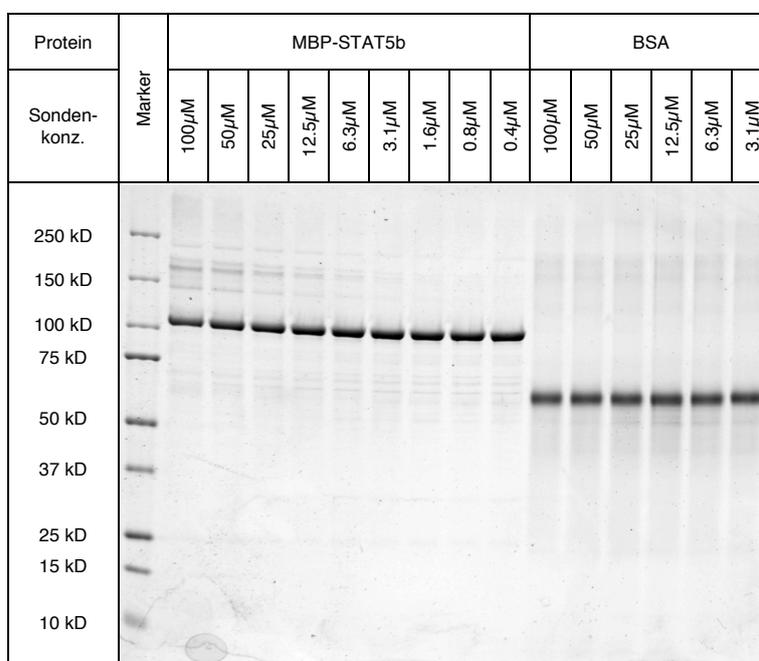


Abb. 11.28: Abhängigkeit der Photovernetzung von der Sondenkonzentration (Coomassiebild)

### 11.4.4 Photovernetzung nach Denaturierung des Proteins mit Harnstoff

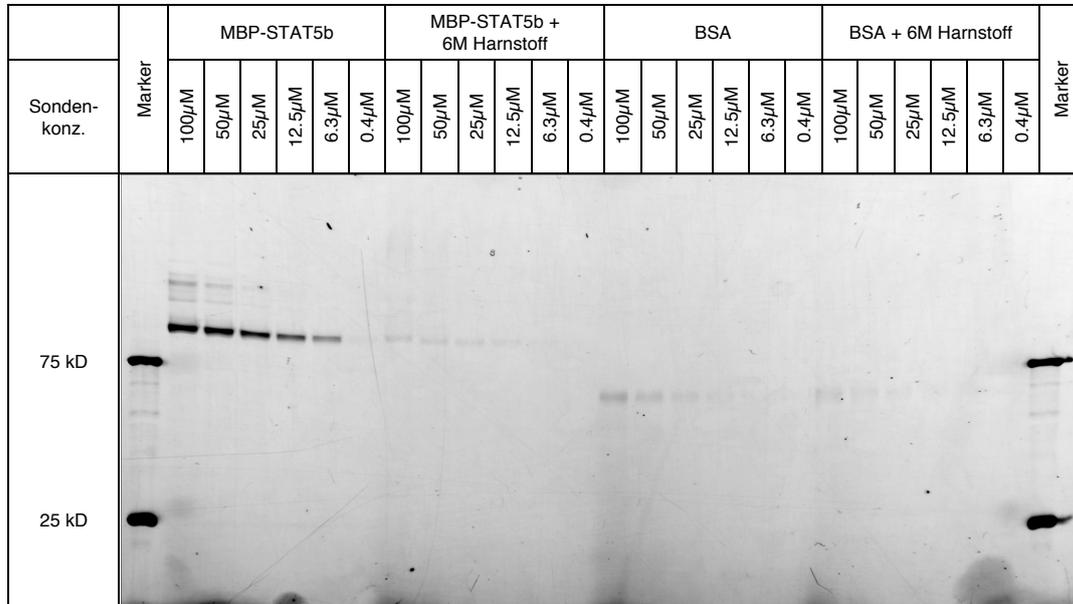


Abb. 11.29: Photovernetzung nach Denaturierung des Proteins mit Harnstoff (Fluoreszenz-bild)

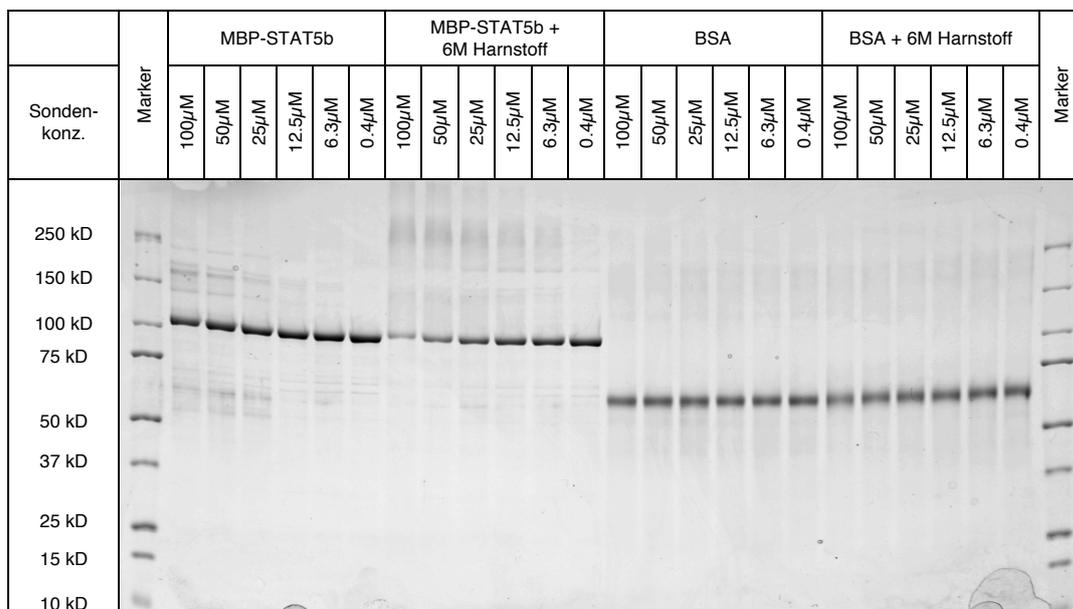
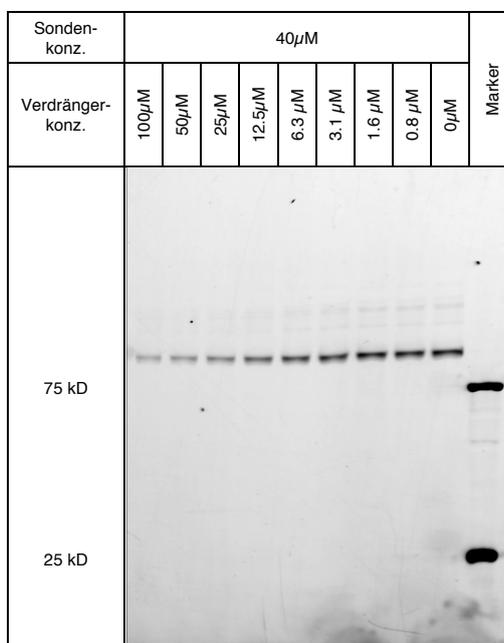
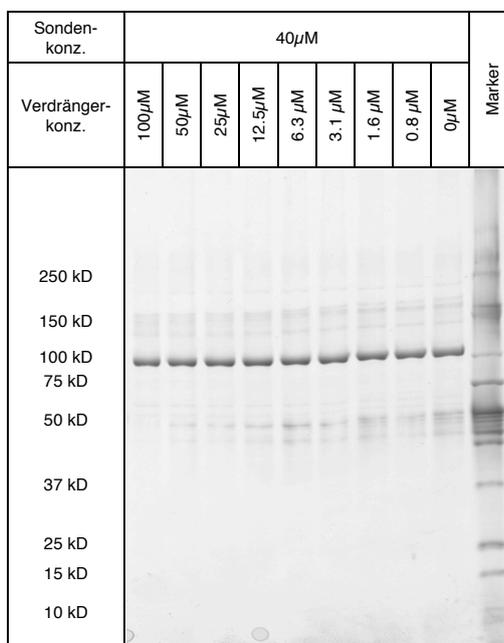


Abb. 11.30: Photovernetzung nach Denaturierung des Proteins mit Harnstoff (Coomassie-bild)

### 11.4.5 Verdrängung der PAL-Sonde mit einem kompetitiven Inhibitor

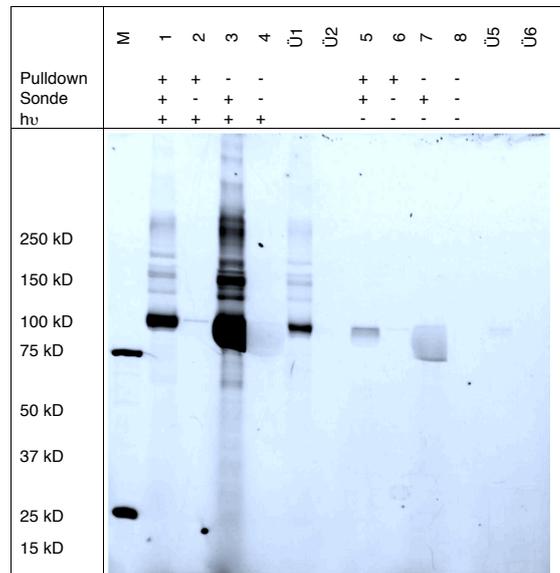


**Abb. 11.31:** Verdrängung der PAL-Sonde mit einem kompetitiven Inhibitor Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** (Fluoreszenzbild)

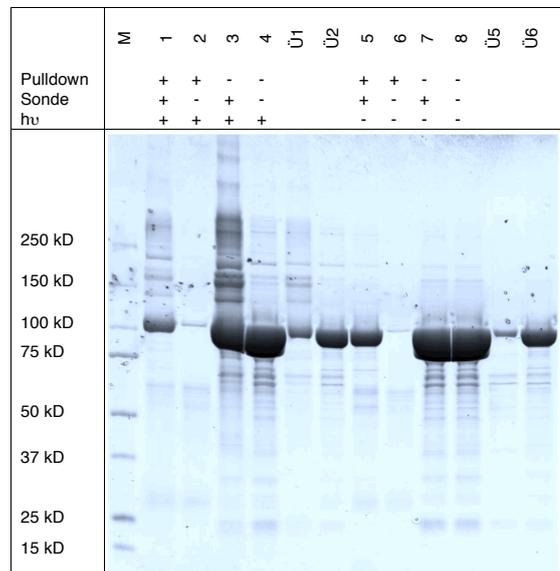


**Abb. 11.32:** Verdrängung der PAL-Sonde mit einem kompetitiven Inhibitor Ac-GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **40** (Coomassiebild)

### 11.4.6 Pulldown-Experimente



**Abb. 11.33:** Pulldown-Experimente mit MBP-STAT5b und der PAL-Sonde FAM-K(Biotin)GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** (Fluoreszenzbild)



**Abb. 11.34:** Pulldown-Experimente mit MBP-STAT5b und der PAL-Sonde FAM-K(Biotin)GpYLSLPPW-NH<sub>2</sub> **39** (Coomassiebild)