

Reversible Kinaseinhibitoren als Werkzeuge in der funktionellen Proteomik

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Doctor rerum naturalium)

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Miriam C. Hagenstein

Bielefeld 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Mattay

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis März 2006 unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald

an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater für die interessante Aufgabenstellung und die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit in Form von Anregungen sowie steter Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Jochen Mattay danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn PD Dr. Olaf Kruse, Dr. Jan H. Mußnug und Lutz Wobbe danke ich für die kooperative Zusammenarbeit und insbesondere die Durchführung der biologischen Experimente. Frau HD Dr. Anke Becker gebührt mein Dank für die freundliche Erlaubnis zur Nutzung des Typhoon Scanners; Dr. Kirsten Lotte, Dr. Regina Brockhinke geb. Plessow und PD Dr. Andreas Brockhinke danke ich für die Durchführung der FRET-Untersuchungen.

Bei den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises OC III bedanke ich mich für die Kollegialität, freundliche Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Sylwia Urman und Katrin Wollschläger danke ich für die Unterstützung bei den biochemischen Experimenten sowie den lebhaften Austausch über Biacore-Experimente. Eckhart W. Guthöhrlein gebührt mein Dank für die *Docking*-Studien. Anke Nieß danke ich für die Unterstützung beim Ertragen des ganz normalen Wahnsinns, Marco Wißbrock für Hilfe bei HPLC- und MALDI- bzw. allgemein technischen Problemen. Thomas Huber danke ich für einen kritischen Blick auf die Formatierung dieser Arbeit.

Tobias Bogner möchte ich für die im Rahmen seines Blockpraktikums geleistete Arbeit danken. Frau Dr. Katharina Sewald gilt mein Dank für die Bekanntmachung mit dem Biacore[®] 3000.

Den Herren Gerd Lipinski und Peter Mester danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, bei Herrn Dr. Matthias Letzel und Frau Sandra Heitkamp bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Untersuchungen. Dr. Ulrich Neuert danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen der Praktikumsbetreuung.

Biacore AB gebührt mein Dank für die Erlaubnis zur Verwendung einiger Abbildungen.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während meines Studiums.

Ein ganz spezielles Dankeschön gilt Michael für die liebevolle Unterstützung nicht nur beim Schreiben dieser Arbeit, insbesondere sei die Hilfestellung bei zahllosen Formulierungsfragen und das Korrekturlesen erwähnt.

Publikationen

M. Hagenstein, J. Mussnug, O. Kruse, N. Sewald, „Mechanism-based detection and activity-profiling of kinases“, in: E. Benedetti, C. Pedone, Eds., „Peptides 2002, Proceedings of the 27th European Peptide Symposium“, Edizioni Ziino, Castellammare di Stabia, Italien **2002**, 956-957.

M. C. Hagenstein, J. H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, „Affinitätsbasierte Markierung von Proteinfamilien mit reversiblen Inhibitoren – ein Konzept für die funktionelle Proteomik“, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5793-5796; „Affinity-Based Tagging of Protein Families with Reversible Inhibitors: A Concept for Functional Proteomics“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5635-5638.

M. C. Hagenstein, N. Sewald, „Chemical tools for activity-based proteomics“, *J. Biotechnol.* **2006**, *im Druck*, doi:10.1016/j.jbiotec.2005.12.005.

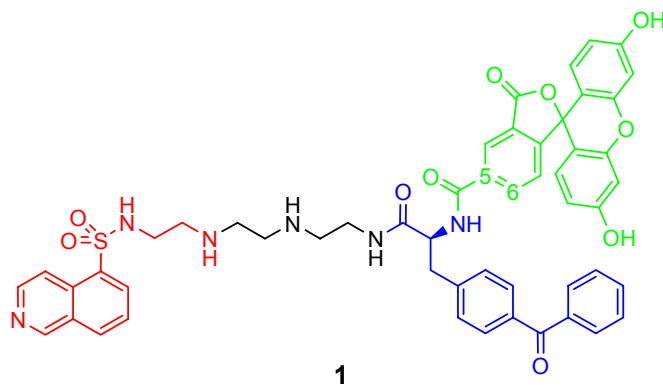
Summary

Proteomics basically relies on the two-dimensional separation of the proteins by 2D-PAGE and their subsequent identification by mass spectrometry. Due to the high amount of proteins present in a given proteome (e.g., usually more than 10000 proteins in a eukaryotic cell), resolution often remains incomplete. Sensitive detection and quantification with staining methods represent further problems. Therefore, the concept of functional proteomics has been developed. Instead of analyzing the whole protein content of a given proteome, this approach tries to label specific subproteomes in an affinity-based manner with a reporter group, thereby reducing the amount of data which has to be analyzed. Selective labeling of enzymes for instance can be achieved by connecting a reporter group with an irreversibly binding inhibitor, since the latter will form the covalent bond to the protein which is necessary for 2D-PAGE-conditions. This approach has been successfully applied to the labeling of serine proteases with fluorophosphonates and cysteine proteases with epoxides as irreversible inhibitors. However, since irreversibly binding ligands are not known for every class of proteins, the applicability of this concept was somewhat limited.

In the frame of this thesis, a concept generally applicable to functional proteomics has been developed which opens up new possibilities for proteome analysis by using reversibly binding inhibitors for affinity-based tagging of protein families. Since a covalent bond between protein and reporter group is necessary, the reversible inhibitor must be equipped with an additional reactive group, e.g., a photo-reactive group.

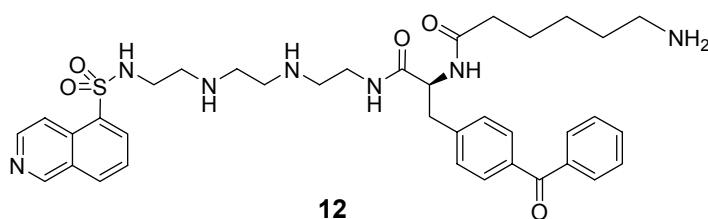
Isoquinolinesulfonamides, which competitively inhibit a broad range of kinases by occupying the ATP-binding site, were chosen to prove the applicability of this concept.

The engineered chemical probe **1** comprises the inhibitor **H-9**, a reporter group (carboxy-fluorescein) and 4-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) as photo-reactive group.



Upon irradiation at $\lambda = 350$ nm, a diradical is generated in the benzophenone chromophore which then inserts into C-H-bond of the protein, thereby forming the covalent bond. Photoaffinity labeling of several purified kinases preincubated with **1** has been performed successfully.

Surface plasmon resonance (SPR) experiments were undertaken to investigate in detail the binding properties of the modified **H-9** derivative **1** to kinases. For this purpose, the derivative **12** was synthesized and immobilized on an SPR-sensor chip.



It was shown that binding of protein kinase A (PKA) and creatine kinase to the immobilized ligand **12** occurs in a concentration-dependent manner. Furthermore, competition experiments with **H-9** and ATP revealed that binding occurs specifically since preincubation of the enzyme with either of them reduced protein binding to the immobilized ligand **12**. The dissociation constant for the interaction of **12** with PKA was determined in binding studies as well ($K_D = 2.3 \cdot 10^{-7}$ M) and was found to be similar to the one published

for the interaction of **H-9** and PKA ($K_D = 1.9 \cdot 10^{-6}$ M). Therefore, conjugation of **H-9** with Bpa does not significantly affect binding to the model kinases.

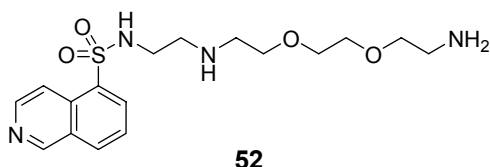
The specificity of the interaction between probe and target protein was further proven with several irradiation experiments. For example, no labeling was detected when creatine kinase was denatured with SDS prior to incubation with a high excess of **1** followed by irradiation.

The applicability of the concept presented here to detect kinases in protein mixtures has been demonstrated by spiking a *Chlamydomonas reinhardtii*-thylakoid membrane preparation with creatine kinase. The latter was successfully labeled and afterwards identified with MALDI-ToF-MS. Several other thylakoid proteins were also labeled, but those putative kinases have not been identified so far since the genome of *Chlamydomonas reinhardtii* is not fully annotated yet.

During this thesis work, it has been shown that reversibly binding inhibitors can be used for affinity-based tagging of proteins in functional proteomics. Engineered probes based on more specific inhibitors should allow the generation of even more accurately defined subproteomes, e.g., instead of whole enzyme families only specific subgroups.

The importance of the concept is highlighted by the fact that several other working groups independently developed similar approaches for the tagging of metalloproteases, aspartic proteases and galectins with probes derived from reversible ligands.

For affinity chromatography purposes, **H-9** was functionalized with a linker to obtain the ligand **52** which can be immobilized on a solid phase without loss of inhibitor affinity.



If **H-9** is immobilized directly on a carboxyl-functionalized matrix, a decrease in affinity cannot be ruled out due to the conversion of the terminal amine into an amide. Moreover,

the additional linker provides better access to the inhibitor moiety (compared to directly immobilized **H-9**) and reduces possible steric hindrances.

Both **H-9** and **52** were immobilized via the terminal amino function on sensor chips and their affinity was investigated with SPR-studies. The dissociation constant for the interaction of **52** with PKA ($K_D \sim 2.2 \cdot 10^{-7}$ M) is similar to the one found for the interaction of **12** and PKA (see above), whereas a lower affinity was determined for the interaction of directly immobilized **H-9** with PKA ($K_D = 2.8 \cdot 10^{-6}$ M). This might be due to the loss of the positive charge at the amino function or to inadequate linker length.

At the moment, this compound is used as ligand in affinity chromatography. Several proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* preparations could be enriched and eluted with **H-9** and ATP, respectively. Their identification is under way, too.

In the future, the compound **52** could also be used for 'fishing' of new kinases in Biacore[®] micro-recover experiments.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	3
2.1	Proteomik	3
2.1.1	Proteomanalytik	4
2.1.2	Funktionelle Proteomik	10
2.2	Proteinkinasen	22
2.3	Isochinolinsulfonamide als Proteinkinaseinhibitoren	24
2.4	Oberflächenplasmonresonanz	29
2.5	Photoaffinitätsmarkierung	38
3	Zielsetzung	43
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Synthese der chemischen Sonde 1	47
4.2	Synthese von Sonden-Derivaten für die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	48
4.2.1	Synthese eines biotinylierten Sonden-Derivates.....	48
4.2.2	Synthese des immobilisierbaren Derivates 12	49
4.2.3	Synthese von Kontrollverbindungen für SPR-Untersuchungen bzw. für die Photoaffinitätsmarkierung.....	52
4.3	Oberflächenplasmonresonanz-Studien	61
4.3.1	Proteine	61
4.3.2	Bindungsversuche mit dem Streptavidin-Sensorchip	62
4.3.3	Immobilisierung von 12 auf dem CM5-Sensorchip.....	64

4.3.4	Bindung von Proteinkinase A an immobilisiertem 12	66
4.3.5	Kompetition mit H-9 und ATP	66
4.3.6	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für den Komplex PKA/Derivat 12	69
4.3.7	SPR-Experimente mit Kontrollderivaten.....	71
4.3.8	Bindung von Kreatinkinase an dem immobilisierten Liganden 12	75
4.4	Photoaffinitätsmarkierung	76
4.4.1	Photoaffinitätsmarkierung verschiedener Kinasen mit dem H-9 -Derivat 1	76
4.4.2	Photoaffinitätsmarkierung in realen Proteingemischen	77
4.4.3	Kontrollexperimente bezüglich der mechanismusbasierten Markierung der Kreatinkinase.....	78
4.4.4	FRET-Untersuchungen	81
4.4.5	Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung mit Bpa.....	83
4.5	Versuche zur Synthese einer nukleophil spaltbaren chemischen Sonde ...	85
4.6	Synthese eines H-9-Derivates für die Affinitätschromatographie	90
4.6.1	Vergleich der Bindungseigenschaften von H-9 und 52 im Biacore®	98
4.7	Synthese eines neuen Linkers bzw. Bausteins	102
5	Zusammenfassung und Ausblick	105
6	Experimenteller Teil	111
6.1	Allgemeine Angaben zu den chemischen Experimenten	111
6.2	Lösungsmittel und Chemikalien	114
6.3	Allgemeine Angaben zu den biochemischen Experimenten	115
6.4	Synthesen	118
6.4.1	Analytische Daten der chemischen Sonde (S)-N-[Fluorescein- 5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(isochinolin-5-sulfonyl- amino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoacetat 1	118
6.4.2	Synthese des biotinylierten Derivates 8	120
6.4.3	Synthese des immobilisierbaren Derivates 12	122
6.4.4	Synthese der Kontrollderivate.....	128

6.4.5	Versuche zur Synthese einer nucleophil spaltbaren Sonde.....	145
6.4.6	Synthese eines H-9 -Derivates für die Affinitätschromatographie	151
6.4.7	Synthese eines neuen Linkers bzw. eines Bausteins für die Darstellung von Sonden für die Photoaffinitätsmarkierung	165
6.5	SPR-Messungen	171
6.5.1	Immobilisierung der Biotin-Variante 8 auf dem SA-Chip	171
6.5.2	Bindungsexperimente mit PKA/Kreatinkinase (SA-Chip)	171
6.5.3	Immobilisierung des Derivates 12 auf dem Sensorchip CM5	172
6.5.4	Bindungsexperimente mit PKA/Kreatinkinase (CM5-Chip).....	173
6.5.5	Immobilisierung von 52 bzw. H-9 auf dem Sensorchip CM5.....	174
6.5.6	Bindungsexperimente mit PKA an immobilisiertem 52 bzw. H-9	174
6.6	Photoaffinitätsmarkierung	174
6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	175
6.7.1	Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli	175
6.7.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)	176
6.7.3	Silberfärbung	178
7	Literaturverzeichnis	179

Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson Tyrosinkinase
ABP	<i>activity-based probe</i>
ACN	Acetonitril
AES	Anregungs-Emissions-Spektroskopie
Äq.	(Mol-) Äquivalente
APS	Ammoniumpersulfat
AQUA	<i>Absolute Quantification</i>
arom.	aromatisch
4-AMP	4-Aminomethylpiperidin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (abgeschwächte Totalreflexion)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc ₂ O	Pyrokohlensäure-di- <i>tert</i> -butylester, „Bocanhydrid“
Bpa	4-(Benzoyl)-L-phenylalanin
br.	breit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (AMP)
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cbz-OSu	<i>N</i> -(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (GMP)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CK	Caseinkinase bzw. Kreatinkinase
c-Kit	<i>Stem Cell Factor Receptor</i> (Rezeptortyrosinkinase)
CM5-Chip	SPR-Sensorchip mit carboxymethylierter Dextranmatrix
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>

d	Dublett (¹ H-NMR)
DABCO	Diazobicyclo[2.2.2]octan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	<i>N</i> -1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl
Dde-OH	2-(1-Hydroxyethyliden)-5,5-dimethylcyclohexan-1,3-dion
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Rezeptortyrosinkinase)
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
FDA	<i>US Food and Drug Association</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAC	Inhibitoraffinitätschromatographie

ICAT	<i>Isotope-coded Affinity Tagging</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i>
IR	Infrarot-Spektroskopie
kDa	Kilodalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LHC II	<i>Light Harvesting Complex II</i>
m	Multipllett ($^1\text{H-NMR}$); <i>medium</i> (IR)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
p	primär ($^{13}\text{C-NMR}$)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i> (Rezeptortyrosinkinase)
PE	Petrolether
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase/Proteinkinase A
PKC	Ca^{2+} -Phospholipidabhängige Proteinkinase/Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase/Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethansulfonylchlorid
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Phenylsulfonester
PS II	Photosystem II
PTM	posttranslationale Modifikation
q	Quartett ($^1\text{H-NMR}$); quartär ($^{13}\text{C-NMR}$)

Rh	Rhodamin
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Resonance Unit</i>
s	Singulett (¹ H-NMR); sekundär (¹³ C-NMR); <i>strong</i> (IR)
SA-Chip	SPR-Sensorchip mit Streptavidin-Dextranmatrix
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
t	Triplet (¹ H-NMR); tertiär (¹³ C-NMR)
TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methyl]imidazolium-tetrafluorborat
tert.	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
Tf ₂ O	Triflattanhydrid (Triflat: CF ₃ SO ₃ = OTf)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
ToF	<i>Time of Flight</i>
Tosyl	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
vs	<i>very strong</i> (IR)
vw	<i>very weak</i> (IR)
w	<i>weak</i> (IR)
WBB	Wasserstoffbrückenbindung

1 Einleitung

In der Genomforschung wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, insbesondere sei die vollständige Sequenzierung des Humangenoms im Jahr 2001 erwähnt. Allerdings sind es letztendlich Proteine, nicht Gene, welche für die meisten biologischen Prozesse, die in einer Zelle ablaufen, verantwortlich sind. (DNA und RNA sind die Informationsträger der Zelle, während Proteine die Effektormoleküle darstellen.)

Während das menschliche Genom aus 30000-40000 Genen besteht, liegt die geschätzte Zahl strukturell und funktional unterschiedlicher Proteine eine Größenordnung höher.^[1] Dieses Verhältnis kommt unter anderem dadurch zustande, dass nur selten ein 1:1-Verhältnis von Genen und Proteinen besteht, da die mRNA vieler Gene unterschiedlich gespleißt werden kann und somit zu verschiedenen Proteinen führt. Zudem wird bei höheren Organismen die Funktion vieler Proteine durch posttranslationale Modifizierung (Phosphorylierung, Methylierung, Glykosylierung, proteolytische Spaltung etc.) entscheidend beeinflusst.^[2,3] Deshalb reicht eine DNA- bzw. RNA-Analyse nicht aus, um komplexe zelluläre Vorgänge verstehen zu können.^[4,5] Dies gilt umso mehr, als Proteine unter veränderten Konditionen oft mit wechselnden Bindungspartnern interagieren. Ein Protein kann an mehreren Prozessen beteiligt sein, alternativ können verschiedene Proteine die gleiche Funktion erfüllen.

Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren neben der Genomik, welche die Gene eines Organismus untersucht, eine neue Disziplin entstanden, die sich der Untersuchung der Proteine widmet. Die Gesamtheit der exprimierten Proteine einer Zelle oder eines Organismus bezeichnet man als Proteom – in Analogie zum Genom als der Gesamtheit des Erbguts. Die so genannte Proteomik hat nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen zum Ziel, sondern untersucht auch deren Struktur, Funktion, Aktivität sowie Interaktionen mit Bindungspartnern.^[6]

Insbesondere in der pharmazeutischen Industrie ist es in Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente wichtig, therapeutisch relevante Proteine zu identifizieren und zu

charakterisieren. Da das Proteom hochempfindlich auf Variationen der Umweltbedingungen reagiert, lassen sich durch Vergleich der Proteinmuster verschiedener Zustände (z. B. vor/nach Zugabe eines Medikamentes, gesunde/pathologisch veränderte Zellen) Veränderungen einzelner Proteine feststellen und quantitativ auswerten. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf zelluläre Stoffwechselwege und Regulationskaskaden eines Organismus gezogen werden. Insbesondere eröffnet die Proteomik die Möglichkeit, krankheitsassoziierte Markerproteine zu identifizieren und als Hilfsmittel in Diagnose und Prognose einzusetzen. Ein Beispiel sind die so genannten Tumormarker in der Krebsmedizin.^[7] Diese Proteine stellen potentielle Ziele neuer Therapien dar und können auch als Indikatoren für die Effizienz von Medikamenten benutzt werden.

Kinasen stellen in Säugetieren die größte Enzymfamilie dar, so besteht das menschliche „Kinom“ aus 518 im Genom codierten Kinasen.^[8] Die Phosphorylierung durch Proteinkinasen (bzw. die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen) ist ein Vorgang von überragender biologischer Bedeutung. Etwa ein Drittel aller intrazellulären Proteine weist kovalent gebundenes Phosphat auf.^[8] Die Veränderungen im Phosphorylierungszustand der Proteine regulieren die Aktivität unzähliger Enzyme, die an zellulären Signalkaskaden und Interaktionsnetzwerken beteiligt sind. Daher sind Proteinkinasen essentiell für die Regulation einer Vielzahl vitaler Zellfunktionen (z.B. Transkription und Translation, Zellteilung und Wachstum) und Stoffwechselprozesse (z.B. Glykogen-Abbau und Lipolyse).^[9] Abnormale Proteinphosphorylierung ist dagegen Ursache (oder auch Folge) gravierender Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Arthritis und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aus diesem Grund haben sich in den letzten Jahren die Proteinkinasen neben G-Protein gekoppelten Rezeptoren zur zweitwichtigsten Zielgruppe der Medikamentenforschung entwickelt.^[10] Es besteht großes Interesse an einem besseren Verständnis der zellulären regulatorischen Interaktionsnetzwerke, sowie an der Identifizierung und Charakterisierung von weiteren Kinasen. Die Proteomforschung kann hierbei wertvolle Dienste leisten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines Konzepts für die Proteomanalyse vorgestellt. Ausgehend von breitbandigen Kinaseinhibitoren soll eine für die Kinom-Analytik geeignete chemische Sonde synthetisiert und getestet werden.

2 Theorie

2.1 Proteomik

Der Begriff „Proteom“ wurde ursprünglich 1994 von Mark Wilkins und Keith Williams (Macquarie Universität, Australien) geprägt, um das PROTEin-Äquivalent des GenOMs zu beschreiben.^[11] Unter „Proteomik“ versteht man den qualitativen und quantitativen Vergleich von Proteomen, die aus unterschiedlichen Bedingungen/Zuständen resultieren. Während die Gen-Analyse (Genomik) über ein breites Spektrum an Methoden verfügt, welche die vergleichende Auswertung eines gegebenen mRNA-Komplements in einem einzigen Experiment erlauben (z. B. cDNA oder Oligonucleotid-Microarrays),^[12] sieht die Situation im Fall der Proteomik anders aus. Die Analyse von Proteinen ist technisch anspruchsvoll, da zu einem bestimmten Zeitpunkt in einfachen prokaryotischen Organismen einige Tausend und in eukaryotischen Zellen rund 10000 Proteine exprimiert werden. Die Tatsache, dass Proteine sehr heterogene physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen (z. B. membranständige vs. lösliche Proteine, extreme isoelektrische Punkte (IEP), posttranslationale Modifikationen) und in äußerst unterschiedlichen Mengen vorliegen können (schwach bzw. stark exprimierte Proteine), erschwert ihre Untersuchung zusätzlich. Zudem existieren weder generelle Proteinbindungspartner (wie z. B. *anti-sense* DNA) noch eine Methode, die die Vervielfältigung schwach exprimierter Proteine erlaubt, wie dies für DNA bzw. mRNA mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) möglich ist. Daher ist die gleichzeitige Charakterisierung der relativen Expressionslevel und der Aktivität aller Proteine eines gegebenen Proteoms mit nur einer Strategie nicht möglich.

Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom ein dynamisches System, dessen Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und von den Umweltbedingungen (Wachstumsbedingungen, Stressfaktoren, Krankheitszustände usw.) variiert. Ein eindrucks-

volles Beispiel ist der Vergleich einer Raupe und des entsprechenden Schmetterlings: beide haben dasselbe Genom, aber unterschiedliche Proteome (Abbildung 2.1).^[13]

Ein Genom...



...verschiedene Proteome.

Abbildung 2.1: Raupe und Falter des Schwalbenschwanzes *Papilio machaon*
(mit freundlicher Genehmigung von Walter Schön)

2.1.1 Proteomanalytik

Das Proteom stellt einen einzigartigen, hochsensitiven Monitor für komplexe metabolische und regulatorische Zusammenhänge dar.^[13] Die Proteomanalytik erfolgt als subtraktiver Ansatz, indem zwei oder mehr wohldefinierte Zustände miteinander verglichen werden. Unterschiede in den Proteinmustern verschiedener Zustände (z. B. vor und nach Wirkstoffgabe, gesunde und pathologische Zustände) werden beobachtet und quantitativ ausgewertet.

Die am weitesten verbreitete Technik zur Proteintrennung, Quantifizierung und Identifizierung stellt die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)^[14] in Ver-

bindung mit Proteinfärbung und Massenspektrometrie (MS) ausgeschnittener und verdauter Proteinspots dar. 2D-PAGE erlaubt die simultane Auftrennung von mehr als 5000 Proteinen (abhängig von Gelgröße und pH-Gradient), die entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte und dem Molekulargewicht separiert werden.^[15] Die Proteine werden dabei zunächst in der ersten Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach ihrer Ladung und anschließend in der zweiten Dimension in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrer Masse aufgetrennt. Die Bindung von SDS an die Proteine führt zu deren Entfaltung (Denaturierung), des weiteren maskiert die negative Ladung der SDS-Moleküle die eigentliche Ladung der Proteine, so dass SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse und eine einheitliche, stabähnliche Form haben.

Im Ergebnis erhält man nach Anfärben der Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau, Silber oder Fluoreszenzfarbstoffen ein zweidimensionales Muster von *spots*, deren Positionen charakteristisch für das jeweilige Protein sind (Abbildung 2.2).

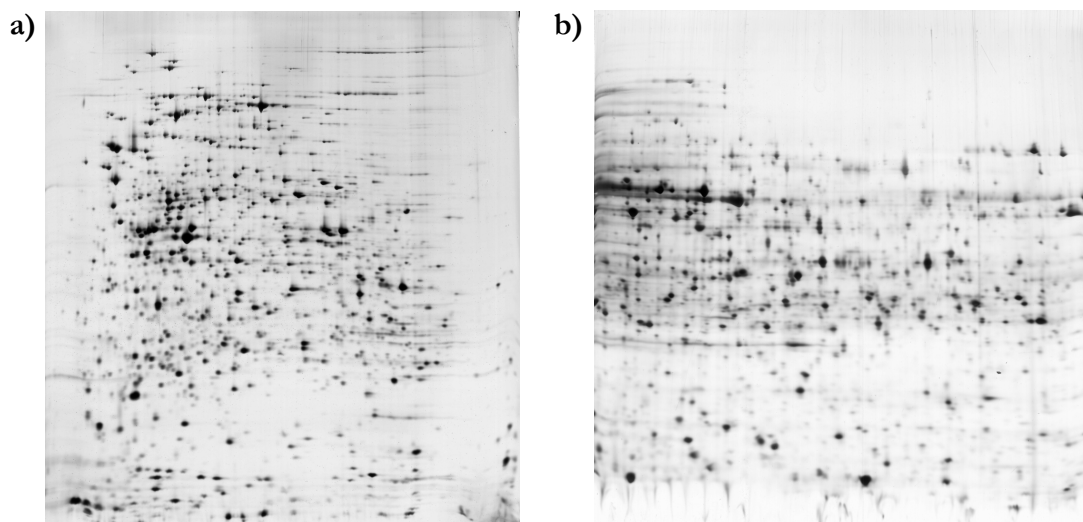


Abbildung 2.2: 2D-PAGE von *Escherichia coli*, a) IEF pH 4 -10,^[16] b) IEF pH 5-6^[17]
(SWISS-2DPAGE database)

Allerdings haben konventionelle Färbemethoden einige Nachteile: zum einen erfolgt das Anfärben nicht selektiv und die Ergebnisse sind schwer reproduzierbar. Proteine werden unterschiedlich und nicht vorhersagbar intensiv gefärbt, deswegen sind sowohl die Quantifizierung als auch der Vergleich unterschiedlich gefärbter Gele problematisch. Des weiteren

liegen bei der 2D-Gelelektrophorese aufgrund ungenügend hoher Auflösung oft mehrere Proteine nah beieinander, wodurch schwach exprimierte Proteine überdeckt werden können. Alternativ ist die kovalente Verknüpfung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen vor der Elektrophorese möglich. Allerdings erfolgt die Markierung unspezifisch, eine einheitliche Markierung ist daher schwierig zu realisieren und eine absolute Quantifizierung problematisch. Während extensive Markierung Fluoreszenzlöschung und Löslichkeitsprobleme zur Folge haben kann, ist im Fall unvollständiger Markierung (*minimal labeling*) ein „*Spotsplitting*“ wahrscheinlich, da der Farbstoff zumeist das Laufverhalten des Proteins beeinflusst.^[13,18]

Im Allgemeinen wird die 2D-Analyse von zwei oder mehr Proteomen zwecks Bestimmung unterschiedlich exprimierter Proteine durchgeführt, indem jede Proteinprobe auf einem separaten Gel getrennt und angefärbt wird. Die verschiedenen Gele werden anschließend mit Hilfe von computerunterstützten Bildauswertungsprogrammen verglichen; da aber oftmals keine perfekte Überlagerung realisiert werden kann, bleibt die Bildauswertung eine zeitraubende Angelegenheit. Dieses Problem kann durch die von Ünlü *et al.* entwickelte Technik der differentiellen Gelelektrophorese (*difference gel electrophoresis*, DIGE) vermieden werden.^[19] Zwei zu verschiedenen Proteomzuständen gehörige Proteinproben werden jeweils mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die sich in Größe und Ladung entsprechen, in ihren spektralen Eigenschaften (Anregungs- und Emissionswellenlänge) aber unterscheiden. Das erlaubt die Auftrennung (*Co-Separation*) der Proben in demselben Gel und stellt sicher, dass alle Proben die erste und zweite Dimension der Elektrophorese unter exakt den gleichen Bedingungen durchlaufen. Auf diese Weise werden experimentelle Abweichungen limitiert und eine genaue Übereinstimmung sichergestellt.

Durch Anregung mit der jeweils passenden Wellenlänge können dann die verschiedenen Proben einzeln visualisiert werden, während Unterschiede im Expressionsniveau einzelner Proteine der verschiedenen Proteome nach Überlagerung der Einzelbilder sichtbar werden. Die Einführung eines weiteren komplementären Farbstoffs macht sogar den Vergleich dreier Proben in einem Gel möglich. Dies erlaubt eine genauere Auswertung der Expressionsunterschiede in mehreren Gelen: eine Referenzprobe wird mit diesem dritten Farbstoff markiert und jeweils als interner Standard in den Gelen verwendet.^[20]

Obwohl die Einführung von Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPGs) für die erste Dimension die Leistungsfähigkeit hinsichtlich früherer Mängel (wie Reproduzierbarkeit, Auflösungsvermögen, Trennung stark saurer/basischer Proteine und Probenauftragskapazität) verbesserte,^[21] stößt die 2D-Gelelektrophorese in Hinblick auf einige wichtige Proteinklassen (darunter membranständige bzw. schwach exprimierte Proteine) noch immer an ihre Grenzen.^[22,23]

Eine Alternative zu den auf Gelelektrophorese basierenden Strategien stellen gelfreie Methoden wie z. B. MudPIT (*multidimensional protein identification technology*) oder ICAT (*isotope-coded affinity tagging*) dar.

MudPIT ermöglicht die Trennung und Identifizierung komplexer Protein- und Peptidgemische durch zwei- (oder mehr-) dimensionale Flüssigchromatographie (2D-LC), gefolgt von MS/MS. Die Proteine werden von einer Protease verdaut und das entstehende Peptidgemisch wird auf eine starke Kationenaustauschersäule aufgebracht (1. Dimension). Die Peptide werden durch steigende Salzkonzentration sukzessiv auf eine Umkehrphasensäule (*reversed phase*, RP) eluiert, wo sie in Abhängigkeit von ihrer Hydrophobizität getrennt werden (2. Dimension). Die Peptidfraktionen werden direkt in das MS/MS eingespeist, die Identifizierung erfolgt durch Vergleich der ermittelten Peptidsequenzen mit Datenbanken.^[24-26]

Die ICAT-Technik basiert auf der Markierung gleicher Proteine oder Peptide aus verschiedenen Proteomen mit *Tags*, die leichte oder schwere Isotope aufweisen. Die *Tags* beinhalten eine thiol-spezifische reaktive Iodacetylgruppe, eine Biotineinheit und im Fall der schweren Variante mehrere schwere Isotope wie Deuterium, ¹³C oder ¹⁵N; auf diese Weise erhält man chemisch identische, aber unterschiedliche schwere Moleküle. Die leicht bzw. schwer markierten Proteomproben werden vereint, verdaut und mittels Avidin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dieser Schritt reduziert die Komplexität etwa um den Faktor 10,^[27] da nur cysteininhaltige Peptide analysiert werden, und vereinfacht die Trennung. Die markierten Peptide werden mittels (multidimensionaler) LC aufgetrennt und die simultan eluierten korrespondierenden leichten und schweren Peptide werden per MS untersucht. Durch Vergleich der Signalintensitäten der Peptidpaare ist eine relative Quantifizierung möglich. Die Identifizierung erfolgt durch MS/MS und Datenbankrecherche.^[27-29]

Bei der eng verwandten *cleavable* ICAT-Technik (cICAT) enthalten die *Tags* zusätzlich eine Spaltstelle. Die von Zhou *et al.* beschriebene festphasenbasierten Variante verwendet *Tags*, die über einen photospaltbaren Linker auf Glasperlen immobilisiert wurden.^[30] Cysteinhaltige Peptide werden somit durch die Markierungsreaktion an der festen Phase immobilisiert und können leicht aus dem Gemisch isoliert werden. Die anschließende photoinduzierte Spaltung des Linkers setzt die Peptide in isotopenmarkierter Form wieder frei. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz kommerziell erhältlicher ICAT-Reagenzien, die Biotin und einen säurelabilen Linker enthalten.^[31] Dieser erlaubt im Anschluss an die ICAT-Markierung und Avidinaffinitätsaufreinigung der Peptide das Entfernen der Biotineinheit und verbessert so die Qualität von CID (*collision induced dissociation*) - MS Spektren.^[32]

Der Nachteil der (c)ICAT-Techniken besteht darin, dass nur cysteinhaltige Proteine und Peptide analysiert werden können. Dadurch wird die Information über die Proteinsequenz erheblich eingeschränkt. Des weiteren eignet sich (c)ICAT nicht zur Untersuchung posttranslationaler Modifikationen (PTM), da die Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptidfragment sowohl ein Cystein als auch eine posttranslationale Modifikation aufweist, relativ gering ist.

Während die bisher beschriebenen Strategien der Isotopenmarkierung lediglich eine relative Quantifizierung erlauben, lässt sich das Prinzip auch zur absoluten Quantifizierung einsetzen. Die von Gerber *et al.* entwickelte AQUA-Technik (*absolute quantification*) benutzt isotopenmarkierte synthetische Analoga (sogenannte AQUA-Peptide) der nativen Peptide, die bei der Proteolyse der Zielproteine entstehen, als internen Standard für die MS/MS-Analyse.^[33] Durch Vergleich der Intensität des von einer bekannten Menge AQUA-Peptids hervorgerufenen Signals mit dem Signal des korrespondierenden nativen Peptids ist eine Quantifizierung des letzteren möglich.

Unlängst wurde von Ross *et al.* mit iTRAQ (*isotope tagging for relative and absolute protein quantification*; Applied Biosystems) ein Multiplex-Verfahren entwickelt.^[34] Verschiedene Proteomproben werden enzymatisch verdaut und die primären Aminogruppen der generierten Peptide (N-Terminus oder Lysin) werden chemisch mit isobaren *Tags* verknüpft. Als ‚isobar‘ werden Atome bezeichnet, die trotz unterschiedlicher Ordnungszahl das gleiche Atomgewicht haben; in diesem Zusammenhang handelt es sich um Moleküle, die bei unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung das gleiche Molekulargewicht auf-

weisen. Als *Tags* dienen isotopenmarkierte 2-(4-Methylpiperazin-1-yl)acetylreste ($C_7H_{14}N_2O \rightarrow {}^{12}C_5{}^{13}C_2H_{14}N_2{}^{18}O$ bzw. ${}^{12}C_4{}^{13}C_3H_{14}{}^{14}N{}^{15}N{}^{18}O$).

Anschließend werden die verschiedenen Peptidgemische vereint und mittels MS analysiert. Durch die isobaren *Tags* erscheint im Massenspektrum für korrespondierende Peptide aus den verschiedenen Proteomproben jeweils nur ein Signal. Wird nun eine bestimmte Ionensorte (d. h. das entsprechende Gemisch korrespondierender, isobar markierter Peptide) Fragmentierungsbedingungen (CID, MS/MS) unterworfen, setzen die *Tags* 4-Methyl-1-methylenpiperazinium-Ionen frei, welche sich aufgrund der unterschiedlichen Isotopenzusammensetzung um je eine Masseneinheit unterscheiden ($MW({}^{12}C_5{}^{13}CH_{13}N_2) = 114$ g/mol; $MW({}^{12}C_4{}^{13}C_2H_{13}N_2) = 115$ g/mol; $MW({}^{12}C_4{}^{13}C_2H_{13}{}^{14}N{}^{15}N) = 116$ g/mol; $MW({}^{12}C_3{}^{13}C_3H_{13}{}^{14}N{}^{15}N) = 117$ g/mol).

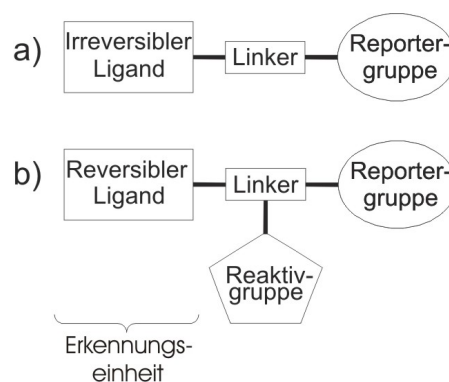
Durch Vergleich der Signalintensitäten dieser niedermolekularen Reporterionen ist die relative bzw. – in Anwesenheit eines internen Peptidstandards – absolute Quantifizierung von bis zu vier Proben in einem Experiment möglich. Da jedes Peptid markiert wird, ermöglicht die Methode das Aufspüren von PTM. Ein Nachteil ist der durch die Aufnahme der MS/MS-Spektren größere Zeitaufwand.

Alle bisher erwähnten Strategien haben als gemeinsames Merkmal, dass sie Veränderungen in der Proteinmenge messen (*abundance-based proteomics* oder auch „Expressionsproteomik“), aber keine Aussage über die Funktion oder Aktivität der Enzyme zulassen. Da Änderungen des Phänotyps zwar zum einen durch veränderte Proteinmengen hervorgerufen werden, zum anderen jedoch auch durch den Anteil an aktivem Protein bedingt sein können, wurden andere Untersuchungsmethoden entwickelt, die als „Funktionelle Proteomik“ bezeichnet werden.

2.1.2 Funktionelle Proteomik

Der Grundgedanke der funktionellen Proteomik beinhaltet die Verwendung kleiner Moleküle zur kovalenten Markierung des aktiven Zentrums von Enzymen. Der Einsatz selektiver Moleküle, die in ihrer Affinität gegenüber verschiedenen Zielenzymen angepasst werden können, ermöglicht die Bildung von Subproteomen (Proteomteilmengen). Indem nur diese der weiteren Aufreinigung, Verdauung und MS-Analyse zugeführt werden, wird die Datenmenge, die prozessiert werden muss, verringert. Durch gezielte Markierung können auch schwach exprimierte Proteine einfach analysiert werden. Da häufig nur aktive Enzyme detektiert werden, während inaktive Proformen und inhibitorgebundene Enzyme unmarkiert bleiben, ist eine direkte Korrelation von Effektorproteinen mit spezifischen biologischen Vorgängen möglich.^[35-40] Entsprechend wird anstelle von „funktioneller Proteomik“ häufig synonym der Begriff „aktivitätsbasierte Proteomik“ (*activity-based proteomics* bzw. *activity-based protein profiling*, ABPP) verwendet.

Die Werkzeuge der funktionellen Proteomik, die so genannten aktivitätsbasierten Sonden (*activity-based probes*, ABP), bestehen aus einer Erkennungseinheit (Ligand) und zumindest einer Reportergruppe (zur Detektion und/oder Aufreinigung),^[41] welche über einen Linker verbunden sind (Schema 2.1). Oftmals fungiert die Erkennungseinheit gleichzeitig als Reaktivgruppe und bildet die kovalente Bindung zum aktiven Zentrum aus, z. B. im Fall irreversibler Inhibitoren oder bei den so genannten Suizid-Substraten, die im Verlauf der Enzymreaktion in ein reaktives Intermediat überführt werden.



Schema 2.1: Aufbau einer Sonde für die funktionelle Proteomik mit a) irreversibel und b) reversibel bindenden Liganden (Inhibitoren)

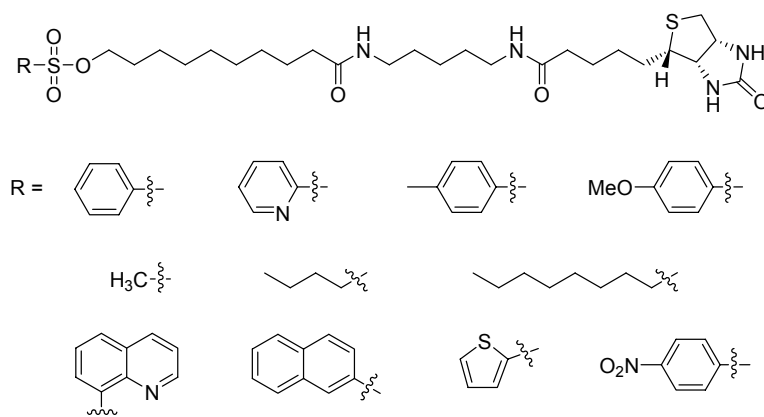
Im Fall reversibler Inhibitoren als Erkennungseinheit ist dagegen eine zusätzliche Reaktivgruppe (z. B. Photoaffinitätsmarker) zur Ausbildung der kovalenten Bindung erforderlich. Weitere Erkennungseinheiten können dagegen z. B. die Wechselwirkung eher unspezifischer Elektrophile mit den gewünschten Enzymgruppen unterstützen.

Zwei verschiedene Strategien für den Einsatz solcher aktivitätsbasierter Sonden wurden bisher entwickelt:

- (1) ein ungerichteter (kombinatorischer) Ansatz, bei dem Elektrophil-Bibliotheken in Hinsicht auf die spezifische Markierung von (neuen) Zielproteinen in komplexen Proteomen untersucht werden, und
- (2) ein gerichteter Ansatz, der auf bekannte Inhibitoren zurückgreift, um den funktionellen Status spezifischer Enzymklassen festzustellen.

2.1.2.1 Ungerichtete ABP

Da nicht für jede Enzym-Klasse ein Inhibitor oder Ligand bekannt ist, wurde von Adam *et al.* das Konzept der ungerichteten ABP eingeführt.^[42] Ausgehend von der Annahme, dass ein mäßig reaktives Kohlenstoffelektrophil bevorzugt im aktiven Zentrum von Enzymen reagieren sollte, da dieses eine erhöhte Dichte an nukleophilen Resten aufweist, wurde eine kleine kombinatorische Sulfonyl-Bibliothek synthetisiert. Neben der Sulfonyl-Reaktivgruppe wiesen die Sonden eine variable Alkyl-/Aryl-Erkennungseinheit auf, um die aktiven Zentren verschiedener Enzyme anzusprechen, sowie einen aliphatischen Linker und Biotin als Reportergruppe (Schema 2.2).



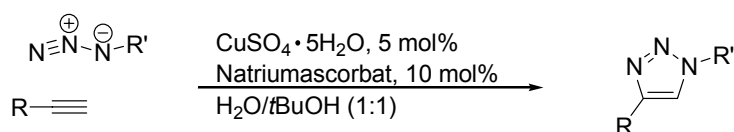
Schema 2.2: Ungerichtete Sulfonyl ABP.

Jeder Sulfonester wurde jeweils mit einer nativen und einer hitzedenaturierten Probe eines Proteoms umgesetzt. Analyse mittels SDS-PAGE und Avidin-*Blotting* offenbarte mehrere Proteine, deren Markierung durch Hitze beeinflussbar und somit spezifisch verlief. Die Sulfonester zeigten gegenüber einzelnen Proteinen beträchtliche Reaktivitätsunterschiede. Dies und die Tatsache, dass ein Protein (eine Aldehyddehydrogenase) von einigen Sulfonestern irreversibel inhibiert wurde, stützt die Annahme, dass die Markierung im bzw. nah dem aktiven Zentrum stattfindet. Durch Sulfonester-sonden mit Rhodamin anstelle von Biotin (um die Sensitivität zu erhöhen) konnte die Markierung von wenigstens sechs mechanistisch verschiedenen Enzymklassen belegt werden^[43]

Keines der durch die Sulfonesterbibliothek gefundenen Proteine gehörte zu einer Zielgruppe früherer Untersuchungen; dies unterstreicht den Nutzen chemisch und strukturell diverser Sondenbibliotheken für die Identifizierung neuer Proteinmarker.^[44]

In vivo Anwendungen der funktionellen Proteomik stellen aufgrund der sperrigen Reportergruppen der ABP (Molekulargewicht > 700-1000 Da) eine technische Herausforderung dar. Die physikalischen Eigenschaften der Reportergruppen können sowohl die Membrandurchgängigkeit der Sonden als auch deren Bindungsaffinität beeinflussen und somit die Zellaufnahme und Verteilung beeinträchtigen. Im Allgemeinen wird angenommen, dass kleine ungeladene Moleküle besser in intrazelluläre und extravaskuläre Bereiche gelangen. Aus diesem Grund wäre es vorteilhaft, zuerst die Proteine *in vivo* mit einer „unverdächtigen“ Sonde zu markieren, um in einem zweiten Schritt dann die Reportergruppe anzubringen. Folgt man diesen Überlegungen, würde die Probe lediglich eine (chemisch reaktive) funktionelle Gruppe benötigen, die sich unter physiologischen Bedingungen inert verhält, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt mit dem richtigen Reaktionspartner (dem Reporter) eine kovalente Bindung ausbildet.

Eine solche Bioorthogonalität weisen z. B. Azidogruppen auf, welche selektiv mit Phosphanen (Staudinger-Bertozzi-Ligation)^[45,46] oder aktivierten Alkinen^[47,48] modifiziert werden können.^[49] Alternativ können auch endständige Alkine mit Aziden zu 1,2,3-Triazolen ligiert werden. Dies geschieht in einer von Sharpless und Mitarbeitern entwickelten, Cu(I)-katalysierten schrittweisen Reaktion, die analog zu Huisgens 1,3-dipolarer Cycloaddition^[50] verläuft (sogenannte „Click-Chemie“).^[51-54]



Schema 2.3: “Click-Chemie”, Kupfer(I)-katalysierte Synthese von 1,2,3-Triazolen.

Durch die Synthese eines PhenylsulfonesterazidDerivates ($\text{PhSO}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{N}_3$, PS- N_3) und eines Rhodamin-Alkin-Tags ($\text{RH}-\equiv$) schufen Speers *et al.* ein Paar biologisch inerter Ligationspartner.^[55] Es konnte gezeigt werden, dass Zell- bzw. Gewebehomogenisate von mit PS- N_3 behandelten Zellen/Mäusen nach Umsetzung mit $\text{Rh}-\equiv$ starke Fluoreszenz zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die Azid-Alkin-Cycloaddition tatsächlich für eine Markierung *in vivo* geeignet ist. Außerdem erlaubt die „Click-Chemie“ eine einfache Anpassung von Fluorophor oder *affinity tag* an die Erfordernisse, da jede Alkin-modifizierte Reportergruppe einsetzbar ist.^[56]

Ovaa *et al.* gelang das gerichtete *in vivo*-Labeling aktiver Proteasome mit Vinylsulfonen, indem sie eine modifizierte Staudinger-Ligation für die Verknüpfung eines gerichteten, Azid-derivatisierten Inhibitors mit einer phosphanhaltigen Reportergruppe benutzten.^[57]

2.1.2.2 Gerichtete ABP

Ein wichtiges Ziel in der funktionellen Proteomik ist die Entwicklung molekularer Werkzeuge, die an viele bzw. alle Vertreter einer Proteinklasse in einer familienspezifischen Weise binden und somit deren Markierung mit Reportergruppen oder die selektive Anreicherung mittels Affinitätschromatographie erlauben.

In Abhängigkeit von der Erkennungseinheit (Ligand oder Inhibitor) unterscheidet man zwei Untergruppen: gerichtet irreversibel und gerichtet reversibel.

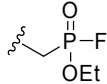
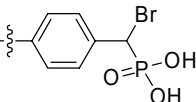
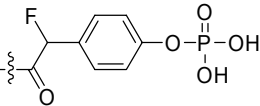
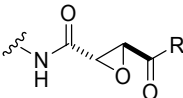
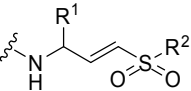
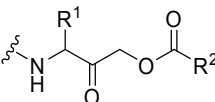
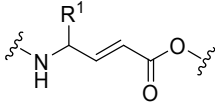
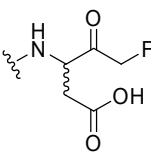
Irreversible Inhibitoren

ABP mit irreversibel bindenden Erkennungseinheiten werden zusätzlich unterteilt in a) reaktive mechanismusbasierte Sonden und b) die so genannten Suizidsubstrate.^[58] Der Unterschied zwischen diesen zwei Untergruppen besteht darin, dass im letzteren Fall das Substrat im Verlauf der Enzymreaktion in ein hochreaktives Zwischenprodukt umgewan-

delt wird, welches eine kovalente Bindung zum aktiven Zentrum des Enzyms ausbildet. Im ersten Fall weist bereits die Sonde selbst eine hohe Reaktivität, z. B. gegenüber Nukleophilen, auf. In der Regel ist die Fähigkeit der Sonde, die entsprechende Enzymfamilie zu binden, eng mit der Enzymaktivität verknüpft.

Repräsentative Beispiele für Proteinfamilien und die entsprechenden, auf irreversiblen Inhibitoren basierenden gerichteten Sonden sind in (Tabelle 2.1) zusammengestellt.

Tabelle 2.1: Gerichtete irreversible Inhibitoren

Enzymfamilie	Reaktivgruppe
<u>Serinhydrolasen:</u>	
	Fluorophosponat ^[35,36,59]
<u>Tyrosinphosphatasen:</u>	
	α -Brom-benzylphosphonat ^[60]
	<i>p</i> -Fluoralkyl-phenylphosphat ^[61,62]
<u>Cysteinproteasen:</u>	
	Epoxy succinyl ^[39,40,63,64]
	Vinylsulfon ^[57,65-67]
	Acyloxymethylketon ^[68-70]
	Acrylat ^[71]
	Fluormethylketon ^[72]

Fluorophosphonate inhibieren Serinproteasen/Serinhydrolasen irreversibel, indem sie den Serinrest im aktiven Zentrum dieser Enzyme phosphorylieren. Da die Fluorophosphonatsonden nur mit diesem katalytisch aktiven Serinrest reagieren, werden lediglich aktive Enzyme angesprochen, jedoch keine Proformen oder inhibierten Enzyme.^[35,36,59]

In ähnlicher Weise werden Cysteinproteasen durch Epoxysuccinyle, Vinylsulfone, Acyloxymethylketone, Acrylate (insbesondere vinyloge Aminosäuren) und Fluormethylketone „erkannt“.^[39,40,57,63-73] Alle erwähnten Verbindungen sind potente Elektrophile, die auch unter physiologischen Bedingungen glatt mit der nukleophilen Thiolfunktion des Cysteins im aktiven Zentrum reagieren.

Die Epoxysuccinyleinheit, die sich von einem natürlich vorkommenden generellen Cysteinprotease-Inhibitor ableitet (**E-64**, Abbildung 2.3), dient häufig als Ausgangspunkt für die Synthese von ABP für die Papainunterfamilie der Cysteinproteasen. So stellt die Verbindung **DCG-04** eine generelle Sonde für lysosomale Cathepsine dar.^[39]

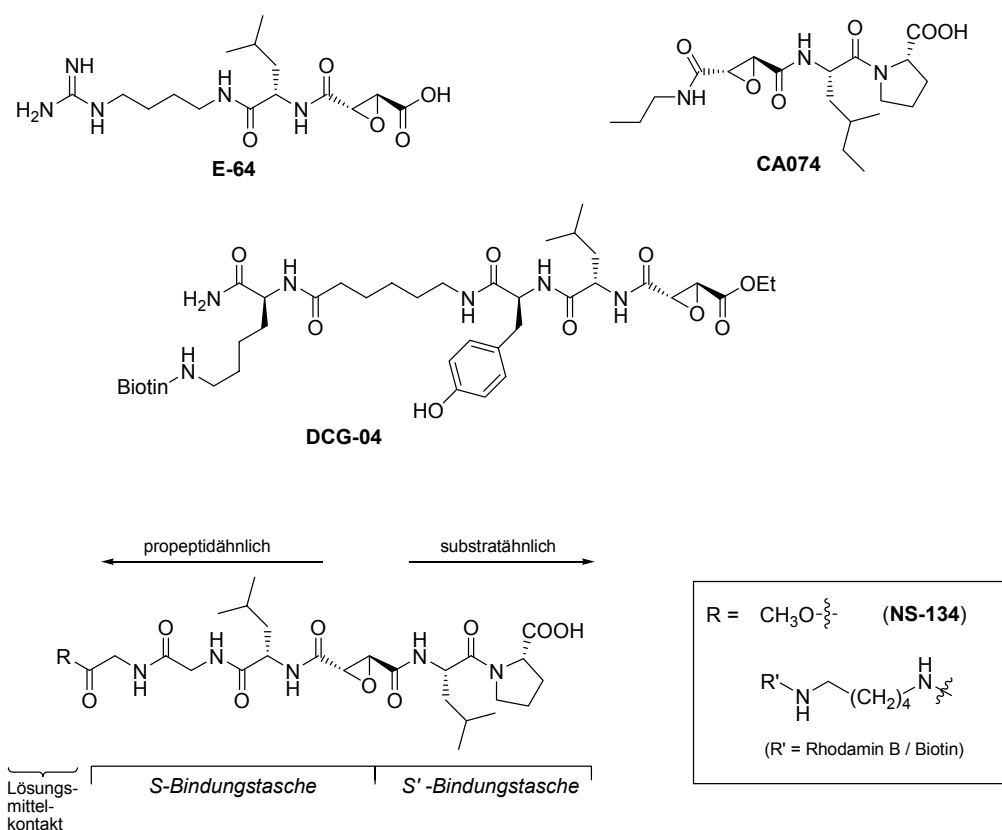
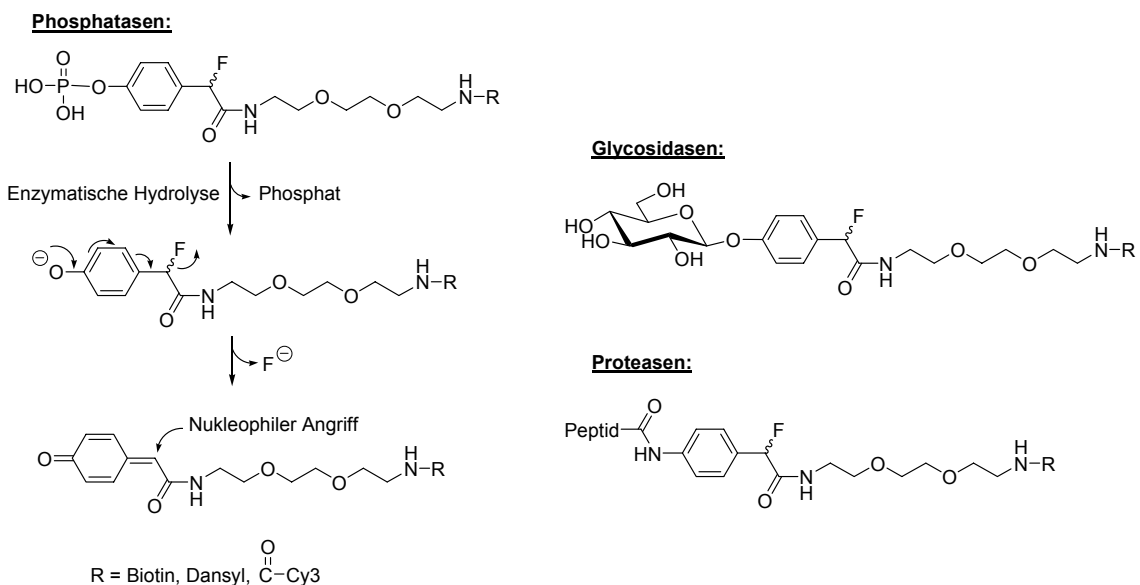


Abbildung 2.3: Epoxysuccinylbasierte ABP, die sich von den natürlich vorkommenden Proteaseinhibitoren E-64 und CA074 ableiten.

Dagegen wurde von Schaschke *et al.* ein Konzept entwickelt, welches auf die spezifische Erkennung einzelner Mitglieder der Cathepsinunterfamilie abzielt.^[64] Kombination der charakteristischen strukturellen und bindungstechnischen Eigenschaften der Inhibitoren **E-64** und **CA074** ergab den hoch wirksamen und selektiven Inhibitor **NS-134**, dessen Affinität zu Cathepsin B durch eine Röntgenstruktur zusätzlich belegt werden konnte (Abbildung 2.3).^[74] Durch Hinzufügen einer Reportergruppe lässt sich der chimäre Inhibitor für ABPP einsetzen. Der neuartige Aspekt dieses Ansatzes ist die zweigleisige Herangehensweise: sowohl der substratähnliche Teil der Probe, der auf die *S'*-Bindungstasche abzielt, als auch der propeptidähnliche Teil, der auf die *S*-Bindungstasche ausgerichtet ist, können zwecks selektiver Adressierung spezifischer Cathepsine modifiziert werden.^[64]

Für Proteintyrosinphosphatasen existieren bis jetzt zwei verschiedene ABP-Varianten. Kumar *et al.* entwickelten eine Sonde auf der Basis von α -Brombenzylphosphonat, welches mutmaßlich mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum reagiert.^[60]

Demgegenüber wurden auch ABP dargestellt, die sich von verschiedenen Phosphatase-Suizidinhhibitoren ableiten, darunter Sonden, die ein Tyrosinphosphat-Mimetikum aufweisen. Ein solches entsteht z. B. wenn die Methyleneinheit des Tyrosinphosphats entfernt sowie die Aminogruppe durch die Abgangsgruppe Fluor ersetzt wird (Schema 2.4).^[60-62]



Schema 2.4: Auf Suizidsubstraten basierende ABP

Der zentrale Schritt im Wirkmechanismus der Phosphatase ist der nukleophile Angriff am Phosphatester durch ein Cystein-Thiol im aktiven Zentrum. Im Fall des Mimetikums folgt der Dephosphorylierung (enzymatische Hydrolyse) die 1,6-Eliminierung von Fluorid, es entsteht ein Chinonmethid, welches infolge des nukleophilen Angriffs durch das Thiol die kovalente Bindung ausbildet (Schema 2.4).

Ein Nachteil dieser ABP liegt darin, dass die Sonden in einem hohen Überschuss eingesetzt werden müssen. Außerdem verläuft die Reaktion des Chinonmethids mit Nukleophilen eher langsam, was die Diffusion der reaktiven Spezies aus dem aktiven Zentrum und damit unspezifische Markierung zur Folge haben kann.^[75]

Ein Glycosidanalogen des oben besprochenen Tyrosinphosphatmimetikums wirkt als Suizidsubstrat für Glykosidasen (Schema 2.4).^[76]

Durch ein intermediäres Chinoniminmethid, das aus einem entsprechend modifizierten Peptid entsteht, können Proteasen adressiert werden (Schema 2.4). Die Spezifität der Proteasen für ihr Substrat wird hauptsächlich durch die Aminosäureseitenketten in P¹- und/oder P²-Position des Substrats bestimmt, daher lässt sich durch Anpassung des Peptidylrests der ABP die Zielprotease variieren.^[77]

Reversible Inhibitoren/Liganden

Viele Enzyme haben keine bekannten, irreversibel bindenden Inhibitoren oder Liganden; dies gilt insbesondere für jene Enzyme, die keine nukleophilen Reste im aktiven Zentrum aufweisen. Dasselbe gilt im Fall nicht katalytisch wirkender Proteine, wo irreversibel bindende Liganden kaum bekannt sind.

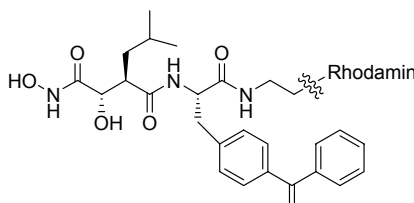
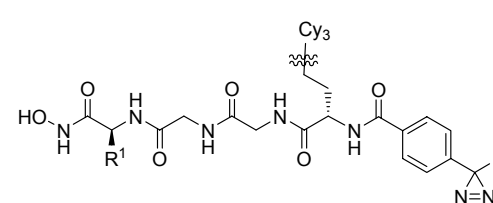
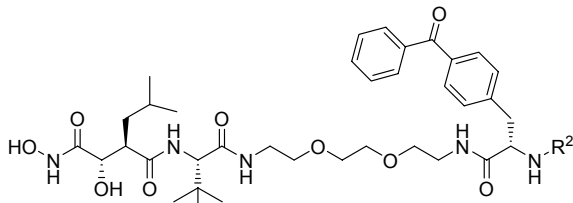
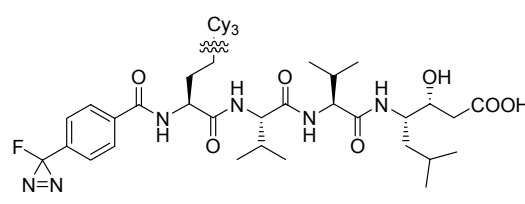
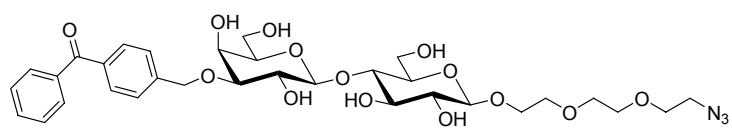
Durch Synthese neuer, maßgeschneiderter reaktiver Moleküle, die sich von reversiblen Inhibitoren der fraglichen Proteinfamilien ableiten, kann diesem Mangel Abhilfe geschaffen werden. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen ist für die 2D-Gelelektrophorese eine kovalente Bindung zwischen ABP und Zielmolekül unentbehrlich. Die im Fall der reversiblen Inhibitoren/Liganden notwendige, zusätzliche (chemische) Reaktion zur Ausbildung dieser kovalenten Bindung wird in der Regel photochemisch herbeigeführt (siehe Kapitel 2.5). Das Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung wird z. B. in der Biochemie häufig eingesetzt, um Ligandenbindungsstellen zu lokalisieren.^[78]

Obwohl falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können, ist diese Methode in der Lage, die Zahl der zu analysierenden Proteine in einem gegebenen Proteom zu verringern. Durch Inkubation eines Proteoms mit solch einer photoreaktiven Sonde und nachfolgendes *Photocrosslinking* werden nur die Proteine, welche die Erkennungseinheit der Sonde binden können, markiert. Deshalb lassen sich einzelne Proteomsubsets auch in komplexen Proteingemischen mit hoher Sensitivität detektieren.

Erste Versuche mit einem entsprechend modifizierten reversiblen Inhibitor wurden im Jahr 2000 von Li *et al.* durchgeführt.^[79] Indem sie einen mit Benzophenon ausgestatteten, reversiblen γ -Sekretase-Inhibitor verwendeten, gelang es ihnen, innerhalb des γ -Sekretasekomplexes das Protein zu identifizieren, welches das aktive Zentrum trägt.

Seitdem wurde diese Strategie für das *Activity-profiling* verschiedener Enzymklassen weiterentwickelt. Sowohl Jenssen^[80] als auch Saghalian *et al.*^[58] und Chan *et al.*^[81] veröffentlichten im Jahr 2004 vergleichbare Strategien für das *Activity-profiling* von Metalloproteasen: Zink-chelatisierende Metalloproteaseinhibitoren vom Hydroxamat-Typ wurden mit verschiedenen Reportergruppen und einer Photoreaktivgruppe ausgestattet (Benzophenon in den ersten beiden Veröffentlichungen, Diazirin im letzteren Fall) (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: ABP auf Basis reversibler Inhibitoren/Liganden

Enzyme	Struktur der Sonde (Literatur)
<u>Metalloproteasen</u>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>(Saghatelian <i>et al.</i>, [38])</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(Chan <i>et al.</i>, [81])</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>(Jenssen, [80])</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px; width: fit-content; margin-left: auto; margin-right: auto;"> <p>R¹ = Aminosäureseitenkette R² = Carboxyfluorescein, Dansyl, 7-Diethylamino-3-carboxylsäure</p> </div>
<u>Aspartatproteasen</u>	<div style="text-align: center;">  <p>(Chattopadhyaya <i>et al.</i>, [82])</p> </div>
<u>Galectine</u>	<div style="text-align: center;">  <p>(Ballell <i>et al.</i>, [83])</p> </div>

Von Chattopadhyaya *et al.* wurde das Konzept erst kürzlich auf Aspartatproteasen ausgedehnt (Tabelle 2.2).^[82] Wie Ballell *et al.* zeigen konnten, ist auch die Markierung kohlenhydratbindender Proteine mit diesem Verfahren möglich.^[83] Die von ihnen entwickelte Sonde für Lectine besteht aus einem Disaccharid als Ligand, Benzophenon als Photoreaktivgruppe und einem Azid, das als Anknüpfungspunkt für eine Reportergruppe (in diesem Fall ein Alkinderivat von Rhodamin) mittels „Click-Chemie“ dient (Tabelle 2.2). Ein potentieller Nachteil der Photoreaktivgruppen besteht darin, dass sie die kovalente Bindung nicht notwendigerweise im aktiven Zentrum ausbilden; daher ist eine Identifizierung katalytisch aktiver Reste meist nicht möglich.

Reversible Inhibitoren ermöglichen außerdem die Erzeugung von Enzym-Subproteomen mittels Inhibitor-Affinitätschromatographie (IAC). Zu diesem Zweck werden die (je nach Bedarf entsprechend derivatisierten) Inhibitoren auf einer Affinitätschromatographiesäule immobilisiert, über die dann das Proteingemisch geleitet wird. Die Proteine, die mit den immobilisierten Molekülen wechselwirken, werden zurückgehalten und angereichert und können nach einem Waschschrift unter geeigneten Bedingungen eluiert werden.

Die IAC wurde bereits erfolgreich zur Erzeugung von Metalloprotease-Subproteomen^[84] bzw. Kinase-Subproteomen^[85-89] eingesetzt. Die Elutionsbedingungen für die IAC können hervorragend mittels Oberflächenplasmonresonanz optimiert werden.^[90]

2.1.2.3 Reportergruppen/*Affinity tags*

Reportergruppen dienen entweder zur schnellen und sensitiven Detektion markierter Proteine oder zur Affinitätsanreicherung vor der anschließenden Identifizierung. Am gebräuchlichsten sind Fluoreszenzfarbstoffe und Radioisotopmarker für die Detektion im Gel, und Biotin sowohl für die Sichtbarmachung im Anschluss an *Western Blotting* als auch für die Affinitätsanreicherung z. B. mit streptavidinbeschichteten Beads.

Da die Reportergruppen dank der Inhibitoren bzw. Liganden spezifisch und in bekannter Stöchiometrie mit den Zielproteinen verknüpft werden, ist – mit Hilfe von Eichkurven – auch eine Quantifizierung möglich. Schätzungsweise ist durch Fluoreszenz-Scanning selbst die Detektion von nur 10^{-17} mol Fluorophosphonat-Rhodamin-markiertem Enzym möglich.^[59]

2.1.2.4 Linker

Die Hauptfunktion einer Linkereinheit in einer ABP ist die Verbindung zwischen Erkennungseinheit und Reportergruppe/*Affinity tag* sowie, falls erforderlich, mit einer zusätzlichen Reaktivgruppe (z. B. einer photoreaktiven Gruppe). Des Weiteren wird durch die Länge der Linkereinheit für ausreichend Raum zwischen Erkennungseinheit und *Tag* gesorgt, sodass sterische Behinderungen bzw. eine Beeinflussung des aktiven Zentrums vermieden werden. Die einfachsten Linker sind langkettige Alkyl- oder Polyethylenglykolverbindungen, die außerdem eine Anpassung der hydrophoben Eigenschaften der ABP

entsprechend den Anforderungen (Membrandurchlässigkeit vs. Löslichkeit in wässrigen Medien) erlauben.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Peptid- bzw. peptidähnlichen Linkern. Diese können eine zusätzliche Selektivität der ABP induzieren, z.B. für bestimmte Proteaseklassen. So reagieren Acyloxymethylketone mit einem Aspartatrest neben der Inhibitoreinheit selektiv mit Caspasen (vgl. Tabelle 2.1).^[68]

Insbesondere bei Vinylsulfonsonden ist ein starker Einfluss des Linkers zu beobachten. So ist die Verbindung **A** (Abbildung 2.4), deren Linker aus Leucin und Homophenylalanin aufgebaut ist, eine Sonde für die Cysteinproteaseunterfamilie der Cathepsine.

Verbindung **B** mit drei Leucinresten markiert dagegen selektiv die katalytischen Untereinheiten des Proteasoms, die einen katalytischen Threoninrest im aktiven Zentrum aufweisen (Abbildung 2.4).^[91]

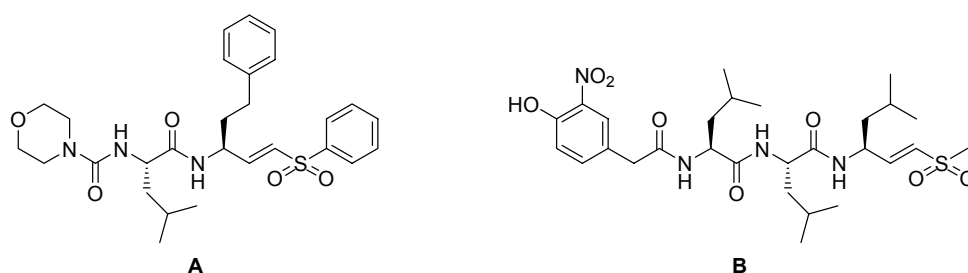


Abbildung 2.4: Vinylsulfonsonden mit verschiedenen Linkern

Die Entwicklung spaltbarer Linker vergleichbar den in der cICAT-Technik gebräuchlichen wird bei Analysemethoden auf Biotinbasis eine wichtige Rolle spielen, da die Elution streptavidin-gebundener biotinylierter Peptide im Anschluss an die Affinitätsanreicherung aufgrund der starken Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung oft problematisch ist.^[30-32]

2.2 Proteinkinasen

Bei den Kinasen handelt es sich um eine zu den Transferasen gehörende Gruppe von Enzymen, die Phosphat-Gruppen von ATP auf andere Substrate übertragen. Proteinkinasen phosphorylieren Enzyme oder andere Proteine und regulieren dadurch deren Aktivität. Dieser Vorgang spielt eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktion, da es sich bei den phosphorylierten Proteinen häufig um Bestandteile von Signalkaskaden handelt. In Eukaryoten findet die Phosphorylierung meist an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenketten der Proteine statt, dementsprechend unterscheidet man Serin/Threonin-Proteinkinasen und Tyrosin-Proteinkinasen. In Prokaryoten findet dagegen hauptsächlich eine Phosphorylierung durch Histidinkinasen statt. Diese unterscheiden sich von den anderen Proteinkinasen insofern, als sie erst einen eigenen Histidinrest phosphorylieren, bevor die Phosphorylgruppe anschließend auf ein Aspartat eines Effektorproteins übertragen wird.

Obwohl die Proteinkinasen sich in Größe, Substratspezifität, Untereinheiten, dem Aktivierungsmechanismus und der subzellulären Lokalisierung unterscheiden, weisen sie alle ein stark konserviertes, homologes katalytisches Zentrum auf.^[92] Aus diesem Grund liefern Erkenntnisse über das aktive Zentrum, die an einem Mitglied der Familie gewonnen werden, auch Informationen über die gesamte Enzymfamilie.

Als Modellkinase hat aufgrund ihres Aufbaus oftmals die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA) gedient. Sie liegt als Heterotetramer aus jeweils zwei katalytischen und regulatorischen Untereinheiten vor (Abbildung 2.5). Die regulatorischen Untereinheiten (R) mit einem Molekulargewicht von 49-54 kDa haben eine hohe Affinität für cAMP, während die katalytischen Untereinheiten (C) mit einem Molekulargewicht von 39-41 kDa Bindungsplätze für Substrat und ATP aufweisen. In Abwesenheit von cAMP liegt der inaktive R_2C_2 -Komplex vor, in welchem die regulatorischen Untereinheiten die katalytischen Zentren blockieren. Die Bindung von je zwei Molekülen cAMP an die regulatorischen Untereinheiten hat die Dissoziation des Komplexes in R_2 ($\cdot 4$ cAMP) und zwei aktive katalytische Untereinheiten zur Folge.^[93-95]

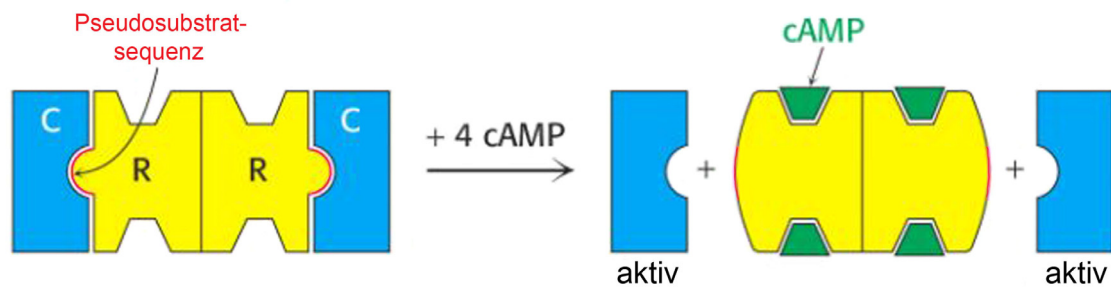


Abbildung 2.5: Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase.^[9]

(C = katalytische Untereinheit, R = regulatorische Untereinheit, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat).

Die cAMP-abhängige Proteinkinase war die erste Proteinkinase, deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde. Insbesondere die Kristallstruktur des binären Komplexes der katalytischen PKA-Untereinheit mit dem hochaffinen Inhibitorpeptid PKI(5-24) als auch später die des ternären Komplexes mit zusätzlichem Adenosin haben signifikant zum Verständnis der Kinasen beigetragen.^[96-98] Ein hervorstechendes Strukturmerkmal der katalytischen Untereinheit ist die Faltung in zwei durch eine tiefe Spalte getrennte Domänen. Die kleinere Domäne bindet MgATP, während die größere Domäne für die Katalyse wichtige Reste sowie die Substratbindestelle aufweist. Die katalytische Reaktion läuft in der Spalte ab. Die Bindung von ATP erfolgt an der Verbindungsstelle der zwei Domänen, die Adeninbase findet dabei Platz in einer hydrophoben Tasche am Boden der Spalte, während das Triphosphat mehr zum Rand hin in einer polaren Umgebung aus mehreren invarianten, geladenen Resten positioniert wird. Das zu phosphorylierende Substrat ragt dagegen nur teilweise in die Spalte und wird eher am Rand gebunden.^[96] An der Bindung des Nukleotids bzw. an der Katalyse sind hochkonservierte Regionen innerhalb des aktiven Zentrums beteiligt, dagegen sind die substratbindenden Bereiche variabler.

Diese Grundstruktur des aktiven Zentrums findet sich bei allen Mitgliedern der Kinasefamilie, die Interaktion mit dem Substrat kann jedoch durch zusätzliche Untereinheiten oder weitere Domänen beeinflusst werden. Dies bedingt die unterschiedlichen Substratspezifitäten innerhalb der Kinasefamilie.^[96,99,100]

2.3 Isochinolinsulfonamide als Proteinkinaseinhibitoren

Seit der ersten gezielten Entwicklung von niedermolekularen Proteinkinaseinhibitoren durch Hidaka *et al.* Anfang der achtziger Jahre^[101] hat sich der Einsatz entsprechender Verbindungen für die Untersuchung von Kinasen bzw. deren Rolle in der Signaltransduktion zu einer weit verbreiteten Methode entwickelt. Das steigende Interesse der pharmazeutischen Industrie an potentiellen (Krebs-)Therapeutika hat entscheidend zur Erforschung und Entwicklung neuer Kinaseinhibitoren beigetragen; mittlerweile existiert ein breites Spektrum von niedermolekularen Kinaseinhibitoren aus diversen Verbindungsklassen. Einige Beispiele für bereits als Medikament zugelassene Krebstherapeutika sind in Abbildung 2.6 wiedergegeben.^[102,103]

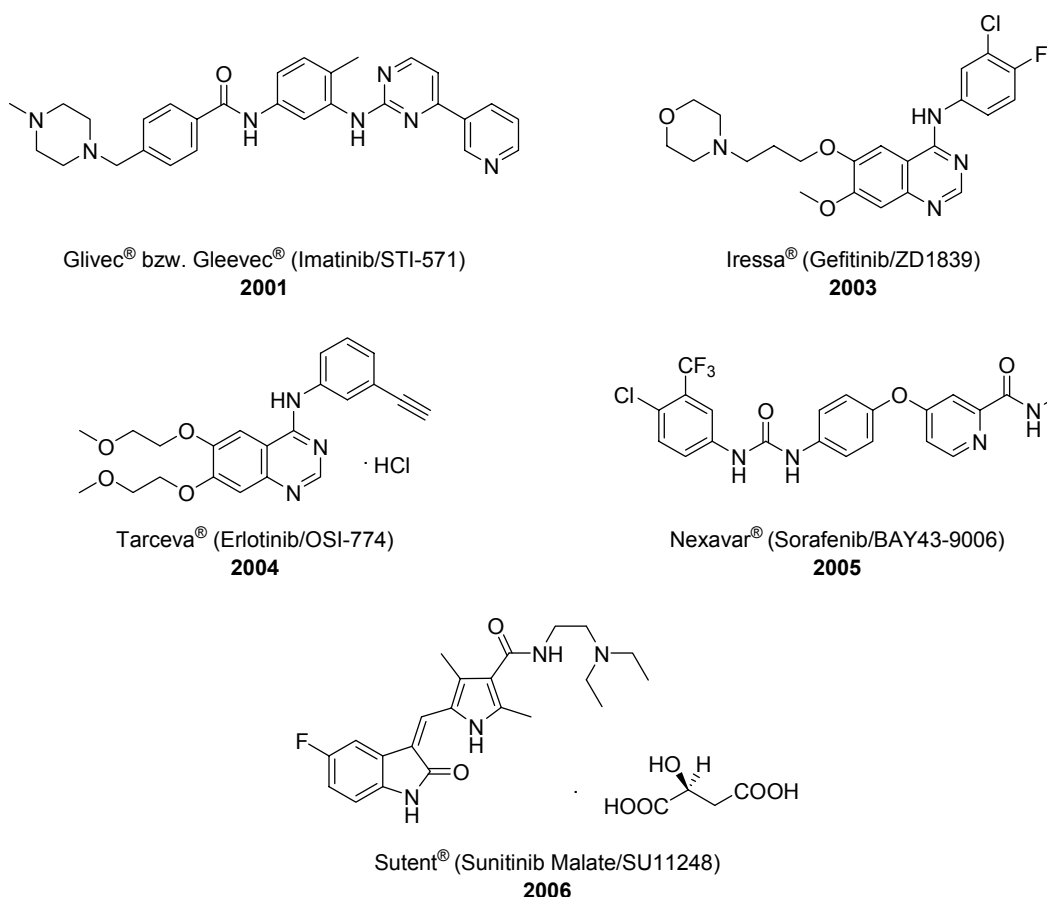


Abbildung 2.6: Als Medikament zugelassene, niedermolekulare Kinaseinhibitoren, angegeben ist jeweils der Handelsname (mit früheren Bezeichnungen) sowie das Jahr der Zulassung^[102,103]

Gleevec[®] war der erste Wirkstoff, der gezielt gegen eine bestimmte Kinase, die Abelson Tyrosinkinase (Abl), zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) entwickelt wurde; die Zulassung durch die *US Food and Drug Association* (FDA) erfolgte im Jahr 2001.^[104] Trotz der gezielten Entwicklung stellte sich jedoch später heraus, dass Gleevec[®] zumindest zwei weitere Tyrosinkinasen (*platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR, und *stem cell factor receptor*, c-Kit) ähnlich gut inhibiert wie Abl (K_i jeweils ~ 14 nM).^[105] Die Anwendungsmöglichkeiten von Gleevec[®] als Inhibitor von PDGFR und c-Kit werden derzeit untersucht.

Iressa[®] inhibiert die Tyrosinkinasedomäne des *epidermal growth factor receptor*, EGFR,^[105] ebenso das strukturell verwandte Tarceva[®]; beide sind zur Behandlung von Lungenkrebs (nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, NSCLC) zugelassen, weitere mögliche Indikationen werden auch hier noch untersucht.

Zur Zielgruppe von Nexavar[®] gehören Serin/Threonin- sowie Rezeptortyrosinkinasen, die am Tumorwachstum und an der Gefäßneubildung (Angiogenese) beteiligt sind; es wird zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom eingesetzt.

Bei Sutent[®] handelt es sich um das erste Medikament, welches von der FDA gleichzeitig für die Behandlung von zwei Krebsarten – fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom sowie eine seltene Form von Magen-/Darmkrebs (gastrointestinale Stromatumoren, GIST) – zugelassen wurde.^[103] Seine Wirkung beruht auf der Inhibierung verschiedener an Tumorwachstum, Angiogenese bzw. Metastasierung beteiligter Rezeptortyrosinkinasen.

Eine Reihe weiterer Wirkstoffe, u. a. gegen Krebs, rheumatische Arthritis oder Netzhauterkrankungen, befindet sich derzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung.^[102]

Im Folgenden soll lediglich auf die Verbindungsklasse der Isochinolinsulfonamide näher eingegangen werden, für einen umfassenden Einblick in die Kinaseinhibitorentwicklung seit den 80er Jahren sei auf die Literatur verwiesen.^[102,104-109]

Die von Hidaka *et al.* entwickelten Isochinolinsulfonamidverbindungen der so genannten H-Serie (Abbildung 2.7) sind kompetitiv in Bezug auf ATP, zellpermeabel und synthetisch gut zugänglich und daher nützliche Werkzeuge für die Untersuchung von Signalübertragungswegen.^[101,110]

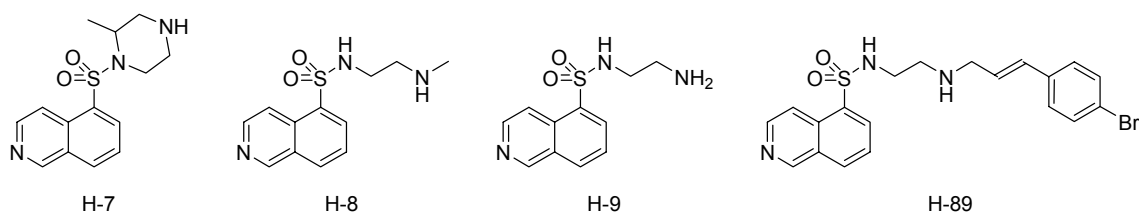


Abbildung 2.7: Beispiele für Inhibitoren der H-Serie

Obwohl Isochinolinsulfonamide Proteinkinasen kompetitiv inhibieren, werden andere ATP-verbrauchende Enzyme wie ATPasen und Adenylatzykasen durch sie nur wenig beeinflusst.^[111] Der Grund für die Selektivität der Isochinolinsulfonamide ist die hydrophobe Adenosinbindungstasche der Proteinkinasen, in welche die Isochinolineinheit gut hineinpasst. Viele der anderen ATP-verbrauchenden Enzyme weisen diese nicht oder nur unvollständig ausgebildet auf. Selbst Enzyme mit einer Adenosinbindungstasche können, z. B. aufgrund von Polaritätsunterschieden oder sterischen Differenzen in der Tasche, eine nur geringe Affinität gegenüber den Inhibitoren aufweisen.^[112]

Die Affinität der Isochinolinsulfonamide zu der Adenosin-Bindungstasche basiert auf der Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Das Stickstoffatom des Isochinolinrings bildet eine Wasserstoffbrücke aus, die der des N1 im Adenosin entspricht. (Die Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke wird durch die Tatsache belegt, dass entsprechende Naphthalinsulfonylverbindungen keine für Proteinkinasen selektiven Inhibitoren darstellen.)^[101] Durch den aromatischen Isochinolinring bestehen zusätzlich von der Waals-Wechselwirkungen, die denen der Adeninbase vergleichbar sind. Auch die unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegende Aminogruppe der Seitenkette bildet diverse Wasserstoffbrückenbindungen aus.^[111]

Aufgrund der familienweit konservierten ATP-Bindungsstelle weisen die Isochinolinsulfonamide ein eher breites Kinaseinhibierungsspektrum auf, so werden u.a. cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), Proteinkinase C (PKC), *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) und die Caseinkinasen 1 bzw. 2 (CK1/CK2) gehemmt (Tabelle 2.3).

Die Inhibierungskonstanten K_i bestimmter Inhibitoren^a können sich für verschiedene Proteinkinasen dennoch deutlich unterscheiden, was zum einen auf einer gewissen Variabilität der die Bindungstasche säumenden Reste und den daraus resultierenden, unterschiedlichen Wechselwirkungen beruht. Ein weiterer Faktor sind mögliche Interaktionen mit Regionen außerhalb der Adenosinbindungstasche. So weisen die Inhibitoren der H-Serie insgesamt gegenüber den Caseinkinasen 1 bzw. 2 und MLCK eine geringere Affinität auf als gegenüber den von zyklischen Nukleotiden abhängigen Proteinkinasen A und G sowie der Proteinkinase C (Tabelle 2.3). **H-7** wiederum inhibiert die Proteinkinase C deutlich stärker als die Inhibitoren **H-8** und **H-9**. In diesen wurde das Sulfonylpiperazin durch einen Aminoethylsulfonamidrest ersetzt und dadurch eine höhere Affinität gegenüber den Proteinkinasen A und G generiert. In Weiterentwicklung dieser Grundstruktur wurde durch Einführen eines aromatischen Restes in die Seitenkette der für PKA selektive Inhibitor **H-89** erhalten,^b wobei die gesteigerte Affinität auf zusätzliche van-der-Waals-Interaktionsmöglichkeiten durch die Seitenkette zurückgeführt wird.^[101,110]

Tabelle 2.3: Inhibierungskonstanten K_i [μM] von Isochinolinsulfonamidverbindungen der H-Serie für verschiedene Kinasen^[110]

	Proteinkinase			MLCK	CK1	CK2
	A	G	C			
H-7	3	5.8	6.0	97	100	780
H-8	1.2	0.48	15	68	133	950
H-9	1.9	0.9	18	70	110	> 300
H-89	0.048	0.48	30	30	40	140

Das Isochinolinsulfonamid-Grundgerüst bietet sich aus verschiedenen Gründen als Ausgangspunkt für die Synthese neuer molekularer Werkzeuge zur Detektion von Kinasen an. Zum einen sind die Isochinolinsulfonamide aufgrund der einfachen synthetischen Zugänglichkeit leicht zu modifizieren, zum anderen existieren von vielen Vertretern der H-Serie Kristallstrukturen im Komplex mit PKA, die strukturellen Grundlagen der Interaktion von Enzym und Inhibitor sind also bekannt.^[112]

^a Bei der Inhibierungskonstante K_i handelt es sich um die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

^b Allerdings hemmt selbst dieser Inhibitor noch diverse andere Proteinkinasen (u. a. *mitogen- and stress-activated protein kinase* MSK1, *Rho dependent protein kinase* ROCK-II, *p70 ribosomal protein S6 kinase* S6K1) vergleichbar gut oder sogar besser.^[106]

Aus der Röntgenstruktur von PKA mit dem Inhibitor **H-8** ist ersichtlich, dass die 2-(Methylamino)ethyl-Einheit leicht zugänglich aus der Spalte des aktiven Zentrums herausragt (Abbildung 2.8).^[112]

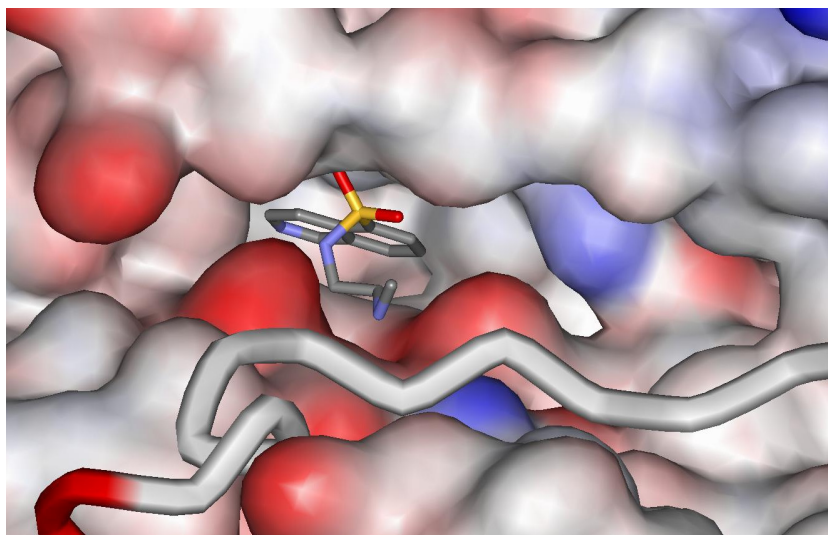


Abbildung 2.8: PKA (Rind) im Komplex mit H-8 und Pseudosubstrat PKI-(5-24)
(Brookhaven databank: 1YDS)^[112]

Eine Funktionalisierung der terminalen Aminogruppe von **H-9** mit einem Linker müsste daher ohne gravierende Verschlechterung der Bindungsaffinität des Inhibitors möglich sein. Allerdings sollte die protonierbare Aminofunktion dabei erhalten bleiben, da von Hidaka *et al.* in einer Untersuchung der Bindungseigenschaften verschiedener Isochinolinsulfonamide festgestellt wurde, dass die Affinität dieser Verbindungen unter anderem von der positiven Ladung der terminalen Aminogruppe abhängt. Einen weiteren Faktor stellt die Ethylendiamin-Einheit dar, da die Affinität mit zunehmender Distanz zwischen Sulfonamid und terminalem Stickstoffatom abnimmt. So beträgt der K_i -Wert für PKA (PKG) im Fall von *N*-(2-aminoethyl)-5-isochinolinsulfonamid (**H-9**) 1.9 μM (0.9 μM), bei *N*-(3-aminopropyl)-5-isochinolinsulfonamid 4.3 μM (1.7 μM) und bei *N*-(6-aminohexyl)-5-isochinolinsulfonamid nur noch 12 μM (16 μM).^[101]

2.4 Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz stellt ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen dar, da sie die qualitative und quantitative Untersuchung reversibler Bindungsprozesse zwischen verschiedenen Interaktionspartnern in Echtzeit erlaubt.

Bei der Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) handelt es sich um ein opto-elektronisches Quantenphänomen, das durch die Wechselwirkung von reflektiertem Licht mit einer Metalloberfläche zustande kommt. In einem Metall liegen die frei beweglichen Valenzelektronen des Leitungsbandes delokalisiert als so genanntes Elektronengas bzw. Plasma vor. Schwingungen der Elektronen äußern sich an der Oberfläche des Metalls, genauer an der Grenzfläche zwischen Metall und einem Dielektrikum (Isolator), als Oberflächenplasmawellen (Elektronendichteschwankungen). Die ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung Oberflächenplasmonen (Plasmon = Abkürzung für Plasmaschwingungsquant) rührt aus der quantenmechanischen Betrachtung als Quasiteilchen her (Welle-Teilchen-Dualismus).^[113] Die Oberflächenplasmawelle (d. h. die Elektronenoszillation) generiert ein elektrisches Feld, das sich entlang der Metalloberfläche ausbreitet und als evaneszentes Feld in Metall und Dielektrikum eindringt (Evaneszent bedeutet 'dahinschwindend', d. h. die Amplitude nimmt senkrecht zur Oberfläche exponentiell ab.) Der Großteil des evaneszenten Feldes erstreckt sich dabei in das Dielektrikum.^[114]

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Anregung von Oberflächenplasmawellen, im Folgenden soll jedoch nur die optische Anregung näher betrachtet werden. Eine optische Anregung findet statt, wenn die freien Elektronen mit dem elektromagnetischen Feld des Lichts wechselwirken (Resonanzkopplung). Dies ist möglich, wenn der Impuls (Wellenvektor) von Licht- und Plasmawelle übereinstimmt (vgl. Abbildung 2.9).^[115] Eine solche Übereinstimmung ist bei direkter Bestrahlung einer glatten Metalloberfläche nicht realisierbar, sie kann aber durch verschiedene Methoden erreicht werden.^[114] Hier soll nur das Prinzip des Kretschmann-Prismas näher erläutert werden, da das im Rahmen dieser Arbeit benutzte Biacore[®] 3000 auf diesem basiert.

Licht, das auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes trifft, wird an dieser Grenzfläche teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Fällt Licht von einem optischen dichteren Medium in eines mit geringerer optischer Dichte, wird ab einem bestimmten Winkel das Licht nicht mehr gebrochen, sondern es findet eine Totalreflexion statt (TIR, *total internal reflection*). Allerdings fällt das elektromagnetische Feld hinter der Grenzfläche nicht abrupt auf Null ab, sondern propagiert als evaneszente Welle (mit den gleichen Eigenschaften wie das einfallende Licht) etwa eine Lichtwellenlänge weit in das optisch dünnere Medium.

Ende der 60er Jahre haben sowohl Otto als auch Kretschmann dieses Phänomen zur Anregung von Oberflächenplasmawellen eingesetzt.^[115-117] Bei dem Kretschmann-Aufbau geschieht dies, indem eine Prismenfläche, die mit einer dünnen Metallschicht bedampft ist, mit monochromatischem, zur Einfallsebene parallel polarisiertem Licht (aus dem sichtbaren bzw. nahen Infrarot-Spektralbereich) in Winkeln bestrahlt wird, die interne Totalreflexion zur Folge haben. Bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem Resonanzwinkel, kann das entstehende evaneszente Feld der Lichtwelle mit dem der Plasmawelle wechselwirken, d. h. an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum^c findet eine Resonanzanregung der Oberflächenplasmawelle statt (Abbildung 2.9). Da die angeregte Oberflächenplasmawelle die eingestrahlte Energie absorbiert, äußert sich das Auftreten der Oberflächenplasmonresonanz in einer stark verminderten Intensität des reflektierten Lichts (Minimum im Intensitätswinkelspektrum, siehe Kasten in Abbildung 2.9), man spricht von abgeschwächter Totalreflexion (ATR, *attenuated total reflection*). Das evaneszente Feld der Oberflächenplasmawelle wechselwirkt mit dem Dielektrikum, daher sind die Anregung der Plasmawelle und damit der Resonanzwinkel direkt abhängig von der Dielektrizitätskonstante bzw. vom Brechungsindex des Dielektrikums in der Nähe der Metalloberfläche und eine Änderung der optischen Eigenschaften des Dielektrikums resultiert in einer Verschiebung des Intensitätsminimums.

^c In dem Experiment von Kretschmann wurden Oberflächenplasmawellen an der Grenzschicht Silber/Luft angeregt, es können aber auch andere Metalle und Dielektrika (z. B. Lösungen) eingesetzt werden.

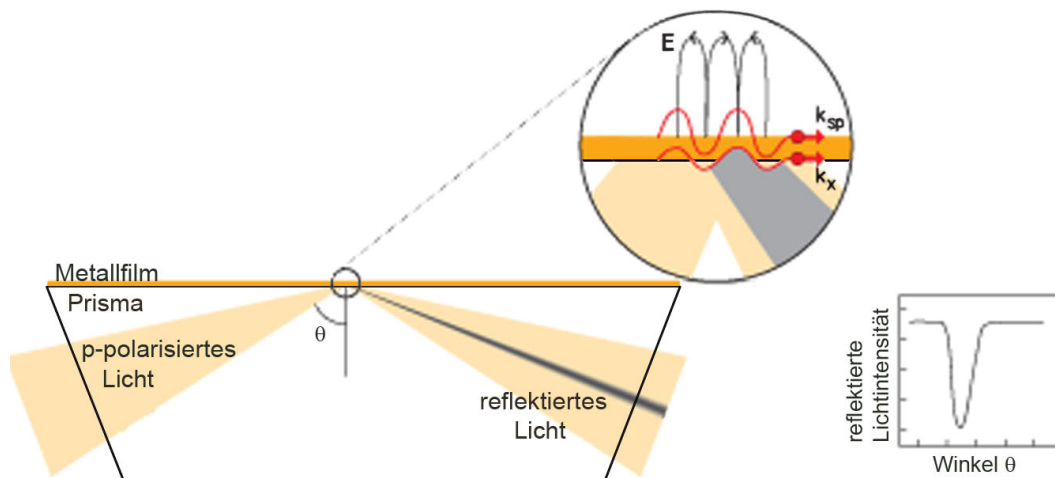


Abbildung 2.9: Anregung von Oberflächenplasmawellen mit einem Kretschmann-Prisma (Quelle: Biacore AB).^[118]

Eine Resonanzkopplung tritt auf, wenn die Wellenvektoren von Licht (k_x) und Oberflächenplasmawelle (k_{sp}) übereinstimmen. E bezeichnet das von der Oberflächenplasmawelle generierte elektrische Feld, dessen Amplitude durch die Resonanzkopplung erhöht wird. Die Eindringtiefe beträgt je nach Wellenlänge des Lichts etwa 100-500 nm.^[119]

Durch die auf wenige hundert Nanometer begrenzte Eindringtiefe des evaneszenten elektrischen Feldes der Oberflächenplasmawelle eignet sich die Oberflächenplasmonresonanz hervorragend für die Untersuchung von Vorgängen auf der Metalloberfläche, so wurde sie von Nylander *et al.* und Liedberg *et al.* sowohl zur Gasdetektion^[120] als auch für biosensorische Zwecke eingesetzt.^[121] Die Adsorption bzw. Desorption von Molekülen an der Metalloberfläche beeinflusst den Brechungsindex im Bereich der evaneszenten Welle und ändert den Resonanzwinkel, wobei das Ausmaß der Winkeländerung mit der Konzentration der Moleküle auf der Oberfläche (bzw. mit der gebundenen Masse) korreliert.^[122]

Im Jahr 1990 brachte die schwedische Firma Pharmacia Biosensors (inzwischen Biacore AB) mit dem Biacore[®] den ersten kommerziellen Biosensor auf den Markt (BIA steht für Biomolekulare Interaktionsanalyse).^[123] Das Biacore[®] nutzt separate Sensorchips, die aus einem mit einer ca. 50 nm dünnen Goldschicht bedampften Glaträger bestehen. Obwohl Silber ein stärkeres evaneszentes Feld und damit ein deutlicheres SPR-Signal erzeugt, wird für Biosensoren in der Regel Gold verwendet, da es oxidationsstabiler ist (Oxidschichten verfälschen das SPR-Signal) und sich einfach chemisch modifizieren lässt. Während der

Messung wird der Chip optisch mit dem im Gerät integrierten Prisma gekoppelt, so dass die Totalreflexion weiterhin an der Grenzfläche Glas/Gold stattfindet. In Abbildung 2.10 ist der Aufbau eines Biacore[®]-Gerätes skizziert.

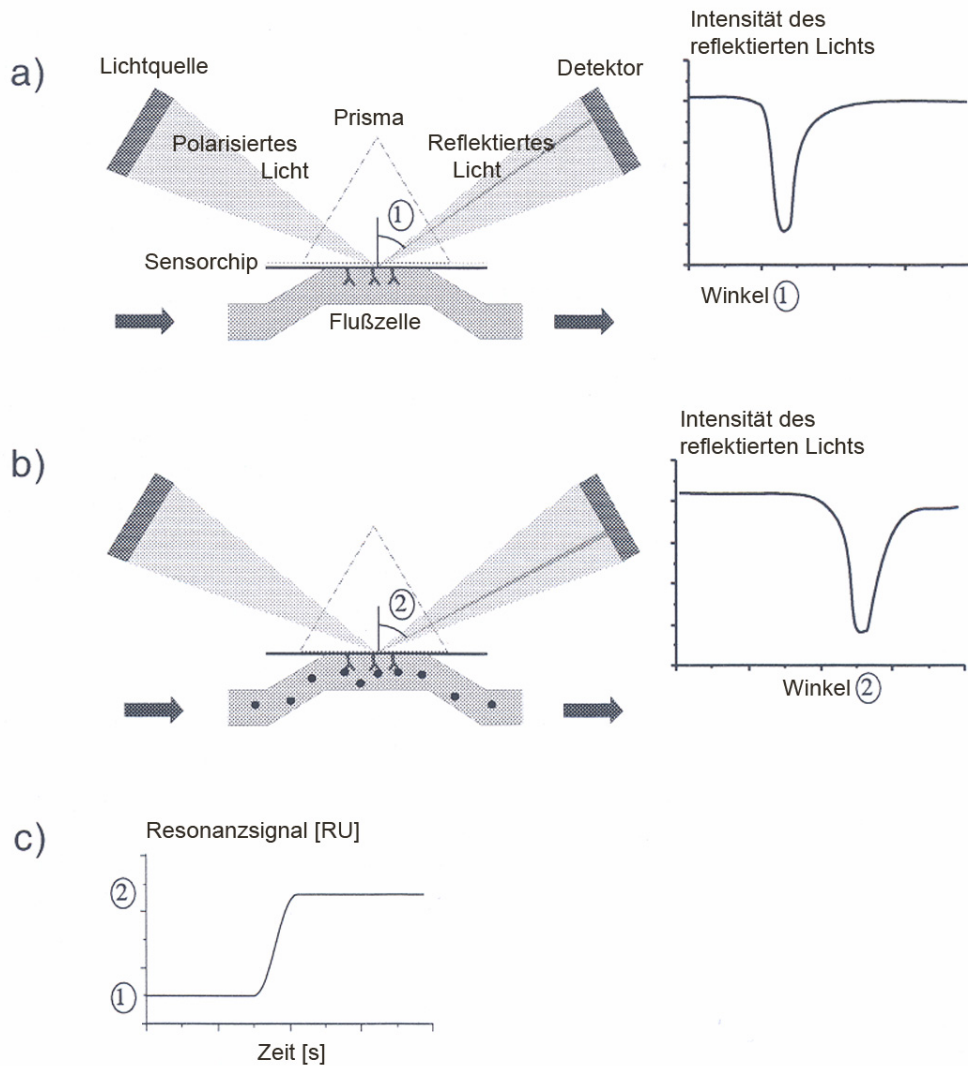


Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines SPR-Biosensors (Quelle: Biacore AB).^[124]

Auf der rechten Seite sind die (a) vor und (b) während der Analytinjektion erhaltenen Intensitätswinkelspektren abgebildet (Λ immobilisierter Ligand, • Analyt). c) zeigt die Auftragung des Resonanzwinkels gegen die Zeit.

Als Lichtquelle dient eine im nahen Infrarot emittierende LED. Das Licht wird in einem keilförmigen Strahl so auf den Sensorchip fokussiert, dass ein festgelegter Winkelbereich abgedeckt wird. Als Detektor fungiert ein Photodiodenarray, der den gesamten Winkel-

bereich des reflektierten Lichts erfasst. Auf diese Weise kann das SPR-Signal in Echtzeit verfolgt werden kann.

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wird häufig als markierungsfreie Untersuchungsmethode bezeichnet, da sie nicht auf die Anwesenheit eines Chromophors angewiesen ist und kein *Labeling* der Moleküle mit z. B. Fluoreszenzfarbstoffen erfordert. Zur Untersuchung von (bio-)molekularen Wechselwirkungen muss jedoch einer der Interaktionspartner, der so genannte Ligand, auf der Goldoberfläche immobilisiert werden. Da dies einer Markierung gleichkommt, ist die Methode nicht wirklich markierungsfrei.

Zur Durchführung von Bindungsstudien wird dann eine Lösung des Interaktionspartners (des Analyten) an den auf der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden vorbeigeleitet. Dies geschieht mit Hilfe eines speziellen Fluss-Systems, das aus vier sowohl einzeln als auch gleichzeitig nutzbaren Flusszellen besteht. Kommt es beim Kontakt der Analytlösung mit den immobilisierten Liganden zu Interaktionen zwischen Analyt und Ligand, so lässt sich dies aufgrund der damit einhergehenden Änderung des Brechungsindex an der Sensoroberfläche über die Änderung des SPR-Winkels verfolgen (Abbildung 2.10 a, b).

Die Analytlösung wird in der Regel auch durch eine Referenzflusszelle geleitet, die keine Liganden aufweist, so dass andere Faktoren, die den Brechungsindex ebenfalls beeinflussen, z. B. veränderte Pufferzusammensetzungen, mittels Referenzsubtraktion herausgerechnet werden können.

Wird der Resonanzwinkel gegen die Zeit aufgetragen, erhält man ein Sensorgramm, welches das Ausmaß der Wechselwirkungen auf der Sensoroberfläche wiedergibt (Abbildung 2.10 c bzw. Abbildung 2.11). Meist wird die relative Änderung des Winkels als Resonanzsignal in RU (*resonance units*) angegeben, dabei entspricht ein RU einer Winkeländerung von 0.0001° (0.1 mdeg) und damit etwa der Assoziation/Dissoziation eines Pikogramms Analyt pro Quadratmillimeter Sensoroberfläche. Dementsprechend ist es insbesondere bei Bindungspartnern mit stark unterschiedlichem Molekulargewicht vorteilhafter, das kleinere Molekül als Ligand zu immobilisieren, da der schwerere Bindungspartner als Analyt ein deutlicheres Resonanzsignal erzeugt. Inwiefern dies möglich ist, hängt jedoch entscheidend von der Art der zu untersuchenden Wechselwirkung sowie davon ab, welcher Bindungspartner ohne Affinitätsverlust immobilisiert werden kann.

Durch die Entwicklung einer Reihe von unterschiedlich modifizierten Sensorchipoberflächen existieren in dieser Hinsicht mehrere Möglichkeiten. Ein häufig verwendeter Sensorchip weist eine carboxymethylierte Dextranmatrix auf, die über eine Linkerschicht aus 16-Mercapto-1-hexadecanol (*self-assembled monolayer*) kovalent mit der Goldoberfläche verbunden ist. Das Dextran bildet in gequollenem Zustand eine ca. 100 nm dicke Hydrogelschicht, die eine für die meisten biologischen Interaktionen geeignete hydrophile Umgebung gewährleistet. Des Weiteren werden eine größere Oberfläche und damit eine bessere Bindungskapazität im Bereich des evaneszenten Feldes generiert, woraus ein intensiveres SPR-Signal resultiert.^[125,126] Die Carboxylgruppen der Dextranmatrix können mit *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert und anschließend auf vielfältige Weise derivatisiert werden, so dass die kovalente Anknüpfung von (Bio-)Molekülen über verschiedene funktionelle Gruppen (Amine, Thiole, Aldehyde) möglich ist.^[127] Für eine effiziente Ligandenimmobilisierung ist u. a. die Wahl des richtigen Puffers wichtig, da die Dextranmatrix bei physiologischen pH-Werten eine negative Nettoladung aufweist. Deshalb sollte bei der Immobilisierung von Proteinen der pH-Wert des Puffers unterhalb des isoelektrischen Punktes (IEP) des Proteins liegen, um eine Abstoßung des ansonsten negativ geladenen Makromoleküls zu vermeiden. Ist der IEP nicht bekannt, kann der für die Interaktion von Ligand und Matrix optimale pH-Wert auch durch ein so genanntes *pH-Scouting* ermittelt werden, indem der Ligand bei verschiedenen pH-Werten über die Sensoroberfläche geleitet wird. Das höchste Resonanzsignal entspricht der maximalen Assoziation und damit dem pH-Optimum. Da auch die Ionenstärke des Puffers Einfluss auf die elektrostatische Anziehung hat, ist dies ein weiterer Faktor, der zu beachten ist.

Alternativ kann die Immobilisierung biotinylierter Moleküle auf einer mit Streptavidin modifizierten Dextranmatrix erfolgen;^[127] wird Nitrilotriessigsäure auf der Dextranmatrix präimmobilisiert, können histidinhaltige Moleküle via Ni^{2+} -Chelatierung immobilisiert werden.^[128] Des Weiteren können durch Beschichtung der Goldoberfläche mit Alkanthiolen bzw. durch lipophile Modifikation der Dextranmatrix sowohl Lipidmonoschichten als auch membranähnliche Lipiddoppelschichten aufgebaut werden. Dies ermöglicht die Immobilisierung von Lipiden (bzw. von Molekülen mit Lipidankern) und membranständigen Proteinen.^[129]

In Abbildung 2.11 ist der normalerweise während einer SPR-Messung beobachtete Kurvenverlauf als schematisches Sensorgramm wiedergegeben.

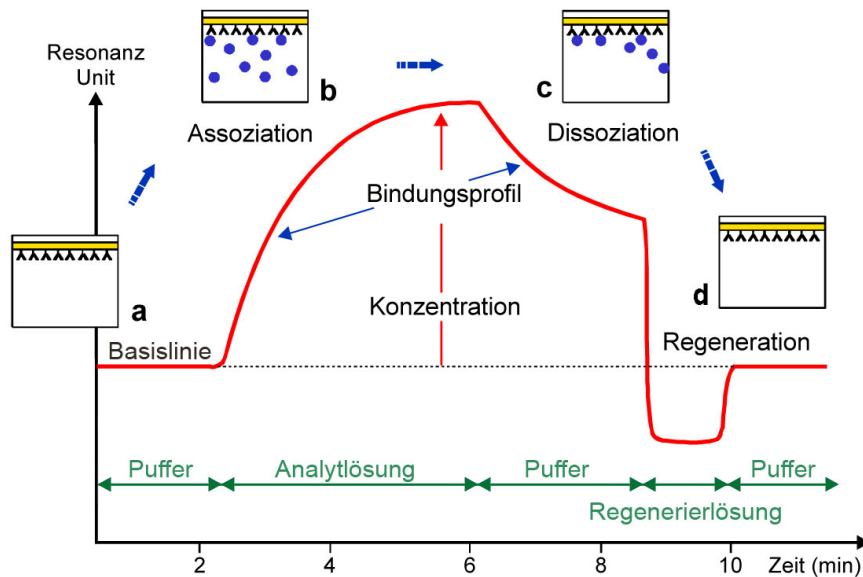


Abbildung 2.11: Schematisches Sensorgramm (Quelle: Biacore AB).

Das SPR-Signal (in RU) ist in rot dargestellt, die Kästchen geben das Geschehen auf der Chipoberfläche wieder: a) Basislinie bei Pufferfluss; b) Injektion der Analytlösung, Bindung des Analyten am immobilisierten Ligand → Signalanstieg; c) Dissoziation des Analyten → Signalabfall; d) Injektion der Regenerierlösung/Basislinie nach erfolgter Regeneration.

Zu Beginn der Messung wird lediglich Laufpuffer injiziert, deshalb sollte die Basislinie möglichst konstant bleiben (Abbildung 2.11, a). Ist dies nicht der Fall, kann das ein Anzeichen für einen labilen Liganden, ungenügendes Spülen mit Puffer nach der Regenerierung (*memory effect*) oder Temperaturschwankungen sein. Sobald die Analytlösung injiziert wird, beginnt die Assoziationsphase (Abbildung 2.11, b). Bei ausreichend langer Injektionsdauer stellt sich nach einiger Zeit (u. a. abhängig von der Beladungsdichte des Liganden, der Flussgeschwindigkeit und der Konzentration der Analytlösung) zwischen Assoziation und Dissoziation ein Gleichgewicht ein, die Messkurve erreicht ein Plateau. Mit dem Ende der Analytinjektion beginnt die Dissoziationsphase (Abbildung 2.11, c). In dieser werden die Analytmoleküle – je nach Affinität der Bindungspartner mehr oder weniger schnell – durch den Laufpuffer eluiert, dementsprechend fällt die Kurve ab. Die Dauer der einzelnen Phasen der Bindungsstudie hängt u. a. davon ab, ob es sich bei der Information, die aus dem Experiment erhalten werden soll, um eine qualitative („Tritt eine Interaktion auf?“)

oder eine quantitative („Wie affin ist die Interaktion?“) handelt. Während das Ergebnis im ersten Fall rasch feststeht, ist zur Ermittlung von thermodynamischen und kinetischen Daten eine längere Messdauer vorteilhaft, da mehr Datenpunkte eine genauere Auswertung erlauben. Bei der anschließenden Regeneration (Abbildung 2.11, d) werden die zu diesem Zeitpunkt noch gebundenen Analytmoleküle durch eine geeignete Regenerierlösung (z. B. mit einem anderen pH-Wert bzw. mit einem Detergenzanteil) normalerweise ohne Beeinträchtigung der immobilisierten Liganden vollständig eluiert. Nach dem Regenerieren wird die Sensoroberfläche mit Laufpuffer gespült. Sobald sich wieder eine konstante Basislinie eingestellt hat, kann der nächste Messzyklus gestartet werden.

Um aus den Oberflächenplasmonresonanzmessungen verlässliche kinetische Daten erhalten zu können, muss sichergestellt werden, dass die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten nicht durch Massentransporteinflüsse verfälscht werden.^[130] So kann es bei schneller Assoziation des Analyten an den immobilisierten Liganden zur Analytverarmung der Lösung an der Sensoroberfläche kommen, wenn aufgrund einer zu geringen Flussrate nicht genügend Analyt zur Sensoroberfläche transportiert wird. In der Folge hängt die Assoziationsgeschwindigkeit des Analyten von der Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle zur Oberfläche bzw. in die Matrix ab und die Assoziationsrate erscheint geringer, als es den tatsächlichen kinetischen Daten entspricht. Entsprechend wird bei der Dissoziation ein künstlich langsamerer Abfall erhalten, wenn der freigesetzte Analyt nicht schnell genug abtransportiert wird, da dann eine Rückbindung an frei gewordenen Bindungsstellen stattfinden kann. Das Auftreten einer Massentransportlimitierung lässt sich sowohl durch die Flussrate als auch durch die Beladungsdichte der Sensoroberfläche mit immobilisiertem Liganden beeinflussen. Durch hohe Flussraten wird die Transportrate des Analyten zur Oberfläche und in die Dextranmatrix beschleunigt und somit ein Absinken der Analytkonzentration an der Oberfläche vermieden. Den gleichen Effekt hat eine geringe Beladungsdichte, da dann weniger Liganden um die Analytmoleküle konkurrieren. Um festzustellen, ab welcher Flussrate bei einer gegebenen Beladungsdichte keine Massentransportlimitierung mehr auftritt, wird eine Analytlösung konstanter Konzentration bei unterschiedlichen Flussraten injiziert. Die Flussrate wird solange erhöht, bis die anfängliche Bindungsrate, d.h. die Steigung der Kurve zu Beginn der Analytinjektion, nicht mehr von der Flussrate abhängig ist.

Der Sensorchip kann auch als eine „Mini-Affinitätschromatographiesäule“ eingesetzt werden, um unbekannte Interaktionspartner in Gemischen zu detektieren und zu identifizieren (Ligandenfischen). Nach der spezifischen Anreicherung auf der Chipoberfläche wird das analythaltige Eluat aufgefangen (*micro-recover*) und massenspektrometrisch analysiert (*SPR-MS* bzw. *BLA-MS*). Alternativ kann auch der Chip mit dem gebundenen Analyt direkt mittels MALDI-ToF-MS untersucht werden, allerdings ist dieser Chip anschließend nicht mehr verwendbar.^[131]

Die unterschiedlichen Sensoroberflächen ermöglichen die Immobilisierung diverser Moleküle (Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Moleküle, Viren usw.) und damit die Analyse verschiedenster Wechselwirkungen (z. B. Antikörper - Antigen, Ligand - Rezeptor). Mögliche Anwendungen der Oberflächenplasmonresonanz sind unter anderem die Bestimmung von Affinitäten und Assoziations-/Dissoziationskonstanten (Kinetik), Komplexuntersuchungen, die Charakterisierung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, Epitop-*Mapping*, Ligandenfischen und Leitstrukturidentifizierung.^[132,133]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächenplasmonresonanz zur Überprüfung der Affinität von Kinaseinhibitorderivaten gegenüber verschiedenen Kinasen eingesetzt (siehe Kapitel 4.3 bzw. 4.6.1).

2.5 Photoaffinitätsmarkierung

Die Photoaffinitätsmarkierung hat sich seit ihrer erstmaligen Anwendung im Jahr 1962^[134] zu einer wichtigen Methode zur Untersuchung von reversiblen Ligand-Rezeptor-Interaktionen entwickelt. Mit ihrer Hilfe können z.B. aktive Zentren von Enzymen, Proteinbindungsstellen und Rezeptoren lokalisiert und identifiziert werden.^[135,136]

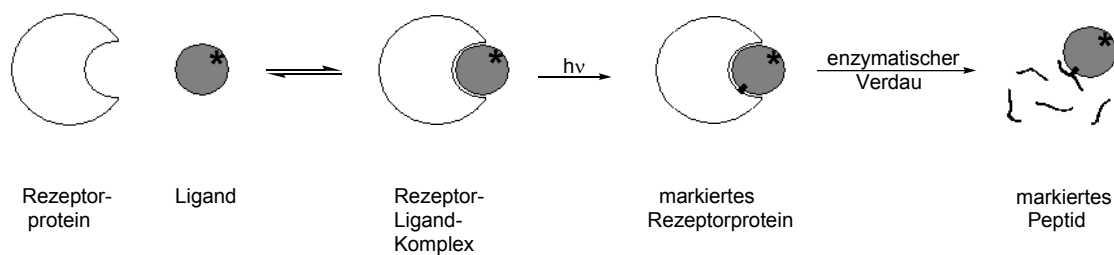


Abbildung 2.12: Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung (* = Reportergruppe)

Die Photoaffinitätsmarkierung erfolgt mit einem photoaktivierbaren, aber chemisch inerten Analogon des ursprünglichen Liganden (Photoaffinitätssonde), das bei Bestrahlung mit UV-Licht ein hochreaktives Intermediat ausbildet und kovalent an das Rezeptorprotein bindet (Abbildung 2.12).

Anschließend kann das nunmehr irreversibel markierte Protein weiter analysiert werden. In der Regel weist die Photoaffinitätssonde zusätzlich eine Reportergruppe (radioaktiver Marker, Fluoreszenzfarbstoff) auf, welche die Identifikation des markierten Proteins (z. B. in Proteingemischen) erleichtert. Enzymatischer Verdau des Rezeptorproteins ergibt ein markiertes Peptid, das die Lokalisierung der Bindungsstelle (idealerweise das aktive Zentrum) im Protein erlaubt. Durch eine nachfolgende Sequenzierung können die Aminosäuresequenz der Bindungsstelle sowie die markierte Aminosäure ermittelt werden.^[137]

Die photoreaktive Gruppe der Photoaffinitätssonde sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- einfach zu synthetisieren
- vor Bestrahlung chemisch inert bzw. stabil in wässriger Lösung
- rasche Photolyse bei Wellenlängen, die keine photochemische Schädigung des Proteins

hervorrufen (> 300 nm)

- hohe Reaktivität des photochemisch erzeugten Intermediates, ohne dass intramolekulare Umlagerungen in weniger reaktive Verbindungen stattfinden
- die Lebensdauer des reaktiven Intermediates sollte geringer sein als die des Ligand-Rezeptor-Komplexes, aber dennoch die Ausbildung einer kovalenten Bindung im Zielbereich ermöglichen
- hohe Markierungseffizienz, Bildung eines uniformen, stabilen Produkts
- das reaktive Intermediat sollte bevorzugt mit C-H- bzw. nukleophilen X-H-Bindungen reagieren und eine geringe Tendenz zur Reaktion mit Wasser/Lösungsmitteln aufweisen
- die Einführung der Photoreaktivgruppe sollte die Struktur und Reaktivität des Liganden möglichst wenig beeinflussen

Es gibt verschiedene funktionelle Gruppen, die Vorstufen photochemisch generierbarer reaktiver Spezies darstellen und diese Anforderungen mehr oder weniger gut erfüllen, u. a. Diazoverbindungen, Diazirine, Arylazide und α,β -ungesättigte Ketone. Den ersten drei Verbindungsklassen ist gemeinsam, dass die reaktive Spezies (Carben bzw. Nitren) jeweils durch die photoinduzierte Abspaltung von molekularem Stickstoff generiert wird (Abbildung 2.13), während das reaktive Diradikal im Fall der α,β -ungesättigte Ketone durch Elektronenanregung gebildet wird (Abbildung 2.14).

Allerdings sind nicht alle Verbindungsklassen gleich gut geeignet. Auch wenn die erste überlieferte Photoaffinitätsmarkierung mit einer Diazoverbindung (*p*-Nitrophenyldiazoacetat) durchgeführt wurde,^[134] spielen die meisten Vertreter dieser Verbindungsklasse heutzutage aufgrund ihrer geringen Stabilität (eine Ausnahme bilden trifluoromethylsubstituierte Diazoverbindungen (Abbildung 2.13 a)^[138]) sowie der im allgemeinen erst bei relativ kurzen Wellenlängen (< 300 nm) erfolgenden Photolyse nur noch eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz dazu stellen Trifluormethylaryldiazirine (Abbildung 2.13 b), die eine vergleichsweise hohe chemische Stabilität aufweisen und bei proteinfreundlichen Wellenlängen von etwa 360 nm photolysiert werden können, eine nützliche Quelle für Aryl-carbene dar.^[137]

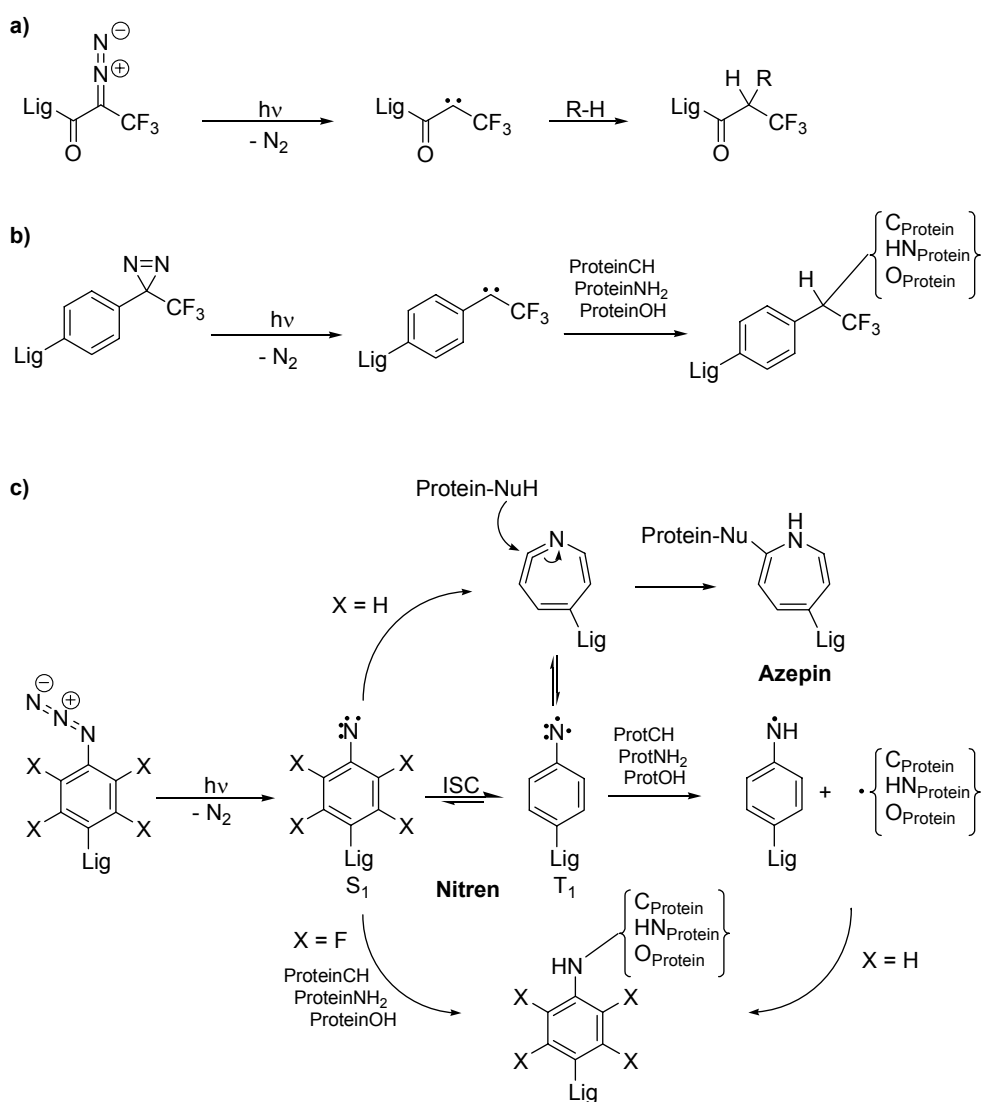


Abbildung 2.13: Photochemie einiger photodissoziativer Vorstufen^[136,140]

a) Diazoverbindungen, b) Diazirine, c) Arylazide

(Lig = Ligand, NuH = Cystein oder Histidin, ISC = *Intersystem Crossing*).

Die Arylazide (Abbildung 2.13 c) gehören zu den am häufigsten eingesetzten Photoreaktivgruppen, allerdings liegt dies eher in der guten synthetischen Zugänglichkeit als in den intrinsischen Eigenschaften der reaktiven Spezies begründet. So erfolgt die Photolyse von Phenylaziden häufig erst unterhalb von 300 nm, und das bei der Bestrahlung primär gebildete Singulett-Nitren geht entweder durch *intersystem crossing* in den Triplett-Grundzustand über oder lagert sich zu einem Didehydroazepin um (Abbildung 2.13 c). Dieses kann zwar mit Nukleophilen zu einem Azepin reagieren, allerdings ist es aufgrund seiner Stabilität und langen Lebensdauer für spezifische Markierungen ungeeignet.

Im Fall der fluorierten Arylazide sieht die Lage dagegen besser aus: erstens können sie bei geeigneten Wellenlängen (~ 350 nm) photolysiert werden und zweitens wandelt sich das Singulett-Nitren nur langsam in das Dihydroazepin um, so dass es effizient reagieren kann. Allerdings entstehen aufgrund einer gewissen Präferenz von O-H- und N-H-Bindungen gegenüber C-H-Bindungen bevorzugt relativ labile Stickstoff-Heteroatom-Bindungen, was im Vergleich zu Carbenen einen Nachteil darstellt.^[135]

Vergleichende Studien haben gezeigt, dass eine effiziente und reproduzierbare Markierung von Proteinen durch den Einsatz von Tetrafluorophenylaziden, Trifluoromethylphenyldiazirinen und Benzophenonen möglich ist.^[139,140] Benzophenonderivate weisen gegenüber den anderen Photoreaktivgruppen drei deutliche Vorteile auf: sie sind chemisch stabiler, können problemlos bei Tageslicht gehandhabt werden und reagieren selbst bei Anwesenheit von Wasser oder Nucleophilen bevorzugt mit C-H-Bindungen.^[141]

Absorbiert das Benzophenon-Chromophor **I** bei 350 nm ein Photon, so wird ein Elektron aus einem nichtbindenden n-Orbital des Sauerstoffs in ein antibindendes π^* -Orbital der Carbonylgruppe promoviert, es entsteht ein diradikalischer Tripletzustand **II** (Abbildung 2.14). Das aufgrund des Elektronenmangels elektrophile n-Orbital des Sauerstoffs interagiert mit schwachen C-H- σ -Bindungen und abstrahiert ein H-Atom (bei Proteinen ein H_α -Atom einer Aminosäure). Das entstandene Alkylradikal **IV** rekombiniert mit dem Ketylradikal **III** zu einem Benzhydrolderivat **V**.

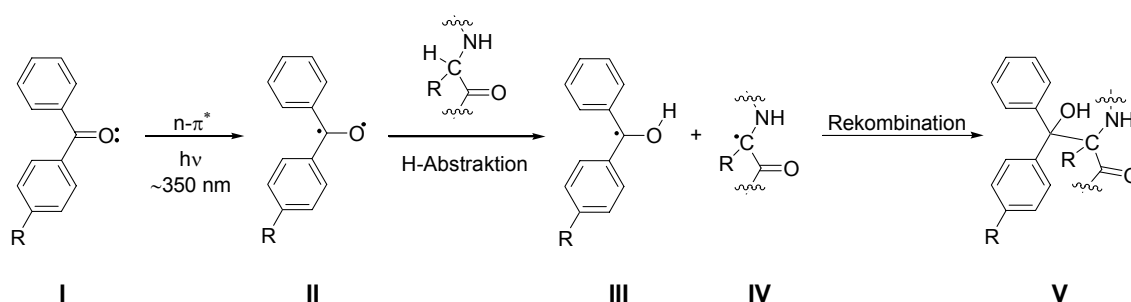


Abbildung 2.14: Photochemie der Benzophenone.

In Abwesenheit eines H-Donors relaxiert der Triplettzustand des Benzophenons nach 80-120 μs in den Grundzustand.^[141] Da dieser Prozess ohne Zusatz von Radikalfängern abläuft, behält das Molekül seine photoaktivierbaren Eigenschaften und eine erneute Anregung ist möglich. Somit können mehrere Aktivierungs-Relaxations-Zyklen durchlaufen werden, bis eine für die Ausbildung der kovalenten Bindung günstige Geometrie erreicht wird. Dies stellt einen weiteren Vorteil der Benzophenone gegenüber den anderen Photoreaktivgruppen dar, da deren Aktivierung wegen der damit einhergehenden Abspaltung von molekularem Stickstoff irreversibel erfolgt.

Diese Eigenschaften, die eine effiziente kovalente Modifizierung von Makromolekülen ermöglichen, wiegen die Nachteile der erhöhten Sperrigkeit und Hydrophobizität, die durch die Einführung der Benzoylphenylgruppe verursacht wird, im allgemeinen auf.^[141] Insbesondere die Entwicklung des photolabilen Aminosäureanalogons 4-Benzoyl-L-phenylalanin im Jahr 1986 durch Kauer *et al.*, das die Synthese photoreaktiver Peptide mit standardisierten Festphasenmethoden ermöglichte, führte zu einer Fülle neuer Studien über Peptid-Protein-Wechselwirkungen.^[142]

3 Zielsetzung

Die Proteomik versucht, quantitative und qualitative Veränderungen in einem Proteom zu detektieren und mit biologischen Vorgängen zu korrelieren. Wegen der großen Anzahl der in einem gegebenen Proteom vorhandenen Proteine – in einer eukaryotischen Zelle üblicherweise mehr als 10000 – ist deren umfassende Analyse jedoch äußerst schwierig. So kommen bei der 2D-Gelelektrophorese aufgrund ungenügend hoher Auflösung oft mehrere Proteine in einer Position zu liegen, wodurch schwach exprimierte Proteine überdeckt werden können. Ein weiteres Problem ist die sensitive Detektion bzw. Quantifizierung der Proteine, da das Anfärben mit Coomassie-Blau, Silber oder Fluoreszenzfarbstoffen nicht einheitlich erfolgt und die Ergebnisse mitunter schwer reproduzierbar sind. Dies macht sowohl die Quantifizierung als auch den Vergleich unterschiedlich gefärbter Gele problematisch. Mit gelfreien Methoden wie MudPIT oder ICAT lässt sich zwar das Problem der Anfärbung umgehen und durch isotope markierte *Tags* ist eine (relative) Quantifizierung möglich. Allerdings können mit diesen Methoden nur bereits bekannte bzw. in Datenbanken eingetragene Proteine identifiziert werden. Des Weiteren ist keine Aussage über die Aktivität bzw. Funktion der Proteine möglich.

Aus diesem Grund wurde das Konzept der funktionellen Proteomik entwickelt. Diese hat nicht mehr die Analyse des Gesamtproteoms zum Ziel, sondern versucht, mit Hilfe kleiner Moleküle (Liganden) gezielt bestimmte Proteomteilmengen affinitätsbasiert zu selektieren und so die Analytik zu vereinfachen.

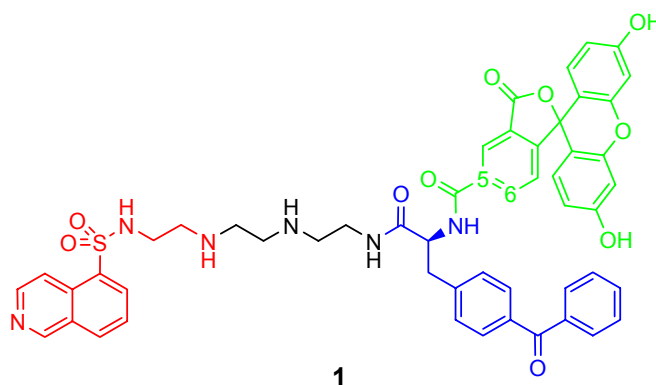
Die Selektion kann zum einen durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten spezifischen Liganden erfolgen. Eine andere Möglichkeit stellt die Markierung bestimmter Proteine mit einer Reportergruppe dar, welche dann eine einfache Detektion erlaubt. Eine solche gezielte Markierung ist z. B. mit spezifischen, irreversibel bindenden Inhibitoren, welche mit einer Reportergruppe verknüpft wurden, möglich, da diese eine kovalente Bindung zum Zielprotein ausbilden. Dieses Konzept wurde bereits für verschiedene

Enzymklassen erfolgreich angewendet, u. a. zur Markierung von Serinproteasen mit Fluorophosphonaten^[36] und von Cysteinproteasen mit Epoxiden.^[39]

Es stehen jedoch nicht für alle Proteinklassen irreversibel bindende Liganden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die Eignung reversibel bindender Inhibitoren als Werkzeuge in der funktionellen Proteomik am Beispiel der Kinasen untersucht werden.^d

Damit auch reversibel bindende Liganden zur gezielten Markierung von Proteinen eingesetzt werden können, müssen sie lediglich neben der Reportergruppe zusätzlich mit einer Reaktivgruppe ausgestattet werden. Im Rahmen der Diplomarbeit^[143] wurde bereits eine Synthese für einen entsprechend modifizierten reversiblen Kinaseinhibitor ausgearbeitet.

Die maßgeschneiderte chemische Sonde **1** basiert auf dem reversiblen Kinaseinhibitor **H-9**, welcher über einen Linker mit einer photoreaktiven Gruppe (4-Benzoyl-L-phenylalanin) und einem Fluoreszenzfarbstoff (5(6)-Carboxyfluorescein) als Reportergruppe verknüpft wurde.



Mit **H-9** wurde ein Inhibitor mit einem breiten Wirkungsspektrum ausgewählt, um ein Werkzeug für die familienweite Markierung von Kinasen zu schaffen.

Ein Ziel dieses Dissertationsvorhabens ist es, herauszufinden, ob sich **1** als Sonde für die affinitätsbasierte Markierung von Kinasen eignet.

Die chemische Sonde sollte möglichst über die gleichen Bindungseigenschaften verfügen wie der zugrunde liegende Inhibitor. Die Bindungseigenschaften des modifizierten Inhibi-

^d Bei Beginn dieses Dissertationsvorhabens im Jahre 2002 waren lediglich irreversible Inhibitoren in der funktionellen Proteomik eingesetzt worden, das Konzept der reversiblen Inhibitoren wurde in den folgenden Jahren unabhängig auch von anderen Gruppen entwickelt.

tors sollen anhand von Oberflächenplasmonresonanz-Studien überprüft werden, da mit dieser Methode direkte Aussagen über die Affinität eines Liganden zu einem Protein möglich sind. Zu diesem Zweck soll ein immobilisierbares Analogon der Sonde **1** synthetisiert werden. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz soll außerdem die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D der Wechselwirkung ausgewählter Kinasen mit dem modifizierten Inhibitor bestimmt und mit der Wechselwirkung **H-9**/PKA verglichen werden.

Des Weiteren sollen verschiedene Kontrollderivate dargestellt werden, um eventuelle Schwachstellen der Sonde **1** festzustellen, und um die Spezifität der Interaktion Sonde/Zielprotein zu belegen.

Durch verschiedene Bestrahlungsexperimente sowohl mit aufgereinigten Kinasen als auch mit biologischen Präparationen soll untersucht werden, ob reversible Inhibitoren nach Ausstattung mit einer Photoreaktivgruppe tatsächlich zur affinitätsbasierten, kovalenten Markierung von Proteinen eingesetzt werden können. Zum anderen soll durch Kontrollexperimente gezeigt werden, ob die Markierung spezifisch erfolgt.

Neben der Photoaffinitätsmarkierung mit der chemischen Sonde **1** soll die Affinitätschromatographie zur Erzeugung von Kinasesubproteomen eingesetzt werden, da durch gezielte Anreicherung von Kinasen an einer festen Phase die Detektion nur schwach exprimierter Kinasen leichter möglich wird.

Deshalb soll ein immobilisierbares **H-9**-Analogon synthetisiert werden, dessen Bindungseigenschaften ebenfalls durch SPR-Studien untersucht werden sollen.

In einem weiteren Ansatz soll versucht werden, das in der Arbeitsgruppe von Cravatt entwickelte Konzept der ungerichteten Sulfonester-sonden (vgl. Kapitel 2.1.2.1)^[42] um gerichtete Sonden zu erweitern, indem der reversible Inhibitor **H-9** über einen Linker, welcher eine nukleophil spaltbare Sulfonesterfunktion aufweist, an eine Reportergruppe gekuppelt wird. Da die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Reportergruppe und Zielprotein in diesem Fall nicht durch Bestrahlung erfolgen würde, sondern durch den Angriff von nukleophilen Resten im aktiven Zentrum des Enzyms, könnte sich ein komplementäres Spektrum von Zielproteinen ergeben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der chemischen Sonde 1

Die Darstellung der auf dem Kinaseinhibitor **H-9** basierenden chemischen Sonde **1** erfolgte gemäß der im Rahmen der Diplomarbeit ausgearbeiteten Synthese (Abbildung 4.1).^[143]

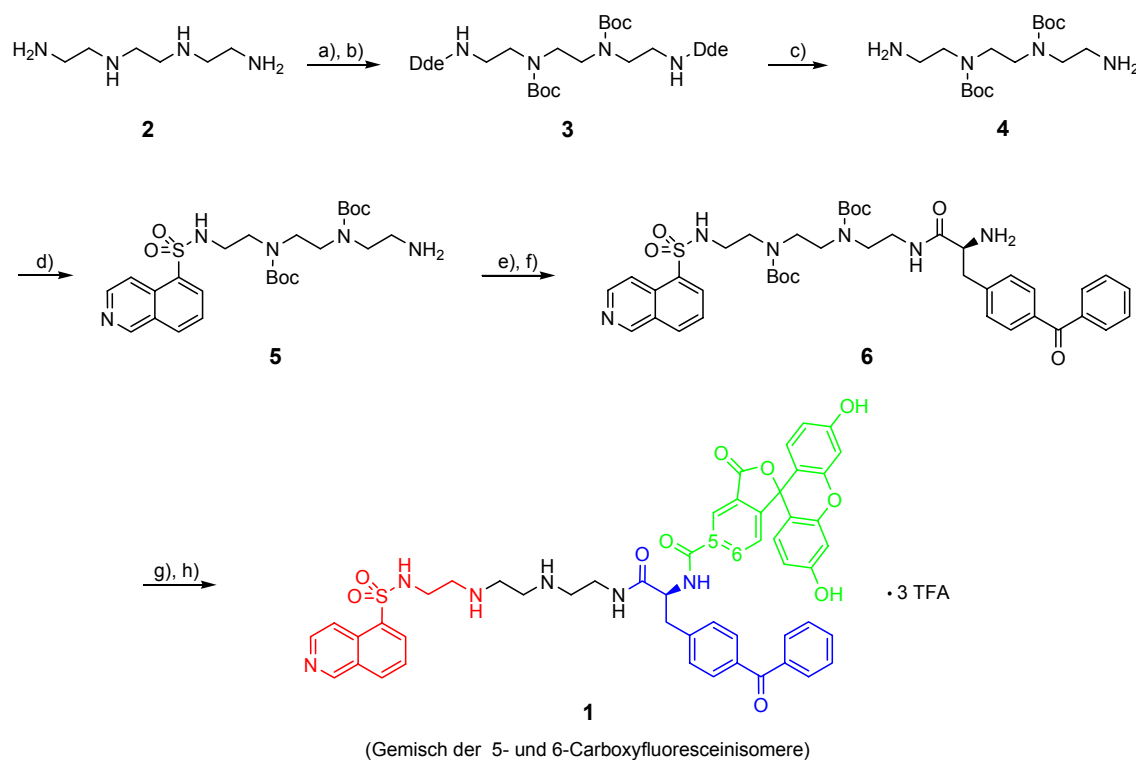


Abbildung 4.1: Synthese der von **H-9** abgeleiteten chemischen Sonde **1**, bestehend aus dem **Kinaseinhibitor H-9**, der photoreaktiven Gruppe **4-Benzoylphenylalanin**, und der fluoreszierenden Reportergruppe **5(6)-Carboxyfluorescein**.

a) 2-Acetyldimeton, DMF, RT, 16 h, 74 %; b) Boc₂O, DCM, 45 °C, 1 h, 89 %; c) N₂H₄ · H₂O, DCM, 50 °C, 6 h, 45 %; d) 5-Isochinolinsulfonylchlorid · HCl, NEt₃, CHCl₃, RT, 3 h, 63 %; e) EDC · HCl, NMM, Fmoc-Bpa-OH, HOBT · H₂O, DCM, RT, 16 h, 68 %; f) 4-(Aminomethyl)-piperidin, DCM, RT, 0,5 h, 85 %; g) EDC · HCl, NMM, 5(6)-Carboxyfluorescein, HOBT · H₂O, DCM/DMF (1:1), 0 °C → RT, 16 h, 45 %; h) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0,5 h, 99 %.

Ausgangspunkt der Synthese ist 1,8-Diamino-3,6-diazaoctan (**2**), dessen primäre und sekundäre Aminogruppen orthogonal geschützt werden (**3**). Selektives Entschützen der primären Aminogruppen durch Hydrazinolyse (**4**), gefolgt von Umsetzung mit Isochinolin-sulfonylchlorid-Hydrochlorid ergibt das Sulfonamid **5**. Dieses wird erst mit Fmoc-L-Benzoylphenylalanin und – nach Entschützen der Aminofunktion – mit 5(6)-Carboxy-fluorescein gekuppelt. Das Zielmolekül **1** wird nach Entschützen der sekundären Aminofunktionen des Linkers erhalten.

4.2 Synthese von Sonden-Derivaten für die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Die Affinität des modifizierten Inhibitors **1** gegenüber Modellkinasen wurde u. a. mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene immobilisierbare Derivate synthetisiert.

4.2.1 Synthese eines biotinylierten Sonden-Derivates

In einem ersten Ansatz wurde mit dem biotinylierten Molekül **8** eine Variante von **H-9** hergestellt, die auf einem Streptavidin-Sensorchip (SA-Chip) immobilisiert werden kann.

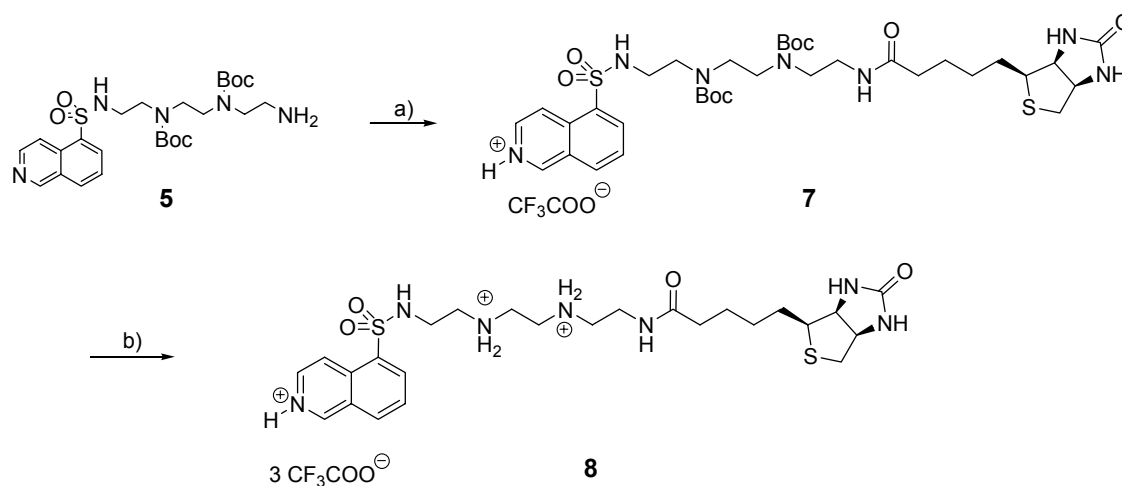


Abbildung 4.2: a) NHS-Sulfo-Biotin, PBS-Puffer, RT, 2 h, 98 %; b) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 2 h, 52 %.

Die Umsetzung von **5** mit NHS-aktiviertem Sulfo-Biotin verlief zufrieden stellend mit guter Ausbeute. Dagegen kam es im nächsten Schritt unerwarteter Weise zu Verlusten, da beim Abspalten der Boc-Schutzgruppen von **7** (mit der Standardmethode TFA in DCM) mehrere nicht isolierte Nebenprodukte entstanden, die allerdings mittels RP-HPLC leicht abgetrennt werden konnten. Das Vorliegen der als Trifluoracetat-Salz erhaltenen Zielverbindung **8** geht aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum hervor, in dem sich die Signale der Ringprotonen des Biotins sowie die der aromatischen Isochinolin-Protonen eindeutig zuordnen lassen. Auch das hochaufgelöste Massenspektrum (ESI-FT-ICR) belegt das Vorliegen von Verbindung **8**.

Die Synthese wurde nicht weiter optimiert, da sich der Streptavidin-Sensorchip als problematisch erwies. Zwar konnte das Molekül **8** auf dem Chip immobilisiert werden, jedoch stellte sich anschließend heraus, dass die unspezifische Bindung der Proteine am Streptavidin jede spezifische Bindung an dem immobilisierten Liganden **8** überlagerte (vgl. Kapitel 4.3.2). Auf die Synthese weiterer biotinylierter Derivate, z. B. mit Bpa (entspreche **6** + Biotin), um eine größerer Ähnlichkeit mit der Sonde **1** zu gewährleisten, wurde daher verzichtet.

4.2.2 Synthese des immobilisierbaren Derivates **12**

Um ein **H-9**-Derivat zu erhalten, das sich zum einen auf einem Sensorchip mit carboxymethylierter Dextranmatrix (CM5-Chip) immobilisieren lässt, und zum anderen eine möglichst hohe Ähnlichkeit mit der Sonde **1** aufweist, wurde die Inhibitor-Linker-Bpa-Einheit **6** (vgl. Abbildung 4.1) mit der Fmoc-geschützten 6-Aminohexansäure **10** (anstelle von 5(6)-Carboxyfluorescein) verknüpft (Abbildung 4.3). Prinzipiell könnte auch die Verbindung **6** direkt über die Aminogruppe des Bpa auf dem Chip immobilisiert werden. Allerdings wäre in diesem Fall die Benzoylphenyleinheit eventuell sterisch eingeschränkt, was sich negativ auf die Proteinbindung auswirken könnte. Dies wird durch die zusätzliche Linkereinheit in Form der Aminohexansäure vermieden. Des weiteren würde durch einen zu kurzen Linker der immobilisierte Ligand eventuell nicht mehr tief genug in die Bindungstasche des Proteins gelangen, um optimal wechselwirken zu können.

Die Synthese von **10** erfolgte nach einer Literaturvorschrift durch praktisch quantitative Umsetzung der 6-Aminohexansäure **9** mit Fmoc-OSu.^[144] Zur Aktivierung der Carboxylfunktion von **10** wurde das Kupplungsreagenz *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) eingesetzt.

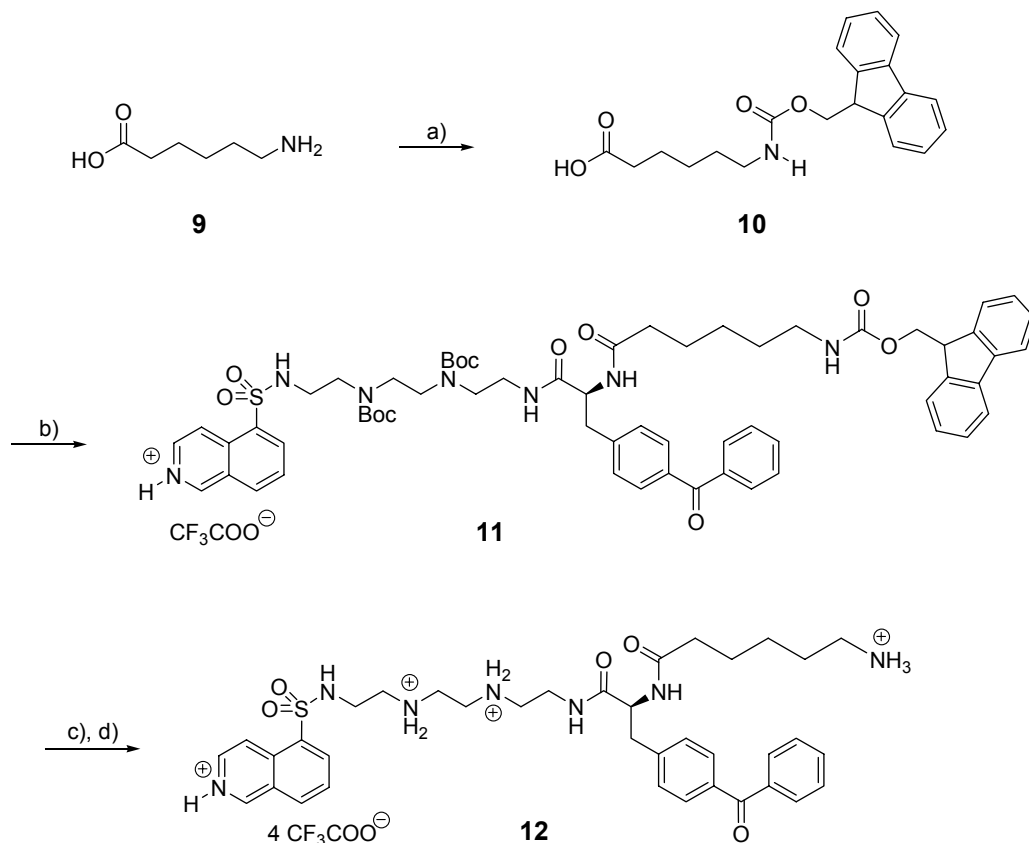


Abbildung 4.3: a) Fmoc-OSu, NaHCO₃, H₂O/Aceton (1:1), RT, 4 h, 99 %; b) **6**, EDC·HCl, NMM, Fmoc-6-aminohexansäure, HOBT·H₂O, DCM, 0 °C → RT, 16 h, 54 %; c) 4-(Aminomethyl)piperidin, DCM, RT, 1 h, 92 %; d) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0.5 h, 98 %.

Der allgemeine Mechanismus der Carbodiimid-Aktivierung von Carbonsäuren ist in Abbildung 4.4 wiedergegeben. Die Carbonsäure **I** wird mit einem beliebigen Carbodiimid **II** inkubiert. Das gebildete hochreaktive *O*-Acylisoharnstoffderivat **III** kann prinzipiell direkt mit einem Amin **IV** zum Amid **V** umgesetzt werden, wobei als Nebenprodukt ein Harnstoffderivat **VI** entsteht. **III** neigt jedoch zur Umlagerung in das unreaktive *N*-Acylharnstoffderivat **VII**, deshalb wird es durch Zugabe von 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol **VIII**

(HOBT) in den stabileren Aktivester **IX** überführt, welcher dann mit dem Amin reagiert.^e HOBT wirkt also als Acyltransferreagenz. Alternativ lassen sich zu diesem Zweck u. a. auch DMAP (vgl. Abbildung 4.28) oder *N*-Hydroxysuccinimid einsetzen.

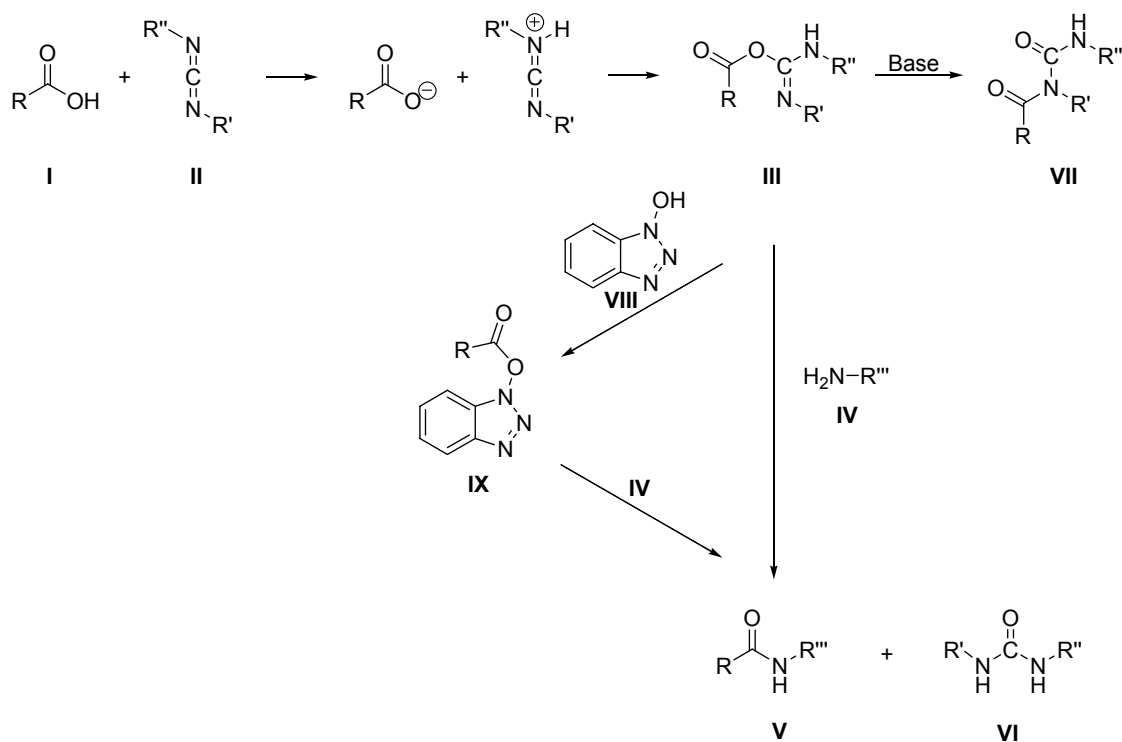


Abbildung 4.4: Mechanismus der Carbodiimid-Carbonsäureaktivierung unter Beteiligung von HOBT (EDC: R' = Ethyl, R'' = 3-Dimethylaminopropyl; DCC: R' = R'' = Cyclohexyl; DIC: R' = R'' = Isopropyl).

Da EDC – im Gegensatz zu dem üblicheren *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bzw. *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) – in wässriger Lösung einsetzbar ist, ergeben sich auch bei Einsatz des besser verfügbaren HOBT-Hydrats (HOBT · H₂O) anstelle von HOBT keine Probleme. Die Base *N*-Methylmorpholin dient zur Freisetzung des nur als Hydrochlorid erhältlichen EDC.

Die nur mäßig befriedigende Ausbeute der auf diese Weise erhaltene Verbindung **11** (Abbildung 4.3) ist auf das Entstehen von (nicht näher analysierten) Nebenprodukten

^e Durch die Umsetzung mit HOBT wird im Fall aktivierter Aminosäuren außerdem die über eine Oxazolombildung ablaufende Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom unterdrückt.

zurückzuführen, welche sich nur durch wiederholte präparative RP-HPLC abtrennen ließen. Da die letztendlich erzielte Menge an Produkt **12** für die geplanten Untersuchungen ausreichend war, wurde auf eine Optimierung verzichtet. Die Verbindung **11** wurde anschließend durch vollständiges Entschützen in das Zielmolekül **12** überführt, dabei erfolgten sowohl die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch 4-Aminomethylpiperidin (4-AMP) als auch die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in guter Ausbeute. Die mit 92 % etwas geringere Ausbeute bei der Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe ist dabei wahrscheinlich auf den zusätzlichen Reinigungsschritt per RP-HPLC zur Entfernung des Adduktes aus 4-AMP und Dibenzofulven zurückzuführen.

Das Vorliegen der Verbindung **12** wird durch das hochaufgelöste Massenspektrum, in welchem die Signale der ein- bzw. zweifach protonierten Spezies $[M+H]^+$ bzw. $[M+2H]^{2+}$ erscheinen, eindeutig belegt.

4.2.3 Synthese von Kontrollverbindungen für SPR-Untersuchungen bzw. für die Photoaffinitätsmarkierung

Um den Einfluss der am Inhibitor **H-9** durchgeführten Modifikationen auf dessen Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurden verschiedene Kontrollverbindungen synthetisiert (z. B. mit einem zusätzlichen Linker bzw. einem anderen Fluoreszenzfarbstoff). Des Weiteren wurde ein Derivat ohne **H-9**-Einheit dargestellt, um die unspezifische Affinität einer der Komponenten auszuschließen.

4.2.3.1 Synthese des 5(6)-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylesters **14**

Allgemein stellt bei Synthesen mit 5(6)-Carboxyfluorescein die Aufarbeitung ein Problem dar. Carboxyfluoresceinhaltige Verbindungen haften sehr gut an Kieselgel und lassen sich nur unvollständig eluieren. Deshalb ist eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel nur unter Inkaufnahme von Verlusten möglich, was sich in den relativ geringen Ausbeuten widerspiegelt. Dies gilt – wenn auch in geringerem Ausmaß – ebenso für die Aufreinigung mittels RP-HPLC.

Obwohl sich 5(6)-Carboxyfluorescein **13** mit gängigen Kupplungsreagenzien auch *in situ* aktivieren lässt, wurde bei den folgenden Synthesen der Einsatz des *N*-Succinimidylesters **14** (Abbildung 4.5) vorgezogen. Auf diese Weise kann der Zusatz von Kupplungsreagenzien vermieden und somit die Aufarbeitung der Reaktionsgemische erleichtert werden.

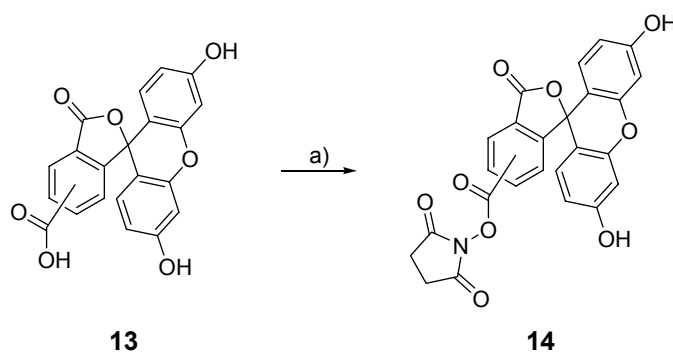


Abbildung 4.5: a) DCC, NHS, THF, RT, $\bar{u}N$, 62 %.

Carboxyfluorescein löst sich in den normalerweise für Kupplungsreaktionen eingesetzten Lösungsmitteln wie DCM oder auch DMF nur sehr schlecht, daher wurde die Darstellung des *N*-Succinimidylesters **14** in THF durchgeführt. Als Kupplungsreagenz wurde in diesem Fall DCC eingesetzt. Da *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) die aktivierte Carbonsäure ohnehin in einen Aktivester überführt, ist eine Zugabe von HOBT überflüssig.

Die Trennung der 5- und 6-Isomere des *N*-Succinimidylesters **14** mittels Säulenchromatographie ist möglich, allerdings geschah dies hauptsächlich zu analytischen Zwecken, d. h. um in den NMR-Spektren die Signale dem jeweiligen Isomer zuordnen zu können. In der Regel wurden die weiteren Syntheseschritte mit dem Isomerengemisch durchgeführt, eine Ausnahme stellt die Synthese von Verbindung **25** dar (siehe Kapitel 4.2.3.7).

4.2.3.2 Synthese eines Derivates mit zusätzlicher Linkereinheit zwischen Bpa und Carboxyfluorescein

Um zu überprüfen, ob das sterisch anspruchsvolle Carboxyfluorescein die Bindung der Sonde im aktiven Zentrum beeinträchtigt, wurde zum einen ein Derivat mit einer zusätzlichen Linkereinheit zwischen Bpa und Fluoreszenzfarbstoff synthetisiert (Abbildung 4.6). Des weiteren wurden auch Derivate mit dem sterisch weniger anspruchsvollen Fluores-

zenzfarbstoff 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure dargestellt (siehe Kapitel 4.2.3.3 bis 4.2.3.5).

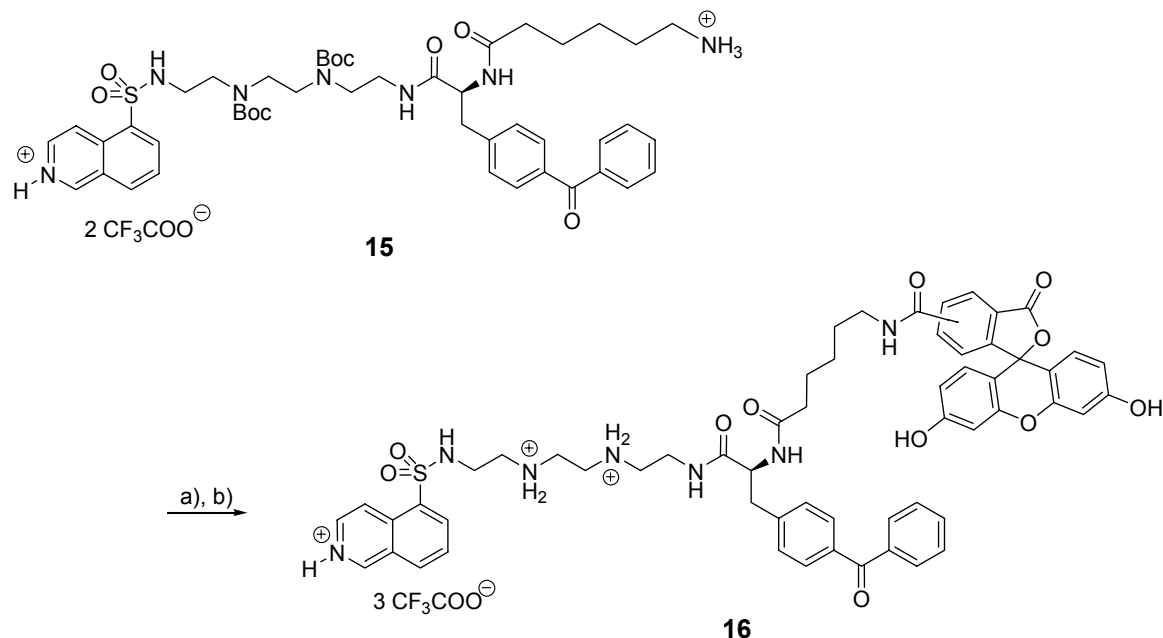


Abbildung 4.6: a) **14** (Isomerenmischung), DIPEA, THF, RT, $\bar{u}N$, 49 %; b) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0,5 h, quantitativ.

Die Synthese des Kontrollderivates **16** geht von der Boc-geschützten Vorstufe **15** (Abbildung 4.6) der immobilisierbaren Verbindung **12** (Abbildung 4.3) aus. Die Reaktion mit dem 5(6)-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester **14** läuft laut Reaktionskontrolle per MALDI-ToF-MS und analytischer RP-HPLC unter vollständiger Umsetzung des Edukts ab. Die schon diskutierten Aufarbeitungsprobleme führen allerdings auch in diesem Fall zu Verlusten, so dass die isolierte Ausbeute in diesem ersten Schritt lediglich 49 % beträgt. Die anschließende Abspaltung der Boc-Schutzgruppen führt quantitativ zu der Zielverbindung **16**. Deren Vorliegen wird durch das NMR-Spektrum und insbesondere die MS-Spektren belegt. Im ESI-MS taucht neben den Signalen der zweifach bzw. einfach positiv geladenen Spezies, $[M+2H]^{2+}$ (m/z 530.9) und $[M+H]^+$ (m/z 1060.7), auch das Signal des deprotonierten Moleküls $[M-H]^-$ (m/z 1058.5) auf, dessen Existenz auf die Anwesenheit der aciden phenolischen OH-Gruppen zurückzuführen ist. Das hochaufgelöste Massenspektrum zeigt ebenfalls den $[M+2H]^{2+}$ - sowie den $[M+H]^+$ -Peak.

4.2.3.3 Synthese von 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure **19** als alternativem Fluoreszenzfarbstoff

Der Fluoreszenzfarbstoff 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure **19** wurde nach der Literaturvorschrift von Bonsignore *et al.* dargestellt (Abbildung 4.7).^[145] Im ersten Schritt wird der 4-Diethylamino-2-hydroxybenzaldehyd **17** in einer Knoevenagel-Kondensation mit Malonsäurediethylester in Anwesenheit katalytischer Mengen Piperidin und Essigsäure zum 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäureethylester **18** umgesetzt. Nach Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel wurde **18** als orangefarbener Feststoff in einer Ausbeute von 79 % isoliert; in der Literatur wurde mit 80 % Ausbeute ein Öl erhalten.^[145]

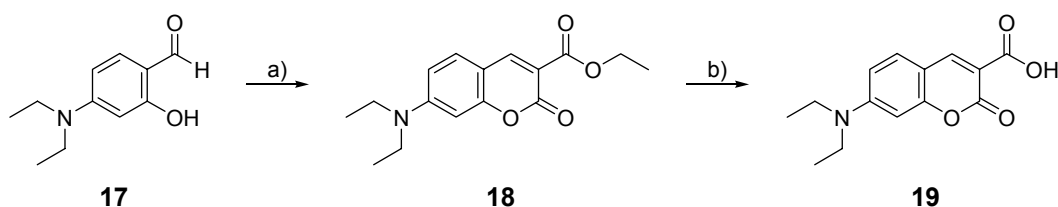


Abbildung 4.7: a) Malonsäurediethylester, Piperidin, Essigsäure, Ethanol, Rückfluss, 24 h, 79 %; b) 20%ige NaOH, Rückfluss, 1,5 h, 91 %.

Die Verseifung von **18** zur 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure **19** erfolgt durch Refluxieren in 20 %iger Natronlauge. Das Produkt fällt nach Ansäuern als gelber Feststoff aus. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu stark angesäuert wird, da sonst die am Stickstoff protonierte Verbindung wieder in Lösung geht. Die Verbindung **19** liegt nach Abfiltrieren und Waschen mit Diethylether analysenrein vor, die Ausbeute beträgt 91 % (Literatur^[145]: 90 %). Die Signale der aufgenommenen NMR-Spektren können eindeutig zugeordnet werden. Im MALDI-ToF-MS erscheint neben den Signalen der $[M+H]^+$ -, $[M+Na]^+$ - und $[M+K]^+$ -Ionen bei m/z 262.2, 284.3 und 300.2 auch das für Carbonsäuren typische Signal des $[M-H+2Na]^+$ -Ions bei m/z 306.3.

4.2.3.4 Synthese eines Derivates mit 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure anstelle von Carboxyfluorescein

Da das Kontrollderivat **20** bis auf den ausgetauschten Fluoreszenzfarbstoff mit der Verbindung **1** identisch ist (vgl. Abbildung 4.1), erfolgt die Synthese praktisch analog. Die 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure **19** wird durch EDC/HOBt aktiviert und mit der Verbindung **6** gekuppelt. Da dieser Schritt nur einmal durchgeführt wurde, kann die Ausbeute von 71 % noch optimiert werden. Nach Aufreinigung der Zwischenstufe mittels präparativer RP-HPLC sowie acidolytischer Entfernung der Boc-Schutzgruppen wurde das Cumarinderivat **20** in Form des Trifluoracetat-Salzes als gelber Feststoff erhalten (Abbildung 4.8).

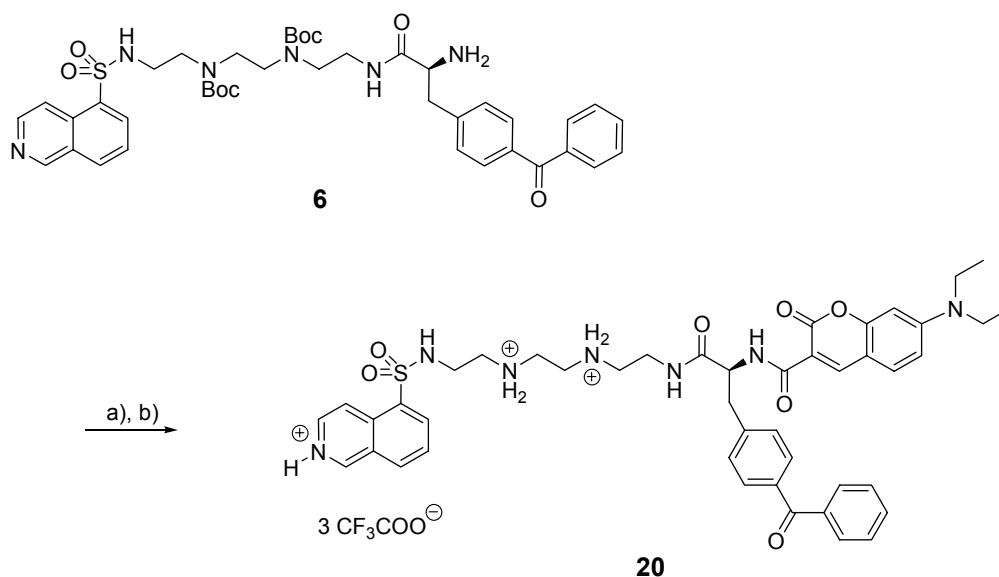


Abbildung 4.8: a) **19**, EDC·HCl, NMM, HOBt·H₂O, DCM, 0 °C → RT, üN, 71 %;
b) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0.5 h, 97 %.

Das Vorliegen der Verbindung **20** wird durch die NMR-Spektren sowie die MS-Daten eindeutig belegt. Insbesondere die Signale der Cumarinprotonen weisen charakteristische Kopplungsmuster auf. Das im negativen Modus aufgenommene ESI-MS zeigt bei m/z 830.5 und m/z 868.4 die Signale der $[M-H]^-$ - bzw. $[M-2H+K]^-$ -Ionen, während im hochaufgelösten Massenspektrum (ESI-FT-ICR) sowohl der $[M+H]^+$ - als auch der $[M+Na]^+$ -Peak bei m/z 832.3 bzw. m/z 854.3 aufzufinden sind.

4.2.3.5 Synthese eines Derivates mit zusätzlicher Linkereinheit zwischen Bpa und 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure

Die Darstellung der Verbindung **21** mit zusätzlicher Linkereinheit zwischen Bpa und Cumarin geht, genau wie die Synthese des entsprechenden carboxyfluoresceinhaltigen Analogons **16** (siehe Abbildung 4.6), von dem Boc-geschützten Vorläufer **15** des immobilisierbaren Derivates **12** aus. Die Kupplung mit dem Cumarinfarbstoff **19** erfolgte auch hier mittels EDC/HOBt (Abbildung 4.9). Die mittelmäßige Ausbeute dieses Schrittes lässt sich wahrscheinlich auf die kleine Ansatzgröße von nur wenigen Milligramm zurückführen, da die normalen Verluste bei der Aufreinigung sich hier besonders stark bemerkbar machen.

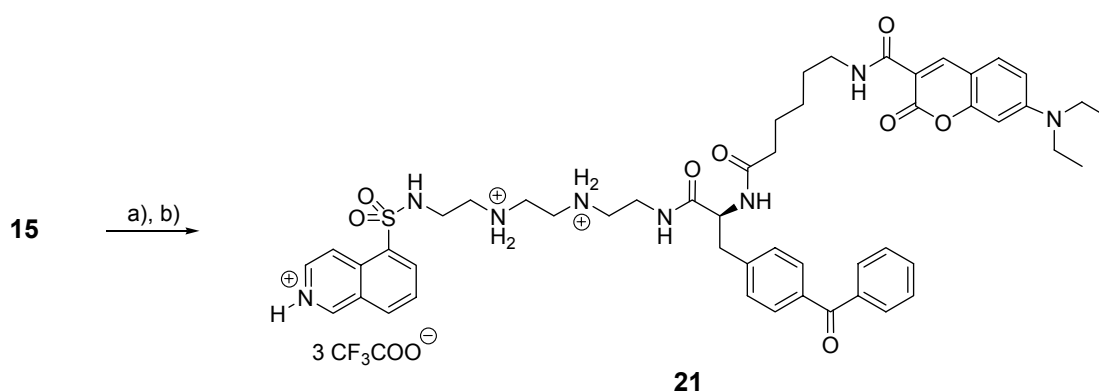


Abbildung 4.9: a) **19**, EDC·HCl, NMM, HOBt·H₂O, DCM, 0 °C → RT, üN, 45 %;
b) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0.5 h, 65 %.

Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppen und der in diesem Fall notwendigen Aufreinigung mittels RP-HPLC wurde **21** als gelber voluminöser Feststoff in 65 % Ausbeute erhalten. Da die bei diesem Ansatz erzielte Produktmenge für die geplanten Experimente ausreichend war, wurde keine Syntheseoptimierung betrieben.

4.2.3.6 Synthese eines Kontrollderivates ohne H-9-Einheit für die Photoaffinitätsmarkierung

Um sicherstellen zu können, dass nur die von der Inhibitoreinheit der Sonde **1** erkannten Proteine bei Bestrahlung markiert werden, wurde ein Kontrollderivat ohne **H-9**-Einheit synthetisiert (siehe Kapitel **4.4.3**).

Eine mögliche Syntheseroute zur Darstellung des Derivates **24** (Abbildung 4.10), welches bis auf die fehlende **H-9**-Einheit mit der Sonde **1** identisch ist, wäre ausgehend vom geschützten Linker **4** denkbar (Abbildung 4.1). Anstatt diesen mit Isochinolin-5-sulfonylchlorid umzusetzen, könnte direkt eine Kupplung mit Fmoc-Bpa-OH durchgeführt werden, gefolgt von der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Kupplung mit Carboxyfluorescein. Allerdings wäre vor dem Entschützen des Bpa ein zusätzlicher Syntheseschritt erforderlich, um die terminale Aminogruppe des Linker-Bpa-Konstruktes zu schützen.

Da außerdem die Synthese des Linkers **4** nicht trivial ist,^[143] wurde die Synthesereihenfolge im Vergleich zu Abbildung 4.1 derart geändert, dass erst das kommerziell erhältliche Fmoc-Bpa-OH **22** mit NHS-Carboxyfluorescein **14** gekuppelt wurde, obwohl es in der Regel wegen der in Abschnitt 4.2.3.1 diskutierten Probleme bei der Aufarbeitung vorteilhaft ist, das Carboxyfluorescein möglichst spät in das Molekül einzubauen.

Das Entschützen des Fmoc-Bpa-OH **22** sowie die anschließende Umsetzung mit dem NHS-aktivierten Carboxyfluorescein **14** zur Verbindung **23** erfolgte ohne Isolierung des entschützten Zwischenproduktes. Das Fmoc-Bpa-OH **22** wurde zuerst mit Hilfe von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethylpolystyrol entschützt.^[146] Das DBU dient zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, während die Thiolgruppe des festphasengebundenen Reagenzes das dabei entstehende Dibenzofulven abfängt, so dass das polymere Addukt anschließend einfach abfiltriert werden kann. Da im folgenden Schritt ohnehin eine Hilfsbase benötigt wird, bereitet der Verbleib des DBU im Reaktionsgemisch keine Probleme.

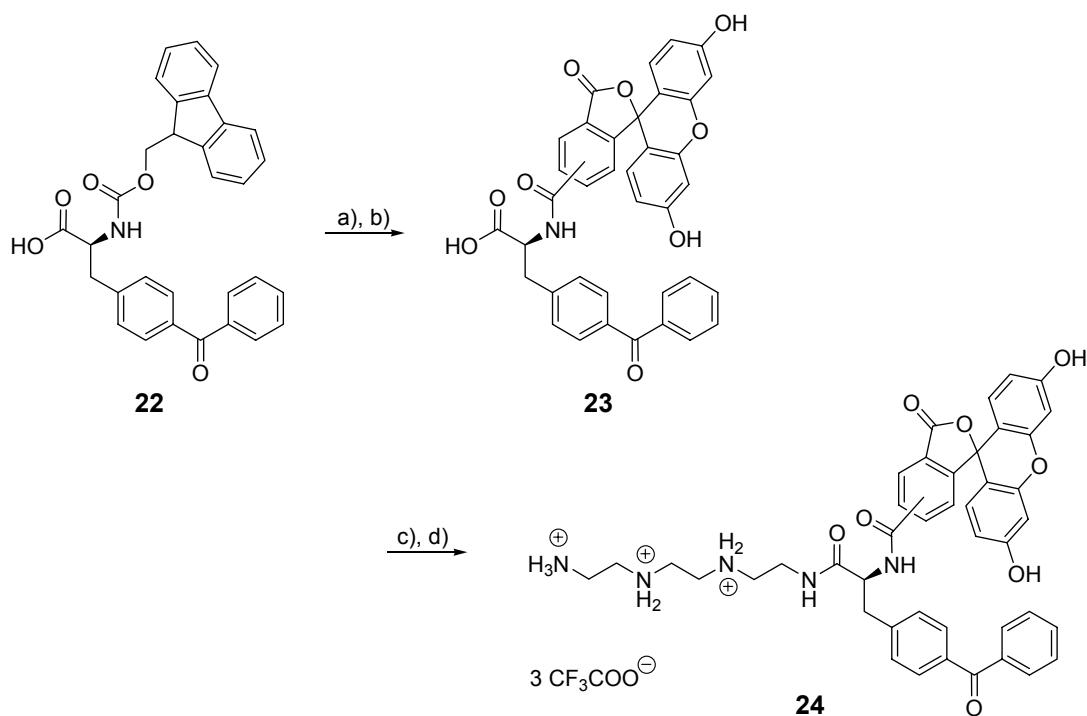


Abbildung 4.10: a) *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethylpolystyrol, DBU, THF, RT, 1.5 h, b) **14** (Isomerengemisch), DBU, THF, RT, 2 h, 42 %; c) **4**, EDC·HCl, NMM, HOBt·H₂O, DCM, 0 °C → RT, 16 h, 20 %; d) TFA:DCM (3:7 v/v), RT, 0.5 h, 97 %.

Bei der Reaktion von **23** mit dem Boc-geschützten Linker **4** konnten lediglich 20 % des gewünschten Produktes isoliert werden, da zum einen aus ungeklärter Ursache das Edukt nur unvollständig umgesetzt wurde, zum anderen wurde die Entstehung einiger Nebenprodukte festgestellt. Da jedoch die nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erhaltene Menge der Zielverbindung **24** für die geplanten Experimente ausreichend war, wurde keine Optimierung der nur einmal durchgeführten Synthese hinsichtlich höherer Ausbeuten betrieben.

4.2.3.7 Synthese eines Kontrollderivates ohne Bpa

Das Kontrollderivat **25**, welches bis auf die fehlende Bpa-Einheit mit der Sonde **6** identisch ist, kann ausgehend von der Verbindung **4** in zwei Syntheseschritten erhalten werden (Abbildung 4.11). Der erste Schritt stellt die Kupplung mit isomerenreinem 5-Carboxy-

fluorescein-*N*-succinimidylester **14** dar (vgl. Kapitel 4.2.3.1). Die Ausbeute von lediglich 71 % lässt sich auf die oben diskutierten Probleme bei der säulenchromatographischen Aufreinigung von carboxyfluoresceinhaltigen Verbindungen zurückführen (Kapitel 4.2.3.1). Durch anschließendes Abspalten der Boc-Schutzgruppen mit TFA in DCM wird das analysenreine Trifluoracetat-Salz der Verbindung **25** erhalten.

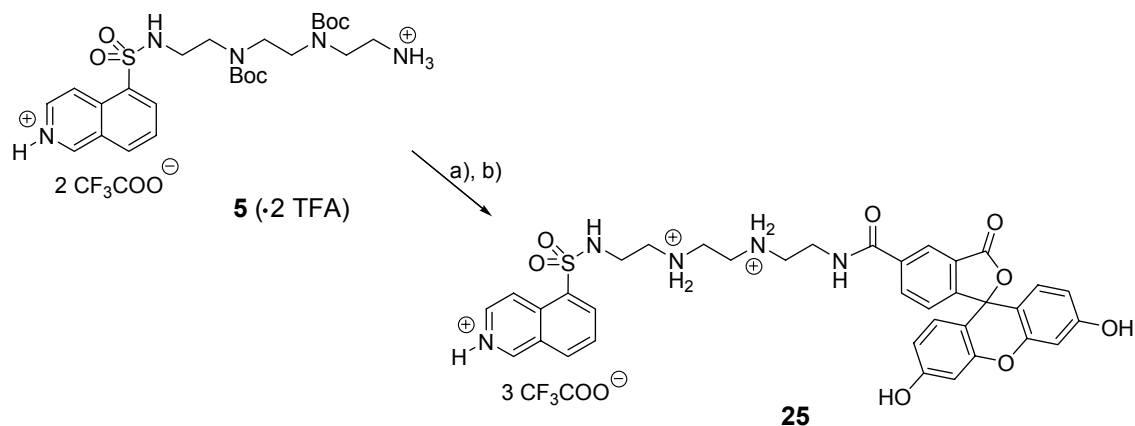


Abbildung 4.11: a) **14** (5-Isomer), THF, RT, 2.5 h, 71 %; b) TFA/DCM (3:6 v/v), RT, 0.5 h, 99 %.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **25** weisen die Signale der aromatischen Protonen sowohl des Isochinolins als auch des 5-Carboxyfluoresceins klare Kopplungsmuster auf, so dass mit Hilfe der Kopplungskonstanten eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich ist. Im ESI-MS erscheinen bei m/z 348.7 und 696.4 die Signale des $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ions bzw. des $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions, und auch durch das hochaufgelöste Massenspektrum wird die Existenz der Verbindung **25** belegt.

4.3 Oberflächenplasmonresonanz-Studien

Die Oberflächenplasmonresonanzuntersuchungen (SPR-Studien) wurden auf dem Biacore[®] 3000 der Firma Biacore AB durchgeführt. Das Resonanzsignal (in *resonance units*, RU) wurde kontinuierlich aufgenommen und in Form von Sensorgrammen dargestellt. Bei den Bindungsexperimenten wurde die Analytlösung sowohl in die Referenz- als auch in die Messflusszelle injiziert; alle entsprechenden Sensorgramme sind durch Subtraktion des Signals der Referenzzelle korrigiert (sofern nicht anders angegeben).

4.3.1 Proteine

Für die Oberflächenplasmonresonanzmessungen wurden zwei verschiedene Kinasen eingesetzt. Zum einen wurde die cAMP-abhängige Proteinkinase A verwendet, da der derivatisierte Inhibitor **1** auf Grundlage der Kristallstruktur dieses Enzyms entworfen wurde. Außerdem wurde die Proteinkinase A bereits sehr gut untersucht und dient sozusagen als Modell-Proteinkinase (vgl. Kapitel 2.2).^[97a] Als zweites Enzym wurde Kreatinkinase verwendet, da sich bei ersten Experimenten zur Photoaffinitätsmarkierung (siehe Kapitel 4.4.1) gezeigt hatte, dass auch dieses Enzym zur Zielgruppe der chemischen Sonde **1** gehört. Bei der Kreatinkinase handelt es sich nicht um eine Proteinkinase, sie wurde ausgewählt, um die Eignung von **1** als familienübergreifende Kinasesonde zu demonstrieren.

cAMP-abhängige Proteinkinase A, cAPK, Proteinkinase A, PKA

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A liegt als Heterotetramer (~180 kDa) aus jeweils zwei katalytischen und regulatorischen Untereinheiten vor (vgl. Kapitel 2.2).

Für die Oberflächenplasmonresonanzuntersuchungen wurde die katalytische Untereinheit (~41 kDa) der PKA aus Rinderherz eingesetzt. Im Fall des Heterotetramers müssten die katalytischen Untereinheiten durch Zusatz von cAMP aktiviert werden, während dies im vorliegenden Fall aus nahe liegenden Gründen entfällt.

Kreatinkinasen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf Kreatin ($\text{ATP} + \text{Kreatin} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{Kreatinphosphat}$). Kreatinkinasen sind dimere Enzyme, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, M (*muscle*) und B (*brain*), die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 39-42 kDa besitzen. Aus diesen Untereinheiten ergeben sich drei dimere cytosolische Isoenzyme: die vor allem im Zentralnervensystem lokalisierte Kreatinkinase CK-BB, die in der gestreiften Skelettmuskulatur und im Herzmuskel exprimierte CK-MM, sowie die Mischform CK-MB.^[147,148] Letztere findet sich im Herz (speziell im Myokard) und dient als diagnostischer Marker u. a. des akuten Myokardinfarkts (Herzinfarkts).^[149] Es existiert außerdem eine mitochondriale Kreatinkinase CK-MiMi.^[150] In der vorliegenden Arbeit wurde Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel (~ 81 kDa)^[148] verwendet.

4.3.2 Bindungsversuche mit dem Streptavidin-Sensorchip

Die Immobilisierung des biotinylierten Liganden **8** auf dem Streptavidin-Sensorchip erfolgte einfach durch Spülen der Sensoroberfläche mit einer ~ 1.1 mM Lösung von **8** in HBS-EP-Puffer, da aufgrund der hochaffinen Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin ($K_D \approx 10^{-15}$ M),^[151] deren Stabilität annähernd einer kovalenten Bindung entspricht, zur Immobilisierung keine Kupplungschemie notwendig ist. In der Messzelle konnte ein Immobilisierungsniveau von 67 RU erreicht werden.

Nach Spülen des Systems mit Phosphatpuffer wurden Proteinlösungen (2.2 μM Proteinkinase A bzw. 26 μM Kreatinkinase in Phosphatpuffer) sowohl in die Referenzzelle als auch in die Messzelle injiziert (genauer gesagt durchfließt die injizierte Analytlösung erst die Referenzzelle und dann die Messzelle).

Wie in dem Sensorgramm der Bindungsstudie mit Proteinkinase A (Abbildung 4.12) zu erkennen ist, steigt die Kurve der Referenzzelle (rot) stärker an als die der Messzelle (grün). Dies bedeutet, dass sich auf der Sensoroberfläche in der Referenzzelle, wo **8** nicht immobilisiert wurde, mehr Proteinkinase A anlagert als in der Messzelle mit dem immobilisierten Biotinderivat **8**.

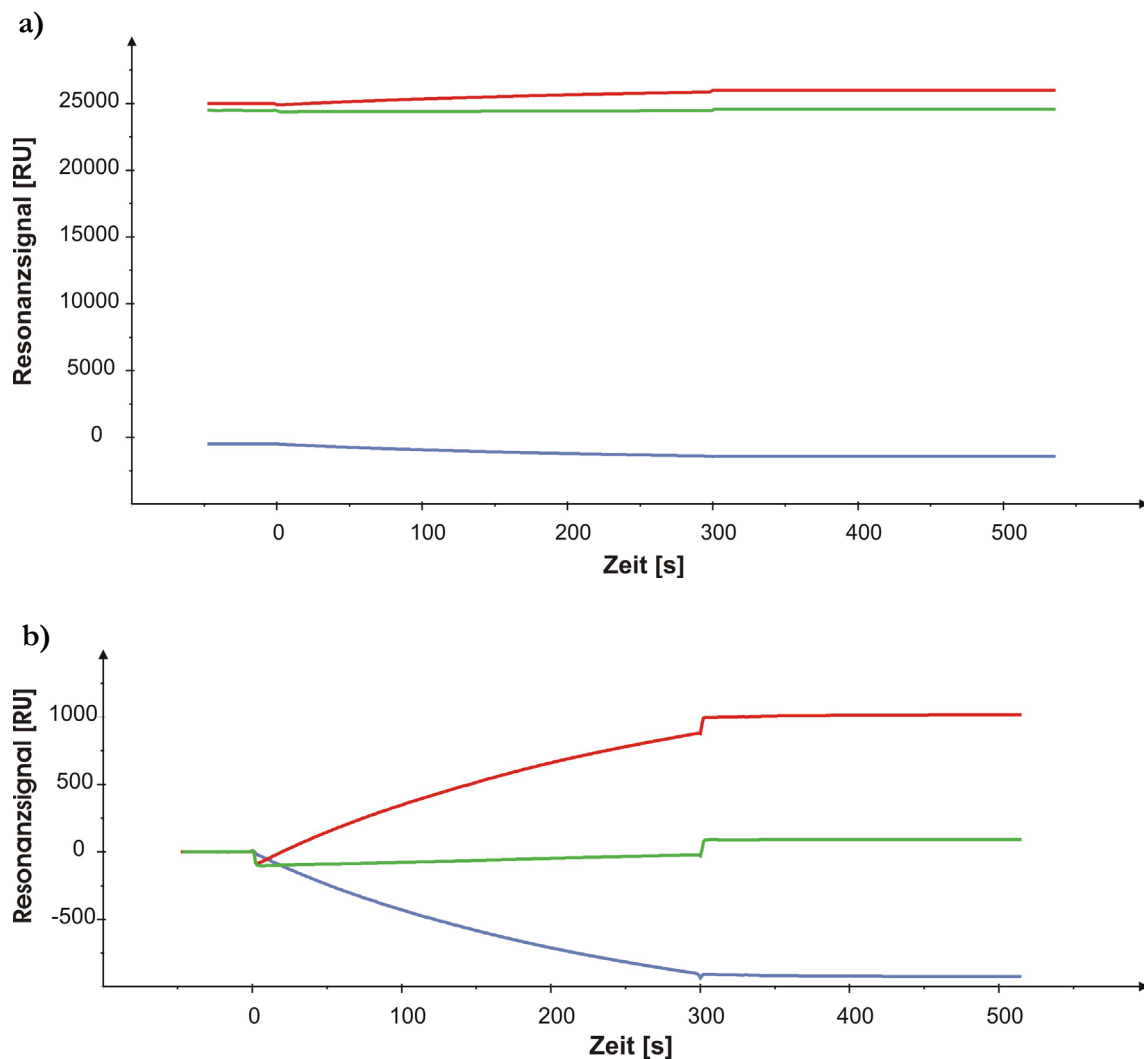


Abbildung 4.12: Unspezifische Bindung von Proteinkinase A an Streptavidin.

a) abgebildet sind die Resonanzsignale von **Referenzflusszelle** und **Messzelle** sowie das durch **Referenzsubtraktion** erhaltene Signal; b) zum besseren Vergleich wurden die Kurven vergrößert und auf Null normiert.

Da das eigentliche Resonanzsignal (blau) durch Subtraktion des Signals der Referenzzelle von dem der Messzelle erhalten wird (Referenzsubtraktion), resultiert in diesem Fall eine negative Steigung der Messkurve, die vortäuscht, dass keine Assoziation stattfindet, sondern im Gegenteil immobilisierte Moleküle abdissoziieren.

Dieses Verhalten lässt sich mit einer starken unspezifischen Bindung an Streptavidin erklären, die auch im Fall der Kreatinkinase zu beobachten war (Abbildung 4.13). Bei dem abrupten Abfall bzw. Anstieg des Signals zu Beginn und Ende der Analytinjektion handelt es sich um einen so genannten Puffersprung. Dieser tritt auf, wenn die Analytlösung einen

anderen Brechungsindex aufweist als der Laufpuffer (z. B. durch unterschiedliche Salzkonzentrationen); durch die Referenzsubtraktion wird dieser in der Regel herausgerechnet.

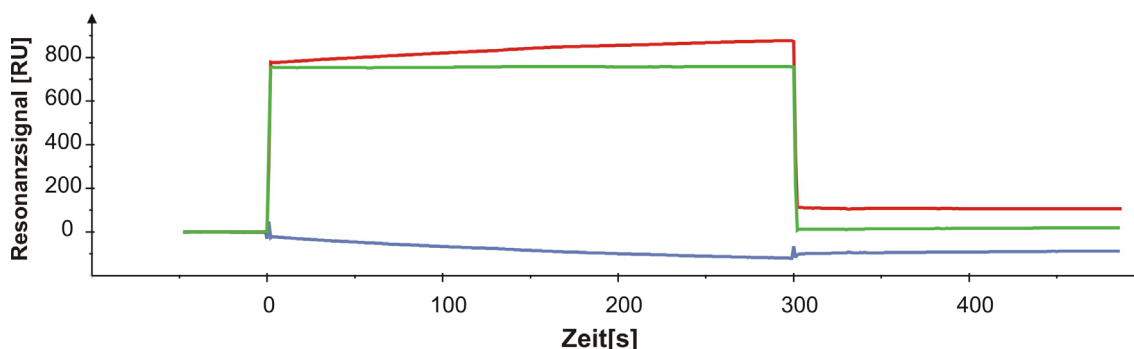


Abbildung 4.13: Unspezifische Bindung von Kreatinkinase an Streptavidin.

Abgebildet sind die Resonanzsignale von **Referenzflusszelle** und **Messzelle** sowie das durch **Referenzsubtraktion** erhaltene Signal (die Kurven wurden auf Null normiert, Abbildung 4.12 b).

Auf weitere Experimente mit dem Streptavidin-Sensorchip wurde verzichtet und stattdessen ein Sensorchip mit carboxymethylierter Dextranmatrix (CM5-Chip) verwendet.

4.3.3 Immobilisierung von **12** auf dem CM5-Sensorchip

Zur Immobilisierung von **12** auf dem CM5-Sensorchip wird die endständige Aminogruppe des Liganden mit der aktivierten carboxymethylierten Dextranmatrix gekuppelt. Die Aktivierung der Carboxylgruppen erfolgt durch Spülen der Sensoroberfläche sowohl der Referenz- als auch der Messzelle mit einer EDC/NHS-haltigen Lösung. Als Laufpuffer wird HBS-EP Puffer (pH 7.4) verwendet, da bei diesem pH-Wert die Carboxylgruppen der Matrix vollständig deprotoniert vorliegen und somit einer hoher Aktivierungsgrad erreicht werden kann. Der Ligand **12** wird in demselben Puffer gelöst, da ein zu niedriger pH-Wert wegen der protoniert vorliegenden Aminogruppe eine effektive Kupplung verhindern würde, und die Lösung in die Messzelle injiziert. Die durch Reaktion der Aminogruppe mit dem NHS-Ester ausgebildete Amidbindung gewährleistet eine stabile Anbindung des Liganden an die Sensoroberfläche. Die anschließende Deaktivierung nicht umgesetzter NHS-Ester erfolgt durch Spülen der Sensoroberfläche mit Ethanolamin. Auch dieser Schritt wird sowohl in der Referenz- als auch in der Messzelle durchgeführt. Das eigentlich

unnötige Aktivieren/Deaktivieren der Sensoroberfläche in der Referenzflusszelle wird durchgeführt, um eine größtmögliche Gleichbehandlung von Referenz- und Messflusszelle zu gewährleisten. Auf diese Weise werden unspezifische Veränderungen der Sensoroberfläche durch die Referenzsubtraktion normalisiert.

Neben der gewünschten Immobilisierung über die endständige, primäre Aminogruppe des Moleküls **12** ist prinzipiell auch eine Immobilisierung über die sekundären Aminogruppen des Linkers denkbar. Diese reagieren jedoch zum einen langsamer, zum anderen sollten derart angebundene Moleküle nur eine geringe bis keine Affinität mehr aufweisen und die Untersuchungen lediglich dahingehend beeinflussen, dass weniger Liganden als theoretisch möglich mit dem Analyten wechselwirken.

Die bei den ersten Immobilisierungsversuchen eingesetzte 0.17 mM Lösung von **12** führte nach 7-minütiger Injektion zu Immobilisierungsniveaus von 160 bis 180 RU. Bei nachfolgenden Immobilisierungen wurden dagegen mit einer gleich konzentrierten Lösung Immobilisierungsniveaus von 100 RU bzw. 280 RU erreicht. Andererseits kam es auch vor, dass mit der 0.17 mM Lösung lediglich ein Immobilisierungsniveau unterhalb von 50 RU realisiert werden konnte. Die beträchtlichen Niveauunterschiede sind höchstwahrscheinlich auf Schwankungen in der Qualität bzw. Reaktivität des EDC zurückzuführen, welche das Ausmaß der Aktivierung der Dextranmatrix und damit die Kupplungseffizienz beeinflussen. Im letzten Fall wurden durch 6-minütige Injektion der fünfmal so konzentrierten Stammlösung in eine unbenutzte Flusszelle des betreffenden Chips ~370 RU immobilisiert.

Die so beladenen Sensorchipoberflächen konnten erfolgreich zur Untersuchung diverser Wechselwirkungen eingesetzt werden.^f Die jeweiligen Immobilisierungsniveaus sind bei den entsprechenden Bindungsstudien angegeben.

^f Der zuerst als Laufpuffer verwendete Phosphat-Puffer (100 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7.0) erwies sich als ungeeignet, da weder bei PKA noch bei Kreatinkinase eine spezifische Bindung am Liganden beobachtet werden konnte. Durch Wechsel des Laufpuffers zu Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.0) konnte dieses Problem jedoch behoben werden.

4.3.4 Bindung von Proteinkinase A an immobilisiertem **12**

Die Bindung von Proteinkinase A (PKA) an dem immobilisierten Liganden **12** wurde durch Injektion verschieden konzentrierter Lösungen der katalytischen Untereinheit der PKA untersucht. In Abbildung 4.14 ist das Sensorgramm dieser Konzentrationsreihe wiedergegeben. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität des Resonanzsignals mit der Konzentration des Analyten direkt korreliert.

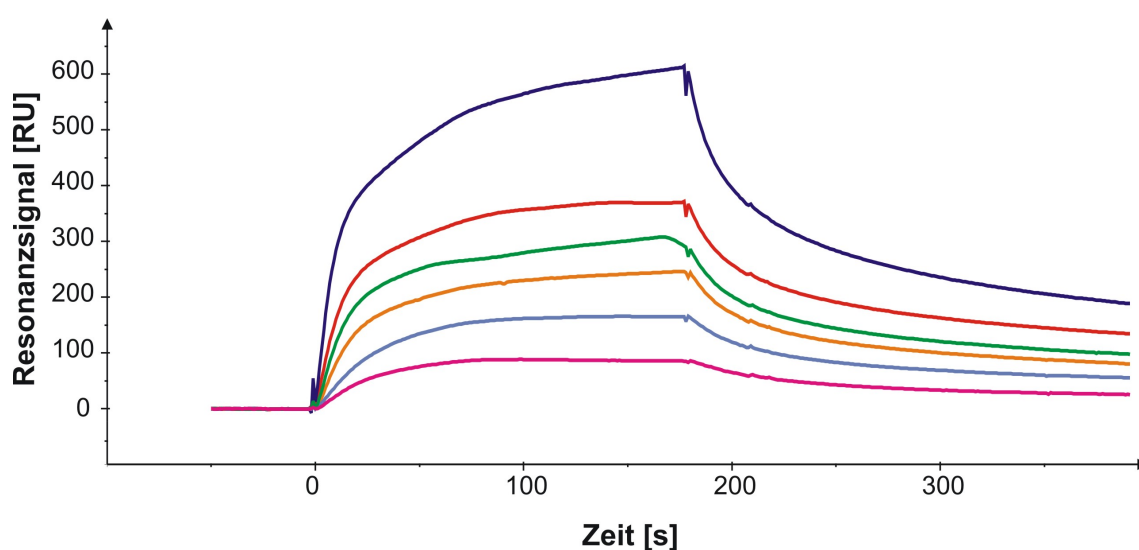


Abbildung 4.14: Konzentrationsabhängige Bindung von PKA an immobilisiertem **12**.

Konzentration der katalytischen Untereinheit: 120 nM, 60 nM, 48 nM, 36 nM, 24 nM, 12 nM (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 163 RU, Tris-Puffer).

4.3.5 Konkurrenz mit **H-9** und ATP

Die Spezifität der Bindung von PKA an **12** lässt sich durch Versuche zur Konkurrenz in Lösung belegen: wird das Protein vor der Injektion mit dem Inhibitor **H-9** inkubiert, sollte anschließend die Bindung an das immobilisierte **H-9**-Derivat dementsprechend geringer ausfallen (vorausgesetzt, der modifizierte Inhibitor bindet an derselben Stelle des aktiven Zentrums wie **H-9**). Wie in Abbildung 4.15 zu erkennen ist, nimmt mit steigender Konzentration von **H-9** die Bindung von PKA an **12** ab bzw. wird sogar ganz unterdrückt, es handelt sich hier also eindeutig um eine spezifische Bindung.

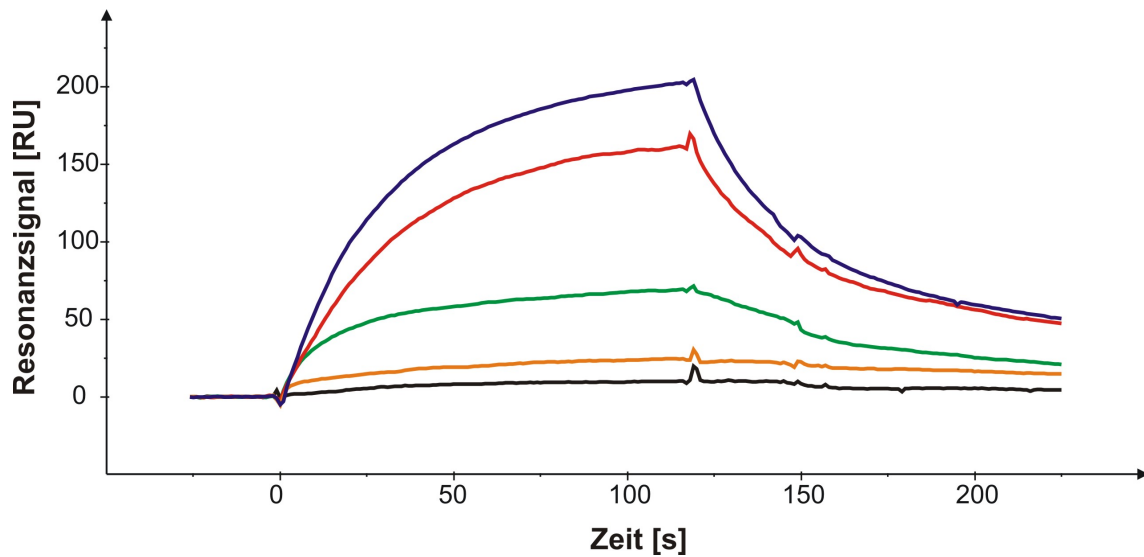


Abbildung 4.15: **Kompetition in Lösung mit H-9.**

24 nM PKA, 24 nM PKA + 18.5 nM H-9, 24 nM PKA + 185 nM H-9, 24 nM PKA + 1.85 μ M H-9, 24 nM PKA + 185 μ M H-9 (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 176 RU, Tris-Puffer).

Vorinkubieren mit ATP führt ebenfalls zu einer verminderten Bindung der PKA an dem immobilisierten Liganden **12** (Abbildung 4.16).

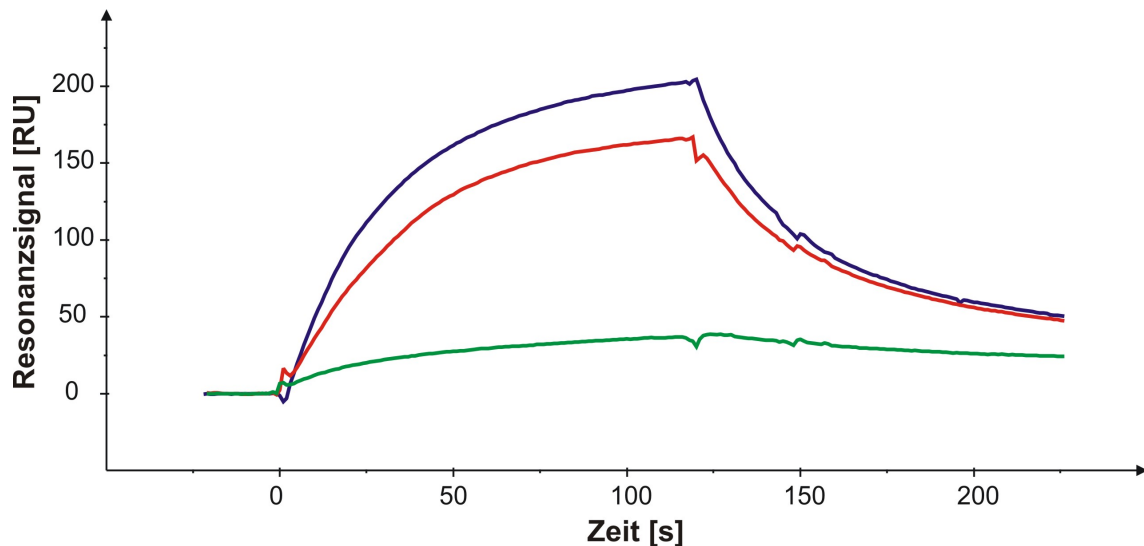


Abbildung 4.16: **Kompetition in Lösung mit ATP.**

24 nM PKA, 24 nM PKA + 0.64 μ M ATP, 24 nM PKA + 64 μ M ATP (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 176 RU, Tris-Puffer).

Dies zeigt, dass auch der modifizierte Inhibitor noch mit ATP um dessen Bindungsstelle kompetiert. Demzufolge binden sowohl ATP als auch der Inhibitor **H-9** und dessen Derivat **12** in der Adenosinbindungstasche im aktiven Zentrum der Proteinkinase A.

Ein Vergleich der Sensorgramme der beiden Konkurrenzexperimente zeigt, dass eine Abnahme der PKA-Bindung im Fall von **H-9** mit wesentlich geringeren Überschüssen erreicht wird als bei ATP. Bereits weniger als ein Äquivalent **H-9** (24 nM PKA + 18.5 nM **H-9**) hat eine Verringerung des Resonanzsignals von ~200 RU auf ~150 RU zur Folge, während im Fall des ATP für den gleichen Effekt ein 27-facher Überschuss eingesetzt werden muss. Entsprechend wird eine Abnahme des Resonanzsignals auf etwa 25 RU durch Inkubation der PKA mit 77 Äquivalenten **H-9** oder mit ~2700 Äquivalenten ATP beobachtet.

Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität des Inhibitors **H-9** gegenüber PKA wesentlich höher ist als die von ATP. Deswegen und aufgrund der Tatsache, dass selbst bei einem ATP-Überschuss von ~2700 Äquivalenten die PKA-Bindung an **12** nicht vollständig unterdrückt wird, sollte eine Proteinmarkierung mit der chemischen Sonde **1** in biologischen Systemen auch in Anwesenheit des ubiquitären ATP möglich sein.[§]

[§] Dies konnte später in Experimenten zur Photoaffinitätsmarkierung von Thylakoidmembranpräparaten in HEPES-ATP-Puffer verifiziert werden.^[154]

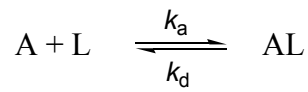
4.3.6 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für den Komplex PKA/Derivat **12**

Die BIAevaluation-Software beinhaltet verschiedene Auswertungsmodelle, mit deren Hilfe kinetische Parameter für diverse Wechselwirkungstypen bestimmt werden können, z. B. Langmuir-Bindung (1:1-Wechselwirkung), bivalenter Analyt \leftrightarrow monovalenter Ligand, Konkurrenz zweier verschiedener Analyten um einen Liganden, bindungsinduzierte Konformationsänderung, usw. Die einzelnen Modelle unterscheiden sich in den ihnen zugrunde liegenden mathematischen Gleichungen.

Um die gemessenen Kurven auswerten zu können, variiert die Software die Parameterwerte in der Gleichung des entsprechenden Modells derart, dass die Summe der Fehlerquadrate, d. h. die Abweichung zwischen errechneter und experimenteller Kurve, minimal wird (sogenanntes *Curve fitting*).^[152] Je genauer die angepassten Kurven mit den gemessenen Kurven übereinstimmen, desto verlässlicher sind die mit der angepassten Gleichung berechneten Kinetikdaten.

Bei der Interaktion von PKA mit **H-9** handelt es sich um eine 1:1-Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand. Demzufolge ist die Annahme berechtigt, dass für die Interaktion von PKA mit dem immobilisierten Liganden **12** dasselbe gilt. Die Messkurven, die bei der Bindungsstudie PKA an **12** erhalten wurden, stimmen jedoch mit den entsprechenden gefitteten Kurven des „Langmuir-Bindung“-Auswertungsmodells nur unzureichend überein. Dies ist unter anderem auf den relativ steilen Anstieg des Resonanzsignals zu Beginn der Analytinjektion zurückzuführen. Dieser verleitet die Software dazu, einen Puffersprung anzunehmen, welcher in die Berechnung der theoretischen Kurven miteinbezogen wird. Dementsprechend fallen diese am Ende der Analytinjektion stärker ab als die real gemessenen Kurven, und die aus dem *Fitting* erhaltenen kinetischen Daten sind nicht zuverlässig. Aus diesem Grund wurde als Auswertungsmethode der sogenannte *Scatchard-Plot* gewählt.^[153]

Für eine 1:1-Wechselwirkung zweier Interaktionspartner L (Ligand) und A (Analyt),



ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D wie folgt definiert:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] \cdot [L]}{[AL]}$$

mit $[A]$, $[L]$ = Konzentration des freien Analyten bzw. Liganden; $[AL]$ = Konzentration des Analyt-Ligand-Komplexes.

Die Konzentration des freien Liganden auf der Sensoroberfläche ergibt sich, wenn von der Gesamtligandkonzentration $[L]_{\text{total}}$ die Konzentration des als Komplex vorliegenden Liganden $[AL]$ abgezogen wird, es gilt:

$$K_D = \frac{[A] \cdot ([L]_{\text{total}} - [AL])}{[AL]}$$

Die Komplexkonzentration $[AL]$ korreliert direkt mit dem Resonanzsignal R ($[AL] \approx R$), daher entspricht die maximale Bindungskapazität $[L]_{\text{total}} = [AL]_{\text{max}} \approx R_{\text{max}}$. Die Konzentration an freiem Analyt $[A]$ ist konstant und gleich der Konzentration C der Analytlösung, da während der Injektion stetig neuer Analyt an die Liganden herangeführt wird. Durch Einsetzen in Gleichung (2) ergibt sich

$$K_D = \frac{C \cdot (R_{\text{max}} - R_{\text{eq}})}{R_{\text{eq}}}$$

bzw. nach Umformen

$$\frac{R_{\text{eq}}}{C} = \frac{R_{\text{max}}}{K_D} - \frac{R_{\text{eq}}}{K_D}$$

Wird nun für verschiedene Analytkonzentrationen der Quotient aus dem Resonanzsignal im Gleichgewicht R_{eq} (in RU) und der Analytkonzentration C gegen R_{eq} aufgetragen, so ent-

spricht nach Gleichung (4) die Steigung der resultierenden Gerade dem negativen Kehrwert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D (*Scatchard-Plot*, Abbildung 4.17).

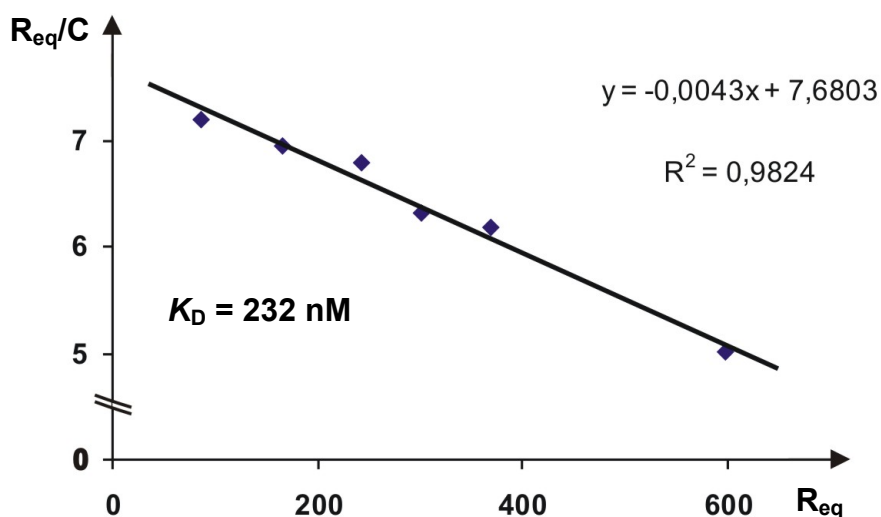


Abbildung 4.17: Scatchard-Plot für die PKA-Konzentrationsreihe an immobilisiertem **12** (vgl. Abbildung 4.14); durchgezogene Linie = Gerade der linearen Regression; R^2 = Korrelationskoeffizient.

Die mit Hilfe des *Scatchard-Plots* ermittelte Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D beträgt $2.32 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und liegt damit durchaus im Bereich des Literaturwertes für den PKA/**H-9**-Komplex, welcher $1.9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ beträgt.^[101]

4.3.7 SPR-Experimente mit Kontrollderivaten

Die bisher beschriebenen SPR-Experimente zeigen, dass die Bindung von PKA an dem immobilisierten Derivat **12** konzentrationsabhängig und spezifisch stattfindet. Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, in wieweit die am Inhibitor durchgeführten Modifikationen sich auf dessen Affinität auswirken, bzw. ob das Design der Sonde **1** geändert werden sollte, um möglicherweise eine bessere Affinität zu erreichen.

Die Durchführung der Kontrollexperimente entspricht der in Kapitel 4.3.5 (Kompetition mit **H-9** und ATP) beschriebenen. Die Proteinkinase A wird mit der Sonde **1** bzw. dem jeweiligen Kontrollderivat inkubiert und anschließend über den Sensorchip mit immobi-

lisierem **12** geleitet. Je nachdem, ob die Affinität des Kontrollderivates höher oder geringer ist als die von **1**, sollte die Bindung des Proteins an dem immobilisiertem **12** stärker oder schwächer unterdrückt werden. Die in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Kontrollderivate, die zu diesem Zweck synthetisiert wurden, sind in Tabelle 4.1 in verkürzter Form aufgeführt (Cumarin = 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure **19**; Linker2 = 6-Aminohexansäure **9**).

Tabelle 4.1: Untersuchte (Kontroll-)Verbindungen

Nummer	Struktur
1	H-9 – Linker – Bpa – Carboxyfluorescein
12	H-9 – Linker – Bpa – Linker2
16	H-9 – Linker – Bpa – Linker2 – Carboxyfluorescein
20	H-9 – Linker – Bpa – Cumarin
21	H-9 – Linker – Bpa – Linker2 – Cumarin

Die Kontrollderivate weisen nur eine begrenzte Löslichkeit in Puffer auf, deswegen wurden die Stammlösungen in DMSO angesetzt; die resultierenden Injektionsgemische enthielten 2.5 % DMSO. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde auch der reinen Proteinlösung sowie den Gemischen mit **H-9** 2.5 % DMSO zugesetzt. Der ausgeprägte Puffersprung in Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19 ist auf diesen DMSO-Anteil zurückzuführen.

Durch Vorinkubieren der PKA mit jeweils 100 Äquivalenten **1**, **12**, **16** oder **H-9** sollte der Einfluss der Anwesenheit bzw. Position des Carboxyfluoresceins geklärt werden.

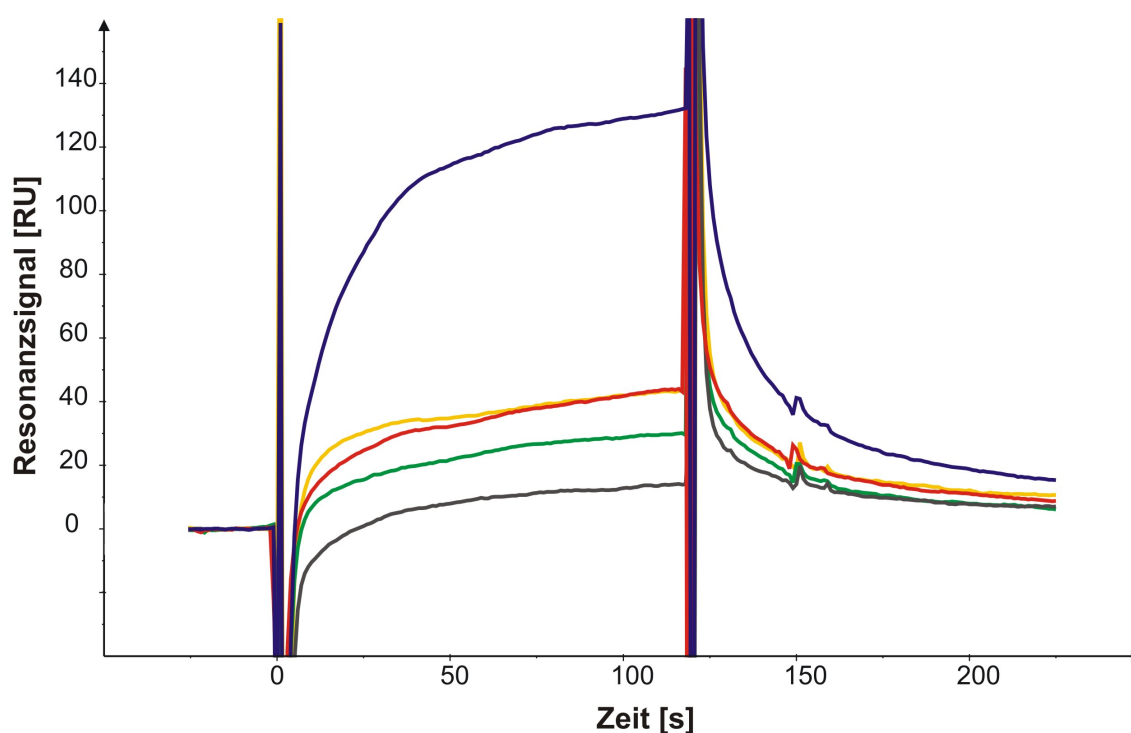


Abbildung 4.18: Bindungsexperimente mit Kontrollderivaten.

30 nM PKA, 30 nM PKA + 100 Äq. **1**, 30 nM PKA + 100 Äq. **12**, 30 nM PKA + 100 Äq. **16**, 30 nM PKA + 100 Äq. **H-9** (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 100 RU, Tris-Puffer).

Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist, ist die Affinität von **H-9** bei dem gegebenen Überschuss am höchsten, da die Bindung von PKA an dem immobilisierten Liganden **12** am stärksten unterdrückt wird. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Molekülgröße zurückzuführen, da diese den einfachsten Zugang zum aktiven Zentrum erlaubt.

Zwischen der Originalsonde **1** und dem carboxyfluoresceinfreien Derivat **12**, welches dem immobilisierten Ligand entspricht, besteht kaum ein Unterschied, die Messkurven verlaufen praktisch analog. Die Verbindung **16** mit der zusätzlichen Linkereinheit zwischen Bpa und Carboxyfluorescein zeigt hier nach **H-9** die größte Affinität zu PKA. Allerdings war die Tendenz nicht eindeutig, da bei einem geringeren Überschuss von 10 Äquivalenten das Kompetitionsvermögen von **16** unter das von **1** sank. Die Affinität der Sonde scheint sich also durch eine zusätzliche Linkereinheit nicht bedeutend zu erhöhen.

Das Ergebnis der Untersuchung hinsichtlich der Frage, ob der im Vergleich zu Carboxyfluorescein kleinere Fluoreszenzfarbstoff Cumarin die Affinität der Sonde positiv beeinflusst, ist in Abbildung 4.19 dargestellt.

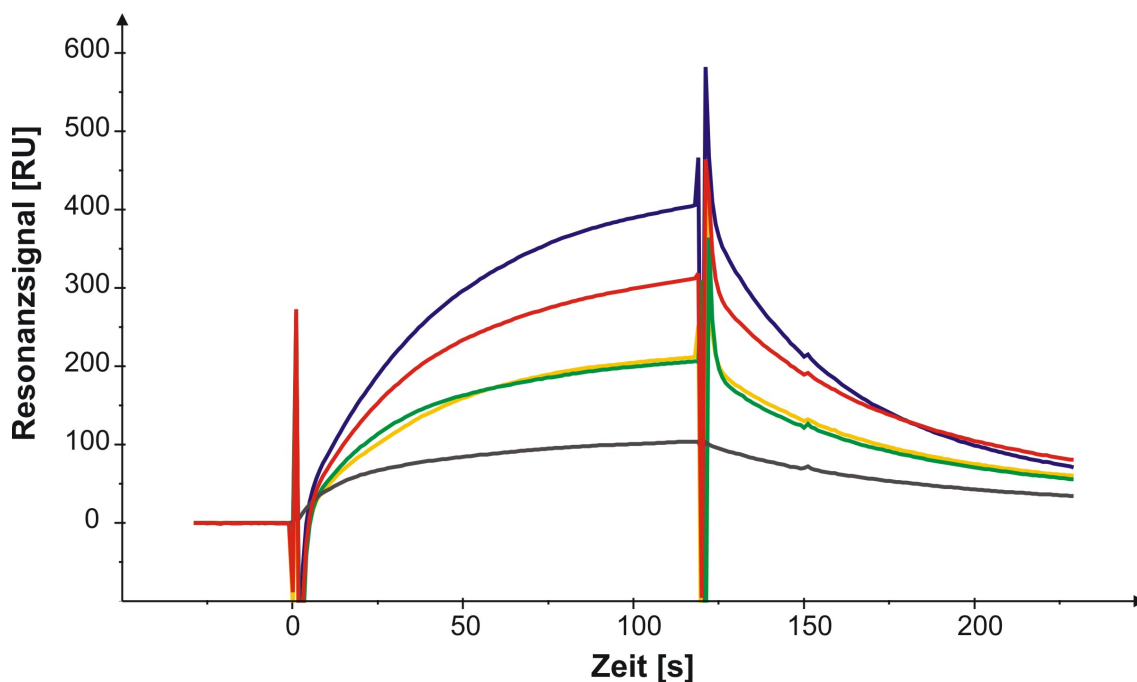


Abbildung 4.19: Bindungsexperimente mit Kontrollderivaten (Fortsetzung).

30 nM PKA, 30 nM PKA + 100 Äq. **21**, 30 nM PKA + 100 Äq. **1**, 30 nM PKA + 100 Äq. **20**, 30 nM PKA + 100 Äq. **H-9** (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 280 RU, Tris-Puffer).

Auch hier weist wiederum **H-9** die höchste Affinität zu PKA auf. Das Kontrollderivat **20** mit Cumarin anstelle von Carboxyfluorescein scheint ähnlich affin zu sein wie die Verbindung **1**. Unerwarteterweise scheint die zusätzliche Linkereinheit im Fall von **21** einen negativen Effekt auszuüben, da die Affinität hier deutlich geringer ist.^h

Durch den Austausch des Farbstoffs wurde also keine Verbesserung erzielt. Zieht man zusätzlich in Betracht, dass die Derivate der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe ähnlich aufwendig zu synthetisieren sind wie die Carboxyfluoresceinderivate, und dass in der Biologie der Standardfarbstoff Fluorescein bevorzugt eingesetzt wird, gab es keinen Grund, zu Cumarin zu wechseln.

^h Auch in diesem Fall ist keine 100 %ige Aussage darüber möglich, welches Derivat (**20** oder **21**) tatsächlich affiner ist, da die bei geringeren Überschüssen erhaltenen Messkurven einander sehr ähnlich wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die Kontrollexperimente keine eindeutig bessere Sonde als **1** identifizieren ließ. Dementsprechend wurde die Photoaffinitätsmarkierung weiterhin mit dieser „Originalsonde“ durchgeführt.

4.3.8 Bindung von Kreatinkinase an dem immobilisierten Liganden **12**

Bei der Bindung von Kreatinkinase an **12** handelt es sich ebenfalls um eine konzentrationsabhängige Bindung (Abbildung 4.20), deren Spezifität durch Wettbewerbsstudien mit **H-9** und ATP gezeigt werden konnte.

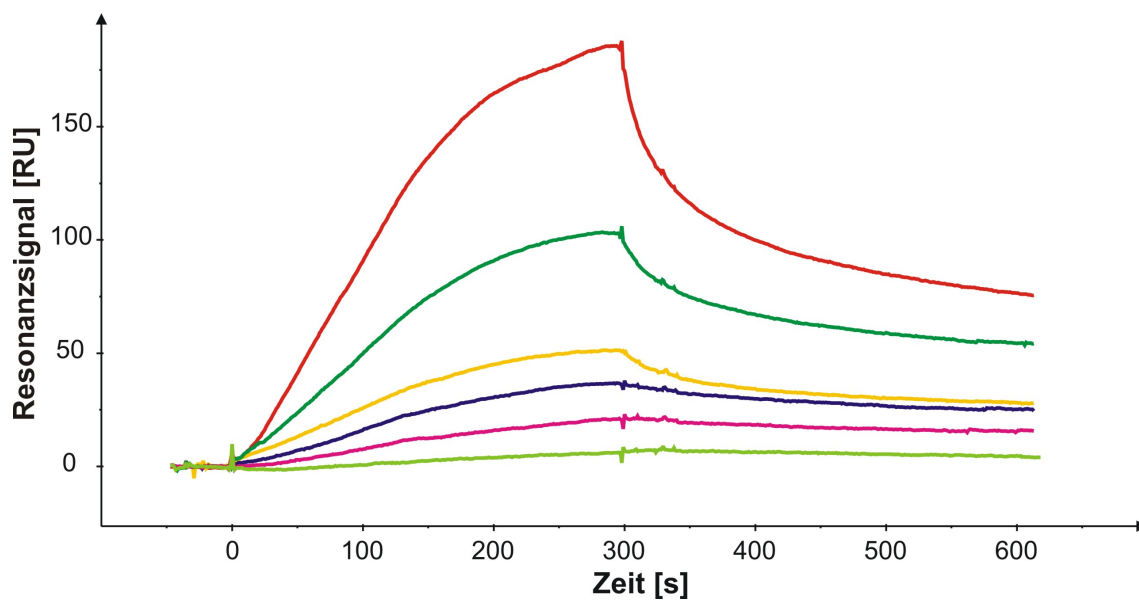


Abbildung 4.20: **Konzentrationsabhängige Bindung von Kreatinkinase an **12**.**
Konzentrationen: 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM
(CM5-Chip, Immobilisierungsniveau: 370 RU, Tris-Puffer).

4.4 Photoaffinitätsmarkierung

4.4.1 Photoaffinitätsmarkierung verschiedener Kinasen mit dem H-9-Derivat 1

Erste Markierungsexperimente mit der chemischen Sonde **1** wurden mit vier kommerziell erhältlichen Kinasen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Photoaffinitätsmarkierung verschiedener Kinasen mit diesem **H-9-Derivat** möglich ist (Abbildung 4.21).^[154] Aus den Experimenten geht hervor, dass die Isochinolinsulfonamid-Inhibitoreinheit nicht auf die Erkennung von Proteinkinasen beschränkt ist, da neben der Proteinkinase A (Abbildung 4.21, Bahn 3) auch die Hexokinase und die Kreatinkinase in hohem Ausmaß fluoreszenzmarkiert wurden (Abbildung 4.21, Bahnen 1 und 2). Im Fall der 3PGA-Phosphokinase dagegen wird nur eine schwache Markierungseffizienz beobachtet, obwohl sie der Silberfärbung zufolge in höherer Konzentration vorlag.

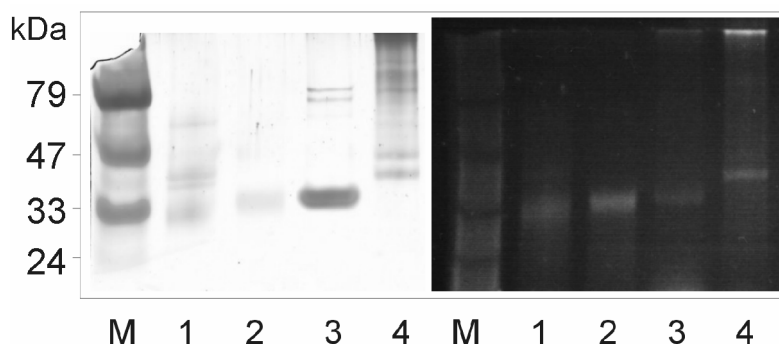


Abbildung 4.21: Spezifische Photoaffinitätsmarkierung verschiedener Kinasen mit dem H-9-Derivat 1.

Links: Silberfärbung; rechts: Fluoreszenzaufnahme. Bahn 1: Hexokinase; Bahn 2: Kreatinkinase; Bahn 3: 3PGA Phosphokinase; Bahn 4: Proteinkinase A; M: vorgefärbter Proteinmarker.

(Das Experiment wurde von J. H. Mußnug durchgeführt^[154]).

Ein Indiz für die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung ist die Tatsache, dass nur die katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A markiert wurden (Abbildung 4.21, Bahn 4, untere Bande), die regulatorischen Untereinheiten jedoch nicht.

Im Fall der Kreatinkinase konnten nach Inkubieren des Proteins mit einem 10-fachen Überschuss von **1** und anschließender Bestrahlung die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Banden im Gel noch bei einem Proteingehalt von weniger als 50 ng pro Bande detektiert werden.ⁱ

4.4.2 Photoaffinitätsmarkierung in realen Proteingemischen

In einem weiteren Experiment sollte gezeigt werden, dass die Photoaffinitätsmarkierung nicht nur mit aufgereinigten Enzymen, sondern auch in Gemischen funktioniert. Als Testsystem wurde ein Thylakoidmembranpräparat der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ausgewählt.

Bei Thylakoiden handelt es sich um Membranstrukturen in Chloroplasten. Die Thylakoidmembranen enthalten die am ersten Schritt der Photosynthese, der Lichtreaktion, beteiligten Photosysteme I und II. Das Photosystem II (PS II) beinhaltet etliche chlorophyllhaltige Lichtsammelkomplexe LHC II (*light harvesting complex II*). Es wird angenommen, dass durch reversible Phosphorylierung von Untereinheiten dieses LHC II-Komplexes sowie des PS II-Kernkomplexes eine Adaption an veränderte Lichtverhältnisse (Lichtintensität/Wellenlänge) erreicht wird.^[155] Die Phosphorylierung erfolgt durch membranständige Proteinkinasen. Die entsprechenden PS II-/LHC II-Kinasen sind noch nicht eindeutig identifiziert. Es ist jedoch bekannt, dass der Proteinkinaseinhibitor **H-9** unter reduzierenden Bedingungen die Phosphorylierung der Proteine des LHC II-Komplexes in Thylakoiden der Tabakpflanze inhibiert.^[156] Dieselbe Wirkung konnte auch im Fall des eukaryotischen Einzellers *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden.^[154] Deshalb sollte mit der chemischen Sonde **1** eine gezielte Markierung von Thylakoidkinasen und damit deren vereinfachte Detektion und Charakterisierung möglich sein.

Als interne Referenz für die erfolgreiche Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung wurde dem Thylakoidmembranpräparat in einer Vergleichsprobe Kreatinkinase zugesetzt. Anschließendes Inkubieren mit der Sonde **1** (200 Äq.), gefolgt von Bestrahlung, ergab mehrere markierte Thylakoidmembranproteine mit einem Molekulargewicht überwiegend zwischen 40 kDa und 80 kDa (Abbildung 4.22, Bahn 3).

ⁱ Die Bestimmung des exakten Detektionslimit ist schwierig, da dieses unter anderem von der Behandlung der Gele bzw. deren pH-Wert und der dadurch beeinflussten Fluoreszenzintensität abhängt.

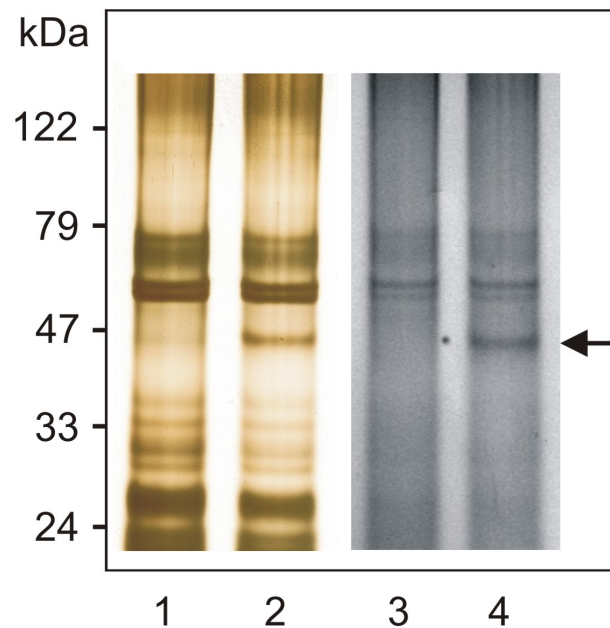


Abbildung 4.22: Rückgewinnung von Kreatinkinase aus Thylakoidmembran-Präparaten nach der Photoaffinitätsmarkierung.

Bahn 1: Silberfärbung. Bahn 2: Silberfärbung, mit zusätzlichen 150 ng Kreatinkinase. Bahn 3: Fluoreszenzaufnahme. Bahn 4: Fluoreszenzaufnahme, mit zusätzlichen 150 ng Kreatinkinase (siehe Pfeil).

(Das Experiment wurde von J. H. Mußnug durchgeführt^[154]).

Die Proteinbande bei 45 kDa wurde anschließend mittels MALDI-TOF-MS Fingerprint-Analyse^[154] als die hinzugefügte, erfolgreich fluoreszenzmarkierte Kreatinkinase identifiziert (Abbildung 4.22, Pfeil). Die übrigen markierten Proteine konnten noch nicht identifiziert werden. Zwar wurde das Chloroplastengenom von *Chlamydomonas reinhardtii* bereits sequenziert,^[157] die vollständige Annotation steht jedoch noch immer aus.

4.4.3 Kontrollexperimente bezüglich der mechanismusbasierten Markierung der Kreatinkinase

Die Spezifität der affinitätsbasierten Photoaffinitätsmarkierung konnte durch ein Kontrollexperiment mit SDS-denaturierter Kreatinkinase eindeutig belegt werden. Eine Kreatinkinaseprobe wurde vor der Inkubation und Photoreaktion mit **1** mit SDS behandelt (Abbildung 4.23).

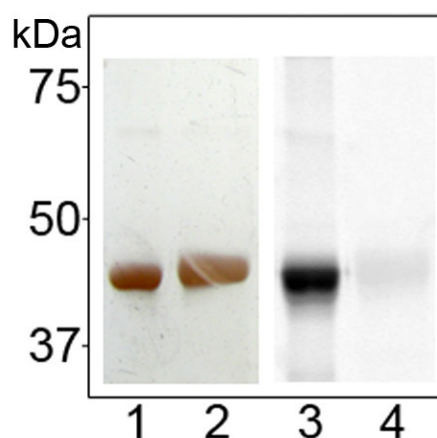


Abbildung 4.23: Vergleich der Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung von nativer und denaturierter Kreatinkinase.

Bahn 1: Silberfärbung, native Kreatinkinase. Bahn 2: Silberfärbung, denaturierte Kreatinkinase. Bahn 3: Fluoreszenzaufnahme, native Kreatinkinase. Bahn 4: Fluoreszenzaufnahme, denaturierte Kreatinkinase.

(Die auf das Gel aufgetragene Proteinmenge betrug etwa 3.7 μg pro Bahn).

Die im Vergleich zur Referenz (Abbildung 4.23, Bahn 1) praktisch nicht vorhandene Fluoreszenz (Abbildung 4.23, Bahn 2) veranschaulicht deutlich, dass die Photoaffinitätsmarkierung mit der chemischen Sonde **1** spezifisch erfolgt. Da die **H-9**-Einheit das aktive Zentrum des SDS-denaturierten Proteins wegen der fehlenden dreidimensionalen Struktur nicht mehr erkennt, kann das Bpa nicht in räumlicher Nähe zum Protein positioniert werden. Entsprechend ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung bei Bestrahlung unwahrscheinlich und es findet trotz einer relativ hohen Enzymkonzentration (6.2 μM) und eines 10-fachen Überschusses an **1** keine unspezifische Photoaffinitätsmarkierung statt. (Die in der Silberfärbung (Bahn 4) wahrnehmbare leichte Verbreiterung der Bande ist auf das SDS zurückzuführen, nicht auf unterschiedliche Proteinmengen).

Um sicherzustellen, dass die CH-Insertion des Benzophenon-Tripletts (und nicht etwa andere photochemische Prozesse, z.B. Photooxidation) den vorherrschenden Prozess darstellt, und um zu überprüfen, ob eventuell auch durch unspezifische Wechselwirkungen eine Photoaffinitätsmarkierung herbeigeführt werden kann, wurden Bestrahlungsexperimente sowohl mit dem Konjugat **24** ohne die Inhibitoreinheit (Linker-Bpa-Carboxyfluorescein, vgl. Kapitel 4.2.3.6) als auch 5(6)-Carboxyfluorescein **13** allein durchgeführt. In Abbildung 4.24 ist das Ergebnis der Kontrollexperimente wiedergegeben.

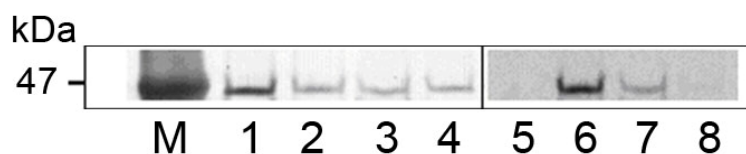


Abbildung 4.24: Vergleich der Photoaffinitätsmarkierung von Kreatinkinase mit 1 bzw. mit Kontrollderivaten

Bahn 1/5: Silberfärbung/Fluoreszenzbild, Kreatinkinase; Bahn 2/6: Silberfärbung/Fluoreszenzbild, Markierung der Kreatinkinase mit dem vollständigen Konjugat **1**; Bahn 3/7: Silberfärbung/Fluoreszenzbild, Markierung der Kreatinkinase mit dem Konjugat **24** ohne Inhibitor; Bahn 4/8: Silberfärbung/Fluoreszenzbild, Bestrahlung der Kreatinkinase in Anwesenheit von 5(6)-Carboxyfluorescein **13**; M: Proteinmarker.

(Das Experiment wurde von J. H. Mußnug durchgeführt^[154]).

Die Bedingungen waren für alle Kreatinkinaseproben identisch (1 mg/ml, Inkubation mit 200 Äquivalenten der Sonde **1** bzw. der jeweiligen Kontrollverbindung, Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm, Ultrafiltration). Die fluoreszierende Bande in Bahn 6 zeigt die effiziente Markierung der Kreatinkinase mit **1**. Das Ausmaß der unspezifischen Markierung mit dem keine Inhibitoreinheit enthaltenden **24** ist trotz des sehr hohen Überschusses von 200 Äquivalenten ausreichend gering (Bahn 7). Addukte von Kreatinkinase und Carboxyfluorescein wurden nicht festgestellt (Bahn 8).

Außerdem wurde Kreatinkinase in Anwesenheit der Kontrollverbindung **25** (Inhibitor-Linker-Carboxyfluorescein) bestrahlt. Unerwarteterweise fand in diesem Fall trotz der fehlenden Photoreaktivgruppe eine deutliche Fluoreszenzmarkierung des Proteins statt.

Auf welchen Prozess die Markierung genau zurückzuführen ist, konnte noch nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass im Fall der Kontrollverbindung **24** mit Photoreaktivgruppe, aber ohne Inhibitoreinheit lediglich eine sehr geringe unspezifische Markierung festzustellen war, weist jedoch darauf hin, dass die durch die Inhibitoreinheit vermittelte räumliche Nähe zum Protein von entscheidender Bedeutung für die zur Markierung führende Reaktion ist. Eventuell wird durch einen nukleophilen Rest im aktiven Zentrum die Amidbindung zwischen Linker und Carboxyfluorescein gespalten und so eine kovalente Bindung zwischen Nukleophil und Fluoreszenzfarbstoff ausgebildet; auch eine Reaktion mit der in der chinoiden, fluoreszierenden Form des Fluoresceins frei vorliegenden Carboxygruppe

käme in Frage. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die Bestrahlung das Carboxyfluorescein angeregt wird und dadurch mit dem Protein reagieren kann.

In Hinsicht auf den Einsatz der chemischen Sonde **1** zur gezielten Markierung von Proteinen stellt das Auftreten dieser Markierungsreaktion kein Problem dar: Da bei Carboxyfluorescein **13** selbst bzw. bei der Kontrollverbindung **24** ohne **H-9** keine bzw. nur eine sehr schwache Markierung festzustellen war, die Markierungsreaktion also auf die räumliche Nähe zum Protein angewiesen zu sein scheint, sollte dieser alternative Markierungsmechanismus nur für die Zielproteine des Inhibitors in Frage kommen und somit lediglich eine verbesserte Markierungseffizienz zur Folge haben.

4.4.4 FRET-Untersuchungen

Als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) wird die strahlungslose Energieübertragung von einem angeregten Fluoreszenz-Donor auf einen Fluoreszenz-Akzeptor bezeichnet. Die Effizienz des Energietransfers, welcher über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor erfolgt, hängt einerseits von der Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum und andererseits vom Donor-Akzeptor-Abstand ab. Da letzteres die Bestimmung des Abstandes zwischen Fluorophoren mit Hilfe von FRET-Experimenten erlaubt, können z. B. Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden, wenn das eine Protein mit einem Donorfluorophor und das andere Protein mit einem Akzeptorfluorophor verknüpft wird.

Die chemische Sonde **1** weist mit der Isochinolineinheit des Inhibitors, der Photoreaktivgruppe und dem Fluoreszenzfarbstoff gleich drei Fluorophore auf. Deshalb wurde die Sonde mittels Anregungs-Emissions-Spektroskopie (AES) hinsichtlich des Auftretens eines intramolekularen FRET, insbesondere zwischen dem Triplettzustand des Benzophenons und dem benachbarten Fluorescein, untersucht.^[154,158] In Abbildung 4.25 sind die möglichen Relaxationsprozesse nach gezielter Anregung der Benzophenon-Einheit dargestellt. Falls FRET den dominierenden Verlustprozess des angeregten Benzophenons darstellen sollte, wäre die Sonde **1** nutzlos, da dann die kovalente Bindung zum Protein nicht mehr ausgebildet werden würde.

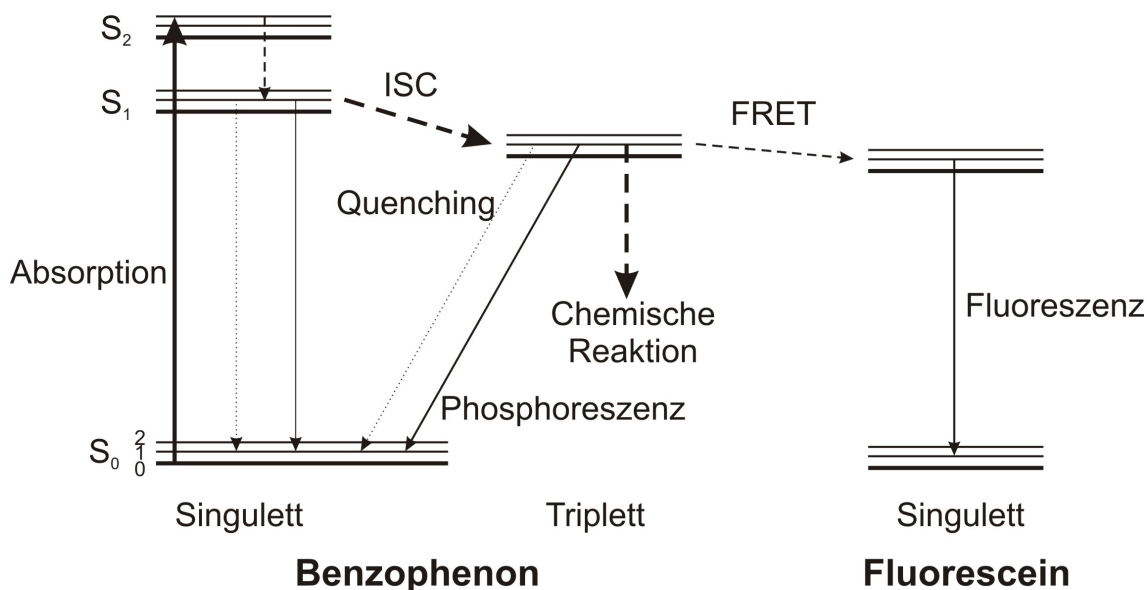


Abbildung 4.25: Mögliche Relaxationsprozesse der Sonde 1 nach selektiver Anregung der Benzophenoneinheit. Durchgezogene Linie: Strahlungsprozesse; gepunktete Linie: Quenching; gestrichelte Linie: andere strahlungslose Prozesse; die Liniendicke korreliert indiziert die Wahrscheinlichkeit des entsprechenden Prozesses.

Bei der Untersuchung mittels AES wurde bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, welche für die Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt wird, sowohl für **H-9** als auch 4-Benzoyl-L-phenylalanin lediglich eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute festgestellt ($\Phi_{\text{Fl}} \approx 10^{-4}$).

Da sich das Emissionsspektrum von Benzophenon ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ für $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) und das Anregungsspektrum von Fluorescein ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 490 \text{ nm}$) überlappen, könnte prinzipiell Energietransfer stattfinden. Bei Vergleich des normalisierten Emissionsspektrums der vollständigen Sonde **1** mit dem der Verbindung **24** ohne Photoreaktivgruppe konnte jedoch bei $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ kein signifikanter FRET festgestellt werden ($\Phi_{\text{FRET}} = 10^{-2}$). Bei kürzeren Anregungswellenlängen resultiert eine Rotverschiebung des Emissionsspektrums des Benzophenons ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 450 \text{ nm}$); in diesem Fall wird ein gewisser Energietransfer (15 % Zunahme der Akzeptorfluoreszenz) beobachtet. Der Energietransfer zwischen **H-9** und Fluorescein erwies sich über den gesamten Wellenlängenbereich als unbedeutend ($\Phi_{\text{FRET}} \leq 10^{-4}$). Deshalb stellen nach Photoaktivierung bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ Quenching und chemische Reaktionen die entscheidenden Verlustwege dar.

4.4.5 Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung mit Bpa

Theoretisch ist für die Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen mit Benzophenonen eine Markierungseffizienz von 100 % möglich, wenn sich die Benzophenoneinheit in der richtigen Position befindet, und wenn genügend Anregungs-Relaxationszyklen durchlaufen werden (vgl. Kapitel 2.5). In der Literatur werden Ausbeuten zwischen 15 % und ~90 % angegeben,^[139] wobei die Bestimmung der Ausbeute in der Regel autoradiographisch mit Hilfe von im Molekül vorhandenen Radioisotopen erfolgt.

Weist das zur Photoaffinitätsmarkierung verwendete Molekül kein Radioisotop auf, gestaltet sich die Bestimmung der Markierungseffizienz bedeutend schwieriger. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn kleine Moleküle zur Markierung wesentlich größerer Proteine eingesetzt werden, wie es im Rahmen dieser Arbeit geschah.

Eine Quantifizierung mittels MS wäre zum einen wegen der durch die Markierung unterschiedlichen Flugeigenschaften der Proteine von vornherein ungenau. Außerdem kommt es wegen der großen Massendifferenz zwischen Sonde und Protein (hier mindestens 40 kDa) und der in diesem Massenbereich nicht mehr genügend hohen Auflösung zumindest zu einer partiellen Überlagerung der Signale von markiertem und unmarkiertem Protein. Daher erscheint das Signal des markierten Proteins nicht als separater Peak, sondern eher in Form einer Signalverbreiterung bzw. als Schulter des Signals des unmarkierten Proteins. Demzufolge lässt die Massenspektrometrie lediglich eine Aussage darüber zu, ob noch unmarkiertes Protein vorhanden ist.

Fluoreszenz-Eichkurven auf Basis verschiedener Konzentrationen von **1** erwiesen sich als ungeeignet, da die Sondenmoleküle leicht aus dem Gel ausgewaschen werden können, außerdem scheint die direkte Umgebung des Fluorophors, d. h. Gel oder Protein, für die Fluoreszenzintensität eine Rolle zu spielen. Eine Eichkurve mit definierten Mengen fluoreszenzmarkierten Proteins konnte nicht realisiert werden, da sich wegen der geringen Molekülgröße der Sonde das markierte und das unmarkierte Protein nicht ausreichend unterscheiden, um eine Abtrennung des markierten Proteins durchführen zu können. Versuche, die im eindimensionalen Gel erhaltene Mischbande aufzutrennen (durch andere

Geldichten bzw. längere Laufstrecken) und die zwei Einzelbanden dann mittels Silberfärbung zu quantifizieren, blieben ebenfalls erfolglos.

Die Anwesenheit der basischen Aminogruppen in **1** müsste nach der Markierung prinzipiell zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes (IEP) des betreffenden Proteins führen. Dies könnte eine Entkopplung von markierten und unmarkierten Proteinen während der isoelektrischen Fokussierungsphase der 2D-Gelelektrophorese zur Folge haben, sofern die Änderung des IEP groß genug ausfällt. Im Gel würden dementsprechend bei nicht 100 %iger Markierung pro Protein statt eines Flecks zwei erscheinen (*spot splitting*).

Theoretisch müsste sich diese – eigentlich unerwünschte – Entkopplung durch die Markierung mit **1** zur Quantifizierung der Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung mittels 2D-PAGE ausnutzen lassen. Ein Gemisch aus Kreatinkinase und markierter Kreatinkinase wurde in einem IPG-Strip mit pH-Gradient von 3-10 (7 cm bzw. 17 cm) isoelektrisch fokussiert. Eine Unterscheidung von Kreatinkinase und markierter Kreatinkinase war nach der anschließenden Gelelektrophorese jedoch nicht möglich, da im Gel sowohl mit dem Fluoreszenzscanner als auch nach der Silberfärbung nur ein Spot an derselben Position zu detektieren war. Das positive Resultat dieser Experimente ist, dass die Markierung mit der Sonde **1** keine gravierende Änderung des IEP zur Folge hat und somit bei der 2D-PAGE keine verkomplizierte Auswertung durch mehr *Spots* zu befürchten ist. Leider ist deshalb auch mit dieser Methode keine Quantifizierung der Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung möglich. Eventuell könnte durch gezieltere Fokussierung in IPG-Strips mit sehr engem pH-Bereich doch noch *spot splitting* auftreten und so eine Quantifizierung möglich werden.

4.5 Versuche zur Synthese einer nukleophil spaltbaren chemischen Sonde

In einer Veröffentlichung von Adam *et al.* aus dem Jahr 2001 wurde die Synthese einer Bibliothek von ungerichteten, aktivitätsbasierten Sonden sowie deren Einsatz in der Proteomik beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.2.1).^[42] Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Sonden ist eine Sulfonester-Reaktivgruppe (siehe Schema 2.2), welche mit nukleophilen Resten im aktiven Zentrum von Enzymen reagiert und deshalb zur Markierung dieser Enzyme eingesetzt werden kann.

Auf Grundlage dieser Veröffentlichung entstand die Idee, den Inhibitor **H-9** mit einer Sulfonestergruppe (und einer Reportergruppe) auszustatten und somit eine gerichtete Sulfonestersonde zu entwickeln. Solchermaßen ließe sich das Konzept, reversible Inhibitoren in der Proteomik einzusetzen, ausweiten.

Die mögliche Struktur einer nukleophil spaltbaren chemischen Sonde **26** ist in Abbildung 4.26 wiedergegeben, es wurde die Darstellung zweier Varianten ins Auge gefasst: **26** mit R = H bzw. mit R = Me.

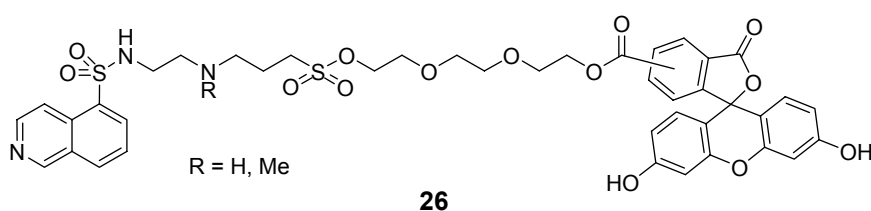


Abbildung 4.26: Struktur der geplanten gerichteten Sulfonestersonde

Der Inhibitorteil der Verbindung **26** mit R = H entspricht weitgehend dem der chemischen Sonde **1**. Demzufolge sollte keine Beeinträchtigung der Affinität zu erwarten sein, und auch die inhibierten Proteine sollten dieselben bleiben. Allerdings kompliziert die Anwesenheit der sekundären Aminogruppe in einem nukleophil spaltbaren Zielmolekül die Handhabung desselben. Die Synthese sollte nach Einführung einer geeigneten Schutzgruppe bis hin zum Entschützen unproblematisch sein. Um intra- bzw. intermolekulare Reaktionen nach dem

Entschützen möglichst zu verhindern, sollte dieser letzte Schritt erst kurz vor Anwendung erfolgen; nukleophile Reaktionen der Aminogruppe müssten durch rasches Protonieren vermieden werden können.

Die Sondenvariante **26** mit R = Me (Abbildung 4.26), welche die Einführung einer Schutzgruppe unnötig macht, dürfte laut theoretischen Berechnungen von E. W. Guthöhrlein ebenfalls in der Lage sein, als Kinaseinhibitor zu fungieren. Durch die tertiäre Aminogruppe an Stelle der sekundären könnte sich hier ein anderes Spektrum von Zielproteinen ergeben.

Die Syntheseplanung für beide Sonden sah die getrennte Darstellung von 3-Aza-6-(isochinolin-5-sulfonylamino)-hexan-1-sulfonsäure (linke Hälfte des Moleküls) und 5(6)-Carboxyfluorescein-(8-hydroxy-3,6-dioxaoctanyl)ester (rechte Hälfte) vor, welche anschließend zum Sulfonester **26** verknüpft werden sollten.

Die Synthese der rechten Molekülhälfte (**28**) ist in Abbildung 4.27 skizziert.

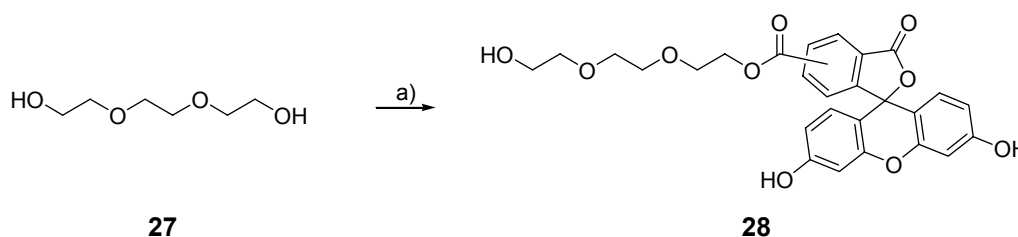


Abbildung 4.27: a) 5(6)-Carboxyfluorescein **13**, DCC, DMAP, THF, -15 °C → RT, 3.5 h, 24 %.

Die Aktivierung der Carboxylfunktion des 5(6)-Carboxyfluoresceins **13** erfolgte hier mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und DMAP (Abbildung 4.28, vgl. auch Abbildung 4.4). Der zuerst gebildete *O*-Acylisoharnstoff **III** wird mit DMAP unter Freisetzung des Harnstoffderivates **VI** in das reaktive Acylpyridiniumion **XI** überführt. Reaktion von **XI** mit einem Amin **IV** führt zum Amid **V**. Das DMAP wird in diesem Schritt regeneriert, daher sind katalytische Mengen ausreichend.

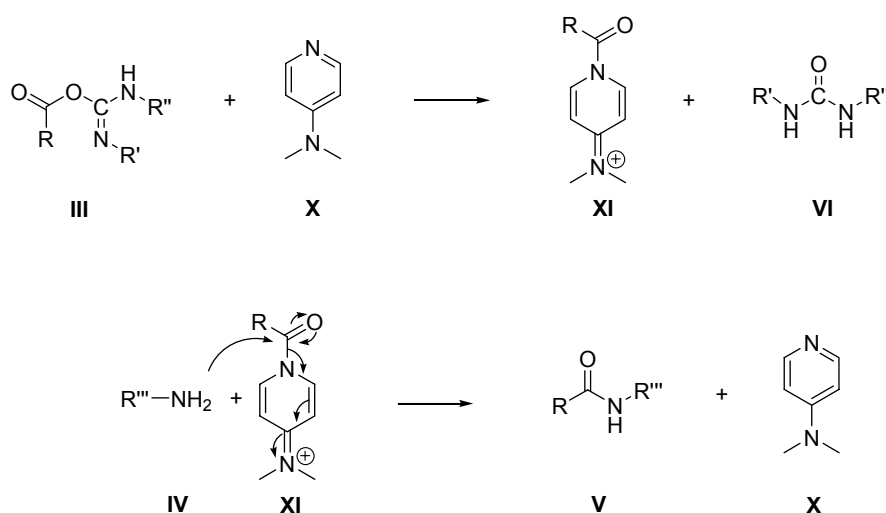


Abbildung 4.28: Carbodiimid-Aktivierung von Carbonsäuren unter Beteiligung von DMAP

Das Problem der schwierigen Aufarbeitung von Carboxyfluoresceinverbindungen (vgl. Kapitel 4.2.3.1) wird durch die Kupplung mit Triethylenglykol, welches bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung ebenfalls Schwierigkeiten bereitet, potenziert, so dass das Carboxyfluoresceinderivat **28** lediglich in einer (nicht optimierten) Ausbeute von 24 % isoliert werden konnte.

Die linke Molekülhälfte der Sonde **26** mit $R = H$ konnte durch Umsetzung von **H-9** mit 1,3-Propanedithion **29** dargestellt werden (Abbildung 4.29).^[159, 160]

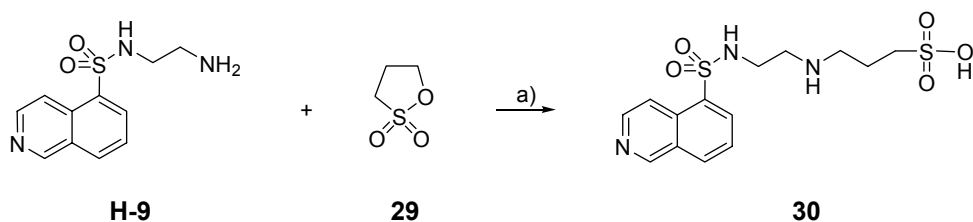
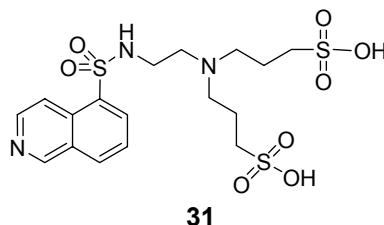


Abbildung 4.29: a) MeOH, RT, $\bar{u}N$, 25 %.

Bei Einsatz äquimolarer Eduktmengen konnte keine vollständige Umsetzung erreicht werden, die isolierte Ausbeute der Zielverbindung **30** betrug 25 %. Die Abtrennung des Produkts von nicht umgesetztem **H-9** bzw. Nebenprodukten erwies sich als schwierig und machte die wiederholte Aufreinigung mittels Säulenchromatographie erforderlich. Auch ein

Überschuss von 1,3-Propanolthion **29** führte nicht zu mehr Produkt, stattdessen entstand vermehrt das zweifach reagierte Nebenprodukt **31**.



Zur Verknüpfung der beiden Molekülhälften zum Sulfonester **26** muss die Sulfonsäurefunktion der Verbindung **30** in das aktivere Sulfonylchlorid überführt werden. Um bei der entsprechenden Reaktion die direkte Entstehung von Sulfonamiden zu verhindern, und auch um eine Spaltung des Sulfonesters durch die intramolekular vorhandene nukleophile Aminogruppe zu vermeiden, wurde diese als Benzyloxycarbonylamin geschützt (Abbildung 4.30).

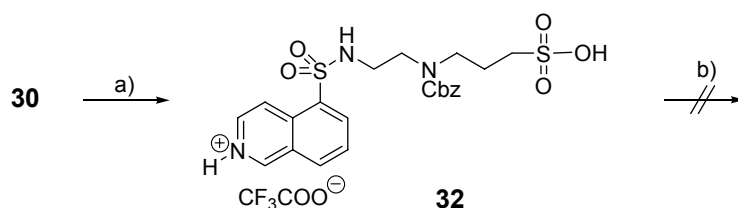


Abbildung 4.30: a) Cbz-OSU, NEt₃, Acetonitril/H₂O (1:2), 0 °C → RT, 1 h, 61 %; b) SOCl₂, DMF, Rückfluss; **28**, DABCO o. Pyridin, DMF, nicht isoliert.

Das Vorliegen der geschützten Verbindung **32** wird durch die analytischen Daten eindeutig belegt. Allerdings blieben alle nachfolgenden Versuche, **32** nach Umsetzung zum entsprechenden Sulfonylchlorid mit **28** zu verknüpfen, erfolglos; es konnte kein Produkt isoliert werden.

Die Synthesepipeline für die linke Molekülhälfte der Sondenvariante mit R = Me (Abbildung 4.26) sah den Aufbau der **H-9**-Einheit aus Isochinolin-5-sulfonsäurechlorid und einem geeignet derivatisierten *N*-Methylethylendiamin vor.

Um dieses darzustellen, wurde im ersten Schritt selektiv die primäre Aminofunktion von *N*-Methylethylendiamin **33** mit 2-Acetyl-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexandion **34** geschützt (Abbildung 4.31).^[161] Die Verbindung **35** konnte nach Aufreinigung durch wiederholtes Umkristallisieren als hygroskopischer Feststoff in 55 % Ausbeute isoliert werden; im ¹H-NMR-Spektrum erscheint das Signal des H-Atoms der geschützten Aminogruppe bei einer charakteristischen Verschiebung von 13.5 ppm.

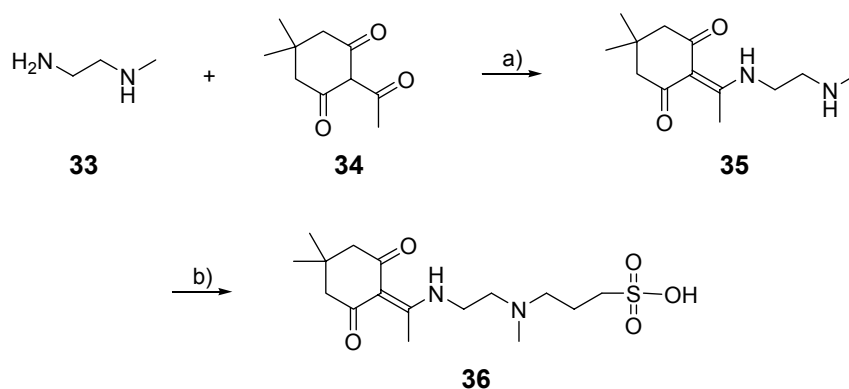


Abbildung 4.31: a) NEt₃, DMF, RT, üN, 55 %; b) **29**, MeOH, 0 °C → RT, üN, nicht isoliert.

Bei der Umsetzung der Verbindung **34** mit 1,3-Propansulton **29** (Abbildung 4.31) wurden bei der Reaktionskontrolle mittels MALDI-ToF-MS Peaks detektiert, die der Zielverbindung **36** entsprechen würden. Indes konnte weder durch Säulenchromatographie an AlO_x noch mittels präparativer RP-HPLC Produkt isoliert werden.

Die Synthese wurde anschließend wegen dieser Probleme nicht weiter verfolgt. Ein weiterer Faktor ist die Toxizität des 1,3-Propansultons, welches als hochwirksames Alkylierungsmittel Krebs erzeugen kann (im Tierversuch eindeutig nachgewiesen). Daher ist der Einsatz von 1,3-Propansulton trotz seiner synthetischen Nützlichkeit nur bedingt zu empfehlen.

Um zu testen, in wieweit die positive Ladung tatsächlich entscheidend ist, sollte ein **H-9**-Derivat mit einem Linker synthetisiert werden, welches sich unter Erhalt der protonierbaren Aminofunktion immobilisieren lässt. Durch SPR-Studien sollten dann die Affinitäten des direkt bzw. des über den zusätzlichen Linker immobilisierten **H-9** untersucht und verglichen werden.

Ein mögliches Synthesziel sind Verbindungen wie die in Abbildung 4.33 gezeigte, welche durch reduktive Aminierung der entsprechenden Aminoaldehyde (4-Aminobutanal bzw. 5-Aminopentanal, s. u.) mit **H-9** zugänglich sein sollten.

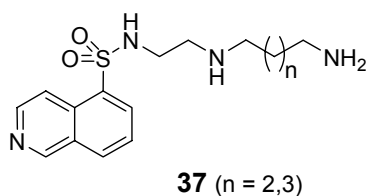


Abbildung 4.33: Immobilisierbare H-9-Derivate für die Affinitätschromatographie

Beim Versuch der Darstellung des Fmoc-geschützten 4-Aminobutanals **40** aus 4-Aminobutyraldehyddiethylacetal **38** (Abbildung 4.34) ergaben sich allerdings Probleme. So kam es bei der sauren Spaltung des Acetals **39** zu intramolekularen Nebenreaktionen des Fmoc-geschützten Amins; zwei der Nebenprodukte konnten isoliert und als die Verbindungen **41** bzw. **42** identifiziert werden.^[163]

In den ¹H-NMR-Spektren von **41** bzw. **42** erscheinen jeweils die Signalsets zweier Konformere, was wahrscheinlich auf eingeschränkte Drehbarkeit zurückzuführen ist. Ein Indiz dafür sind die Konformerenverhältnisse: bei der Verbindung **41** ergibt sich aus den Integralen im ¹H-NMR-Spektren ein Verhältnis von 55:45, während im Fall der Verbindung **42**, wo die OH-Gruppe entweder zum Carbonyl- oder zum Alkoxy-Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann, ein Verhältnis von 61:39 bestimmt wurde.

Als ein drittes Nebenprodukt wurde anhand des MALDI-ToF-MS die Verbindung **43** identifiziert.

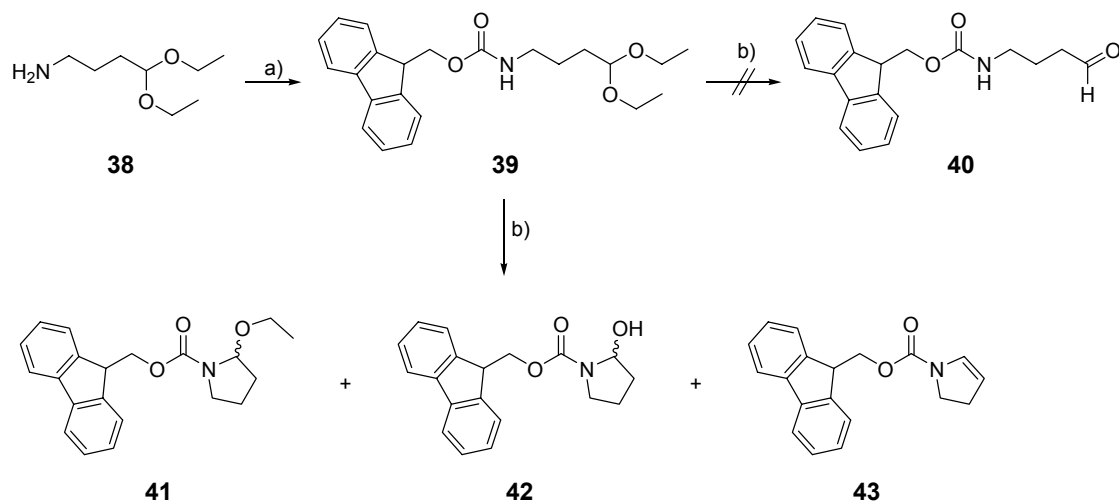
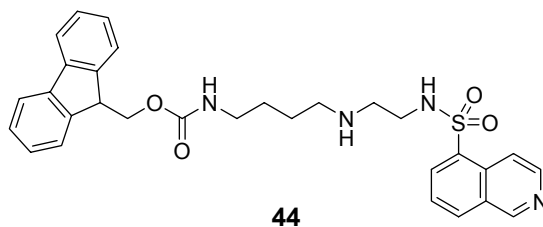


Abbildung 4.34: Versuch der Darstellung von *N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-4-amino-butanal **40**.

a) Fmoc-OSU, NEt₃, ACN, RT, 4 h, 60 %; b) 1N HCl, THF, RT, 19 % **41** und 63 % **42** (**43** nicht isoliert).

Eine Änderung der Spaltbedingungen von HCl/THF zu TFA/CHCl₃^[164] bzw. zu nassem Kieselgel^[165] führte hinsichtlich der Bildung der Nebenprodukte zu keiner Besserung.

Nach einer Testumsetzung des Reaktionsgemisches der Acetalspaltung mit **H-9** und NaHB(OAc)₃, konnten im MALDI-ToF-MS bei m/z 545.3 ([M+H]⁺, berechnet für C₃₀H₃₃N₄O₄S⁺: 545.2), 567.3 ([M+Na]⁺, berechnet für C₃₀H₃₂N₄O₄SNa⁺: 567.2) und 583.2 ([M+K]⁺, berechnet für C₃₀H₃₂N₄O₄SK⁺: 583.2) zwar die Signale des gewünschten Produkts **44** detektiert werden, was auf eine intermediäre Existenz von **40** hindeutet, Isolierungsversuche im größeren Maßstab blieben aber erfolglos.



Als Alternative wurde die Oxidation eines primären Alkohols zum Aldehyd mittels Pyridiniumchlorochromat versucht.^[166]

Der vom Fmoc-geschützten 5-Amino-1-pentanol **45** ausgehende Darstellungsversuch von 5-(Fmoc-amino)-1-pentanal **46** (Abbildung 4.35) blieb jedoch erfolglos, da auch hier – trotz anderer Reaktionsbedingungen – Nebenreaktionen dominierten. Das Hauptnebenprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel isoliert und konnte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig als das ungesättigte Carbamat **47** charakterisiert werden, welches aus dem intermediär gebildeten Aldehyd **46** durch intramolekulare Zyklisierung und anschließende Wasserabspaltung entsteht. Auch im ¹H-NMR-Spektrum von **47** erscheinen die Signalsets zweier Konformere (vgl. oben), das Verhältnis beträgt hier 58:42.

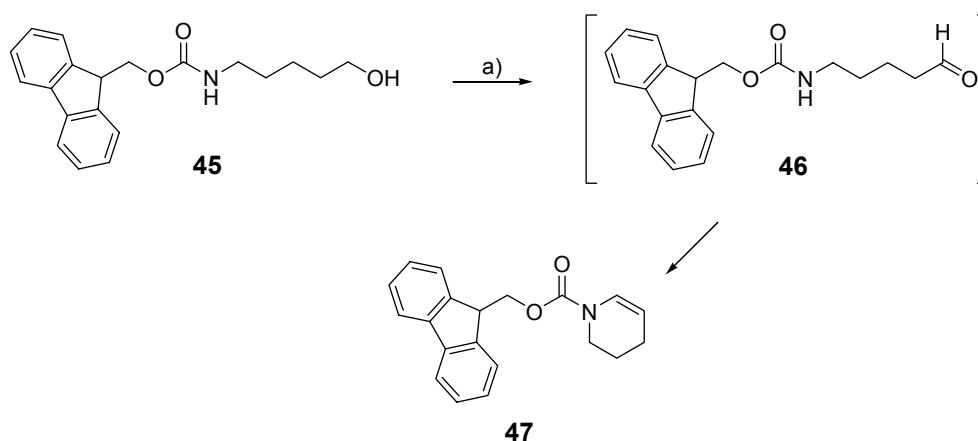


Abbildung 4.35: Versuch der Darstellung von N-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-5-amino-1-pentanal **46.**

a) PCC, DCM, RT, 2 h, 36 % **47**.

Wegen der Probleme bei der Darstellung der Aminoaldehyde wurde die Synthesestrategie geändert: anstelle die Verknüpfung mittels reduktiver Aminierung einer Aldehydfunktion herbeizuführen, kann **H-9** auch durch nukleophile Substitution mit einem entsprechend derivatisierten Linker verbunden werden.

Eine Möglichkeit, dies zu realisieren stellen Linker dar, die eine Sulfonsäureestergruppe beinhalten. Verschiedene Versuche, den Fmoc-geschützten Aminoalkohol **45** durch Reaktion mit Tosylchlorid oder Tf₂O in einen Sulfonsäureester zu überführen, führten jedoch

nicht zur Isolierung des gewünschten Produktes.^j Wegen dieser Probleme, und um eine gute Wasserlöslichkeit des Endproduktes zu gewährleisten, wurde stattdessen ein Linker auf Triethylglykolbasis ausgewählt.

Die für die spätere Immobilisierung an einer festen Phase notwendige Aminogruppe wird in geschützter Form als Azidofunktion in das Triethylglykol eingeführt. Diese säurestabile Aminoschutzgruppe erlaubt im Folgenden die problemlose Derivatisierung der Hydroxylfunktion.

Die Einführung der Azidofunktion kann ausgehend von zwei verschiedenen Edukten erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Substitution des Chlorids in 8-Chlor-3,6-dioxa-1-octanol **48** durch Reaktion mit Natriumazid (Abbildung 4.36).

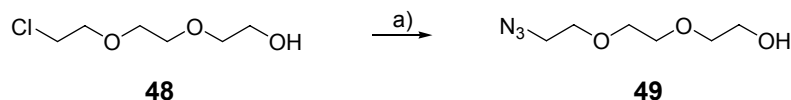


Abbildung 4.36: a) NaN₃, NaI, H₂O, 50 °C, üN, ~35 %.

Die von Hatanaka *et al.*^[167] publizierte Ausbeute von etwa 67 %^k für die in Abbildung 4.36 beschriebene Umsetzung konnte nicht reproduziert werden. Da die Umsetzung nicht quantitativ verlief und das Edukt **48** sich vom Produkt **49** nicht abtrennen lässt, wurde das Rohprodukt, dessen Produktgehalt mittels NMR zu etwa 50 % bestimmt wurde (entsprechend einer Ausbeute von ~35 %), so weiter eingesetzt.

Der Austausch des Chlorids gegen die Azidofunktion lässt sich im IR durch das Auftauchen der charakteristischen Azidobande bei 2107 cm⁻¹ verfolgen. Im ¹H-NMR-Spektrum erscheint das Triplett der zur Azidogruppe benachbarten Methylengruppe bei einer chemischen Verschiebung von 3.40 ppm.

^j Ob das Produkt überhaupt gebildet wurde oder ob es sich im Rahmen der Aufarbeitung zersetzte konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Statt dessen wurde die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe beobachtet, obwohl die eingesetzte Base DIPEA unter den gewählten Reaktionsbedingungen eigentlich nicht zur Fmoc-Abspaltung führen sollte.

^k In der Literatur werden lediglich die Ausbeute des Rohproduktes sowie dessen Produktgehalt (80 %) angegeben, der Prozentwert wurde mit diesen Daten berechnet.

Eine andere Synthesevariante für die Verbindung **49** geht von Triethylenglykol aus. Dabei wird unter Pseudoverdünnungsbedingungen eine der beiden Hydroxylgruppen mit Methansulfonylchlorid zum Sulfonsäureester umgesetzt. Anschließende Substitution mit Azid ergibt die Zielverbindung in größerer Reinheit und besseren Ausbeuten.^[80,168] Die auf diese Weise synthetisierte Verbindung wurde freundlicherweise von Dr. K. Jossen bzw. P. Plattner zur Verfügung gestellt.

Das 8-Azido-3,6-dioxa-1-octanol **49** wurde im Folgenden auf zwei verschiedenen Wegen zur Verbindung **51** umgesetzt.

Zum einen wurde es durch Reaktion mit *p*-Tosylchlorid in den *p*-Tosylester **50** überführt (Abbildung 4.37, Reaktionsweg a). Die Reaktion verlief laut DC-Kontrolle quantitativ, allerdings kam es bei der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel zu Verlusten. Diese sind wahrscheinlich auf Zersetzung während der Säulenchromatographie zurückzuführen, da Flashchromatographie geringere Verluste zur Folge hatte. Das Produkt konnte mit Hilfe der NMR- und MS-Spektren eindeutig charakterisiert werden. Die anschließende Umsetzung von **50** mit **H-9** ergab erst nach mehrtägiger Reaktionszeit bei 60 °C das Produkt **51** in einer Ausbeute von 65 % (Abbildung 4.37, Reaktionsweg b).

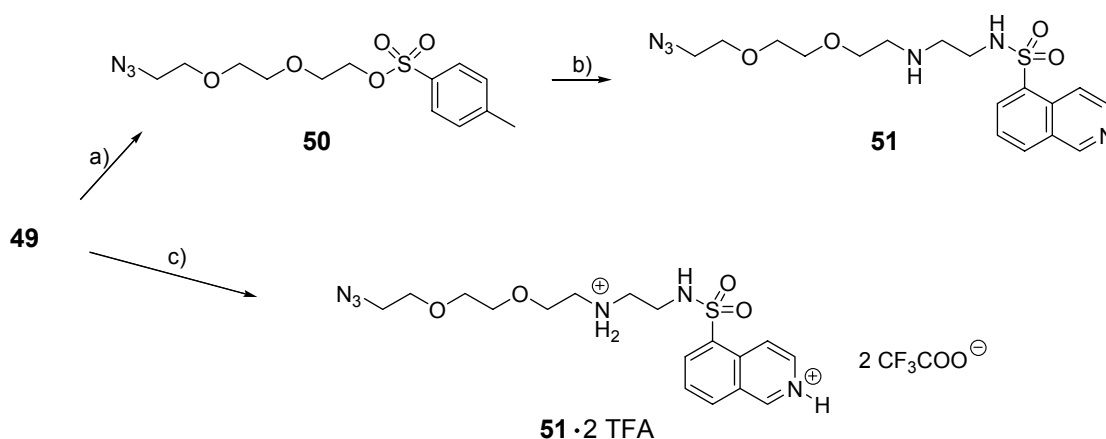


Abbildung 4.37: a) *p*-Tosylchlorid, DABCO, DCM, 0 °C → RT, 2 h, ~72 %; b) **H-9**, NMM, DMF, 0 °C → RT üN, 2 d 60 °C, 65 %; c) CF_3COCl , Pyridin, DCM; **H-9**, NMM, DMF, 16 h RT, 1 d 60 °C, ~50 %.

Zum anderen wurde aus dem 8-Azido-3,6-dioxa-1-octanol **49** mit Triflatsanhydrid Tf_2O der entsprechende Trifluormethansulfonsäureester dargestellt, welcher nach Entfernen des überschüssigen Tf_2O ohne weitere Aufarbeitung mit **H-9** versetzt wurde (Abbildung 4.37, Reaktionsweg c). Auch in diesem Fall erwies sich Rühren bei RT als unzureichende Reaktionsbedingung, dementsprechend wurde die Temperatur ebenfalls auf 60 °C angehoben und die Reaktionszeit verlängert. Die Endausbeute, welche für beide Reaktionswege bei etwa 50 % lag, lässt sich wahrscheinlich durch Reaktionsführung bei höherer Temperatur in einem anderen Lösungsmittel noch optimieren.

Der Versuch, die Azidogruppe mit $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}$ in die Aminogruppe der Zielverbindung **52** (Abbildung 4.38) zu überführen, scheiterte am heteroaromatischen Ring des Isochinolins, welcher unter diesen Bedingungen ebenfalls reduziert wurde.

Der Einsatz von Thiolen zur Reduktion der Azidofunktionalität erwies sich als erfolgreicher.^[169,170] Es wurden zwei verschiedene Thiolverbindungen verwendet, 1,4-Dithioerythritol (DTE)¹ und 1,3-Propandithiol, wobei mit 1,3-Propandithiol eine bessere Ausbeute erzielt werden konnte als mit DTE. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass im Fall des 1,3-Propandithiols ein Großteil des Reagenzes als Polysulfid ausfällt und abfiltriert werden kann, was die Aufarbeitung erleichtert. Allerdings bleibt ein Anteil löslicher Sulfide zurück, so dass eine Aufreinigung mittels RP-HPLC bei beiden Reagenzien erforderlich war.

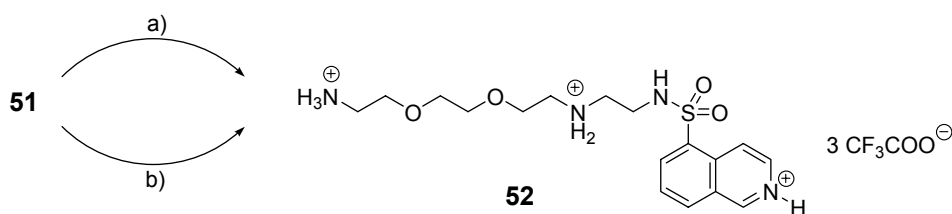


Abbildung 4.38: a) DTE, DBU, MeOH, RT, $\bar{u}\text{N}$, 45 %; b) 1,3-Propandithiol, NEt_3 , MeOH, RT, $\bar{u}\text{N}$, 62 %.

¹ In der Literatur wird in der Regel der Einsatz von 1,4-Dithiothreitol (DTT) anstelle von DTE beschrieben. Da letzteres vorhanden war und es nicht ersichtlich ist, inwiefern sich die beiden Substanzen in Bezug auf ihre Eignung als Reduktionsmittel unterscheiden sollten, wurde DTE verwendet.

Nachteilig an 1,3-Propanedithiol ist die im Vergleich zu DTE höhere Flüchtigkeit, die im Umgang eine deutlich größere Geruchsbelästigung zur Folge hat.

Die erfolgreiche Reduktion der Azidogruppe lässt sich im IR-Spektrum am Verschwinden der entsprechenden Bande ablesen. Des Weiteren wird das Vorliegen der Verbindung **52** durch die NMR-Spektren sowie das hochaufgelöste Massenspektrum bestätigt.

4.6.1 Vergleich der Bindungseigenschaften von H-9 und Derivat 52 im Biacore®

Sowohl **H-9** als auch **52** wurden jeweils auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die Aktivierung der Matrix wurde wiederum nach dem NHS/EDC-Protokoll durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.3).^m

In Abbildung 4.39 sind die Messkurven für die Bindung von PKA an immobilisiertem **52** dargestellt. Auch hier liegt eine lineare Abhängigkeit des erhaltenen Resonanzsignals von der Konzentration der Analytlösung vor.ⁿ

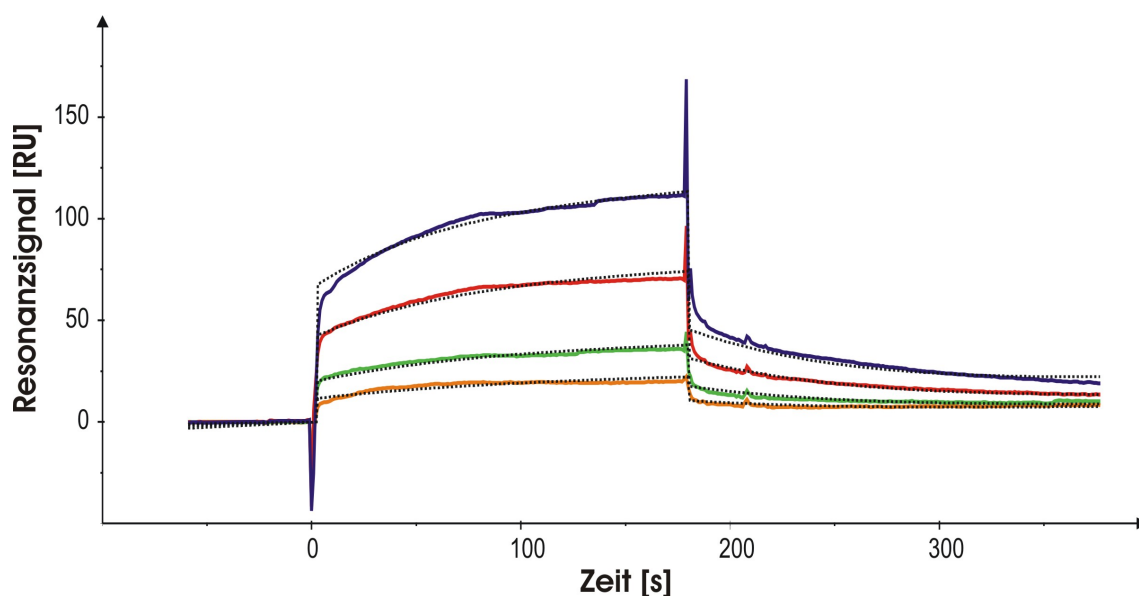


Abbildung 4.39: Kinetik der konzentrationsabhängigen Bindung von PKA an immobilisiertem **52** unter Annahme einer 1:1-Bindung mit Basisliniendrift.

75 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM; die gefitteten Kurven sind gestrichelt dargestellt (CM5-Chip, Immobilisierungsniveau 80 RU, Tris-Puffer).

Die Übereinstimmung der Messkurven mit den von der BIAevaluation Software berechneten theoretischen Kurven (Abbildung 4.39, gestrichelte Kurven) ist in diesem Fall

^m Für die dem Artikel von Inagaki *et al.*^[162] eigentlich entsprechende Bromcyan-Aktivierung sind die Biacore-Sensorchips nicht ausgelegt. Des weiteren ist Bromcyan hochtoxisch. Für die NHS/EDC-Aktivierung des Sensorchips spricht außerdem, dass auch die anschließende Affinitätschromatographie anstelle von CNBr-aktiverter mit NHS-aktiverter Sepharose durchgeführt wird, da diese eine zusätzliche Linkereinheit in Form von 6-Aminohexansäure aufweist.

ⁿ In den hier beschriebenen Bindungsstudien diente Tris-HCl als Laufpuffer; es konnte jedoch auch in HEPES-Puffer eine Bindung von PKA an dem immobilisiertem Liganden **52** beobachtet werden.

akzeptabel, die aus dem *Fitting* erhaltenen kinetischen und thermodynamischen Konstanten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Kinetische und thermodynamische Konstanten für die Interaktion PKA/52

k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	R_{max}	K_A [1/M]	K_D [M]	χ^2
$5.02 \cdot 10^4$	0.0115	160	$4.36 \cdot 10^6$	$2.29 \cdot 10^{-7}$	1.71

Die aus dem *Fitting* erhaltene Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $K_D = 229$ nM (Tabelle 4.2) stimmt gut mit dem aus der Auftragung als *Scatchard-Plot* (Abbildung 4.40) erhaltenen Wert $K_D = 212$ nM überein.

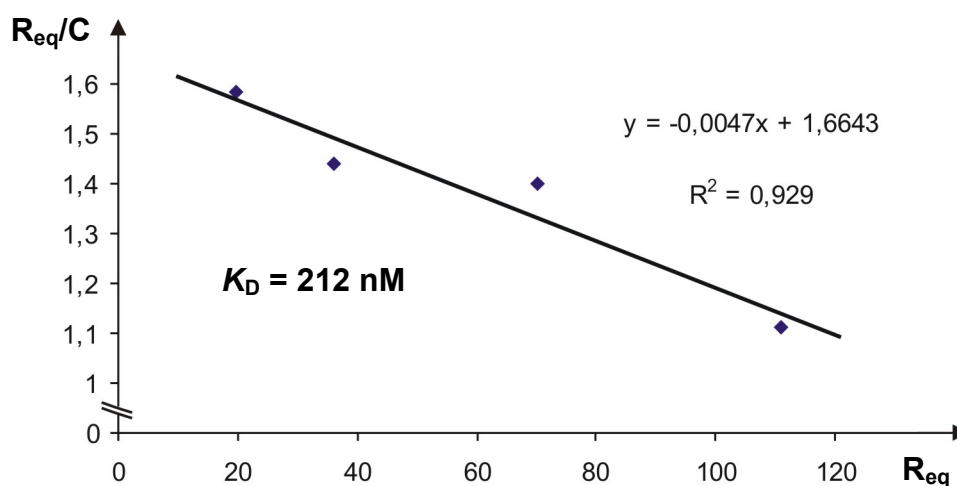


Abbildung 4.40: Scatchard-Plot für die PKA-Konzentrationsreihe an immobilisiertem 52 (Abbildung 4.39); durchgezogene Linie = Gerade der linearen Regression; R^2 = Korrelationskoeffizient.

Auch der Wert, der für die Wechselwirkung von PKA mit dem immobilisierten Derivat **12** bestimmt wurde, liegt mit $K_D = 232$ nM im gleichen Bereich (vgl. Abbildung 4.17). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Affinität von **H-9** durch die Modifizierung mit der Photoreaktivgruppe Bpa nicht negativ beeinflusst wurde.

Abbildung 4.41 zeigt das Ergebnis der Interaktionsstudie zur konzentrationsabhängigen Bindung von PKA an direkt immobilisiertem **H-9**.

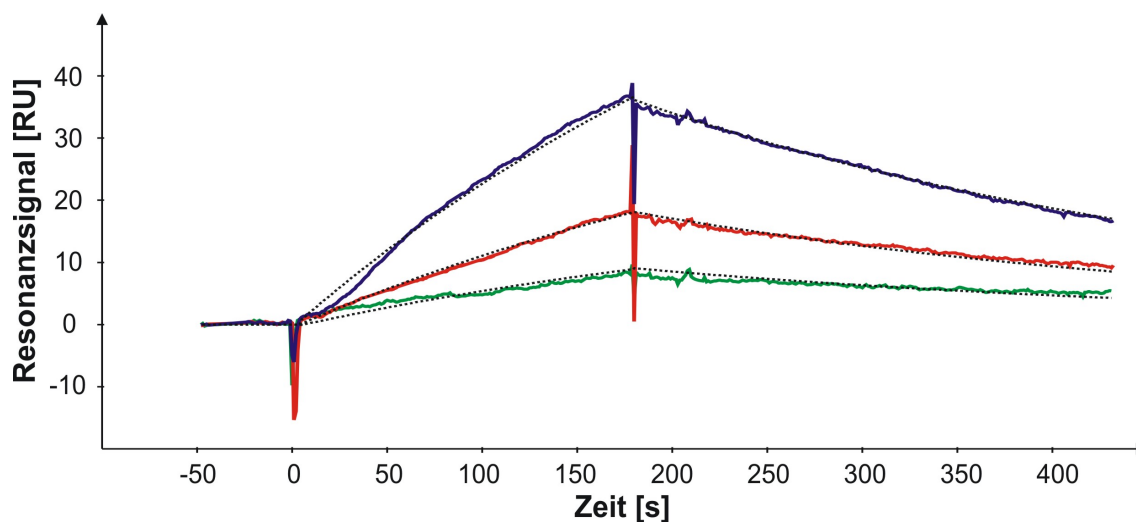


Abbildung 4.41: Kinetik der konzentrationsabhängigen Bindung von PKA an immobilisiertem H-9 unter Annahme einer 1:1-Langmuir-Bindung.
50 nM, 25 nM, 12.5 nM; die gefitteten Kurven sind gestrichelt dargestellt (Immobilisierungsniveau 44 RU).

Die Auswertung der erhaltenen Messkurven mittels *Scatchard-Plot* war hier nicht anwendbar, da der immer noch recht steile Anstieg der Messkurven gegen Ende der Injektion darauf hindeutet, dass sich die Wechselwirkung von PKA mit dem immobilisierten **H-9** noch nicht im Gleichgewicht befand.

Aus diesem Grund wurde die BIAevaluation Software zur Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Konstanten verwendet, die aus dem *Fitting* erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Kinetische und thermodynamische Konstanten für die Interaktion PKA/H-9

k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	R_{max}	K_A [1/M]	K_D [M]	χ^2
$1.06 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4.99 \cdot 10^3$	$3.55 \cdot 10^5$	$2.82 \cdot 10^{-6}$	0.38

Der für die Dissoziationskonstante kalkulierte Wert $K_D = 2.82 \mu\text{M}$ ist etwa eine Zehnerpotenz größer als der für die Bindung von PKA an immobilisiertem **52** bestimmte K_D -Wert

(229 nM bzw. 212 nM; siehe Tabelle 4.2 bzw. Abbildung 4.40). Die in **52** vorhandene Linkereinheit scheint also die Affinität des Inhibitors im Vergleich zu direkt immobilisiertem **H-9** positiv zu beeinflussen. Ob dies jedoch tatsächlich auf die protonierbare Aminofunktion zurückzuführen ist, wie in der Veröffentlichung von Hidaka *et al.*^[101] beschrieben, oder ob auch sterische Gründe eine Rolle spielen, ist nicht feststellbar.

Ein wirklich aussagekräftiger Vergleich wäre nur bei Immobilisierung der PKA auf einem Chip möglich, da dann die Bindung eines dem immobilisierten **H-9** entsprechenden Amid-Derivates der Bindung von **52** an PKA gegenübergestellt werden könnte. Allerdings ist auch dieser Versuchsaufbau wegen der relativ zu PKA sehr geringen Molekülgröße der **H-9**-Derivate nicht unproblematisch, da entsprechend nur ein schwaches Resonanzsignal zu erwarten ist.

Das Derivat **52** wird derzeit von Lutz Wobbe als Ligand für die Affinitätschromatographie von *Chlamydomonas reinhardtii*-Präparationen eingesetzt. Verschiedene zytosolische Proteine konnten angereichert und mit **H-9** bzw. ATP gezielt eluiert werden, die Identifizierung steht jedoch auch hier noch aus (vgl. Kapitel 4.4.2).

4.7 Synthese eines neuen Linkers bzw. Bausteins

Prinzipiell kann aus jedem reversibel bindenden Inhibitor, der einen geeigneten Anknüpfungspunkt aufweist, durch Kombination mit Reaktiv- und Reportergruppen eine chemische Sonde analog **1** entwickelt werden. Je mehr verschiedene Bausteine zur Verfügung stehen, und je individueller diese untereinander zusammengefügt werden können, desto leichter können solche Sonden entwickelt und optimiert werden. So kann die Benzophenon-Photoreaktivgruppe je nach Bedarf entweder als 4-Benzoylphenylalanin oder z. B. auch endständig als 4-Aminobenzophenon eingeführt werden. Bi- oder oligofunktionelle Linkermoleküle tragen ebenfalls zur Variabilität dieses Baukastensystems bei.

Die Synthese eines neuen bifunktionellen Linkers, der sowohl eine Amino- als auch eine Carboxyfunktionalität enthält, wird im Folgenden beschrieben.

Das Molekül **49**, welches aus Triethylenglykol oder 8-Chlor-3,6-dioxa-1-octanol zugänglich ist (vgl. Abbildung 4.36), weist mit der Azidogruppe bereits die Aminofunktionalität in geschützter Form auf. Da die Azidofunktion säurestabil ist, kann die Hydroxylfunktion durch Oxidation mit Jones-Reagenz in die Carboxylfunktion überführt werden (Abbildung 4.42).

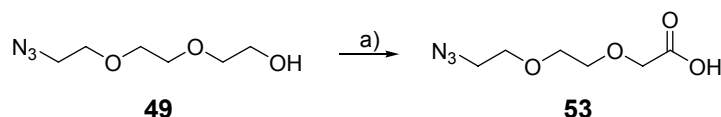


Abbildung 4.42: a) Jones-Reagenz ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$), Aceton, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 4 h, $\sim 90\%$.

Die Oxidation wird durchgeführt, indem eine Lösung des Alkohols **49** in Aceton solange tropfenweise mit Chromreagenz versetzt wird, bis eine bleibende Orangefärbung^o des Reaktionsgemischs die quantitative Umsetzung des Alkohols anzeigt.

^o Im Verlauf der Redox-Reaktion wird das rotorange CrO_3 zu grünem $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ reduziert, welches ausfällt.

Überschüssiges Chromreagenz wird anschließend mit Isopropanol gequench, und nach Entfernen des grünschwarzen $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ -Niederschlags wird die Azidocarbonsäure **53** erhalten.^p

Mit der Verbindung **53** existiert nun der gewünschte bifunktionelle Linker. Da die Aminofunktion noch als Azid maskiert vorliegt, kann die Carboxylfunktion gezielt mit Amino- oder Hydroxylgruppen verknüpft werden. Alternativ kann auch eine Säureschutzgruppe eingeführt werden, um nach Reduktion des Azids zum Amin letzteres zu derivatisieren. Die Umwandlung des Azids in eine Aminofunktion kann u. a. durch katalytische Hydrogenolyse oder mit Thiolverbindungen erreicht werden.

Im Folgenden ist die Umsetzung des Linkers **53** mit 4-Aminobenzophenon zu der Verbindung **55** beschrieben (Abbildung 4.43), welche einen weiteren Baustein für den „Sondenbaukasten“ darstellt. Die Verknüpfung der Carboxylgruppe von **53** mit der Aminofunktion des 4-Aminobenzophenons kann entweder mit Hilfe von Kupplungsreagenzien (Abbildung 4.43, Reaktionsweg a) oder über das Säurechlorid (Abbildung 4.43, Reaktionsweg b) erreicht werden.

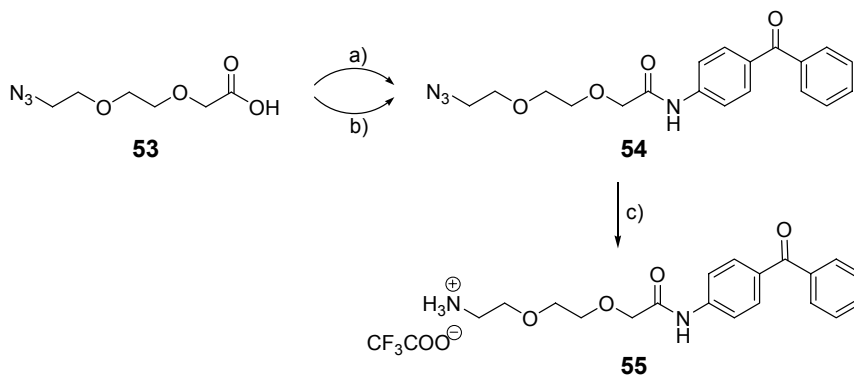


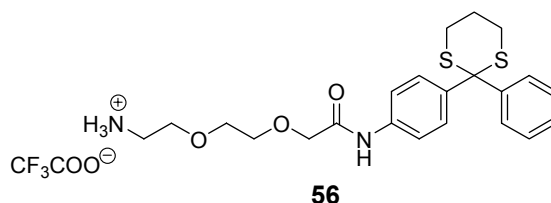
Abbildung 4.43: a) 4-Aminobenzophenon, TBTU, DIPEA, DMF/DCM (1:2), 0 °C → RT, 2 d, ~45 %; b) Thionylchlorid, Rückfluss; 4-Aminobenzophenon, NEt_3 , DCM, 0 °C → RT, 4.5 h, ~71 %; c) 1,3-Propandithiol, NEt_3 , MeOH, RT, üN, 47 %.

^p Wenn mehr als 50 mg **49** umgesetzt wurden, erwies sich das Abtrennen des ausgefallenen $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ als relativ schwierig, da der Niederschlag dann eine klebrige Konsistenz aufwies. Diese erschwerte das Abfiltrieren sowie das Waschen des Filterkuchens und hatte dementsprechend Ausbeuteverluste zur Folge.

Die mit ~45 % mäßige Ausbeute der Kupplungsreaktion (Reaktionsweg a) ist auf die – verglichen mit aliphatischen Aminen – geringere Nukleophilie der aromatischen Aminogruppe zurückzuführen, welche für eine rasche Umsetzung mit dem TBTU-Aktivester anscheinend nicht ausreicht. Wird die Carboxylfunktion jedoch stattdessen in das reaktivere Säurechlorid überführt (Reaktionsweg b), entsteht **54** in zufrieden stellenden Ausbeuten von über 70 %.

Auch in diesem Fall ist die Reduktion der Azidogruppe nicht mit $H_2/Pd/C$ möglich, da die Ketogruppe der Benzoylphenyleinheit reduziert wird. Die Umwandlung der Azido- in die Aminofunktion wurde mit 1,3-Propanedithiol durchgeführt, da dies bei der Darstellung von **52** bessere Resultate zur Folge hatte als DTE (vgl. Abbildung 4.38).

Das Vorliegen der Zielverbindung **55** wird durch die NMR- und Massenspektren eindeutig belegt. Allerdings wurde die Ketofunktion trotz basischer Reaktionsbedingungen in einem gewissen Ausmaß in das Thioketal **56** überführt.



Durch Isolierung dieses Nebenproduktes und Thioketalspaltung ließe sich die Ausbeute von **55** daher noch erhöhen. Eventuell könnte sich in diesem Fall – entgegen der Erfahrungen bei der Synthese von **52** – auch der Einsatz von DTE als Thiolreagenz vorteilhaft auswirken, da anstelle eines Sechsring-Thioketals ein ungünstigeres Siebenring-Thioketal entstehen müsste.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzept für die funktionelle Proteomik entwickelt, welches neue Möglichkeiten in der Kinomanalytik, d. h. der simultanen Erfassung aller zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle/einem Gewebe vorhandenen Kinasen, eröffnet.

Ausgehend von einem reversiblen Kinaseinhibitor wurden sowohl eine Sonde für die affinitätsbasierte Markierung von Kinasen als auch ein Ligand für die Affinitätschromatographie entwickelt. Beide Methoden eignen sich zur Erzeugung von Kinase-Subproteomen, welche aufgrund der verringerten Komplexität einfacher und schneller analysiert werden können als das Gesamtproteom.

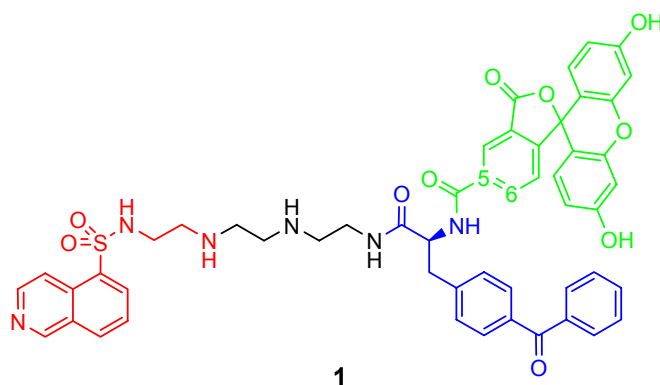
Der neuartige Ansatz des hier vorgestellten Konzepts ist die Verwendung einer chemischen Sonde, die auf einem reversibel bindenden Inhibitor basiert. Mit einer Reportergruppe ausgestattete, irreversible Inhibitoren wurden schon früher erfolgreich zur Proteinmarkierung eingesetzt, da sie eine kovalente Bindung zum Zielprotein ausbilden.^[35,36] Bei Proteinfamilien ohne irreversibel bindende Liganden stieß diese Methode jedoch an ihre Grenzen.

Durch die Verwendung reversibler Liganden kann diesem Mangel Abhilfe geschaffen werden. Die Ausbildung der erforderlichen kovalenten Bindung zum Zielprotein wird durch Verknüpfung des Liganden mit einer Reaktivgruppe gewährleistet.

Als Testsystem zur Erprobung der Affinitätsmarkierung von Proteinen mit reversiblen Inhibitoren wurden Kinasen ausgewählt.

Die chemische Sonde **1** basiert auf dem Breitbandkinaseinhibitor **H-9**, welcher mit der Photoreaktivgruppe **4-Benzoyl-L-phenylalanin** und **Carboxyfluorescein** als Reportergruppe verknüpft wurde. Unter Bestrahlung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 350$ nm wird im

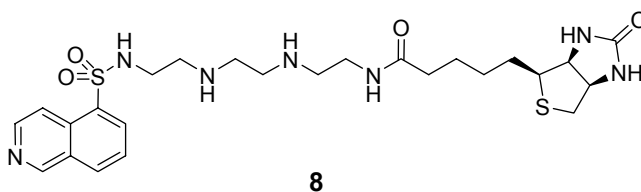
Benzophenon-Chromophor ein Diradikal generiert, welches in eine CH-Bindung des Zielproteins inseriert. Das Fluorescein erlaubt die einfache Fluoreszenzdetektion markierter Proteine z. B. in einem 2D-Polyacrylamidgel.



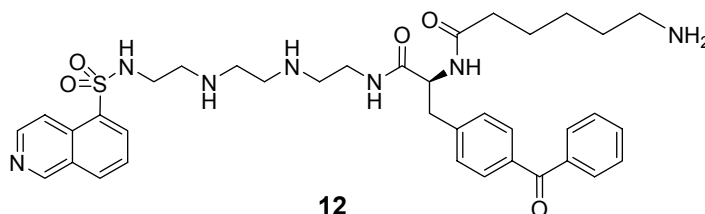
In einem Experiment zur Photoaffinitätsmarkierung wurden Hexokinase, Kreatinkinase, 3PGA Phosphokinase und Proteinkinase A mit **1** inkubiert und durch anschließende Bestrahlung erfolgreich markiert. Die unterschiedlichen Kinasen spiegeln das breite Wirkungsspektrum des Kinaseinhibitors **H-9** wider, welcher nicht auf Proteinkinasen beschränkt ist.

Inwiefern die Derivatisierung die Bindungseigenschaften des Inhibitors beeinflusst, sollte in Oberflächenplasmonresonanz-Studien untersucht werden.

Das zu diesem Zweck synthetisierte biotinylierte Derivat **8** konnte erfolgreich auf einem Streptavidin-Sensorchip immobilisiert werden; wegen starker, unspezifischer Wechselwirkungen der Proteine mit der Streptavidinoberfläche wurde dieser Weg jedoch nicht weiter verfolgt.



Stattdessen wurde mit der Verbindung **12** ein Analogon der chemischen Sonde **1** entwickelt, welches anstelle der Carboxyfluoresceineinheit einen Linker mit einer terminalen Aminofunktion enthält. Über diese Aminofunktion konnte **12** auf der Oberfläche eines Sensorchips mit carboxymethylierter Dextranmatrix (CM5-Chip) immobilisiert werden.



Für die SPR-Studien wurden Proteinkinase A und Kreatinkinase als Modellproteine ausgewählt. Durch Wettbewerbsstudien mit **H-9** und ATP konnte gezeigt werden, dass die Bindung des immobilisierten **12** sowohl bei PKA als auch bei Kreatinkinase spezifisch erfolgt. Die Bindungsstudien belegen, dass die Derivatisierung des Inhibitors keine Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften zur Folge hat, da die für die Wechselwirkung des immobilisierten Derivates **12** mit PKA bestimmte Gleichgewichtskonstante $K_D = 2.32 \cdot 10^{-7}$ M etwa dieselbe Größenordnung hat wie die entsprechende Konstante für die Wechselwirkung **H-9**/PKA ($K_D = 1.9 \cdot 10^{-6}$ M).^[101]

Es wurden außerdem verschiedene Kontrollderivate synthetisiert und mittels SPR untersucht, um eventuelle Schwachstellen der Sonde **1** festzustellen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass mit der Verbindung **1** bereits die ideale chemische Sonde vorliegt, da sich weder die Kontrollverbindungen mit ausgetauschtem Fluoreszenzfarbstoff noch jene mit einer zusätzlichen Linkereinheit zwischen Photoreaktivgruppe und Farbstoff als affiner erwiesen.

Die Spezifität der Wechselwirkung Sonde **1**/Protein konnte außerdem durch verschiedene Bestrahlungsexperimente weiter belegt werden. So wurde nach Bestrahlung von SDS-denaturierter Kreatinkinase trotz eines hohen Überschusses der Sonde **1** kein markiertes Protein detektiert, was die Bedeutung der spezifischen Proteinerkennung durch den Inhibitor für die affinitätsbasierte Markierung unterstreicht.

Die Eignung des vorgestellten Konzepts zur Auffindung von Kinasen in Proteingemischen wurde demonstriert, indem ein Thylakoidmembranpräparat von *Chlamydomonas reinhardtii* mit Kreatinkinase versetzt wurde. Die Kreatinkinase wurde erfolgreich fluoreszenzmarkiert und anschließend mittels MALDI-ToF-Fingerprintanalyse eindeutig identifiziert. Die Funktionalität der Kombination aus affinitätsbasierter Markierung mit der chemischen Sonde **1** und Massenspektrometrie zur Identifizierung von Kinasen konnte somit gezeigt werden.

Verschiedene Thylakoidproteine wurden ebenfalls markiert, die Identifizierung dieser mutmaßlichen Kinasen steht jedoch noch aus, da das *Chlamydomonas reinhardtii*-Genom noch nicht vollständig annotiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass reversible Inhibitoren für die selektive, affinitätsbasierte Markierung von Kinasen in der funktionellen Proteomik eingesetzt werden können.

Durch Entwicklung weiterer chemischer Sonden auf Grundlage spezifischerer Kinaseinhibitoren anstelle des Breitbandinhibitors **H-9** sollte auch die Erzeugung genauer definierter Subproteome möglich sein, welche dann nicht mehr die gesamte Kinasefamilie beinhalten, sondern nur noch spezielle Untergruppen.

Da sichergestellt werden muss, dass der jeweilige Inhibitor sowie die von ihm abgeleitete chemische Sonde die gleichen Bindungseigenschaften haben, bieten sich vor allem solche Inhibitoren als chemische Sonden an, von denen eine Kristallstruktur im Komplex mit dem Zielprotein existiert. Funktionalisierungspunkte, deren Modifikation in Hinsicht auf die Inhibitoraffinität unkritisch sein sollte, können auf diese Weise leicht ausgemacht werden. Allerdings wurden bisher erst wenige 3D-Strukturen von Kinase-Inhibitor-Komplexen aufgeklärt, so dass dies momentan einen limitierenden Faktor darstellt.

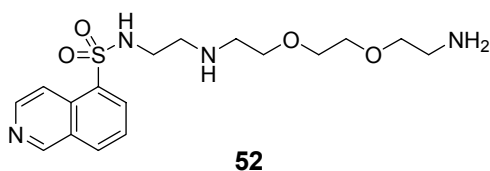
Das hier vorgestellte Konzept ist allgemein für das affinitätsbasierte Markieren von Proteinen mit reversiblen Inhibitoren anwendbar.

Seine Bedeutung und Funktionalität wird dadurch unterstrichen, dass andere Gruppen unabhängig vergleichbare Konzepte für die affinitätsbasierte Markierung von Metalloproteasen,^[38,81] Aspartatproteasen^[82] und Galectinen^[83] mit Sonden, die sich von reversiblen Liganden ableiten, entwickelt haben (vgl. Tabelle 2.2).

Die Darstellung einer von **H-9** abgeleiteten, gerichteten Sulfonester-sonde konnte bisher lediglich teilweise realisiert werden, da sich die Synthese der Sulfonesterfunktion als unerwartet schwierig erwies. Ob sich dieses Problem durch Änderung synthetischer Parameter beheben lässt, bleibt noch zu untersuchen.

Für den Einsatz in der Affinitätschromatographie sollte **H-9** mit einem Linker funktionalisiert werden, um die **H-9**-Einheit ohne Beeinträchtigung ihrer Affinität auf einer festen Phase immobilisieren zu können. Bei direkter Immobilisierung von **H-9** auf einer carboxylfunktionalisierten Matrix kann dagegen wegen der Umwandlung der terminalen Aminofunktion in ein Amid ein Affinitätsverlust nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich sorgt die Linkereinheit für eine bessere Zugänglichkeit der Inhibitoreinheit, wodurch mögliche sterische Behinderungen (im Vergleich zu direkt immobilisiertem **H-9**) reduziert werden.

Durch Umsetzung von **H-9** mit *p*-Toluolsulfonsäure-(8-azido-3,6-dioxaoct-1-yl)ester, gefolgt von thiolvermittelter Reduktion der Azidofunktion, wurde mit der Verbindung **52** ein für die Affinitätschromatographie geeignetes Derivat erhalten.



Sowohl das Derivat **52** als auch **H-9** selbst wurden jeweils über die terminale Aminofunktion auf einem CM5-Chip immobilisiert, um ihre Affinität gegenüber PKA in SPR-Studien zu untersuchen.

Die für die Wechselwirkung von **52** mit PKA bestimmte Gleichgewichtsdissoziationskonstante entspricht mit $K_D \sim 2.2 \cdot 10^{-7}$ M in etwa dem Wert für die Interaktion **12**/PKA (s. o.). Für die Interaktion des direkt immobilisierten **H-9** mit PKA ergab sich aus den Bindungsstudien eine höhere Gleichgewichtsdissoziationskonstante $K_D = 2.82 \cdot 10^{-6}$ M und damit eine geringere Affinität gegenüber PKA, was sich auf den Verlust der protonierbaren Aminofunktion oder auf die ungenügende Linkerlänge zurückführen lässt.

Das Derivat **52** wird derzeit als Ligand in der Affinitätschromatographie eingesetzt. Aus *Chlamydomonas reinhardtii*-Präparationen konnten verschiedene Proteine angereichert und mit **H-9** bzw. ATP gezielt eluiert werden, die Identifizierung steht jedoch auch hier noch aus.

In Zukunft könnte **52** auch in Biacore[®]-*micro-recover*-Experimenten als Ligand zum „Fischen“ neuer Kinasen eingesetzt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben zu den chemischen Experimenten

Schmelzpunktbestimmung Schmelzpunktapparatur Büchi B-540,
die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

IR-Spektren Jasco FT/IR-410, mit Basislinienkorrektur.

NMR-Spektren

Bruker AC-250 P (^1H : 250.13 MHz; ^{13}C : 62.9 MHz).

Bruker DRX-500 (^1H : 500.13 MHz; ^{13}C : 125.8 MHz).

Referenz: ^1H -NMR: TMS (0.00 ppm) bzw. Restwasserstoffsignal der deuterierten Lösungsmittel (DMSO- D_6 2.50 ppm, CD_3OD 3.31 ppm, D_2O 4.79 ppm).
 ^{13}C -NMR: TMS (0.00 ppm) bzw. Lösungsmittelsignal (DMSO- D_6 39.5 ppm, CD_3OD 49.0 ppm).

^{13}C -NMR-Spektren wurden mit ^1H -Breitband-Entkopplung aufgenommen. In der Regel wurden zwecks genauerer Zuordnung der Signale auch ^{13}C -DEPT-Spektren gemessen; in einigen Fällen wurden zusätzlich zweidimensionale homo- bzw. heteronukleare NMR-Spektren aufgenommen (COSY, HMQC, HMBC).

Bei ^{13}C -NMR-Spektren von Trifluoressigsäure Salzen wurde auf die Angabe der Signale der Trifluoressigsäure verzichtet.

MALDI-ToF-MS

PerSeptive Biosystems Voyager-DETM BiospectrometryTM Workstation

Laser: LSI-Stickstofflaser

($\lambda = 337 \text{ nm}$, Pulsbreite 3 ns, Wiederholungsrate 3 Hz)

Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB)
Kalibrierung: gegen Polyethylenglykol bzw. gegen die Matrix-Signale
Software: Applied Biosystems Voyager Instrument Control Panel V5.10,
Data Explorer V 4.0.0.0.

ESI-MS Bruker Daltonik Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer.

HRMS (ESI-FT-ICR)

Bruker Daltonik Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer
APEX III mit supraleitendem 7.0 T-Magnet.

Chromatographie

Säulenchromatographie Kieselgel 60, 63-200 μm (Merck).

Flashchromatographie Kieselgel 60, 40-63 μm (Merck).

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigplatten: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck);
Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ neutral (Typ E) (Merck);
Polygram ALOX N/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel).

Detektion:

UV: Desaga MinUVIS (254 nm/366 nm);

Anfärben: Ninhydrin-Lösung (0.3 g auf 100 ml 2-Propanol und 3 ml AcOH) oder
Bedampfen mit Iod.

Reversed-Phase (RP)-HPLC:

Controller: Thermo Separation Products SN 100

Pumpe: Thermo Separation Products P 4000

Software: ChromQuest Version 2.51

Eluent A: H₂O:Acetonitril:TFA (95:5:0.1)

Eluent B: H₂O:Acetonitril:TFA (5:95:0.1)

Analytische RP-HPLC

Autosampler: Thermo Separation Products AS 100

Detektor: Thermo Separation Products UV 6000 LP, $\lambda = 220 \text{ nm}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Vorsäule: VydacTM High Performance Guard Column, Protein and Peptide C18

Säule: VydacTM 218 TP54 Protein and Peptide C18 (5 μm , 250 \times 4.6 mm) oder Phenomenex[®] Jupiter C18 (5 μm , 250 \times 4.6 mm).

Flussrate: 1.0 ml/min

Methode:	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	0	100	0
	3	100	0
	40	0	100
	50	100	0

Präparative RP-HPLC

Detektor: Thermo Separation Products UV 1000

Vorsäule: VydacTM High Performance Guard Column, Protein and Peptide C18

Säule: VydacTM 218 TP 1022 Efficiency,
Protein and Peptide C18, 10 μm , 250 \times 22 mm

In den Fällen, wo die Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC erfolgte, ist die verwendete Methode jeweils bei der Analytik der entsprechenden Verbindung angegeben. Die Aufarbeitung der produkthaltigen Fraktionen geschah folgendermaßen: Acetonitril wurde am Rotationsverdampfer entfernt, anschließend wurde die wässrige Lösung lyophilisiert.

Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 2-4 (LOC-1m)

Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super 10 P

6.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Lösungsmittel wurden in p.A.-Qualität eingesetzt oder vor Gebrauch destilliert und im Bedarfsfall absolutiert.

Dichlormethan	Kaliumcarbonat, anschließend Calciumhydrid
Diethylether	Kaliumhydroxid, gefolgt von Calciumhydrid, anschließend Natrium/Benzophenon
DMF	3 h mit Ninhydrin (ca. 100 mg/l) refluxieren, anschließend Vakuumdestillation bei 55 mbar
THF	Kaliumhydroxid, gefolgt von Calciumhydrid, anschließend Natrium/Benzophenon

Lösungsmittel für RP-HPLC:

Acetonitril	Merck (<i>Lichrosolv</i>)
Wasser	Millipore [®] Reinstwasseranlage Milli Q
TFA	Solvay Fluor and Derivative GmbH

Chemikalien wurden bei Advanced ChemTech, Acros, Fluka, Merck, Lancaster, Iris Biotech und Novabiochem erworben.

Die Verbindung 1,8-Diamino-3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-3,6-diazaoctan **4** wurde synthetisiert wie bereits in der Diplomarbeit beschrieben und veröffentlicht.^[143]

H-9 wurde in Anlehnung an die Methoden von Hidaka *et al.* und Morikawa *et al.* synthetisiert.^[101,171]

Anmerkung:

Rühren über Nacht wird grundsätzlich unter einer Argon-Atmosphäre durchgeführt.

6.3 Allgemeine Angaben zu den biochemischen Experimenten

Oberflächenplasmonresonanz

Biacore[®] 3000 (Biacore AB)

Sensorchips: SA-Chip bzw. CM5-Chip (jeweils *research grade*)

Software: BIAcore 3000 Control Software Version 3.1.1 bzw 4.1;
BIAevaluation Version 3.1 bzw 4.1.

Bestrahlungsapparatur

Rayonet Photoreaktor (Southern NE Ultraviolet Co.),

ausgestattet mit 16 RPR-3500 Lampen, $\lambda = 350$ nm, Entfernung 5 cm.

Isoelektrische Fokussierung

BIO-RAD PROTEAN IEF Cell

IPG-Strips BIO-RAD ReadyStrip[™], pH 3-10 linearer Gradient, 7 cm

SDS-PAGE

Elektrophoresekammer BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System

Stromversorgung BIO-RAD PowerPac 200 bzw. PowerPac[™] Basic

Fluoreszenzdetektion

Fluoreszenzscanner Typhoon 8600 (GE Healthcare)

Software ImageQuant[™] Version 5.2 (GE Healthcare)

Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus der Millipore[®]-Anlage angesetzt, der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. Salzsäure eingestellt (jeweils Titrisol 0.1 M oder 1 M).

Die verwendeten Chemikalien waren analysenrein (p. A.) oder von BioChemika-Qualität.

Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert (Porengröße 0.22 µm) und im Ultraschallbad entgast.

Elektrophoresepuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3
Glycin-HCl Puffer	10 mM Glycin-HCl, pH 1.5 (Biacore AB)
HBS-EP Puffer	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) Surfactant P20, pH 7.4
HEPES-Puffer	10 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , 50 nM PMSF, pH 7.3
Phosphat Puffer:	<i>Stammlösungen:</i> (I) 0.2 M Mono-Kaliumphosphatlösung (II) 0.2 M Di-Kaliumphosphatlösung

für 100 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7.0:

39 ml (I)
+ 61 ml (II)
+ 1.75 g NaCl
<hr/> auf 200 ml auffüllen

ReadyPrep™ 2-D Starter Kit (BIO-RAD):

Rehydrierungspuffer	8 M Urea, 2 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS), 50 mM DTT, 0.2 % (w/v) Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte, Bromphenolblau
Equilibrierungspuffer I	0.375 M Tris-HCl, 6 M Urea, 20 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 2 % (w/v) DTT, pH 8.8
Equilibrierungspuffer II	Stammlösung: 0.375 M Tris-HCl, 6 M Urea, 20 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, pH 8.8 kurz vor Gebrauch auf 20 ml Puffer 0.5 g Iodacetamid zugeben
Agarose-Lösung	0.5 % niedrig schmelzende Agarose in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS, Bromphenolblau

3-fach Probenpuffer	1.75 ml Tris-HCl pH 6.8, 1.5 ml Glycerin, 5 ml SDS (10 %ig), 0.5 ml β -Mercaptoethanol, 1.25 ml Bromphenol-blau (gesättigt in 0.1 % Ethanol)
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
Tris-HCl Puffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.0
Standard	Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color (BIO-RAD) SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)
Fixiererlösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Glycerin
Silberkomplexlösung	2 % (w/v) AgNO ₃ , 2 % (w/v) NH ₄ NO ₃
Moderator	10 % (w/v) Wolframatokieselsäure
Entwickler	3 % Formaldehyd
Beschleunigerlösung	5 % (w/v) NaCO ₃
Stop-Lösung	5 % (v/v) Essigsäure

Enzyme

Proteinkinase A, katalytische Untereinheit aus Rinderherz (Sigma)

Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel (Roche bzw. Sigma)

Enzymstammlösungen

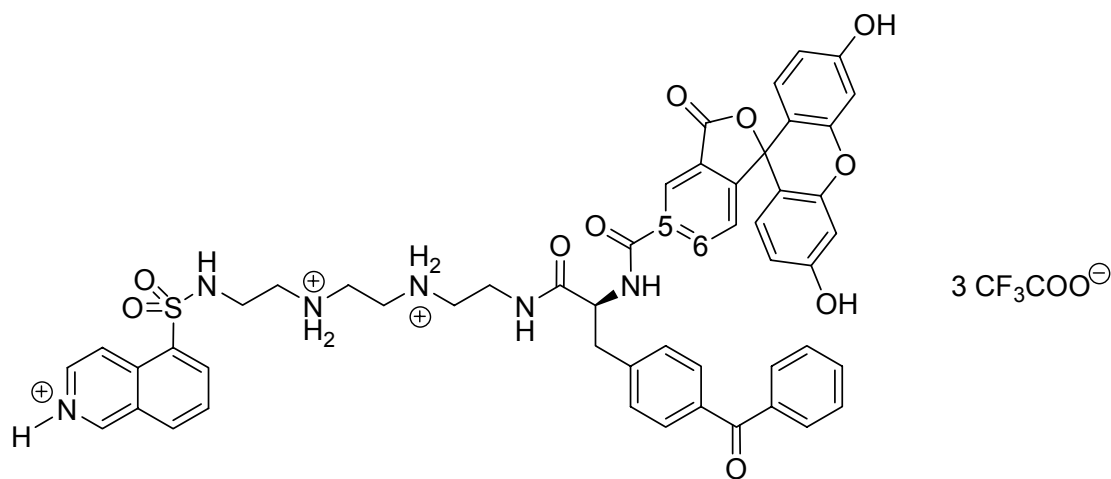
PKA kat. UE 1.195 μ M bzw. 22 μ M, rekonstituiert in DTE-Lösung
(6 mg/ml H₂O).

Kreatinkinase 4 μ M, 62 μ M oder 2.6 mM, jeweils gelöst in Reinstwasser.

6.4 Synthesen

6.4.1 Analytische Daten der chemischen Sonde (S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 1

Die aufgrund des Substitutionsmusters am Carboxyfluorescein entstehenden Regioisomere von **1** können durch präparative RP-HPLC getrennt werden (Gradient: A:B (92:8) → A:B (70:30) nach 5 min → A:B (30:70) nach 35 min, Flussrate 25 ml/min, $\lambda = 254$ nm), t_R (5-Carboxyfluoresceinisomer) = 14.4 min, t_R (6-Carboxyfluoresceinisomer) = 15.7 min.



(Gemisch der 5- und 6-Carboxyfluoresceinisomere)

Molmasse: 1289.09 g/mol

Summenformel: C₅₈H₄₉F₉N₆O₁₆S

5-Carboxyfluoresceinisomer:

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 2.98-3.49 (m, 14H, 6 CH₂, CH₂ *Benzoylphenylalanin*), 4.81 (m, 1H, CH *Benzoylphenylalanin*), 6.49-6.58 (m, 4H, 2 CCHCHCOH *Fluorescein*), 6.68 (m, 2H, 2 OCCHCOH *Fluorescein*), 7.36 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz, NHCOCCHCHC *Fluorescein*), 7.48-7.55 (m, 4H,

CH_{Benzoylphenyl}), 7.64-7.70 (m, 5H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.87 (m, 1H, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.17 (m, 1H, NHCOCCHCHC_{Fluorescein}), 8.36 (d, 1H, ³J = 7.2 Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.42 (d, 1H, ³J = 6.1 Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.45-8.53 (m, 4H, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}, NHCOCCHC_{Fluorescein}, SO₂NHCH₂, CH₂CH₂NHCO), 8.73 (d, 1H, ³J = 6.1 Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.80-9.06 (br. s, NH⁺), 9.14 (m, 1H, NHCOAr), 9.52 (s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}), 10.20 (br. s, OH).

6-Carboxyfluoresceinisomer:

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 2.93-3.39 (m, 14H, 6 CH₂, CH₂ Benzoylphenylalanin), 4.71 (m, 1H, CH_{Benzoylphenylalanin}), 6.45-6.59 (m, 4H, 2 CCHCHCOH_{Fluorescein}), 6.68 (m, 2H, 2 OCCHCOH_{Fluorescein}), 7.38 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz, CH₂CCH_{Benzoylphenyl}), 7.49-7.57 (m, 4H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.59-7.63 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.64-7.69 (m, 2H, NHCOCCHC_{Fluorescein}, CH_{Benzoylphenyl}), 7.87 (m, 1H, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.06-8.13 (m, 2H, NHCOCCHCHC_{Fluorescein}), 8.36 (d, 1H, ³J = 7.1 Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.41 (d, 1H, ³J = 6.1 Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.42-8.51 (m, 3H, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}, SO₂NHCH₂, CH₂CH₂NHCO), 8.73 (d, 1H, ³J = 6.1 Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.75-8.96 (br. s, NH⁺), 9.02 (m, 1H, NHCOAr), 9.52 (s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}), 10.20 (br. s, OH).

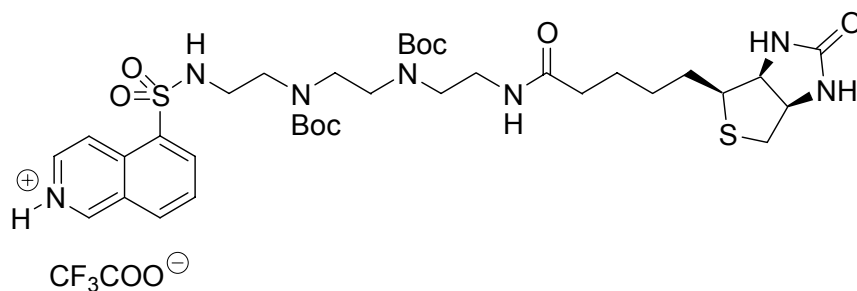
MS (ESI): $m/z = 474.2$ ([M+2H]²⁺, berechnet für C₅₂H₄₈N₆O₁₀S²⁺: 474.2), 947.3 ([M+H]⁺, berechnet für C₅₂H₄₇N₆O₁₀S⁺: 947.3).

HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 947.30862$ ([M+H]⁺, berechnet für C₅₂H₄₇N₆O₁₀S⁺: 947.30689; Abweichung 1.73 mmu/1.83 ppm).

6.4.2 Synthese des biotinylierten Derivates 8

6.4.2.1 *N*-(+)-Biotin-[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoacetat 7

Eine Lösung aus 5 mg (6.5 μmol) *N*-(8-Amino-3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-3,6-diazaoct-1-yl)isochinolin-5-sulfonamid **5** ($\cdot 2$ TFA) in 0.5 ml PBS-Puffer (0.1 M Natriumphosphat, 0.15 M Natriumchlorid, pH 7.2) wird mit 9 mg (19 μmol) Sulfosuccinimidobiotin versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wird das Reaktionsgemisch lyophilisiert und anschließend mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Das Produkt wird als Trifluoacetat erhalten.



Ausbeute: 6 mg (6.4 μmol , 98 %), blassgelber Feststoff.

Molmasse: 877.99 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_2$

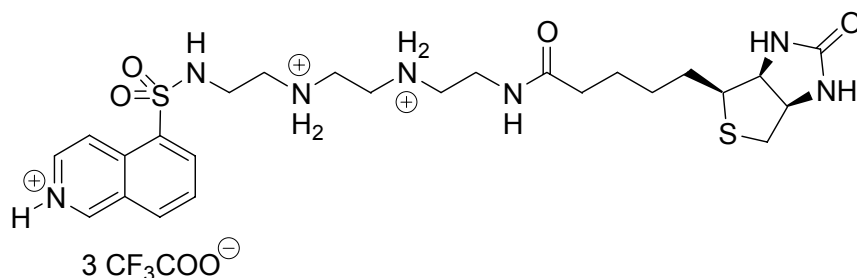
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 764.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2^+$: 764.3), 786.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}^+$: 786.3), 802.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2\text{K}^+$: 802.3).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 21.7$ min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (100:0) \rightarrow A:B (60:40) nach 45 min, Flussrate 13 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_R = 37.6$ min.

6.4.2.2 *N*-(+)-Biotin-[8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoacetat 8

Eine Lösung aus 6 mg (6.4 μmol) **7** in 3 ml TFA:DCM (3:7 v/v) wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 3 mg (3.3 μmol , 52 %), hygroskopischer blassgelber Feststoff.

Molmasse: 905.81 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{F}_9\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_2$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1.15-1.55 (m, 6H, CH_2 *Biotin*), 2.10-2.14 (m, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, COCH_2 *Biotin*), 2.56 (d, 1H, $^2J = 13.1$ Hz, CH_{endo} *S* *Biotin*), 2.78 (dd, 1H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 5.0$, CH_{exo} *S* *Biotin*), 3.09-3.16 (m, 7H, $\text{C}_{4\text{B}}$ *H* *Biotin*, 3 CH_2), 3.34-3.41 (m, 6H, CH_2), 4.21 (m, 1H, $\text{C}_{3\text{a}}$ *H* *Biotin*), 4.40 (m, 1H, $\text{C}_{6\text{a}}$ *H* *Biotin*), 7.97 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, meta zu CS}}$), 8.56 (m, 1H, $\text{CHCHNHCH}_{\text{Isochinolin}}$), 8.58 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.64 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.83 (m, 1H, $\text{CHCHNHCH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.67 (s, 1H, $\text{CCHNH}_{\text{Isochinolin}}$).

HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 564.24161$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}_2^+$: 564.24212; Abweichung 0.51 mmu/0.90 ppm).

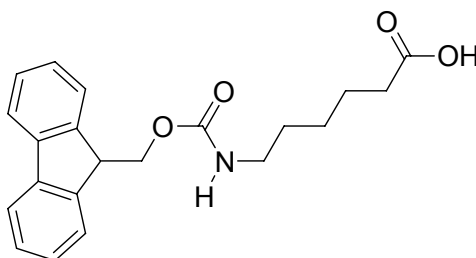
Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 9.5$ min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (100:0) \rightarrow A:B (25:75) nach 40 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_{\text{R}} = 13.5$ min.

6.4.3 Synthese des immobilisierbaren Derivates 12

6.4.3.1 *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-6-aminohexansäure 10

2.50 g (7.41 mmol) Fluorenylmethyloxycarbonylsuccinimid und 0.62 g (7.41 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden in einer Lösung von 0.97 g (7.41 mmol) 6-Amino-hexansäure **9** in 50 ml H₂O:Aceton (1:1) suspendiert und 4 h bei RT gerührt. Das Aceton wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit DCM/Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wird mit 0.1N HCl und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus DCM/Ethylacetat/Petrolether umkristallisiert.



Ausbeute: 2.60 g (7.37 mmol, 99 %, Lit.^[144]: 99 %), farblose Nadeln.

Molmasse: 353.41 g/mol

Summenformel: C₂₁H₂₃NO₄

DC: R_f = 0.37 (Ethylacetat)

Schmp.: 117-119 °C (Lit.^[144]: 117-120 °C)

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 1.23 (m, 2H, CH₂), 1.38 (m, 2H, CH₂), 1.48 (m, 2H, CH₂), 2.18 (m, 2H, CONHCH₂), 2.95 (m, 2H, CH₂COOH), 4.20 (t, 1H, ³J = 6.8 Hz, CH_{Fmoc}), 4.29 (d, 2H, ³J = 6.8 Hz, CH_{2 Fmoc}), 7.27 (m, 1H, CONHCH₂), 7.32 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.40 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.67 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.87 (m, 2H, CH_{aryl}), 12.01 (br. s, 1H, OH).

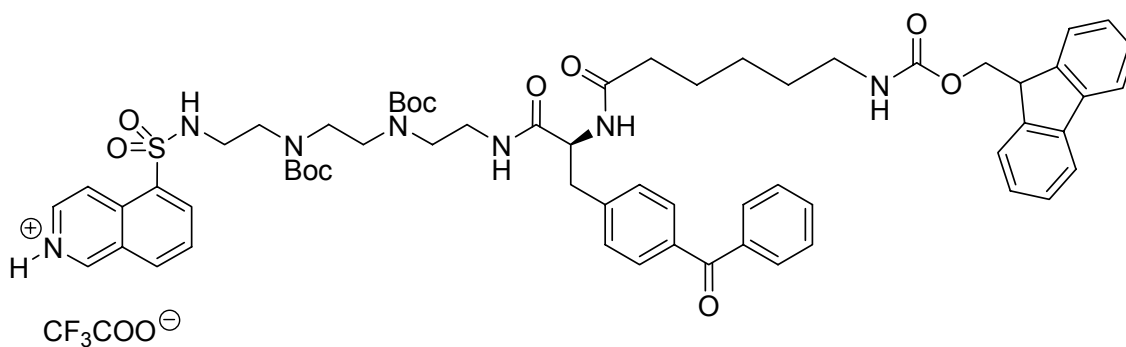
^{13}C -NMR (125.7 MHz, DMSO- D_6): δ [ppm] = 24.2 (s, CH_2), 25.8 (s, CH_2), 29.1 (s, CH_2), 33.6 (CH_2COOH), 40.1 (s, CONHCH_2), 46.8 (t, CH_{Fmoc}), 65.1 (s, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 120.1 (t, 2 CH_{aryl}), 125.2 (t, 2 CH_{aryl}), 127.1 (t, 2 CH_{aryl}), 127.6 (t, 2 CH_{aryl}), 140.8 (q, 2 C_{aryl}), 144.0 (q, 2 C_{aryl}), 156.1 (q, OCONH), 174.5 (q, COOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3340 vs, 3066 w, 3025 w, 2951 m, 2874 m, 2860 m, 1709 vs, 1690 vs, 1652 s, 1532 vs, 1474 m, 1460 m, 1450 m, 1418 m, 1330 m, 1292 m, 1271 vs, 1254 vs, 1238 s, 1196 m, 1131 s, 1101 m, 1011 m, 996 m, 937 m, 759 s, 737 vs, 668 m.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 354.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$: 354.2), 376.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{Na}^+$: 376.2), 392.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{K}^+$: 392.1).

6.4.3.2 (S)-*N*-[*N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-6-aminohexanoyl]- (4-benzoylphenyl)alanin-[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin- 5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 11

21 mg (60 μmol) Fmoc-6-aminohexansäure **10** und 14 mg (90 μmol) HOBt \cdot H_2O werden unter Eiskühlung zu einer Lösung von 12 mg (60 μmol) EDC \cdot HCl und 9.9 μl (90 μmol) NMM in 1 ml DCM gegeben. Das Gemisch wird 15 min bei 0 $^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend zu einer eisgekühlten Lösung von 38 mg (48 μmol) (S)-(4-Benzoylphenyl)alanin-[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]-amid **6** in 2 ml DCM getropft. Nach 16 h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand wird mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 32 mg (26 μmol , 54 %), farbloser Feststoff.

Molmasse: 1238.37 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{64}\text{H}_{74}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CD_2Cl_2 , TMS): δ [ppm] = 1.15-1.25 (m, 2H, CH_2), 1.39 (br. s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.43-1.58 (m, 6H, CH_2), 2.16-2.20 (m, 2H, CH_2), 2.99-3.13 (m, 4H, CH_2), 3.17-3.42 (m, 10H, CH_2), 4.16-4.20 (m, 1H, CH_{Fmoc}), 4.31-4.35 (m, 2H, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 4.79 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 6.65 (br. s, 4 NH), 7.25-7.35 (m, 4H, CH_{aryl}), 7.38 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.47 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.54-7.63 (m, 3H, CH_{aryl}), 7.68 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.71-7.80 (m, 4H, CH_{aryl}), 7.94 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, meta zu C5}}$), 8.12 (br. s, 1H, NH^+), 8.47 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin}}$), 8.67 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.04 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.71 (s, 1H, $\text{CCHNH}_{\text{Isochinolin}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 25.5 (s, CH_2), 26.3 (s, 2 CH_2), 28.5 (p, 2 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.8 (s, 2 CH_2), 36.4 (s, CH_2), 36.5 (s, CH_2), 38.9 (s, CH_2), 39.5 (s, CH_2), 41.0 (s, 2 CH_2), 46.9 (s, CH_2), 47.7 (t, CH_{Fmoc}), 54.6 (t, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 66.9 (s, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 81.2 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81.3 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120.3 (t, 2 CH_{aryl}), 125.4 (t, CH_{aryl}), 125.5 (t, CH_{aryl}), 127.4 (t, 2 CH_{aryl}), 128.0 (t, 2 CH_{aryl}), 128.7 (t, 2 CH_{aryl}), 129.6 (q, C_{aryl}), 129.7 (t, CH_{aryl}), 129.8 (t, CH_{aryl}), 130.3 (t, 2 CH_{aryl}), 130.5 (t, CH_{aryl}), 130.6 (t, CH_{aryl}), 130.7 (t, CH_{aryl}), 132.8 (t, CH_{aryl}), 132.9 (t, CH_{aryl}), 134.2 (q, C_{aryl}), 135.1 (t, CH_{aryl}), 135.3 (t, CH_{aryl}), 136.6 (t, CH_{aryl}), 137.3 (q, C_{aryl}), 137.9 (q, C_{aryl}), 141.7 (q, 2 C_{aryl}), 142.1 (q, C_{aryl}), 144.4 (q, C_{aryl}), 144.5 (q, 2 C_{aryl}), 152.6 (t, CH_{aryl}), 156.6 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Boc}}$), 156.7 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Boc}}$), 156.9 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Fmoc}}$), 171.8 (q, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$), 174.2 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 196.6 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$).

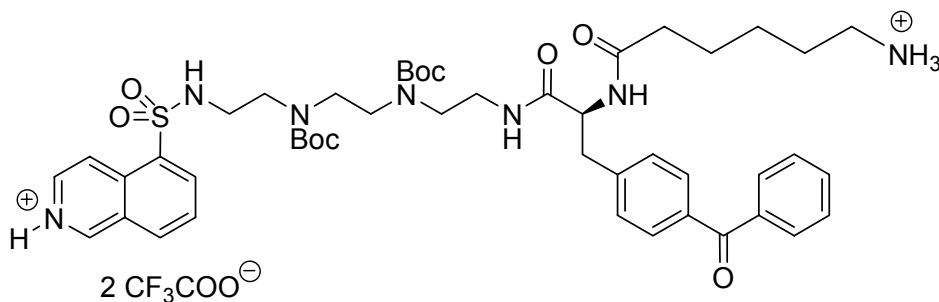
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 1124.5$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{62}H_{74}N_7O_{11}S^+$: 1124.5), 1146.5 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{62}H_{73}N_7O_{11}SNa^+$: 1146.5), 1162.5 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{62}H_{73}N_7O_{11}SK^+$: 1162.5).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 33.6$ min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (55:45) nach 5 min → A:B (0:100) nach 30 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_R = 19.8$ min.

6.4.3.3 (S)-N-[6-Aminohexanoyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[3,6-di-(*tert*-butyloxy-carbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 15

Eine Lösung aus 32 mg (26 μ mol) **11** in 1.5 ml DCM wird mit 0.25 ml 4-(Aminomethyl)-piperidin (4-AMP) versetzt. Nach einstündigem Rühren bei RT werden Lösungsmittel und überschüssiges 4-AMP abdestilliert. Der ölige Rückstand wird mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 27 mg (24 μ mol, 92 %), farbloser Feststoff.

Molmasse: 1130.16 g/mol

Summenformel: $C_{51}H_{65}F_6N_7O_{13}S$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1.19-1.27 (m, 2H, CH_2), 1.41 (br. s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.46-1.62 (m, 6H, CH_2), 1.97-2.01 (m, 2H, CH_2), 2.18-2.23 (m, 2H, CH_2),

2.83-2.87 (m, 2H, CH₂), 2.88-2.93 (m, 2H, CH₂), 2.93-3.08 (m, 4H, CH₂), 3.28-3.32 (m, 2H, CH₂), 3.44 (m, 2H, CH₂), 4.67 (m, 1H, CH_{Benzoylphenylalanin}), 7.41 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.51 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.63 (m, 1H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.69 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.73 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.93 (m, 1H, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.51 (m, 1H, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.57 (m, 1H, CH_{Isochinolin}), 8.66-8.87 (m, 2H, CH_{Isochinolin}), 9.66 (s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 26.1 (s, CH₂), 26.8 (s, CH₂), 27.2 (s, 2 CH₂), 28.2 (s, CH₂), 28.8 (p, 2 C(CH₃)₃), 33.5 (s, CH₂), 36.3 (s, CH₂), 39.1 (s, CH₂), 40.5 (s, CH₂), 44.4 (s, 2 CH₂), 44.9 (s, CH₂), 55.7 (t, CH_{Benzoylphenylalanin}), 81.4 (q, C(CH₃)₃), 81.5 (q, C(CH₃)₃), 129.1 (q, C_{aryl}), 129.5 (t, 2 CH_{aryl}), 130.5 (t, 2 CH_{aryl}), 130.9 (t, 2 CH_{aryl}), 131.2 (t, 2 CH_{aryl}), 133.7 (t, CH_{aryl}), 133.9 (t, CH_{aryl}), 135.5 (q, C_{aryl}), 135.6 (q, C_{aryl}), 136.0 (t, CH_{aryl}), 136.2 (t, CH_{aryl}), 137.1 (q, C_{aryl}), 137.3 (t, CH_{aryl}), 138.8 (t, CH_{aryl}), 144.1 (q, C_{aryl}), 144.2 (q, C_{aryl}), 152.6 (t, CH_{aryl}), 157.0 (q, C=O_{Boc}), 157.1 (q, C=O_{Boc}), 173.5 (q, NHCOCH₂CH₂), 175.5 (q, C=O_{Benzoylphenylalanin}), 198.3 (q, C=O_{Benzoylphenylalanin}).

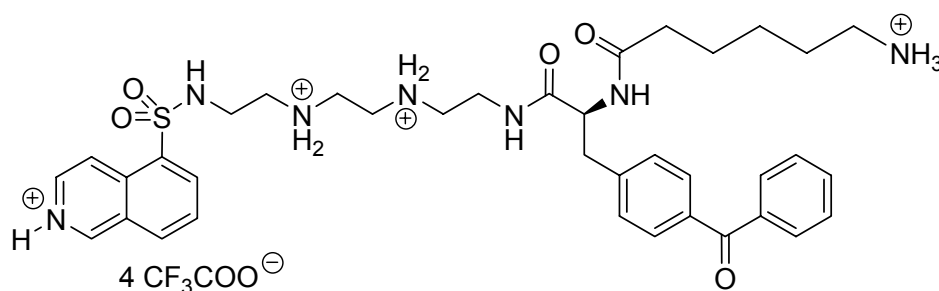
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 902.5 ([M+H]⁺, berechnet für C₄₇H₆₅N₇O₉S⁺: 902.5), 924.5 ([M+Na]⁺, berechnet für C₄₇H₆₄N₇O₉SNa⁺: 924.4), 940.5 ([M+K]⁺, berechnet für C₄₇H₆₄N₇O₉SK⁺: 940.4).

Analytische RP-HPLC: t_R = 23.5 min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (20:80) nach 40 min, Flussrate 10 ml/min, λ = 220 nm): t_R = 20.7 min.

6.4.3.4 (S)-N-[6-Aminohexanoyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 12

Eine Lösung aus 5 mg **15** (4.4 μmol) in 1 ml TFA:DCM (3:7 v/v) wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert, um die Trifluoressigsäure vollständig zu entfernen.



Ausbeute: 5 mg (4.3 μ mol, 98 %), farbloser Feststoff.

Molmasse: 1157.97 g/mol

Summenformel: C₄₅H₅₁F₁₂N₇O₁₃S

¹H-NMR (500.13 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1.18-1.27 (m, 2H, CH₂), 1.47-1.61 (m, 4H, CH₂), 2.21-2.26 (m, 2H, CH₂), 2.82-2.87 (m, 2H, CH₂), 3.16-3.21 (m, 4H, CH₂), 3.22-3.25 (m, 2H, CH₂), 3.44-3.50 (m, 6H, CH₂), 3.57-3.65 (m, 2H, CH₂), 4.64 (m, 1H, CH_{Benzoylphenylalanin}), 7.43 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.52 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.65 (m, 1H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.70 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.75 (m, 2H, CH_{Benzoylphenyl}), 7.86 (m, 1H, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.47 (m, 1H, CH_{Isochinolin}), 8.52 (m, 1H, CH_{Isochinolin}), 8.59 (m, 1H, CH_{Isochinolin}), 8.65 (m, 1H, CH_{Isochinolin}), 9.47 (s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}).

HRMS (ESI-FT-ICR): m/z = 351.67506 ([M+2H]²⁺, berechnet für C₃₇H₄₉N₇O₅S²⁺: 351.67525; Abweichung 0.19 mmu/0.54 ppm), 702.34277 ([M+H]⁺, berechnet für C₃₇H₄₈N₇O₅S⁺: 702.34321; Abweichung 0.44 mmu/0.63 ppm).

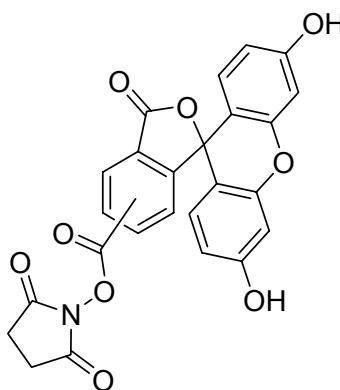
Analytische RP-HPLC: t_R = 16.0 min (VydacTM)/18.1 min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (20:80) nach 40 min, Flussrate 10 ml/min, λ = 220 nm): t_R = 14.1 min.

6.4.4 Synthese der Kontrollderivate

6.4.4.1 5(6)-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester **14**

Eine Lösung aus 0.30 g (0.78 mmol) 5(6)-Carboxyfluorescein **13** und 0.18 g (0.88 mmol) DCC in 6 ml THF wird mit 0.10 g (0.88 mmol) NHS versetzt. Die entstandene Suspension wird bei RT über Nacht gerührt und dann filtriert. Der nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene orangefarbene Rückstand wird mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EE:PE = 4:1) aufgereinigt.



Ausbeute: 231 mg (0.49 mmol, 62 %), orangefarbener Feststoff (Isomerengemisch).

Molmasse: 473.39 g/mol

Summenformel: C₂₅H₁₅NO₉

DC: R_f = 0.35 (EE:PE = 4:1)

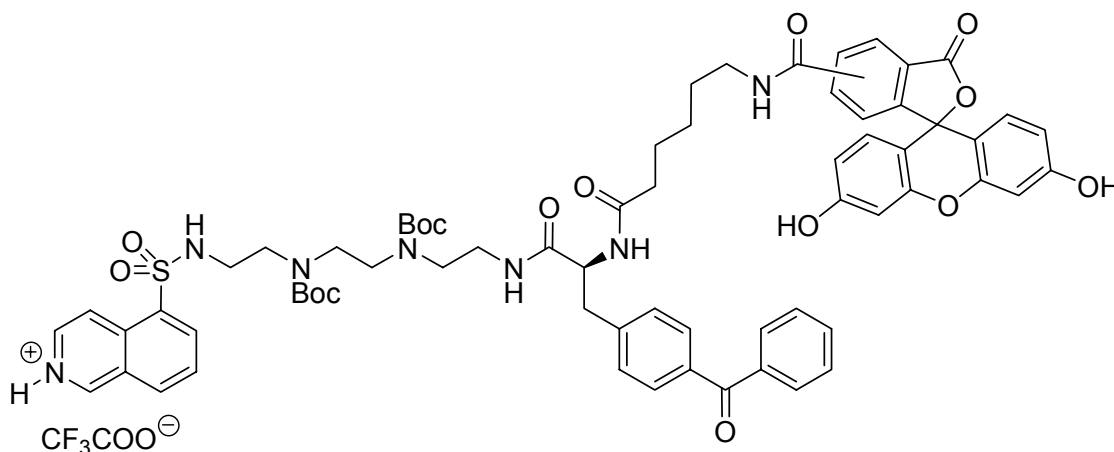
Isomerenverhältnis 5-Carboxyfluorescein : 6-Carboxyfluorescein ~ 1:1

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 2.79-2.98 (m, 4H, CH₂), 6.52-6.59 (m, 2H, CH_{aryl}), 6.64-6.73 (m, 4H, CH_{aryl}), 7.56 (m, 0.5H, CH_{aryl}, 5-Isomer), 7.92 (s, 0.5H, CH_{aryl}, 6-Isomer), 8.25 (m, 0.5H, CH_{aryl}, 6-Isomer), 8.39 (m, 0.5H, CH_{aryl}, 6-Isomer), 8.43 (m, 0.5H, CH_{aryl}, 5-Isomer), 8.54 (s, 0.5H, CH_{aryl}, 5-Isomer), 10.18 (s, 2H, OH).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 474.2$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{25}H_{16}NO_9^+$: 474.1), 496.1 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{25}H_{15}NO_9Na^+$: 496.1), 512.1 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{25}H_{15}NO_9K^+$: 512.0).

6.4.4.2 (S)-N-[N'-(Fluorescein-5(6)-carbonyl)-6-aminohexanoyl]-(4-benzoyl-phenyl)alanin-[3,6-di-(tert-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 57

Eine Lösung aus 20 mg (42.2 μ mol) NHS-Carboxyfluorescein **14** und 14.5 μ l (84.4 μ mol) DIPEA in 3 ml THF wird mit 13.5 mg (11.9 μ mol) **15** (2 TFA) versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 8 mg (5.8 μ mol, 49 %), gelborangefarbener Feststoff (Isomerengemisch).

Molmasse: 1374.43 g/mol

Summenformel: $C_{70}H_{74}F_3N_7O_{17}S$

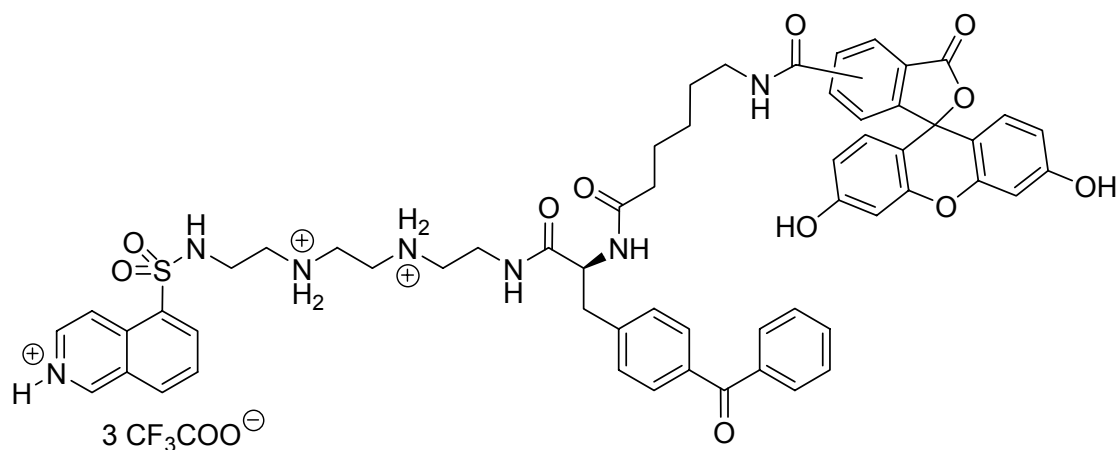
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 1260.9$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{68}H_{74}N_7O_{15}S^+$: 1260.5), 1283.0 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{68}H_{73}N_7O_{15}SNa^+$: 1282.5), 1299.0 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{68}H_{73}N_7O_{15}SK^+$: 1298.5).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 26.8$ min (Vydac™).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (80:20) nach 3 min → A:B (30:70) nach 45 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_R = 26.8$ min.

6.4.4.3 (S)-N-[N'-(Fluorescein-5(6)-carbonyl)-6-aminohexanoyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 16

8 mg **57** (5.8 μ mol) werden in 1 ml TFA:DCM (3:7 v/v) gelöst. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert, um die Trifluoressigsäure vollständig zu entfernen.



Ausbeute: 8 mg (5.8 μ mol, quantitativ), gelboranger Feststoff (Isomerengemisch).

Molmasse: 1402.25 g/mol

Summenformel: C₆₄H₆₀F₉N₇O₁₇S

¹H-NMR (500.13 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1.09-1.44 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 2.12-2.16 (m, 2H, NHCOCH₂CH₂), 2.95-3.39 (m, 10H, CH₂), 3.46-3.73 (m, 6H, CH₂), 4.70 (m, 1H, CH_{Benzoylphenylalanin}), 6.16-6.47 (m, 6H, CH_{aryl}), 6.55 (m, 1H, CH_{aryl}), 6.90 (m, 2H, CH_{aryl}), 6.98-7.26 (m, 7H, CH_{aryl}), 7.64 (m, 1H, CH_{aryl}), 7.76 (m, 1H, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.11 (m, 1H,

CH_{aryl}), 8.36 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.42-8.59 (m, 2H, $\text{NHCHCH}_{\text{Isochinolin}}$, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.66 (m, 1H, $\text{NHCHCH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.48 (s, 1H, $\text{CCHNH}_{\text{Isochinolin}}$).

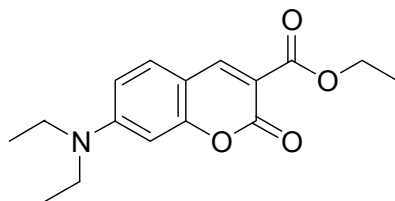
MS (ESI): $m/z = 530.9$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, berechnet für $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}^{2+}$: 530.7), 1060.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{58}\text{H}_{58}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}^+$: 1060.4), 1058.5 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, berechnet für $\text{C}_{58}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}^-$: 1058.4).

HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 530.69919$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, berechnet für $\text{C}_{58}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}^{2+}$: 530.69911; Abweichung 0.08 mmu/0.15 ppm), 1060.39006 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{58}\text{H}_{58}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}^+$: 1060.39095; Abweichung 0.89 mmu/0.84 ppm).

Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 20.5$ min (VydacTM).

6.4.4.4 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäureethylester **18**

Zu 2.90 g (15 mmol) 4-Diethylamino-2-hydroxybenzaldehyd **17** in 110 ml Ethanol (95 % v/v) werden 0.375 ml Piperidin und 7.5 μl Essigsäure gegeben. Sobald eine klare Lösung vorliegt, werden 2.96 ml (3.12 g, 19.5 mmol) Malonsäurediethylester hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wird 24 h refluxiert. Das nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene rot-orangefarbene, ölige Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (SiO_2 , PE:EE = 2.5:1) gereinigt.



Ausbeute: 3.42 g (11.8 mmol, 79 %), orangefarbener Feststoff (Lit.^[145]: 80 %, Öl).

Molmasse: 289.33 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

DC: $R_f = 0.38$ (PE:EE = 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, $\text{DMSO-}D_6$): δ [ppm] = 1.12 (t, 6H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.27 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 3.46 (q, 4H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.21 (q, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 6.52 (d, 1H, $^4J = 2.5$ Hz, CCHCN), 6.75 (dd, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, CNCHCH), 7.61 (d, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, CNCHCH), 8.53 (s, 1H, CCH=CCO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, $\text{DMSO-}D_6$): δ [ppm] = 12.2 (p, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 14.1 (p, OCH_2CH_3), 44.3 (s, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 60.2 (s, OCH_2CH_3), 95.8 (t, CCHCN), 106.9 (q, CCOOEt), 107.4 (q, CCH=CCO), 109.7 (t, CNCHCH), 131.6 (t, CNCHCH), 149.0 (t, CCH=CCO), 152.7 (q, CNEt_2), 156.9 und 158.0 (q, C(O)OC), 163.3 (q, COEt).

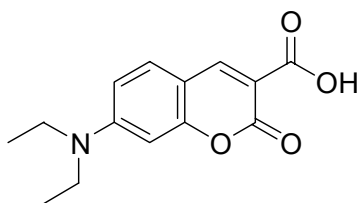
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3435 w, 2976 m, 2922 w, 2872 w, 1734 vs, 1697 s, 1622 vs, 1589 vs, 1514 vs, 1477 m, 1448 m, 1423 s, 1379 m, 1354 s, 1311 s, 1226 vs, 1200 s, 1186 vs, 1142 s, 1120 s, 1101 s, 1072 m, 1028 s, 820 s, 793 s, 685 w, 638 w.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 290.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$: 290.1), 312.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Na}^+$: 312.1), 328.0 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{K}^+$: 328.1).

6.4.4.5 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure 19

Eine Suspension von 2.33 g (8.05 mmol) 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäureethylester **18** in 40 ml 20 %iger Natronlauge wird 1.5 h refluxiert. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wird filtriert und bei 0 °C mit Salzsäure bis zum Auftreten eines gelben Niederschlags angesäuert (pH 1-2).^q Der Niederschlag wird filtriert und mit Diethylether gewaschen.

^q Bei zu niedrigem pH-Wert löst sich der Feststoff wieder.



Ausbeute: 1.91 g (7.31 mmol, 91 %), gelber Feststoff (Lit.^[145]: 90 %).

Molmasse: 261.27 g/mol

Summenformel: C₁₄H₁₅NO₄

DC: R_f = 0.23 (DCM:MeOH = 20:0.1)

Schmelzpunkt: ab ca. 200 °C dunkle Verfärbung, bei 218 °C komplett zersetzt

(Lit.^[145]: Schmelzpunkt 215-217 °C).

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 1.12 (t, 6H, ³J = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 3.47 (q, 4H, ³J = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 6.56 (d, 1H, ⁴J = 2.5 Hz, CCHCN), 6.79 (dd, 1H, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, CNCHCH), 7.63 (d, 1H, ³J = 9.1 Hz, CNCHCH), 8.58 (s, 1H, CCH=CCO), 12.51 (s, 1H, COOH).

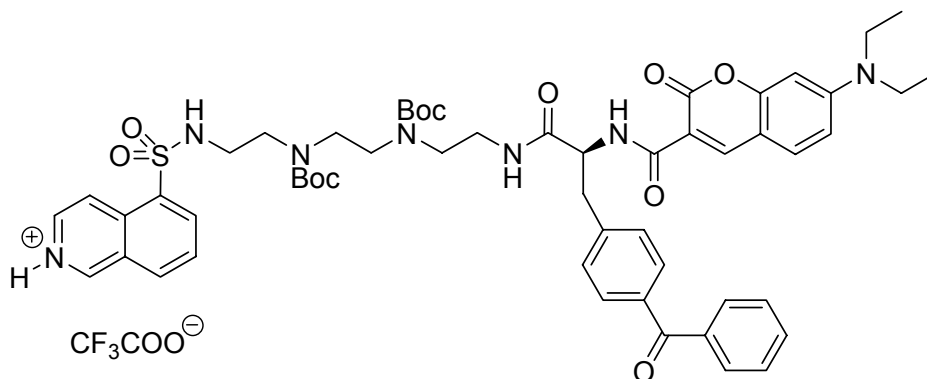
¹³C-NMR (125.7 MHz, DMSO-*D*₆): δ [ppm] = 12.2 (p, N(CH₂CH₃)₂), 44.3 (s, N(CH₂CH₃)₂), 95.9 (t, CCHCN), 107.1 (q, CCOOH), 107.3 (q, CCH=CCO), 110.0 (t, CNCHCH), 131.8 (t, CNCHCH), 149.3 (t, CCH=CCO), 152.9 (q, CNEt₂), 157.8 (q, COOC), 159.6 (q, COOC), 164.9 (q, COOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3458 m, 2981 m, 2937 w, 2875 w, 1738 vs, 1666 s, 1622 vs, 1578 vs, 1514 vs, 1479 m, 1452 m, 1404 s, 1356 s, 1313 w, 1267 m, 1209 m, 1190 m, 1130 m, 1082 m, 1009 w, 960 w, 804 m, 732 w, 679 w, 640 w.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 262.2 ([M+H]⁺, berechnet für C₁₄H₁₆NO₄⁺: 262.1), 284.3 ([M+Na]⁺, berechnet für C₁₄H₁₅NO₄Na⁺: 284.1), 300.2 ([M+K]⁺, berechnet für C₁₄H₁₅NO₄K⁺: 300.1), 306.3 ([M-H+2Na]⁺, berechnet für C₁₄H₁₄NO₄Na₂⁺: 306.1).

6.4.4.6 (S)-N-[7-Diethylaminocumarin-3-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 58

Eine Lösung aus 7 mg (37 μ mol) EDC \cdot HCl, 6 mg (37 μ mol) HOBt \cdot H₂O, 9 mg (35 μ mol) **19** und 12 μ l (11 mg, 110 μ mol) NMM in 2 ml DCM wird 15 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe einer Lösung aus 26 mg (33 μ mol) **6** in 2 ml DCM wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird durch präparative RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 27 mg (23.6 μ mol, 71 %), gelber Feststoff.

Molmasse: 1146.23 g/mol

Summenformel: C₅₇H₆₆F₃N₇O₁₃S

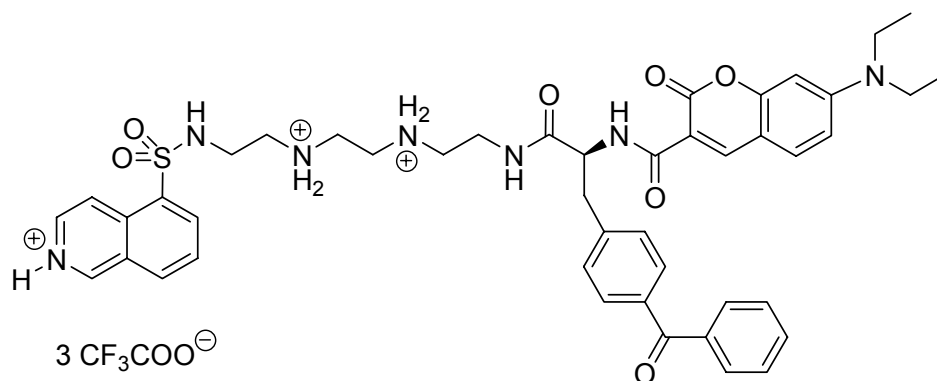
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 1032.2$ ([M+H]⁺, berechnet für C₅₅H₆₆N₇O₁₁S⁺: 1032.5), 1054.3 ([M+Na]⁺, berechnet für C₅₅H₆₅N₇O₁₁SNa⁺:1054.4), 1070.3 ([M+K]⁺, berechnet für C₅₅H₆₅N₇O₁₁SK⁺: 1070.4).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 31.8$ min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (85:15) \rightarrow A:B (0:100) nach 40 min, Flussrate 8 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_R = 31.3$ min.

6.4.4.7 (S)-N-[7-Diethylaminocumarin-3-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 20

27 mg (23.6 μmol) **58** werden in 3 ml TFA:DCM (3:6 v/v) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand zur vollständigen Entfernung der Trifluoressigsäure lyophilisiert.



Ausbeute: 27 mg (23.1 μmol , 97 %), voluminöser gelber Feststoff.

Molmasse: 1174.05 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{51}\text{H}_{52}\text{F}_9\text{N}_7\text{O}_{13}\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1.20 (t, 6H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.18-3.38 (m, 10H, CH_2), 3.50 (q, 4H, $^3J = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.53-3.69 (m, 4H, CH_2), 4.74 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 6.48 (d, 1H, $^4J = 2.5$ Hz, $\text{CCHCN}_{\text{Cumarin}}$), 6.74 (dd, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, $\text{CNCHCH}_{\text{Cumarin}}$), 7.45 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenyl}}$), 7.47 (d, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, $\text{CNCHCH}_{\text{Cumarin}}$), 7.48 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenyl}}$), 7.60 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenyl}}$), 7.67-7.74 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenyl}}$), 7.87 (dd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, meta zu CS}}$), 8.47 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.52 (s, 1H, $\text{CCH=CCO}_{\text{Cumarin}}$), 8.53 (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.62-8.78 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.61 (br. s, 1H, $\text{CCHNH}_{\text{Isochinolin}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 12.7 (p, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 36.8 (s, CH_2), 38.8 (s, CH_2), 39.8 (s, CH_2), 40.1 (s, CH_2), 40.6 (s, CH_2), 44.3 (s, CH_2), 44.8 (s, CH_2), 46.0 (s, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 56.9 (t, $\text{CH}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 97.2 (t, $\text{CCHCN}_{\text{Cumarin}}$), 109.2 (q, $\text{C}_{\text{Cumarin}}$), 109.4 (q,

C_{Cumarin} , 111.8 (t, CH_{aryl}), 128.4 (t, CH_{aryl}), 129.5 (t, 2 CH_{aryl}), 130.7 (t, 2 CH_{aryl}), 130.9 (t, CH_{aryl}), 131.0 (t, 2 CH_{aryl}), 131.4 (t, 2 CH_{aryl}), 132.8 (t, CH_{aryl}), 132.9 (t, CH_{aryl}), 133.8 (t, CH_{aryl}), 135.3 (q, C_{aryl}), 135.5 (t, CH_{aryl}), 135.7 (q, C_{aryl}), 135.9 (t, CH_{aryl}), 136.2 (t, CH_{aryl}), 137.6 (q, C_{aryl}), 138.8 (q, C_{aryl}), 142.9 (q, C_{aryl}), 143.2 (q, C_{aryl}), 149.6 (t, CH_{aryl}), 154.9 (q, C_{aryl}), 159.2 (q, C_{aryl}), 164.0 (q, C_{aryl}), 165.9 (q, C_{aryl}), 174.9 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$), 198.2 (q, $\text{C}=\text{O}_{\text{Benzoylphenylalanin}}$).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3434 s, 3078 m, 2978 m, 2930 m, 2854 w, 1682 vs, 1616 vs, 1579 s, 1511 vs, 1449 m, 1420 m, 1352 m, 1317 w, 1279 m, 1261 w, 1202 vs, 1188 vs, 1135 vs, 1076 m, 926 vw, 834 m, 797 m, 759 vw, 721 m, 703 w, 644 vw.

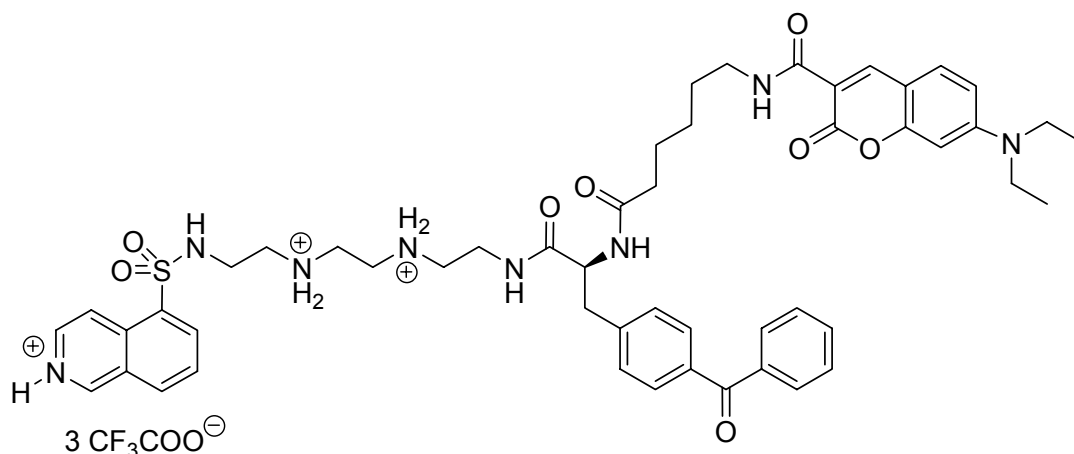
MS (ESI): m/z = 416.8 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}^{2+}$: 416.7), 832.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}^+$: 832.3), 830.5 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}^-$: 830.3), 868.4 ($[\text{M}-2\text{H}+\text{K}]^-$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_7\text{SK}^-$: 868.3).

HRMS (ESI-FT-ICR): m/z = 832.34863 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}^+$: 832.34869; Abweichung 0.06 mmu/0.07 ppm), 854.33084 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_7\text{SNa}^+$: 854.33064; Abweichung 0.20 mmu/0.23 ppm).

Analytische RP-HPLC: t_{R} = 23.4 min (VydacTM).

6.4.4.8 (S)-N-[N'-(7-Diethylaminocumarin-3-carbonyl)-6-aminohexanoyl]- (4-benzoylphenyl)alanin-[3,6-di-(tert-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin- 5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 59

Eine Lösung aus 2.5 mg (13 μmol) EDC \cdot HCl, 2 mg (13 μmol) HOBt \cdot H₂O, 3 mg (11.5 μmol) **19** und 5.5 μl (5 mg, 50 μmol) NMM in 1 ml DCM wird 15 min bei 0 °C gerührt und dann mit 12 mg (10.5 μmol) **15** versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch präparative RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 4 mg (3.1 μ mol, 65 %), voluminöser gelber Feststoff.

Molmasse: 1287.21 g/mol

Summenformel: C₅₇H₆₃F₉N₈O₁₄S

HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 945.43230$ ([M+H]⁺, berechnet für C₅₁H₆₁N₈O₈S⁺: 945.43276; Abweichung 0.46 mmu/0.49 ppm).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 23.8$ min (VydacTM).

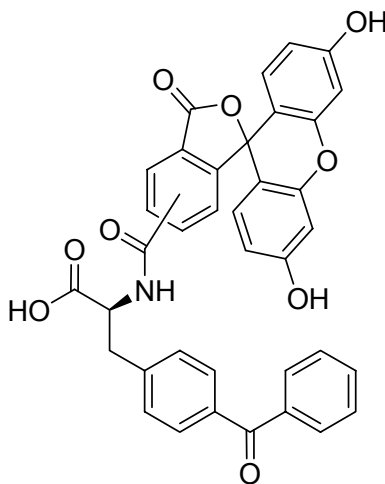
Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (25:75) nach 40 min, Flussrate 8 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_R = 26.5$ min.

6.4.4.10 (S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin

Trifluoracetat 23

Ein Gemisch aus 80 mg (0.16 mmol) Fmoc-Bpa-OH **22**, Scavengerharz *N*-(2-Mercaptoethyl)-aminomethylpolystyrol (3 Äquiv.) und 47.8 μ l (0.32 mmol) DBU in 5 ml THF wird 1.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz abfiltriert und mit THF gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer auf 5-10 ml eingengt und tropfenweise mit einer Lösung aus 70 mg (0.15 mmol) NHS-aktiviertem 5(6)-Carboxyfluorescein **14** und 23.9 μ l (0.16 mmol) DBU versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Die Aufarbeitung des öligen roten Rückstands mittels präparativer RP-HPLC ergibt ein Gemisch beider Isomere von **23**.



Ausbeute: 42 mg (0.07 mmol, 42 %), gelborangefarbener Feststoff.

Molmasse: 627.60 g/mol

Summenformel: C₃₇H₂₅NO₉

¹H-NMR (500.13 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 3.40-3.44 (m, 2H, CH₂ *Benzoylphenylalanin*), 4.92 (m, 1H, CH *Benzoylphenylalanin*), 6.66 (m, 2H, CH *Fluorescein*), 6.74-6.86 (m, 4H, CH *Fluorescein*), 7.36 (m, 1H, CH_{aryl}), 7.44-7.54 (m, 4H, CH_{aryl}), 7.57-7.68 (m, 4H, CH_{aryl}), 7.72 (m, 2H, CH_{aryl}), 8.13 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.41 (br. s, OH).

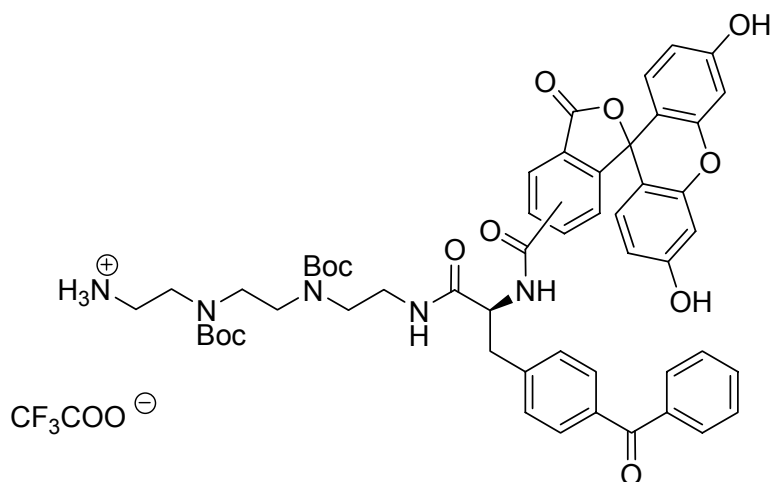
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 628.5 ([M+H]⁺, berechnet für C₃₇H₂₆NO₉⁺: 628.2), 650.4 ([M+Na]⁺, berechnet für C₃₇H₂₅NO₉Na⁺: 650.1), 666.5 ([M+K]⁺, berechnet für C₃₇H₂₅NO₉K⁺: 666.1).

Analytische RP-HPLC: t_R = 23.7 min und 24.5 min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (0:100) nach 50 min, Flussrate 10 ml/min, λ = 254 nm): t_R = 39.6 min.

**6.4.4.11 (S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-
[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-amino-3,6-diazaoct-1-yl]amid
Trifluoracetat 60**

12 mg (19 μmol) **23** gelöst in 2 ml DCM werden zu einer eisgekühlten Lösung aus 4 mg (20 μmol) EDC \cdot HCl, 2.2 μl (20 μmol) NMM und 3 mg (20 μmol) HOBT \cdot H₂O in 1 ml DCM gegeben. Das Gemisch wird 15 min bei 0 °C gerührt und dann zu einer eiskalten Lösung aus 33 mg (95 μmol) 1,8-Diamino-3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-3,6-diazaoctan **4** in 1 ml DCM getropft. Nach 16 h Rühren bei RT wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Aufreinigung des öligen Rückstands mittels präparativer RP-HPLC wird das Produkt als Isomergemisch erhalten.



Ausbeute: 4 mg (3.7 μmol , 20 %), orangefarbener Feststoff.

Molmasse: 1070.07 g/mol

Summenformel: C₅₅H₅₈F₃N₅O₁₄

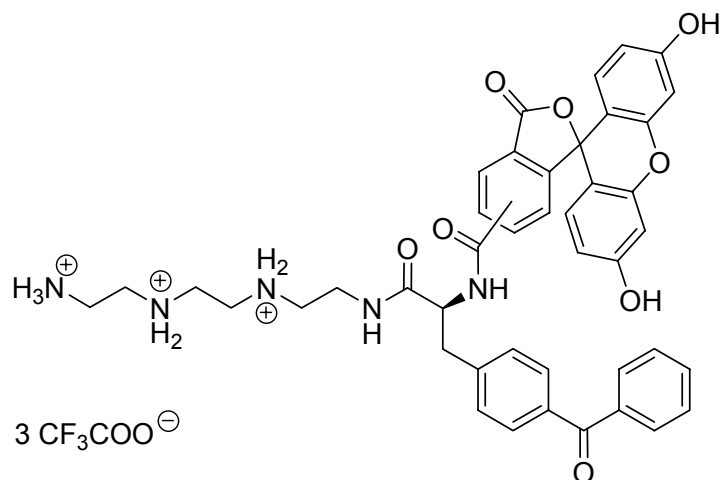
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 956.6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für C₅₃H₅₈N₅O₁₂⁺: 956.4), 978.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für C₅₃H₅₇N₅O₁₂Na⁺: 978.4), 994.6 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für C₅₃H₅₇N₅O₁₂K⁺: 994.4).

Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 23.8$ min und 24.2 min (Vydac™).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (30:70) nach 40 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_{\text{R}} = 27.7$ min.

6.4.4.12 (S)-N-[Fluorescein-5(6)-carbonyl]-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-amino-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 24

Eine Lösung aus 4 mg **60** (3.7 μmol) in 1 ml TFA:DCM (3:7 v/v) wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.



Ausbeute: 4 mg (3.6 μmol , 97 %), hygroskopischer oranger Feststoff (Isomerengemisch).

Molmasse: 1097.88 g/mol

Summenformel: C₄₉H₄₄F₉N₅O₁₄

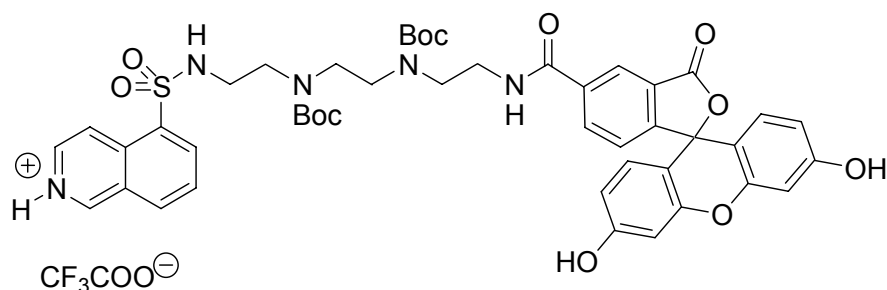
¹H-NMR (500.13 MHz, CD₃OD/D₂O): δ [ppm] = 2.95-3.02 (m, 2H, CH₂), 3.10-3.21 (m, 6H, CH₂), 3.23-3.28 (m, 4H, CH₂), 3.42-3.49 (m, 2H, CH₂), 4.82 (m, 1H, CH_{Benzoylphenylalanin}), 6.22 (m, 2H, CH_{aryl}), 6.35 (m, 2H, CH_{aryl}), 6.45 (m, 2H, CH_{aryl}), 6.98 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.03 (m, 1H, CH_{aryl}), 7.10 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.18 (m, 3H, CH_{aryl}), 7.23 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.48 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.01 (m, 1H, CH_{aryl}).

MS (ESI-FT-ICR): $m/z = 756.30434$ ([M+H]⁺, berechnet für C₄₃H₄₂N₅O₈⁺: 756.30279; Abweichung 1.55 mmu/2.05 ppm).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 20.0$ min (VydacTM).

6.4.4.13 *N*-(Fluorescein-5-carbonyl)-[3,6-di-(*tert*-butyloxycarbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat **61**

26 mg (0.055 mmol) 5-Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester **14** werden in 1.5 ml THF gelöst und zu einer Lösung aus 27 mg (0.035 mmol) **4** · 2 TFA in 3 ml THF gegeben. Das Gemisch wird mit 43.5 µl (33 mg, 0.25 mmol) DIPEA versetzt und 2.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im VAKuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 25 mg (0.025 mmol, 71 %), orangefarbener Feststoff.

Molmasse: 1010.00 g/mol

Summenformel: C₄₈H₅₀F₃N₅O₁₄S

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1.38 (br. s, 18H, 2 C(CH₃)₃), 3.04-3.11 (m, 2H, CH₂), 3.22-3.41 (m, 6H, CH₂), 3.42-3.50 (m, 2H, CH₂), 3.54-3.62 (m, 2H, CH₂), 6.61-6.68 (m, 2H, CH_{Fluorescein}), 6.71-6.77 (m, 2H, CH_{Fluorescein}), 6.80-6.85 (m, 2H, CH_{Fluorescein}), 7.35 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.03 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.18-8.28 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.47-8.55 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.62 (m, 1H, CH_{aryl}), 8.65-8.77 (m, 2H, CH_{aryl}), 8.91-9.00 (m, 1H, CH_{aryl}), 9.77 (br. s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 28.7 (p, 2 C(CH₃)₃), 39.5 (s, CH₂), 39.7 (s, CH₂), 42.0 (s, CH₂), 42.5 (s, CH₂), 46.3 (s, CH₂), 47.2 (s, CH₂), 81.3 (q, C(CH₃)₃), 81.4 (q, C(CH₃)₃), 81.6 (q, C_{Fluorescein}), 103.6 (t, 2 CH_{aryl}), 111.9 (q, 2 C_{Fluorescein}), 114.9 (t, 2 CH_{aryl}), 117.2 (q), 122.2 (t, CH_{aryl}), 126.0 (t, CH_{aryl}), 126.6 (t, CH_{aryl}), 129.2 (q), 129.9 (t, CH_{aryl}), 130.4 (t, CH_{aryl}), 130.7 (t, 2 CH_{aryl}), 134.7 (q), 135.1 (t, CH_{aryl}), 136.0 (t, CH_{aryl}), 137.1 (q), 137.5 (t,

CH_{aryl}), 151.4 (t, CH_{aryl}), 155.1 (q, 2 C_{Fluorescein}), 157.1 (q), 157.5 (q), 161.2 (q), 161.4 (q), 163.1 (q, 2 C_{Fluorescein}), 168.3 (q, NHC(O)Ph), 169.9 (q, CC(O)OC).

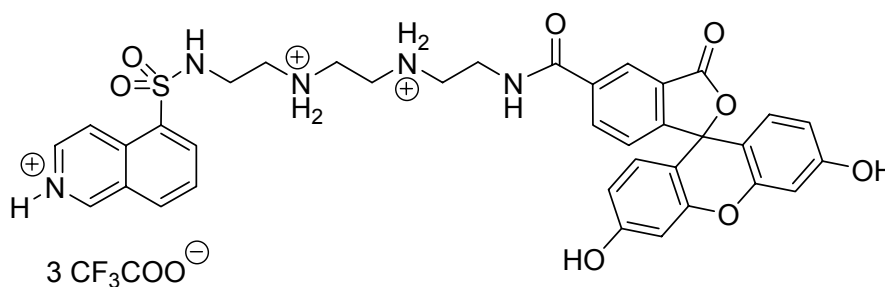
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 896.1$ ($[M+H]^+$, berechnet für C₄₆H₅₀N₅O₁₂S⁺: 896.3), 918.1 ($[M+Na]^+$, berechnet für C₄₆H₄₉N₅O₁₂SNa⁺: 918.3), 934.1 ($[M+K]^+$, berechnet für C₄₆H₄₉N₅O₁₂SK⁺: 934.3).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 24.6$ min (VydacTM).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (30:70) nach 40 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_R = 25.7$ min.

6.4.4.14 *N*-(Fluorescein-5-carbonyl)-8-(isochinolin-5-sulfonylamino)-3,6-diazaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 25

22 mg (0.022 mmol) **61** werden in 3 ml TFA:DCM (3:6 v/v) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird zur vollständigen Entfernung der TFA lyophilisiert.



Ausbeute: 22 mg (0.022 mmol, 99 %), orangefarbener Feststoff.

Molmasse: 1037.81 g/mol

Summenformel: C₄₂H₃₆F₉N₅O₁₄S

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 3.05-3.14 (m, 4H, CH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂), 3.39-3.48 (m, 4H, CH₂), 3.69 (m, 2H, CH₂), 6.41 (d, 2H, ⁴J = 2.4 Hz, 2 OCCHCOH_{Fluorescein}), 6.55 (dd, 2H, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 2 CCHCHCOH_{Fluorescein}), 6.83 (d, 2H, ³J = 9.1 Hz,

2 CCHCHCOH_{Fluorescein}), 7.18 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, NHCOCCHCHC_{Fluorescein}), 7.79 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.06 (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, NHCOCCHCHC_{Fluorescein}), 8.36 (d, 1H, $^4J = 1.8$ Hz, NHCOCCHC_{Fluorescein}), 8.37 (d, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.40 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.51 (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.69 (d, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 9.53 (s, 1H, CCHNH_{Isochinolin}).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3434 s, 3101 m, 2978 w, 2925 w, 2854 w, 1748 w, 1677 vs, 1637 s, 1560 w, 1543 m, 1508 vw, 1457 m, 1388 vw, 1320 w, 1282 w, 1250 m, 1202 vs, 1185 vs, 1135 vs, 993 vw, 923 vw, 838 m, 798 m, 759 w, 722 m, 691 vw, 676 vw.

MS (ESI): $m/z = 348.7$ ([M+2H]²⁺, berechnet für C₃₆H₃₄N₅O₈S²⁺: 348.6), 696.4 ([M+H]⁺, berechnet für C₃₆H₃₄N₅O₈S⁺: 696.2).

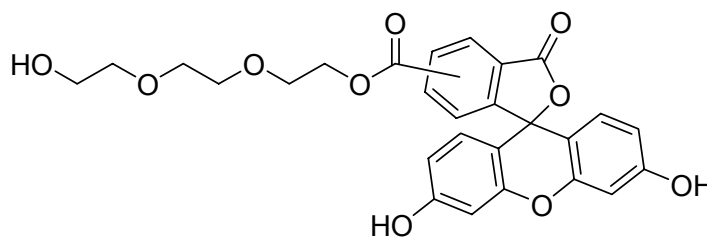
HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 696.21209$ ([M+H]⁺, berechnet für C₃₆H₃₄N₅O₈S⁺: 696.21226; Abweichung 0.17 mmu/0.24 ppm).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 12.3$ min (VydacTM) / 15.6 min (Jupiter).

6.4.5 Versuche zur Synthese einer nucleophil spaltbaren Sonde

6.4.5.1 5(6)-Carboxyfluorescein-(8-hydroxy-3,6-dioxaoctanyl)ester **28**

Es werden 0.50 g (1.33 mmol) 5(6)-Carboxyfluorescein **13** in 15 ml THF suspendiert und mit einer Kältemischung (Streusalz/Eis, $\sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$) gekühlt. Die Suspension wird mit 0.27 g (1.33 mmol) DCC und 10 min später mit 1.33 ml (10 mmol) Triethylenglykol **27** sowie einer Spatelspitze DMAP versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1 h unter Kühlung und dann 2.5 h bei RT gerührt. Es wird filtriert und das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt. Der ölige Rückstand wird im Kühlschrank teilweise fest. Der Feststoff wird mit Wasser versetzt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen, um den Überschuss an Triethylenglykol zu entfernen. Das Rohprodukt wird in wenig THF aufgenommen und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (EE:MeOH = 25:1 \rightarrow 2:1) aufgereinigt.



Ausbeute: 160 mg (0.31 mmol, 24 %), orangefarbener Feststoff.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$

Molmasse: 508.47 g/mol

Isomerenverhältnis 5-Carboxyfluorescein : 6-Carboxyfluorescein = 0.6 : 0.4

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, $\text{DMSO-}D_6$): δ [ppm] = 3.38-3.47 (m, 4H, CH_2), 3.49-3.55 (m, 2H, CH_2), 3.58-3.62 (m, 2H, CH_2), 3.69 (m, 0.8H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)}$, 6-Isomer), 3.79 (m, 1.2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)}$, 5-Isomer), 4.03 (br. s, CH_2OH), 4.35 (m, 0.8H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)}$, 6-Isomer), 4.47 (m, 1.2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)}$, 5-Isomer), 6.54 (m, 2H, CCHCHCOH), 6.60 (m, 2H, CCHCHCOH), 6.68 (m, 2H, OCCHCOH), 7.43 (d, 0.6H, $^3J = 8.1\text{ Hz}$, OC(O)CCHCHC , 5-Isomer), 7.67 (m, 0.4H, OC(O)CCHC , 6-Isomer), 8.14 (d, 0.4H, $^3J = 8.0\text{ Hz}$, OC(O)CCHCHC , 6-Isomer), 8.24 (dd, 0.4H, $^3J = 8.0\text{ Hz}$, $^4J = 1.4\text{ Hz}$,

OC(O)CCHCHC, 6-Isomer), 8.30 (dd, 0.6H, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, OC(O)CCHCHC, 5-Isomer), 8.41 (d, 0.6H, $^4J = 1.7$ Hz, OC(O)CCHC, 5-Isomer), 10.17 (br. s, 2H, OH_{aryl}).

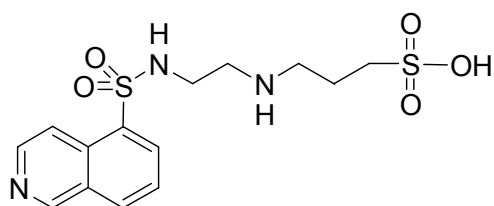
^{13}C -NMR (500.13 MHz, DMSO- D_6): δ [ppm] = 60.2 (s, CH₂), 64.8 (s, CH₂), 68.1 (s, CH₂), 69.7 (s, CH₂), 69.9 (s, CH₂), 72.3 (s, CH₂), 80.9 (q), 102.2 (t), 102.3 (t), 108.9 (q), 109.1 (q), 113.0 (t), 113.1 (t), 125.7 (t), 127.5 (q), 129.2 (t), 129.3 (t), 130.8 (t), 131.6 (q), 135.7 (t), 151.9 (q), 152.0 (q), 152.1 (q), 160.3 (q), 160.4 (q), 164.5 (q, C=O), 167.7 (q, C=O).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3421 s, 3254 m, 3084 m, 2949 m, 2927 m, 2878 m, 1764 m, 1725 vs, 1678 m, 1636 s, 1605 vs, 1541 m, 1508 vw, 1457 s, 1387 w, 1282 ss, 1241 s, 1208 vs, 1176 vs, 1118 vs, 1071 m, 992 vw, 924 vw, 851 w, 796 vw, 761 w, 752 w, 720 vw, 674 vw.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 509.6$ ([M+H]⁺, berechnet für C₂₇H₂₅O₁₀⁺: 509.5), 531.6 ([M+Na]⁺, berechnet für C₂₇H₂₄O₁₀Na⁺: 531.5), 547.5 ([M+K]⁺, berechnet für C₂₇H₂₄O₁₀K⁺: 547.6).

6.4.5.2 3-Aza-6-(isochinolin-5-sulfonyl)aminohexan-1-sulfonsäure **30**

Eine Lösung von 249 mg (0.99 mmol) **H-9** in 5 ml MeOH wird portionsweise mit 121 mg (0.99 mmol) 1,3-Propansulton **29** versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel (erst MeOH, dann EE:MeOH = 1:1.5) aufgereinigt.



Ausbeute: 94 mg (0.25 mmol, 25 %), brauner, klebriger Feststoff.

Summenformel: $C_{14}H_{19}N_3O_5S_2$

Molmasse: 373.45 g/mol

DC: $R_f = 0.43$ (MeOH)

1H -NMR (500.13 MHz, DMSO- D_6): δ [ppm] = 1.87 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.56 (t, 2H, $^3J = 6.6$ Hz, $NHCH_2CH_2CH_2$), 2.92-3.05 (m, 6H, $NHCH_2CH_2NH$, CH_2SO_3), 7.89 (dd, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, $CH_{Isochinolin, meta\ zu\ CS}$), 8.40 (dd, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, $CH_{Isochinolin, ortho\ o.\ para\ zu\ CS}$), 8.44 (d, 1H, $^3J = 6.1$ Hz, $NCHCH_{Isochinolin}$), 8.51 (dd, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, $CH_{Isochinolin, ortho\ o.\ para\ zu\ CS}$), 8.57 (br. s, 2H, SO_3H , SO_2NH), 8.74 (d, 1H, $^3J = 6.1$ Hz, $NCHCH_{Isochinolin}$), 9.56 (s, 1H, $CCHN_{Isochinolin}$).

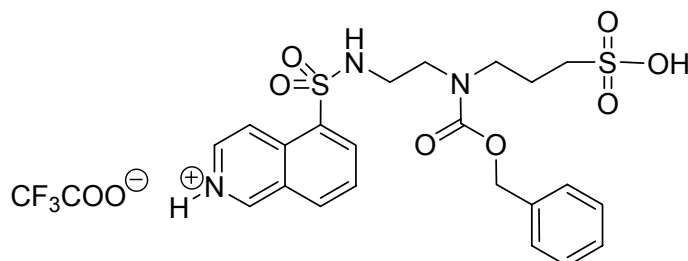
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 374.4$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{14}H_{20}N_3O_5S_2^+$: 374.1), 396.3 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{14}H_{19}N_3O_5S_2Na^+$: 396.1), 412.3 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{14}H_{19}N_3O_5S_2K^+$: 412.0).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 6.0$ min (VydacTM).

6.4.5.3 3-(Benzyloxycarbonyl)-3-aza-6-(isochinolin-5-sulfonylamino)hexan-1-sulfonsäure Trifluoracetat **32**

Eine Lösung von 60 mg (0.16 mmol) **30** und 44.5 μ l (0.32 mmol) NEt_3 in 2 ml Wasser wird bei 0 °C mit 44 mg (0.18 mmol) Cbz-OSu, gelöst in 1 ml Acetonitril, versetzt. Es wird

5 min bei 0 °C und dann 1 h bei RT gerührt. Das Acetonitril wird im Vakuum am Rotationsverdampfer und das Wasser durch Lyophilisieren entfernt. Der Rückstand wird mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 61 mg (0.098 mmol, 61 %), beigefarbener Feststoff.

Molmasse: 621.61 g/mol

Summenformel: C₂₄H₂₆F₃N₃O₉S₂

¹H-NMR (500.13 MHz, CD₃OD/D₂O): δ [ppm] = 2.55 (m, 2H, CH₂), 2.93 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH₂), 3.06-3.12 (m, 4H, CH₂), 4.91 (s, 2H, CH₂Ph), 4.97 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, CH₂), 8.12 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ³J = 7.5 Hz, CH_{Isochinolin, meta zu CS}), 8.66 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 0.6 Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.78 (dd, 1H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.6 Hz, CH_{Isochinolin, ortho o. para zu CS}), 8.85 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz, NCHCH_{Isochinolin}), 9.10 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz, NCHCH_{Isochinolin}), 10.00 (s, 1H, CCHN_{Isochinolin}).

¹³C-NMR (500.13 MHz, CD₃OD/D₂O): δ [ppm] = 24.2 (s, CH₂CH₂CH₂), 41.8 (s, CH₂), 47.6 (s, CH₂), 48.1 (s, CH₂), 49.5 (s, CH₂), 68.3 (s, CH₂Ph), 118.8 (t, CH_{aryl}), 127.7 (t, CH_{aryl}), 128.7 (t, CH_{aryl}), 128.8 (t, CH_{aryl}), 129.2 (t, CH_{aryl}), 129.5 (t, CH_{aryl}), 129.6 (t, CH_{aryl}), 130.3 (q, C_{aryl}), 132.2 (q, C_{aryl}), 134.5 (t, CH_{aryl}), 135.1 (t, CH_{aryl}), 135.3 (q, C_{aryl}), 137.3 (q, C_{aryl}), 144.6 (t, CH_{aryl}), 154.1 (t, CH_{aryl}), 157.6 (q, C=O).

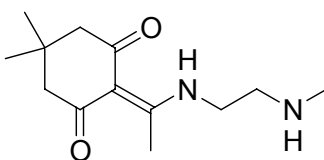
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3433 s, 3219 m, 3090 m, 3064 m, 3035 m, 2943 m, 2876 m, 1686 vs, 1620 m, 1585 w, 1563 w, 1485 m, 1455 m, 1425 s, 1367 m, 1327 s, 1277 w, 1212 s, 1159 vs, 1137 s, 1045 s, 991 m, 917 w, 831 m, 800 w, 762 m, 736 m, 698 m.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 508.3$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{22}H_{26}N_3O_7S_2^+$: 508.1), 530.3 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{22}H_{25}N_3O_7S_2Na^+$: 530.1), 546.2 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{22}H_{25}N_3O_7S_2K^+$: 546.1).

Analytische RP-HPLC: $t_R = 16.1$ min (VydacTM).

6.4.5.4 *N*-1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl-*N'*-methylethylen-diamin **35**

Eine Lösung von 13.5 g (74.0 mmol) Dde-OH **34** und 10.3 ml (74.0 mmol) NEt_3 in 30 ml DMF wird mit 4.31 ml (61.0 mmol) *N*-Methylethylen-diamin **33** versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Argon über Nacht bei RT gerührt, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der orangefarbene ölige Rückstand wird in reichlich eiskaltem Diethylether aufgenommen. Nach Abfiltrieren eines weißen Niederschlags wird eingeeengt und aus Diethylether (um)kristallisiert. Beim Abfiltrieren bzw. Waschen der Kristalle mit eiskaltem Diethylether muss zügig gearbeitet werden, da das Produkt hygroskopisch ist. Nach Trocknen des Produkts im Hochvakuum wird ein gelboranger Feststoff erhalten.



Ausbeute: 8.03 g (33.7 mmol, 55 %).

Molmasse: 238.33 g/mol

Summenformel: $C_{13}H_{22}N_2O_2$

DC: $R_f = 0.41$ (AlO_x neutral, 2 % MeOH in $CHCl_3$)

Schmelzpunkt: 49-50 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.03 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.49 (br. s, CH_3NH), 2.37 (s, 4H, CH_2CO), 2.49 (s, 3H, NHCH_3), 2.58 (s, 3H, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 2.90 (m, 2H, CH_3NHCH_2), 3.51 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 13.48 (br. s, Dde-NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 18.1 (p, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 28.3 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 30.1 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 36.2 (p, NHCH_3), 43.1 (s, NHCH_2), 50.1 (s, NHCH_2), 52.9 (s, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 53.1 (s, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 108.0 (q, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 173.5 (q, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 197.1 (q, $\text{C}=\text{O}$), 197.9 (q, $\text{C}=\text{O}$).

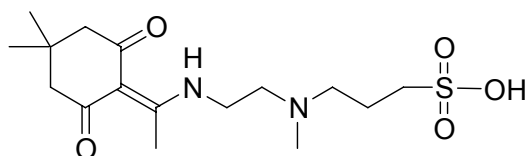
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3454 vw, 3357 w, 3302 s, 2959 s, 2889 m, 2866 m, 2848 m, 2797 s, 1632 vs, 1580 vs, 1459 vs, 1449 vs, 1419 s, 1365 s, 1334 vs, 1326 vs, 1299 s, 1290 s, 1267 s, 1209 w, 1143 s, 1093 w, 1039 m, 1013 w, 909 m, 800 m, 718 w, 625 m.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 239.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2^+$: 239.2), 261.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}^+$: 261.2), 277.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{K}^+$: 277.1).

6.4.5.5 8-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-4-methyl-4,7-diazanonan-1-sulfonsäure **36**

Eine Lösung von 3.18 g (13.3 mmol) **35** in 25 ml MeOH wird unter Eiskühlung portionsweise mit 1.63 g (13.3 mmol) 1,3-Propansulton **29** versetzt. Das Reaktionsgemisch wird weitere 10 min bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wird.

Obwohl laut Reaktionskontrolle mittels MALDI-ToF-MS das Produkt gebildet wurde, konnte aus dem öligen Rückstand weder durch Säulenchromatographie (AlO_x neutral, 2 % MeOH in Chloroform) noch durch präparative RP-HPLC Produkt isoliert werden.



Molmasse: 360.47 g/mol

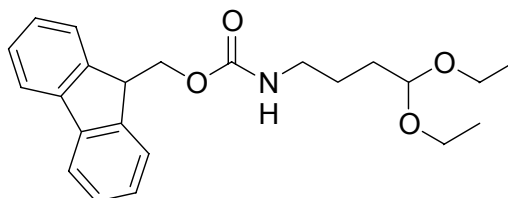
Summenformel: C₁₆H₂₈N₂O₅S

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 361.6$ ($[M+H]^+$, berechnet für C₁₆H₂₉N₂O₅S⁺: 361.2), 383.5 ($[M+Na]^+$, berechnet für C₁₆H₂₈N₂O₅SNa⁺: 383.2), 399.5 ($[M+K]^+$, berechnet für C₁₆H₂₈N₂O₅SK⁺: 399.1).

6.4.6 Synthese eines H-9-Derivates für die Affinitätschromatographie

6.4.6.1 *N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-4-aminobutyraldehyddiethylacetal **39**

Eine Lösung von 2.5 ml (12.6 mmol) 4-Aminobutyraldehyddiethylacetal **38** ($\geq 90\%$) und 1.77 ml (12.6 mmol) NEt₃ in 15 ml Acetonitril wird mit einer Lösung von 4.22 g (12.5 mmol) Fmoc-OSu in 30 ml Acetonitril versetzt und bei RT gerührt, bis laut Dünnschichtchromatographie keine Reaktion mehr stattfindet (ca. 4 h). Das Reaktionsgemisch wird filtriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (EE:PE = 1:4 → 1:1) gereinigt und das Produkt aus EE/PE kristallisiert.



Ausbeute: 2.87 g (7.47 mmol, 60%), farbloser nadeliger Feststoff.

Molmasse: 383.48 g/mol

Summenformel: C₂₃H₂₉NO₄

DC: R_f = 0.35 (PE:EE = 4:1)

Schmp.: 96.0-96.5 °C

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.20 (t, 6H, ³J = 7.1 Hz, CH(OCH₂CH₃)₂), 1.54-1.69 (m, 4H, CH₂), 3.22 (m, 2H, CONHCH₂), 3.49 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 3.63 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.20 (t, 1H, ³J = 6.9 Hz, CHCH₂OCONH), 4.39 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz, CHCH₂OCONH), 4.48 (m, 1H, CH(OCH₂CH₃)₂), 4.99 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, CONHCH₂), 7.30 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.39 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.59 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.75 (m, 2H, CH_{aryl}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 15.3 (p, CH(OCH₂CH₃)₂), 25.0 (s, CH₂), 30.9 (s, CH₂), 40.8 (s, C(O)NHCH₂), 47.3 (t, CHCH₂OC(O)NH), 61.4 (s, CH(OCH₂CH₃)₂), 66.5 (s, CHCH₂OC(O)NH), 102.6 (t, CH(OCH₂CH₃)₂), 119.9 (t, 2 CH_{aryl}), 125.0 (t, 2 CH_{aryl}), 127.0 (t, 2 CH_{aryl}), 127.6 (t, 2 CH_{aryl}), 141.3 (q, 2 C_{aryl}), 144.0 (q, 2 C_{aryl}), 156.4 (q, C(O)NH).

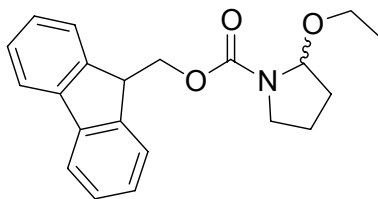
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3316 s, 3072 vw, 2973 m, 2930 w, 2884 w, 1693 vs, 1551 s, 1478 vw, 1451 m, 1370 w, 1343 vw, 1263 s, 1237 vw, 1144 s, 1102 w, 1070 m, 1031 w, 1010 w, 979 w, 926 vw, 824 vw, 758 m, 742 m, 691 w, 644 vw, 621 vw.

MS (ESI): m/z = 406.3 ([M+Na]⁺, berechnet für C₂₃H₂₉NO₄Na⁺: 406.2).

6.4.6.2 Versuch der Darstellung von *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-4-amino-butanal **40**

Eine Lösung von 1.59 g (4.15 mmol) **39** in 6 ml THF wird bei 0 °C tropfenweise mit 2 ml 1N HCl versetzt und dann bei RT gerührt, bis laut DC-Kontrolle (SiO₂, EE:PE = 1:4) das Edukt abreagiert hat. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser versetzt und die wässrige Lösung mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des öligen Rückstands an Kieselgel (EE:PE = 1:2.5) ergibt 0.26 g (0.77 mmol, 19 %) *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-2-ethoxypyrrolidin **41** als farbloses Öl, und 0.81 g (2.60 mmol, 63 %) *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-2-hydroxypyrrolidin **42** als gelbes Öl.

N-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-2-ethoxypyrrolidin **41**



Molmasse: 337.41 g/mol

Summenformel: C₂₁H₂₃NO₃

DC: R_f = 0.65 (EE:PE = 1:4)

Konformeren-Verhältnis I:II = 55:45

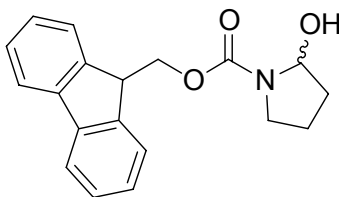
¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 0.98 (t, 1.35H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃, Konformer II), 1.19 (t, 1.65H, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃, Konformer I), 1.58-2.20 (m, 4H, NCH(OEt)CH₂ und NCH₂CH₂), 3.02 (m, 0.9H, OCH₂CH₃, Konformer II), 3.29-3.41 (m, 1.1H, NCH₂CH₂, Konformer I), 3.41-3.48 (m, 0.9H, NCH₂CH₂, Konformer II), 3.52-3.61 (m, 1.1H, OCH₂CH₃, Konformer I), 4.22 (m, 0.45H, CH_{Fmoc}, Konformer II), 4.25 (m, 0.55H, CH_{Fmoc}, Konformer I), 4.41 (m, 1.1H, CH₂Fmoc, Konformer I), 4.63 (m, 0.9H, CH₂Fmoc, Konformer II)

Konformer II), 4.81 (d, 0.45H, $^3J = 4.4$ Hz, NCHOEt, Konformer II), 5.33 (d, 0.55H, $^3J = 5.0$ Hz, NCHOEt, Konformer I), 7.32 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.40 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.62 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.77 (m, 2H, CH_{aryl}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 15.3 (p, CH₃, Konformer II), 15.4 (p, CH₃, Konformer I), 21.7 (s, NCH₂CH₂, Konformer II), 22.8 (s, NCH₂CH₂, Konformer I), 32.3 (s, NCH(OEt)CH₂, Konformer I), 32.7 (s, NCH(OEt)CH₂, Konformer II), 45.7 (s, NCH₂CH₂, Konformer I), 45.9 (s, NCH₂CH₂, Konformer II), 47.3 (t, CH_{Fmoc}, Konformer I), 47.4 (t, CH_{Fmoc}, Konformer II), 62.8 (p, CH₂CH₃, Konformer II), 63.8 (p, CH₂CH₃, Konformer I), 66.4 (s, CH_{2 Fmoc}, Konformer II), 67.2 (s, CH_{2 Fmoc}, Konformer I), 87.1 (t, NCHOEt, Konformer II), 87.7 (t, NCHOEt, Konformer I), 120.0 (t, 2 CH_{aryl}), 125.1 (t, 2 CH_{aryl}), 127.0 (t, 2 CH_{aryl}), 127.7 (t, 2 CH_{aryl}), 141.3 (q, 2 C_{aryl}, Konformer I), 141.4 (q, 2 C_{aryl}, Konformer II), 143.87 (q, C_{aryl}, Konformer II), 143.96 (q, C_{aryl}, Konformer I), 144.03 (q, C_{aryl}, Konformer I), 144.13 (q, C_{aryl}, Konformer II), 154.9 (q, C=O, Konformer II), 155.7 (q, C=O, Konformer I).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 359.9$ ([M+Na]⁺, berechnet für C₂₁H₂₃NO₃Na⁺: 360.2), 375.8 ([M+K]⁺, berechnet für C₂₁H₂₃NO₃K⁺: 376.1).

N-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-2-hydroxypyrrolidin 42



Molmasse: 309.36 g/mol

Summenformel: C₁₉H₁₉NO₃

DC: R_f = 0.16 (EE:PE = 1:4)

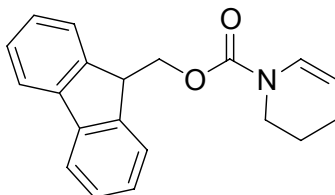
Konformer-Verhältnis I:II = 61:39

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 1.54-2.14 (m, 4H, NCH(OH)CH_2 und NCH_2CH_2), 3.20-3.65 (m, 3H, NCH_2CH_2 , OH), 4.24 (m, 0.39H, CH_{Fmoc} Konformer II), 4.26 (m, 0.61H, CH_{Fmoc} Konformer I), 4.41 (m, 1.22H, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ Konformer I), 4.65 (m, 0.78H, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$ Konformer II), 4.96 (m, 0.39H, NCHOH , Konformer II), 5.54 (m, 1H, NCHOH , Konformer I), 7.32 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.41 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.60 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.77 (m, 2H, CH_{aryl}).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 309.9$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_3^+$: 310.1), 332.0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}^+$: 332.1), 348.0 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{K}^+$: 348.1).

6.4.6.3 Versuch der Darstellung von *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-5-aminopentanal **47** aus *N*-(Fluorenylmethyloxycarbonyl)-5-amino-1-pentanol **46**

Eine Lösung von 100 mg (0.31 mmol) 5-(Fmoc-amino)-1-pentanol **45** in 1.5 ml trockenem DCM wird zu einer Suspension von 97 mg (0.45 mmol) PCC in 0.5 ml trockenem DCM gegeben. Es wird bei RT gerührt, bis das Edukt laut DC-Kontrolle (SiO_2 , EE:PE = 1:2) abreagiert hat (nach 2 h), dabei scheidet sich ein braunschwarzer Niederschlag ab. Das Reaktionsgemisch wird mit 7.5 ml trockenem Diethylether versetzt, dann wird dekantiert und der Feststoff dreimal mit Ether gewaschen. Die vereinigten Lösungsfraktionen werden durch 3 cm Florisil filtriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rückstands mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (EE:PE = 1:2) ergibt das ungesättigte Carbamat-Nebenprodukt **47**.

***N*-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-3,4-dihydro-2*H*-pyridin 47**

Ausbeute: 34 mg (11.1 mmol, 36 %), weißer Feststoff.

Molmasse: 305.37 g/mol

Summenformel: C₂₀H₁₉NO₂

DC: R_f = 0.93 (EE:PE = 1:2)

Konformeren-Verhältnis I:II = 58:42

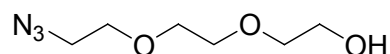
¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.85 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 2.06 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂), 3.62 (m, 0.84H, NCH₂CH₂CH₂, Konformer II), 3.65 (m, 1.16H, NCH₂CH₂CH₂, Konformer I), 4.27 (m, 1H, CH_{Fmoc}), 4.43 (m, 2H, CH₂_{Fmoc}), 4.93 (dt, 0.58H, ³J = 8.3 Hz, ³J = 4.1 Hz, NCH=CHCH₂, Konformer I), 4.98 (dt, 0.42H, ³J = 8.3 Hz, ³J = 4.1 Hz, NCH=CHCH₂, Konformer II), 6.82 (dt, 0.58H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, NCH=CHCH₂, Konformer I), 6.88 (dt, 0.42H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, NCH=CHCH₂, Konformer II), 7.31 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.40 (m, 2H, 2 CH_{aryl}), 7.59 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.76 (m, 2H, CH_{aryl}).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 21.2 (s, CH₂, Konformer II), 21.5 (s, CH₂, Konformer I), 21.6 (s, CH₂, Konformer I), 21.7 (s, CH₂, Konformer II), 42.2 (s, NCH₂CH₂CH₂, Konformer I), 42.4 (s, NCH₂CH₂CH₂, Konformer II), 47.2 (t, CHCH₂OCONH), 67.3 (s, CH₂_{Fmoc}, Konformer II), 67.8 (s, CH₂_{Fmoc}, Konformer I), 106.8 (t, NCH=CHCH₂, Konformer I), 106.9 (t, NCH=CHCH₂, Konformer II), 120.0 (t, 2 CH_{aryl}), 124.7 (t, NCH=CHCH₂, Konformer I), 125.1 (t, 2 CH_{aryl}), 125.3 (t, NCH=CHCH₂, Konformer II), 127.1 (t, 2 CH_{aryl}), 127.7 (t, 2 CH_{aryl}), 141.3 (q, 2 C_{aryl}), 143.9 (q, 2 C_{aryl}), 153.1 (q, C=O, Konformer I), 153.5 (q, C=O, Konformer II).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 305.9$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{20}H_{20}NO_2^+$: 306.1), 328.0 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{20}H_{19}NO_2Na^+$: 328.1), 344.0 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{20}H_{19}NO_2K^+$: 344.1).

6.4.6.4 8-Azido-3,6-dioxa-1-octanol **49**

Eine Suspension aus 1.85 g (10.8 mmol) 8-Chlor-3,6-dioxa-1-octanol **48** (98 %), 0.33 g (2,23 mmol) Natriumiodid und 7.22 g (111 mmol) Natriumazid in 15 ml Wasser wird bei 50 °C über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und der Rückstand mit wenig Wasser gewaschen. Das Filtrat wird eingengt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die Lösung wird zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden einmal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Das Edukt lässt sich so nicht vom Produkt abtrennen, der Produktgehalt des Öls wurde per 1H -NMR zu ca. 50 % bestimmt; das Rohprodukt wurde so weiter eingesetzt.



Ausbeute: 1.33 g Rohprodukt (entsprechend ca. 3.8 mmol Produkt, ~ 35 %,

Lit.^[172]: ~ 67 %), schwach gelbes Öl.

Molmasse: 175.19 g/mol

Summenformel: $C_6H_{13}N_3O_3$

DC: R_f (Iodfärbung) = 0.58 (DCM:MeOH = 9:1).

1H -NMR (500.13 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 2.43 (br. s, 1H, OH), 3.40 (t, 2H, $^3J = 5.0$ Hz, N_3CH_2), 3.57-3.78 (m, 10H, CH_2).

^{13}C -NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ [ppm] = 50.7 (s, N_3CH_2), 61.8 (s, CH_2OH), 70.1 (s, CH_2), 70.4 (s, CH_2), 70.7 (s, CH_2), 72.5 (s, CH_2).

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3434 m, 2923 s, 2872 s, 2107 vs, 1449 w, 1346 m, 1302 s, 1286 s, 1121 vs, 1069 s, 933 m, 887 w, 849 w, 825 w, 714 w.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 176.3 ([M+H]⁺, berechnet für C₆H₁₄N₃O₃⁺: 176.1), 198.2 ([M+Na]⁺, berechnet für C₆H₁₃N₃O₃Na⁺: 198.1), 214.2 ([M+K]⁺, berechnet für C₆H₁₃N₃O₃Na⁺: 214.1).

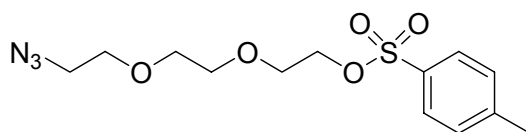
MS (ESI): m/z = 198.0 ([M+Na]⁺, berechnet für C₆H₁₃N₃O₃Na⁺: 198.1).

Außerdem wurde 8-Azido-3,6-dioxa-1-octanol, das von K. Jensen bzw. P. Plattner nach der Vorschrift von Jeong *et al.* bzw. K. Jensen synthetisiert wurde (mit wechselndem Produktgehalt), bei weiteren Reaktionen eingesetzt.^[80,173]

6.4.6.5 (11-Azido-3-aza-6,9-dioxaundec-1-yl)isochinolin-5-sulfonamid 51 (Methode A)

6.4.6.5.1 *p*-Toluolsulfonsäure-(8-azido-3,6-dioxaoct-1-yl)ester 50

2.0 g **49** (Reinheit ca. 70 %, ~ 8 mmol) und 2.56 g (22.8 mmol) DABCO werden in 60 ml DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wird portionsweise mit 3.26 g (17.1 mmol) *p*-Tosylchlorid versetzt und dann 2 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 50 ml Ethylacetat wird das Reaktionsgemisch filtriert und der Filterkuchen wird mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wird mit 50 ml Wasser und zweimal mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene schwach gelbe Öl mittels Flashchromatographie an Kieselgel (PE:EE = 2:1) gereinigt.



Ausbeute: 1.9 g (5.78 mmol, 72 %), schwach gelbes Öl.

Molmasse: 329.37 g/mol

Summenformel: C₁₃H₁₉N₃O₅S

DC: R_f = 0.32 (PE:EE = 2:1)

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 2.45 (s, 3H, CH₃), 3.37 (t, 2H, ³J = 5.0 Hz, N₃CH₂), 3.59-3.62 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.64 (t, 2H, ³J = 5.0 Hz, N₃CH₂CH₂O), 3.70 (t, 2H, ³J = 4.7 Hz, OCH₂CH₂OSO₂), 4.17 (t, 2H, ³J = 4.7 Hz, OCH₂CH₂OSO₂), 7.35 (dm, 2H, ³J_{ortho} = 8.2 Hz, CH_{meta zu CS}), 7.80 (dm, 2H, ³J_{ortho} = 8.2 Hz, CH_{ortho zu CS}).

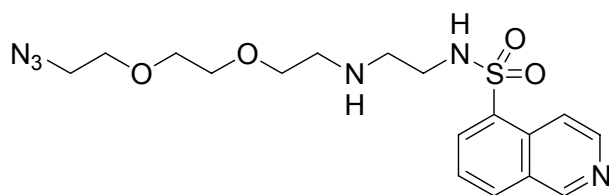
¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 21.6 (p, CH₃), 50.7 (s, N₃CH₂), 68.8 (s, CH₂), 69.3 (s, CH₂), 70.1 (s, CH₂), 70.6 (s, CH₂), 70.8 (s, CH₂), 128.0 (t, 2 CH_{aryl}), 129.8 (t, 2 CH_{aryl}), 133.0 (q, CCH₃), 144.8 (q, CS).

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2924 m, 2870 m, 2105 vs, 1598 w, 1451 w, 1357 vs, 1302 m, 1291 m, 1188 s, 1176 vs, 1122 s, 1098 s, 1018 m, 923 s, 817 m, 776 m, 663 s.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 330.4 ([M+H]⁺, berechnet für C₁₃H₂₀N₃O₅S⁺: 330.1), 352.5 ([M+Na]⁺, berechnet für C₁₃H₁₉N₃O₅SNa⁺: 352.1), 368.5 ([M+K]⁺, berechnet für C₁₃H₁₉N₃O₅SK⁺: 368.1).

6.4.6.5.2 (11-Azido-3-aza-6,9-dioxaundec-1-yl)isochinolin-5-sulfonamid **51**

Eine Lösung von 196 mg (0.60 mmol) **50** in 1 ml DMF wird auf 0 °C gekühlt und mit 197 μ l (1.79 mmol) NMM versetzt. Nach Zugabe einer Lösung von 300 mg (1.19 mmol) **H-9** in 2.5 ml DMF wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Um eine vollständige Umsetzung zu erreichen, wird das Reaktionsgemisch anschließend 48 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH 19:1 \rightarrow 9:1).



Ausbeute: 160 mg (0.39 mmol, 65 %), hellgelbes Öl.

Molmasse: 408.48 g/mol

Summenformel: C₁₇H₂₄N₆O₄S

DC: R_f (Ninhydrin) = 0.63 (DCM:MeOH = 9:1);

0.30 (DCM:MeOH = 19:1).

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃/CD₃OD, TMS): δ [ppm] = 3.23-3.28 (m, 4H, CH₂), 3.49 (t, 2H, ³J = 5.0 Hz, N₃CH₂), 3.65-3.73 (m, 4H, CH₂), 3.79 (t, 2H, ³J = 4.7 Hz, CH₂), 3.86-3.94 (m, 4H, CH₂), 7.85 (m, 1H, CH_{isochinolin}), 8.38 (m, 1H, CH_{isochinolin}), 8.52 (m, 1H, CH_{isochinolin}), 8.63-8.75 (m, 2H, CH_{isochinolin}), 9.52 (s, 1H, CCHN_{isochinolin}).

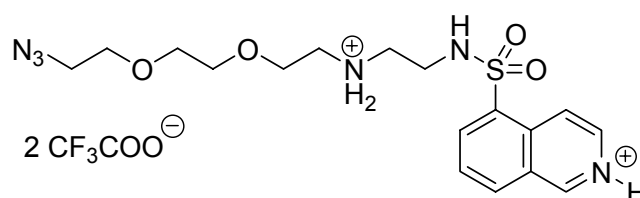
¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃/CD₃OD, TMS): δ [ppm] = 39.1 (s, CH₂), 47.6 (s, CH₂), 47.9 (s, CH₂), 50.6 (s, N₃CH₂), 65.7 (s, CH₂), 70.0 (s, CH₂), 70.3 (s, CH₂), 70.4 (s, CH₂), 119.5 (t, CH_{aryl}), 127.4 (t, CH_{aryl}), 127.8 (q, C_{aryl}), 129.1 (q, C_{aryl}), 132.5 (q, C_{aryl}), 134.6 (t, CH_{aryl}), 134.9 (t, CH_{aryl}), 141.1 (t, CH_{aryl}), 151.3 (t, CH_{aryl}).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 409.6$ ($[M+H]^+$, berechnet für $C_{17}H_{25}N_6O_4S^+$: 409.2), 431.6 ($[M+Na]^+$, berechnet für $C_{17}H_{24}N_6O_4SNa^+$: 431.1), 447.6 ($[M+K]^+$, berechnet für $C_{17}H_{24}N_6O_4SK^+$: 447.1).

6.4.6.6 (11-Azido-3-aza-6,9-dioxaundec-1-yl)isochinolin-5-sulfonamid

Trifluoracetat 51 (Methode B)

Eine Lösung von 175 mg **49** (Reinheit ca. 70 %, ~ 0.70 mmol) in 5 ml trockenem DCM wird bei 0 °C mit 1 ml Pyridin versetzt. Nach Zugabe von 504 μ l (3.0 mmol) Tf_2O , gelöst in 2 ml trockenem DCM, wird das Reaktionsgemisch 1h bei 0 °C gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Tf_2O wird im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in EE/ Et_2O aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird eingengt, der Rückstand in 2 ml DMF aufgenommen und bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung von 503 mg (2.0 mmol) **H-9** in 4 ml DMF und 440 μ l (4.0 mmol) NMM versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 0.5 h bei 0 °C, anschließend 16 h bei RT und dann einen Tag bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird am Hochvakuum-Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 220 mg (0.35 mmol, 50 %), gelbes Öl.

Molmasse: 636.52 g/mol

Summenformel: $C_{21}H_{26}F_6N_6O_8S$

1H -NMR (500.13 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$, TMS): δ [ppm] = 3.21-3.30 (m, 6H, CH_2), 3.43 (m, 2H, CH_2), 3.66-3.74 (m, 6H, CH_2), 3.80 (m, 2H, CH_2), 7.95 (m, 1H, $CH_{\text{Isochinolin, meta zu CS}}$), 8.53 (d, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $CH_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.62 (d, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, $CH_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu}}$

δ_{CS}), 8.68 (d, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 8.80 (d, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, NHCHCH_{Isochinolin}), 9.61 (s, 1H, CCHN_{Isochinolin}).

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3448 m, 3096 s, 2966 s, 2930 s, 2874 s, 2112 s, 1778 m, 1745 m, 1675 vs, 1616 s, 1557 w, 1481 m, 1444 m, 1385 w, 1348 s, 1311 m, 1199 vs, 1170 vs, 1145 vs, 1035 s, 1010 m, 926 vw, 830 s, 797 s, 759 w, 722 s, 706 m, 685 m, 638 vw.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 409.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$: 409.2), 431.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{SNa}^+$: 431.1), 447.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{SK}^+$: 447.1).

Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 13.1$ min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (50:50) nach 30 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_{\text{R}} = 13.3$ min.

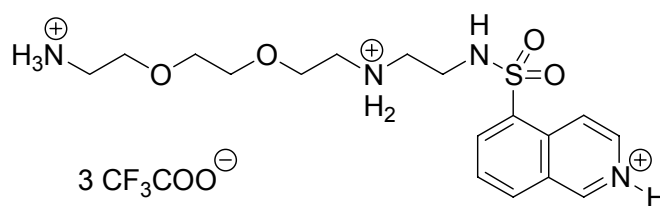
Andere physikalische Daten: vgl. 6.4.6.5.2, Darstellung von 51 nach Methode A.

6.4.6.7 (11-Amino-3-aza-6,9-dioxaundec-1-yl)isochinolin-5-sulfonamid

Trifluoracetat 52

6.4.6.7.1 Reduktion der Azidofunktion mit DTE

Eine Lösung von 79 mg (510 μmol) DTE und 11.2 μl (75 μmol) DBU in 2 ml MeOH wird nach 10-minütiger Inkubation zu einer Lösung von 30 mg (73 μmol) **51** in 3 ml MeOH gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.



Ausbeute: 24 mg (33 μmol , 45 %), schwach gelbes Öl.

Molmasse: 724.55 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{F}_9\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 3.14 (m, 2H, CH_2), 3.2 (m, 4H, CH_2), 3.28 (m, 2H, CH_2), 3.71 (br. s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.72 (m, 2H, CH_2), 3.78 (m, 2H, CH_2), 7.95 (dd, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, meta zu CS}}$), 8.55 (d, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.60 (d, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_{\text{Isochinolin, ortho o. para zu CS}}$), 8.69 (d, 1H, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{NHCHCH}_{\text{Isochinolin}}$), 8.73 (d, 1H, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{NHCHCH}_{\text{Isochinolin}}$), 9.59 (s, 1H, $\text{CCHNH}_{\text{Isochinolin}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 40.0 (s, CH_2), 40.6 (s, CH_2), 48.4 (s, CH_2), 48.5 (s, CH_2), 66.8 (s, CH_2), 67.9 (s, CH_2), 71.3 (s, CH_2), 71.5 (s, CH_2), 121.0 (t, CH_{aryl}), 129.1 (q, C_{aryl}), 130.5 (t, CH_{aryl}), 133.9 (q, C_{aryl}), 135.9 (t, CH_{aryl}), 136.1 (t, CH_{aryl}), 136.9 (q, C_{aryl}), 140.8 (t, CH_{aryl}), 152.5 (t, CH_{aryl}).

IR (CDCl_3 -Lösung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3607 w, 3089 m, 3042 m, 2925 m, 2884 m, 1675 vs, 1649 s, 1596 m, 1528 w, 1452 w, 1425 w, 1325 w, 1201 vs, 1134 vs, 1043 w, 997 w, 835 m, 799 m, 765 w, 721 m, 638 m, 629 m, 617 s.

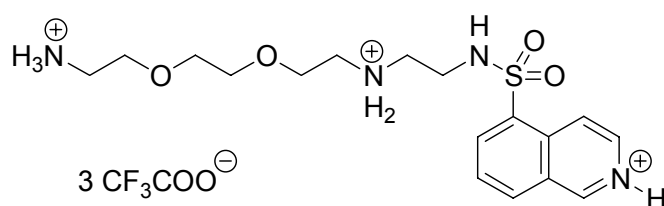
HRMS (ESI-FT-ICR): $m/z = 383.17435$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$: 383.17428; Abweichung 0.40 mmu/1.05 ppm), 405.15663 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}^+$: 405.15670; Abweichung 0.07 mmu/0.17 ppm).

Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 13.1$ min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (50:50) nach 30 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_{\text{R}} = 6.5$ min.

6.4.6.7.2 Reduktion der Azidofunktion mit 1,3-Propandithiol

Ein Gemisch aus 223 μl (1.6 mmol) NEt_3 und 161 μl (1.6 mmol) 1,3-Propandithiol wird 5 min bei RT inkubiert und dann zu einer Lösung von 130 mg (318 μmol) **51** in 2 ml MeOH (unter Argon) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer RP-HPLC ergibt das Produkt als schwach gelbes Öl.



Ausbeute: 142 mg (196 μmol , 62 %), schwach gelbes Öl.

Molmasse: 724.55 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{F}_9\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 383.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$: 383.2), 405.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{SNa}^+$: 405.2), 421.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4\text{SK}^+$: 421.1).

Analytische RP-HPLC: $t_{\text{R}} = 12.0$ min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (60:40) nach 25 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 254$ nm): $t_{\text{R}} = 10.3$ min.

Physikalische Daten siehe 6.4.6.7.1.

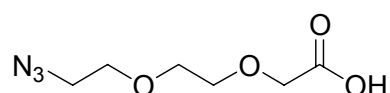
6.4.7 Synthese eines neuen Linkers bzw. eines Bausteins für die Darstellung von Sonden für die Photoaffinitätsmarkierung

6.4.7.1 8-Azido-3,6-dioxaoctancarbonsäure **53**

Darstellung des Jones-Reagenz:

Eine Suspension von 2.5 g Chrom(VI)oxid in 2.5 ml konzentrierter Schwefelsäure wird langsam in 7.5 ml eiskaltes Wasser eingerührt, es entsteht eine rot-orange Lösung.

Eine Lösung von 0.4 g 8-Azido-3,6-dioxa-1-octanol **49** (Reinheit ca. 95 %, ~ 2.71 mmol) in 10 ml Aceton wird unter Eiskühlung und Rühren solange tropfenweise mit Jones-Reagenz versetzt, bis eine bleibende rotbraune Färbung eintritt, die sich auch nach längerer Zeit nicht mehr zu grün umwandelt. Das Reaktionsgemisch wird 4 h weitergerührt und dabei langsam auf RT gebracht. Nicht reagiertes Jones-Reagens wird mit Isopropanol gequench. Der entstehende klebrige grüne Feststoff wird abfiltriert, der Filterkuchen wird mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Filtrat wird über Na_2SO_4 getrocknet, durch Filterflocken filtriert und zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt (ca. 80 % Produktgehalt laut $^1\text{H-NMR}$) wird ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.



Ausbeute: 0.58 g Rohprodukt (entspr. ~ 2.45 mmol Produkt, ~ 90 %), blassgelbes Öl.

Molmasse: 189.17 g/mol

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 3.45 (t, 2H, $^3J = 4.9$ Hz, N_3CH_2), 3.65-3.82 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.21 (s, 2H, OCH_2CONH), 9.90 (br. s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 50.7 (s, N_3CH_2), 68.4 (s, OCH_2COOH), 70.1 (s, CH_2), 70.5 (s, CH_2), 71.2 (s, CH_2), 174.5 (q, COOH).

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3447 m, 2925 s, 2873 s, 2100 vs, 1749 vs, 1737 vs, 1646 m, 1444 m, 1383 w, 1347 m, 1282 s, 1228 vs, 1144 s, 1118 vs, 1086 vs, 1039 s, 1006 vs, 938 m, 898 w, 851 m, 821 w, 741 s, 715 m, 680 m, 645 m, 624 s, 610 s.

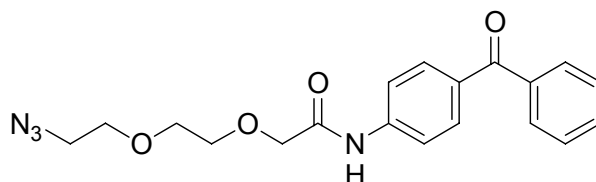
MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): m/z = 189.9 ([M+H]⁺, berechnet für C₆H₁₂N₃O₄⁺: 190.1), 211.8 ([M+Na]⁺, berechnet für C₆H₁₁N₃O₄Na⁺: 212.1), 227.8 ([M+K]⁺, berechnet für C₆H₁₁N₃O₄K⁺: 288.0).

MS (ESI): m/z = 188.5 ([M-H]⁻, berechnet für C₆H₁₀N₃O₄⁻: 188.1), 224.3 ([M+Cl]⁻, berechnet für C₆H₁₁N₃O₄Cl⁻: 244.0).

6.4.7.2 *N*-(4-Benzoylphenyl)-8-azido-3,6-dioxaoctanamid **54**

6.4.7.2.1 Darstellung von **54** mit Kupplungsreagenz

Eine Suspension von 250 mg 8-Azido-3,6-dioxaoctancarbonsäure **53** (Reinheit ca. 80 %, ~ 1.0 mmol) und 434 mg (1.35 mmol) TBTU in 6 ml DMF/DCM (1:1) wird auf 0 °C gekühlt und mit 685 µl (4.0 mmol) DIPEA versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wird eine Lösung von 399 mg (2.0 mmol) 98 %igem 4-Aminobenzophenon in 2.5 ml DCM zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 2 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch vorfraktioniert (SiO₂, DCM:MeOH:AcOH = 9:1:0.1). Das Rohprodukt wird anschließend mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Ausbeute: 164 mg (0.45 mmol, 45 %), hellgelbes Öl.

Molmasse: 368.39 g/mol

Summenformel: C₁₉H₂₀N₄O₄

DC: $R_f = 0.18$ (PE:EE:AcOH = 9:3:0.1)

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 3.45 (t, 2H, $^3J = 4.9$ Hz, N_3CH_2), 3.75 (m, 4H, OCH_2), 3.80 (m, 2H, OCH_2), 4.16 (s, 2H, OCH_2CONH), 7.48 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.58 (m, 1H, CH_{aryl}), 7.73 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.78 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.84 (m, 2H, CH_{aryl}), 8.78 (br. s, 1H, CONH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 50.5 (s, N_3CH_2), 70.1 (s, CH_2), 70.2 (s, CH_2), 70.6 (s, CH_2), 71.1 (s, CH_2), 119.1 (t, 2 CH_{aryl}), 128.3 (t, 2 CH_{aryl}), 129.8 (t, 2 CH_{aryl}), 131.5 (t, 2 CH_{aryl}), 132.2 (t, CH_{aryl}), 133.3 (q, C_{aryl}), 137.8 (q, C_{aryl}), 141.2 (q, C_{aryl}), 168.3 (q, CONH), 195.6 (q, PhCOPh).

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3524 vw, 3335 m, 3059 vw, 2923 m, 2872 m, 2107 vs, 1735 w, 1698 vs, 1653 vs, 1599 vs, 1524 vs, 1446 m, 1408 s, 1314 vs, 1281 vs, 1176 s, 1147 vs, 1113 vs, 938 m, 925 m, 854 m, 794 w, 744 m, 702 s, 662 m.

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): $m/z = 369.5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 369.2), 391.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}^+$: 391.1), 407.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{K}^+$: 407.1).

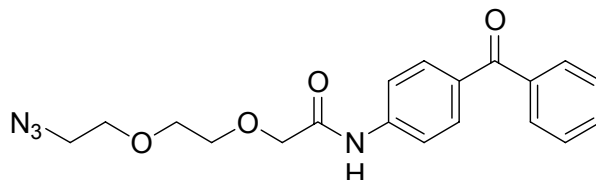
Analytische RP-HPLC: $t_R = 33.1$ min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (10:90) nach 45 min, Flussrate 10 ml/min, $\lambda = 220$ nm): $t_R = 31.6$ min.

6.4.7.2.2 Darstellung von 54 via Säurechlorid

Es werden 0.7 g 8-Azido-3,6-dioxaoctancarbonsäure **53** (Reinheit ca. 50 %, ~ 1.8 mmol) mit 0.54 ml SOCl_2 versetzt und 30 min refluxiert, dann wird der SOCl_2 -Überschuß im Wasserstrahlvakuum entfernt. Das Säurechlorid wird in trockenem DCM aufgenommen und unter Argon zu einer eisgekühlten Lösung von 0.73 g (3.7 mmol) 4-Aminobenzo-

phenon und 1.54 ml (11.1 mmol) Triethylamin in 15 ml trockenem DCM getropft. Nach erfolgter Zugabe wird das Reaktionsgemisch unter Argon 4.5 h bei RT gerührt. Nach Waschen mit 0.1 N HCl wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EE = 2:1 → PE:EE = 1:1).



Ausbeute: 0.47 g (1.28 mmol, 71 %), hellgelbes Öl.

Molmasse: 368.39 g/mol

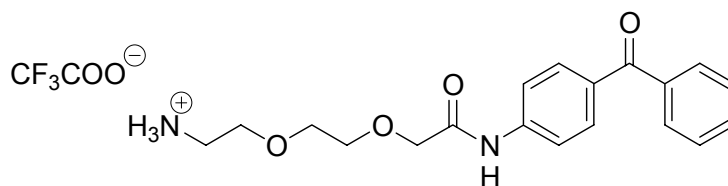
Summenformel: C₁₉H₂₀N₄O₄

DC: R_f = 0.12 (EE:PE = 1:2)

Physikalische Daten siehe 6.4.7.2.1.

6.4.7.3 N-(4-Benzoylphenyl)-8-amino-3,6-dioxaoctanamid Trifluoracetat **55**

Eine Mischung aus 552 µl (5.50 mmol) 1,3-Propanedithiol und 762 µl (5.50 mmol) NEt₃ wird 5 min bei RT inkubiert und dann zu einer Lösung von 0.56 g (1.52 mmol) **54** in 5 ml MeOH gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt, dabei fällt ein farbloser Feststoff (Polysulfide) aus. Es wird eingeeengt, um eine möglichst vollständige Fällung zu erreichen, anschließend wird in MeOH resuspendiert und abfiltriert. Das Lösungsmittel wird erneut entfernt und der Rückstand wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.



Ausbeute: 329 mg (0.72 mmol, 47 %), schwach gelbes Öl.

Molmasse: 456.41 g/mol

Summenformel: $C_{21}H_{23}F_3N_2O_6$

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 3.15 (m, 2H, CH_2NH_3^+), 3.61-3.75 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.12 (s, 2H, OCH_2CONH), 7.44 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.56 (m, 1H, CH_{aryl}), 7.67 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.72 (m, 4H, CH_{aryl}), 8.12 (br. s, 3H, NH_3^+), 9.07 (br. s, 1H, CONH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3 , TMS): δ [ppm] = 39.5 (s, CH_2NH_3^+), 66.7 (s, CH_2), 70.3 (s, CH_2), 70.5 (s, CH_2), 70.6 (s, CH_2), 119.3 (t, 2 CH_{aryl}), 128.3 (t, 2 CH_{aryl}), 129.9 (t, 2 CH_{aryl}), 131.5 (t, 2 CH_{aryl}), 132.5 (t, CH_{aryl}), 133.3 (q, C_{aryl}), 137.5 (q, C_{aryl}), 141.2 (q, C_{aryl}), 169.2 (q, CONH), 196.1 (q, PhCOPh).

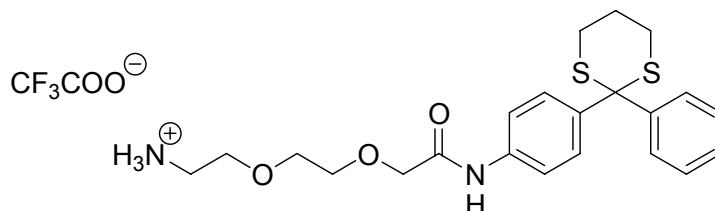
IR (CDCl_3 -Lösung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3471 m, 3384 m, 3325 m, 3260 m, 3177 m, 3095 m, 3059 m, 2921 m, 1675 vs, 1652 vs, 1596 vs, 1524 vs, 1447 m, 1409 s, 1314 vs, 1282 vs, 1258 s, 1201 vs, 1177 vs, 1132 vs, 1062 w, 1027 w, 1001 w, 939 m, 925 m, 855 m, 837 m, 798 s, 743 m, 722 s, 701 vs, 664 s, 625 m, 613 s.

HRMS (ESI-FT-ICR): m/z = 343.16507 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$: 343.16507; Abweichung 0.16 mmu/0.47 ppm), 365.14712 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$: 365.14718; Abweichung 0.06 mmu/0.16 ppm).

Analytische RP-HPLC: t_R = 19.8 min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) \rightarrow A:B (0:100) nach 50 min, Flussrate 10 ml/min, λ = 254 nm): t_R = 16.8 min.

Analytische Daten des Nebenproduktes *N*-(4-(2-Phenyl-[1,3]dithian-2-yl)phenyl)-8-amino-3,6-dioxaoctanamid Trifluoracetat 56



Ausbeute: 10 - 20 %

Molmasse: 546.62 g/mol

Summenformel: C₂₄H₂₉F₃N₂O₅S₂

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 1.88-2.04 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₂S), 2.74 (m, 4H, SCH₂CH₂CH₂S), 3.03-3.17 (m, 2H, NCH₂), 3.55-3.73 (m, 6H, CH₂), 4.10 (s, 2H, OCH₂CONH), 7.18-7.36 (m, 3H, CH_{aryl}), 7.47 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.60 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.68 (m, 2H, CH_{aryl}), 7.96 (br. s, 3H, NH₃⁺), 8.63 (br. s, 1H, CONH).

¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃, TMS): δ [ppm] = 24.4 (s, SCH₂CH₂CH₂S), 29.3 (s, SCH₂CH₂CH₂S), 39.5 (s, NCH₂), 62.3 (q, SCS), 66.6 (s, CH₂), 70.4 (s, CH₂), 70.5 (s, CH₂), 70.6 (s, CH₂), 120.0 (t, 2 CH_{aryl}), 127.6 (t, CH_{aryl}), 128.4 (t, 2 CH_{aryl}), 129.2 (t, 2 CH_{aryl}), 130.0 (t, 2 CH_{aryl}), 136.1 (q, C_{aryl}), 139.2 (q, C_{aryl}), 142.3 (q, C_{aryl}), 169.0 (q, CONH).

MS (MALDI-ToF, 2,5-DHB): *m/z* = 433.6 ([M+H]⁺, berechnet für C₂₂H₂₉N₂O₃S₂⁺: 433.2), 455.5 ([M+Na]⁺, berechnet für C₂₂H₂₈N₂O₃S₂Na⁺: 455.1), 471.5 ([M+K]⁺, berechnet für C₂₂H₂₈N₂O₃S₂Na⁺: 471.1).

Analytische RP-HPLC: *t_R* = 25.6 min (Jupiter).

Präparative RP-HPLC (Gradient: A:B (92:8) → A:B (0:100) nach 50 min, Flussrate 10 ml/min, λ = 254 nm): *t_R* = 21.4 min.

6.5 SPR-Messungen

6.5.1 Immobilisierung der Biotin-Variante 8 auf dem SA-Chip

Die Immobilisierung von **8** wird mit HBS-EP-Puffer als Laufpuffer bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. In einem ersten Versuch wird eine Stammlösung von **8** (0.6 mg in 0.6 ml HBS-EP-Puffer; $c \sim 1.1 \text{ mM}$) mit HBS-EP-Puffer 50-fach verdünnt und 1.5 min in die Messzelle injiziert. Hierbei wird allerdings nach beendeter Injektion kein konstantes Immobilisierungsniveau erhalten, sondern eine abfallende Kurve. Daher wird anschließend nur 10-fach verdünnte Stammlösung für 4.5 min injiziert. Dies führt zu einem konstanten Immobilisierungsniveau von 67 RU.

6.5.2 Bindungsexperimente mit PKA/Kreatinkinase (SA-Chip)

Die Bindungsexperimente mit Proteinkinase A (PKA) und Kreatinkinase werden in Phosphatpuffer bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Vor Injektion der Proteine wird ein *Prime* des Systems durchgeführt, um es mit dem neuen Puffer durchzuspülen. Die jeweilige Proteinlösung wird 5 min sowohl in die Referenz- als auch in die Messzelle injiziert, wobei das Signal der Referenzzelle von dem der Messzelle subtrahiert wird.

Im Fall der PKA wird ein Gemisch aus 14 μl Enzymstammlösung (22 μM) und 126 μl Phosphatpuffer nach 15-minütiger Inkubation auf Eis injiziert, im Fall der Kreatinkinase eine 1:100-Verdünnung der 2.6 mM Stammlösung in Phosphatpuffer.

Beide Proteine binden stärker in der Referenzzelle als in der Messzelle (negative RU), das heißt die unspezifische Wechselwirkung mit dem Streptavidin ist jeweils stärker als die spezifische Wechselwirkung mit dem immobilisierten Liganden.

6.5.3 Immobilisierung des Derivates **12** auf dem Sensorchip CM5

Während der Immobilisierung von **12** wird HBS-EP Puffer als Laufpuffer verwendet, alle Schritte werden bei einem Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt.

Die Aktivierung der carboxymethylierten Dextran-Matrix auf der Sensorchip Oberfläche erfolgt entsprechend dem empfohlenen Protokoll: gleiche Volumina von 0.1 M NHS-Lösung und 0.4 M EDC · HCl-Lösung (jeweils in Reinstwasser) werden gemischt. Die Mischung wird injiziert und für 7 min über die Oberflächen sowohl der Mess- als auch der Referenzzelle geleitet. Die Immobilisierung erfolgt durch Injektion einer Lösung von **12** in HBS-EP Puffer in die Messzelle, wobei die Konzentration der Lösung entweder 0.17 mM oder 0.85 mM beträgt. Das erreichte Immobilisierungsniveau liegt im Fall der geringeren Konzentration nach 7-minütiger Injektion zwischen 100 und 280 RU, für die höhere Konzentration werden in 6 min \sim 370 RU immobilisiert.

Nichtreagierte Hydroxysuccinimidylgruppen auf der Oberfläche beider Flusszellen werden durch Ethanolamin deaktiviert (1 M Ethanolamin Hydrochlorid, pH 8.5, 7 min). Im Anschluss an die Immobilisierung wird das ganze System mit dem Laufpuffer für die folgenden Bindungsexperimente gespült (*Prime*).

6.5.3.1 Massentransfer

PKA: Um Massentransfereffekte festzustellen, wird eine \sim 24 nM Lösung der katalytischen Untereinheit in Tris-HCl Puffer bei verschiedenen Flussraten (5 $\mu\text{l}/\text{min}$; 10 $\mu\text{l}/\text{min}$; 20 $\mu\text{l}/\text{min}$; 30 $\mu\text{l}/\text{min}$; 40 $\mu\text{l}/\text{min}$) für 5 min injiziert. Als Laufpuffer dient ebenfalls Tris-Puffer. Zwischen den Injektionen wird mit 0.1 M Arginin die Chipoberfläche regeneriert.

Kreatinkinase: Eine 200 nM Kreatinkinase-Lösung in Tris-Puffer wird 5 min lang bei verschiedenen Flussraten (5 $\mu\text{l}/\text{min}$; 10 $\mu\text{l}/\text{min}$; 20 $\mu\text{l}/\text{min}$; 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) injiziert. Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgt durch einminütige Injektionen von 50 mM NaOH und 10 mM Glycin-HCl, pH 1.5.

6.5.4 Bindungsexperimente mit PKA/Kreatinkinase (CM5-Chip)

Proteinkinase A, katalytische UE

Die Enzymstammlösung ($c \sim 1.195 \mu\text{M}$) wird mit Tris-Puffer auf verschiedene Konzentrationen (12 nM - 120 nM) verdünnt und jeweils 3 min bei einer Flussrate von $30 \mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgt durch einminütige Injektionen von 0.1 M Arginin.

Kreatinkinase

Eine $4 \mu\text{M}$ Enzymstammlösung wird mit Tris-HCl Laufpuffer verdünnt (12.5 nM - 400 nM) und 5 min bei einer Flussrate von $20 \mu\text{l}/\text{min}$ injiziert.

Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgt durch einminütige Injektionen von 50 mM NaOH und 10 mM Glycin-HCl, pH 1.5.

Kompetition in Lösung: PKA und H-9 bzw. ATP

Eine 24 nM PKA-Lösung^r wird jeweils 15 min mit verschiedenen Konzentrationen ATP (25 nM - $64 \mu\text{M}$) oder Inhibitor H-9 (19 nM - $1.9 \mu\text{M}$) inkubiert und dann injiziert (2 min bei einer Flussrate von $20 \mu\text{l}/\text{min}$, Tris-HCl). Die Chipoberfläche wird nach jedem Durchgang mit 0.1 M Arginin regeneriert.

Kompetition in Lösung: Vergleich H-9 und Derivate

Die inhibitorische Effizienz von **H-9** und einigen Derivaten (**12**, **16**, **20** und **21**) wird verglichen, indem eine PKA-Lösung mit 10 oder 100 Äquivalenten der entsprechenden Verbindung für 15 min inkubiert wird und das Gemisch dann in die Messzelle injiziert wird (2 min bei einer Flussrate von $20 \mu\text{l}/\text{min}$, Tris-HCl, Proteinkonzentration der Injektionslösung 30 nM). Aufgrund von Löslichkeitsproblemen müssen die Inhibitorderivate in DMSO gelöst werden. Deshalb enthalten die Enzym-Inhibitor-Gemische 2.5 % (v/v) DMSO. Eine entsprechende Menge DMSO wurde auch den reinen Enzymproben zugefügt.

^rDie Konzentrationsangaben beziehen sich auf die fertige Injektionslösung, d. h. nach Mischen aller Komponenten.

Die Regeneration der Sensorchip-Oberfläche erfolgt durch einminütiges Spülen mit 50 mM NaOH.

6.5.5 Immobilisierung von **52** bzw. **H-9** auf dem Sensorchip **CM5**

Immobilisierung von **52**

Die Immobilisierung von **52** wird mit HBS-EP-Puffer als Laufpuffer bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Die Aktivierung von Mess- und Referenzflusszelle erfolgt analog der Immobilisierung von **12** durch EDC/NHS (7 min, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$). Dann wird eine 0.2 mM Lösung von **52** in HBS-EP-Puffer für 6 min in die Messzelle injiziert. Anschließend werden beide Flusszellen mit Ethanolamin deaktiviert. Auf diese Weise wird ein Immobilisierungsniveau von 80 RU erreicht.

Immobilisierung von **H-9**

Die Immobilisierung erfolgt wie für **52** beschrieben, jedoch mit einer 0.2 mM Lösung von **H-9** in HBS-EP-Puffer; es werden etwa 44 RU immobilisiert.

6.5.6 Bindungsexperimente mit PKA an immobilisiertem **52** bzw. **H-9**

Es werden verschieden konzentrierte PKA-Lösungen bei einem Fluss von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 3 min injiziert, als Laufpuffer dient entweder Tris-HCl oder HEPES-Puffer.

6.6 Photoaffinitätsmarkierung

Allgemeines Vorgehen:

Die Proteine werden mit der Sonde **1** in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, pH = 7.3, 10 mM MgCl_2 , 50 nM PMSF) ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die kovalente Verknüpfung wird anschließend durch 30-minütige Bestrahlung der gekühlten Proben in einer kontinuierlichen Photoreaktion mit UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) erreicht.

Anschließend werden die Proteinproben mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (s. u.).

Die Gele werden zunächst mit einem Typhoon Fluoreszenzscanner visualisiert. Dies kann entweder vor oder nach der Fixierung des Gels geschehen, allerdings sollte die Handhabung einheitlich sein, da die Fluoreszenzintensität durch pH-Wert-Änderungen beeinflusst wird. Anschließend werden die Gele einer Silberfärbung (s. u.) unterzogen.

Vergleich der Photoaffinitätsmarkierung von nativer Kreatinkinase und SDS-denaturierter Kreatinkinase

Es werden zwei Proben vorbereitet, die beide je 10 μl Kreatinkinaselösung (5 mg/ml; $c = 62 \mu\text{M}$) und 10 μl einer 610 μM Lösung von **1** (10-facher Überschuss) enthalten. Eine Probe wird zusätzlich mit 30 μl einer 20 %igen SDS-Lösung versetzt. Beide Proben werden mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 μl verdünnt.^s

6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

6.7.1 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli^[174]

Zur Gelherstellung werden die mit Ethanol gereinigten Glasplatten zusammengesetzt und in die Gelgießapparatur eingespannt. Es wird soviel Trenngellösung blasenfrei in den Zwischenraum pipettiert, dass ca. 1.5 cm nach oben hin frei bleiben, dann wird mit 2-Propanol überschichtet. Wenn die Polymerisation erfolgt ist, wird das 2-Propanol entfernt und die Sammelgellösung bis zur Glaskante eingefüllt. Es wird unverzüglich ein Probenkamm (10 Taschen à 20 μl) blasenfrei eingesetzt. Zur vollständigen Polymerisation wird das Gel in feuchte Tücher eingeschlagen und in einem Folienbeutel über Nacht bei 4 °C gehalten.

^s Als Standard wurde Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color (10-250 kD) (BIO-RAD) verwendet.

für 2 Gele (à 7.3 · 8.3 cm)	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Wasser	4.1 ml	2.89 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1.26 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2.5 ml	0.5 ml
TEMED	5 µl	5 µl
1.5 % APS (Polymerisationsstarter)	0.8 ml	0.3 ml

Für die Elektrophorese wird das Gel nach Entfernen des Kammes in die Apparatur eingespannt, dann wird diese mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Probenaschen mit Puffer gespült. Die Proteinproben werden vor dem Auftragen mit 3-fach Probenpuffer im Verhältnis 3:1 (Protein:Probenpuffer) versetzt und mindestens 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese wird erst 5 min bei 60 V durchgeführt, um die Proben in den Probenaschen zu konzentrieren. Dann folgen 15 min bei 100 V, in denen die Proben das Sammelgel durchlaufen. Die Auftrennung erfolgt anschließend bei 200 V.

6.7.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)^[175]

Das Proteingemisch wird in soviel Rehydratisierungspuffer aufgenommen, dass das für die Striplänge erforderliche Gesamtvolumen (für 7 cm = 125 µl) erreicht wird.^{†[175]} Die Lösung wird in eine Vertiefung einer Fokussierungsschale entsprechender Länge pipettiert, dabei sollte an jedem Ende 1 cm frei bleiben. Ein von der Schutzfolie befreiter IPG-Strip wird mit der Gelseite nach unten möglichst blasenfrei auf der Lösung platziert und anschließend mit Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Fokussierungsschale wird in der auf 20 °C temperierten PROTEAN IEF Cell platziert, und es wird 12 h lang aktiv rehydratisiert (d.h. es liegt eine geringe Spannung an (50 V), um die Diffusion der

[†]Die Rehydratisierung der IPG-Strips sowie die anschließende isoelektrische Fokussierung wurden entsprechend der Protokolle im *ReadyStrip™ IPG Strip Instruction Manual* von Bio-Rad durchgeführt (Rehydratisierung: Method 2).

Proteine in den Gelstreifen zu erleichtern). Anschließend erfolgt die Fokussierung unter den im Handbuch für 7 cm-Strips angegebenen Bedingungen (0 V - 4000 V; 10000 V-hr; *rapid ramp*).

Nach beendeter Fokussierung wird der Strip vom Mineralöl befreit, in dem er zwischen zwei angefeuchteten Filter- oder Blottingpapieren platziert und vorsichtig angedrückt wird. Anschließend kann der Strip entweder in Folie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden oder direkt für die zweite Dimension vorbereitet werden.

2. Dimension: SDS-PAGE

Herstellung des Gels

Die Gelherstellung erfolgt wie oben beschrieben, allerdings wird kein Sammelgel verwendet. Die Trenngelösung wird bis ca. 0.5 cm unterhalb des Randes einpipettiert und mit 2-Propanol überschichtet.¹⁴ Nach der Polymerisation wird das 2-Propanol entfernt, der Freiraum mit Wasser gespült und das Gel in feuchten Tüchern in einem Folienbeutel über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Benutzung wird im Freiraum verbliebenes Wasser entfernt.

Äquilibrieren des Strips

Der IPG-Strip wird mit der Gelseite nach oben in einer Vertiefung einer trockenen Äquilibrierungsschale platziert, mit 2.5 ml Äquilibrierungspuffer I versetzt und 10 min langsam geschüttelt. Anschließend wird der Puffer I vollständig dekantiert, der Strip mit 2.5 ml Äquilibrierungspuffer II versetzt und erneut 10 min geschüttelt.

Elektrophorese

Der Strip wird kurz in Elektrophoresepuffer getaucht und dann mit der Gelseite nach oben auf die hintere, überstehende Glasplatte des Gels platziert. Das Gel selbst wird mit etwas aufgekochter Agarose-Lösung überschichtet, dann wird der Strip mit Hilfe einer Pinzette soweit zwischen die Glasplatten geschoben, dass er das Gel berührt. Die Agarose dient zur Fixierung des Strips und das enthaltene Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Lauf-front.

¹⁴ Alternativ kann ein Kamm eingesetzt werden, der eine Aussparung für einen Markerstandard sowie eine große Tasche für den IPG-Strip aufweist.

Nach dem Festwerden der Agarose wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die Elektrophorese wird erst 5 min bei 60 V durchgeführt, gefolgt von 15 min bei 100 V, um die Proteine aus dem Strip in das Gel zu transferieren. Die Auftrennung erfolgt anschließend bei 200 V.

6.7.3 Silberfärbung^[176]

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel bzw. der IPG-Strip entfernt und das Trenngel wird 20 min in Fixierer geschwenkt. Nach zweimaligem, jeweils 10-minütigem Waschen mit Wasser erfolgt die Färbung. Dazu wird ein Gemisch aus 5 ml Silberkomplex-Lösung, 5 ml Moderator und 5 ml Entwickler in 35 ml Wasser zu 50 ml Beschleunigerlösung gegeben und das Gel hinzugefügt. Das Gel wird solange entwickelt, bis die Banden die gewünschte Intensität aufweisen. Der Entwicklungsprozess wird durch Überführen des Gels in Stopplösung beendet.

7 Literaturverzeichnis

- [1] J.C. Venter *et al.*, „The sequence of the human genome“, *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [2] S. Nock, P. Wagner, „Proteomics: Die post-genomische Revolution“, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, *34*, 348-354.
- [3] M. Tyers, M. Mann, „From genomics to proteomics“, *Nature* **2003**, *422*, 193-197.
- [4] S.P. Gygi, Y. Rochon, B.R. Franza, R. Aebersold, „Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast“, *Mol. Cell. Biology* **1999**, *19*, 1720-1730.
- [5] L. Anderson, J. Seilhamer, „A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver“, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 533-537.
- [6] S. Fields, „Proteomics: Proteomics in genomeland“, *Science* **2001**, *291*, 1221-1224.
- [7] G. Chambers, L. Lawrie, P. Cash, G.I. Murray, „Proteomics: a new approach to the study of disease“, *J. Pathol.* **2000**, *192*, 280-288.
- [8] S.A. Johnson, T. Hunter, „Kinomics: methods for deciphering the kinome“, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 17-25.
- [9] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1996**.
- [10] P. Cohen, „Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century?“, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 309-315.
- [11] V.C. Wasinger, S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, I. Humphery-Smith, „Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*“, *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1090-1094.
- [12] Y. Dharmadi, R. Gonzalez, „DNA Microarrays: Experimental Issues, Data Analysis, and Application to Bacterial Systems“, *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1309-1324.
- [13] F. Lottspeich, „Proteomanalyse – ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen“, *Angew. Chemie* **1999**, *111*, 2630-2647; „Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2476-2492.
- [14] P.H. O’Farrell, „High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins“, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-4021.

- [15] A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn, „Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics“, *Proteomics* **2004**, *4*, 3665-3685.
- [16] a) C. Hoogland, K. Mostaguir, J.-C. Sanchez, D.F. Hochstrasser, R.D. Appel, “SWISS-2DPAGE, ten years later”, *Proteomics* **2004**, *4*, 2352-2356.
- b) L. Tonella, B.J. Walsh, J.-C. Sanchez, K. Ou, M.R. Wilkins, M. Tyler, S. Frutiger, A.A. Gooley, I. Pescaru, R.D. Appel, J.X. Yan, A. Bairoch, C. Hoogland, F.S. Morch, G.J. Hughes, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, „'98 Escherichia coli SWISS-2DPAGE database update”, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1960-1971.
- c) <http://www.expasy.ch/cgi-bin/map2/def?ECOLI>
- [17] a) J.X. Yan, A.T. Devenish, R. Wait, T. Stone, S. Lewis, S. Fowler, „Fluorescence 2-D difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of E. coli“, *Proteomics* **2002**, *2*, 1682-1698.
- b) <http://www.expasy.ch/cgi-bin/map2/noid?ECOLI5-6>
- [18] T. Rabilloud (Ed.), “Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods”, Springer, Berlin, Heidelberg, **2000**.
- [19] M. Ünlü, M.E. Morgan, J.S. Minden, „Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts“, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2071-2077.
- [20] S. Gharbi, P. Gaffney, A. Yang, M.J. Zvelebil, R. Cramer, M.D. Waterfield, J.F. Timms, „Evaluation of Two-dimensional Differential Gel Electrophoresis for Proteomic Expression Analysis of a Model Breast Cancer Cell System“, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 91-98.
- [21] A. Görg, W. Postel, S. Günther, „Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients“, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 531-546.
- [22] S.P. Gygi, G.L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, R. Aebersold, „Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9390-9395.
- [23] V. Santoni, M. Molloy, T. Rabilloud, „Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?“, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1054-1070.
- [24] A.J. Link, J. Eng, D.M. Schieltz, E. Carmack, G.J. Mize, D.R. Morris, B.M. Garvik, J.R. Yates III., „Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry“, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 676-682.
- [25] M.P. Washburn, D. Wolters, J.R. Yates III., „Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology“, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242-247.
- [26] W.H. McDonald, R. Ohi, D.T. Miyamoto, T.J. Mitchison, J.R. Yates III., „Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of

- proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT“, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 245-251.
- [27] S.P. Gygi, B. Rist, T.J. Griffin, J. Eng, R. Aebersold, „Proteome Analysis of Low-Abundance Proteins Using Multidimensional Chromatography and Isotope-Coded Affinity Tags“, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 47-54.
- [28] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, „Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags“, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999.
- [29] M. Smolka, H. Zhou, R. Aebersold, „Quantitative Protein Profiling Using Two-dimensional Gel Electrophoresis, Isotope-coded Affinity Tag Labeling, and Mass Spectrometry“, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 19-29.
- [30] H. Zhou, J.A. Ranish, J.D. Watts, R. Aebersold, „Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry“, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *19*, 512-515.
- [31] K.C. Hansen, G. Schmitt-Ulms, R.J. Chalkley, J. Hirsch, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame, „Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ¹³C-Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography“, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 299-314.
- [32] J. Li, H. Steen, S.P. Gygi, „Protein Profiling with Cleavable Isotope-coded Affinity Tag (cICAT) Reagents“, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1198-1204.
- [33] S.A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M.W. Kirschner, S.P. Gygi, „Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6940-6945.
- [34] P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D.J. Pappin, „Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents“, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154-1169.
- [35] D. Kidd, Y. Liu, B.F. Cravatt, „Profiling Serine Hydrolase Activities in Complex Proteomes“, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005-4015.
- [36] Y.Liu, M.P. Patricelli, B.F. Cravatt, „Activity-based protein profiling: the serine hydrolases“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694-14699.
- [37] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B.F. Cravatt, „Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer invasiveness“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10335-10340.
- [38] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B.F. Cravatt, „Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000-10005.

- [39] D. Greenbaum, K.F. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, „Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools“, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569-581.
- [40] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K.F. Medzihradzky, M. Bogyo, „Chemical approaches for functionally probing the proteome“, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 60-68.
- [41] G.C. Adam, E.J. Sorensen, B.F. Cravatt, „Trifunctional Chemical Probes for the Consolidated Detection and Identification of Enzyme Activities from Complex Proteomes“, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 828-835.
- [42] G.C. Adam, B.F. Cravatt, E.J. Sorensen, „Profiling the specific reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes“, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 81-95.
- [43] G.C. Adam, E.J. Sorensen, B.F. Cravatt, „Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype“, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805-809.
- [44] A.E. Speers, B.F. Cravatt, „Chemical Strategies for Activity-Based Proteomics“, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41-47.
- [45] E. Saxon, C.R. Bertozzi, „Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction“, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [46] J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, „Chemistry in living systems“, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [47] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, „The growing impact of click chemistry on drug discovery“, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [48] N.J. Agard, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, „A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems“, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [49] P.F. van Swieten, M.A. Leeuwenburgh, B.M. Keßler, H.S. Overkleeft, „Bioorthogonal organic chemistry in living cells: novel strategies for labeling biomolecules“, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 20-27.
- [50] R. Huisgen, „1,3-Dipolar cycloadditions“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- [51] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, „Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [52] W.G. Lewis, L.G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, K.B. Sharpless, „Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 1053-1057.
- [53] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, „A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599.

- [54] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, „Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition“, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [55] A.E. Speers, G.C. Adam, B.F. Cravatt, „Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition“, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687.
- [56] A.E. Speers, B.F. Cravatt, „Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods“, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [57] H. Ovaa, P.F. v. Swieten, B.M. Kessler, M.A. Leeuwenburgh, E. Fiebigler, A.M.C.H. v.d. Nieuwendijk, P.J. Galardy, G.A.V.D. Marel, H.L. Ploegh, H.S. Overkleeft, „Chemistry in Living Cells: Detection of Active Proteasomes by a Two-Step Labeling Strategy“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *115*, 3626-3629.
- [58] D.A. Jeffrey, M. Bogyo, „Chemical proteomics and its application to drug discovery“, *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 87-95.
- [59] M.P. Patricelli, D.K. Giang, L.M. Stamp, J.L. Burbaum, „Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes“, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067-1071.
- [60] S. Kumar, B. Zhou, F. Liang, W.-Q. Wang, Z. Huang, Z.-Y. Zhang, „Activity-based probes for protein tyrosine phosphatases“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7943-7948.
- [61] L.-C. Lo, T.-L. Pang, C.-H. Kuo, Y.-L. Chiang, H.-Y. Wang, J.-J. Lin, „Design and Synthesis of Class-Selective Activity Probes for Protein Tyrosine Phosphatases“, *J. Proteome Research* **2002**, *1*, 35-40.
- [62] Q. Zhu, X. Huang, G.Y.J. Chen, S.Q. Yao, „Activity-based fluorescent probes that target phosphatases“, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 2669–2672.
- [63] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, L. Moroder, „Substrate/pro-peptide-derived endo-epoxysuccinyl peptides as highly potent and selective cathepsin B inhibitors“, *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 80-82.
- [64] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, Th. Laßleben, C.P. Sommerhoff, L. Moroder, W. Machleidt, „Epoxy succinyl peptide-derived affinity labels for cathepsin B“, *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 91-96.
- [65] M. Bogyo, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, D. Greenbaum, „Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs“, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 27-38.
- [66] T. Nazif, M. Bogyo, „Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2967-2972.
- [67] G. Wang, U. Mahesh, G.Y.J. Chen, S.Q. Yao, „Solid-Phase Synthesis of Peptide Vinyl Sulfones as Potential Inhibitors and Activity-Based Probes of Cysteine Proteases“, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 737-740.

- [68] N.A. Thornberry, E.P. Peterson, J.J. Zhao, A.D. Howard, P.R. Griffin, K.T. Chapman, „Inactivation of Interleukin-1 β Converting Enzyme by Peptide (Acyl-oxy)methyl Ketones“, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3934-3940.
- [69] L. Faleiro, R. Kobayashi, H. Fearnhead, Y. Lazebnik, „Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells“, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2271-2281.
- [70] D. Kato, K.M. Boatright, A.B. Berger, T. Nazif, G. Blum, C. Ryan, K.A.H. Chehade, G.S. Salvesen, M. Bogoy, „Activity-based probes that target diverse cysteine protease families“, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 33-38.
- [71] N. Winssinger, S. Ficarro, P.G. Schultz, J.L. Harris, „Profiling protein function with small molecule microarrays“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139-11144.
- [72] M.L. Liao, R.C. Panicker, S.Q. Yao, „Design and synthesis of an affinity probe that targets caspases in proteomic experiments“, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 1043-1046.
- [73] M. Bogoy, S. Shin, J.S. McMaster, H.L. Ploegh, „Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes“, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 307-320.
- [74] I. Štern, N. Schaschke, L. Moroder, D. Turk, „Crystal structure of NS-134 in complex with bovine cathepsin B: a two-headed epoxysuccinyl inhibitor extends along the entire active-site cleft“, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 511-517.
- [75] S.H.L. Verhelst, M. Bogoy, „Dissecting Protein Function Using Chemical Proteomic Methods“, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 261-269.
- [76] C.-S. Tsai, Y.-K. Li, L.-C. Lo, „Design and Synthesis of Activity Probes for Glycosidases“, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3607-3610.
- [77] Q. Zhu, A. Girish, S. Chattopadhyaya, S.Q. Yao, „Developing novel activity-based fluorescent probes that target different classes of proteases“, *Chem. Comm.* **2004**, *13*, 1512-1513.
- [78] a) H. Bayley, J.R. Knowles, „Photoaffinity Labeling“, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69-114. b) V. Chowdry, F.H. Westheimer, „Photoaffinity labeling of biological systems“, *Ann. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 293-325.
- [79] Y.-M. Li, M. Xu, M.-T. Lai, Q. Huang, J.L. Castro, J. Dimuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J.G. Neduelil, R.B. Register, M.K. Sardana, M.S. Shearman, A.L. Smith, X.-P. Shi, K.-C. Yin, J.A. Shafer, S.J. Gardell, „Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1“, *Nature* **2000**, *405*, 689-694.
- [80] K. Jenssen, „Peptide und peptidomimetische Verbindungen als Werkzeuge in der Proteomanalyse“, Dissertation, Universität Bielefeld, **2004**.
- [81] E.W.S. Chan, S. Chattopadhyaya, R.C. Panicker, X. Huang, S.Q. Yao, „Developing Photoactive Affinity Probes for Proteomic Profiling: Hydroxamat-based Probes for Metalloproteases“, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14435-14446.

- [82] S. Chattopadhyaya, E.W.S. Chan, S.Q. Yao, „An affinity-based probe for the proteomic profiling of aspartic proteases“, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4053-4056.
- [83] L. Ballell, K.J. Alink, M. Slijper, C. Versluis, R.M.J. Liskamp, R.J. Pieters, „A New Chemical Probe for Proteomics of Carbohydrate-Binding Proteins“, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 291-295.
- [84] J.R. Freije, R. Bischoff, „Activity-based enrichment of matrix metalloproteinases using reversible inhibitors as affinity ligands“, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 155-169.
- [85] G.Lolli, F. Thaler, B. Valsasina, F. Roletto, S. Knapp, M. Uggeri, A. Bachi, V. Matafora, P. Storici, A. Stewart, H.M. Kalisz, A. Isacchi, „Inhibitor affinity chromatography: Profiling the specific reactivity of the proteome with immobilized molecules“, *Proteomics* **2003**, *3*, 1287-1298.
- [86] H. Daub, K. Godl, B. Klebl, G. Müller, „Evaluation of Kinase Inhibitor Selectivity by Chemical Proteomics“, *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, *2*, 215-224.
- [87] J. Wissing, K. Godl, D. Brehmer, S. Blencke, M. Weber, P. Habenberger, M. Steingerlach, A. Missio, M. Cotten, S. Müller, H. Daub, „Chemical Proteomic Analysis Reveals Alternative Modes of Action for Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine Kinase Inhibitors“, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1181-1193.
- [88] D. Brehmer, K. Godl, B. Zech, J. Wissing, H. Daub, „Proteome-wide identification of cellular targets affected by bisindolylmaleimide-type protein kinase C inhibitors“, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 490–500.
- [89] D. Brehmer, Z. Greff, K. Godl, S. Blencke, A. Kurtenbach, M. Weber, S. Müller, B. Klebl, M. Cotten, G. Kéri, J. Wissing, H. Daub, „Cellular Targets of Gefitinib“, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 379-382.
- [90] K. Jenssen, K. Sewald, N. Sewald, „Synthesis of Marimastat and a Marimastat Conjugate for Affinity Chromatography and Surface Plasmon Resonance Studies“, *Bioconj. Chem.* **2004**, *15*, 594-600.
- [91] M. Bogyo, J.S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A.L. Goldberg, H. Ploegh, „Covalent modification of the active site threonine of proteasomal subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6629–6634.
- [92] S.K. Hanks, A.M. Quinn, T. Hunter, „The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains“, *Science* **1988**, *241*, 42-52.
- [93] S.J. Beebe, J.D. Corbin, „Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases“, in P.D. Boyer, E.G. Krebs, Eds., „The Enzymes“, 3rd Ed., Vol. XVII, Academic Press, London **1986**, 43-109.
- [94] S.S. Taylor, J.A. Buechler, W. Yonemoto, „cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes“, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 971-1005.

- [95] K. Taskén et al., „PKA: cAMPdependent protein kinase (vertebrates)“. In: G. Hardie, S. Hanks, Eds., „The Protein Kinase Facts Book: Protein-Serine Kinases“, Academic Press, London **1995**, 58-63.
- [96] a) D.R. Knighton, J. Zheng, L.F. ten Eyck, V.A. Ashford, N.-H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, „Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase“, *Science* **1991**, *253*, 407-414.
- b) D.R. Knighton, J. Zheng, L.F. ten Eyck, V.A. Ashford, N.-H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, „Structure of a Peptide Inhibitor Bound to the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase“, *Science* **1991**, *253*, 414-424.
- [97] J. Zheng, D.R. Knighton, L.F. ten Eyck, R. Karlsson, N. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, „Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2154-2161.
- [98] N. Narayana, S. Cox, S. Shaltiel, S.S. Taylor, N. Xuong, „Crystal Structure of a Poly-histidine-Tagged Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with the Peptide Inhibitor PKI(5-24) and Adenosine“, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4438-4448.
- [99] A. Krupa, N. Srinivasan, „The repertoire of protein kinases encoded in the draft version of the human genome: atypical variations and uncommon domain combinations“, *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0066.1-0066.14.
- [100] L. Wong, P.A. Jennings, J.A. Adams, „Communication Pathways between the Nucleotide Pocket and Distal Regulatory Sites in Protein Kinases“, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 304-311.
- [101] H. Hidaka, M. Inagaki, S. Kawamoto, Y. Sasaki, „Isoquinolinesulfonamides, Novel and Potent Inhibitors of Cyclic Nucleotide Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C“, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5036-5041.
- [102] K. Garber, „The second wave in kinase cancer drugs“, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 127-130.
- [103] Homepage der US Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>).
- [104] P. Cohen, „Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century?“, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 309-315.
- [105] Z.A.Knight, K.M. Shokat, „Features of Selective Kinase Inhibitors“, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 621-637.
- [106] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, „Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors“, *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95-105.
- [107] C. García-Echeverría, P. Traxler, D.B. Evans, „ATP Site-Directed Competitive and Irreversible Inhibitors of Protein Kinases“, *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 28-57.

- [108] A.J. Bridges, „Chemical Inhibitors of Protein Kinases“, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541-2571.
- [109] P.M. Fischer, „The Design of Drug Candidate Molecules as Selective Inhibitors of Therapeutically Relevant Protein Kinases“, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1563-1583.
- [110] N. Ono-Saito, I. Niki, H. Hidaka, „H-Series Protein Kinase Inhibitors and Potential Clinical Applications“, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 123-131.
- [111] R. Xu, G. Carmel, J. Kuret, X. Cheng, „Structural basis for selectivity of the isoquinoline sulfonamide family of protein kinase inhibitors“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6308-6313.
- [112] R.A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Hubert, D. Bossemeyer, „Crystal Structure of Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in Complex with Isoquinolinesulfonyl Protein Kinase Inhibitors H7, H8, and H89“, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26157-26164.
- [113] A. Otto, „Wechselwirkung elektromagnetischer Oberflächenwellen“, *Z. angew. Phys.* **1969**, *27*, 207-209.
- [114] J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, „Surface plasmon resonance sensors: review“, *Sens. Actuators B* **1999**, *54*, 3-15.
- [115] A. Otto, „Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection“, *Z. Phys.* **1968**, *216*, 398-410.
- [116] E. Kretschmann, H. Raether, „Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light“, *Z. Naturforsch.* **1968**, *23A*, 2135-2136.
- [117] E. Kretschmann, „Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen“, *Z. Phys.* **1971**, *241*, 313-324.
- [118] Biacore Technology Note 1 (BR-9001-15), „Surface plasmon resonance“, **2001**.
- [119] J. Homola, „Present and future of surface plasmon resonance biosensors“, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528-539.
- [120] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lindt, „Gas detection by means of surface plasmon resonance“, *Sens. Actuators* **1982/83**, *3*, 79-88.
- [121] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, „Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing“, *Sens. Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
- [122] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, „Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins“, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513-526.
- [123] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, „Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started“, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, i-ix.
- [124] BIAtchnology Handbook (BR-1001-84), BIACORE AB, Uppsala, Schweden, **1998**.

- [125] S. Löfås, B. Johnsson, „A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands“, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1526-1528.
- [126] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, „Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance“, *Sens. Actuators B* **1993**, *11*, 63-72.
- [127] B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, Å. Edström, R.M. Müller Hillgren, A. Hansson, „Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies“, *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 125-131.
- [128] L. Nieba, S.E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, Å. Frostell Karlsson, A. Plückthun, „BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins Using a Chelating NTA Sensor Chip“, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217-228.
- [129] H. Mozsolits, M.-I. Aguilar, „Surface Plasmon Resonance Spectroscopy: An Emerging Tool for the Study of Peptide-Membrane Interactions“, *Biopolymers* **2002**, *66*, 3-18.
- [130] R.L. Rich, D.G. Myszka, „Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis“, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54-61.
- [131] D. Nedelkov, R.W. Nelson, „Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks“, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 301-305.
- [132] R.J. Green, R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, „Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials“, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1823-1835.
- [133] J.M. McDonnell, „Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition“, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 572-577.
- [134] I. Singh, E.R. Thornton, F.H. Westheimer, „The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin“, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006-3008.
- [135] H. Bayley, J.R. Knowles, „Photoaffinity Labeling“, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69-114.
- [136] G. Dorman, G.D. Prestwich, „Using photolabile ligands in drug discovery and development“, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64-77.
- [137] F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goellner, „Neue Entwicklungen bei der Photoaffinitätsmarkierung“, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1391-1408.
- [138] V. Chowdry, R. Vaughan, F.H. Westheimer, „2-Diazo-3,3,3-trifluoropropionyl chloride: Reagent for photoaffinity labeling“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1406-1408.
- [139] S.A. Fleming, „Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling“, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520.

- [140] P.J.A. Weber, A.G. Beck-Sickinger, „Comparison of the photochemical behavior of four different photoactivatable ptobes“, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 375-383.
- [141] G. Dormán, G.D. Prestwich, „Benzophenone photophores in biochemistry“, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [142] J.C. Kauer, S. Erickson-Viitanen, H.R.J. Wolfe, W.F. DeGrado, „*p*-Benzoyl-L-phenylalanine, A New Photoreactive Amino Acid“, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10695-10699.
- [143] M. Hagenstein, Diplomarbeit, „Proteinkinaseinhibitoren als Werkzeuge in der funktionellen Proteomik“, Universität Bielefeld **2001**.
- [144] C. Wojczewski, K. Schwarzer, J.W. Engels, „Synthesis of 3'-Deoxythymidine 5'-Triphosphates by Regioselective Thionation and Their Use as Chain Terminators in DNA Sequencing“, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1268-1277.
- [145] L. Bonsignore, F. Cottiglia, S.M. Lavagna, G. Loy, D. Secci, „Synthesis of Coumarin-3-*O*-acylisoureas by Different Carbodiimides“, *Heterocycles* **1999**, *50*, 469-478.
- [146] J.E. Sheppeck II, H. Kar, H. Hong, „A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution“, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329-5333.
- [147] H.M. Eppenberger, D.M. Dawson, N.O. Kaplan, „The Comparative Enzymology of Creatine Kinases: I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION FROM CHICKEN AND RABBIT TISSUES“, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 204-209.
- [148] D.M. Dawson, H.M. Eppenberger, N.O. Kaplan, „The Comparative Enzymology of Creatine Kinases: II. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES“, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 210-217.
- [149] J.E. Adams III, D.R. Abendschein, A.S. Jaffe, „Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990's?“, *Circulation* **1993**, *88*, 750-763.
- [150] R.M. Payne, R.C. Haas, A. Strauss, „Structural characterization and tissue-specific expression of the mRNAs encoding isoenzymes from two rat mitochondrial creatine kinase genes“, *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1089*, 352-361.
- [151] A. Chilkoti, P.S. Stayton, „Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics“, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10622-10628.
- [152] Biacore, BIAevaluation Software Handbook“, edition April 2003 (version AE), Schweden **2003**.
- [153] G. Scatchard, „The attractions of proteins for small molecules and ions“, *Ann. NY Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-672.
- [154] M.C. Hagenstein, J.H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, „Affinitätsbasierte Markierung von Proteinfamilien mit reversiblen Inhibitoren – ein Konzept für die funktionelle Proteomik“, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5793-5796; „Affinity-Based Tagging of Protein Families with Reversible Inhibi-

- tors: A Concept for Functional Proteomics“, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5635-5638.
- [155] J. F. Allen, J. Bennett, K. E. Steinback, C. J. Arntzen, *Nature* **1981**, *291*, 25-29.
- [156] Ishak, I. R. White, P. A. Millner, *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *20*, 8S.
- [157] J.E. Maul, J.W. Lilly, L. Cui, C.W. dePamphilis, W. Miller, E.H. Harris, D.B. Stern, „The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats“, *Plant Cell* **2002**, *14*, 2659-2679.
- [158] A. Brockhinke, „Laser Diagnostic Methods in Physical Chemistry: Modern methods to study fast chemical reactions and to track conformational changes in molecules“, Habilitationsschrift, Universität Bielefeld, **2003**.
- [159] D. Redmore, F.T. Welge (Petrolite Corporation), „Amino-phosphonic-sulfonic acids“, US Patent 4085134, **1978**.
(<http://www.freepatentsonline.com/4085134.html>)
- [160] I. Zeid, I.I. Ismail, H. Abd El-Bary, „Reactions with Propanesultone (1,3).II“, *Egypt. J. Chem.* **1987**, *30*, 321-325.
- [161] I.A. Nash, B.W. Bycroft, W.C. Chan, „Dde - A Selective Primary Amine Protecting Group: A Facile Solid Phase Synthetic Approach To Polyamine Conjugates“, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625-2628.
- [162] M. Inagaki, M. Watanabe, H. Hidaka, „N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a Newly Synthesized Protein Kinase Inhibitor, Functions as a Ligand in Affinity Chromatography“, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2922-2925.
- [163] C.M. Marson, J.H. Pink, C. Smith, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik, „A biomimetic synthesis of the pyrrolizidine ring by sequential intramolecular cyclizations“, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 127-129.
- [164] R.A. Ellison, E.R. Lukenbach, C.-W. Chiu, „Cyclopentenone synthesis via aldol condensation. Synthesis of a key prostaglandin intermediate“, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 499-502.
- [165] F. Huet, A. Lechevalier, M. Pellet, J.M. Conia, „Wet Silica Gel ; A Convenient Reagent for Deacetalization“, *Synthesis* **1978**, 63-65.
- [166] E.J. Corey, J.W. Suggs, „Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds“, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647-2650.
- [167] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Y. Kanaoka, „A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine“, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1367-1373.
- [168] S.W. Jeong, D.F. O'Brien, „Synthesis of a Polymerizable Metal-Ion-Chelating Lipid for Fluid Bilayers“, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4799-4802.

- [169] J.V. Staros, H. Bayley, D.N. Standring, J.R. Knowles, „Reduction of aryl azides by thiols: Implications for the use of photoaffinity reagents“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568-572.
- [170] H. Bayley, D.N. Standring, J.R. Knowles, „Propane-1,3-dithiol: A selective reagent for the efficient reduction of alkyl and aryl azides to amines“, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633-3634.
- [171] A. Morikawa, T. Sone, T. Asano, „5-Isoquinolinesulfonamide Derivatives. 1. Synthesis and Vasodilatory Activity of *N*-(2-Guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide Derivatives“, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 42-46.
- [172] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Y. Kanaoka, „A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine“, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1367-1373.
- [173] S.W. Jeong, D.F. O'Brien, „Synthesis of a Polymerizable Metal-Ion-Chelating Lipid for Fluid Bilayers“, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4799-4802.
- [174] U.K. Laemmli, „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [175] Bio-Rad Laboratories Inc., „ReadyStrip™ IPG Strip Instruction Manual“, Katalognr. 163-2099.
- [176] C.R. Merrill, D. Goldman, S.A. Sedman, M.H. Ebert, „Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins“, *Science* **1981**, *211*, 1437-1438.

„Der frühe Vogel fängt den Wurm,
aber erst die zweite Maus bekommt den Käse.“