

Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide zur Evaluierung von Lipiddynamiken *in vivo*.

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Tim Walter

aus Nürnberg

Würzburg 2018



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2012 bis September 2017 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Jürgen Seibel angefertigt.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

L. Collenburg, T. Walter, A. Burgert, N. Müller, J. Seibel, L. Japtok, B. Kleuser, M. Sauer, S. Schneider-Schaulies, „A Functionalized Sphingolipid Analogue for Studying Redistribution during Activation in Living T Cells“, *J Immunol* **2016**, *196*, 3951-3962.

T. Walter, L. Collenburg, L. Japtok, B. Kleuser, S. Schneider-Schaulies, N. Müller, J. Becam, A. Schubert-Unkmeir, J. N. Kong, E. Bieberich, J. Seibel, „Incorporation and visualization of azido-functionalized N-oleoyl serinol in Jurkat cells, mouse brain astrocytes, 3T3 fibroblasts and human brain microvascular endothelial cells“, *Chemical communications* **2016**, *52*, 8612-8614.

T. Walter, J. Schlegel, A. Burgert, A. Kurz, J. Seibel, M. Sauer, „Incorporation studies of clickable ceramides in Jurkat cell plasma membranes“, *Chemical communications* **2017**, *55*, 6836-6839

J. Becam, T. Walter, A. Burgert, J. Schlegel, M. Sauer, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, “Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*”, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 17627.

Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Jürgen Seibel für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit. Für die gute Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch danke ich auch allen Kooperationspartnern.

Meiner Arbeitsgruppe, allen voran meinen geschätzten Mitdoktoranden möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft sowie die unterhaltsame und gute Zusammenarbeit Danke sagen. Auch den Azubis und meinen Praktikanten möchte ich an dieser Stelle für die hilfreiche praktische Unterstützung im Labor danken. Ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken möchte ich allen Beteiligten des Praktikums „Chemie für Mediziner“.

Den technischen und administrativen Serviceabteilungen des Instituts für Organische Chemie danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel, die Anfertigung von Analysen sowie die reibungslose Arbeitsumgebung.

Besondere Wertschätzung möchte ich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mir immer neuen Mut gegeben haben. Larissa Meyer danke ich zusätzlich für das aufmerksame Lesen und Korrigieren dieser Arbeit sowie viel Geduld und Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Kenntnisstand.....	3
2.1. Sphingolipide	3
2.1.1. Aufbau	3
2.1.2. Biosynthese und Sphingolipidkreislauf.....	9
2.1.3 Sphingolipide als signalgebende Biomoleküle.....	12
2.1.4 Chemische Synthese.....	15
2.1.5 Fluoreszenzmarkierte Sphingolipide.....	20
2.2. Bioorthogonale Markierungsreaktionen	24
2.2.1 Staudinger-Ligation.....	25
2.2.2 Spurlose Staudinger-Ligation	27
2.2.3 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition.....	28
2.2.4 SPAAC.....	30
2.2.5 iEDDA	37
2.2.6 Bioorthogonale Marker.....	39
3 Zielsetzung	41
4 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse	43
4.1 Sphingolipidderivate zur Untersuchung von Lipiddynamiken.....	43
4.1.1 Azidfunktionalisierte Ceramide.....	45
4.1.2 ω -Azidoacylceramide.....	49
4.1.3 α -Azidoacylceramide	55
4.1.4 Antimikrobielle Wirkung der azidmodifizierten Ceramide.....	65

4.1.5 Cyclooctenolfunktionalisierte Ceramide.....	71
4.1.6 Azidfunktionalisierte Sphingoidbasen	78
4.1.7 2-Azido-2-Desaminosphingoidbasen	79
4.1.8 An Position 1 funktionalisierte Sphingoidbasen	84
4.1.9 Diskussion der spektroskopischen Daten der Sphingolipidderivate	87
4.2 Sphingolipidanaloga.....	91
4.2.1. Azidfunktionalisierte <i>N</i> -Oleoylserinolderivate.....	95
4.2.2 Azidfunktionalisiertes <i>O</i> -Galactosyl- <i>N</i> -Oleoylserinol.....	107
4.2.3 Diskussion der spektroskopischen Daten der <i>N</i> -Oleoylserinolanaloga	108
4.2.3. Figolimodderivate	112
4.2.4 Diskussion der spektroskopischen Daten	117
4.3 Sphingolipidmodifizierte Oberflächen.....	119
4.3.1 Protokoll für lipidbeschichteten Oberflächen.....	121
4.3.2 Evaluierung der antibakteriellen Wirkung.....	123
4.3.3 Antibakterielle Oberflächen der 2. Generation	127
4.4 Funktionelle Moleküle zur Verfolgung von Zellmechanismen	130
4.4.1 Multivalenter Linker zur Mehrfachkonjugation.....	130
4.4.2 Isotpenmarkiertes Benzochinonderivat	133
4.4.3 Diskussion der spektroskopischen Daten des Benzochinonderivats	136
5 Zusammenfassung	139
6 Summary.....	149
7 Experimentalteil.....	159
7.1 Allgemeine Arbeits- und Messtechniken.....	159
7.1.1 Geräte und Materialien.....	159
7.1.2 Chemikalien	161
7.2 Allgemeine Synthesevorschriften	163
7.3 Spezifische Synthesevorschriften	165

7.3.1 Synthese von Carbonsäurederivaten	165
7.3.2 Synthese von Cyclooctenolen	176
7.3.3 Synthese von Ceramidderivaten.....	180
7.3.4 Synthese von Sphingoidbaserivaten.....	187
7.3.5 Synthese von Seinolamiden	206
7.3.6 Synthese von Fingolimodderivaten	233
7.3.7 Synthese des multivalenten Linkers.....	241
7.3.8 Synthese des Isotopenmarkierten Benchinonderivates.....	248
8 Abkürzungen und Akronyme.....	253
9 Literaturverzeichnis	257
10 Anhang.....	275
NMR-Spektren.....	275

1 Einleitung

Einer der Meilensteine der medizinischen Forschung war die eher zufällige Entdeckung des ersten Antibiotikums Penicillin im Jahre 1929 durch Alexander Fleming.^[1] Heute, knapp 90 Jahre später, gibt es zwar durch intensive und gezielte Forschung eine Vielzahl weiterer Antibiotika, trotzdem gehören Infektionskrankheiten laut der Weltgesundheitsorganisation WHO immer noch zu den zehn häufigsten Todesursachen. Dazu trägt die Tatsache bei, dass viele Bakterien durch unsachgemäße und unverhältnismäßige Anwendung von Antibiotika Resistenzen entwickelt haben - teilweise auch gegen mehrere Antibiotika parallel (Multiresistente Erreger).

Eine britische Studie prognostiziert ab dem Jahr 2050 jährlich 10 Millionen Todesfälle allein durch multiresistente Keime.^[2] Auch wenn die Erfassung der grundlegenden Daten schwierig ist und die konkreten Zahlen der Studie durchaus umstritten sind,^[3] stellt die Bekämpfung resistenter Erreger eine der größten Herausforderung für die Zukunft dar. In einer vor kurzem erschienenen Pressemitteilung schätzt die WHO, dass von 51 neuen Antibiotika, die sich zurzeit in der Entwicklung befinden, nur acht neue Behandlungswege eröffnen werden.^[4] Ferner benennt die WHO zwölf Erreger die eine besondere Bedrohung darstellen und fordert deshalb von der internationalen Gemeinschaft höhere Investitionen in die Entwicklung sowohl neuer Antibiotika als auch neuer Impf-, Analyse- und Diagnosemethoden.^[5]

Neben der WHO beschäftigen sich auch weitere Institutionen mit dieser dramatischen Entwicklung, deren Fokus nur eingeschränkt auf dem Gesundheitswesen liegt. Auf dem G20-Gipfel im März 2017 in Hamburg wurde die Berliner Erklärung verfasst, die den Beschluss zur engeren Zusammenarbeit der Nationen enthält, um die Verbreitung von resistenten Erregern zu begrenzen und die Wirksamkeit von vorhandenen Antibiotika

zu erhalten. Dabei sorgen sich die Minister nicht nur um die Gesundheit der Bevölkerung, sondern auch um die wirtschaftliche Stabilität.^[6]

Die Kosten der Behandlung multiresistenter Keime liegen ein Vielfaches über denen, die normale Behandlungsmethoden erfordern. Als Beispiel seien hier die Behandlungskosten der multiresistenten Tuberkulose erläutert, dessen Ausbreitung die WHO am kritischsten einstuft.^[5] Die Kosten für die Behandlung eines Tuberkulosepatienten liegen in Deutschland bei etwa 1.000 Euro, zur Behandlung multiresistenter Tuberkulose können die Kosten auf mehr als 50.000 Euro steigen.^[7] Daher setzt sich ebenfalls die Weltbank mit der Ausbreitung von resistenten Keimen auseinander. Diese schätzt sogar, dass die Kosten hervorgerufen durch Infektionen mit resistenten Erregern bis 2050 höher liegen könnten als die finanziellen Schäden, die durch die Finanzkrise im Jahre 2008 verursacht wurden.^[8]

Eine Stoffklasse, die vermehrt in den Fokus der Wirkstoffforschung gerückt ist, sind Sphingolipide.^[9] Die Untersuchung der Wechselwirkungen von Sphingolipiden mit Proteinen sowie ihrer Beteiligung an Signalkaskaden hat bereits viel zum Verständnis ihrer Rolle in der Pathogenese vieler Krankheitsbilder wie Krebs, Entzündungen, neurologischen Erkrankungen und Stoffwechselstörungen beigetragen.^[10] Ebenfalls wurden antibakterielle Aktivitäten von Sphingolipiden beobachtet.^[9, 11]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung funktionalisierten Sphingolipiden und Sphingolipidanaloga, die bioorthogonale Reaktionen erlauben. Die hier vorgestellten Verbindungen dienen somit als Werkzeuge in biologischen Untersuchungen, um die Rolle von Sphingolipiden während Infektionen besser zu verstehen und auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse, die Entwicklung neuer Wirkstoffe sowie neuer Impf-, Analyse- und Diagnosemethoden zu ermöglichen.

2 Kenntnisstand

2.1. Sphingolipide

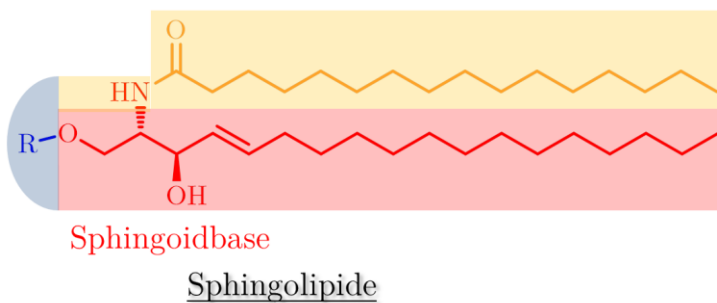
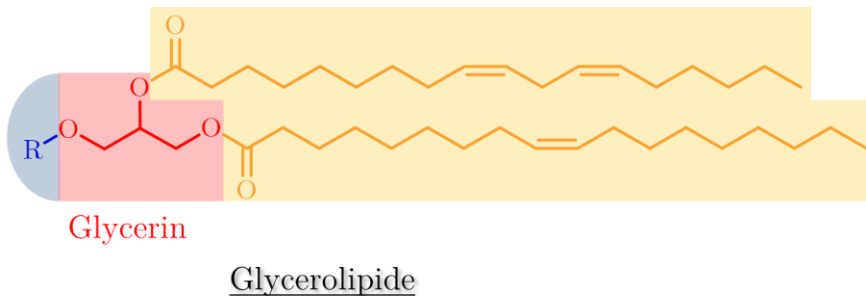
Sphingolipide bilden zusammen mit Glycerolipiden und Sterolen die drei Hauptgruppen der Membranlipide. Im Gegensatz zu den anderen Lipidarten sind sie stärker in grundlegende biologische Prozesse wie beispielsweise Signaltransduktion und Zell-Zell-Erkennung eingebunden. Die strukturell vielfältigen Sphingolipide bewirken auf Zellebene je nach Aufbau viele unterschiedliche, teilweise antagonistische signalgebende Effekte wie Apoptose und Zellüberleben. Die ausgelösten Zellprozesse sind stark von den Konzentrationen der jeweiligen Sphingolipide abhängig, die durch ein komplexes System von Enzymen im Normalzustand in Homöostase gehalten werden. Bei äußeren Einflüssen wie UV-Strahlung oder Hitzestress kann es zur lokalen Anreicherung bestimmter Sphingolipide und damit zur Auslösung verschiedener Signaltransduktionen kommen.^[12]

2.1.1. Aufbau

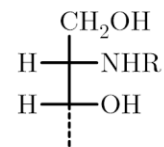
Der zentrale Baustein der meisten Lipide ist Glycerin, nach Acylierung von Fettsäuren und eventueller Bindung von Kopfgruppen ergeben sich Glycerolipide, die den Hauptteil der Membranen ausmachen und vorwiegend strukturgebende Bedeutung haben. Das Rückgrat der Sphingolipide stellen langkettige Sphingoidbasen (*long chain bases*, LCBs) dar. Komplexere Sphingolipide ergeben sich nach Acylierung von

2 Kenntnisstand

Carbonsäuren an die Aminogruppe (Ceramide) und/oder die Bindung von unterschiedlichen Kopfgruppen.



Fischerprojektion



D-Erythro

Abbildung 2.1: Links oben: Aufbau von Glycero- und links unten Sphingolipiden. Die Kernmoleküle (Glycerin bzw. Sphingoidbase) sind in rot dargestellt, verknüpfte Fettsäuren in gelb. R in blau steht für die verschiedenen Kopfgruppen. Rechts: Darstellung der Stereozentren von D-erythro Sphingosin **1** in der Fischerprojektion.

Sphingoidbasen

Sphingoidbasen weisen gewöhnlich eine Kettenlänge von 18 Kohlenstoffen auf, strukturelle Varianten mit Kettenlängen von 12 bis 26 Kohlenstoffen sind in Säugetieren bekannt, aber seltener.^[13] In Menschen und anderen Säugetieren ist (2S,3R,*E*)-2-amino-octadec-4-ene-1,3-diol **1** die am häufigsten vorkommende LCB (vgl. Abb. 2.1). Aufgrund der stereochemischen Anordnung der beiden chiralen Zentren spricht man analog zur Benennung von Kohlenhydraten auch von D-erythro Sphingosin (siehe Abb. 2.1). Da die stereochemische Konfiguration des β -Hydroxyamid-Motivs in

natürlichen LCBs normalerweise nicht variiert, ist bei dieser Sphingoidbase meist nur von Sphingosin (SPH) **1** die Rede.

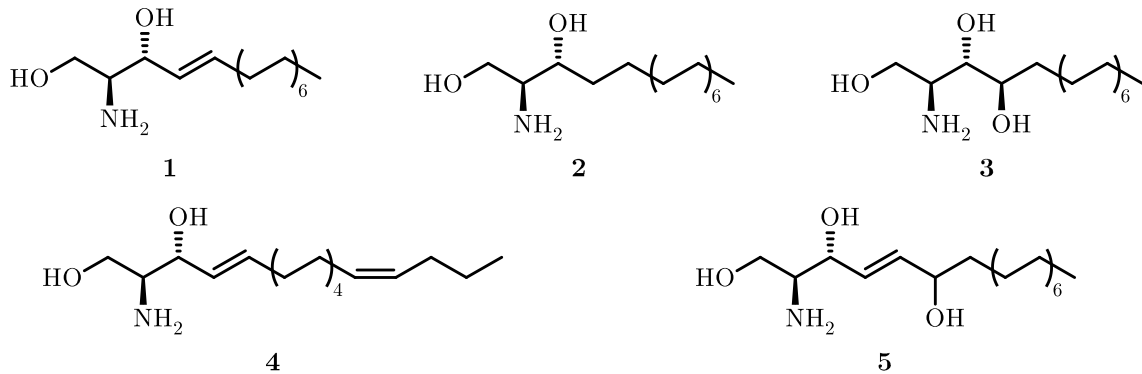


Abbildung 2.2: Oben: Die in Säugetieren häufigsten Sphingoidbasen Sphingosin **1**, Sphinganine **2** und Phytosphingosin **3**. Unten: Beispiele für seltenere strukturelle Varianten.

In Säugetieren bilden SPH **1**, Sphinganin (SA) **2**, das keine Doppelbindung in der Alkylkette aufweist, und Phytsphingosin (PHS) **3**, welches eine weitere Hydroxylgruppe an C-4 besitzt, die häufigsten natürlich vorkommenden LCBs.^[13] Neben diesen LCBs gibt es noch weitere strukturelle Varianten von LCBs, deren Häufigkeit zumindest in Säugetieren geringer ausfällt, aber auch stark gewebe- bzw. sekretabhängig ist. Beispielweise kommt das 4*E*, 14*Z* Dien **4** vornehmlich in Hirngewebe vor^[14], während 6-Hydroxysphingosin **5** im Hautgewebe zu finden ist.^[15-16] LCBs stellen die strukturell einfachsten Sphingolipide dar, komplexere Sphingolipide ergeben sich hauptsächlich durch über die Aminogruppe acylierte Fettsäuren und unterschiedliche Kopfgruppenmodifikationen. In Abb. 2.2 sind die genannten Sphingolipide dargestellt.

Ceramide

Sobald eine Fettsäure als Amid an eine Sphingoidbase gebunden ist, handelt es sich um ein Ceramid (Cer), bei der Kombination von Phytosphingosin und Fettsäure spricht man auch oft von Phytoceramiden. In Säugetieren variieren die acylierten Fettsäuren vornehmlich in ihren Kettenlängen von 14 bis 34 Kohlenstoffen, eine Doppelbindung und/oder eine Hydroxylgruppe in α - oder ω -Position.^[17]

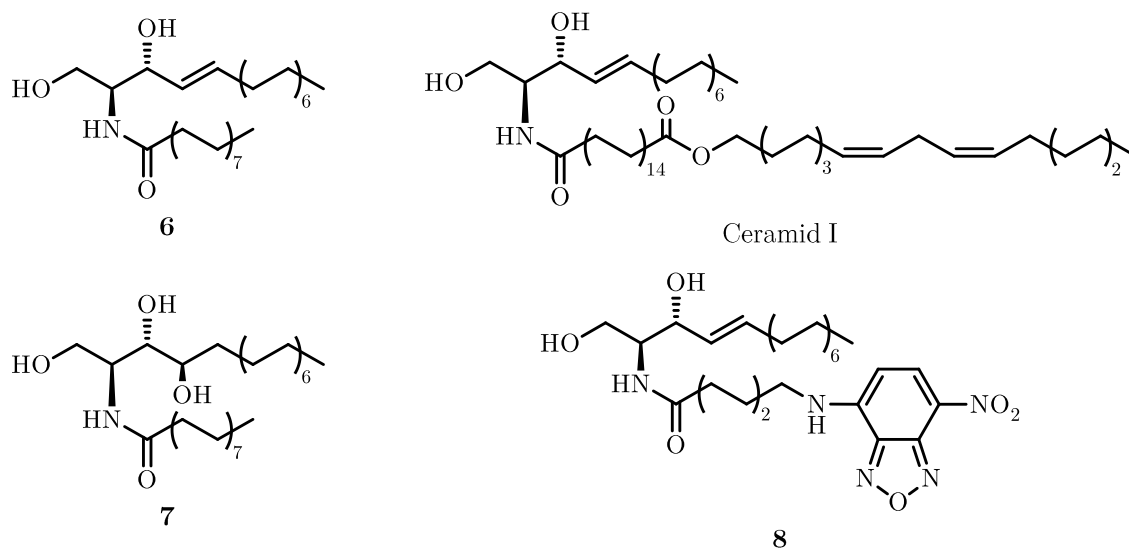


Abbildung 2.3: links oben Ceramid **6**, links unten Phytoceramid **7**, rechts oben ein Ceramid 1 als Beispiel für *O*-acyl Ceramide, rechts unten synthetisches, mit 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol modifiziertes Ceramid **8**.

Am verbreitetsten sind Ceramide mit Fettsäureresten einer Kettenlänge von 16 Kohlenstoffen (*N*-Palmitoylsphingosin **6**, *N*-Palmitoylphytosphingosin **7**). Wie bei den LCBs ist auch der Gehalt an Ceramiden und die Komposition der Acylreste stark gewebe-/sekretabhängig. In menschlichem Plasma machen Sphingolipide insgesamt nur 4 % der Lipide aus. Reine Ceramide ohne gebundene Kopfgruppen machen davon wiederum nur etwa 4 % aus.^[18] Ein ungewöhnlich hoher Anteil von Ceramiden findet sich im *stratum corneum*, der äußersten Hautschicht, Ceramide machen hier ca. 50 % der Lipide aus.^[19] Auch der Ceramidanteil der langkettigen bzw. ultralangkettigen

Ceramide ist im *stratum corneum* sehr hoch und liegt bei etwa 60 % bzw. 24 %. Langkettige Ceramide haben eine Gesamtzahl von Kohlenstoffen von mindestens 38 Kohlenstoffen, von ultralangen Ceramiden spricht man ab 48 Kohlenstoffen.^[20-22] Zusätzlich kommen im *stratum corneum* *O*-acyl Ceramide vor, die über eine ω -Hydroxylgruppe der *N*-Acyleinheit zusätzlich noch Linolsäure verestert haben. Solche *O*-acyl Ceramide werden in der Dermatologie nach der Mobilität in der Dünnschichtchromatographie auch Ceramid I genannt.^[23-24] Diese Zusammensetzung aus hydrophoben Lipiden schützt die Haut nicht nur vor dem Austrocknen, sondern trägt gleichzeitig zum Schutz vor Mikroorganismen bei.^[19, 25-26] In Abb. 2.3 sind die genannten Ceramide dargestellt.

Kurznamenklatur

Um die Variationsmöglichkeiten der Sphingolipide bezüglich Kettenlängen und Anzahl der Doppelbindungen schnell abzubilden, hat sich zur Beschreibung eine Kurznamenklatur der Form d,tA:B durchgesetzt. Beginnend mit der Anzahl der Hydroxylgruppen (d für di-, t für tri-, etc.), anschließend wird die Kettenlänge der LCB genannt, und mit Doppelpunkt getrennt die Anzahl der Doppelbindungen. Falls eine Fettsäure acyliert ist, wird diese durch Semikolon getrennt analog beschrieben. Beispiele: Palmitoylsphingosin **6**: d18:1;16:0, oder die Sphingoidbase ohne Doppelbindung Phytosphingosin **3** t18:0. Eine andere Kurznamenklatur beschreibt die unterschiedlichen acylierten Fettsäuren von Ceramiden. Hier wird die Kettenlänge der Fettsäure und eine weitere Funktionalisierung dem Kürzel Cer vorgesetzt, beispielsweise wird Ceramid **6** mit C₁₆-Cer beschrieben und das fluoreszierende, 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD) modifizierte Ceramid **8** mit NBD C₆-Cer.

Kopfgruppen

Über die primäre Alkoholgruppe können analog zu den Glycerolipiden verschiedene Reste wie beispielsweise Phosphate oder Saccharide gebunden sein (vgl. Abb. 2.4).

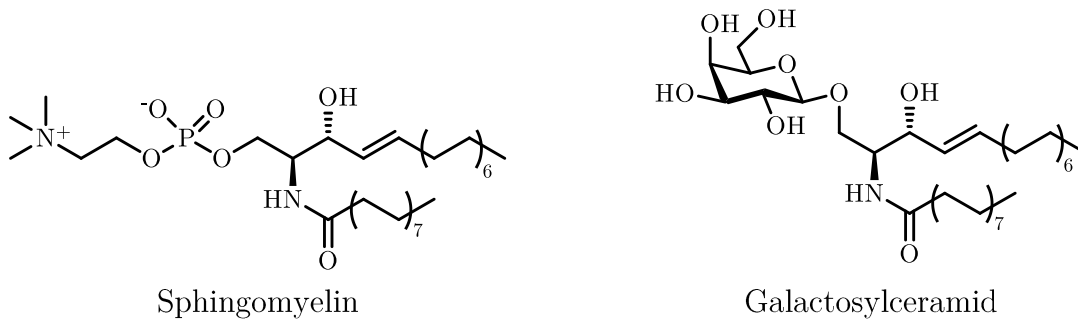


Abbildung 2.4: Sphingolipide mit unterschiedlichen Kopfgruppen.

Bei Sphingomyelin (SM), dem häufigsten Sphingolipid in Säugetieren, dient Phosphocholin als Kopfgruppe. Glycosphingolipide beginnen ausschließlich mit 1- β verknüpften Galactosyl oder Glucosyleinheiten, die darauf aufbauenden komplexeren Saccharidstrukturen variieren dafür sehr stark. Die bekanntesten Glycosphingolipide stellen dabei die Ganglioside dar, zu denen auch die Blutgruppenmarker gehören.

Aus den Variationsmöglichkeiten der LCBs, die verschiedenen acylierten Carbonsäuren und durch die unterschiedlichen Kopfgruppen resultieren eine große Anzahl verschiedener Sphingolipide (SL). Bis Ende der achtziger Jahre waren bereits über 300 unterschiedliche SLs alleine in Säugetieren bekannt,^[27] 2010 wurden allein in menschlichem Blutplasma 204 unterschiedliche Sphingolipide identifiziert.^[18]

2.1.2. Biosynthese und Sphingolipidkreislauf

Die zentrale Molekülklasse in der Biosynthese von Sphingolipiden (SL) stellen Ceramide dar, die entweder aus der *de novo* Synthese (siehe Abb. 2.5) oder über den *salvage pathway* des Sphingolipidkreislaufs generiert werden können.

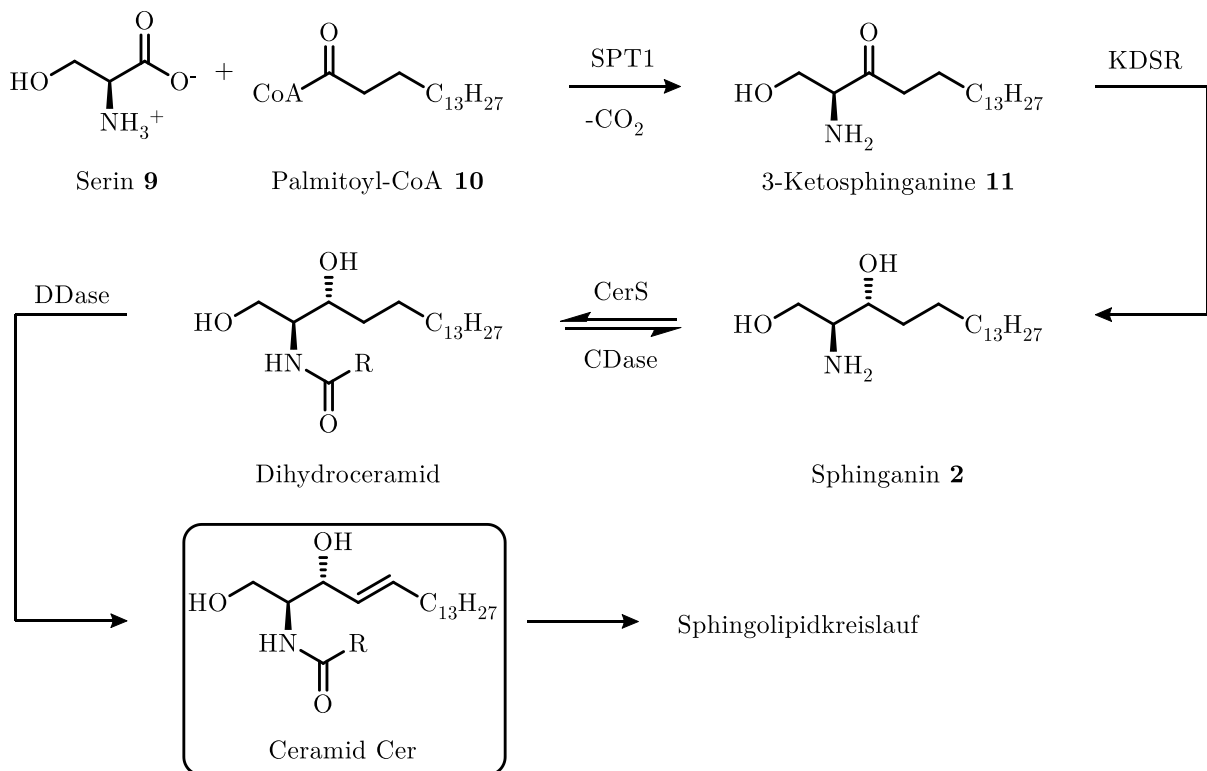


Abbildung 2.5: *De novo* Biosynthese von Ceramid. Abkürzungen; SPT1 Serin Palmitoyl-Transferase, KDSR 3-Ketosphinganine-Reduktase, CerS Ceramid-Synthase und DDase Dihydroceramid-Desaturase.^{[12,}

28]

Die *de novo* Synthese der SLs beginnt mit der Kondensation von L-Serin **9** und Palmitoyl-CoA **10** zu 3-Ketosphinganine **11** (siehe Abb. 2.5) katalysiert von Serin Palmitoyltransferase (SPT). Anschließend folgt die stereochemisch selektive Reduktion zu Sphinganine **2** durch Ketosphinganine-Reduktase. Nachdem durch Ceramidase eine Fettsäure acyliert wurde, erfolgt die selektive *trans*-Dehydrierung zu Ceramiden. Bis

2 Kenntnisstand

auf die Synthese von Dihydroceramid sind dabei alle Schritte irreversibel.^[12, 28] Da die Serin-Palmitoyl-Transferase in Säugetieren bevorzugt Acyl-CoAs von gesättigten Fettsäuren mit 16 ± 1 C-Atomen umsetzt und Palmitoyl-CoA im Überschuss vorhanden ist, erklärt dies die bevorzugte Kettenlänge von 18 Kohlestoffen der LCBs.^[13]

Alle weiteren SLs befinden sich direkt oder über Zwischenstufen mit Ceramid in einem dynamischen Gleichgewicht. Über diese enzymkontrollierten Gleichgewichte kann Ceramid auch aus anderen SLs generiert werden. In Abb. 2.6 sind die metabolischen Stoffwechselwege der Sphingolipide über die *de novo* Synthese dargestellt.

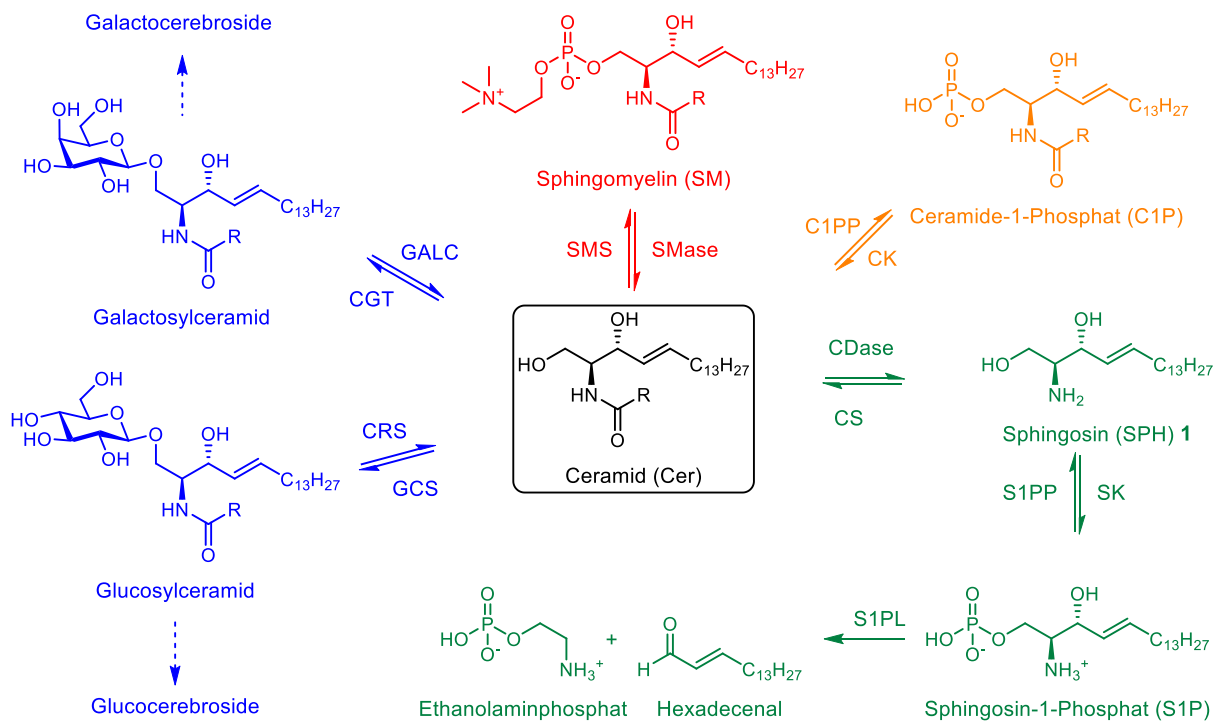


Abbildung 2.6: Metabolische Stoffwechselwege der Sphingolipide über die *de novo* Synthese; Glycosphingolipide (blau), Sphingomyelin Kreislauf (rot), Phosphorylierung von Ceramid (orange) und metabolischer Abbau über S1P (grün). Abkürzungen: GALC Galactosylceramidase, CGT Ceramid Galactosyltransferase, CRS Cerebrosidase, GCS Glucosylceramid Synthase, SMS Sphingomyelin Synthase, SMase Sphingomyelinase, C1PP Ceramid Phosphatase, CK Ceramid Kinase, CDase Ceramidase, CS Ceramid Synthase, S1PP Sphingosin-1-Phosphatase, SK Sphingosin Kinase, S1PL Sphingosine-1-Phosphate Lyase.^[12, 28]

Nachdem die *de novo* Synthese von Ceramid im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt ist, wird Cer vom Ceramidtransfer Protein (CERT) in den Golgi transportiert.^[29] Anschließend kann die Sphingomyelin-Synthase eine Phosphocholineinheit vom Glycerolipid Phosphatidylcholin (PC) auf das Ceramid übertragen und dadurch das am häufigsten verbreitete Sphingolipid Sphingomyelin (SM) generieren. Aus SM kann nach Sphingomyelinase (SMase) Aktivierung wiederum Ceramid für komplexere Sphingolipide gewonnen werden (Sphingomyelinkreislauf).^[29] Da die Gewinnung von Ceramid aus Sphingomyelin wesentlich schneller ist und in den benötigten Kompartimenten erfolgt, ist die Funktion der Sphingomyelinasen wichtig für die Lipidhomöostase und Signaltransduktion. Letztere wird im Kapitel 2.1.3 genauer diskutiert.

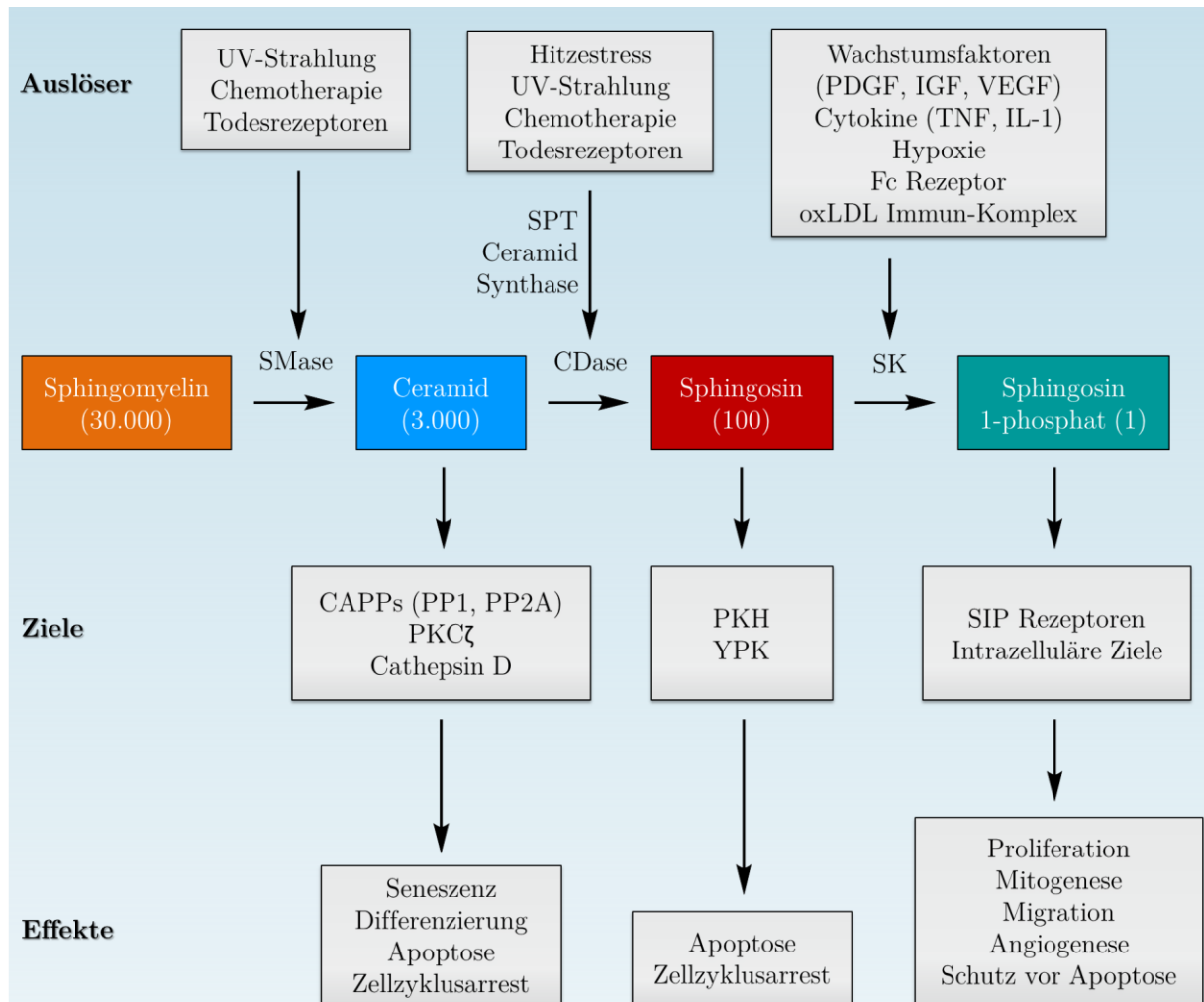
Glucosyl- und Galactosylceramide werden durch das Ausbilden einer β -glycosidischen Bindung mit der primären Hydroxylgruppe des Ceramides synthetisiert. Diese mono Glycosylceramide sind auch die einzigen Precursoren für alle komplexeren Glycosphingolide, zu denen auch die Ganglioside gehören, die als die Blutgruppenmarker bekannt sind.^[30] Weitere Sphingolipide, die direkt aus Cer generiert werden, sind Ceramid-1-Phosphat (Cer1P) sowie die reine Sphingoidbase SPH. Von SPH aus findet über Sphingosine-1-Phosphat (S1P) auch der einzige Abbaumechanismus zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin statt. Hexadecanal kann in Folge wieder reduziert werden und daher wieder im Lipidkreislauf verwendet werden.^[13, 31]

In anderen Organismen können sich die Biosynthese und die daraus resultierenden Sphingolipide stark unterscheiden. In Pflanzen erfolgt statt der Dehydrierung von Dihydroceramid der Einbau einer weiteren Hydroxylgruppe. Daher ist PHS die häufigste LCB in Pflanzen.^[32] Die komplexeren Sphingolipide in Pflanzen unterscheiden

sich hauptsächlich in der Sphingoidbase von den Säugetiervarianten. Die Kopfgruppen und acylierten Fettsäuren bleiben weitestgehend konstant.

2.1.3 Sphingolipide als signalgebende Biomoleküle

Lange Zeit wurden Lipiden lediglich strukturgebende Eigenschaften zugesprochen. Doch gerade für SLs erwuchs in den letzten 25 Jahren eine überaus zentrale Rolle in nahezu allen wichtigen signalgebenden Bereichen der Zellbiologie. Dabei ist die Wirkmechanismus der Lipide nicht ausschließlich von den Kopfgruppen abhängig. So zeigt zum Beispiel das Glycerolipid Phosphatidylcholin (PC) - im Gegensatz zum Sphingolipid SM - keine signalgebenden Eigenschaften, obwohl beide die gleiche Kopfgruppe aufweisen. Alle Sphingolipide besitzen signalgebende Effekte und stehen deshalb im Fokus der medizinischen Forschung. Eine vereinfachte Übersicht der Signalwege und Effekte von SLs in biologischen Systemen ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Abbildung 2.7. Signaltransduktion der Sphingolipide mit Auslösern und Effekten nach Hannun *et al.*^[12]

Gerade die strukturell einfacheren SLs wie Cer und SPH 1 und deren Phosphate Cer1P und SPH1P zeigen einen wichtigen Einfluss auf die grundlegenden Zellfunktionen. So hat Cer substantielle Wirkung bei der Reaktion von Zellen auf Stress- einschließlich der Signaltransduktion zur Apoptose^[33] und Seneszenz.^[34] Sphingosin 1 hat neben Auswirkungen auf den Zellzyklus und dem Membrantransport ebenfalls Einfluss auf die Apoptose.^[35] Cer1P ist in den vesikulären Transport und die Entzündungsreaktion involviert.^[36-38] SPH1P hat Einfluss auf das Überleben, Zellwanderung und ebenfalls Entzündungsreaktionen.^[39]. Daher wird inzwischen auch verstärkt die Rolle von Sphingolipiden in den verschiedensten Krankheitsbildern untersucht.

Einfluss des Sphingolipidkreislaufs auf die Gesundheit

Die meisten Schritte des Sphingolipidkreislaufs sind essentiell für grundlegende Zellprozesse. Defekte des Kreislaufs führen daher meist zu schwerwiegenden Krankheiten. Im Bereich der vornehmlich im Nervengewebe vorhandenen Glycosphingolipide führen Störungen in der Biosynthese zu neurodegenerativen Krankheitsbildern. Bei der Erbkrankheit Gaucher-Syndrom führt eine Defizienz des Enzyms Glucocerebrosidase zur Anreicherung von Glucocerebrosiden in Leber, Milz, Knochenmark sowie dem zentralen Nervensystem und kann okulomotorische Apraxie und/oder Hornhauteintrübung zur Folge haben. Morbus Krabbe, Niemann-Pick-Syndrom und das Farber-Syndrom stehen ebenfalls mit einem gestörten Glycosphingolipid-Kreislauf in Verbindung.^[40]

Auch bei der Immunantwort ist der Sphingolipidkreislauf von zentraler Bedeutung. Im Fokus der aktuellen Forschung stehen dabei vor allem die Sphingomyelinasen. Sphingomyelin ist mit Abstand das häufigste Sphingolipid in Säugetieren, im Blutplasma macht es beispielsweise etwa 95 % der Sphingolipide aus.^[18] Sphingomyelinasen sind dafür verantwortlich, dass Sphingomyelin als schnell verfügbare Quelle für Ceramid dienen kann, was zum Beispiel bei Entzündungen eine wichtige Rolle innerhalb der immunologischen Signalkaskade spielt.^[41] Bis heute wurden sechs humane Sphingomyelinasen beschrieben. Die Isoenzyme unterscheiden sich dabei bei optimalen Reaktionsbedingungen und Lokalisation, sowohl auf geweblicher als auch auf zellulärer Ebene.^[42] Die Isoenzyme werden nach optimalem pH-Wert in alkalische, neutrale und saure Sphingomyelinasen (alk-SM, NSM und ASM) eingeteilt. Bisher ist lediglich eine Sphingomyelinase bekannt, die ihr Aktivitätsmaximum im Basischen erreicht. Sie ist extrazellulär in Darm- und Lebergewebe lokalisiert und ihr wird eine Rolle in der dortigen Tumorentwicklung zugeschrieben.^[43-44] Im neutralen pH-Bereich wurden bisher drei unterschiedliche optimal arbeitende Sphingomyelinasen beschrieben: NSM1^[45] NSM2^[46-47] und NSM3.^[48] Während NSM2 vor allem in Hirngewebe und NSM3

in Muskelgewebe zu finden sind, ist NSM1 in allen Gewebearten auffindbar. Im sauren pH-Bereich sind bisher zwei optimal arbeitende Sphingomyelinasen bekannt. Hier unterscheidet man zwischen der im Lysosom lokalisierten lysosomalen ASM^[49-51] und der sekretierten extrazellulären ASM.^[41, 52-53]

2.1.4 Chemische Synthese

Sphingolipide können in geringen Mengen aus biologischen Materialien wie Hühnereiern und Schweine- oder Rinderhirnen gewonnen werden. Da sich die Sphingolipid-Zusammensetzung je nach Organismus und Gewebe unterscheidet, beispielsweise in der Kettenlänge der acylierten Fettsäuren, werden so lediglich inhomogene Gemische gewonnen, die nur schwer zu trennen sind.^[27] Zur Synthese von genau definierten Sphingolipiden wird daher meist der jeweiligen reinen Sphingoidbase ausgegangen. Um die Sphingoidbasen wiederum aus den Gemischen zu gewinnen, müssen zuerst die Kopfgruppen entfernt und die Fettsäuren deacyliert werden. Für diese Synthesen sind drastische Reaktionsbedingungen nötig, die zu Acylmigration oder Umlagerungsreaktionen führen können.^[54-55] Folglich ist man zur Gewinnung definierter Sphingoidbasen wie Sphingosin **1** meist auf eine chemische Synthese angewiesen.

Die meisten effizienten Synthesestrategien gehen analog zur Biosynthese von Serin **9** aus. Einige ältere Totalsynthesen greifen auf Phytosphingosin **3** oder Zucker als Ausgangsmoleküle zurück. Dabei ist es wichtig, die chiralen Informationen der Ausgangsstoffe zu erhalten und den Aufbau der fehlenden Stereozentren bzw. Doppelbindungsisomere möglichst selektiv zu gestalten. Vor allem der Aufbau der *trans*-Doppelbindung ist hierbei von großer Bedeutung. Dazu sind oft mehrfache Schützungs- und Entschützungs-schritte notwendig.

Auf L-Serin **9** basierte Synthesestrategien

Viele Synthesen orientieren sich an der *de novo* Biosynthese und gehen von L-Serin **9a** als chiraalem Ausgangsstoff aus; einige Beispiele sind dazu in Abb. 2.8 dargestellt. Die größte Herausforderung bei diesen Synthesestrategien liegt im Aufbau der *trans*-Doppelbindung beim Einbringen der langen Alkylkette.

Der Grundstein zur Synthese ausgehend von Serin **9** wurde in den 80er Jahren von Garner gelegt. Er veröffentlichte 1984 eine Methode zur Herstellung des konfigurationsstabilen 1,1-Dimethylethyl-4-formyl-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carboxylates aus Serin **9**.^[56] Das heute nach ihm benannte Garner's Aldehyd dient als chiraler Grundbaustein vieler asymmetrischer Syntheserouten zu den unterschiedlichsten Naturstoffen.^[57] So ist Garner's Aldehyd ebenfalls Ausgangsmolekül für die erste, 1988 von Garner entwickelte Sphingosinsynthese. Nach Umsetzung von Garner's Aldehyd mit dem Lithiumalkinyl von 1-Pentadecin, gefolgt von der *trans*-selektiven Reduktion und Entschützung wird Sphingosin **1** erhalten.^[58] Zur Reduktion werden Benkesers Reaktionsbedingungen (Lithium in Ethylamin) verwendet (vgl. Abb. 2.8, Mitte).^[59] Allerdings erreicht man über diese Strategie nicht die hohe Enantiomerenreinheit der später entwickelten Synthesen.

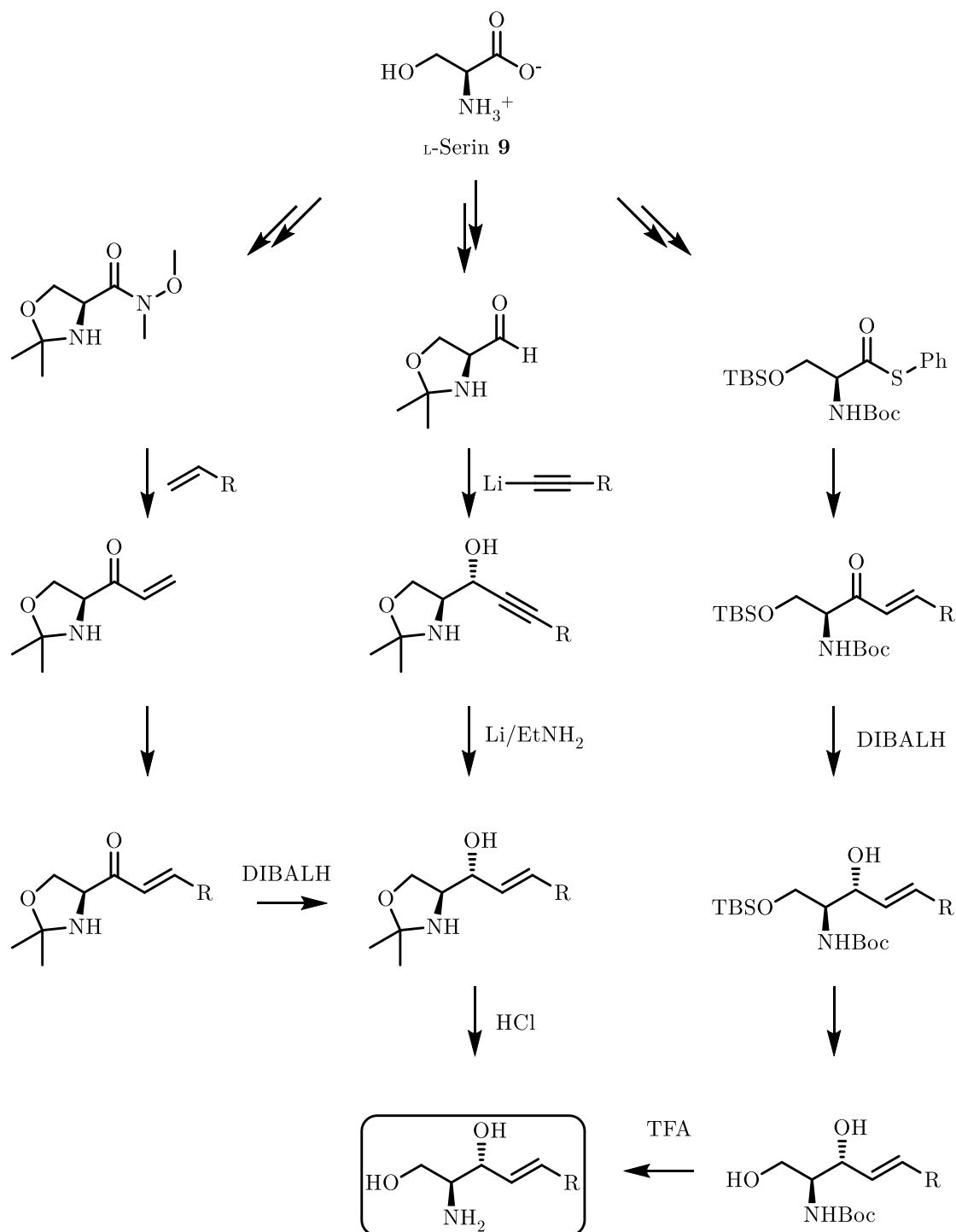


Abbildung 2.8: Serin **9** basierte Synthesestrategien. Links: über Grubbs-Metathese.^[60-61] Mitte: über Garners Aldehyd.^[58] Rechts: über Liebeskind-Srogl Kupplung.^[62]

Eine weitere Möglichkeit die Doppelbindung des Sphingosins aufzubauen, erfolgt *via* Olefin-Metathese nach Grubbs (vgl. Abb. 2.8, links). Hier wird NHBoc L-Serin **52** erst zum Weinrebamid und nach dem Schützen der primären Hydroxylfunktion

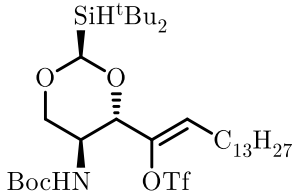
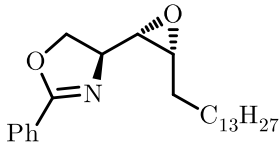
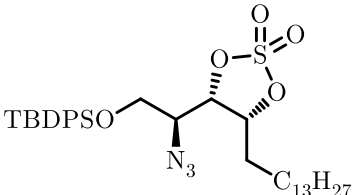
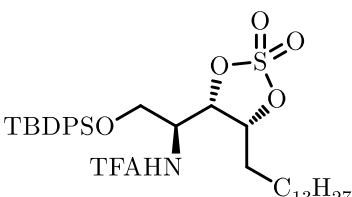
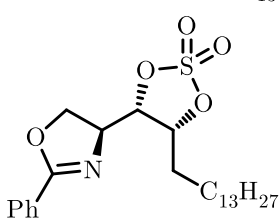
anschließend mit Vinylgrignard umgesetzt. Das entstandene Keton wird in Folge erst stereoselektiv reduziert und anschließend über Grubbs-Katalyse mit Pentadecen verlängert. Nach Entschützung der primären Hydroxylgruppe und des Amins wird Sphingosin **1** erhalten. Bei der Metathese muss eine sehr hohe Pentadecenkonzentration verwendet werden, um die Homometathese des chiralen Moleküls zu minimieren.^[60-61, 63]

Mit der Entwicklung metallkatalysierter C-C Knüpfungsreaktionen stellte Liebeskind *et al.* im Jahre 2000 eine Variante der Suzuki-Miyaura-Kupplung vor, bei der Thioester mit organischen Boronsäuren zu Ketonen umgesetzt werden.^[64] Bei Verwendung von *E*-Enyl-1-boronsäuren entstehen selektiv Michaelssysteme mit *trans* konfigurierten Doppelbindungen. Diese sogenannte Liebeskind-Srogl-Kupplung wurde 2007 verwendet, um geschütztes 3-Ketosphingonin **11** als Vorstufe von Sphingosin **1** herzustellen (vgl. Abb. 2.8, rechts). Ausgehend von Serin **9** konnte Liebeskind über 6 Stufen eine Ausbeute von 71 % erreichen.^[62]

Auf Phytosphingosin-basierte Synthesestrategien

Im Gegensatz zu Sphingosin **1** kann Phytosphingosin **3** durch Fermentationsprozesse in hoher Reinheit, in großen Mengen und zu einem günstigen Preis gewonnen werden.^[65] Die beiden Sphingoidbasen unterscheiden sich durch die Doppelbindung und die Anzahl der Hydroxylgruppen. Phytosphingosin **3** wird deshalb oft als Ausgangsstoff zur Synthese von Sphingosin **1** verwendet. Alle relevanten Stereoinformationen sind bereits vorhanden. Die größte Herausforderung in der Synthese besteht in der Ausbildung der *trans*-Doppelbindung. Vor allem die Gruppen um van den Berg und Kim beschäftigten sich seit 2002 mit der Entwicklung und Verbesserung von Synthesestrategien.^[66] Die geschützten Schlüsselverbindungen einer Auswahl von Syntheserouten sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Schlüsselverbindungen bei den Phytosphingosin-basierten Synthesestrategien.

Schlüsselverbindung	Jahr	Stufen	Ausbeute
	2002	8	57 % ^[67]
	2004	7	52 % ^[68]
	2006	9	53 % ^[69]
	2011	9	55 % ^[70]
	2011	7	67 % ^[66]

Dabei stellt die 2011 von van den Berg vorgestellte Variante mit einer Ausbeute von 67 % über sieben Stufen die Variante mit den wenigsten Zwischenstufen und gleichzeitig der höchsten Gesamtausbeute dar (siehe Tab. 2.1, letzte Zeile).^[66] Hier werden die primäre Hydroxylgruppe zusammen mit der Aminogruppe über den Aufbau eine Oxazolineinheit geschützt und die sekundären Hydroxylgruppen zu einem fünfgliedrigen Sulfat umgesetzt. Sphingosin **1** wird dann durch selektive Eliminierung des Sulfates und anschließender Öffnung des Oxazolins erhalten.

Zuckerbasierte Synthesestrategien

Als weiteres chirales Startmaterial eignen sich Zuckerstrukturen. So sind Sphingosinsynthesen ausgehend von D-Mannose^[71] D-Galactose^[72-73] und D-Xylose^[73-74] beschrieben. Da diese allerdings mindestens in einem der Bereiche a) Anzahl der Syntheseschritte, b) Gesamtausbeuten und/oder c) enantiomeren Reinheit den bereits beschriebenen Synthesen unterlegen sind, werden diese Synthesen an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

2.1.5 Fluoreszenzmarkierte Sphingolipide

Mit dem steigenden Interesse an Sphingolipiden in der medizinisch-biologischen Forschung wuchs auch der Bedarf an Methoden, um Signalwege und Enzymaktivitäten des Sphingolipidkreislaufs genauer untersuchen zu können. Gerade Fluoreszenzmikroskopie eignet sich, um Lipiddynamiken, Enzymaktivität und den Transport untersuchen zu können; die Entwicklung vieler verschiedener fluoreszenzmarkierter Lipidanaloga war die Folge. In Abb. 2.9 sind einige Kernstrukturen häufig verwendeter Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung von Sphingolipiden dargestellt, darunter NBD (7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) und BODIPY (Bordipyrromethen).

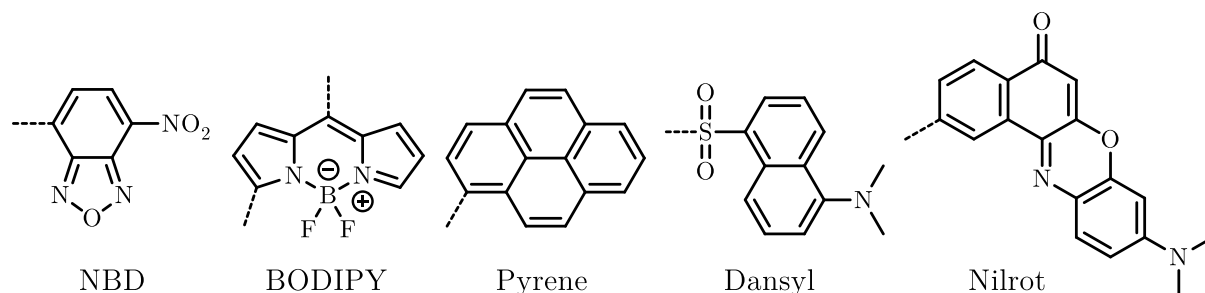


Abbildung 2.9: Kernstrukturen der häufig verwendeten Farbstoffe bei fluoreszenzmarkierten Sphingolipiden. Die gestrichelte Linie zeigt die möglichen Bindungen an die Sphingolipide.

Die erste wegweisende Arbeit, die sich mit fluoreszenzmarkierten Sphingolipiden beschäftigte wurde 1985 von Pagano *et al.* veröffentlicht. Dabei wurde als Fluoreszenzfarbstoff Nitrobenzoxadiazol (NBD) genutzt, welches am Stickstoff der ω -Aminohexansäure konjugiert ist. Das resultierende Ceramidanaloga ist löslich in Wasser und den natürlichen Sphingolipiden strukturell so ähnlich, dass die Verstoffwechslung bis in den Golgi verfolgt werden kann.^[75-76] NBD-C₆-Ceramid **8** entwickelte sich schnell zum Standard, um Sphingolipide in Zellen sichtbar zu machen. Die gewonnenen Daten aus Versuchen mit NBD-C₆-Cer **8** dienten auch als Basis für die *Lipid Raft* Hypothese.^[77] Bis heute wurden viele fluoreszierende Ceramidanaloga entwickelt, von denen die meisten den Farbstoff über die gebundene Fettsäure einbringen. Ein prominentes Beispiel ist hier das Boron-Dipyrromethen (BODIPY) tragende C₅-DMB-Cer^[78]. Während NBD durch seine Polarität die Eigenschaften von Ceramiden nur unzureichend reflektiert, was sich in der geringeren Affinität zu den anderen *Raft*-bildenden Lipiden zeigt, kann durch die Bindung des wesentlich unpolaren Farbstoffes die Affinität erhöht werden.^[79] Sowohl NBD-C₆-Cer **8**, C₅-DMB-Cer als auch andere Ceramidanaloga mit größeren strukturellen Änderungen in der acylierten Fettsäure weisen allerdings eine erhöhte Toxizität auf.

Um die toxische Wirkung zu reduzieren, können fluoreszierende Sphingolipide mit mehreren konjugierten Doppelbindungen in den lipophilen Ketten verwendet werden. Bereits in den 70er Jahren entwickelten Sklar *et al.* Fettsäuren mit konjugierten

Doppelbindungen, um die physikalischen Eigenschaften von Phospholipiden *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.^[80-81] Die Idee der konjugierten Doppelbindungen übertrug Kuerschner *et al.* durch Acylierung einer Polyen-Fettsäure neben anderen Lipiden auch auf Sphingolipide.^[82] Im Vergleich zu den gesättigten Fettsäuren führen die konjugierten Doppelbindungen zusätzlich zu einer unnatürlichen Starrheit der Seitenkette. Auch sind die Fluoreszenzeigenschaften dieser Ceramide etablierten Fluoreszenzfarbstoffen klar unterlegen.

Erst mit der Entwicklung neuartiger Sphingosinsynthesen (siehe Kapitel 2.1.4), die unter milden Bedingungen erfolgen, ergab sich die Möglichkeit die empfindlichen Fluorophore in die Alkylgruppe des LCB-Rückgrats einzubringen. 2003 entwickelte T. Hakogi *et al.* NDB modifizierte Versionen von SPH **1** und PHS **3**, die geringe Toxizität aufweisen.^[83] Im folgenden Jahr veröffentlichte Ettmayer *et al.* eine Synthese derselben Verbindung und ergänzte zwei Sphingolipidanaloga mit den Fluorophoren Dansyl und Pyren.^[84] Beide Arbeitsgruppen orientierten sich dabei an der Synthese nach Garner *et al.*^[58] 2007 adaptierte die Gruppe von Nussbaumer *et al.* die Olefinmetathese, um eine entsprechende BODIPY-Verbindung zu synthetisieren.^[85] Alle Sphingolipide, die den Fluorophor in der LCB gebunden haben, weisen eine geringere Toxizität als NBD-C₆-Cer **8** auf und führten zu einer Vielzahl neuer Erkenntnisse. Das NBD-Sphingosinderivat konnte zum Beispiel genutzt werden, um potentielle Liganden des Ceramid Transfer Proteins (CERT) zu untersuchen.^[86] Des Weiteren wurde 2012 Nilrot als Fluoreszenzfarbstoff eingeführt und in Kinetik-Assays verschiedener Ceramidasen mit den NBD-Varianten verglichen. Dabei wurden die Farbstoffe sowohl am Ende der acylierten Fettsäure als auch am Ende des LCB Gerüsts eingeführt. Die Studie konnte allerdings keinen generellen Trend aufzeigen, dass einer der Farbstoffe besser geeignet wäre oder die Position einen entscheidenden Einfluss besitzt, um Ceramide möglichst natürlich zu repräsentieren.^[87]

2.2. Bioorthogonale Markierungsreaktionen

Bioorthogonales Markieren (*bioorthogonal labeling*) hat sich in den letzten Jahren zu einer vielseitigen und effizienten Methode zur Untersuchung verschiedenster Biomoleküle entwickelt.^[88] Dabei werden Biomoleküle mit einer funktionellen Gruppe versehen, die in natürlichen biologischen Systemen nicht vorkommen. Diese funktionelle Gruppe kann, auch nach Einbau in biologische Systeme, selektiv mit einem chemischen Reporter versehen werden. Dabei dürfen sich die im biologischen System vorhandenen funktionellen Gruppen wie Thiole, Carboxylate oder Amine nicht störend auf die Markierung auswirken und keine Nebenreaktionen erzeugen. Als chemischer Reporter dient in den oft Fällen ein Farbstoff, der den Einsatz in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ermöglicht. In Abb. 2.10 ist das Prinzip der bioorthogonalen Markierung schematisch dargestellt.

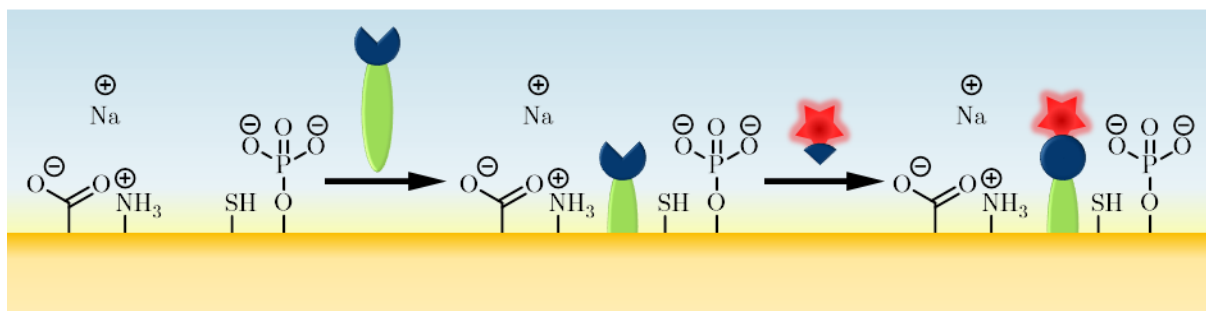


Abbildung 2.10: Prinzip der bioorthogonalen Markierung. Ein Biomolekül (grün) wird mit einer bioorthogonalen Funktion (blau) versehen und in ein biologisches System eingebaut, beispielsweise eine Zelle. Anschließend wird ein chemischer Reporter, beispielsweise ein Fluorophor (rot) mit der korrespondierenden Funktion (blau) zugegeben und bildet so eine kovalente Bindung mit dem modifizierten Biomolekül aus.

Im Folgenden werden mit der Staudinger-Ligation, Azid-Alkin-Cycloaddition und der Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA, inverse electron demand Diels-Alder addition) die gebräuchlichsten bioorthogonalen Markierungsreaktionen

vorgestellt. Diese und die zugehörigen Reaktionszeiten sind schematisch in Abb. 2.11 gezeigt. Anhand von Abb. 2.11 zeigt sich, dass die iEDDA die größten Reaktionsgeschwindigkeiten für bioorthogonale Markierungen aufweist.

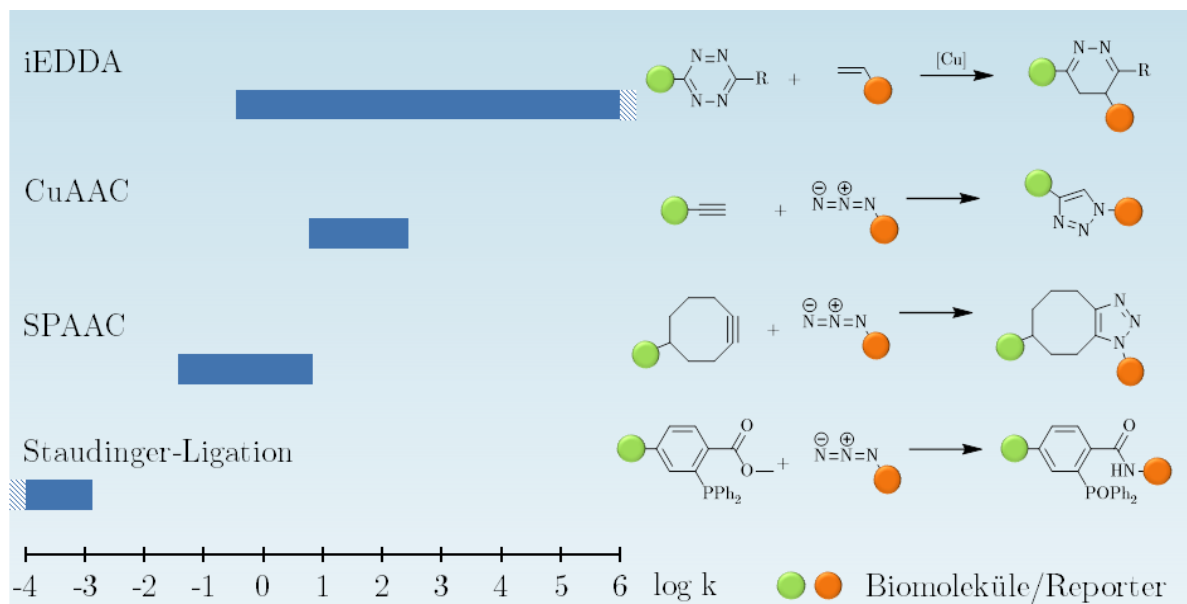


Abb. 2.11 Reaktionsgeschwindigkeiten ausgewählter bioorthogonaler Reaktionen nach Kele *et al.*^[89]

2.2.1 Staudinger-Ligation

Die erste bioorthogonale Reaktion wurde 2000 von Bertozzi *et al.* vorgestellt. Sie basiert auf einer Reduktion, die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Staudinger entwickelt wurde und dessen Namen sie bis heute trägt.^[90] Hierbei wird ein Azid durch Phosphin zum Amin reduziert. Die Gruppe um Bertozzi ergänzte das Phosphin-Reagenz in unmittelbarer Nähe um einen Carbonyl-ester, der als Elektrophil mit dem entstehenden Aza-Ylid direkt weiter reagiert. Nach der Hydrolyse des entstandenen

Oxaazaphosphetans in wässrigem Medium entsteht ein stabiles Amid.^[91-92] (Siehe Abbildung 2.12)

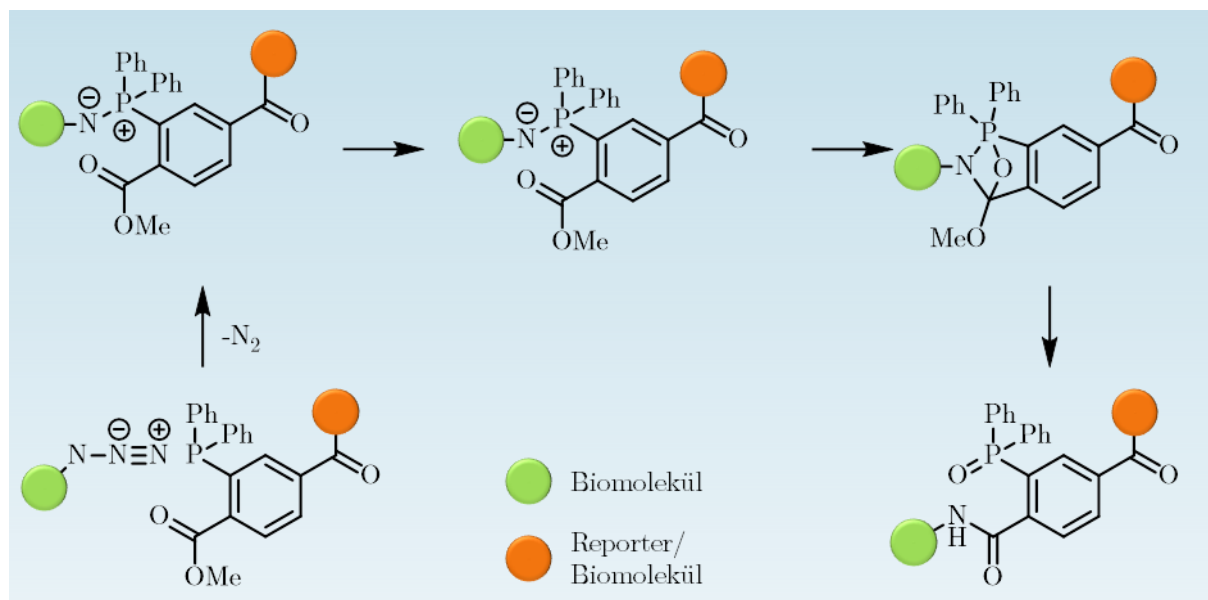


Abbildung 2.12 Ablauf der Staudinger-Ligation zur bioorthogonalen Markierung.

Damit Biokonjugation effizient genutzt werden kann, ist es elementar, dass der Reaktionsschritt schnell, selektiv und möglichst ohne Nebenprodukte verläuft sowie in wässrigem Medium stattfinden kann. Der Reaktionsschritt muss also die Kriterien der Clickchemie erfüllen, einem Konzept das 2001 von Sharpless definiert wurde.^[93] Gerade bei der Geschwindigkeit zeigt sich jedoch ein Nachteil der klassischen Staudinger-Ligation mit reinen Phenylliganden am Phosphor: Sie weist eine eher geringe Reaktionsgeschwindigkeit (ca. $10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) auf (siehe auch Abb. 2.11).^[94] Durch andere Liganden kann die Reaktionsgeschwindigkeit zwar gesteigert werden, aber meist auf Kosten einer hohen Oxidationsanfälligkeit.^[95-97] Die Verwendung von Perfluoroarylaziden hat einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Für die Staudinger Reaktion mit diesem Azid konnten kürzlich Reaktionsraten von bis zu $18 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreicht werden.^[98]

Auch *in vivo* findet die Staudinger-Ligation Verwendung. Sie weist keine messbare Toxizität auf, sowohl Phosphin als auch Azid existieren in natürlichen biologischen Systemen nicht und eignen sich daher gut als bioorthogonale Reaktionspartner. Als erste nutzte die Bertozzi Gruppe den klassischen Ansatz, um Azidozucker in Membranglycoproteine einzubringen und selektiv mit einem Biotinphosphin-Reagenz zu markieren. Anschließend wurde das Molekül über das fluoreszierende FITC-Avidin sichtbar gemacht.^[91] Die klassische Staudinger-Ligation findet bis heute Verwendung zur Untersuchung von Proteinen,^[99] Zuckern,^[100] DNA^[101] als auch Lipiden.^[102]

2.2.2 Spurlose Staudinger-Ligation

Kurze Zeit nach der Veröffentlichung der Staudinger-Ligation stellten die Gruppen um Bertozzi^[103] und Raines^[104] eine „spurlose“ Variante vor, bei der das entstehende Phosphinoxid nach Ausbildung der Amidbindung abgespalten wird. (siehe Abbildung 2.13) Raines entwickelte anschließend weitere Variationen der spurlosen Staudingerligation und nutzte sie zur Peptidsynthese.^[105-106]

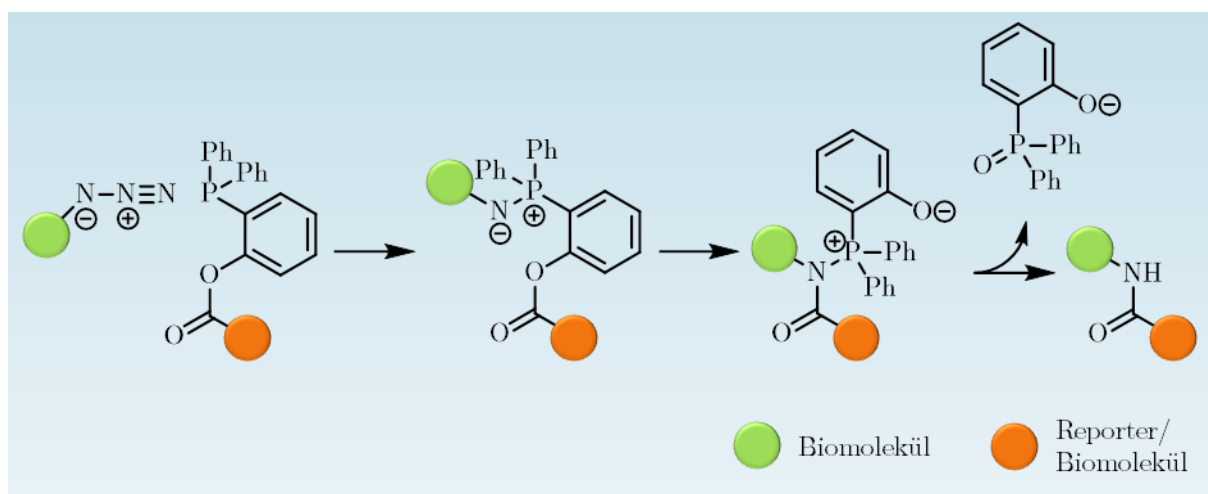


Abbildung 2.13 Ablauf der spurlosen Staudinger-Ligation zur bioorthogonalen Markierung.

Die spurlose Staudinger-Ligation findet bisher nur begrenzt Anwendung in lebenden Systemen.^[107] Aufgrund der von Nebenreaktionen, unter anderem der Oxidation des Phosphins, Amidbildung mit Aminogruppen von Peptiden oder Proteinen^[108-109] sowie den teilweise geringen Ausbeuten/Reaktionsgeschwindigkeiten ist die spurlose Staudinger Reaktion alternativen bioorthogonalen Reaktionen *in vivo* unterlegen.^[110] Da die Probleme hauptsächlich von der Phosphineinheit ausgehen, setzen auch andere bioorthogonale Reaktionen auf Azid als funktionelle Gruppe: Azid ist unter physiologischen Bedingungen stabil, inert und weist eine geringe Größe auf. Azidmodifizierte Biomoleküle weisen daher nur kleine strukturelle Abweichungen zu ihren natürlichen Gegenstücken auf und verhalten sich dadurch in biochemischen Prozessen analog ihrer natürlicher Pendanten^[107]

2.2.3 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

Die Bedeutung der [3+2] Zykladdition von C-C Dreifachbindungen mit Aziden als Reaktionspartnern zur Ausbildung von 1,2,3-Triazolen wurde erstmals 1961 von Huisgen erkannt.^[111] Sie verläuft allerdings nur bei sehr hohen Temperaturen und lässt auch Regioselektivität vermissen. Daher wurden seit ihrer Entdeckung verschiedene Versuche unternommen, um diese Nachteile zu beseitigen. Den Durchbruch erzielten 2002 die Gruppen um Sharpless und Meldal mit der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition kurz CuAAC).^[112-113] Durch die Kupfer(I)-Katalyse wurde ausschließlich das 1,4 Regioisomer gebildet und die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa das 10⁷-fache gesteigert. Diese Reaktionsrate ermöglicht die Reaktionsdurchführung bei Raumtemperatur (RT). Außerdem wurden durch beide Arbeitsgruppen weitere Vorteile der kupferkatalysierten Variante offenbart. So zeigt die CuAAC eine hohe Toleranz gegenüber pH-Werten

zwischen 4-12, die meisten funktionellen Gruppen bewirken keine störenden Einflüsse auf CuAAC und das benötigte Cu(I) kann einfach *in situ* generiert werden.^[112-113] Die nach Huisgen-Sharpless-Meldal benannte Reaktion erfüllt die Voraussetzungen der Clickchemie so gut, dass sie in der Literatur inzwischen auch als synonym für Clickchemie verwendet wird. Da terminale Alkine nicht in natürlichen Molekülen vorkommen, wurde die Huisgen-Sharpless-Meldal-Reaktion für ebenfalls für bioorthogonale Markierungen vielfach eingesetzt.^[114] Der Mechanismus der Huisgen-Sharpless-Meldal-Reaktion ist in Abb. 2.14 dargestellt.

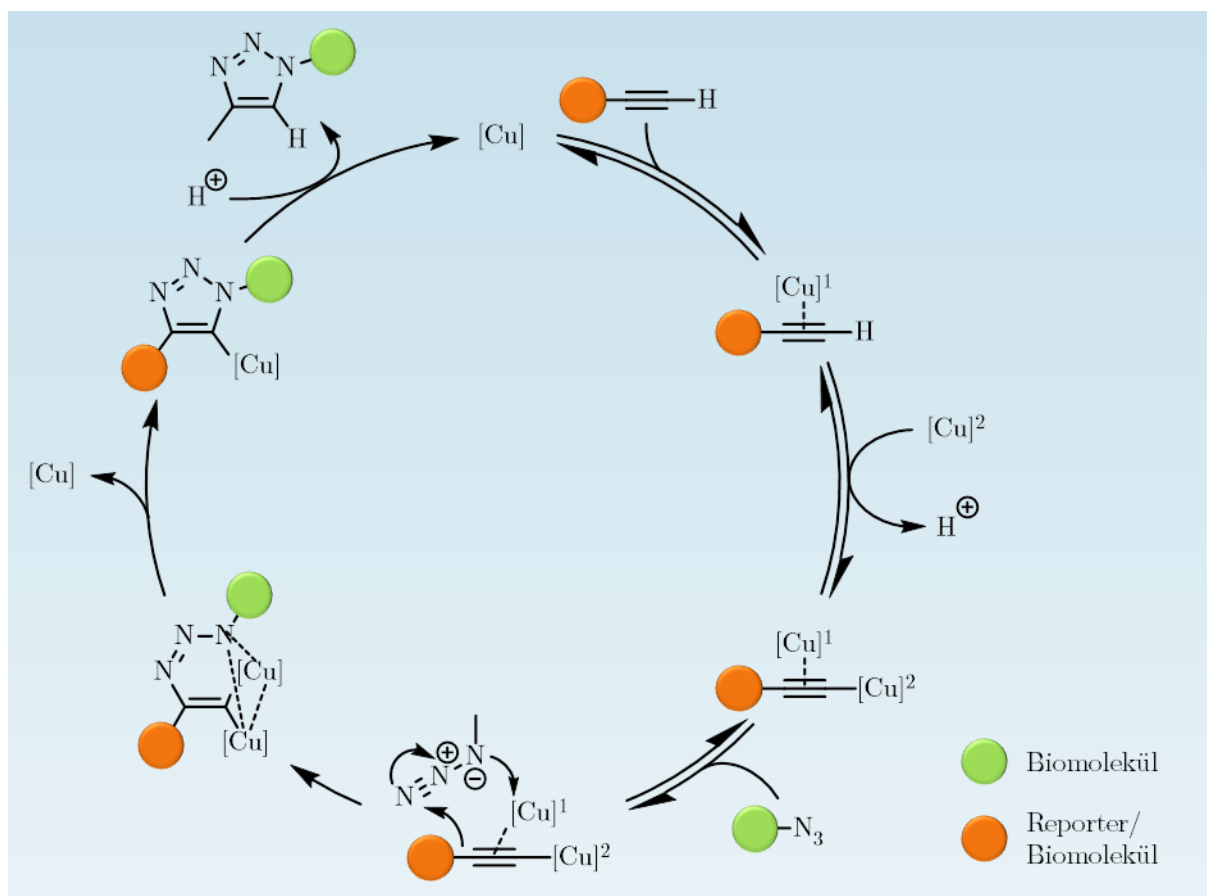


Abbildung 2.14: Katalyse Zyklus der kupferkatalysierten [3+2] Zyклоaddition über eine dinukleare Kupfer-Zwischenstufe in der Huisgen-Sharpless-Meldal-Reaktion.^[115]

Der Mechanismus der CuAAC wird immer noch kontrovers diskutiert. Kinetische Studien zeigen, dass die Reaktion bei gesättigten Konzentrationen von Azid und Alkin

nach zweiter Ordnung in Bezug auf die Kupferkonzentration erfolgt. Diese Abhängigkeit von Kupfer deutet auf eine Zwischenstufe mit zwei Kupfer Ionen hin.^[116] Diese Theorie wurde durch massenspektroskopische Untersuchungen bestätigt^[117] und ein möglicher Mechanismus durch DFT-Berechnungen vorgeschlagen (siehe Abbildung 2.14).^[118]

Kupfer(I) begrenzt allerdings die Anwendung in biologischen Systemen, da es zytotoxisch ist und zur Denaturierung von Proteinen führen kann.^[119] Daher wurden Liganden entwickelt, die nicht nur die Toxizität mindern, sondern auch das oxidationsempfindliche Cu (I) stabilisieren. Dadurch sind ebenfalls geringere Arbeitskonzentrationen notwendig.^[120] Das führte dazu, dass die CuAAC hauptsächlich in fixierten Zellen,^[121-123] und in verschiedenen „-omics“ Untersuchungen^[124-126] zur bioorthogonalen Markierung verwendet wurde.

2.2.4 SPAAC

Die Verwendung von gespannten Dreifachbindungen ermöglicht den Verzicht auf Kupfer. Die Kohlenstoffe sind bei Alkinen *sp*-hybridisiert und bevorzugen einen Bindungswinkel von 180°. Durch Einbindung der Dreifachbindung in kleine cyclische Systeme kommt es durch die aufgebaute Spannung zu einer erhöhten Reaktivität gegenüber Additionen. Das kleinste stabile, ringförmige Alkin ist Cyclooctin (OCT). Der Abbau der vorherrschenden Ringspannung von etwa 80 kJ/mol^[127] begünstigt auch die Cycloaddition von Aziden. Die erste dieser auch SPAAC (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition) genannten Reaktionen konnten Bertozzi *et al.* Vorstellen (vgl. Abb. 2.15). Die Arbeitsgruppe konnte auch die Eignung von SPAAC zur kupferfreien bioorthogonalen Markierung *in vivo* zeigen.^[128]

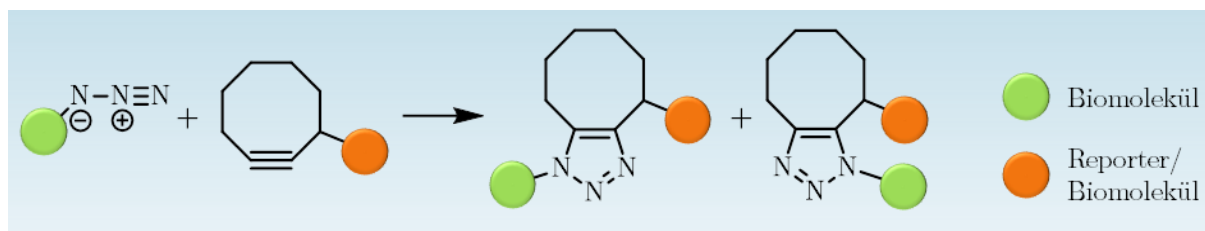


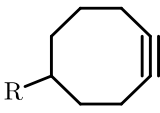
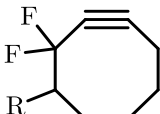
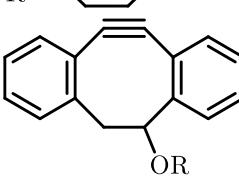
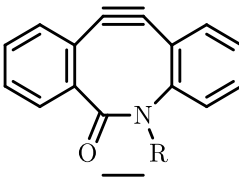
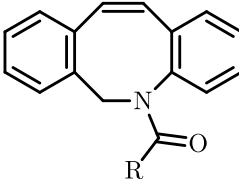
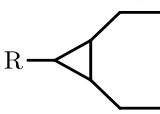
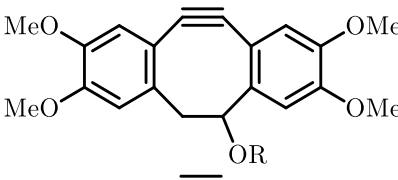
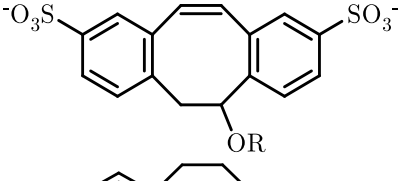
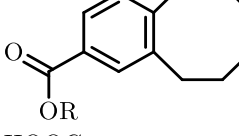
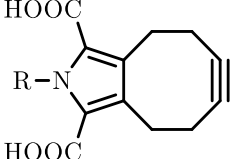
Abbildung 2.15: Durch Abbau von Ringspannung initiierte [3+2] Cycloaddition (SPAAC) mit Cyclooctin (OCT).

Die Idee, den Abbau von Ringspannung als Triebkraft zu nutzen, beruht auf Erkenntnissen von frühen Arbeiten von Wittig und Krebs aus den 60er Jahren.^[129] Die Reaktionsgeschwindigkeit ist gegenüber der kupferkatalysierten Variante um etwa drei Größenordnungen geringer und liegt gleichauf mit der der Staudinger-Ligation. Ebenso ist die Regioselektivität nicht mehr einheitlich. Um die Geschwindigkeit der SPAAC zu verbessern, wurden in den letzten 15 Jahren mehrere reaktivere Cyclooctinderivate vorgestellt, die erfolgreich zur Konjugation von Proteinen,^[130] Zuckern,^[131] Lipiden^[132] und DNA^[133] eingesetzt werden konnten.

Eine Übersicht der Strukturen, Reaktionskonstanten und Syntheseschritten sowie Ausbeuten der verschiedenen Cyclooctin-Derivate ist in Tabelle 2.2 dargestellt und wird im Folgenden genauer diskutiert.

2 Kenntnisstand

Tabelle 2.2: Übersicht über eine Auswahl an Cyclooctinen für die [3+2] Cycloaddition nach van Delft.^[134] Die Reaktionskonstanten sind für vergleichbare Azide in folgenden Lösungsmittel gemessen worden a: CD₃CN, b: CD₃OD oder CH₃OH (3:1), c: CD₃CN/D₂O.

Octin	Kürzel	k [10 ⁻³ mol ⁻¹ s ⁻¹]	Syntheseschritte / (Ausbeute)	Gruppe Jahr
	OCT	2.4 ^a	4 (52 %)	Bertozzi 2004 ^[128]
	DIFO	8.8 ^a	8-10 (1-27 %)	Bertozzi 2007 ^[135]
	DIBO	120 ^c	5 (10 %)	Ning 2008 ^[136]
	BARAC	960 ^a	6 (18 %)	Bertozzi 2010 ^[137]
	DBCO	310 ^b	9 (41 %)	Popik 2010 ^[138] Van Delft 2010 ^[139]
	BCN	140 ^b	4 (15 %)	Van Delft 2010 ^[140]
	TMDIBO	6.0 ^b	7 (57 %)	Leeper 2011 ^[141]
	s-DIBO	112 ^b	7 (13 %)	Boons 2012 ^[142]
	COMBO	235 ^a	6 (11 %)	Kele 2012 ^[143]
	PYRROC	6.0 ^a	11 (83 %)	Berg 2015 ^[144]

Die ersten Versuche reaktivere Cyclooctine zu entwickeln, brachten nur begrenzte Steigerungen der Reaktionsgeschwindigkeit.^[145] Erst durch Einbau von zwei elektronenziehenden Fluorsubstituenten in Propargylstellung (Difluorinated Cyclooctyne, DIFO) konnte eine Steigerung der Geschwindigkeitskonstanten um das 17 bis 63-fache gegenüber OCT oder der Staudinger-Ligation erreicht werden.^[135] Die erste Synthese von DIFO benötigte allerdings zehn Syntheseschritte mit einer Gesamtausbeute um etwa einem Prozent. Um diese Defizite zu beheben, wurden effizientere Synthesen von DIFO entwickelt, die resultierenden die Cyclooctine DIFO-2^[146] und DIFO-3^[147] unterscheiden sich nur durch den Linker vom ersten DIFO. Insgesamt konnten die Syntheseschritte auf acht reduziert und die Gesamtausbeute auf 27 % erhöht werden. Die gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich durch die Absenkung der LUMO-Energieniveaus erklären.

Exkurs Einfluss von Substituenten auf [3+2] Cycloadditionen

Bei [3+2]-Cycloadditionen reagieren ein 1,3-Dipol, hier ein Azid, und ein Dipolarophil, hier ein Alkin miteinander. Die Bindungen kommen durch Wechselwirkungen zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) des einen Reaktionspartners und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) des anderen zustande (vgl. Abb. 2.16). Welcher Reaktionspartner dabei HOMO bzw. LUMO stellt, ist vom jeweiligen Abstand der Orbitalenergien abhängig. Dabei entspricht die Energie des HOMOs der 1. Ionisierungsenergie und die Energie des LUMOs der Elektronenaffinität. Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen HOMO und LUMO sind von der Energiedifferenz dieser beiden abhängig: Je geringer der energetische Unterschied ausfällt, desto stärker sind die Wechselwirkungen und damit auch die Reaktionsgeschwindigkeit.

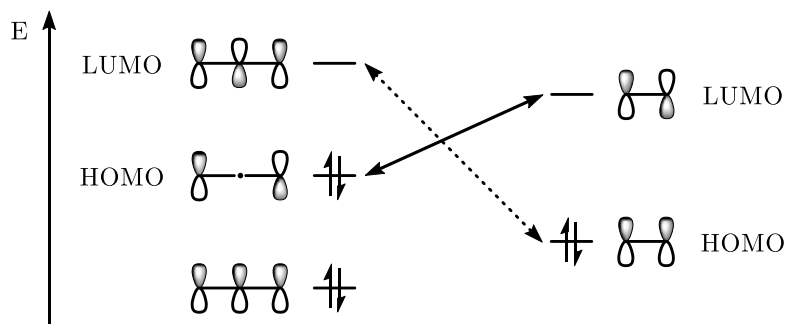


Abbildung 2.16: Molekülorbitalwechselwirkungen der [3+2] Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen. Links: der 1,3-Dipol (das Azid), rechts: das Dipolarophil (das Alkin). Die Reaktion findet zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) des 1,3-Dipols und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) des Dipolarophils statt, da der energetische Abstand zwischen diesen geringer ausfällt als umgekehrt.

Bei elektronenziehenden Substituenten benachbart zum Dipolarophil wird Ladung aus der Bindung abgezogen. Die verbleibenden Elektronen werden dadurch stärker gebunden und infolge sinken sowohl die Energie des HOMOs als auch des LUMOs, da die 1. Ionisierungsenergie steigt bzw. das Molekül leichter Elektronen aufnehmen kann.

Bei DIFO senken die Fluorsubstituenten in Propargylstellung das LUMO des Alkins (Dipolarophil) ab. Quantenchemische Berechnungen zeigen, dass bei weiteren Fluorsubstituenten in der zweiten Propargyl Stellung ein weiterer Geschwindigkeitszuwachs zu erwarten ist.^[148] Solche Cyclooctine ließen sich jedoch bisher synthetisch nicht darstellen.^[147]

Ein anderer Ansatz der parallel von Boons *et al.* verfolgt wurde, ist die Ringspannung zu verstärken. Die Erhöhung der Ringspannung kann durch Annelierung von Aromaten am Cycloctingerüst zum Erfolg führen. Die Dibenzocyclooctinol Derivate (DIBO)^[136] weist dabei höhere Reaktivität als die DIFO-Verbindungen auf. Die Synthese erfordert dabei nur fünf Stufen, allerdings kann dabei lediglich eine Gesamtausbeute von 10 % erzielt werden.

Um ein noch reaktiveres Cyclooctin zu generieren, wurde versucht die Strategien hinter DIFO und DIBO zu kombinieren und sowohl einen anellierten Aromaten als auch zwei Fluorsubstituenten in Propargylstellung einzubringen. Das 2010 von Bertozzi *et al.* dargestellte Modellmolekül neigte jedoch unter Ausbildung eines aromatischen Sechsrings zur Trimerisierung.^[149]

Im gleichen Jahr wurden noch einige weitere Cyclooctin-Derivate vorgestellt. Ebenfalls von Bertozzi *et al.* stammt das Lactam Biaryllazacyclooctinon (BARAC). Der Ring des Cyclooctins in BARAC beinhaltet keinerlei sp^3 -hybridisierten Atome und infolge eine sehr hohe Ringspannung. Die hohe Geschwindigkeitskonstante von etwa $1 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ geht allerdings zu Lasten der Stabilität, wodurch die Einsatzmöglichkeiten stark begrenzt werden.^[137]

Die Verbreitung und Anwendung der meisten vorgestellten Cyclooctine wie DIFO bzw. DIBO sind durch die geringen Syntheseausbeuten eingeschränkt. Mit Azadibenzocyclooctin (ADIBO) respektive Dibenzooazacyclooctin (DIBAC) wurden von den Arbeitsgruppen um Popik^[138] und van Delft^[139] weitere Synthesen von gespannten Cyclooctinen vorgestellt. Bei ADIBO und DIBAC handelt es sich um das gleiche funktionalisierte Cyclooctin, dass allerdings mit unterschiedlichen Linkern funktionalisiert ist. Die Synthese von DIBAC erreicht eine Gesamtausbeute von 41 % über neun Stufen. Von allen bisher entwickelten stabilen Cyclooctin-Derivaten kombiniert DIBAC sowohl eine hohe Reaktivität als auch gute synthetische Zugänglichkeit. Die unter dem Kürzel DBCO (dibenzocyclooctyne) im Handel verfügbare Verbindung findet inzwischen breite Anwendung zur Biokonjugation.^[134]

Ebenfalls 2010 eingeführt wurde Bicyclooctonyne (BCN),^[140] das neben DIBAC das bis heute am meisten verwendete Cyclooctin darstellt.^[134] BCN weist zwar eine etwas geringere Reaktivität als DIBAC auf, besitzt allerdings eine höhere Löslichkeit in Wasser. Da die bioorthogonale Markierung meist im wässrigen Medium stattfindet und

unpolare Moleküle sich unspezifisch in Zellmembranen einlagern können, ist eine gute Löslichkeit in Wasser vorteilhaft, was BCN attraktiver als DIBAC macht.

Um eine höhere Löslichkeit in wässrigem Medium zu erreichen wurden auch neuere DIBO-Varianten entwickelt. Ein Ansatz war hier das Einbringen von polaren Substituenten in die Aromaten. Die bekanntesten Beispiele dafür sind das Tetramethoxy-DIBO (TMDIBO)^[141] und Sulfonyl-DIBO (s-DIBO).^[142] Alternativ wurde versucht den lipophilen Charakter der Verbindung zu reduzieren, indem nur ein Aromat in das Cyclooctin eingebunden wird. Das nach dieser Strategie generierte monobenzylierte Carboxymethylmonobenzocyclooctin (COMBO)^[143] erreicht eine wesentlich bessere Löslichkeit in wässrigen Medien als die dibenzylierten Cyclooctine. Gleiches gilt auch für das 2015 vorgestellte Pyrrolocyclooctin (PYRROC).^[144] PYRROC stellt gleichzeitig das erste Cyclooctin dar, dessen Umsetzung mit Aziden nur zu einem einzigen Stereoisomer führt.

Allgemein sind die Cyclooctinderivate mit höherer Löslichkeit in Wasser allerdings auch gleichzeitig weniger reaktiv in [3+2]-Cycloadditionen. Daher werden zum Erhöhen der Löslichkeit oft Polyglycol-Linker verwendet, um den chemischen Reporter und das Alkin zu verbinden.

Bei Ermittlung der Reaktionskinetiken wurde festgestellt, dass ein Wechsel zu polarerer Lösungsmitteln die Reaktionsgeschwindigkeit der SPAAC im Allgemeinen erhöht.^[136, 140, 150-151] Auch unterschiedliche Pufferlösungen und die Salzkonzentrationen zeigen einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der [3+2]-Cycloadditionen, allerdings fallen diese Einflüsse weniger signifikant aus.^[151] Einen größeren Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante hat die Struktur des Azides: Als Standard für kinetische Messungen hat sich Benzylazid etabliert. Wechselt man hingegen auf direkt am Aromaten gebundene Azide, kann das große Auswirkungen auf die Reaktivität haben. BCN weist bei aromatischen Aziden eine wesentlich höhere

Reaktionsgeschwindigkeit (von $k < 0.5 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ bis zu ca. $2 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) auf, während die von DIBAC abnimmt.^[134] Die Modifikation des Azides ist in der bioorthogonale Markierung ist meist nicht sinnvoll, da die strukturellen Änderungen am Biomolekülanalogon so gering wie möglich gehalten werden sollten, um ein möglichst natürliches Verhalten in biochemischen Prozessen zu ermöglichen.

Neben den Cyclooctinen werden auch Cyclononinen als Reaktionspartner für Azide in der SPAAC untersucht. Cyclononine sind weniger anspruchsvoll in der Synthese, erreichen allerdings aufgrund der geringeren Ringspannung in [3+2]-Cycloadditionen noch nicht die Reaktionsgeschwindigkeiten ihrer achtegliedrigen Gegenstücke.^[147, 152-154]

2.2.5 iEDDA

Unter den bisher entwickelten bioorthogonalen Reaktionen ist die Reaktion zwischen Tetrazinen und Dienophilen diejenige mit den höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten. Die bereits 1959 von Carboni und Lindsey beschriebene Reaktion^[155] ist heute hauptsächlich unter der Abkürzung iEDDA^[156] (*inverse electro demand Diels-Alder addition*) bekannt. Allerdings wird die Abkürzung nicht universell verwendet, auch SPIEDAC^[157] (*strain-promoted inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition*), DA_{inv}^[158] (*Diels-Alder with inverse electron demand*) oder ihDA/rDA^[159] (*inverse electron demand hetero Diels-Alder-retro-Diels-Alder*) werden in der Literatur benutzt, um die gleiche Reaktion zu beschreiben. Die Reaktionsschritte der iEDDA sind in Abb. 2.17 dargestellt.

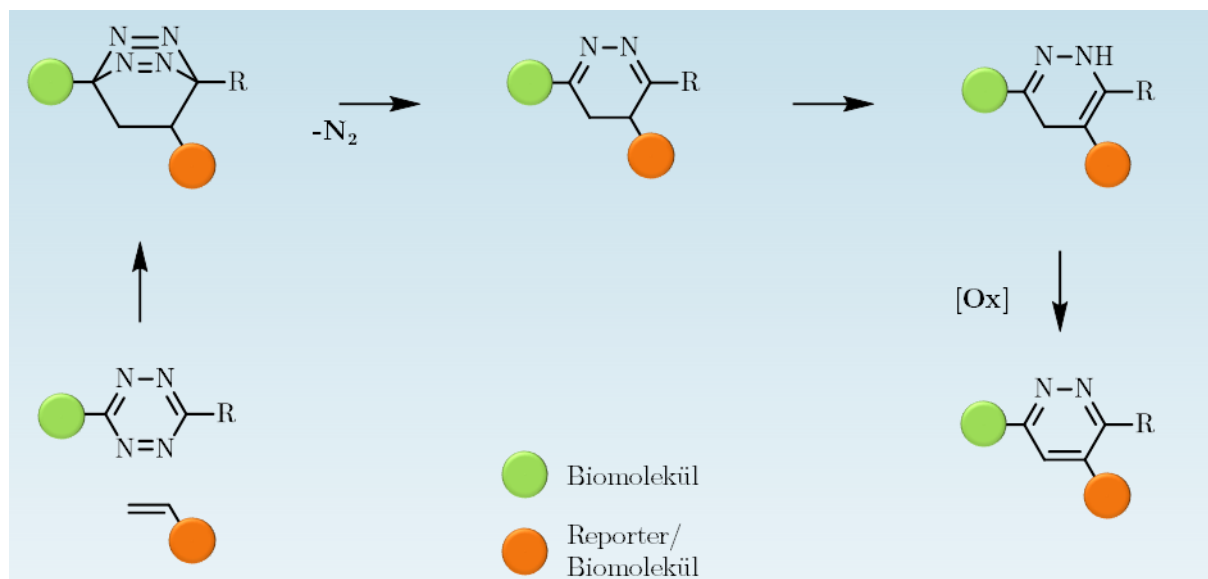


Abb. 2.17: Reaktionsschritte der iEDDA.

Bei der iEDDA reagiert ein Alken mit einem Tetrazin in einer Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zu einem hochgespannten Bicyklus. Nach der [4+2] Cycloaddition folgt eine reverse Diels-Alder Reaktion unter Freisetzung von Stickstoff, dabei bildet sich ein 4,5-Dihydropyridazin. Nach einem 1,3 H-Shift kann durch Oxidation mit Sauerstoff die Rearomatisierung erfolgen.

Ähnlich wie bei der SPAAC wurde an der Struktur der Reaktionspartner geforscht, um die Reaktionsgeschwindigkeiten zu optimieren. Dazu sei auf die wegweisende Arbeit von Sauer *et al.* verwiesen, die sich systematisch mit die Reaktivität unterschiedlicher Alkene mit Tetrazinen beschäftigt.^[160]

Während terminale Alkene noch vergleichsweise niedrige Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen, sind durch den Abbau von Ringspannung der *trans*-Cyclooctene Reaktionsgeschwindigkeiten von bis zu bis 10^3 - 10^6 mol⁻¹/s⁻¹ möglich.^[161-162]

Für diese Geschwindigkeiten muss man zwar größere strukturelle Änderungen der funktionalisierten Biomoleküle in Kauf nehmen, dafür sind SPAAC und iEDDA

weitesgehend orthogonal zueinander und ermöglichen auch Doppelfärbungsexperimente von Aziden und Cycloocten nebeneinander.^[89, 163-164]

2.2.6 Bioorthogonale Marker

Der modulare Ansatz der Clickchemie erlaubt an einem funktionalisierten Molekül die schnelle und einfache Einführung verschiedenster Modifikationen mit guten Ausbeuten. Für die bioorthogonale Markierung können beispielsweise Farbstoffe mit verschiedenen Eigenschaften verwendet werden, um anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht zu werden. Je nach gewünschter Anwendung können Fluoreszenzmarker verwendet werden, die bei unterschiedlichen Emissionswellenlängen emittieren, unterschiedliche Polarität/Hydrophilie aufweisen oder schaltbar sind und sich für ultrahochauflösende Methoden eignen. Hier existiert gerade für die Konjugation von Aziden ein breites Angebot an kommerziellen Produkten (siehe Abb. 2.18).

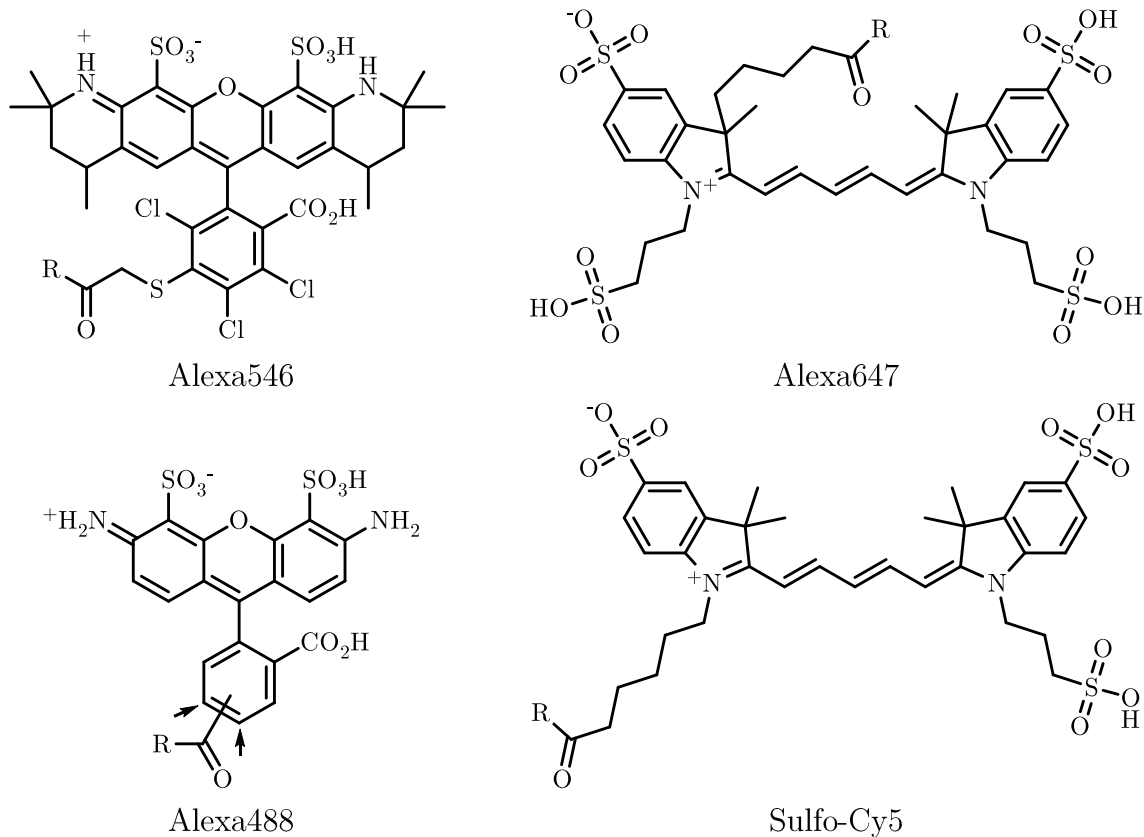


Abbildung 2.18: Häufig verwendete, kommerziell verfügbare Analoga von Rhodamin (links) und Cyanin zur Verwendung als Fluoreszenzfarbstoffe. R steht für über einen Linker gebundene funktionelle Gruppe.^[165]

Zusätzlich wird neben verbesserten Fluoreszenzfarbstoffen mit hohen Quantenausbeuten für verschiedene Emissionswellenlängen^[166] auch an neuartigen Markern geforscht. Beispielsweise an „*turn on probes*“, die erst nach der erfolgreichen Konjugation fluoreszieren^[167] oder an photoschaltbaren Molekülen.^[168]

Die Marker sind dabei nicht nur auf die Anwendung in fluoreszenzspektroskopischen Methoden begrenzt. Zur Konjugation stehen auch Marker zur Verfügung, die den Einsatz in Ramanspektroskopie^[169] oder durch zusätzliche fotoaktivierbare Gruppen die Identifizierung von relevanten Proteinen ermöglichen.^[170] Gerade für den medizinischen Bereich sind auch Proben interessant, die Positronen-Emissions-Tomografie (PET)^[171-172], Einzelphotonen-Emissions-Tomografie (SPECT)^[172] ermöglichen oder als Kontrastmittel für MRI-Untersuchungen dienen können.^[173]

3 Zielsetzung

In den letzten Jahren ist die Bedeutung von Lipiden in der Immunreaktion immer deutlicher geworden. Das gilt in besonders ausgeprägter Form für Sphingolipide, die in der Zell-Zellerkennung und in den Signalkaskaden der Immunantwort eingebunden sind. Die detaillierte Untersuchung von Sphingolipiden, speziell deren Verhalten in Membranen während Infektionen, soll das Verständnis über den Ablauf von Infektionen auf molekularer Ebene vertiefen und zukünftig die Entwicklung von Wirkstoffen und Analysemethoden für die medizinische Anwendung ermöglichen. Die Visualisierung der Lipiddynamiken in der Plasmamembran wurde bisher durch fluorophormodifizierte Lipide ermöglicht, die mit großen strukturellen Veränderungen der natürlichen Struktur einhergehen und damit nur begrenzt repräsentativ sind. Ein Ansatz der bisher viel zum Verständnis von Kohlenhydraten der Glykokalyx in der Zell-Zell-Interaktion und Immunreaktion beigetragen hat, ist die Verwendung von bioorthogonalen Markierungsreaktionen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Konzept der bioorthogonalen Markierung auf Sphingolipide zu übertragen. Es sollten maßgeschneiderte Lipide synthetisiert werden, die in Kooperationen innerhalb der Forschergruppe FOR2123 eingesetzt werden, um die fundamentalen Mechanismen *in vivo* aufzuklären. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung neuer diagnostischer sowie therapeutischer Methoden führen.

Um dies zu erreichen galt es:

- 1) Bioorthogonalfunktionalisierte Sphingoidbasen, Ceramide und Sphingolipidanaloga zu synthetisieren
- 2) Die Position der bioorthogonalen Gruppe zu variieren, um deren Einfluss auf die Markierungsreaktion und die biochemischen Eigenschaften der Lipide untersuchen zu können
- 3) Einsatz der gewonnen Erkenntnisse zur Generierung von Wirkstoffkanidaten gegen multiresistente Erreger und
- 4) Etablierung einer Methode zur Generierung von kovalent Lipidmodifizierten Oberflächen zur zukünftigen Anwendung in diagnostischen sowie therapeutischen Anwendungen.

4 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die chemische Synthese von funktionalisierten Sphingolipiden und Lipidanaloga, mit deren Hilfe die biochemischen Funktionen in menschlichen Zellen untersucht werden können. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten ebenfalls zur Entwicklung von Wirkstoffkanidaten dienen. Die Diskussion der spektroskopischen Daten der wichtigsten Verbindungen ist für vergleichbare Moleküle jeweils am Ende der entsprechenden Unterkapitel zusammengefasst.

4.1 Sphingolipidderivate zur Untersuchung von Lipiddynamiken

Sphingolipide stellen eine Klasse von bioaktiven Lipiden mit vielfältigen Strukturen dar - von einfachen Sphingoidbasen bis zu komplexen Gangliosiden. Neben den strukturgebenden Eigenschaften in Membranen üben Sphingolipide auch signalgebende Funktionen in grundlegenden Prozessen wie Apoptose^[174], Zellwachstum^[175] und -differenzierung^[176] aus. Sphingolipide sind ebenfalls in der Immunreaktion auf bakterielle^[177] und virale^[178] Infektionen eingebunden. Das zentrale Molekül des Sphingolipidkreislaufs stellt Ceramid dar, welches sich strukturell aus einer Sphingoidbase mit acylierter Carbonsäure zusammensetzt, ausführlichere Informationen siehe Kapitel 2.1. Ceramid akkumuliert in Zellmembranen durch die *de novo* Biosynthese, als Abbauprodukt komplexerer Sphingolipide und durch den *salvage pathway* aus Sphingosin. Der Ceramidgehalt wird dabei über ein komplexes Ensemble von Enzymen unter homöostatischen Bedingungen konstant gehalten.^[12, 179] Durch äußere Einflüsse wie Zellstress oder der Aktivierung von Rezeptoren kann es zur

Erhöhung des Ceramidgehalts kommen, wofür vor allem Sphingomyelinasen (SMasen) verantwortlich sind. Durch die Abspaltung der Myelin Kopfgruppe von Sphingomyelin entstehen lokal ceramidreiche Microdomänen, welche lokal die biophysikalischen Eigenschaften der Membran verändern.^[180-183] Diese Mikrodomänen separieren Membranrezeptoren von assoziierten Signalosomen, verändern aber auch die Membrankrümmung und verstärken dadurch die Bildung von exo- und endozytotischen Vesikeln.^[181-182, 184-186]

Untersuchungen mit ceramidspezifischen Antikörpern wurden hauptsächlich an fixierten Zellen durchgeführt, da deren Verwendung zur künstlichen Clusterbildung der Zielmoleküle führen kann.^[187-188] Synthetische, fluorophormodifizierte Ceramidanaloga zur Visualisierung von ceramidreichen Mikrodomänen sind verfügbar wie 6-([N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-dimethyliazol-4-yl)amino] hexanoyl)sphingosin (NBD-C₆-Cer **8**), einem etablierten Golgimarker, der bis heute breite Anwendung findet.^[189-191] Die Fluorophore, die diese Analoga meist in der acylierten Kette gebunden haben, sind allerdings sterisch anspruchsvoll und ändern dadurch die natürliche Membranstruktur.^[192-193]

Voraussetzung für die Untersuchungen von Sphingolipidlokalisation, -transport sowie der Interaktion von Lipiden untereinander beziehungsweise mit Proteinen sind Werkzeuge, welche die Visualisierung der Sphingolipide ermöglichen. Untersuchungen mit ceramidspezifischen Antikörpern wurden hauptsächlich an fixierten Zellen durchgeführt, da die Verwendung von fixierten Zellen zu künstlicher Clusterbildung der Zielmoleküle führen kann.^[187-188] Synthetische, fluorophormodifizierte Ceramidanaloga zur Visualisierung von ceramidreichen Mikrodomänen sind beispielsweise 6-([N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-dimethyliazol-4-yl)amino] hexanoyl)sphingosin (NBD-C₆-Cer **8**, siehe Abbildung 4.1), einem etablierten Golgimarker, der bis heute breite Anwendung findet.^[189-191] Die Fluorophore, die diese Sphingolipidanaloga meist in der acylierten

Kette gebunden haben, sind allerdings sterisch anspruchsvoll und beeinflussen dadurch die natürliche Membranstruktur.^[192-193]

4.1.1 Azidfunktionalisierte Ceramide

Bioorthogonale Konjugationsmethoden lassen sich hervorragend zur Visualisierung von Biomolekülen einsetzen. Der modulare Aufbau dieser Konjugationsmethoden ermöglicht die Verwendung kleiner bioorthogonaler Gruppen in den Biomolekülstrukturen, die selektiv mit verschiedenen Markern konjugiert werden können. Diese chemischen Reportermoleküle können gezielt anhand ihrer Eigenschaften wie Emissionswellenlänge, Quantenausbeute oder Löslichkeit gewählt werden. Zur bioorthogonalen Konjugation steht ein vielfältiges Angebot kommerzieller Farbstoffe zur Verfügung.^[194-198] Bioorthogonale Methoden finden breite Anwendungen zur Visualisierung aller wichtigen Klassen von Biomolekülen wie Kohlehydraten und Proteinen (siehe Kapitel 2.2). Lipide, insbesondere Sphingolipide, sind bisher in diesem Bereich bisher allerdings unterrepräsentiert.^[88]

Über Glycoengineering in *N*-Acetylmannosamin defizienten Zelllinien konnte die Arbeitsgruppe um Kohler azidfunktionalisierte ManNAc Derivate in die Struktur von Gangliosiden einbauen.^[199] Die meisten der bisher vorgestellten Lipidanaloga bauen allerdings auf alkinfunktionalisierten Fettsäuren auf. ^[200-201] Sandbhor *et al.* synthetisierten 2009 bioorthogonal funktionalisierte Analoga von Sphingomyelin und Phosphatidylcholin über eine alkinfunktionalisierte Cholineinheit.^[202] Die Konjugation der endständigen Alkine mit Aziden ist allerdings zur Katalyse auf zytotoxisches Kupfer(I) angewiesen, was ihre Einsatzmöglichkeit *in vivo* begrenzt.^[200] Der Versuch über die Cholineinheit eine Azidfunktion statt der Alkineinheit einzuführen scheiterte

an der begrenzten Stabilität des Precursors N,N-Dimethylazidoethylamin.^[202] Durch die Verwendung von cyclooctinmodifizierten Fettsäuren kann zwar zur Konjugation auf Kupfer verzichtet werden (siehe Kapitel 2.2.4), allerdings bei geringerer Konjugationsgeschwindigkeit und großen strukturelle Änderung im Vergleich zur natürlichen Lipidstruktur.^[200]

Die meisten Visualisierungsuntersuchungen bedienen sich an kommerziell verfügbaren, fluorophormodifizierten Lipiden. Bei Untersuchung von Ceramiddynamiken wird beispielsweise meist auf NBD-C₆-Cer **8** zurückgegriffen. Die meisten der bisher in der Literatur vorgestellten Lipidanaloga bauen auf alkinfunktionalisierten Fettsäuren auf, Beispiele wären hier die Phospholipide **12** und **14**.^[200-201] Die Phosphatgruppe ist hier mit S-Acyl-2-thioethyl (SATE) geschützt um die Aufnahme in die Membran zu erleichtern, siehe Abb. 4.1.

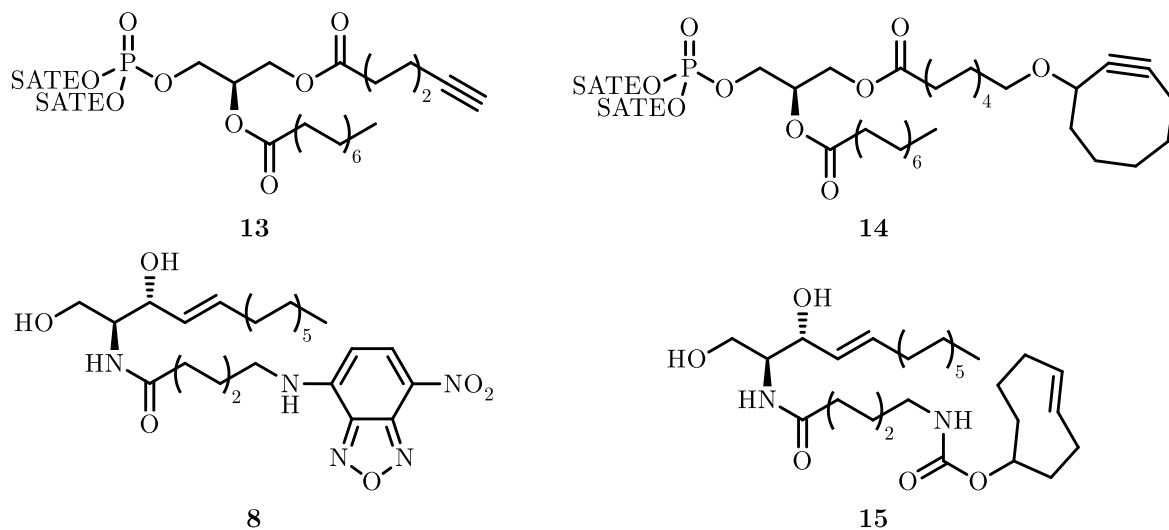


Abbildung 4.1: Auswahl an Lipidanaloga zur Verfolgung von Membrandynamiken. Oben Phospholipide **12** und **14** zur Konjugation von Azidfarbstoffen *via* CuAAC (links) bzw. SPAAC (rechts), unten Golgimarker NBD-C₆-Cer **8** mit vorkonjugiertem Fluorophor und Cer-TCO **15** zur Konjugation von Tetrazinfarbstoffen.

Sandbhor *et al.* synthetisierten 2009 bioorthogonal funktionalisierte Analoga von Sphingomyelin und Phosphatidylcholin über eine alkinfunktionalisierte

Cholineinheit.^[202] Die Konjugation der endständigen Alkine mit Aziden ist allerdings zur Katalyse auf zytotoxisches Kupfer(I) angewiesen, was ihre Einsatzmöglichkeit *in vivo* begrenzt.^[200] Ein Ansatz über die Cholineinheit eine Azidfunktion statt der Alkineinheit einzuführen scheiterte an der begrenzten Stabilität des Precursors N,N-Dimethylazidoethylamin.^[202] Durch die Verwendung von cyclooctinmodifizierten Fettsäuren kann während der Konjugation auf Kupfer verzichtet werden (siehe Kapitel 2.2.4), jedoch sind eine geringere Konjugationsgeschwindigkeit und große strukturelle Änderung im Vergleich zur natürlichen Lipidstruktur die Konsequenz.^[200]

Ohne Katalysator kommt auch das im Jahre 2014 von Erdmann *et al.* vorgestellte *trans*-cyclooctenolmodifizierte Ceramid (Cer-TCO **15**) aus. Die Konjugation des in nahem Infrarot emittierenden Tetrazin Farbstoffes SiR-Tz über eine Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) ermöglichte superhochauflösende Aufnahmen des Golgi-Apparates in lebenden Zellen.^[203] Mit dem Einbringen von *trans*-Cyclooctenol geht hier analog zur Verwendung von Cyclooctin eine starke strukturelle Änderung der natürlichen Lipidstruktur einher.

Azidmodifizierte Sphingolipide wurden bisher kaum eingesetzt, einzig über eine Modifikation der Kopfgruppe. Über Glycoengineering in *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) defizienten Zelllinien konnte die Arbeitsgruppe um Kohler azidfunktionalisierte ManNAc-Derivate in die Struktur von Gangliosiden einbauen und über Konjugation mit alkinhaltigen Farbstoffen Nachweisen.^[199]

Aufbauend auf den oben genannten Studien sollten im Rahmen dieser Arbeit konjugierbare Alternativen zu farbstoffmodifizierten Ceramiden wie NBD-C₆-Cer **8** entwickelt werden, die sich *in vivo* zu beliebigen Zeitpunkten zur Visualisierung mit Farbstoffen konjugieren lassen, ohne dabei ihre biochemischen Eigenschaften zu verlieren. Als bioorthogonale Funktion sollte eine Azidgruppe in die ω -Position der

Acyleinheit eingebracht werden. Das Azid sollte bei Verwendung von stark gespannten Cyclooctinen als Konjugationspartnern effiziente Konjugationsraten gewährleisten. Gleichzeitig sollten so die strukturelle Änderung der Ceramide minimiert werden, bei gleichzeitiger Unabhängigkeit von zytotoxischen Katalysatoren. Um die *in vivo* Konjugation optimal zu gewährleisten, sollten die in dieser Arbeit hergestellten Ceramidanaloga gute Einbauraten aufweisen und die zytotoxischen Eigenschaften der natürlichen Ceramide nicht übersteigen.

Retrosynthetische Überlegungen zu azidfunktionalisierten Ceramiden

Eine gängige Methode zur Darstellung fluorophormodifizierter Sphingolipide ist die Amidbildung zwischen Sphingosin **1** und einer fluorophormodifizierten Carbonsäure. Dabei bleibt das β -Hydroxyamidmotiv erhalten, dass für die meisten biochemischen Eigenschaften von komplexeren Sphingolipiden verantwortlich gemacht wird.^[204] Über den gleichen Ansatz sollten azidmodifizierte Ceramidanaloga über entsprechende Carbonsäuren generiert werden. Dabei sollte analog zu NBD-C₆-Cer **8** von einem ω -azidmodifizierten Derivat der Capronsäure (C₆) ausgegangen werden sowie von einem ω -azidmodifizierten Derivat der Palmitinsäure (C₁₆), der häufigsten Carbonsäure in natürlichen Ceramiden. Die azidmodifizierten Carbonsäuren sollten vorher aus kommerziell verfügbaren Carbonsäurederivaten hergestellt werden. Retrosynthetische Überlegungen zu azidfunktionalisierten Ceramiden sind Abb. 4.2 gezeigt.

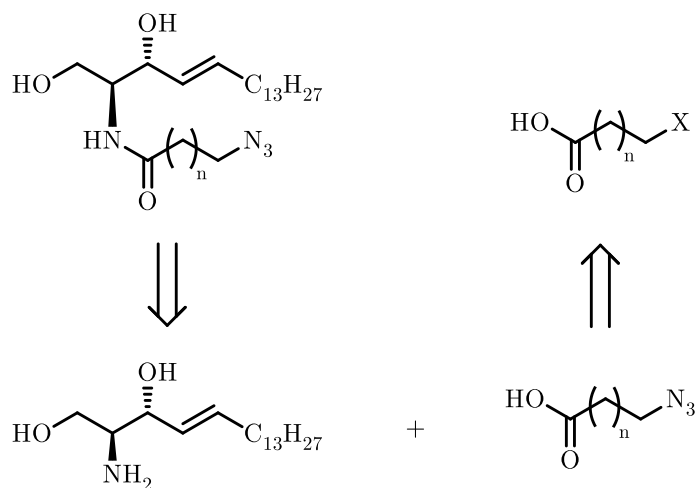


Abbildung 4.2: Retrosynthese der in ω -Position azidfunktionalisierten Ceramidanaloga. X entspricht einer funktionellen Gruppe.

4.1.2 ω -Azidoacylceramide

Zur Herstellung der in ω -Position funktionalisierten Ceramide wurden zuerst die azidmodifizierten Analoga von Capronsäure und Palmitinsäure synthetisiert und anschließend mittels carbodiimidvermittelten Amid-Kupplung mit Sphingosin zum jeweiligen Azido-Ceramid umgesetzt (vgl. Abb. 4.3)

4 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse

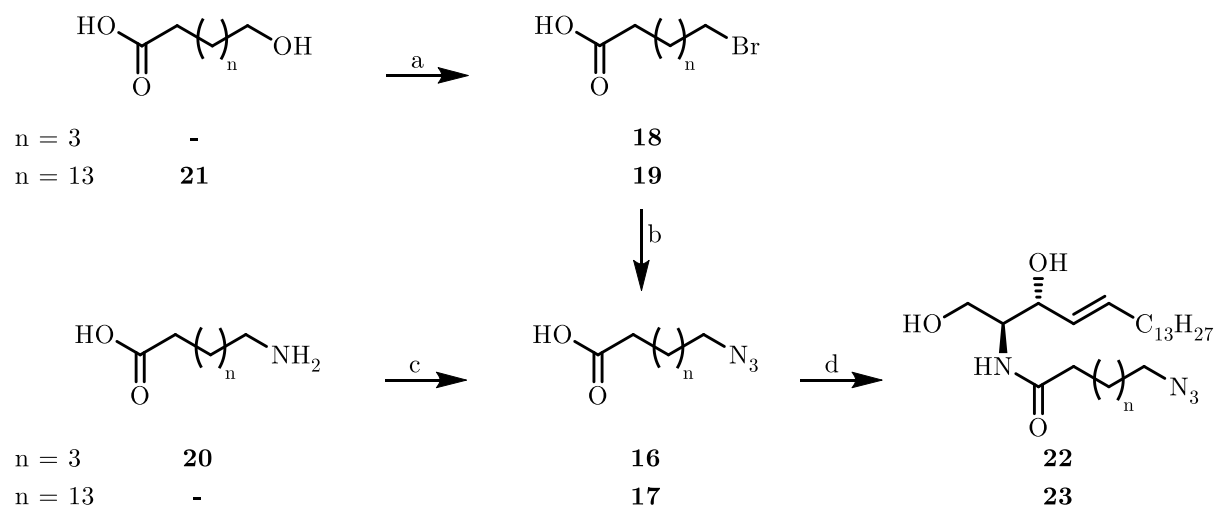


Abbildung 4.3: Synthese der in ω -Position azidmodifizierten Ceramidanaloga auf Sphingosinbasis. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 48 % HBr, AcOH, Reflux, 24 h, 92 %. b) NaN_3 , DMF, 70 °C, 24 h, 99 % (**16**), 99 % (**17**), c) TfN_3 , CuSO_4 , K_2CO_3 , MeOH/ H_2O , RT, 16 h, 99 % (**16**), d) Sphingosin **1**, EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h, 87 % (**22**), 99 % (**23**).

Die azidmodifizierten Carbonsäuren **16** und **17** wurden über die in ω -Position bromierten Vorstufen **18** und **19** *via* $\text{S}_{\text{N}}2$ -Substitution synthetisiert. Dazu wurden die bromierten Carbonsäuren 24 h mit 2 Äq. Natriumazid bei 70 °C in Dimethylformamid (DMF) gerührt. Höhere Reaktionstemperaturen führten zu teilweiser Zersetzung und in Folge zu erschwerter Aufarbeitung und geringeren Ausbeuten. Neben der massenspektrometrischen Charakterisierung und Dünnschichtchromatographie zeigten vor allem die Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum die erfolgreiche Substitution an. Dabei verschiebt sich das Signal des ω -Kohlenstoffes von etwa 34 ppm ($-\text{CH}_2\text{Br}$) nach etwa 51 ppm ($-\text{CH}_2\text{N}_3$). In ersten Synthesen wurde zudem die ω -Azidocaprinsäure **16** über Trifluormethansulfonsäureazid (TfN_3) aus ω -Aminosäure **20** synthetisiert. Aus Verfügbarkeitsgründen wurde das Bromid **19** teilweise aus ω -Hydroxypalmitinsäure **21** hergestellt. Dazu wurde die Hydroxypalmitinsäure 24 h in wässriger 48%iger HBr-Lösung refluxiert. Als Aufarbeitung reichte hier die Umkristallisation aus Cyclohexan. Die Azido-Ceramide $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **22** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** wurden anschließend über die 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) vermittelte Amid-Kupplung in Dichlormethan (DCM) hergestellt. Bei der unter basischen Bedingungen stattfindenden

Reaktion diente 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Katalysator um sehr milde Reaktionsbedingungen zu ermöglichen. Die Ansätze gingen dabei von maximal 50 mg Sphingosin **1** aus. Das Lösemittel wurde nach Vollendung der Reaktion bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch gereinigt. Versuche, bei denen die Reaktionslösung zuerst mit wässrigen, basischen und saureren Lösungen gewaschen wurde, erreichten nur Ausbeuten von maximal 81 %. Die ausführliche NMR-Charakterisierung der Ceramidanaloga ist in Kapitel 4.1.9 beschrieben.

4.1.2.1 Lipiddynamiken von ω -Azidoacylceramiden während T-Zellaktivierung

Großer Bedarf für Werkzeuge zur Visualisierung von Lipiddynamiken besteht im Bereich der T-Zellaktivierung. Bei T-Zellen reguliert die Bildung von ceramidreichen Mikrodomänen die Signalgebung der T-Zell-Rezeptoren (*T-cell receptor*, TCR). Da die Ausbildung der Mikrodomänen als Antwort auf die Rezeptor-Ligation schnell erfolgt, sind neue Ansätze zur Untersuchung dieser Prozesse in lebenden T-Zellen unabdingbar. Ein vielversprechender Ansatz, um die Lipiddynamiken während der T-Zellaktivierung zu verfolgen, ist Fluoreszenzmikroskopie. Da die meisten bisher verwendeten fluorophormodifizierten Ceramide wie NBD-C₆-Ceramid **8** allerdings durch ihre Toxizität gegenüber menschlichen Zellen in ihrem Einsatz begrenzt sind, wurde in Kooperation mit Dr. Lena Collenburg (Arbeitskreis Prof. Dr. Schneider-Schaulies) die Eignung von ω N₃-C₆-Cer **22** und ω N₃-C₁₆-Cer **23** zur Verwendung in T-Zellaktivierungsstudien untersucht.^[205]

Wie für alle anderen Zelltypen auch induziert eine hohe Konzentration synthetischer, C₂/C₆-Ceramide Apoptose in T-Zellen.^[206-208] Auf gleiche Weise führt die

physiologische ASM-Aktivierung nach Todesrezeptor-Ligation durch die Freisetzung von Ceramiden zur Störung der TCR-Signalgebung.^[209-210] Unter anderen physiologischen Bedingungen scheint die Aktivierung der SMasen, die T-Zellaktivierung zu regeln, was darauf hindeutet, dass sowohl die Gesamtmenge als auch die lokale Anreicherung von Ceramiden streng reguliert werden muss. In den von Dr. Lena Collenburg durchgeführten Toxizitätstests (Abbildung 4.4) erweist sich ω N₃-C₆-Cer **22** als ungiftig und daher geeignet zur Verfolgung von Lipiddynamiken in menschlichen Zellen.

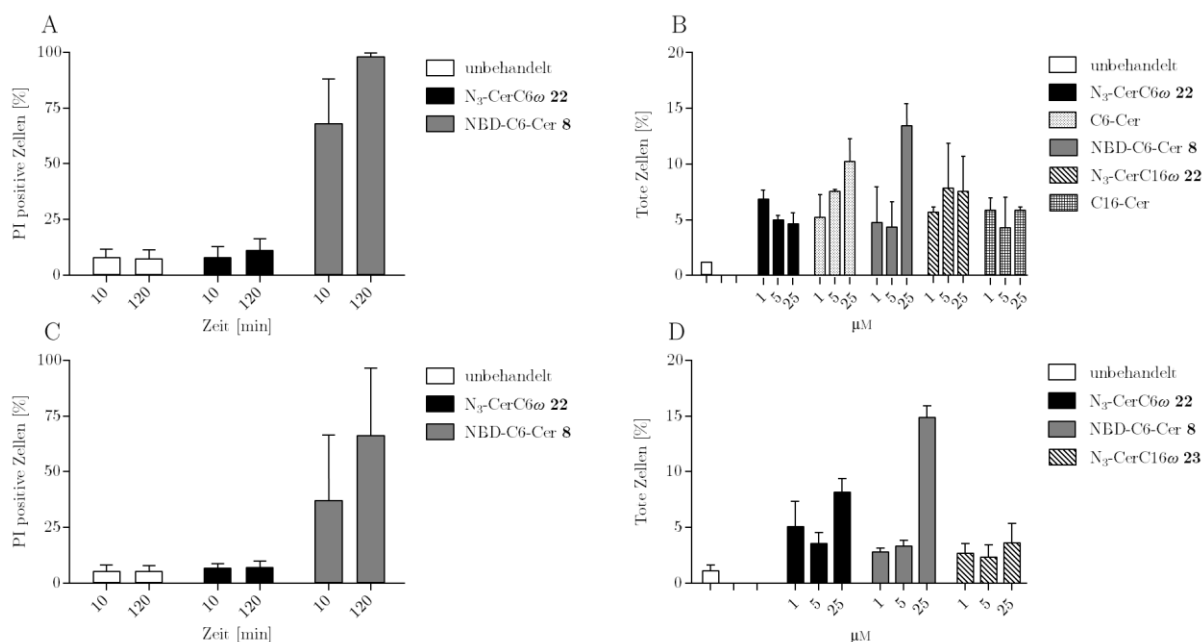


Abbildung 4.4: Toxizitätsuntersuchungen zu azidmodifizierten Ceramiden Links: ω N₃-C₆-Cer **22** in Jurkat- (oben) und primären T-Zellen (unten). Jurkatzellen (A), primären T-Zellen (C) die wurden unbehandelt (weiße Balken) oder mit 25 mM ω N₃-C₆-Cer **22** (schwarze Balken) bzw. mit 25 μ M NBD C₆-Cer **8** (graue Balken) für die angegebene Zeit bei RT inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der toten Zellen ermittelt (Durchschnittswerte aus drei Versuchen mit Standardabweichungen, Differenzierung *via* Propidiumiodid-Färbung). Rechts: konzentrationsabhängige Toxizitätsuntersuchungen: Die Jurkat- (B), primären T-Zellen (D) wurden mit jeweils 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M der angegebenen Verbindungen für 30 min inkubiert, gewaschen und anschließend die Zellviabilität mittels Viability Dye 780 Farbstoff bestimmt. Die Untersuchungen wurden von Dr. Lena Collenburg durchgeführt. Copyright 2016. The American Association of Immunologists, Inc.^[205]

Die Aufnahme des Ceramidanalogs **16** durch die Zellen wurde mittels Massenspektrometrie genauer untersucht, unabhängig von der Konjugation mit

Farbstoffen. In den vom Arbeitskreis Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Uni-Potsdam) durchgeführten Versuchen zeigt sich, dass nach 25 Minuten etwa 70 % der Lipide von den primären T-Zellen bzw. Jurkat Zellen aufgenommen wurden.^[205]

Anschließend untersuchte Dr. Lena Collenburg die Möglichkeit zur Konjugation der Ceramidanaloga **16** und **23** mit Farbstoffen nach deren Einbau in die Zellmembran. Die azidmodifizierten Ceramide $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** wurden nach Fütterung an Jurkat- und primären T-Zellen mittels SPAAC mit Farbstoffen konjugiert. Dabei zeigten Versuche mit $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** lediglich ein sehr geringes Fluoreszenzsignal, wohingegen $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** ein hohe Signalintensität aufweist. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse mit $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** diskutiert. Der Einfluss der Position der Azidgruppe in unterschiedlichen langen acylierten Fettsäuren wird in Kapitel 4.1.3.1 genauer beschrieben. Das azidmodifizierte Ceramid $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** wird effizient in die Membran von lebenden T-Zellen eingebaut, und kann 5 min nach Konjugation mit Farbstoff detektiert werden. $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** konnte in Plasmamembranmikrodomänen und proximalen Vesikeln von ruhenden T-Zellen detektiert werden (Abbildung 4.5). Da manche Farbstoffe durch Diffusion in die Plasmamembran zu unspezifischer Fluoreszenzfärbung neigen, wurde eine Auswahl von SPAAC-fähigen Farbstoffen auf unspezifische Hintergrundsignale untersucht. DIBO 488 und DBCO-Sulfo-Cy5 wiesen dabei keine Membrangängigkeit auf und sind somit geeignet für *in vivo* Untersuchungen. Quantifizierende massenspektrometrische Untersuchungen zeigten ebenfalls die gute Aufnahme von $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** in Jurkat T-Zellen.

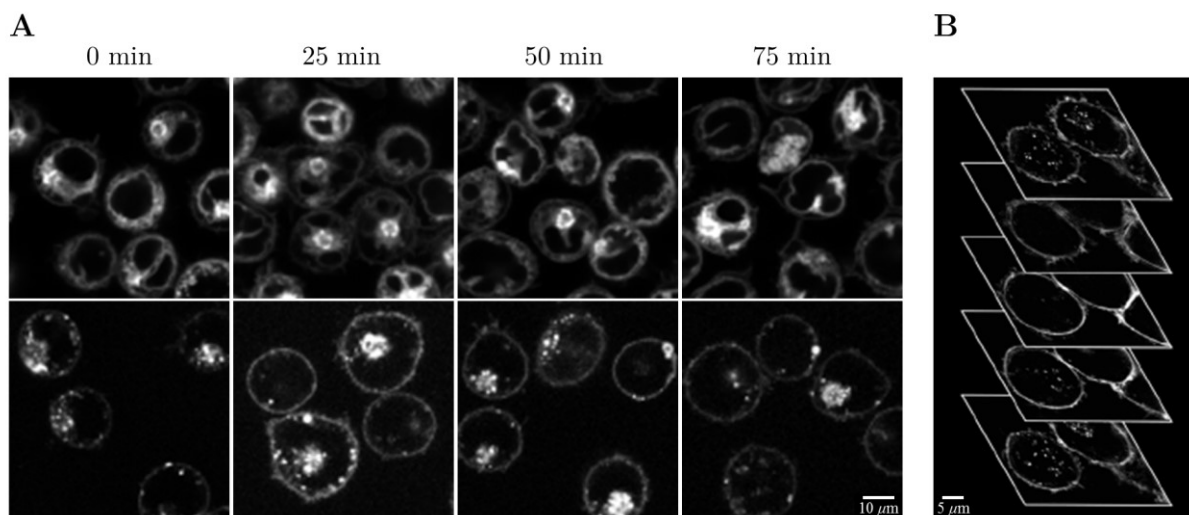


Abbildung 4.5: Konfokale Mikroskopaufnahmen von Jurkat T-Zellen. (A) NBD-C₆-Ceramid (oben, 5 μ M) und ω N₃-C₆-Cer **22**, konjugiert mit DIBO-488 (unten, 25 μ M) wurden über die Zeit aufgenommen. (B) Einzelaufnahmen von SIM z-Ebenen von Jurkat T-Zellen. Die Aufnahmen wurden von Dr. Lena Collenburg durchgeführt. Copyright 2016. The American Association of Immunologists, Inc.^[205]

Selbst nach Stimulierung der T-Zellen kann ω N₃-C₆-Cer **22** 5 min nach Konjugation mit Farbstoff detektiert werden (Abbildung 4.6). Die Stimulation erfolgte dabei mittels des Membranproteins α CD6 und dem Antikörper CD28. CD28-Ligation ist hier von besonderem Interesse, da diese die ASM-Aktivierung fördert und damit ebenso die Freisetzung von Ceramiden, die sich in Mikrodomänen auf der Außenseite der Membran anreichern. Nach TCR- und speziell CD28-Ligation, zeigt sich, dass sich ω N₃-C₆-Cer **22** in Clustern ansammelt. Diese Cluster erscheinen als membran-nahe vesikuläre Strukturen, die wahrscheinlich ceramidangereicherte endozytierte Domänen darstellen (Abbildung 4.6).

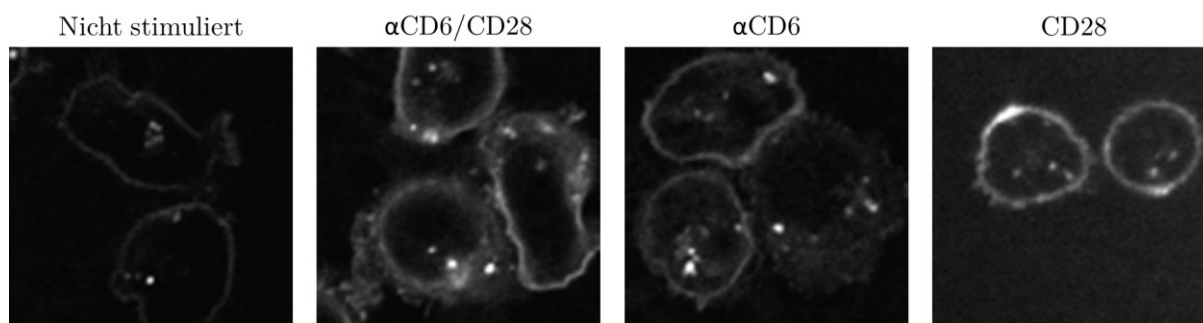


Abbildung 4.6: primäre T-Zellen wurden mit $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** gefüttert ($25\ \mu\text{M}$), 15 min durch die jeweiligen angegebene Antikörper/Proteine stimuliert bzw. nicht stimuliert und gleichzeitig mit DIBO 488 konjugiert. Die Aufnahmen wurden von Dr. Lena Collenburg durchgeführt. Copyright 2016. The American Association of Immunologists, Inc.^[205]

Durch die hohe Dynamik der Sphingolipide und deren Verteilung in Membranen, besteht ein hoher Bedarf an nicht-toxischen Ceramidanaloga für die schnelle Detektion in Lebendzelleexperimenten. Die beschriebenen Studien zeigen, dass $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** alle wichtigen Anforderungen für *in vivo* Konjugation erfüllt: **22** ist nicht toxisch für T-Zellen, wird effizient in dieselben eingebaut und kann anschließend mittels SPAAC effizient *in vivo* markiert werden. Dabei wirkt sich **22** auch nicht störend auf die T-Zellaktivierung aus und kann auch nach Stimulierung noch mit Farbstoffen konjugiert werden. Das in dieser Arbeit synthetisierte $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** ist somit ein erfolgversprechendes Ceramidanaloga, um Lipiddynamiken zu visualisieren. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob und wie die Verbindungen weiter metabolisiert bzw. enzymatisch transformiert werden.

4.1.3 α -Azidoacylceramide

Das langkettige Azido-Ceramid $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** zeigte nach Fütterung an Zellen und anschließender Farbstoffkonjugation ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal (siehe Kapitel 4.1.2.1). Daher wurde vermutet, dass die Aklylkette mit der Azidfunktion tief

anschließend über die EDC- vermittelte Amidkupplung in DCM hergestellt. Da racemische Fettsäurederivate eingesetzt wurden, ergeben sich für die hergestellten α -Azidoacylceramide Epimergemische. Die ausführliche NMR-Charakterisierung der Ceramidanaloga ist in Kapitel 4.1.9 beschrieben.

4.1.3.1 Einbau- und Visualisierungsstudien funktionalisierter Ceramide

Die azidfunktionalisierten Ceramide α N₃-C₆-Cer **28**, ω N₃-C₆-Cer **22**, α N₃-C₁₆-Cer **29** ω N₃-C₁₆-Cer **23** unterscheiden sich in Kettenlänge der acylierten Säuren, beziehungsweise in der Position, an der die Azidfunktion gebunden ist (siehe Abbildung 4.8).

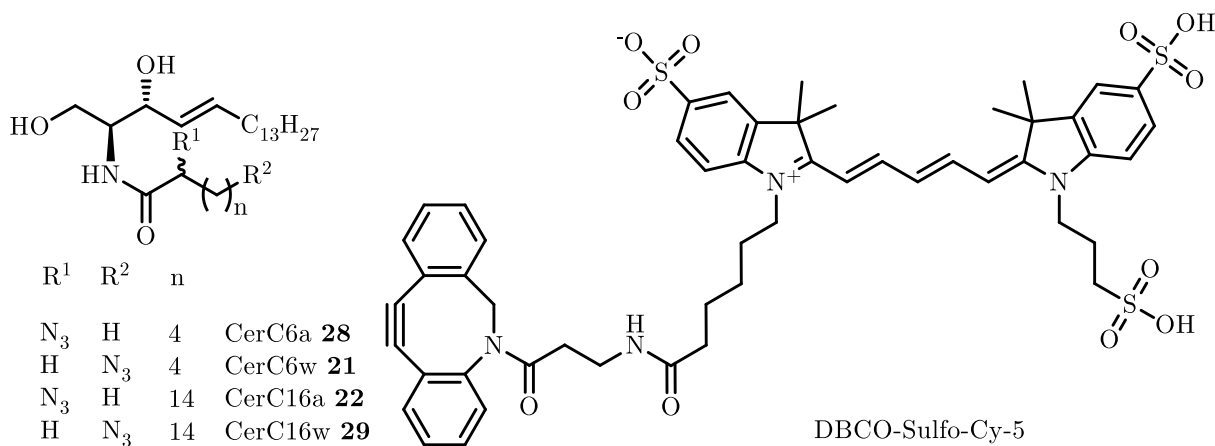


Abbildung 4.8: Strukturen der verwendeten Azido-Ceramide (links) und des zur Konjugation verwendeten Farbstoffes DBCO-Sulfo-Cy5 (rechts).

Die ineffiziente Konjugation von ω N₃-C₁₆-Cer **23** in Zellmembranen (siehe Kapitel 4.1.2.1) zeigte, dass die Unterschiede in Kettenlänge der acylierten Säure und Position der Azidfunktion sich auf die Zugänglichkeit durch die Cyclooctin-funktionalisierten Farbstoffe auswirken. Diese Effekte wurden daher in Kooperation mit dem Arbeitskreis

von Prof. Dr. Markus Sauer mittels Fluoreszenzanisotropie und Löschungsexperimenten genauer untersucht.^[211] Die Fluoreszenzanisotropie ermöglicht Rückschlüsse darüber, wie frei der gebundene/konjugierte Farbstoff rotieren kann. Kommt es durch sterische Wechselwirkung zur Rotationshinderung, beispielsweise mit der Plasmamembran, ergibt sich eine höhere Anisotropie als wenn der Farbstoff ungebunden frei in Lösung rotieren kann. Die Bedingungen der Fluoreszenzlösung wurden so gewählt, dass nur sterisch zugängliche Farbstoffe gelöscht werden, also diejenigen, die aus der Membran heraus präsentiert werden. Die azidmodifizierten Ceramide wurden mittels SPAAC mit DBCO-Sulfo-Cy5 konjugiert, sowohl vor als auch nach Inkubation (*in vivo*) in Jurkatzellen (Abbildung 4.9). Die Färbungsexperimente wurden von Dr. Anne Burgert (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Sauer) durchgeführt.

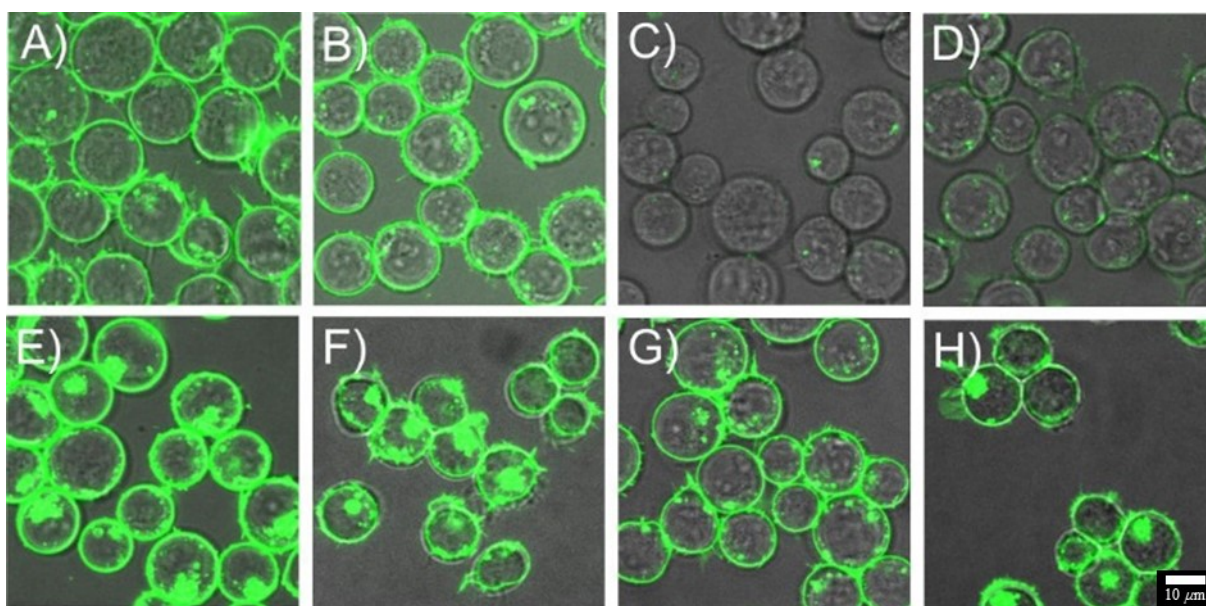


Abbildung 4.9: Konfokale Laserrastermikroskopie-Aufnahmen (*laser scanning microscopy* LSM) von Jurkatzellen nach Fütterung mit azidfunktionalisierten Ceramiden. A bis D: die Zellen wurden mit den Azido-Ceramiden 30 min inkubiert und anschließend für 7 min mit DBCO-Cy5 konjugiert. Die Inkubation erfolgte mit 25 μM (A) $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28**, (B) $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22**, (C) $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** (D) $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23**. Dabei weisen die kurz-kettigen Analoga $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** in der Plasmamembran starke Fluoreszenzsignale auf, während bei den lang-kettigen Analoga nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert wird. E bis F: Die Zellen wurden mit bereits mit Farbstoff konjugierten Derivaten inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min mit 25 μM (E) $\alpha\text{Cy5-C}_6\text{-Cer}$, (F) $\omega\text{Cy5-C}_6\text{-Cer}$, (G) $\alpha\text{Cy5-C}_{16}\text{-Cer}$ (H) $\omega\text{Cy5-C}_{16}\text{-Cer}$. E bis H: Die Zellen zeigen im Vergleich zur *in vivo* Konjugation (A bis D) ein starkes Fluoreszenzsignal, unabhängig von der Ceramidstruktur auf.^[21] Die Aufnahmen wurden von Dr. Anne Burgert durchgeführt.

Die kurz-kettigen Azido-Ceramide $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** zeigen nach der Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5 *in vivo* ein starkes Fluoreszenzsignal (Abbildung 4.9 A und B). Die vorkonjugierten Derivate von $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** weisen - im Vergleich zu den *in vivo* konjugierten Gegenstücken - ein leicht gesteigertes Fluoreszenzsignal auf. Auch zeigen die vorkonjugierten Derivate von $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** eine höhere Tendenz zur Ausbildung innerzellulärer, vesikulärer Strukturen. Die lang-kettigen Azido-Ceramide $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** weisen andere Einbau- und/oder Markierungseigenschaften auf. Während die vorkonjugierten Analoga ein hohes Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran und in innerzellulären vesikulären Strukturen zeigen, weisen die LSM-Aufnahmen des *in vivo*

konjugierten Azido-Ceramids $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** im Vergleich dazu eine nur geringe Signalintensität auf. Die LSM-Aufnahmen von *in vivo* markierten $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** zeigen, dass nahezu keine Membranfluoreszenz detektiert werden kann. Diese Signalintensität ist vergleichbar zu Jurkatzellen, die nur mit dem Farbstoff DBCO-Sulfo-Cy5, aber nicht mit den Azido-Ceramiden, behandelt wurden (vgl. Abb. 4.10).^[211] Folglich eignen sich die kurzkettigen, azidmodifizierten Ceramide **22** und **28** besser für die *in vivo* Konjugation als ihre langkettigen Gegenstücke.

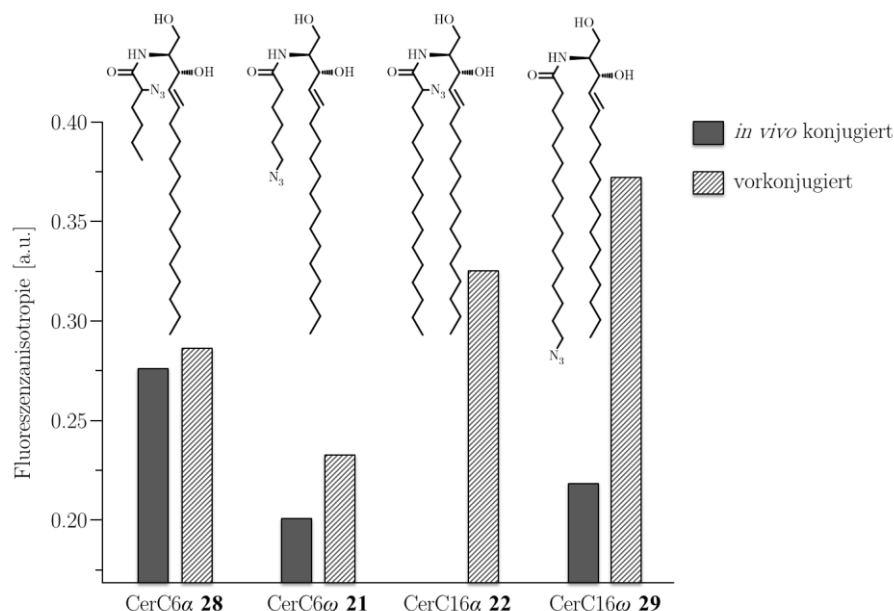


Abbildung 4.10: Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropiewerte der in Jurkatzellen eingebauten und mit DBCO-Sulfo-Cy5 konjugierten Azidoceramide. Die Zellen wurden mit jeweils 25 μM $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28**, $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **21**, $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29**, $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** für 30 min inkubiert und gewaschen. Für die *in vivo* Konjugation wurden die Zellen anschließend 7 min mit 25 μM DBCO-Sulfo-Cy5 behandelt und anschließend die Anisotropie gemessen (graue Balken), die Anisotropie der vorkonjugierten Derivate wurden direkt nach Inkubation gemessen (gestreifte Balken). Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehlern aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils fünf Messungen. Als untere Grenze dient der Gleichgewichts Fluoreszenzanisotropiewert von reinem DBCO-Sulfo-Cy5 in Salzlösung nach Hanks (HBSS-Puffer) von 0.16.^[211] Die Messungen wurden von Jan Schlegel und Andreas Kurz durchgeführt.

Massenspektrometrische Untersuchungen des Arbeitskreises von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Uni Potsdam) zeigen, dass auch die langkettigen Ceramidanaloga gut von

Zellen aufgenommen werden.^[212] Die geringe Signalintensität der LSM-Aufnahmen legt daher die Annahme nahe, dass die Konjugation mit dem DBCO-funktionalisierten Farbstoff mit unterschiedlicher Effizienz erfolgt. Da DBCO-Sulfo-Cy5 nicht in die Zellmembran eindringen kann,^[212] kann die Konjugation nur erfolgen, wenn die azidmodifizierte Acylkette aus der Membran heraus zeigt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden von Andreas Kurz und Jan Schlegel (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Sauer) Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit den vorkonjugierten und *in vivo* konjugierten Azido-Ceramiden durchgeführt. Fluoreszenzanisotropie-Experimente geben Auskunft über Fluoreszenz-Depolarisation, beispielsweise können so Rückschlüsse über die Rotationsfreiheit des Fluorophors gezogen werden. Wenn der Fluorophor an ein Azido-Ceramid konjugiert ist, kann die Anisotropie genutzt werden, um die Interaktion des Farbstoffes mit der Membran und dem Ceramid zu messen. Dazu wurden die Zellen 30 min mit 25 μM der Azido-Ceramide bei 37 °C inkubiert, gewaschen, anschließend mit DBCO-Sulfo-Cy5 konjugiert. Die vorkonjugierten Ceramidanaloga wurden ebenfalls als 25 μM Lösungen für 30 min mit 25 μM der Azido-Ceramide bei 37 °C inkubiert und anschließend die Fluoreszenzanisotropie gemessen. *In vivo* Konjugation zu verschiedenen Zeitpunkten zeigt, dass die Azido-Ceramidkonzentration in der Plasmamembran für die ersten 24 min nach Waschen der Zellen konstant bleibt und die Azido-Ceramide nicht internalisiert werden.^[211]

Die Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie von reinem DBCO-Sulfo-Cy5 in wässriger Pufferlösung beträgt ca. 0.16. Nach Einbau in die Plasmamembran von Jurkatzellen kann für vorkonjugiertes $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** eine höhere Fluoreszenzanisotropie von 0.27 bis 0.28 unabhängig von der Konjugationsmethode beobachtet werden, was auf eine gehinderte Rotation des Farbstoffes hindeutet (Abb. 4.10). In Kombination mit den Intensitäten in den LSM-Aufnahmen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** und sein vorkonjugiertes Gegenstück zwar auf die gleiche Weise eingebaut werden, aber der Einbau des vorkonjugierten Ceramids effizienter erfolgt

(vergleiche Abb. 4.9). Unabhängig, ob die Konjugation vor der Inkubation oder *in vivo* erfolgt, zeigt sich durch eine hohe Anisotropie eine gehinderte Rotation des Farbstoffes, die auf eine teilweise Interaktion mit der Zellmembran von Jurkatzellen hindeutet.

Die Gleichgewichtsanisotropiewerte von 0.20 und 0.23 bei den *in vivo* und vorkonjugierten Varianten von $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** (Abb. 4.10) fallen im Vergleich zu $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** geringer aus und deuten auf eine geringe Rotationshinderung hin. Dieses Ergebnis impliziert, dass die Seitenkette von $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** die meiste Zeit aus der Membran herauszeigt und damit eine bessere Rotation des Farbstoffes ermöglicht. Nur beim vorkonjugierten $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** tendiert der Farbstoff geringfügig stärker dazu mit der Membran zu interagieren. Bei $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** zeigt die Seitenkette mit der Azidfunktion die meiste Zeit aus der Membran heraus und die Seitenkette ist somit für die Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5 verfügbar. Im Fall des vorkonjugierten $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** könnte die Polymethin-Struktur des Farbstoffes die Integration in die Membran erleichtern, und somit zu einer höheren Gleichgewichtsanisotropie führen.

Um die Verfälschung der Werte durch homo FRET-Effekte zwischen den Fluorophoren^[213] auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen der vorkonjugierten Azido-Ceramiden durchgeführt. Die Anisotropiewerte bleiben dabei bei Konzentrationen von 2.5 bis 25 μM konstant. Somit können homo FRET-Effekte als Ursache ausgeschlossen werden.

Die niedrigen Fluoreszenzintensitäten der *in vivo* konjugierten, langkettigen Azido-Ceramide $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** (vgl. Abb. 4.10) deuten darauf hin, dass die längeren Seitenketten die meiste Zeit durch die Plasmamembran abgeschirmt werden und dadurch nicht für die Konjugation mit dem Farbstoff zur Verfügung stehen (Abb. 4.9). Nur bei $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** erweist sich die *in vivo* Konjugation effektiv genug, um Anisotropiemessungen durchzuführen (Abb. 4.10). Die gemessene Gleichgewichtsanisotropie von 0.24 stützt die Theorie, dass die *in vivo* Konjugation nur

dann erfolgt, wenn die Seitenkette mit der Azidfunktion aus der Membran herausragt. Die geringe Anisotropie weist somit gleichzeitig auf eine geringe Rotationshinderung hin. Dagegen weisen Fluoreszenzintensitäten der vorkonjugierten Gegenstücke von $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** auf effiziente Einbauraten hin. Die Gleichgewichtsanisotropiewerte von 0.32. bzw. 0.37 der vorkonjugierten, langkettigen Ceramide weist darauf hin, dass der Farbstoff die meiste Zeit in der Membran verankert ist (Abb. 4.11). Der Anisotropiewert von 0.37 des vorkonjugierten $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** erreicht dabei sogar den eines stationären Dipols.

Um die erhaltenen Informationen über die Lage und die Rotationsfreiheit der Fluorophore weiter zu verifizieren, wurden von Jan Schlegel zusätzlich Fluoreszenzlöschungsexperimente durchgeführt.^[211] Dabei wurden die konjugierten Azido-Ceramide in der Zellmembran von Jurkatzellen mit Tris(2-carboxy-ethyl)phosphin (TCEP) behandelt. TCEP durchdringt die Zellmembran nicht und reagiert spontan mit Cyaninfarbstoffen durch 1,4 Addition an den γ -Kohlenstoff der Polymethinbrücke.^[214] Im Idealfall reflektiert die Löschungseffizienz die Zugänglichkeit zu TCEP und damit den Grad, wie weit die Seitenkette aus der Membran zeigt. Die gewonnenen Ergebnisse sind bis dato schwer zu interpretieren. Die Löschungsexperimente zeigen für die *in vivo* konjugierten Azido-Ceramide $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** eine höhere Löschungseffizienz als die vorkonjugierten Varianten, wahrscheinlich durch die höhere Zugänglichkeit durch TCEP.^[211] Die niedrigste Löschungseffizienz zeigt sich bei den vorkonjugierten $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23**; für **23** ist diese Beobachtung im Einklang mit der Anisotropiemessung (Abb. 4.10). Bei $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** widerspricht das Löschungsexperiment allerdings den Ergebnissen aus der Anisotropiemessung, weiterführende Arbeiten können dazu weitere Erkenntnisse liefern.

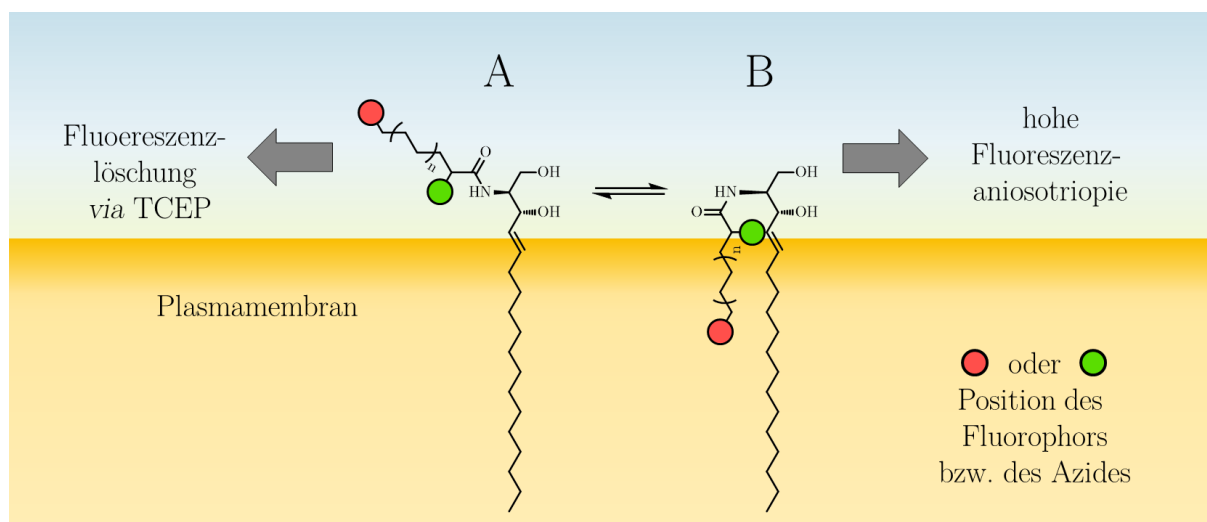


Abbildung 4.11: Einbauschema von Azido-Ceramiden zur Erklärung der unterschiedlichen Zugänglichkeit durch externe Fluoreszenzlöcher bzw. DBCO-Sulfo-Cy5. Nur wenn die Seitenkette aus der Membran zeigt kann DBCO-Sulfo-Cy5 ans Azid konjugiert werden. Wenn der Farbstoff gebunden ist resultiert außerhalb der Membran (A) eine geringere Rotationshinderung als in der Membran (B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die LSM-Aufnahmen und Anisotropiemessungen bestätigen, dass die in dieser Arbeit synthetisierten vorkonjugierten Varianten der Azido-Ceramide **22**, **28**, **23** und **29** alle sehr effizient in die Plasmamembran von Jurkatzellen eingebaut werden und sich stärker in intrazellulären Strukturen anreichern. (Abb. 4.9). Außerdem weisen die vorkonjugierten Azido-Ceramide eine höhere Fluoreszenz-anisotropie auf als ihre *in vivo* konjugierten Gegenstücke. Abhängig von Kettenlänge der acylierten Carbonsäure und der Position des Azides, befindet sich das Fluorophor auf oder in der Plasmamembran. Die beobachteten moderaten bis hohen Rotationshinderungen des Farbstoffes und begrenzenden Zugänglichkeiten von externen Fluoreszenzlöchern bestätigen die Position des Fluorophors. (Abbildung 4.11).

Gleichzeitig zeigen die Experimente mit den *in vivo* konjugierten Gegenstücken, dass die Azidgruppe der langkettigen Ceramide $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** die meiste Zeit für die Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5 nicht zugänglich ist, unabhängig von der Position des Azides (Abb.4.9). Die beiden kurzkettigen Azido-Ceramide

α N₃-C₆-Cer **28** und ω N₃-C₆-Cer **22** lassen sich hingegen unabhängig von der Position des Azides effektiv *in vivo* konjugieren, was darauf hin deutet, dass die Seitenkette die meiste Zeit aus der Membran herausragt (Abbildung 4.11).

4.1.4 Antimikrobielle Wirkung der azidmodifizierten Ceramide

Die rasch steigende Zahl multiresistenter Bakterienstämme ist ein besorgniserregendes Problem der medizinischen Forschung. Das Aufkommen von Antibiotikaresistenzen überwiegt die Entwicklung neuer Antibiotika^[215], was das Interesse an neuartigen Ansätzen zur Behandlung von problematischen Infektionen stark erhöht. Einige natürliche Sphingolipide zeigen wachstumshemmende Wirkung sowohl gegenüber verschiedenen Bakterien als auch gegenüber Pilzen und Mikroalgen;^[216-221] die Inhibitionsrate gegenüber den Krankheitserregern hängt sowohl von der Sphingolipidstruktur als auch vom Stamm der Mikroorganismen ab.^[9] Bisher zeigten besonders Sphingoidbasen vielversprechende antibakterielle Wirkungen.^[222] Beispielsweise berichteten Fischer *et al.* für Sphingosin **1** eine Wirksamkeit gegenüber *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Corynebacterium* Stämmen mit minimalen Hemmkonzentrationen (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) von 1.3 bis 7.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Während in der gleichen Publikation *in vitro* keine Wirksamkeit von Sphingosin **1** gegen *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden konnte, zeigen neuere Studien an Mäusen, dass die Inhalation von Sphingosin vor der Infektion schützen kann.^[223] 2017 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Sphingosin **1** bei Inhalation eine niedrige Toxizität auf den Atemtrakt ausübt, das Potential von **1** als antibakteriellen Wirkstoffkandidaten zur Inhalation wird dadurch unterstrichen.^[25] Die Gruppe von Devi zeigte kürzlich ausgehend von einem azidhaltigen Precursor die Synthese von C₁₂-Sphingalin **30** sowie einiger 1,2,3-Triazolderivate und evaluierte deren antibakteriellen

und antifugalen Eigenschaften.^[224] Das Triazol **31**, das durch die Konjugation von 3-Ethynylphenol generiert wurde, zeigte das größte Potential gegenüber den meisten getesteten Bakterienarten, sowohl grampositive wie -negative. Bei den getesteten grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Micrococcus luteus* konnten MIC Werte von 7.8 bis 3.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ erreicht werden. Ebenfalls vielversprechend ist das ceramidartige Derivat **32**, welches durch die Konjugation von Heptin synthetisiert wurde und über eine zu **31** vergleichbare antibakterielle Wirkung verfügt. Des Weiteren wurden 2009 synthetische Analoga von Sphinganin (Dihydrosphingosin) vorgestellt, die effektiv gegen *Mycobacterium tuberculosis* sind.^[225] Die Analoga **33** und **34** erreichen MIC₅₀ Werte von bis zu 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ und inhibieren auch die Vermehrung von multiresistenten Stämmen. Über den Wirkmechanismus, der diesen antibakteriellen Eigenschaften von Sphingolipiden zugrunde liegt, ist bisher wenig bekannt, obwohl kürzlich Studien darauf hinweisen, dass Sphingosin **1** ultrastrukturelle Schäden in *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* verursachen.^[226] Eine Auswahl antibakterieller Sphingolipide und -analoga mit Angabe der MIC Werte ist in Abb. 4.12 gezeigt.

4.1 Sphingolipidderivate zur Untersuchung von Lipiddynamiken

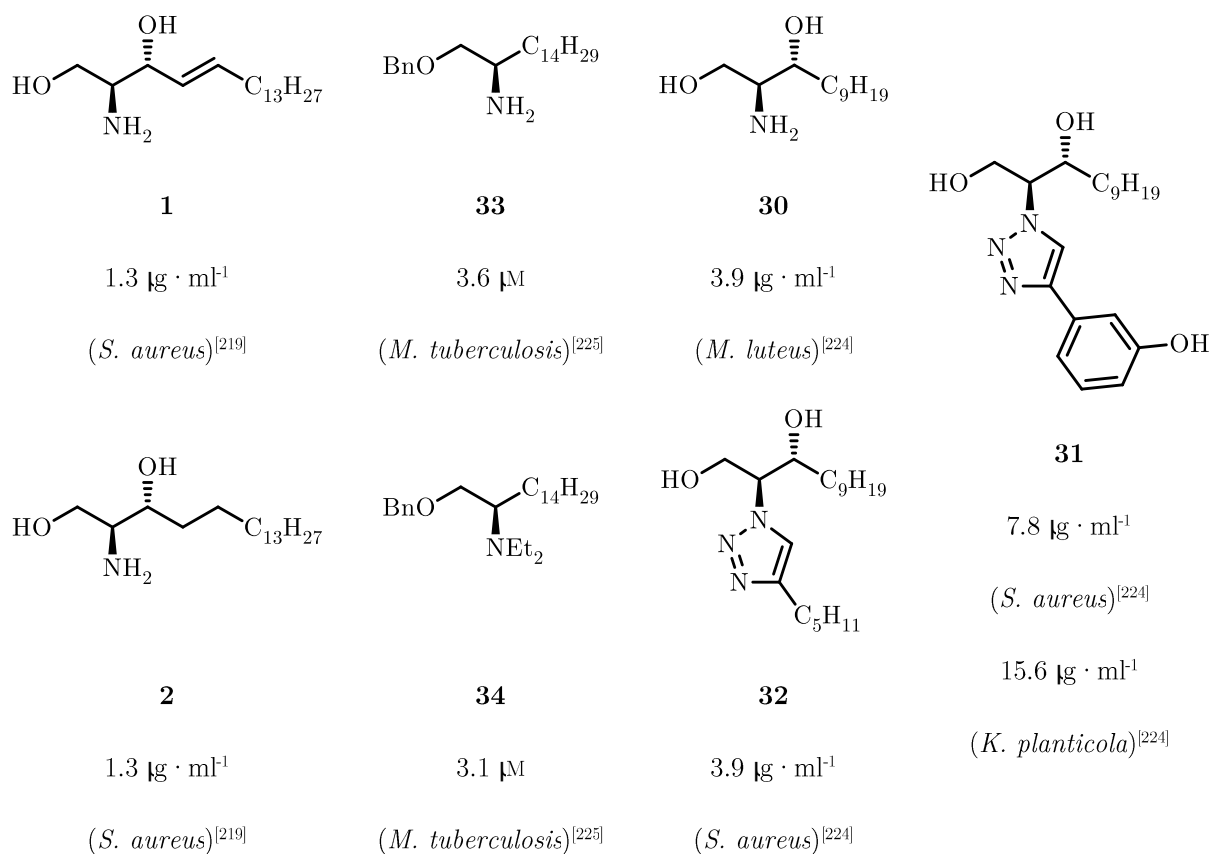


Abbildung 4.12: Antibakterielle Sphingolipide und –analoga mit Angabe ausgewählter MIC Werte. Von links nach rechts: Sphingosin **1**, Sphinganine (Dihydrosphingosin) **2**, Sphinganineanaloga mit Antituberkulotischer Wirkung **33** und **34**, C₁₂-Sphinganine **30** und die Triazolderivate **32** und **31**.

Über die antibakterielle Wirkung von Ceramiden ist im Vergleich zu den Sphingoidbasen wenig bekannt.^[9] Dass Änderungen der Ceramidstruktur einen erheblichen Einfluss auf die Toxizität haben können ist beispielsweise an NBD-C₆-Cer **8** erkennbar. Die azidmodifizierten Ceramide αN₃-C₆-Cer **28**, ωN₃-C₆-Cer **22**, αN₃-C₁₆-Cer **29** und ωN₃-C₁₆-Cer **23** wurden daher auch als Wirkstoffkandidaten entwickelt (vgl. Abb. 4.13). Ihre antibakteriellen Eigenschaften im Vergleich zu ihren unmodifizierten Gegenstücken C₆- und C₁₆-Ceramid **35** bzw. **6** gegenüber *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* sowie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurden in Kooperation mit Jérôme Becam (Arbeitskreis Prof. Dr. Schubert-Unkmeir) im Rahmen dieser Arbeit untersucht.^[227]

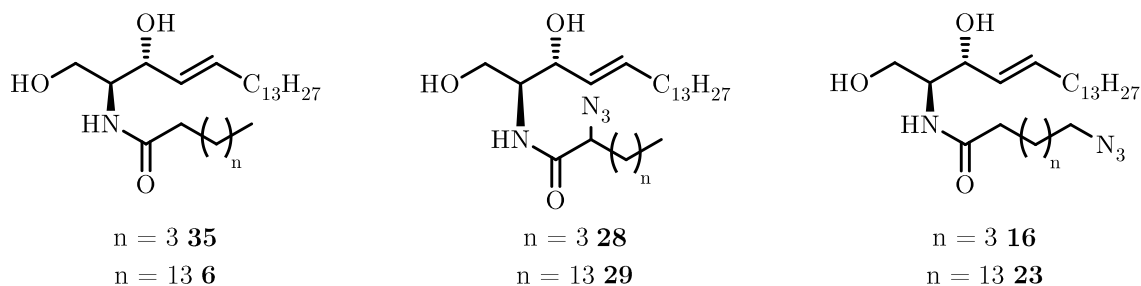


Abbildung 4.13: Ceramide als Wirkstoffkanidaten. Von links nach rechts: C₆-Ceramid **35**, C₆-Ceramid **6**, αN₃-C₆-Cer **28**, ωN₃-C₆-Cer **22**, αN₃-C₁₆-Cer **29** und ωN₃-C₁₆-Cer **23**.

Als exklusiv im Menschen wirkendes Pathogen besiedelt *N. meningitidis* die Atemwege von etwa 10–40 % der gesunden Bevölkerung.^[228-229] In seltenen Fällen kann es jedoch zu fatalen invasiven Infektionen kommen, die zu Blutvergiftungen oder Hirnhautentzündungen führen können, vor allem bei sehr jungen Menschen. *N. gonorrhoeae* ist verantwortlich für Genitaltraktinfektionen (*Gonorrhoe*), die über Blutbahninfektionen verbreitet wird. Bei *N. gonorrhoeae* hat sich in den letzten Jahren ein Stamm entwickelt, der gegenüber den derzeit empfohlenen Antibiotika resistent ist.^[230]

Die antibakterielle Wirkung der Ceramide und Analoga wurde durch die Messung von minimaler Hemm-Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) und minimaler bakterizider Konzentration (*minimal bactericidal concentration*, MBC) bestimmt. In den durchgeführten Experimenten zeigen das azidmodifizierte Ceramid ωN₃-C₆-Cer **22** und das ebenfalls kurz-kettige, nicht azidmodifizierte Ceramid C₆-Cer **35** antibakterielle Wirkung gegenüber den gramnegativen Erregern *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae*. Gegenüber dem ebenfalls gramnegativen Bakterium *E. coli* oder dem grampositiven Bakterium *S. aureus* konnte keine Aktivität festgestellt werden. Die azidmodifizierten Ceramide αN₃-C₆-Cer **28**, αN₃-C₁₆-Cer **29** und ωN₃-C₁₆-Cer **23** weisen hingegen keine signifikanten bakteriziden Eigenschaften auf. Der antibakterielle Effekt von ωN₃-C₆-Cer **22** liegt sogar über dem des nicht modifizierten C₆-Ceramids **35**. Bei der Bestimmung der Abtötungszeit durch die jeweiligen MIC Konzentration konnte

festgestellt werden, dass C₆-Cer **35** das Wachstum nur vorübergehend inhibiert. Lediglich Sphingosin **1** und ω N₃-C₆-Cer **22** führten zur vollständigen Abtötung der *N. meningitidis* Kolonien innerhalb einer bzw. zwei Stunden. Der zusätzliche Umstand, dass **22** keine signifikanten toxischen Effekte auf die Wirtszellen ausübt, macht es zu einem vielversprechenden Wirkstoffkandidat gegen gramnegativen Erregern wie *N. meningitidis*. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: MIC, MIC₅₀ und MBC Werte von Sphingosin **1**, C₆- und C₁₆-Ceramid (C₆-Cer **35** und C₁₆-Cer **6**) sowie der in α und ω Position azidfunktionalisierten Ceramidanaloga (α N₃-C₆-Cer **28**, ω N₃-C₆-Cer **22**, α N₃-C₁₆-Cer **29** und ω N₃-C₁₆-Cer **23**). MIC ist die niedrigste Konzentration, bei der das Wachstum der Bakterien mindestens zu 95 % reduziert ist. MIC₅₀ ist die niedrigste Konzentration bei der das Wachstum der Bakterien mindestens zu 50 % reduziert ist. MBC ist die niedrigste Konzentration bei der das Wachstum der Bakterien vollständig unterbunden wird. Alle Werte sind in $\mu\text{g ml}^{-1}$ angegeben. Die Untersuchungen wurden von Jérôme Becam durchgeführt.^[227]

	<i>N. meningitidis</i>			<i>N. gonorrhoeae</i>		
	MIC	MIC ₅₀	MBC	MIC	MIC ₅₀	MBC
Sphingosin 1	4	1.97	4	4	1.12	8
C ₆ -Cer 35	2	0.69	64	1	0.18	>64
α N ₃ -C ₆ -Cer 28	>64	-	>64	>64	-	>64
ω N ₃ -C ₆ -Cer 22	2	0.8	4	2	0.8	4
C ₁₆ -Cer 6	16	8.39	>64	>64	-	>64
α N ₃ -C ₁₆ -Cer 29	64	16.4	64	32	21	64
ω N ₃ -C ₁₆ -Cer 23	>64	-	>64	>64	-	>64

Neben der Evaluierung der antibakteriellen Eigenschaften wurde zusätzlich die Aufnahme der azidmodifizierten Ceramide durch *N. meningitidis* genauer untersucht. Durchflusszytometrie zeigte bei Behandlung mit jeweils 5 μM der azidmodifizierten Ceramide, dass die kurzkettigen α N₃-C₆-Cer **28** und ω N₃-C₆-Cer **22** sehr gut eingebaut werden, die Einbauraten der langkettigen α N₃-C₁₆-Cer **29** und ω N₃-C₁₆-Cer **23** fiel dagegen geringer aus. LSM-Aufnahmen nach erfolgter Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5 zeigten für alle vier azidmodifizierten Ceramide einen guten Einbau in die

Zellmembran. Aus diesem Grund konnten auch alle vier azidmodifizierten Ceramide in superhochauflösenden Mikroskopieaufnahmen mittels dSTORM^[231] (*Direct stochastic optical reconstruction microscopy*) untersucht werden (vgl. Abb. 4.14). Während bereits gezeigt werden konnte, dass Ceramide in Humanzellen etwa 75 nm große Plattformen bilden,^[232] zeigt sich in Bakterien eine weitestgehend homologe Verteilung.

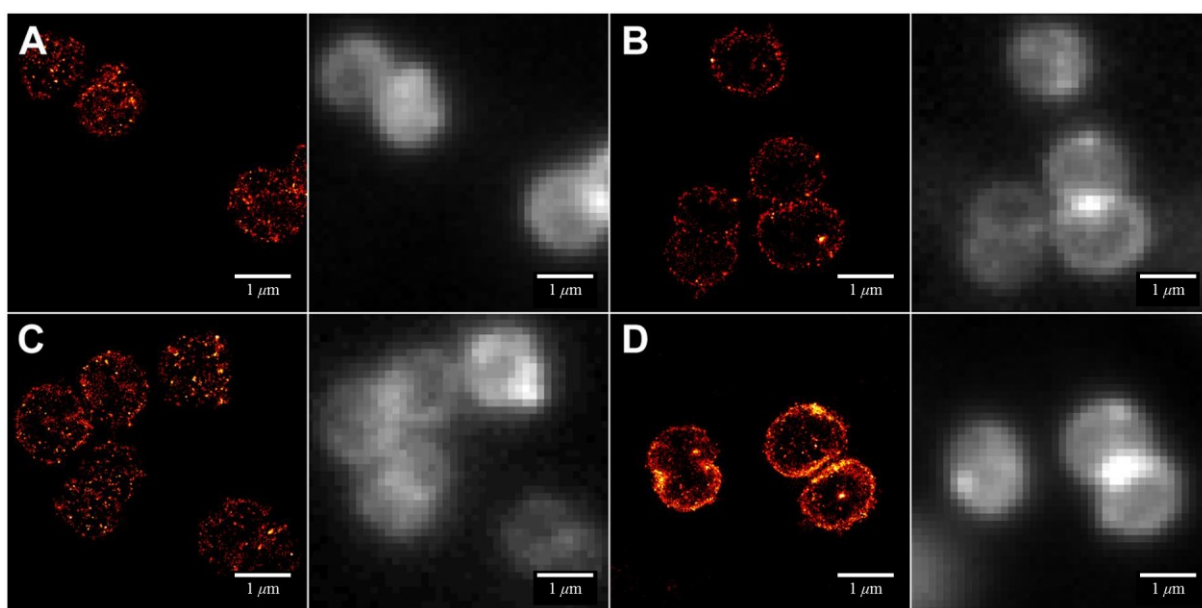


Abbildung 4.14: dSTORM- und die dazugehörigen weitfeld Fluoreszenzaufnahmen von *N. meningitidis* nach Inkubation von (A) $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer } \mathbf{28}$, (B) $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer } \mathbf{22}$, (C) $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer } \mathbf{29}$ und (D) $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer } \mathbf{23}$ und Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5. Die Aufnahmen wurden von Anne Burgert und Jan Schlegel durchgeführt.^[227]

Mit dem in dieser Arbeit synthetisierten $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer } \mathbf{22}$ konnte ein erfolgversprechender Wirkstoffkandidat zur Behandlung von *N. meningitidis* generiert werden, der sich auch zu Lokalisationsstudien eignet und in zukünftigen, systematischen Untersuchungen zur Klärung der Wirkweise von antibakteriellen Sphingolipiden beitragen kann. Die kürzlich vorgestellten 1,2,3-Triazolderivate von C_{12} -Sphinganin $\mathbf{30}$ zeigen, dass durch Konjugation von unterschiedlichen Alkinen die antibakteriellen Eigenschaften von Sphingolipidanaloga noch verbessert werden können.^[224] Über die Konjugation verschiedener Alkine kann $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer } \mathbf{22}$ somit

zukünftig nicht nur zur Klärung der Wirkweise beitragen, sondern eventuell auch als Ausgangspunkt für die Entwicklung noch effektiverer und breiter einsetzbarer Wirkstoffe dienen.

4.1.5 Cyclooctenolfunktionalisierte Ceramide

Mit der erfolgreichen Einführung der azidmodifizierten Ceramidanaloga zur bioorthogonalen Markierung via SPAAC (*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) wuchs auch das Interesse, eine zweite bioorthogonale Funktion im Rahmen dieser Arbeit zu etablieren. Die zweite bioorthogonale Funktion sollte orthogonal zum Azid konjugierbar sein und damit in Zukunft Doppelfärbungsexperimente ermöglichen. Voraussetzungen für den Einsatz *in vivo* sind die Stabilität unter physiologischen Bedingungen, Bioorthogonalität und schnelle Reaktionsraten bei möglichst wenig Nebenprodukten.

Eine Reaktion, die diese Ansprüche erfüllt, ist die Reaktion von Alkenen mit Tetrazinen.^[89, 163-164, 233-234] Dabei handelt es sich um eine Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA, *inverse electro demand Diels-Alder addition*, siehe Kapitel 2.2.5). Niederweiser *et al.* zeigten anhand von Kohlenhydratderivaten, dass terminale Alkene sich sowohl selektiv mit Tetrazinen auf Zelloberflächen konjugieren lassen als auch dass die Konjugation orthogonal zur SPAAC erfolgen kann.^[235] Neuere Untersuchungen verwenden als Alken meist gespannte *trans*-Cyclooctenole, welche mit Reaktionskonstanten bis zu $10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ die bisher schnellste bioorthogonale Konjugationsmöglichkeit darstellen.^[161-162]

Retrosynthetische Überlegungen

Mit den Erfahrungen aus der Synthese und erfolgreichen *in vivo* Konjugation der Azidoceramide dieser Arbeit sollte ferner eine Synthesestrategie etabliert werden, um die Alkeneinheit über die Carbonsäure ins Ceramid einzubringen. Um eine schnelle und effiziente Konjugation mit Tetrazinen zu gewährleisten, sollte mit *trans*-Cyclooctenol eine gespannte Alkeneinheit eingebaut werden. Von Vorteil ist hierbei, dass *trans*-Cyclooctenol die am häufigsten eingesetzte gespannte Alkeneinheit darstellt, wodurch bereits etablierte Synthesestrategien bekannt sind.^[236-237]

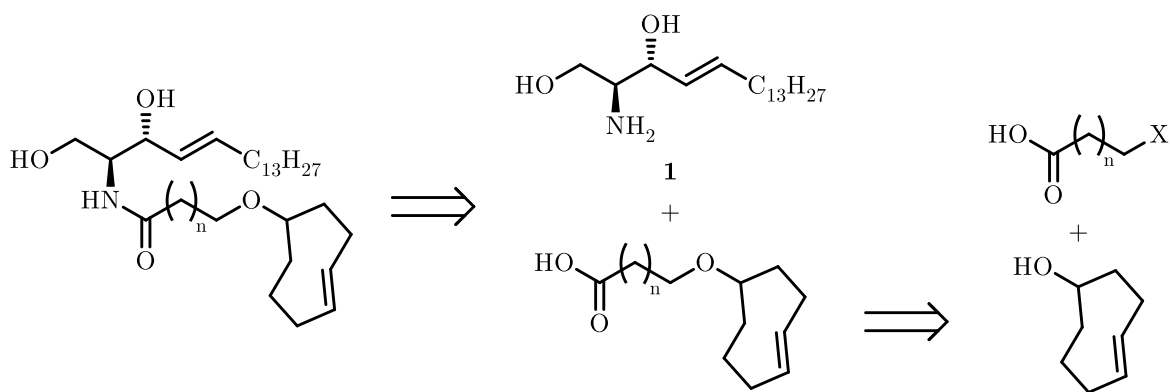


Abbildung 4.15: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung *trans* Cyclooctenol modifizierter Ceramide. X stellt eine funktionelle Gruppe dar.

Analog zu den Azidoceramiden sollte auch die Cyclooctenole über die Carbonsäure in die Ceramide eingebaut werden. Eine Übersicht der retrosynthetischen Überlegungen ist in Abb. 4.15 gegeben.

4.1.4.1 Synthese der *trans*-Cyclooctenole

Zur Synthese der *cis*- und *trans*-Cyclooctenole wurde eine Synthesestrategie von Fox *et al.* [236-237] modifiziert. Zunächst erfolgte hierbei zunächst die Synthese von *cis*-Octenol aus (1*Z*, 5*Z*)Cycloocta-1,5-dien **36**. Anschließend werden die *trans*-Cyclooctenole über eine photochemische Isomerisierung gewonnen (vgl. Abb. 4.16).

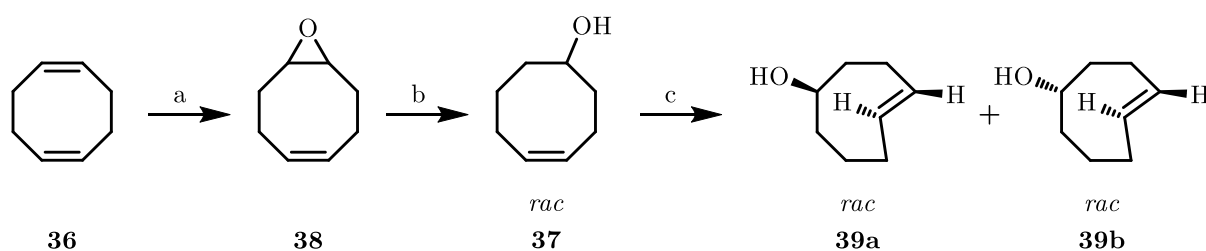


Abbildung 4.16: Synthese von *cis* und *trans*-Cyclooctenol. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *m*CPBA, DCM, RT, 23 h, 56 %; b) LiAlH₄, THF, Reflux, 2 h, 90 %; c) 254 nm, PhCO₂Me, Et₂O/Pentan, RT, 12 % (pro *S*), 11 % (pro *R*).

Zur Herstellung von *cis*-Cyclooctenol **37** wird zuerst das Dien **36** mit 1.5 Äquivalenten *m*CPBA zum Epoxid **38** umgesetzt und anschließend mittels 3.0 Äquivalenten Lithiumaluminiumhydrid zum Alkohol reduziert. *E*-konfiguriertes Cyclooctenol wurde durch Bestrahlung ($\lambda = 254$ nm) im UV-Reaktor hergestellt. Da durch die Bestrahlung ein Gleichgewicht zwischen den Cyclooctenolisomeren erzeugt wird, wurde die Reaktionslösung zudem über eine mit silbernitrat-haltigem Kieselgel gefüllte Säule im Kreislauf gefahren. *E*-Doppelbindungen besitzen eine höhere Affinität zu den Silberionen und werden so dem Gleichgewicht entzogen. *Z*-Cyclooctenol wird wieder der Reaktion zugeführt und anschließend in das *E*-Isomer überführt.^[238] Als Photoaktivator diente Benzoessäuremethylester, um die Energie auf das Alken zu übertragen und die hohe Isomerisierungsbarriere zu überwinden, die bei Cycloocten 35.6 kcal/mol beträgt.^[239] Anschließend wurden die *E*-konfigurierten Cyclooctenole durch Behandlung

mit konzentrierter Ammoniaklösung aus dem silbernitrrathaltigen Kieselgelgemisch gewonnen. *E*-Cyclooctenol besitzt eine planare Chiralität, weshalb bei der Isomerisierungsreaktion die Diastereomere *ret*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** und *ret*-(1*S*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39b** als racemische Gemische gewonnen wurden.

Exkurs planare Chiralität

Wenn in einem Molekül eine Chiralitätsebene vorliegt, ergeben sich zwei Enantiomere. Die Enantiomere unterscheiden sich dabei durch die unterschiedliche Anordnung der verbundenen Atome um diese Ebene. Eine Chiralitätsebene kann bei cyclischen Verbindungen auftreten, die planare Einheiten wie Aromaten oder Doppelbindungen beinhalten. In *trans*-Cycloocten wird diese Ebene zwischen der Doppelbindung und den unmittelbar gebundenen Kohlenstoffen aufgespannt. Durch den Drehsinn der Alkylkette vor der Ebene, können die Enantiomere **40a** und **40b** unterschieden werden (vgl. Abb. 4.17).

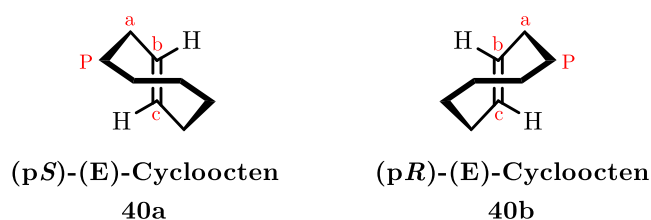


Abbildung 4.17: Bestimmung der planaren Chiralität am Beispiel von *trans*-Cycloocten. In rot dargestellt ist das Vorgehen zur Bestimmung der Enantiomerenkonfiguration. P steht für das Pilotatom, a, b und c sind die Atome aus deren Reihenfolge sich der Drehsinn ergibt.

Nach dem CIP-System wird die der Drehsinn der planaren Chiralität mit *pR* oder *pS* benannt. Am Beispiel von *trans*-Cycloocten wird das Vorgehen zur Bestimmung der planaren Chiralität im Folgenden genauer beschrieben (vgl. Abb. 4.17). Zuerst wird ein

Pilotatom (P) bestimmt. Das Pilotatom muss direkt an einem Atom der Chiralitätsebene gebunden sein und die höchste Priorität aufweisen. Bei *trans*-Cycloocten haben beide möglichen Pilotatome die gleiche Priorität, daher ist es beliebig, welches der beiden möglichen Kohlenstoffatome gewählt wird. Anschließend wird ausgehend vom Pilotatom der Weg zu den Atomen mit der höchsten Priorität innerhalb der Chiralitätsebene verfolgt (a, b und c). Bei einer Drehung im Uhrzeigersinn ergibt sich *pR*, entgegen dem Uhrzeigersinn *pS*.

4.1.4.2 Synthese der cyclooctenolhaltigen Carbonsäurederivaten

Um *trans*-Cyclooctenol modifizierte Ceramide herzustellen, wurde analog zu den azidmodifizierten Ceramiden erst versucht, die entsprechenden cyclooctenolmodifizierten Carbonsäuren zu synthetisieren. Dafür wurde nach einer Synthesevorschrift von Liu *et al.*^[240] NaH in Paraffin vorgelegt, das Paraffin mit trockenem Toluol gelöst, und anschließend in Lösung entfernt. Dann wurde *rel*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** in trockenem Tetrahydrofuran (THF) bei 0 °C zugetropft und anschließend die bromierten Carbonsäuren in trockenem THF bei 0 °C zugetropft und über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Nach der Aufarbeitung konnte jedoch nur nicht reagiertes Cyclooctenol zurück gewonnen werden. Um Carboxylat als konkurrierendes Nucleophil auszuschließen und eine bessere noch Abgangsgruppe als Brom einzuführen, wurden die bromierten Säuren **18** und **19** zuerst zu den Ethylestern **41** und **42** umgesetzt und anschließend über eine Finkelstein-Reaktion in die Iodide **43** und **44** überführt (vgl. Abb. 4.18).

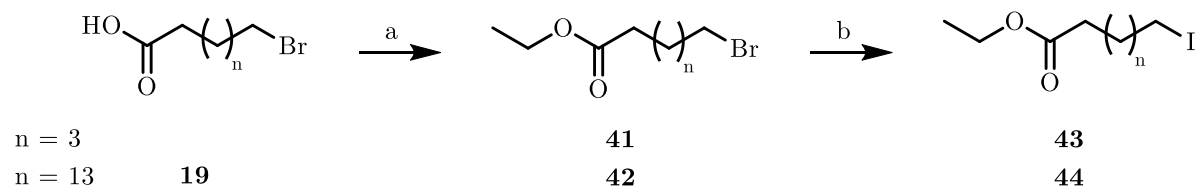


Abbildung 4.18: Synthese der jodierten Säureester. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) EtOH, H₂SO₄, 70 °C, 14 h, 91 % (**41**), quantitativ (**42**); b) NaI, Aceton, Reflux, 20 h, 77 % (**43**), 87 % (**44**).

Anschließend wurde versucht, die jodierten Carbonsäuren in DCM mit *rel*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** mit Pyridin als Base umzusetzen, doch auch über Nacht zeigte die Dünnschichtchromatographie keine Umsetzung an. Daher wurde analog zu den Versuchen mit den freien Säuren NaH in Paraffin vorgelegt, das Paraffin mit trockenem Toluol gelöst, und anschließend in Lösung entfernt. Danach wurde zunächst *rel*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** in trockenem Tetrahydrofuran (THF) bei 0 °C und anschließend die bromierten Carbonsäuren in trockenem THF bei 0 °C zugetropft und anschließend über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Es konnte lediglich nur nicht reagiertes Cyclooctenol zurück gewonnen werden. Als problematisch erwiesen sich hier die vergleichsweise kleinen Ansätze (maximal 100 mg Cyclooctenol) und der Verlust von *rel*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** bei jeder Aufarbeitung. Bei jedem destillativen Entfernen von Lösungsmittel war der unangenehme Geruch des Cyclooctenols im Destillat erkennbar, was die Ausbeuteverluste zusätzlich erklärt.

Als Alternative zu dem oben beschriebenen wurde eine Synthesestrategie von Schepartz *et al.* adaptiert,^[203] bei welcher Alkohole über eine Carbamat-Einheit an Aminosäure verknüpft werden können. Um weitere Verluste an *rel*-(1*R*,4*E*,*pR*)-Cyclooct-4-enol **39a** zu vermeiden, wurde *cis*-Cyclooctenol als Alkeneinheit verwendet. Als Carbonsäureeinheit sollte ω -Aminobutansäure gewählt werden, um die Kettenverlängerung durch die Carbamateinheit auszugleichen (vgl. Abb. 4.19).

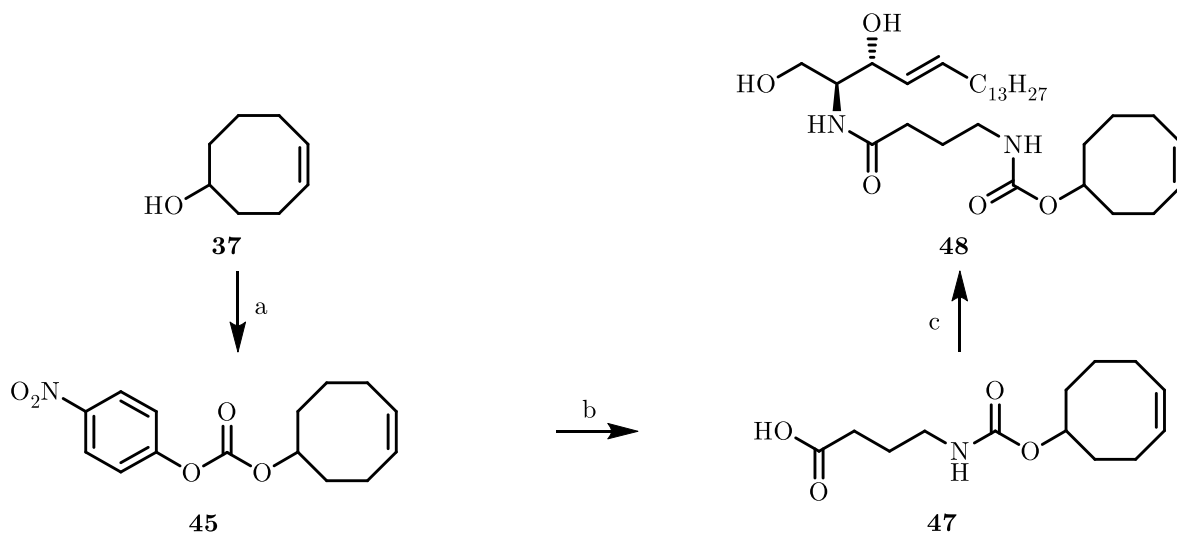


Abbildung 4.19: Synthese von Cyclooctenol funktionalisiertem Ceramid **48**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 4-Nitrophenylchloroformat, Pyridin, DCM, RT, 5 h; b) ω -Aminobutansäure, DIPEA, DMF, RT, 3 d, 34 % über 2 Stufen; c) Sphingosin **1**, EDC, HOBT, DIPEA, DCM, RT, 24 h, 65 %.

Cyclooctenol **37** wurde in trockenem DCM mit 1.5 Äquivalenten 4-Nitrophenylchloroformat unter basischen Bedingungen und unter Lichtausschluss umgesetzt. Anschließend wurde der *p*-Nitrophenolester **45** direkt mit 1.0 Äquivalent ω -Aminobutansäure **46** unter basischen Bedingungen in trockenem DMF umgesetzt, um das Säurederivat **47** zu erhalten. Die begrenzte Stabilität der Nitrophenolestergruppe macht das Arbeiten mit trockenen Lösemitteln unter Lichtausschluss unabdingbar. Die analog zu den Azidoceramiden durchgeführte, carbodiimidvermittelte Amidknüpfung von **47** mit Sphingosin **1** das cyclooctenolmodifizierte Ceramid **48** (vgl. Abb. 4.19).

Ein erster Versuch das Ceramid **48** zur bioorthogonalen Markierung zu nutzen, scheiterte am tetrazinmodifizierten Farbstoff. Der lipophile Tetrazinlinker des Farbstoffes führte zur Einlagerung des Fluorophors in die Zellmembran und damit zu einem unspezifischen, nicht zuordenbarem Fluoreszenzsignal.

4.1.6 Azidfunktionalisierte Sphingoidbasen

Strukturell sind Sphingoidbasen die einfachsten Sphingolipide: Sie stellen zwar das Rückgrat aller Sphingolipide dar, sind aber kein Bestandteil der *de novo* Biosynthese von Ceramiden, sondern werden durch verschiedene Ceramidasen aus diesen gewonnen.^[12] Die häufigsten Sphingoidbasen sind das vor allem in Säugetieren dominierende Sphingosin **46** und das in Pflanzen vorherrschende Phytosphingosin **1**.^[13] Sphingoidbasen haben - wie alle Sphingolipide - signalgebende Eigenschaften. Während freie Sphingoidbasen Proteinkinase C aktivieren und damit Apoptose einleiten^[241], stellen Sphingoidbasen nach Phosphorylierung durch Sphingosinkinasen Mediatoren zur Zellmigration, -differenzierung und -überleben dar.^[242-243] Im Vergleich zu anderen Sphingolipiden ist der natürliche Gehalt von Ceramiden in Membranen geringer, das Verhältnis von Ceramid zu Sphingosin **1** beträgt typischerweise etwa 30:1.^[12] Trotzdem spielen Ceramide eine wichtige Rolle in der Immunreaktion, vor allem bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen der Atemwege.^[244] Einige pathologische Zustände werden Veränderungen im Sphingoidbasenhaushalt zugeschrieben. Zum Beispiel haben Patienten, die an Mukoviszidose leiden, verringerte Sphingosingehälter in den Atemwegen, was die Patienten in Folge auch anfälliger gegenüber anderen bakteriellen Infektionen macht.^[245]

Es existieren nur wenige fluorophormodifizierte Analoga von Sphingosin **1** und Sphingosin-1-Phosphat, die *via* Fluoreszenzmikroskopie Einblicke in deren Abbauwege, Lipiddynamiken, und -transporte ermöglichen könnten. Wie bei den meisten Lipidanaloga werden hier meist BODIPY^[246-247] und NBD^[248] als Farbstoff über den endständigen Kohlenstoff der Alkylkette gebunden. Diese Lipidanaloga finden allerdings hauptsächlich in Enzymassays zur Bestimmung von Sphingosinkinaseaktivitäten Anwendung.

Um das Angebot an Werkzeugen zur Visualisierung von freien Sphingoidbasen zu erweitern, war es ein Ziel dieser Arbeit, bioorthogonalfunktionalisierte Analoga zu synthetisieren.

4.1.7 2-Azido-2-Desaminosphingoidbasen

Bei Einbringen der bioorthogonalen Funktion statt der Aminogruppe am zweiten Kohlenstoffatom von Sphingosin und Phytosphingosin sollten Sphingoidbasenanaloga geschaffen werden, die zwei interessante Eigenschaften verbinden: Zum einen sollten diese Sphingoidbasenanaloga sich zur *in vivo* Konjugation mit alkinhaltigen Farbstoffen zur Visualisierung eignen, zum anderen lassen diese Sphingoidbasenanaloga sich nicht von Ceramidsynthasen über den *salvage pathway* zu Ceramiden umsetzen. Damit sollten diese Sphingoidbasenanaloga sich ferner zur Untersuchung der Sphingosinkinasen eignen.

Ausgehend von den natürlichen Sphingoidbasen muss zur Synthese die Aminofunktion in ein Azid überführt werden. Daher wurde eine Synthesestrategie von Wong *et al.* adaptiert.^[249] Wong nutzte die Überführung von Amin in Azid mittels Trifluormethansulfonylazid (TfN₃) statt einer Aminschutzgruppe. In der Cu(II)-katalysierten Diazo-Transfer-Reaktion bleibt die Stereoinformation unverändert,^[250] so kann analog zum Entfernen einer Schutzgruppe das Azid unter Erhalt der ursprünglichen Stereoinformation wieder zum Amin reduziert werden.

Nach Umsetzen von Phytosphingosin **3** und Sphingosin **1** mittels frisch hergestelltem Trifluormethansulfonylazid (TfN₃) konnten erfolgreich so die azidmodifizierte Analoga **49** und **50** erhalten werden (vgl. Abb. 4.20). Das TfN₃ muss dabei stets in Lösung gehandhabt werden, da es in der Trockene zum Explodieren neigt.^[251]

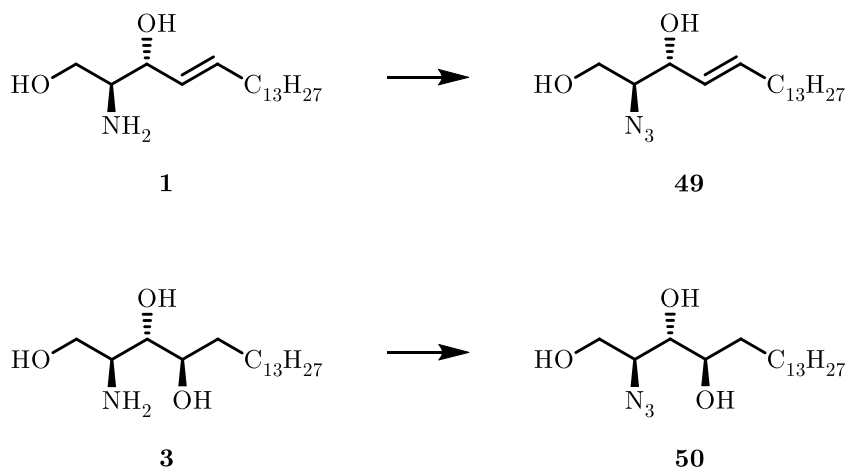


Abbildung 4.20: Synthese von 2-Azido-2-Desaminosphingoidbasen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TfN₃, CuSO₄, K₂CO₃, MeOH, H₂O, 20 h, quantitativ (**49**), 65 % (**50**).

4.1.6.1 Zellwandfärbungen von *Arabidopsis thaliana*

Während bioorthogonale Markierungen in Bakterien-, Säugetier- und Hefezellen zur Visualisierung von Biomolekülen wie Proteinen, Glykanen, Lipiden und Nucleinsäuren breite Anwendung finden, ist die Anwendung in pflanzlichen Systemen bisher selten.^[252] Anderson *et al.* stellten 2012 als erste eine *in vivo* Konjugation zur Zellwandfärbung von Pflanzenzellen. mittels metabolisch in die Zellwand eingebaute, azidmodifizierte Fructose, die mit Farbstoff konjugiert wurde, vor.^[253-254] Die Vorgehensweise wurde anschließend durch eine große Auswahl an azidmodifizierten Monosacchariden erweitert.^[255] Auch bioorthogonalfunktionalisierte Monolignole konnten genutzt werden, um die Zellwand von Pflanzen anzufärben.^[256] Zum Visualisieren von Lipiden in Pflanzenzellen wurde bisher allerdings hauptsächlich auf Farbstoff-modifizierte Lipide zurückgegriffen.^[257]

Daher wurde in Kooperation mit Dr. Frank Waller die Eignung von 2-Azido-2-Desaminophytosphingosin **50** (Azido-PHS) zur Visualisierung nach Einbau in die Zellwand von *Arabidopsis thaliana* untersucht.

In den von Dr. Frank Waller durchgeführten Untersuchungen wurden Setzlinge in Phosphatpuffer mit 200 μM Azido-PHS **50** für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (*Phosphate buffered saline*) wurden die Setzlinge mit 4%iger Formaldehydpufferlösung (PBS) über Nacht fixiert. Die Konjugation mittels CuAAC erfolgte mit 10 μM Alexa647-Alkin, 200 μM CuSO_4 und 1 mM Na-Ascorbat über eine Stunde bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurde einmal mit einer Mischung aus PBS und DMSO (1:1, v/v) und zweimal mit PBS gewaschen. Beim Kontrollversuch wurden die Setzlinge nach der gleichen Prozedur behandelt, jedoch ohne die vorherige Inkubation mit Azido-PHS **50**. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.21 dargestellt.

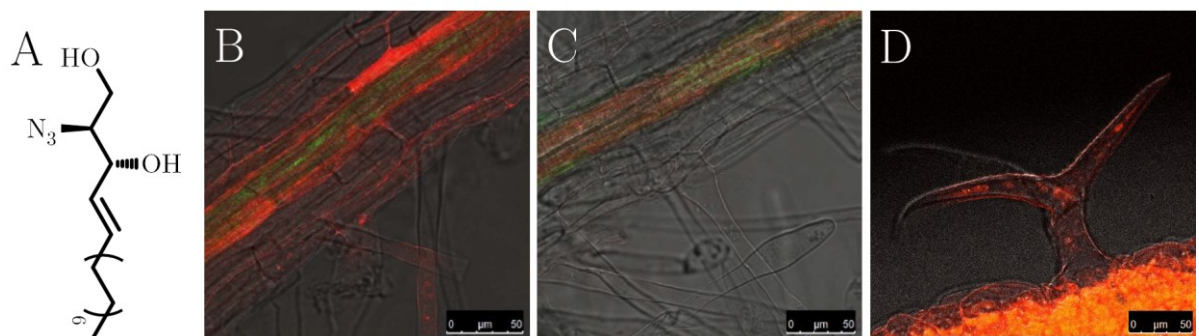


Abbildung 4.21: Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln. (A) Struktur von 2-Azido-2-Desaminophytosphingosin **50** (Azido-PHS), (B) Wurzeln nach Inkubation mit Azido-PHS **50** und Konjugation mit Alexa647-Alkin; (C) Kontrollversuch ohne Azido-PHS **50**; (D) Trichom (Wurzelhaar) nach Inkubation mit Azido-PHS **50** und Konjugation mit Alexa647-Alkin. Bei den Konfokalmikroskopieaufnahmen werden die drei Kanäle übereinandergelegt; Durchlicht, Rot: Alexa647 (648-681 nm) Grün GFP/Autofluoreszenz Kanal (587-529 nm). Die Aufnahmen wurden von Dr. Frank Waller durchgeführt.

Nach Inkubation der *Arabidopsis* Setzlinge mit Azido-PHS **50**, anschließender Fixierung mittels Formaldehyd und kupferkatalysierter Konjugation mit Alexa647-Alkin, erfolgt die Fluoreszenz aus der Plasmamembran, aber auch teilweise von der Wurzeloberfläche (Abb. 4.21 A). Eine Bildüberlagerung von Durchlicht, Alexa647 (rot) und GFP/Autofluoreszenz (grün) zeigt eine starke Färbung der Plasmamembran und

der Wurzelhaare (Abb. 4.21 C) Im grünen Kanal zeigt sich, durch Autofluoreszenz verursacht, ein geringes unspezifisches Signal in der Wurzelrinde. In Kontrollexperimenten wurde die Inkubation mit Azido-PHS **50** ausgelassen. Unter diesen Bedingungen (Abb. 4.21 A) kann nur schwaches Signal von Alexa647 (rot) detektiert werden, das lässt darauf schließen, dass die starke Signalintensität (Abb. 4.21 A) lediglich vom Konjugationsprodukt von Alexa647-Alkin mit Azido-PHS **50** stammt.

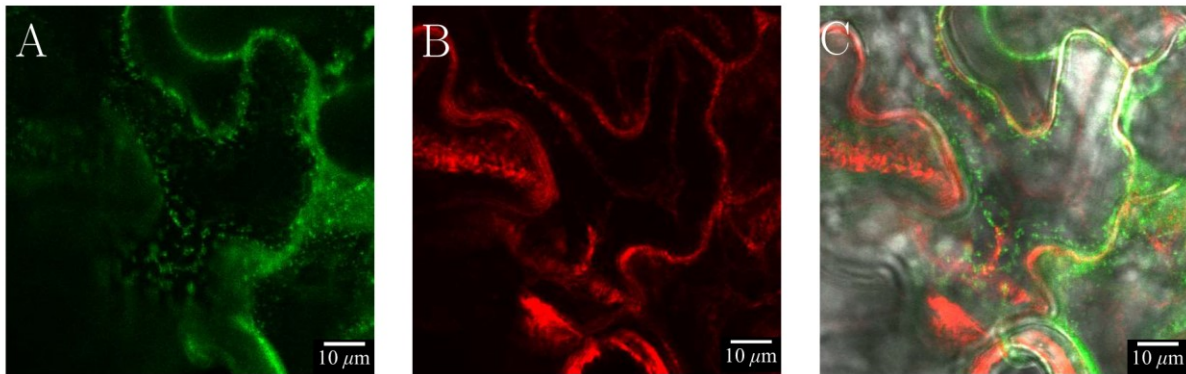


Abbildung 4.22: Konfokale Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von *Arabidopsis thaliana* Blättern nach Inkubation mit Azido-PHS **50** und Konjugation mit Alexa647-Alkin. (A) grüner GFP Kanal; (B) roter Alexa647 Kanal; (C) Überinandergelegtes Bild von A, B und Durchlicht.^[258] Die Aufnahmen wurden von Dr. Frank Waller durchgeführt.

Anders als in den Wurzelzellen zeigen Blatzellen von *Arabidopsis* nach Inkubation mit Azido-PHS **50**, Fixierung und anschließender Konjugation mit Alexa647-Alkin eine starke Fluoreszenz auf der Oberfläche von Epidermiszellen (Abb. 4.22). Für diese Experimente wurden Setzlinge verwendet, die zusätzlich *Solanum tuberosum* Remorin 1.3 exprimieren, an das grün fluoreszierende Protein fusioniert wurde (StREM-GFP).

Im grünen Kanal zeigt sich ein lückenhaftes Muster des in der Plasmamembran lokalisierten StREM-GFP (Abb. 4.22). Das Signal von Alexa647 zeigt sich in den benachbarten Regionen, welche die Oberflächen der Epidermiszellen repräsentieren.

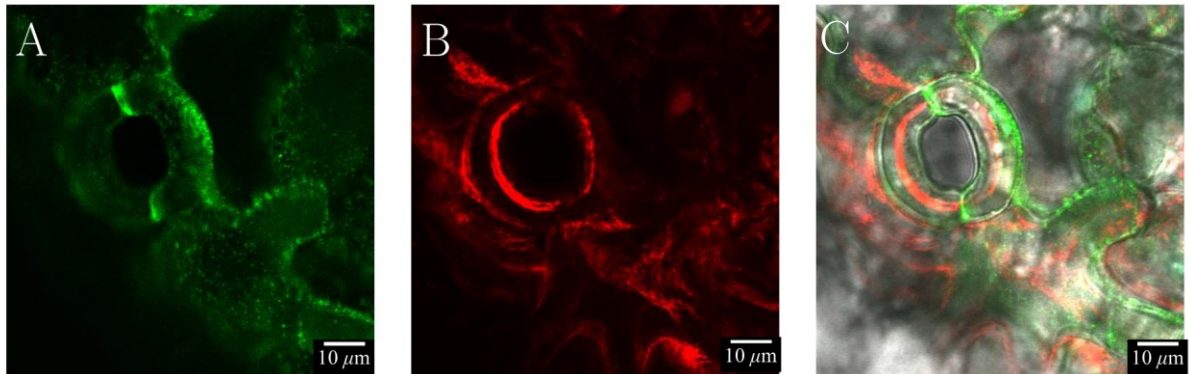


Abbildung 4.23: Konfokale Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von *Arabidopsis thaliana* Stomata nach Inkubation mit Azido-PHS **50** und Konjugation mit Alexa647-Alkin. (A) grüner GFP Kanal; (B) roter Alexa647 Kanal; (C) Übereingeleitetes Bild von A, B und Durchlicht.^[258] Die Aufnahmen wurden von Dr. Frank Waller durchgeführt.

In Stomata formt die Kutikula eine ausgeprägte Lippe auf der inneren Oberfläche der beiden Schließzellen. Diese Struktur ist klar im roten Alexa647 Kanal zu erkennen (Abb. 4.23). Das beobachtete Muster der Fluoreszenzsignale ist daher mit der Lokalisierung von konjugiertem Azido-PHS **50** in der Kutikula in Übereinstimmung. Die Kutikula ist essentiell für die pflanzliche Pathogenabwehr.^[259]

Mit 2-Azido-2-Desaminophytosphingosin **50** (Azido-PHS) konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein bioorthogonal konjugierbares Sphingolipid hergestellt werden, das durch CuAAC mit Alexa647-Alkin zur Visualisierung von *Arabidopsis thaliana* Zellen genutzt werden kann.^[258]

4.1.8 An Position 1 funktionalisierte Sphingoidbasen

Durch den Mangel der Aminofunktion im Aufbau der 2-Azido-2-Desaminosphingoidbasen eignen sich diese Analoga nicht als Ausgangspunkt zur Untersuchung von komplexeren Sphingolipiden. Um dieses Problem zu umgehen, sollte die Azidgruppe anstelle der primären Hydroxylgruppe einer Sphingoidbase eingebracht werden. Hierzu sollte die stereoselektive Synthese von Sphingosin **1** nach Liebeskind *et al.*^[62] angepasst werden (vergleiche Kapitel 2.1.4) Kernschritt dieser Synthese ist eine Palladium-katalysierte C-C-Kupplungsreaktion einer Boronsäure mit Thiophenol aktiviertem *N*-Boc-Serin **51** zum Aufbau der *trans*-konfigurierten Doppelbindung (vgl. 4.24).

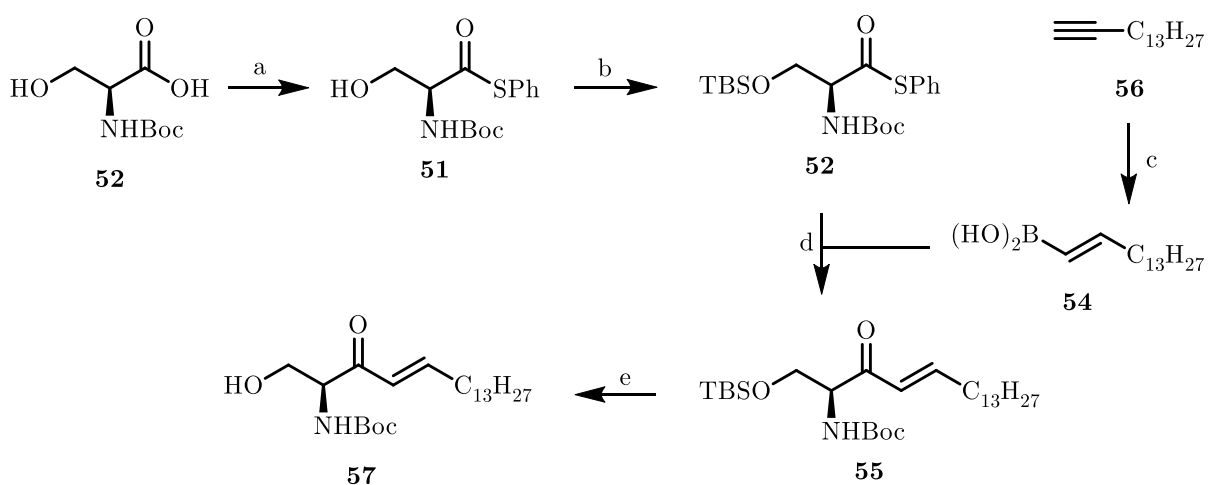


Abbildung 4.24: Synthese von Sphingosin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) PhSH, HOBT, DCC, EA, RT, 72 h, 87 %; b) TBSCl, DMAP, DMF, NMM, 0 °C, 30 min, 82 %; c) $\text{SMe}_2 \cdot \text{HBBR}_2$, RT, 5 h, 84 %; d) $\text{Pd}(\text{dba})_3, \text{CuTC}$, THF, RT, 4 d, 83 %, e) TBAF, 1M HCl, MeOH, 16 h RT, quantitativ.

Zunächst erfolgte die Synthese des aktivierten Thiophenolesters **51** aus *N*-Boc-L-Serin **52**. Nach anschließender Umsetzung mit *tert*-Butylchlorodimethylsilan konnte der gewonnene Silylether **53** in einer Liebeskind-Srogl-Kupplung^[64] mit der Boronsäure **54**

zum α,β ungesättigten Keton **55** umgesetzt werden. **54** wurde vorher durch Hydroborierung des Alkins **56** mit dem Bor-Komplex $\text{SMe}_2 \cdot \text{HBr}_2$ erhalten. **57** wurde durch die Abspaltung der Silylgruppe von **55** wurde durch Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid erreicht. Der anschließende Versuch die ungeschützte Hydroxylgruppe über Methansulfonylchlorid in eine Abgangsgruppe zu überführen, führte nicht zum Erfolg. Vermutlich kommt es durch intramolekulare Substitutionsreaktionen, wie sie ebenfalls bei der Synthese der Fingolimodanaloga (siehe Kapitel 4.2.3) oder im Folgenden auch für das Phytosphingosin analog nachgewiesen werden konnten

Um den synthetischen und finanziellen Aufwand zu reduzieren, wurde in Folge Phytosphingosin als Ausgangssubstanz zur Generierung einer an Position 1 funktionalisierte Sphingoidbase gewählt. Die zweite und dritte Hydroxylgruppe können dabei über ein zyklisches Vollacetal geschützt werden (vgl. Abb. 4.25)

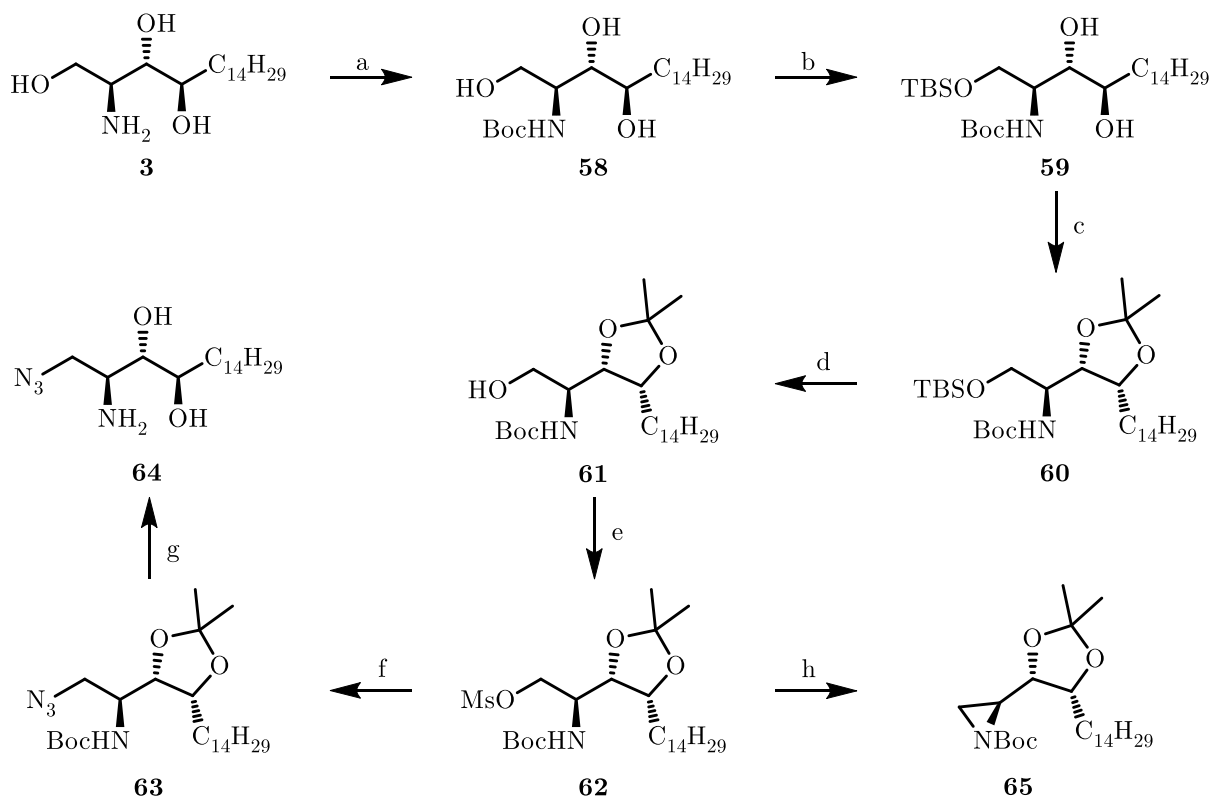


Abbildung 4.25: Synthese von 1-Azido-1-Desoxyphytosphingosin **64** Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc₂O, NaOH, EtOH, H₂O, RT, 29 h quantitativ; b) TBSCl, DMAP, NEt₃, DCM, DMF, RT, 2.5 h, 80 %; c) TsOH, DMP, NEt₃, Aceton, RT, 14 h, 59 %; d) TBAF, THF, RT, 14 h, 76 %; e) MsCl, NEt₃, DCM, 0°C, 2.5 h, f) NaN₃, DMF, 60 °C, 14 h 78 % über 2 Stufen; g) TFA, DCM, H₂O, RT, 14 h, 91 %; h) Allylalkohol, Cs₂CO₃, DMF, RT.

Die Synthese beginnt mit der Umsetzung von Phytosphingosin **3** zum *tert*-Butoxycarbonylamid **58**. Die anschließende Reaktion mit Aceton lieferte Gemische aus fünf- und sechsgliedrigen Acetalen. Daher wurde zuerst das Triol **58** über den primären Silylether **59** als Zwischenstufe selektiv zum fünfgliedrigen Vollacetal **60** umgesetzt und anschließend mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entschützt. Der Alkohol **61** wurde mittels Methansulfonylchlorid aktiviert und das entstandene **62** zum Azid **63** umgesetzt. Mittels Trifluoressigsäure (TFA) wurden infolge die Boc-Gruppe abgespalten das Acetal geöffnet, um 1-Azido-1-desoxyphytosphingosin **64** zu erhalten. Um eine bioorthogonale Gruppe zur Konjugation von Tetrazinen einzubringen, wurde zusätzlich versucht das Mesylat **62** mit Allylalkohol zu substituieren. Basische Bedingungen führen zum intramolekularen Ringschluss, indem Stickstoff, trotz sterisch

anspruchsvoller Boc-Schutzgruppe, als Nucleophil reagiert und erfolgreich das Aziridin **65** bildet.

4.1.9 Diskussion der spektroskopischen Daten der Sphingolipidderivate

Im Folgenden werden die charakteristischen NMR-Signale der Ceramid- und Sphingosinderivate diskutiert. Dabei konzentriert sich die Übersicht auf die chiralen Zentren und deren umgebende Atome. Die Signale der acylierten Carbonsäuren fallen zum Großteil mit denen der Alkylkette der Sphingoidbase zusammen.

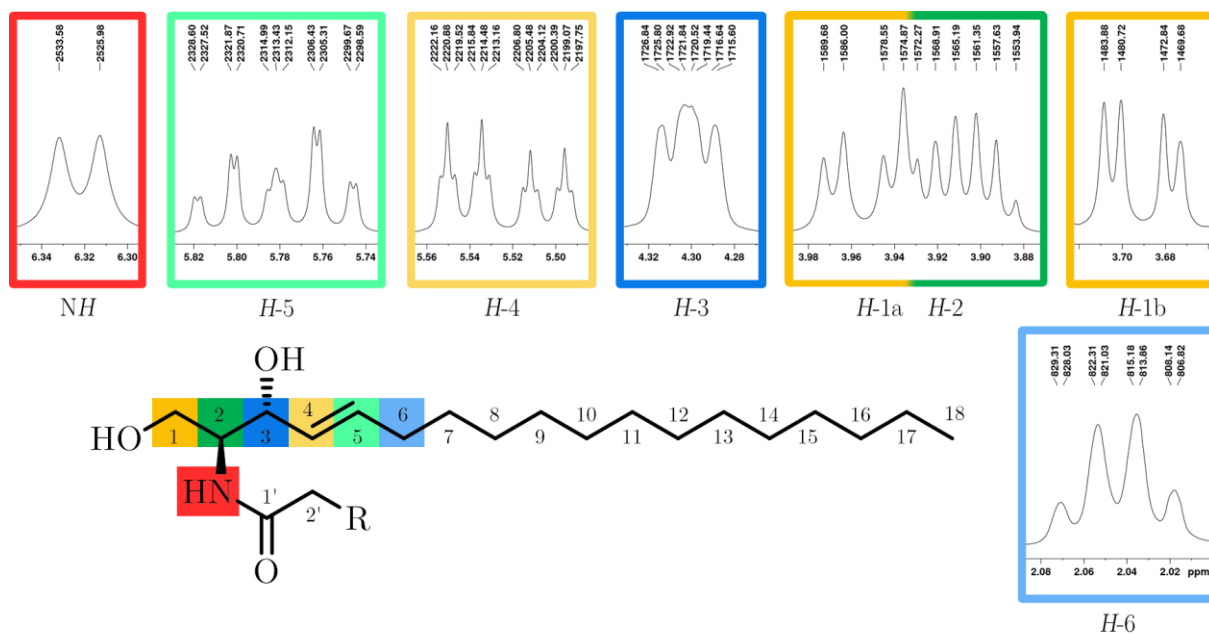


Abbildung 4.26: Darstellung einer Auswahl an charakteristischen Protonen im ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der Sphingosin-/Ceramidanaloga. Die Achseneinheiten sind in ppm, die Peaks sind in Hz angegeben.

Während die Protonen der langen Alkylkette ($H-7$ bis $H-17$) des Sphingosingerüsts in einem Multiplett zusammenfallen, erweisen sich die Protonen an den chiralen Zentren und der Doppelbindung als charakteristisch für Sphingosin-/Ceramidanaloga. Eine Auswahl an charakteristischen Protonensignalen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Abb. 4.26 gegeben. Aufgrund der stereochemisch unterschiedlichen Umgebung werden die beiden diastereotopen Protonen am Kohlenstoff $C-1$ unterschiedlich stark verschoben und weisen eine typische geminale 2J -Kopplung von ca. 11 Hz auf. Da sie ebenfalls mit $H-2$ mit etwa 3.5 bis 4.0 Hz koppeln, erscheinen sie im Spektrum als Dublett von Dubletts. Das Proton $H-2$ am chiralen Zentrum erscheint durch Kopplungen mit insgesamt vier diastereotopen Protonen, an $C-1$, $C-3$ und dem als Dublett erscheinenden Amidproton (7.6 Hz), als vierfaches Dublett. Durch Überlagerung des Signals von $H-2$ mit dem Signal von $H-1a$ können diese beiden nicht bei allen Ceramidderivaten einzeln mit allen Kopplungskonstanten ausgewertet werden. Das Aufspaltungsmuster des Protons $H-3$ am zweiten chiralen Zentrum ($C-3$) kann nur durch Kenntnis der Kopplungskonstanten der beteiligten Protonensignale erklärt werden. Die kleine 4J -Kopplung (typischerweise etwa 1.2 Hz) zu $H-5$, ist die Ursache, dass die 3J -Kopplungen zu $H-2$ (etwa 3.7 Hz) und $H-4$ (ca. 6.4 Hz) nicht klar erkennbar sind. Charakteristisch sind die beiden Doppelbindungsprotonen $H-4$ und $H-5$. $H-4$ koppelt mit $H-5$ mit einer für *trans*-Doppelbindung typischen 3J -Kopplung von ca. 15 Hz und neben der Kopplung zu $H-3$ koppeln noch die beiden Protonen an $C-6$ mit jeweils 1.3 Hz. Diese Kopplungen führen dazu, dass die beiden diastereotopen Protonen an $C-6$ als verbreitertes Dublett von Tripletts erscheinen, da die kleinen 4J -Kopplungen zwar das Signalmuster erklären, aber nicht mehr eindeutig aufgelöst werden können. Das verbreiterte Signal von $H-6$ ist ebenfalls auf die kleinen 4J -Kopplungen zurückzuführen. Die Protonen der terminalen CH_3 -Gruppe erscheinen bei ca. 0.87 ppm durch die große Entfernung zu den Stereozentren als leicht verzerrtes Tripletts mit einer 3J -Kopplung von 6.9 Hz. Die

primäre und sekundäre Hydroxylgruppe erscheint als breites Multiplett bei etwa 2.87 ppm.

Bei den ω -azidmodifizierten Acylresten der Ceramide $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** lassen sich die Signale am Anfang und am Ende der Kette klar zuordnen. Die beiden Protonen in α -Position erscheinen bei 2.25 ppm als Triplet mit einer 3J -Kupplungskonstanten von 6.8 Hz. Die beiden endständigen Protonen neben der Azidfunktion erscheinen als Triplet mit einer 3J -Kupplung von 6.9 Hz bei etwa 3.2 ppm.

Da die für die α -azidmodifizierten Ceramide $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28** racemische Festtsäurederivate verwendet wurden, resultieren Epimergemische, deren Signale aus Zuordnung der enantioimerenreinen Ceramidderivate $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** und $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** über die Kopplungskonstanten differenziert werden können (vgl. Abb. 4.27).

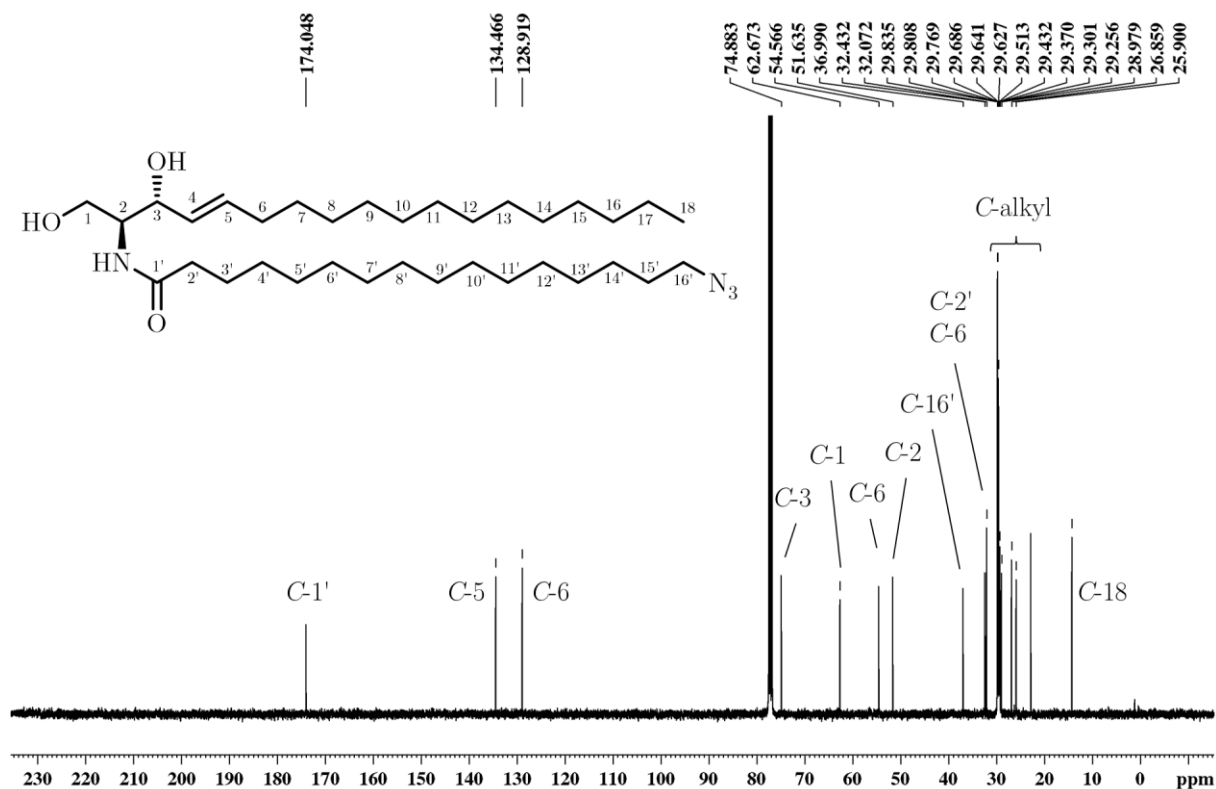


Abbildung 4.27: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von **23** mit Zuteilung der Kohlenstoffsignale.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Ceramidderivate erweisen sich, wie auch im ^1H -Spektrum, vor allem die Signale des Sphingosinrückrates als charakteristisch. Der Amidkohlenstoff erscheint am weitesten im Tieffeld bei ca. 174 ppm, gefolgt von den Kohlenstoffen der Doppelbindung bei ca. 134 (C-5) und 129 ppm. (C-4). Die Kohlenstoffe, an denen die Hydroxylgruppen gebunden sind, erscheinen bei ca. 75 (C-3) und 63 ppm (C-1). Bei ca. 55 ppm erscheint das Signal von C-2. Auch C-6 lässt sich noch eindeutig zuordnen und erscheint bei 32 ppm. Die restlichen Kohlenstoffsignale der Alkylkette erscheinen zwischen 32 und 22 ppm und überlagern zum Teil sehr stark. Nur das Signal der terminalen CH_3 -Gruppe erscheint einzeln im Hochfeld bei ca. 14 ppm.

Bei den Acylresten lassen sich die Signale der Kohlenstoffe am Anfang und am Ende der Kette zuordnen. C-2' in α -Position des Amids erscheint bei 37 ppm, das Azid verschiebt C16' ähnlich wie die Hydroxylgruppen auf 52 ppm. Bei den kürzeren Acylresten lassen sich meist noch weitere Kohlenstoffsignale des Säurerestes zuordnen.

4.2 Sphingolipidanaloga

Die Entwicklung und Untersuchung von Sphingolipidanaloga leistet große Beiträge zum Verständnis der Funktion und Eigenschaften von Sphingolipiden. Durch Änderungen in der Struktur oder des stereochemischen Aufbaus von Biomolekülen können Analoga geschaffen werden, die gezielt biochemische Transformationen verhindert oder bestimmte Rezeptoren stimulieren. Da der dynamische Sphingolipidkreislauf die Konzentrationen der Sphingolipide im Gleichgewicht hält und diese kontinuierlich ineinander überführt, haben Analoga von Sphingolipiden eine besondere Bedeutung, um die biochemischen Eigenschaften der Sphingolipiden zu erforschen und Wirkstoffkandidaten zu entwickeln. Eine Auswahl therapeutischer Sphingolipidanaloga ist in Abb. 4.28 gezeigt.

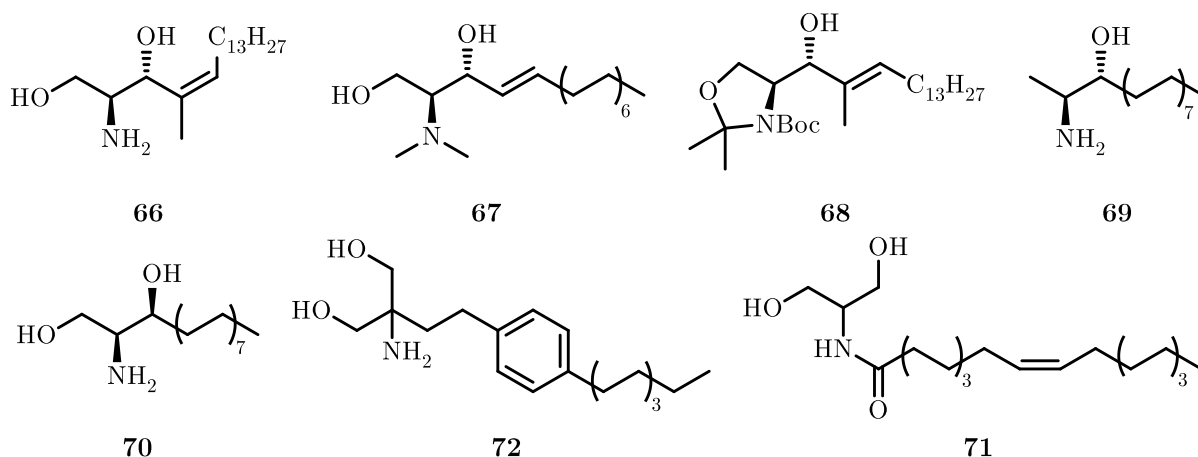


Abbildung 4.28: Auswahl therapeutischer Sphingolipidanaloga. *Cis*-4-Methylsphingosin (Cimes) **66**, 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **CerX033**, N,N-Dimethylsphingosin **67**, Enigmol **69**, Safingol **70**, Fingolimod (FTY-720) **72**, *N*-Oleoylserinol **71**.

1993 stellten Schmidt *et al.* eine Synthese von *E*-4-Methylsphingosin (Cimes) **66** vor.^[260] Durch Änderung der Doppelbindungskonfiguration und der zusätzlich daran gebundenen Methylgruppe wurde ein Sphingosin analog mit interessanten

biochemischen Eigenschaften geschaffen: Es wird effizient von Zellen aufgenommen und wird weder über Ceramidsynthese zu komplexeren Sphingolipiden umgesetzt noch findet ein metabolischer Abbau statt.^[261] Trotz der strukturellen Änderungen ist Cimes aber ein Substrat für Sphingosinkinasen und wird über diese phosphoryliert.^[261-262] Das Phosphat von Cimes wird auch von Sphingosin-1-Phosphat Rezeptoren erkannt, in Folge kommt es zur permanenten Aktivierung dieser Rezeptoren und ermöglicht das Studium von S1P-basierten Signaltransduktionswegen. Der langfristige Einsatz *in vivo* wird allerdings durch den Umstand erschwert, dass Cimes ebenfalls die Sphingosintransferase inhibiert und damit die *de novo* Synthese von Sphingolipiden unterbindet.^[261]

Sphingosinkinase 1 wird in vielen Krebsarten überexprimiert und führt daher zu hohen Konzentrationen von Sphingosin-1-Phosphat (S1P).^[263] Da S1P das Zellwachstum fördert,^[264] die Apoptose unterdrückt^[265] und die Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie erhöht^[266], sind Sphingosinkinase 1 Inhibitoren in den Fokus der Krebsforschung geraten. Dieser Bedarf an S1P Kinaseinhibitoren führten zur Entwicklung von N,N-Dimethylsphingosin **67**. Untersuchungen zeigten, dass das Sphingolipidanalogs **67** zwar einen potenten kompetitiven Inhibitor der Sphingosinkinasen in diversen Zelltypen darstellt^[267], sein Einsatz als Wirkstoff aber durch leicht toxische Eigenschaften verhindert wird. Einen Inhibitor mit geringerer Toxizität stellt das Isopropyliden- und *tert*-Butyloxycarbonyl geschütztes Ketosphingosin **68** dar.^[268]

Ein anderer Ansatz in der Tumorbekämpfung, der sich Sphingolipidanaloga zu Nutze macht, ist es Sphingolipidanaloga zu nutzen, die über keine primäre Hydroxylgruppe verfügen und daher nicht über S1P-Kinase phosphoryliert und anschließend abgebaut werden können. Der daraus resultierende hohe Gehalt an Ceramiden und -analoga induziert dann Apoptose und mindert das Wachstum des Tumorgewebes. Beispiele für

solche sphingolipidbasierte Wirkstoffkanidaten mit tumorsupressor Wirkung sind Spisulosin^[269] (1-Desoxy-Sphingosin) und Enigmol **69**.^[270] Eine ähnliche Wirkung hat auch das Lipidanalog Jaspin B. Allerdings wirkt es als Inhibitor der Sphingomyelin-Synthese und erhöht dadurch den Ceramidgehalt.^[271]

Ein weiteres Sphingolipidanalog, das ebenfalls als Antikrebswirkstoff eingesetzt werden soll, ist Safingol **70**.^[272] Der Einsatz von **70**, dass sich nur durch die Stereoinformation der zweiten Hydroxylgruppe von Sphingamin unterscheidet, wird derzeit in klinischen Studien untersucht. Seine Wirkweise beruht auf der kompetitiven Inhibition der Aktivierung von Proteinkinasen des Typs C.^[273] In vorklinischen Untersuchungen zeigte es bereits in Kombination mit Mitomycin C^[272] oder Fenretinide^[274-275] antitumor Wirkung bei nur geringfügiger Toxizität gegenüber dem Patienten.

Während die bisher beschriebenen Analoga nur auf geringen Änderungen der Stereochemie und/oder Struktur beruhen, sind andere wie 1999 von Bieberich *et al.* vorgestellte *N*-Oleoylserinol **71** rationalem Strukturdesign entsprungen.^[204] **71** wurde dabei unter der Annahme entwickelt, dass vor allem das μ -Hydroxyamid-Motiv, das nahezu allen komplexeren Sphingolipiden gemein ist und daher für viele biochemische Effekte der Sphingolipiden verantwortlich ist. Der Umstand, dass **71** in sich schnell vermehrenden, nicht aber in ruhenden oder differenzierten Neuroblastomazellen Apoptose auslöst, stützt diese These.^[204] Auch aktiviert **71** die atypische Proteinkinase C (aPKC) und löst in Stammzellexperimenten die Bildung des Polaritätskomplexes Par3-Par6-aPKC aus.^[276] Außerdem wird *N*-Oleoylserinol **71** von dem ebenfalls von Bieberich *et al.* entwickelten, hoch spezifischen Ceramidantikörper erkannt.^[188] Das Ceramidanalogue **71** zeigt Potential zum Einsatz in der Stammzellentherapie. Es konnte gezeigt werden, dass **71** die Entwicklung von embryonischen Stammzellen regulieren und die Bildung von Keimzelltumoren unterdrücken kann, welche als ein Hauptproblem der Stammzellentherapie angesehen werden.^[277]

Ebenfalls einem rationalem Strukturdesign entsprungen ist Fingolimod **72**. Das auch unter dem Kürzel FTY-720 bekannte Sphingosinanalogue ist eines der am besten untersuchten Sphingolipidanaloga mit immunsuppressiven Eigenschaften. Die Struktur wurde von Myriocin abgeleitet, um eine weniger toxische Verbindung des Serinepalmitoyltransferase (SPT) Inhibitors zu generieren.^[278] Anders als Myriocin inhibiert **72** nicht die SPT,^[279] sondern wird von Sphingosinkinasen zum *S*-konfigurierten Fingolimod-Phosphat metabolisiert. Das Phosphat wiederum adressiert vier der fünf bekannten S1P-Rezeptoren.^[280-281] Fingolimodphosphat lässt sich nicht durch S1P-Lyase abbauen und inhibiert diese, weshalb sich S1P anreichert.^[282] Studien zeigten, dass die Wirkweise von Fingolimod **72** allerdings weniger auf die agonistische Effekte auf S1P-Rezeptoren, sondern eher auf eine desensibilisierende Wirkung zurückzuführen ist.^[283-284] In Lymphozyten wird der S1P-Rezeptor 1 durch Fingolimodphosphat internalisiert, weshalb der Rezeptor gegenüber dem S1P-Gradienten zwischen Blut und Gewebe unempfindlich wird und verhindert, dass die Lymphozyten aus den Lymphorganen freigesetzt werden.^[283, 285] Durch das bereits erwähnte Fehlen eines enzymatischen Abbaus hält dieser Effekt bis zu acht Tage an.^[286-287] Inzwischen ist das 1995 vorgestellte Fingolimod **72** in der EU zur Behandlung von Multipler Sklerose zugelassen und wird unter dem Markennamen Gilenya[®] vertrieben. Der Einsatz von **72** bei Nierentransplantationen zum Unterdrücken der Organabstoßungsreaktionen wird derzeit untersucht.^[288-289]

.

4.2.1. Azidfunktionalisierte *N*-Oleoylserinolderivate

N-Oleoylserinol **71** wurde von Bieberich *et al.* als ceramiditierendes Lipidanalogen entwickelt.^[204, 290] Die Bedeutung von **71** liegt vor allem in der Aktivierung der atypischen Proteinkinase C (aPKC)^[276] und in der Induktion zur Ausbildung von aPKC assoziierten Polaritätskomplexen, die in der Stammzellentwicklung eine Rolle spielen.^[176] Um diese genauer untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine azidfunktionalisierte Variante von **71** geschaffen werden, die nach Konjugation mit Fluoreszenzfarbstoffen Visualisierungsstudien des Ceramidanalogs *in vivo* ermöglicht und gleichzeitig die biochemischen Eigenschaften behält.

Retrosynthetische Überlegungen zu azidfunktionalisiertem *N*-Oleoylserinol **71**

N-Oleoylserinol **71** setzt sich über eine Amidbindung aus Serinol **73** und Ölsäure **74** zusammen. Da die lipophile Kette der Ölsäureeinheit das Molekül in der Membran hält und das hydrophile Serinolmotiv nach außen präsentiert wird, sollte die Azidfunktion in die Serinoleinheit eingebracht werden. Das Azid **75** sollte aus Serinol **73** hergestellt werden. Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung azidmodifizierter *N*-Oleoylserinole sind in Abb. 4.29 dargestellt.

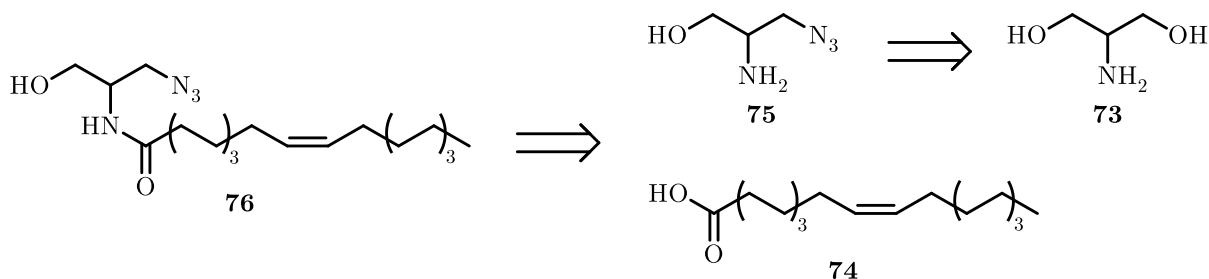


Abbildung 4.29: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung azidmodifiziertem *N*-Oleoylserinol.

Zunächst wurde *N*-Oleoylserinol **71** zur als Referenzmaterial für die späteren *in vivo* Untersuchung der azidmodifizierten *N*-Oleoylserinolanaloga **76** hergestellt (vgl. Abb. 4.30).

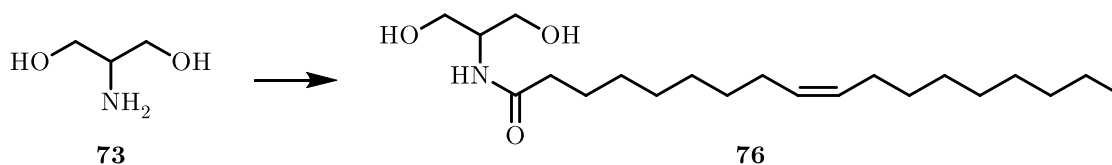


Abbildung 4.30: Synthese von *N*-Oleoylserinol **71**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: Ölsäure **74**, DCC, NHS, DIPEA, DMF, RT, 24 h, 70 %. Alternativ Ölsäurechlorid **77**, NEt₃, DCM, MeOH, RT, 4 d, 48 %.

In einer ersten Reaktion wurde Serinol **73** mit frisch hergestelltem Ölsäurechlorid **77** umgesetzt. Da die Ausbeute mit 48 % unter der Literatursausbeute von 83 %^[291] lag, wurde bei späteren Ansätzen auf eine carbodiimidvermittelte Kupplungsreaktion zurückgegriffen mit der Ausbeuten von bis zu 70 % erreicht werden konnten .

Die Synthese von racemischen Azido *N*-Oleoylserinol **76** ausgehend von Serinol **73** stellte sich als nicht praktikabel heraus. Problematisch sind hier zum einen unerwünschte intramolekulare Ringschlussreaktionen nach Einführen einer Abgangsgruppe; wie sie auch bei Fingolimodderivaten nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 4.2.3). Zum anderen ist Serinol **73** ein kleines organisches Molekül, das

die Azidgruppe nicht gut stabilisieren kann.^[292-295] Es ist bekannt, dass kleine Moleküle mit energiereichen Gruppen wie Azid-, Diazo- oder Nitrofunktionen in der Trockene instabil sind oder gar zu Explosionen neigen.^[292, 296]

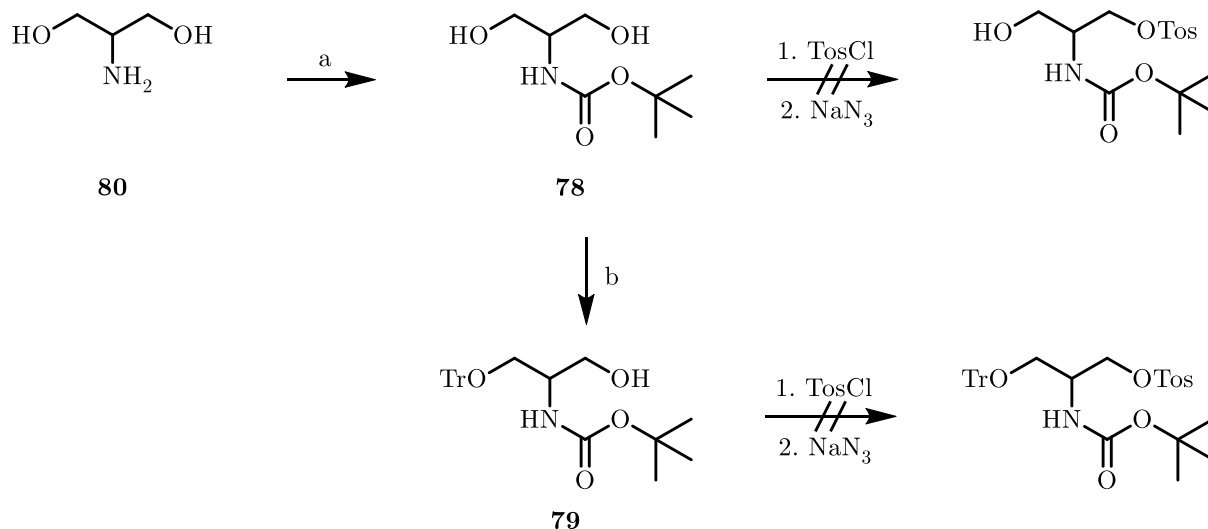


Abbildung 4.30 : Syntheseveruche von racemischen Azido-Serinol **75**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc_2O , MeOH, RT, 14 h, 97 %; b) TrCl, Pyridin, DCM, RT, 22 h, 65 %.

Als erstes erfolgte die Synthese von *N*-Boc Serinol **78**. Die folgende Umsetzung zum Azid nach Tosylaktivierung führte jedoch zur Zersetzung des Serinolderivats. Um den störenden Einfluss der freien Hydroxylgruppe auszuschließen und das geplante Azid zu stabilisieren, wurde ein Sauerstoff mit einem Äquivalent Triphenylmethylchlorid (TrCl) umgesetzt. Der so hergestellte Triphenylmethylether **79** zeigte nach Tosylaktivierung Zersetzung, weshalb eine weitere alternative Synthesestrategie versucht wurde (vgl. Abb. 4.30).

Durch Substitution einer Hydroxylgruppe des Serinols **80** entsteht ein Stereozentrum, das in Folge nur racemische Mischungen von Azido-*N*-Oleoylserinolen **76** zulässt. Um die Möglichkeit intramolekularer nucleophiler Angriffe als Ursache der

Zersetzungserscheinungen nach Einbringen einer Abgangsgruppe zu unterbinden und eine stereoselektive Synthese zu ermöglichen, wurde eine Synthesestrategie von Hawkins *et al.*^[297] ausgehend von L-Serin **9a** bzw. D-Serin **9b** adaptiert (vgl. Abb. 4.31).

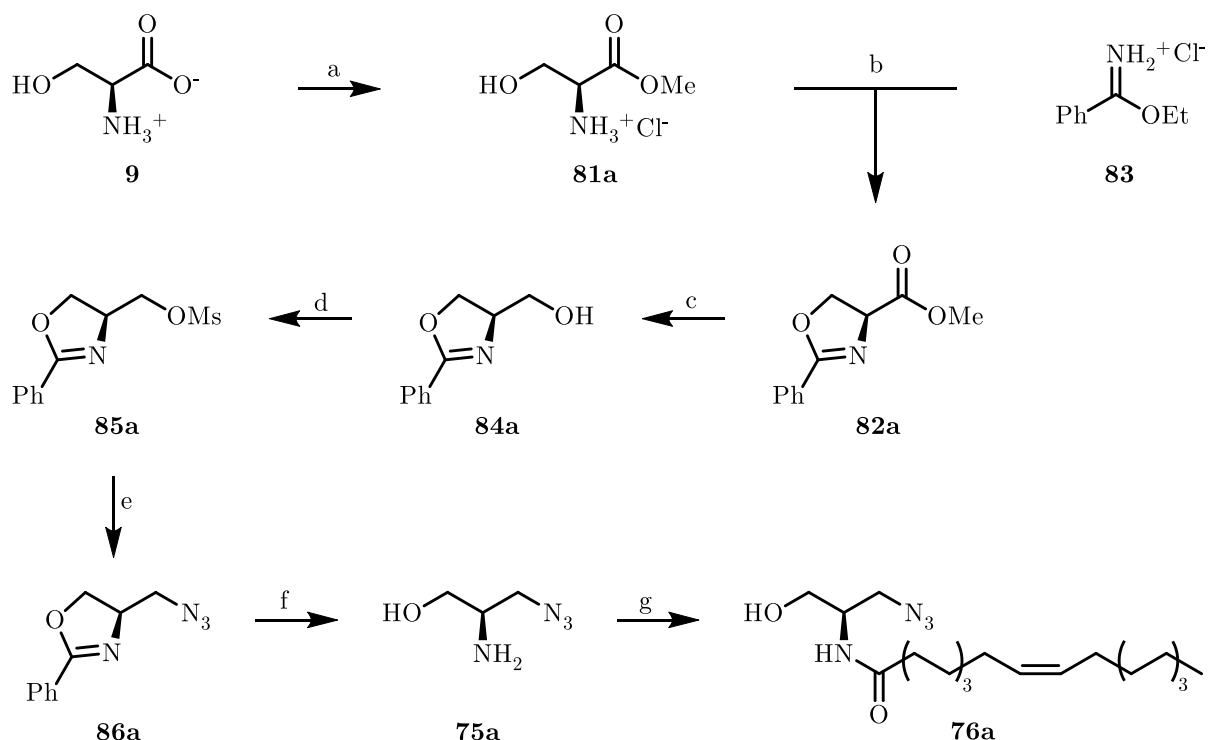


Abbildung 4.31: Syntheseroute des azidmodifizierten *N*-Oleoylserinols **76a** ausgehend von L-Serin. Die Synthese des Enantiomers **76b** erfolgte analog aus D-Serin. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) SOCl_2 , MeOH, RT, 24 h, quantitativ b) NEt_3 , DCM, RT, 24 h, 84 % (**82a**), 83 % (**82b**). c) DIBAL-H, THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 24 h, 74 % (**84a**), 94 % (**84b**). d) MsCl , NEt_3 , DCM, 0°C , 1h. e) DMF, 60°C , 16 h 80 % über zwei Stufen (**86a**), 86 % über zwei Stufen (**86b**). f) 4 N HCl, 107°C , 16 h. g) Ölsäure **74**, DCC, NHS, DIPEA, DMF, RT, 24 h 47 % über zwei Stufen (**76a**), 73 % über zwei Stufen (**76b**).

Dazu wurden zuerst jeweils aus L- und D-Serin thionylchloridvermittelt die Methylester **81a/b** hergestellt. Daneben wurde zur Nachproduktion auch auf kommerziell verfügbare Serinmethylestern zurückgegriffen. Um im Folgenden beim Einführen einer Abgangsgruppe intermolekulare Angriffe zu vermeiden, wurden anschließend die Oxazoline **82a/b** hergestellt. Dazu wurden die Serinmethylester **81a/b** mit

Ethylbenzimidat-Hydrochlorid **83** unter basischen Bedingungen in Dichlormethan (DCM) umgesetzt. Anschließende Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) führte zu den Alkoholen **84a/b**. Die primären Hydroxylgruppen wurden über Methansulfonylchlorid (MsCl) in Abgangsgruppen überführt und nach wässriger Aufarbeitung direkt mit NaN_3 weiter zu den Azidverbindungen umgesetzt. Längere Lagerung der Methansulfonylester **85a/b** ist aufgrund geringer Stabilität nicht ratsam, die Azide **86a/b** sind hingegen auch über Wochen stabil. Die alternative Verwendung von *para*-Toluolsulfonsäurechlorid statt MsCl führte zwar zu den entsprechenden *para*-Toluolsulfonsäureestern, diese zeigen sich allerdings als wesentlich reaktionsträger. Zum Entschützen werden die Azide **86a/b** in wässriger 4 N HCl gekocht. Hier war in der Reaktionskontrolle über Dünnschichtchromatographie auf die vollständige Abspaltung der Benzoesäure zu achten - das Benzoesäureamid, das als Zwischenstufe entsteht, mindert sonst die Ausbeuten. Die Serinolderivate **75a/b** sind instabil und müssen nach Waschen mit DCM und destillativem Entfernen des Wassers bei vermindertem Druck unmittelbar weiter umgesetzt werden. Die gewünschten Azido-*N*-Oleoylserinole **76a/b** wurden durch die carbodiimidvermittelte Umsetzung mit Ölsäure **74** gewonnen.

Zur Ermittlung der Enantiomerenreinheit wurden die Derivate **76a** und **76b** zu den diastereomeren Mosherestern **87** und **88** umgesetzt. Die Veresterung erfolgte dabei ebenfalls über eine carbodiimidvermittelte Kupplungsreaktion (vgl. Abb. 4.32).

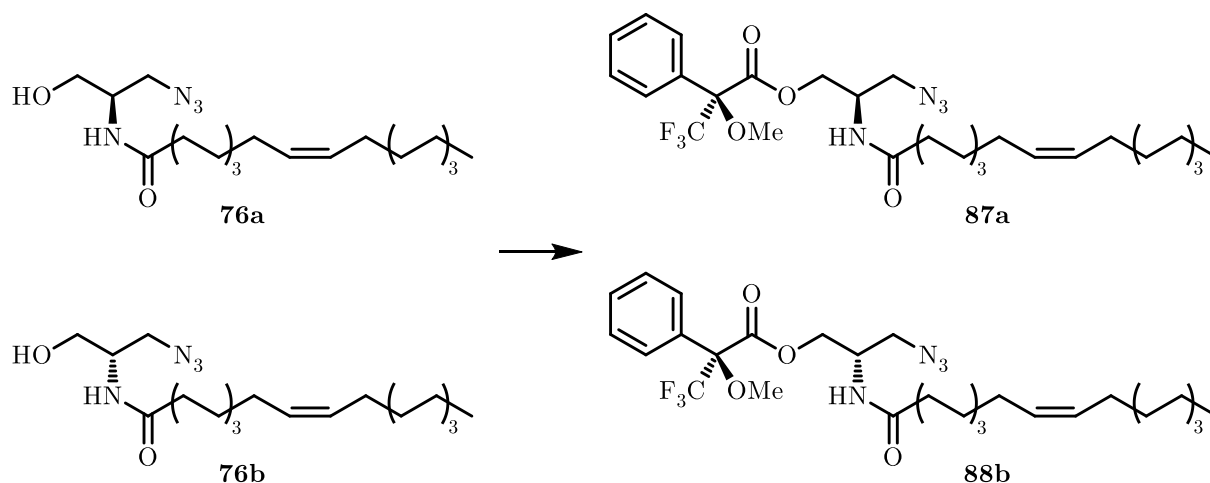


Abbildung 4.32: Synthese der Mosherester **87** und **88** zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: *S*-MTPA, DMAP, DCC, DCM, RT, 14 h, 56 % (**87**), 93 % (**88**).

Durch die entstandenen diastereomeren Mosherester **87** und **76b** lassen sich die Enantiomerenüberschüsse (*enantiomeric excess*, ee) über die Trifluormethylgruppen bestimmen. Über die Flächenverhältnisse der Fluorsignale im ¹⁹F-NMR-Spektrum ergab sich für **76a** ein ee von 92 % und für **76b** ein ee von 95 % (siehe Kapitel 4.2.3).

4.2.1.1 Einbau- und Visualisierungsstudien der Azido-*N*-Oleoylserinole **76a** und **76b**

Es wird vermutet, dass vor allem das β -Hydroxyamid Motiv für die biochemischen Eigenschaften von *N*-Oleoylserinol **71** bzw. von Ceramiden im Allgemeinen verantwortlich ist.^[204] Um diese Annahme zu prüfen, wurde in Kooperation mit mehreren Arbeitskreisen Einbau- und Visualisierungsstudien der Azido-*N*-Oleoylserinole **76a** und **b** in verschiedenen Zelltypen durchgeführt.^[212]

Die azidfunktionalisierten *N*-Oleoylserinolanaloga **76a** und **76b** erweisen sich sowohl in Jurkat-T-Zellen als auch in primären T-Zellen bei Konzentrationen bis zu 25 μ M als minimal toxisch. Von den beiden Enantiomeren löst **76b** etwas weniger Apoptose aus,

jedoch liegt die Toxizität beider Enantiomere **76a** und **76b** deutlich unter der des oft verwendeten Golgimarkers NBD-C₆-Ceramid **3**.^[190, 212] Nach Inkubation der T-Zellen mit **76b** und anschließender durch Ringspannungsabbau getriebener Konjugation mit DIBO488 Farbstoff für 5 min wurde die Anreicherung des mit Farbstoff konjugierten **76b** mittels Durchflusszytometrie zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert (siehe Abb. 4.33).

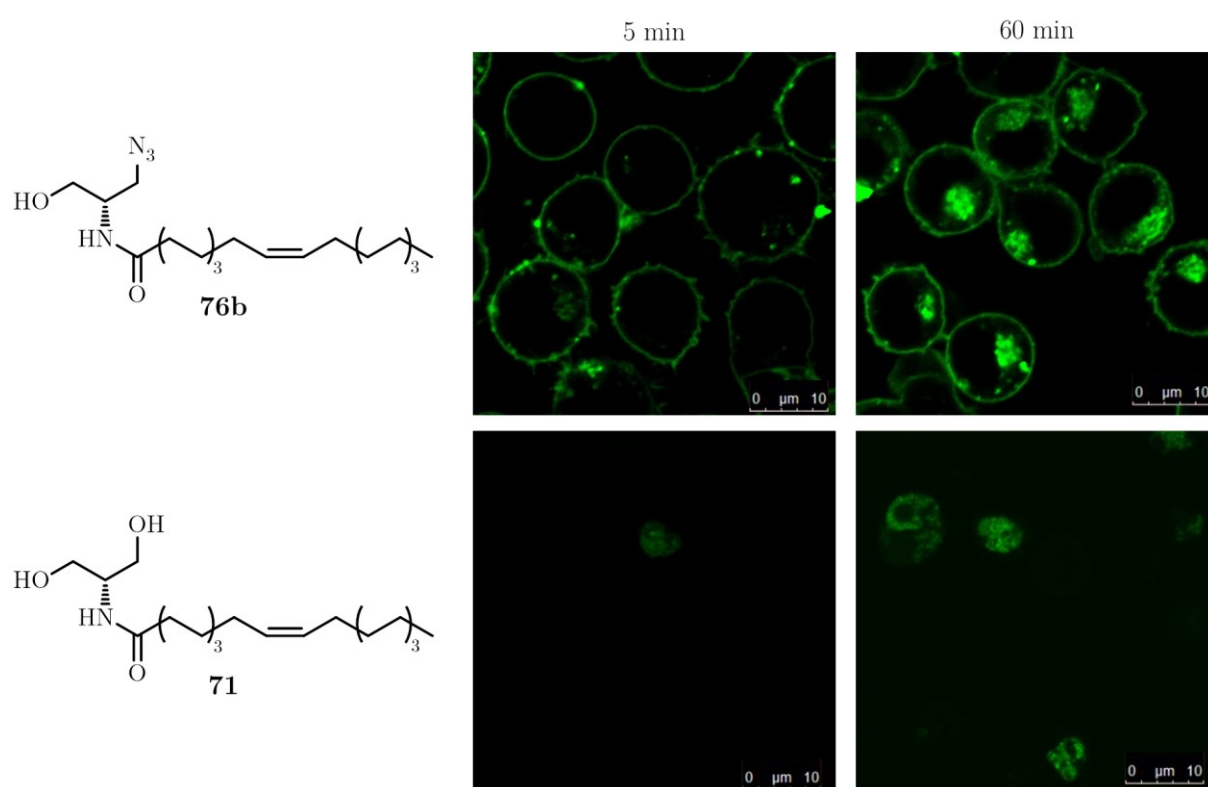


Abbildung 4.33: Jurkat-T-Zellen wurden mit 25 μM **76b** (oben) oder **71** (unten) in HBSS-Medium für 30 min bei RT inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei RT (links) oder 60 min bei 37 °C (rechts) mit 25 μM DIBO488 behandelt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und bis zur mikroskopischen Analyse bei RT aufbewahrt.^[212] Die Aufnahmen wurden von Dr. Lena Collenburg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schneider-Schaulies) durchgeführt.

Während NBD-C₆-Ceramid **3**, das als Kontrollversuch einbezogen wurde, sein Maximum nach etwa 25 min erreichte, sammelte sich **76b** weiter auf der Zelloberfläche an (Abbildung 4.33, oben). Massenspektrometrische Analysen von Prof. Dr. B. Kleuser

(Uni Potsdam) zeigten, dass 70 % von **76b** über die Zeit in Jurkatzellen eingebaut wurden. Im Gegensatz zum Einbau in Jurkat-T-Zellen war der Einbau von **76b** in unstimulierte primäre T-Zellen sehr gering. Die unterschiedliche Einbaurrate wurde auch bei Ergänzung der Konjugationslösung mit F-Pluronic beobachtet, welche die Aufnahme von Lipiden im Allgemeinen erhöht. Um festzustellen, ob das Einbaumuster von **76b** mit dem von Ceramid vergleichbar ist, wurde die subzelluläre Verteilung von **76b** über 60 und 180 min in lebenden Zellen beobachtet. **76b** reichert sich wie NBD-C₆-Ceramid **8** in der Plasmamembran und im Golgi-Kompartiment an. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei **76b** um ein ceramidgetreues Lipidanalogen handelt.

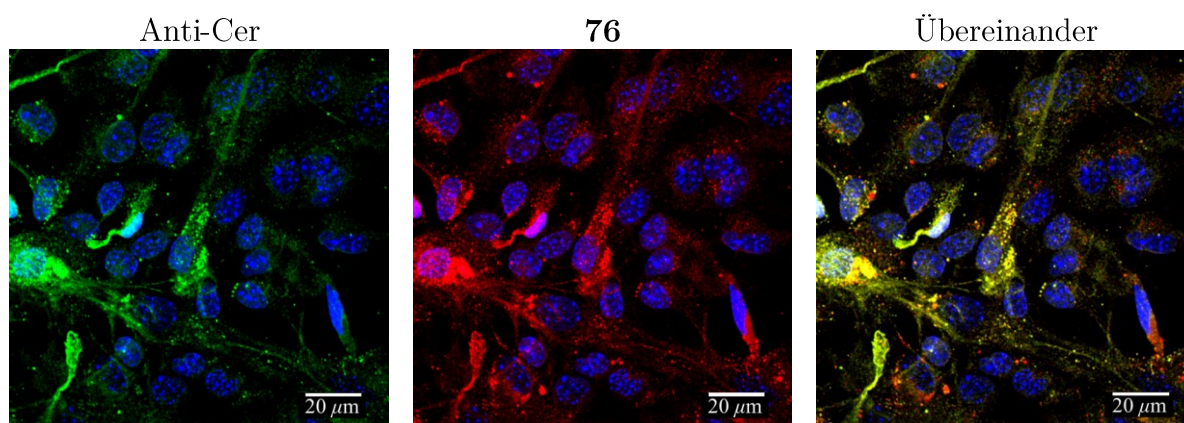


Abbildung 4.34: Primärkulturen von Astrozyten wurden mit 5 µM eines Gemisches von **76a** und **76b** für 1 h inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit Alexa546-DIBO für 20 min bei RT konjugiert. Nach Waschen wurden die Zellen mittels Formaldehyd/Glutaraldehyd fixiert und unter milden Bedingungen permeabilisiert (0.2 % Triton X-100/PBS, 5 min, RT). Immuncytochemie und Cofärbung mit Anti-Ceramid Kaninchen IgG und Alexa 488 Anti- Kaninchen IgG. Zur Kernfärbung (blau) wurde DAPI verwendet.^[212] Die Aufnahmen wurden von Ji Na Kong (AK Bieberich, University of Kentucky) durchgeführt.

Zusätzlich zu den Kolokalisierungsuntersuchungen mit NBD-C₆ Ceramid **3** wurden Kolokalisierungsstudien von **76b** mit einem Ceramid spezifischen Antikörper durchgeführt (siehe Abb. 4.34). Für diese Kolokalisierungsstudien wurden Primärkulturen von Astrozyten verwendet, da sich diese Ceramide im Golgi und anderen vesikulär Kompartimenten anreichern.^[298] Abbildung 4.34 zeigt, dass es sich bei

den mit Antikörpern markierten Kompartimente um dieselben handelt, die auch Fluoreszenz von DIBO488 konjugiertem **76b** aufweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Färbungsreaktionen von ceramidspezifischen Antikörpern und NBD-C₆-Ceramid **82** (Abb. 4.34) zeigte sich, dass die markierten Kompartimente auch teilweise durch GM130, einem *cis*-Golgi marker übereinstimmen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Endothelzellen des humanen Gehirns (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) als Serinolaktzeptoren untersucht (vgl. Abb. 4.35). HBMEC sind einzigartige Endothelzellen, da sie durchgehende interzelluläre Schlussleisten (*Tight Junctions*) ausbilden, welche den Transport von Molekülen durch die Endothelzellschicht kontrollieren. Die Endothelzellen-Pericyten-Interaktionen induzieren ferner die Ausbildung der Schlussleisten. Unter Entzündungsbedingungen stimulieren Pericyten die Immunantwort durch Zytokinproduktion.^[299] Ferner induzieren Meningokokken (*Neisseria meningitidis*), die auf HBMEC einwirken, die Ausbildung von ceramidreichen Domänen auf HBMEC um die Bakterienaufnahmen zu fördern.^[300-301]

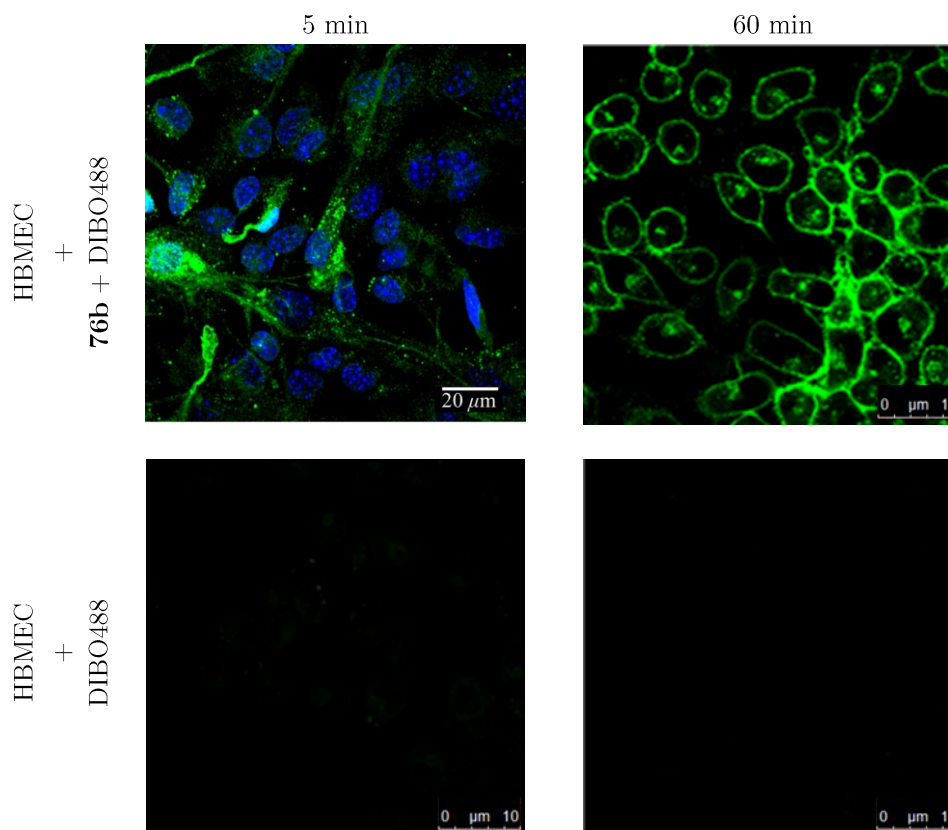


Abbildung 4.35: HBMEC wurden mit $25 \mu\text{M}$ **76b** (links) in RPMI-Medium für 5 min bei RT inkubiert oder unbehandelt (rechts) und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei RT (oben) oder 60 min bei 37°C (unten) mit $25 \mu\text{M}$ DIBO488 behandelt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und bis zur mikroskopischen Analyse bei RT aufbewahrt.^[212] Die Aufnahmen wurden von Jérôme Becam (Arbeitskreis Prof. Dr. Alexandra Schubert Unkmeir) durchgeführt.

Eine der grundlegenden Eigenschaften von Ceramiden ist dass sie durch Induktion von Apoptose den Zelltod auslösen können.^[33, 265] Nach Inkubation von HBMEC mit **76a** und **76b** wurde daher die Zelltodrate bestimmt. Durch Annexin V und Propidiumiodid (PI) Färbung wurde zwischen früher Apoptose und später Apoptose bzw. Necrose unterschieden (siehe Abb. 4.35, Messzeitpunkte 1 h und 6 h). Die Werte von **76a** und **76b** unterscheiden sich dabei kaum merklich von unmodifiziertem *N*-Oleoylserinol **71**. Konzentrationen unterhalb von $50 \mu\text{M}$ erwiesen sich als nicht toxisch. Bieberich *et al.* berichteten, dass *N*-Oleoylserinol **71** nur in sich schnell vermehrenden Neuroblastomazellen Apoptose induziert, aber nicht in ruhenden oder differenzierten

Zellen.^[204] **76a** und **76b** induzierten unter vergleichbaren Konzentrationen jedoch auch in HBMEC Apoptose und weichen in dieser Hinsicht von *N*-Oleoylserinol **71** ab.

Wie aus Abbildung 4.35 ersichtlich ist, erfolgt der Einbau von **76b** in HBMEC sehr effizient. Dabei ist **76b** nach 5 min ausschließlich in der Membran lokalisiert, nach 60 min erfolgte der Transport in den Golgi. Um zu zeigen, dass **76** in der Evaluierung von PKC ζ -Signalkaskaden genutzt werden kann, wurden Kolo-kalisierungsstudien durchgeführt, um potentielle Interaktionen mit PKC ζ zu identifizieren (vgl. Abb. 4.36). Dazu wurde menschliches PKC ζ -GFP in 3T3 Fibroblasten exprimiert, die Fibroblasten anschließend mit **76** inkubiert und mit DIBO 488 konjugiert. Abbildung 4.36 zeigt, dass sowohl die GFP-Fluoreszenz als auch die Fluoreszenz des PKC ζ -Antikörpers mittels **76** lokalisiert werden können. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Ceramidanaloga **76a** und **76b** mit PKC ζ interagieren und dazu genutzt werden können, die Funktion von Ceramid und dessen Interaktion mit Zielproteinen wie PKC ζ bei der Entwicklung von neuronalen Zellen sowie die Polarität zu verfolgen. Auf dieser Grundlage könnten Anti-Krebs Strategien aufbauen, die Inhibition von Proteinkinase C-Signalwegen einschließen.

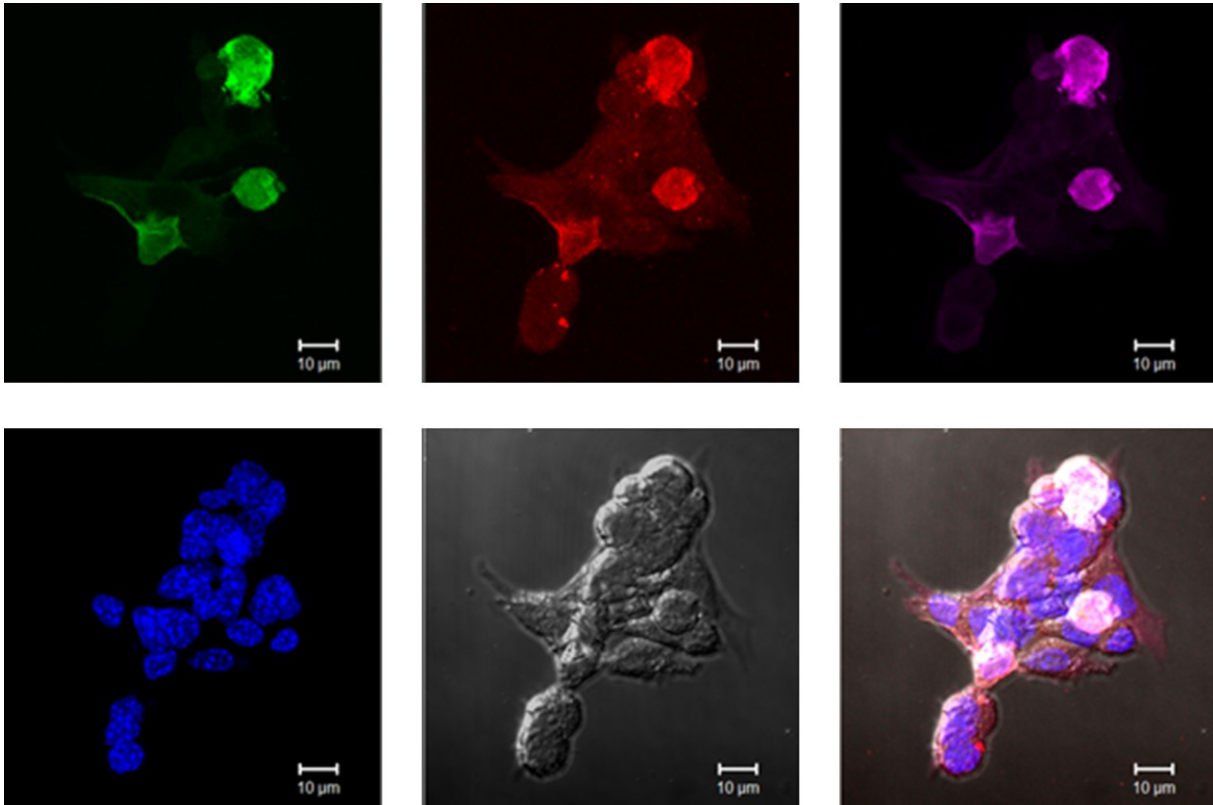


Abbildung 4.36: 3T3 Fibroblasten wurden mit menschlichem PKC ζ -GFP transfesziert und 24 h nach Transfektion über 1 h mit 5 μ M eines Gemisches von **76a** und **76b** inkubiert. Die Konjugation mit Alexa546-DIBO fand für 20 min bei RT statt. Nach Waschen wurden die Zellen mittels Formaldehyd/Glutaraldehyd fixiert und unter milden Bedingungen permeabilisiert (0.2 % Triton X-100/PBS, 5 min, RT). Immuncytochemie und Kofärbung mit Anti-Ceramid Kaninchen IgG und Alexa488 Anti-Kaninchen IgG. (A) GFP/ PKC ζ ; (B) Alexa546/**76**; (C) Alexa488/Anti-PKC ζ ; (D) DAPI-Kernfärbung; (E) Durchlicht; (F) Übereinanderlegung aller Kanäle.^[212] Die Aufnahmen wurden von Ji Na Kong (AK Bieberich, University of Kentucky) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass **76a** und **76b** als nützliche Werkzeuge zum besseren Verständnis der Rolle von ceramidreichen Membrandomänen bei Bakterienaufnahme Prozessen beitragen können, da die Par6- und aPKC-Interaktionen durch Konjugation von **76** verfolgt werden können. Diese Interaktionen sind notwendig für Bildung und Erhaltung der Zellpolarität in nicht transformierten Zellen.^[302] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Infektion von HBMEC mit Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) in der Ausbildung des Polaritätskomplexes aus Par3/Par6/Pkc ζ unter den anhängenden bakteriellen Mikrokolonien resultiert, gefolgt

von der Delokalisierung der Schlussleistenproteine aus den interzellulären Zellverbindungen.^[303] Allgemein konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die azidfunktionalisierten *N*-Oleoylserinolderivate **76a** und **76b** sich zur bioorthogonalen Markierung in Jurkat-, Astrozyten-, Fibroblastzellen und HBMEC eignen.

4.2.2 Azidfunktionalisiertes *O*-Galactosyl-*N*-Oleoylserinol

In Membranen bilden Glycosphingolipide (Cerebroside) zusammen mit Cholesterin und Proteinen spezialisierten Microdomänen, die *Lipid Rafts* genannt werden.^[77, 304] Diese *Lipid Rafts* bewegen sich lateral durch die Zellmembran, können sich aber auch zu größeren geordneten Plattformen zusammenschließen.^[77] *Lipid Rafts* sind wichtig für viele verschiedene Zellaktivitäten und Funktionen wie Endo- und Exozytose, den Transport von Proteinen, Zell-Zellkommunikation, Signaltransduktionswege sowie Wirt-Erreger-Wechselwirkungen.^[177, 305-307]

Die Bildung von *Lipid Rafts* hängt dabei stark von der Eigenschaft der Glycosphingolipide ab, sowohl als Donor als auch Akzeptor zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Lipiden und mit Proteinen zu fungieren.^[308-309] Dabei sorgt die enge Wechselwirkung mit Cholesterin für eine Resistenz der *Lipid Rafts* gegenüber der Auflösung durch Detergenzien.^[304] Änderungen des Gehalts an Glycosphingolipiden in Membranen durch Störungen in der Biosynthese sind in neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington verwickelt.^[310-311]

Daher war es von Interesse neben den *N*-Oleoylserinolanaloga **76a/b** auch die glycosylierte Variante **89** zu generieren um den Einfluss von Zuckerstrukturen als Kopfgruppe auf die Verteilung in der Membran zu untersuchen (vgl. Abb. 4.37).

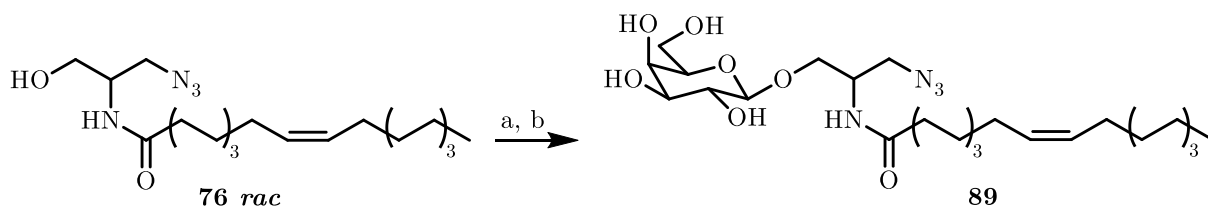


Abb. 4.37: Synthese von Galactosyl modifiziertem Azido-*N*-Oleoylserinol **89**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Penta-*O*-acetyl- β -D-Galaktose, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, DCM, RT, 14 h; b) MeOH NEt_3 , H_2O , RT, 6 h, 6 % über zwei Stufen.

Dazu wurde erst das Serinolderivat durch Lewisäureaktivierung mit Penta-*O*-acetyl- β -D-Galaktose umgesetzt und anschließend direkt basisch deacyliert. Dabei sorgt der Nachbargruppeneffekt für die Bildung der β -Verknüpfung. In Zellexperimenten ließen sich die Derivate allerdings nicht mit Dibenzocyclooctyl- (DBCO)funktionalisierten Fluorophoren konjugieren. Da der DBCO-Linker sterisch anspruchsvoll ist und das Azid durch den Zucker etwas abgeschirmt ist, liegen sterische Hinderungen der Cycloaddition als Ursache nahe.

4.2.3 Diskussion der spektroskopischen Daten der *N*-Oleoylserinolanaloga

Im folgenden Kapitel werden die charakteristischen Signale der NMR-Spektren der Serinolamide genauer diskutiert.

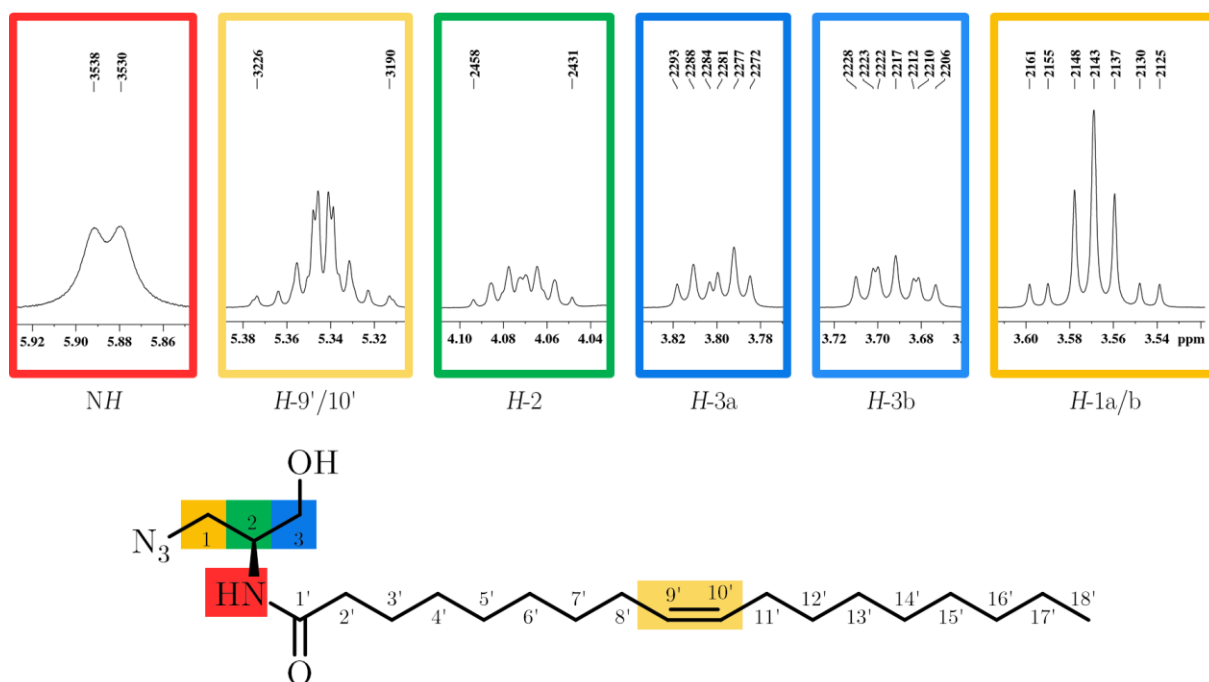
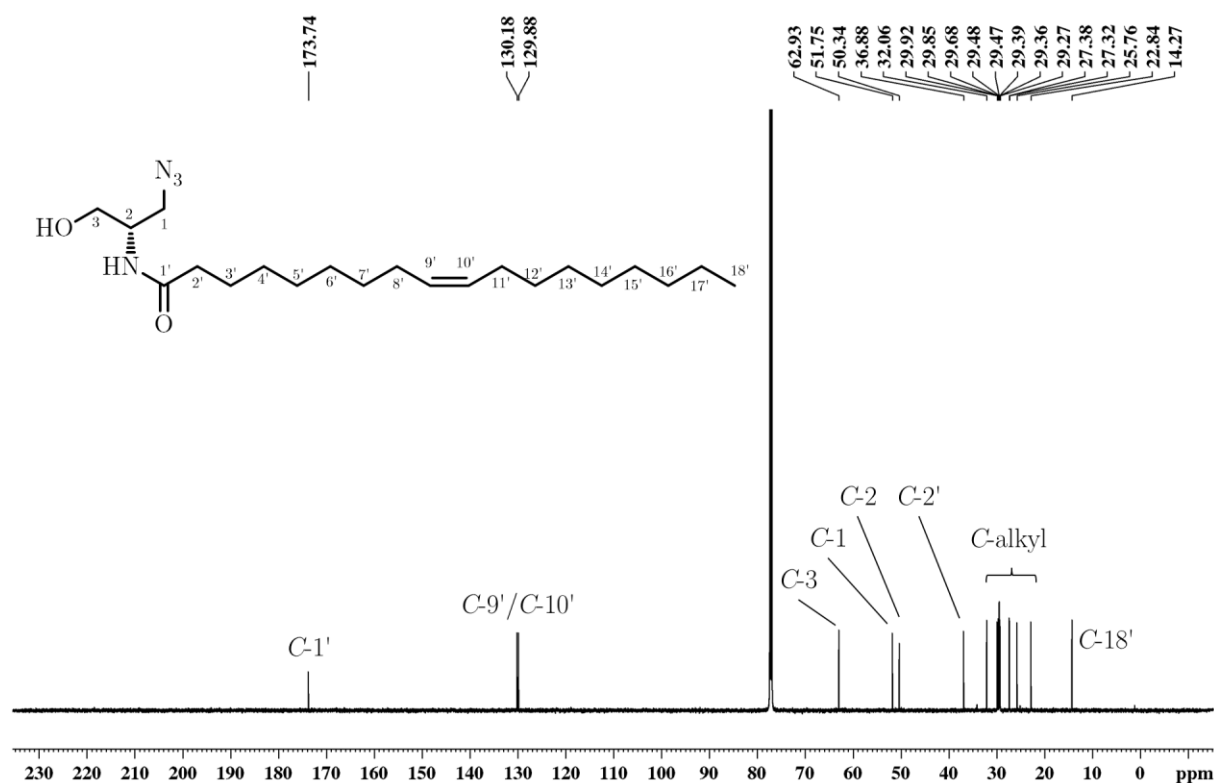


Abbildung 4.38: Darstellung der charakteristischen Protonensignale im ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der Serinolamide am Beispiel von R-2-Azido-2-Desoxy-*N*-Oleoylserinol **76b**. Die Achseneinheiten sind in ppm, die Peaks sind in Hz angegeben.

Eine Darstellung der charakteristischen Protonensignale der Serinolamide im ^1H -NMR-Spektrum ist in Abb. 4.38 gegeben. Bei den Azido-*N*-Oleoylserinolen **76a/b** erscheint das Amidproton am weitesten ins Tieffeld verschoben bei 5.89 ppm als Dublett mit einer 3J -Kopplung von 7.6 Hz. Die Protonen der CH_2 -Gruppen an *C*-1 und *C*-3 sind jeweils diastereotop und erscheinen zwischen 3.80 und 3.55 ppm jeweils als dreifaches Dublett. Die geminalen Kopplungen bei 12.5 Hz für die Protonen an *C*-1 und 11 Hz für die Protonen an *C*-3. Die 3J -Kopplungskonstanten der Protonen an *C*-1 und *C*-2 liegen zwischen 6.2 und 4.5 Hz. Analog zu den Ceramiden erscheint das Signal des Protons am chiralen Zentrum *C*-2 durch das komplexe Aufspaltungsmuster aufgrund der Kopplungen mit den diastereotopen Protonen jeweils an *C*-1 und *C*-3 sowie dem Amidproton als Multiplett. Die Signale der *trans*-konfigurierten Doppelbindung des Ölsäurerestes erscheinen zwischen 5.35 und 5.30 ppm durch gegenseitige Überlagerung als Multiplett. Die CH_2 -Protonen des Acylrestes erscheinen zwischen 2.21 und 1.23 ppm, wobei die meisten Protonen in einem Multiplett zusammenfallen. Die

Protonen der terminalen CH_3 -Gruppe erscheinen als leicht verzerrtes Triplet bei 0.88 Hz mit einer Aufspaltungskonstante von 7.1 Hz.

Bei den achiralen Serinolamiden sind die Protonen der CH_2 -Gruppen benachbart zu Hydroxylgruppen diastereotop und erscheinen wie $H-1$ bei den Sphingolipiden als Dublett von Dublett. Auch hier kommt es zu einer geminalen Aufspaltung von etwa 11 Hz und einer 3J Kupplung von 4.5 – 5.0 Hz zum einzelnen Proton an $C-2$, wobei durch eine Spiegelebene im Serinol jeweils zwei Protonen chemisch äquivalent sind. Das Amidproton erscheint bei 5.89 ppm durch Kopplung mit $H-2$ als Dublett mit einer 3J -Kopplung von 7.6 Hz.



Stellvertretend für die Serinolderivate ist das ^{13}C -Spektrum von **76b** in Abbildung 4.39 dargestellt. Im ^{13}C NMR-Spektrum der Serinolderivate weisen die Signale der

Carbonylkohlenstoffe die weitestete Tieffeldverschiebung auf und liegen bei etwa 170 ppm (vgl. Abb. 4.39). Bei den *N*-Oleoylderivaten **76a** und **76b** erscheinen die Signale der beiden Doppelbindungskohlenstoffe bei etwa 130 ppm. Das Signal des mittleren Kohlenstoffes der Serinoleinheit erscheint bei etwa 63 ppm. Die Signale der Kohlenstoffe an der Hydroxylgruppe erscheinen bei etwa 50 ppm. Bei achiralen Serinolamiden fallen die beiden Signale zusammen. Bei den *N*-Oleoylderivaten **76a** und **76b** wird der Kohlenstoff am Azid geringfügig weiter ins Tieffeld verschoben. Wie bei den Ceramidderivaten lassen sich die Kohlenstoffsignale der langen Alkylkette nicht alle eindeutig zuordnen und erscheinen zwischen etwa 30 und 23 ppm. Bei den *N*-Oleoylderivaten **76a** und **76b** erscheint der endständige Kohlenstoff der Alkylkette bei etwa 14 ppm.

Der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) der Azido-*N*-oleoylserinolen **76a/b** wurde über die Synthese und anschließende NMR-Analyse der Mosherester **87** und **88** ermittelt. Die resultierenden Diastereomere führen zu unterschiedlichen Verschiebungen der ¹⁹F-Signale, deren Integrale die Anteile der beiden Diastereomere und damit der ursprünglichen Enantiomere **76a** und **b** widerspiegeln. Der *ee* kann wie folgt bestimmt werden.

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100$$

In der Formel steht R und S für *rectus* und *sinister* und damit die Anteile der beiden Enantiomere **76a** und **b**.

4.2.3. Figolimodderivate

Fingolimod **72** (FTY-720) wirkt als Immunsuppressiva und wird unter dem Markennamen Gilenya® von Novartis vertrieben. Es ist in der EU zur Behandlung von Multipler Sklerose zugelassen, allerdings ist der Wirkmechanismus bis dato noch nicht endgültig geklärt.^[281] Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Variante von FTY-720 dargestellt werden, die ebenfalls mit Hilfe bioorthogonaler Chemie mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert werden kann. Über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollen so in Zukunft die Membrandynamiken untersucht und neue Erkenntnisse über die Wirkweise von FTY-720 erhalten werden.

Retrosynthetische Überlegungen

Ein vielversprechender Ansatz, um bioorthogonalfunktionalisiertes Fingolimod **72** unter Erhaltung der biochemischen Eigenschaften zu gewinnen, ist eine Funktionalisierung der Kopfgruppe. Da das Lipidanalogen nach Aufnahme in Zellen nur das polare Kopfende aus der Membran heraus präsentiert, besteht so die beste Chance, dass sich das Analogon auch mit Fluorophoren konjugieren lässt. Dabei kann von kommerziell verfügbarem **72** ausgegangen werden, was den synthetischen Aufwand verringert. Von den vorhandenen funktionellen Gruppen ist die Umwandlung einer Hydroxylgruppe in ein Azid eine einfache Herangehensweise. Dafür muss die Hydroxylgruppe zuerst in eine Abgangsgruppe überführt werden, was aufgrund der Aminogruppe und der zweiten Hydroxylgruppe eine Schutzgruppenstrategie erfordert. In Abb. 4.40 sind die retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung azidmodifizierter Fingolimodanaloga dargestellt.

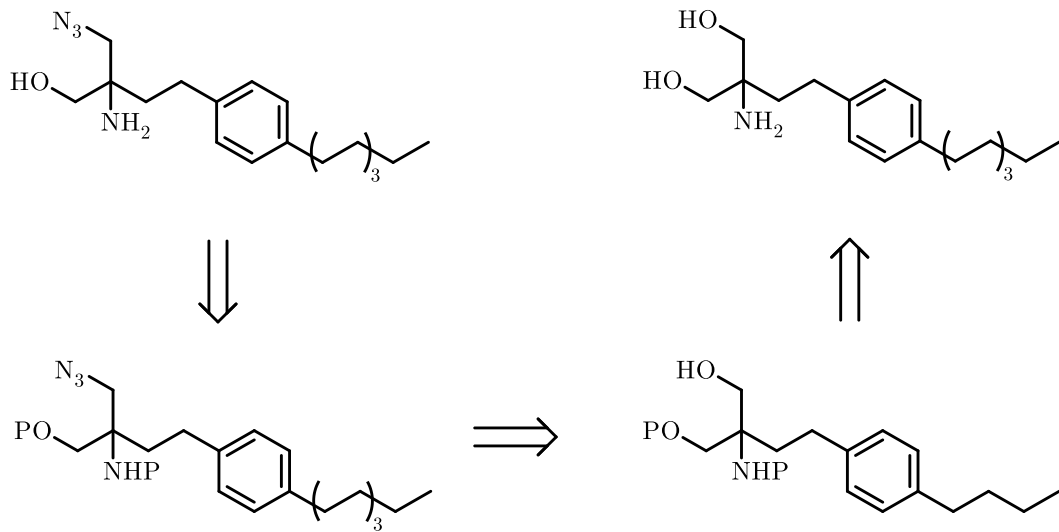


Abbildung 4.40: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung azidmodifizierter Fingolimodanaloga. P steht für eine Schutzgruppe.

Kiuchi *et al.* stellten 2005 chemoenzymatische Synthese der beiden Phosphat-Enantiomeren von Fingolimod vor.^[312] Sie nutzt den Umstand, dass *N*-Acetylfingolimod von verschiedenen Lipasen als Akzeptorsubstrat genutzt wird. So konnte enantiomerenreines diacetyliertes Fingolimod in der *R*-Konfiguration hergestellt und die entsprechenden Phosphate generiert werden. Es lag nahe, die Synthesestrategie für azidmodifizierte Fingolimod-Derivate zu testen (vgl. Abb. 4.41).

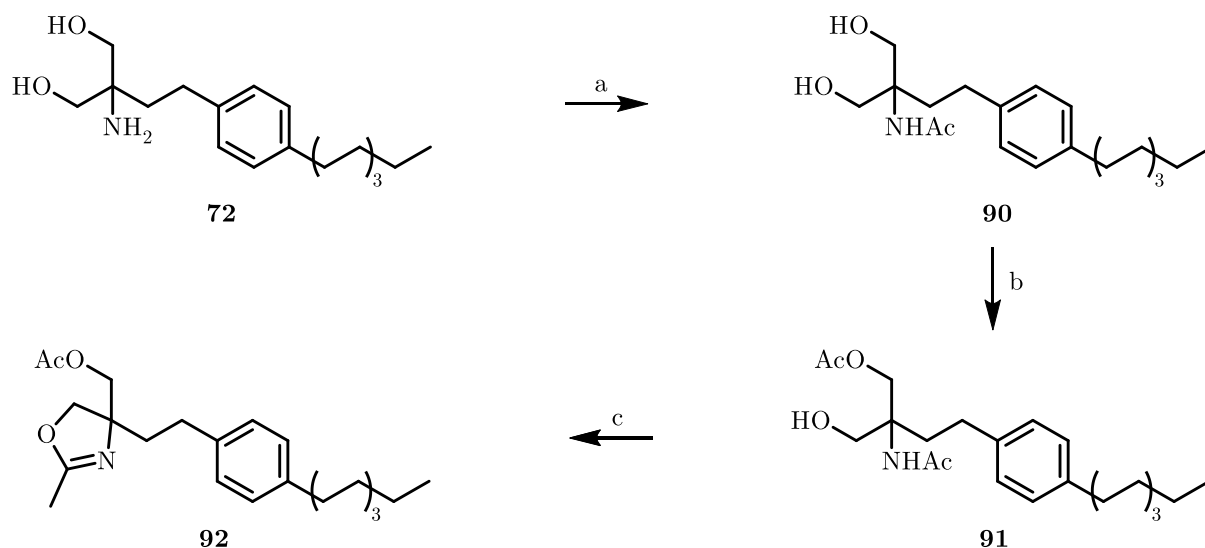


Abbildung 4:41: Syntheseveruche zu azidmodifiziertem Fingolimod über *N*-Acetyl geschützte Zwischenstufen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Ac₂O, NaHCO₃, DCM, RT, 3 d, 64 %; b) Vinylacetat, Lipase, THF, RT, 18 h, 64 %; c) MsCl, NEt₃, DCM, RT.

Dazu wurde die Aminogruppe durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid unter wässrig basischen Bedingungen acetyliert. Anschließend wurde eine Hydroxylgruppe von *N*-Acetylfingolimod **90** durch Novozym 435 (immobilisierte B Lipase von *Candida antarctica*) ebenfalls acetyliert und **91** erhalten. Anschließend wurde versucht die verbliebene Hydroxylgruppe mittel MsCl in eine Abgangsgruppe zu überführen und anschließend mit Natriumazid zu substituieren. Unmittelbar nach Überführen des Alkohols in eine Abgangsgruppe kommt es durch den intramolekularen Angriff des *N*-Acetyls zur Bildung des Oxazolins **92**.^[313] Da die Synthesestrategie zielführend war, wurde auch die Enantiomerenreinheit von **90** oder den Folgeprodukten nicht bestimmt. Kiuchi *et al.* beschrieben bei dieser Reaktion die Bildung des *R* konfigurierten Enantiomers mit einem *ee* von 89 %.

Um die Oxazolinbildung zu verhindern, wurde mit Butyloxycarbonyl (Boc) eine alternative Schutzgruppe für das Amin gewählt (vgl. Abb. 4.42). Da die sperrige *tert*-Butylgruppe die Erkennung durch die Lipase verhindert, wurde hier keine enantioselektive Synthese verfolgt.

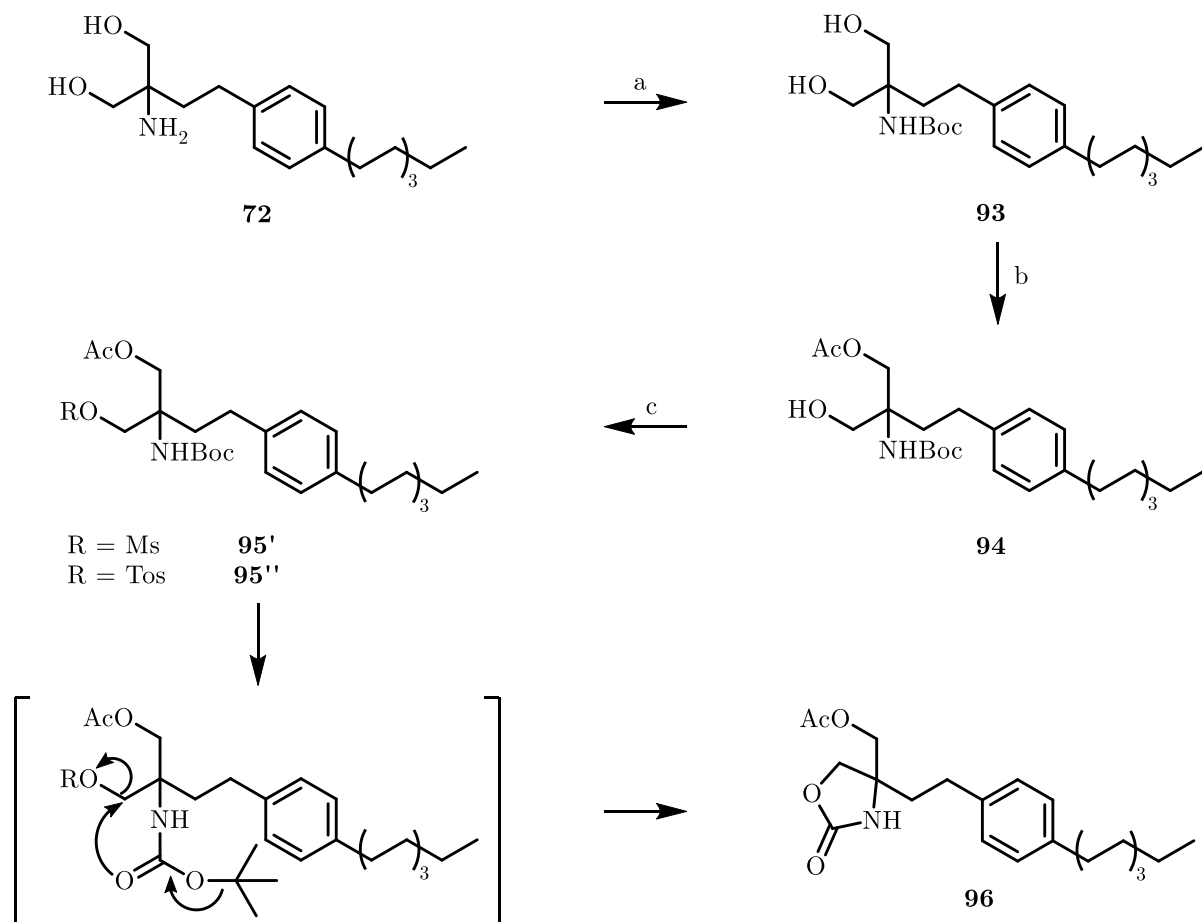


Abbildung 4:42: Syntheseveruche zu azidmodifiziertem Fingolimod über NH-Boc geschützte Zwischenstufen. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc_2O , NEt_3 , MeOH , RT, 2 d, 80 %; b) Ac_2O , NEt_3 , THF , RT, 18 h, 80 %; c) mit MsCl , NEt_3 , DCM , RT, quantitativ (**95Ms**), mit TosCl , NEt_3 , DCM , RT, quantitativ (**95Tos**).

Nach der Schützung der Aminogruppe *via* Boc_2O wurde das Amid **93** mit einem Äquivalent Essigsäureanhydrid umgesetzt. Anschließend wurde die primäre Hydroxylgruppe des Ethylester **94** mittels Mesylchlorid in eine Abgangsgruppe überführt. Im Gegensatz zu den *N*-Acetylamiden sind diese Verbindungen relativ stabil und konnten isoliert werden. Bei der anschließenden Umsetzung des Sulfonsäureesters **95'** mit Natriumazid in DMF bildet sich das 2-Oxazolidinon **96**. Gleiches galt für das weniger reaktive *para*-Toluolsulfonat **95''** das als Alternative hergestellt wurde.

4 Durchführung und Diskussion der Ergebnisse

Da die Synthesestrategie das Azid an Stelle einer der Hydroxylgruppen einzuführen nicht erfolgreich war, wurde die Aminofunktion der Kopfgruppe als Ziel gewählt.

Über Triflatazid lässt sich die Aminogruppe des Fingolimods, ebenso wie bei den Sphingoidbasen, in ein Azid überführen, um Azido-Fingolimod **97** zu erhalten (vgl. Abb. 4.43).

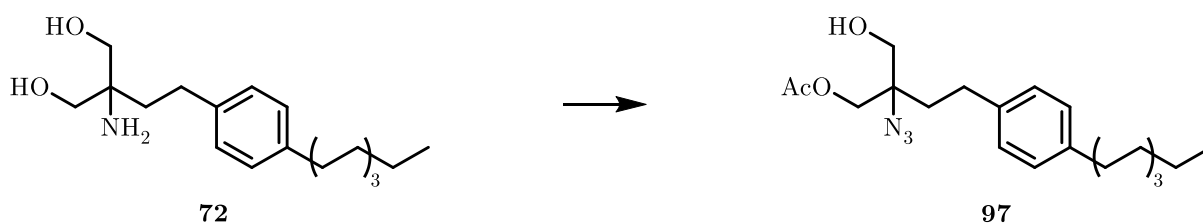
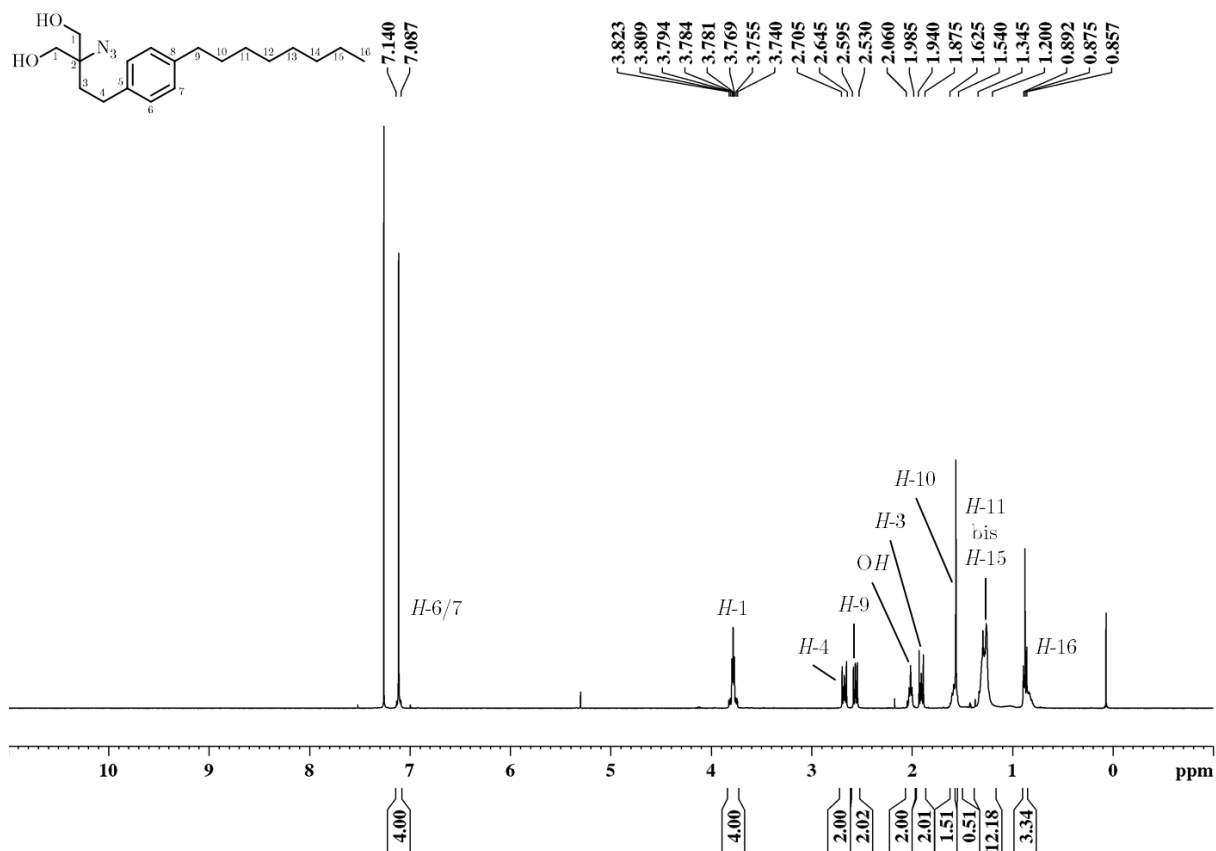


Abbildung 4.43: Synthese von Azido-Fingolimod **97**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: TfN_3 , CuSO_4 , K_2CO_3 , MeOH , H_2O , 20 h, quantitativ.

Über Triflatazid ließ sich die Aminogruppe des Fingolimods, ebenso wie bei den Sphingoidbasen, erfolgreich in ein Azid überführen, um Azido-Fingolimod **97** zu erhalten (vgl. Abb. 4.43). Untersuchungen zur Konjugationsfähigkeit in Zellmembranen und den biochemischen Eigenschaften von Azido-Fingolimod **97** stehen derzeit noch aus.

4.2.4 Diskussion der spektroskopischen Daten

Abbildung 4.44: ^1H NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von **97** mit Zuteilung der Protonensignale.

Im ^1H -NMR-Spektrum von Azido-Fingolimod **97** erscheinen die aromatischen Signale als Multiplett am weitesten im Tieffeld bei etwa 7.10 ppm, gefolgt von den als Dublett von Dublett erscheinenden Signalen der Protonen an C-1 (vgl. Abb. 4.44). Das Signalmuster erklärt sich aus einer geminalen 2J -Kopplung von knapp 12 Hz und einer 3J -Kopplung zum Proton der Hydroxylgruppe von 4 Hz. Die Protonen an den beiden Kohlenstoffen in Benzylstellung erscheinen jeweils als Multiplett zwischen 2.7 und 2.5 ppm. Die restlichen CH_2 -Protonen der Alkylkette erscheinen zwischen 2 und 1 ppm, wobei die meisten in einem Multiplett zusammenfallen. Die Protonen der terminalen CH_3 -Gruppe am Ende der Alkylkette erscheinen am weitesten im Hochfeld als Triplet bei etwa 8.8 ppm mit einer 3J -Kopplung von 6.6 Hz.

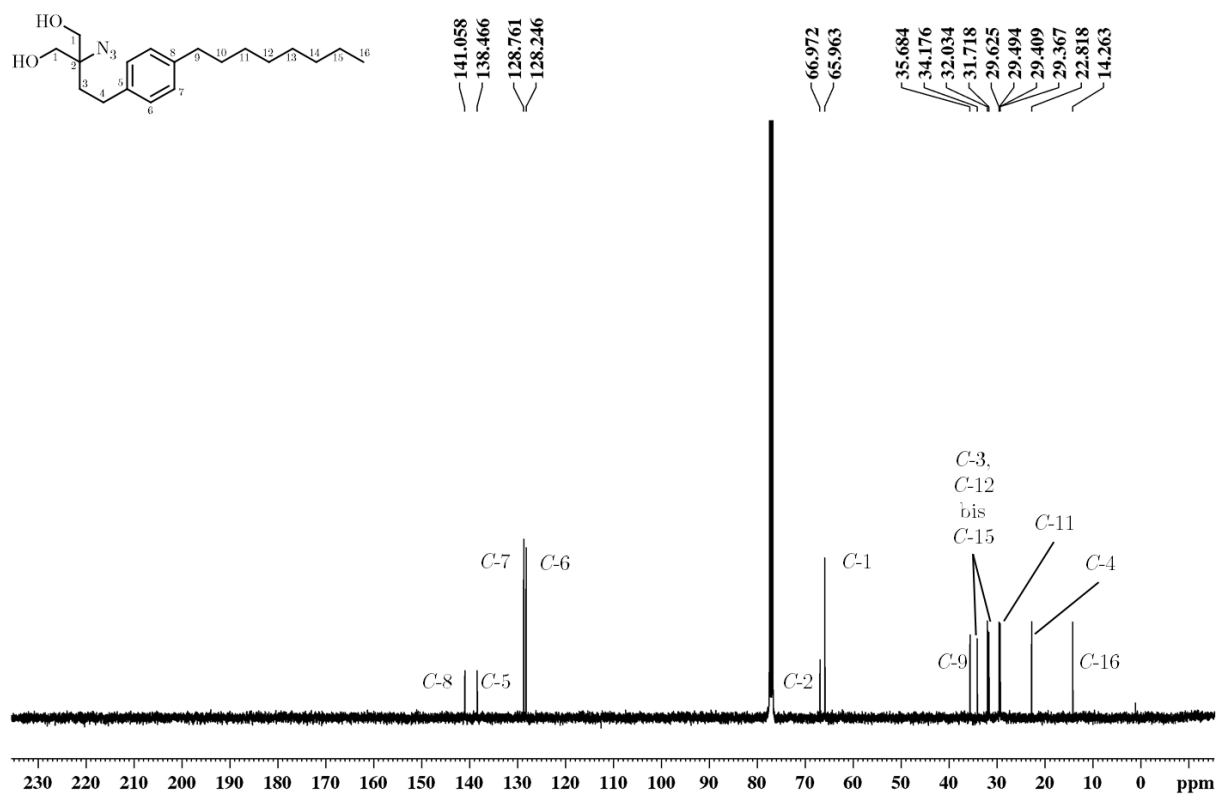


Abbildung 4.45: ^{13}C NMR-Spektrum (150 MHz, CDCl_3) von **76b** mit Zuteilung der Kohlenstoffsignale.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum finden sich die aromatischen Kohlenstoffsignale von **76b** am weitesten im Tieffeld zwischen 141 und 128 ppm (vgl. Abb. 4.45). Bei etwa 67 ppm erscheint das Signal des quartären C-2-Kohlenstoffes gefolgt von den beiden Signalen der C-1-Kohlenstoffe. Die restlichen CH_2 -Kohlenstoff Signale erscheinen zwischen 36 und 22 ppm. Das Signal des terminalen CH_3 -Kohlenstoffes findet sich am weitesten im Hochfeld bei etwa 14 ppm.

4.3 Sphingolipidmodifizierte Oberflächen

Ein großes Problem bei der klinischen Versorgung von langzeitbeatmeten Patienten stellen beatmungsassoziierte Pneumonien (*ventilator associated pneumonia*, VAP) dar.^[314] Dabei gelten Pneumonien (Lungenentzündungen) dann als beatmungsassoziiert, wenn sie sich erst nach mindestens 48 h künstlicher Beatmung entwickeln.^[315] Das Risiko, eine VAP zu entwickeln, liegt innerhalb der ersten fünf Beatmungstage bei 3 % pro Tag und sinkt danach auf 2 % in den Tagen sechs bis neun und ab Tag zehn bleibt sie bei 1 %.^[316] Entwickelt ein Patient eine VAP, verlängern sich dessen Krankenhausaufenthalte im Schnitt um etwa 6 bis 9 Tage.^[317-318] Nach Entwicklung einer VAP liegt die Sterblichkeit je nach Studie mit 13 % bzw. 16 % sehr hoch. VAP stellt daher die häufigste Ursache von tödlich verlaufenden Krankenhausinfektionen dar.^[315, 319-321] Die Gefahr eine VAP zu entwickeln liegt bei invasiven Beatmungen wesentlich höher als bei nicht invasiven.^[314] In den Beatmungsschläuchen (Endotrachealtubus, ETT) kann sich schon kurz nach Beginn der künstlichen Beatmung ein Biofilm bilden,^[322-324] was das Risiko einer VAP erhöht, da der ETT eine direkte Verbindung in die sterilen unteren Atemwege und das Lungenparenchym bildet.^[324] Eine vielversprechende Strategie, um die Biofilmbildung zu minimieren, stellt die Beschichtung der ETTs mit antibakteriellen Materialien wie Silber oder anderen Nanopartikeln dar.^[325-326]

Gulbins *et al.* beobachteten kürzlich, dass Sphingosin **1** in trachealen und bronchialen Epithelzellen antibakterielle Aktivität zeigt und durch Inhalation zur Behandlung von pulmonalen Infektionen dienen könnte.^[223] Wenn sich diese antibakteriellen Eigenschaften der Lipide auf Oberflächen übertragen lassen, können vielversprechende biofilmhemmende Materialien geschaffen werden, die sich unter anderem zur Vermeidung von VAP eignen könnten.

Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass Sphingosin- oder phytosphingosinhaltige ETTs die Adhäsion und das Wachstum der relevanten Erreger *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, und *S. aureus* auf der Oberfläche um bis zu 99 % reduzieren.^[327] Zur Beschichtung wurden die ETTs in Sphingosinlösungen eingetaucht. Bei *in vivo* Intubationsversuchen mit Mäusen zeigte sich, dass mehr als 90 % der Lipide und die damit assoziierte antibakterielle Wirkung, innerhalb von Stunden verloren gehen. Um eine längere Haltbarkeit zu erreichen, wurde eine Sphingosin-Polydopamin-Beschichtung hergestellt. Die bakteriziden Eigenschaften konnten so erhalten werden, aber die Beatmungsschläuche wurden durch die Beschichtung spröde und brüchig. Bei dieser Art der Beschichtung liegt ein großer Anteil der Lipide allerdings vollständig und unwirksam unter der Oberfläche.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Konzept zu entwickeln, mit der Sphingolipid- und abgeleitete Strukturen gezielt an Oberflächen kovalent gebunden werden, potentiell antibakterielle Lipidbeschichtungen gescreent und der Einfluss der relativen Orientierung der Lipide untersucht werden können. Als Ausgangspunkt sollten die bereits in dieser Arbeit vorgestellten azidmodifizierten Sphingolipide und -analoga dienen. Über die Azidgruppe lassen sich die Lipidanaloga mittels CuAAC an alkinpräsentierende Oberflächen konjugieren, anschließend die antibakteriellen Eigenschaften der Oberflächen und der Einfluss der relativen Orientierung der Lipide untersucht (vgl. Abb. 4.46).

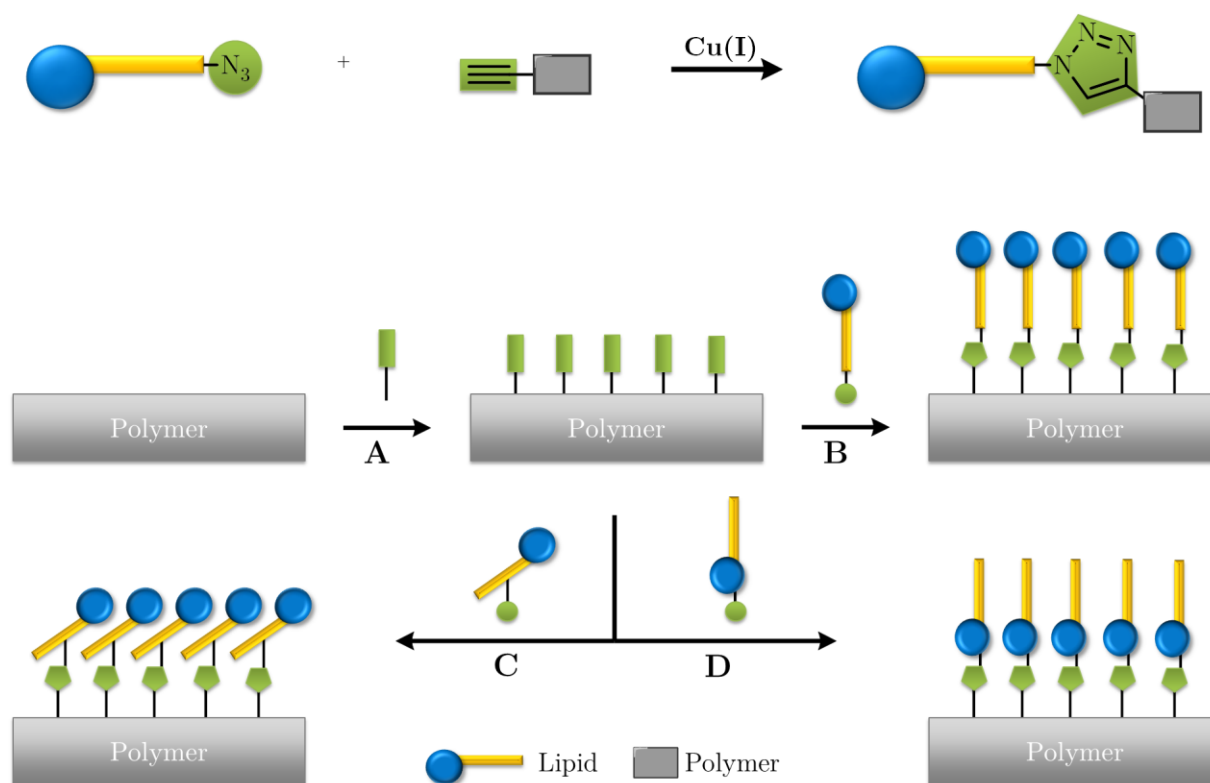


Abbildung 4.46: Lipidmodifizierte Polymeroberflächen. Oben: Konjugation von alkinhaltigen Oberflächen mit azidhaltigen Lipiden mittels CuAAC. Unten: Beschichtung von Polymeroberflächen mit alkinhaltigen Linkern (A) und anschließender Konjugation von Lipiden unterschiedlicher Orientierung. Konjugation von Lipiden mit Azidmodifikation am lipophilen Ende (B), in der Mitte der Alkylkette (C) und am hydrophilen Kopf (D).

4.3.1 Protokoll für lipidbeschichteten Oberflächen

Um alkinpräsentierende Oberflächen zu schaffen, die sich gut als Ausgangspunkt für die Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften der konjugierten Lipide eignen, wurde von Nunc Covalink 96 Wellplates (Microtiterplatten) der Firma ThermoFisher Scientific ausgegangen.^[328] Diese Platten sind an der Oberfläche der Microtiterplatten über Linkermoleküle mit sekundären Aminen funktionalisiert. Nach carbodiimidvermittelter Amidkupplung mit Pentadec-4-insäure werden endständige Alkine auf der Oberfläche präsentiert. Die Dreifachbindungen können anschließend zur Konjugation azidhaltiger Verbindungen mittels CuAAC genutzt werden. Die

Konjugation azidmodifizierter Sphingolipidanaloga ermöglicht variabel und schnell die Herstellung von kovalent lipidbeschichteten Oberflächen. Zur Bestimmung der bakteriziden Oberflächen-eigenschaften wird die Verwendung des zytotoxischen Kupfer (I) in der Konjugationsreaktion nicht verfälscht, da die Oberfläche erst nach mehreren Waschgängen verwendet wird und kein zytotoxisches Kupfer (I) mehr auf den Oberflächen vorhanden ist. Zur Konjugation von am Kopfende modifizierten Sphingolipidanaloga auf der Oberfläche wurden das Azidophytosphingosin **50** sowie die *N*-Oleoylserinolanaloga **76a** und **76b** verwendet. Die Ceramidanaloga **28** und **29** wurden als mittig modifizierte und die Ceramidanaloga **22** und **23** als endständig modifizierte Lipide auf die Oberfläche konjugiert. Zusätzlich wurden die Serinolamide **98** und **99** als achirale Sphingolipidanaloga für die Oberflächenmodifikation synthetisiert. Die Synthese der Serinolamide **98** und **99** ist in Abb. 4.47 gezeigt. In Abb. 4.48 sind die Sphingolipidanaloga für Oberflächenmodifikationen mit der Azidmodifikation in der jeweiligen Position Kopf, Mitte und Ende dargestellt.

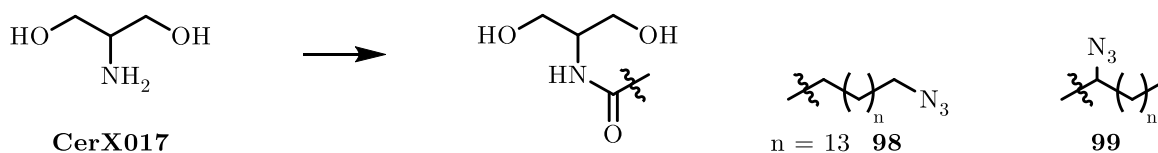


Abbildung 4.47: Synthese von Serinolamiden. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: Carbonsäure, DCC, NHS, DIPEA, DMF, RT, 24 h. mit Azido Carbonsäure **23** 72 % (**98**), mit **29** 86 % (**99**).

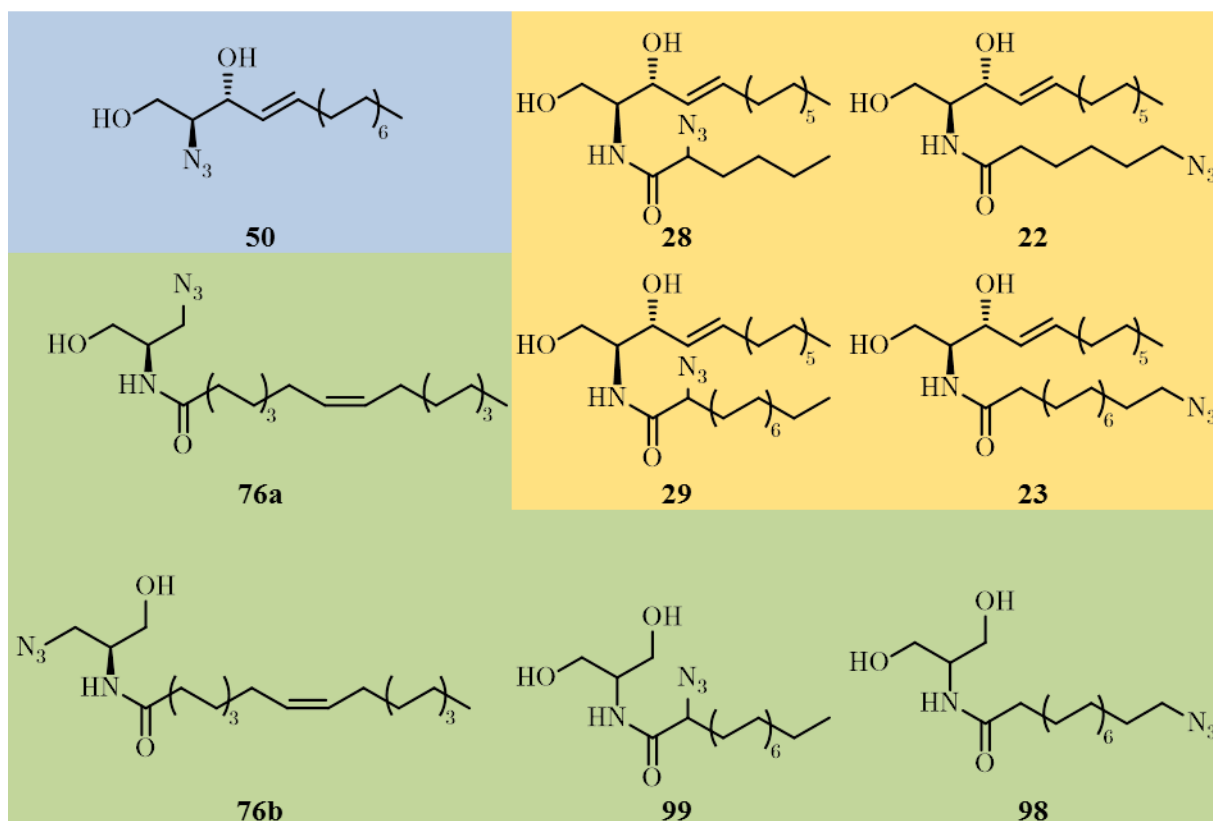


Abbildung 4.48: Sphingolipidanaloga für Oberflächenmodifikationen mit der Azidmodifikation am Kopfende (links) beziehungsweise am Schwanzende (rechts) des acylierten Carbonsäureresters. Die Lipide unterteilen sich in das Phytosphingosin analog **50** (blau), Ceramidanaloga (gelb) und *N*-Acylserinolanaloga (grün).

4.3.2 Evaluierung der antibakteriellen Wirkung

Die Oberflächen der mit azidmodifizierten Sphingolipidanaloga präparierten Wellplates wurden in Folge innerhalb des Arbeitskreises von Prof. Dr. Erich Gulbins (Uni Duisburg-Essen) auf die antibakterielle Wirkung gegenüber den VAP relevanten Erregern *P. aeruginosa* und *S. aureus* untersucht. Dafür wurden Bakteriensuspensionen von *P. aeruginosa* und *S. aureus* in die modifizierten Wellplates gegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach definierter Verdünnung wurden die Lösungen auf Agarplatten gegeben, um über die Bestimmung von koloniebildenden Einheiten (*colony forming unit*, CFU) die überlebenden Bakterien zu quantifizieren. In Abb. 4.49 sind die

Ergebnisse der bakteriziden Oberflächenbeschichtung durch Konjugation mit azidmodifizierten Sphingolipiden und -analoga auf Nunc Covalink 96 Wellplates gegenüber *P. aeruginosa* gezeigt.

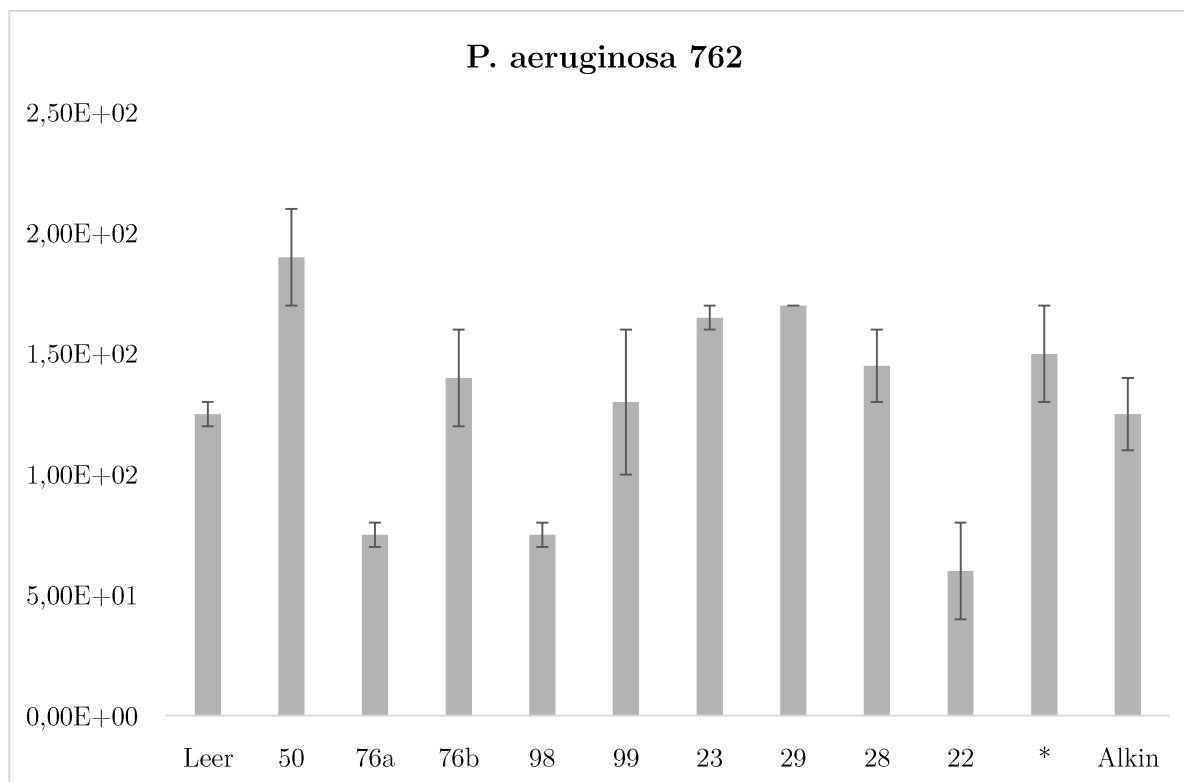


Abbildung 4.49: Ergebnisse zur bakteriziden Oberflächenbeschichtung durch Konjugation mit azidmodifizierten Sphingolipiden und -analoga auf Nunc Covalink 96 Wellplates gegenüber *P. aeruginosa*. * entspricht einem Well auf dessen Oberfläche nur Pentadecin konjugiert wurde. Die auf der Y-Achse angebenen Werte sind in koloniebildende Einheiten (*colony forming unit*, CFU) mit Standardabweichungen.^[329] Die Messungen wurden innerhalb des Arbeitskreises Prof. Dr. Erich Gulbins (Uni Duisburg-Essen) durchgeführt.

Die beste Wirksamkeit gegenüber dem Erreger *P. aeruginosa* zeigten Oberflächen, die mit den Lipidanaloga **76a**, **98** und **22** modifiziert waren und reduzieren die Bakterien nach einer Stunde um mindestens 40 %. Alle Oberflächen, die mit Lipidanaloga beschichtet waren, welche die Azidmodifikation in α -Position der acylierten Carbonsäure tragen, zeigten keine Wirkung gegenüber *P. aeruginosa*. Die schlechten

Ergebnisse der mit Azidophytosphingosin **50** modifizierten Oberfläche zeigen, dass ein Amin oder Amid für die antibakterielle Wirkung nötig ist. Generell lässt sich jedoch nicht feststellen, dass eine Modifikation durch am Kopfende funktionalisierte Sphingolipidanaloga die Wirksamkeit der Oberflächen unterbindet. Die Konjugation des *N*-Oleoylserinolanalogs **76a** erzeugt ebenfalls bakterizide Oberflächen (Bakterienreduktion um 40 %). Interessant ist hier die ausbleibende Bakterizidität nach Konjugation des Enantiomers **76b**. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wirkung zum Teil auf die β -Hydroxyamidstruktur zurückzuführen ist, aber nur in der mit natürlichen Sphingolipiden vergleichbaren stereochemischen Anordnung zwischen der primären Hydroxylgruppe und dem Amid. Die antibakterielle Wirkung der über das Schwanzende gebundenen Lipidoberflächen fällt nur für das langkettige ω N₃-C₁₆-Cer **23** gering aus. Oberflächen, die mit dem langkettigen, achiralen Serinolamid **98** behandelt wurden erreichen eine Reduktion um 40 %. Die wirksamste Oberfläche zur Reduktion von *P. aeruginosa* wird durch die Beschichtung durch das kurzkettige, endständig gebundene Ceramidanalogs ω N₃-C₆-Cer **22** gefunden; hier wird eine Bakterienreduktion um 52% erreicht.

Zusammengefasst hat das β -Hydroxyamidmotiv einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa*, wenn es in der gleichen stereochemischen Anordnung wie der Sphingolipide oder achiral vorliegt. Auch sind kürzere acylierte Carbonsäuren von Vorteil, solange diese endständig an die Oberfläche gebunden werden. Die größere Wirksamkeit kann in der vergleichsweise höheren Hydrophilie begründet sein, die in wässrigem Medium zu einer besseren Präsentation des antibakteriellen Lipides in das wässrige Bakterienmedium sorgt.

Die Ergebnisse der vorläufigen Bakterizitätsuntersuchungen gegen den VAP relevanten Erreger *S. aureus* leiden zwar unter großen Standardabweichungen, zeigen aber ähnliche Trends wie bei den Untersuchungen gegen *P. aeruginosa*. Die Ergebnisse zur bakteriziden Oberflächenbeschichtung durch Konjugation mit azidmodifizierten Sphingolipiden und -analoga auf Nunc Covalink 96 Wellplates gegenüber *S. aureus* sind in Abb. 4.50 zusammengefasst.

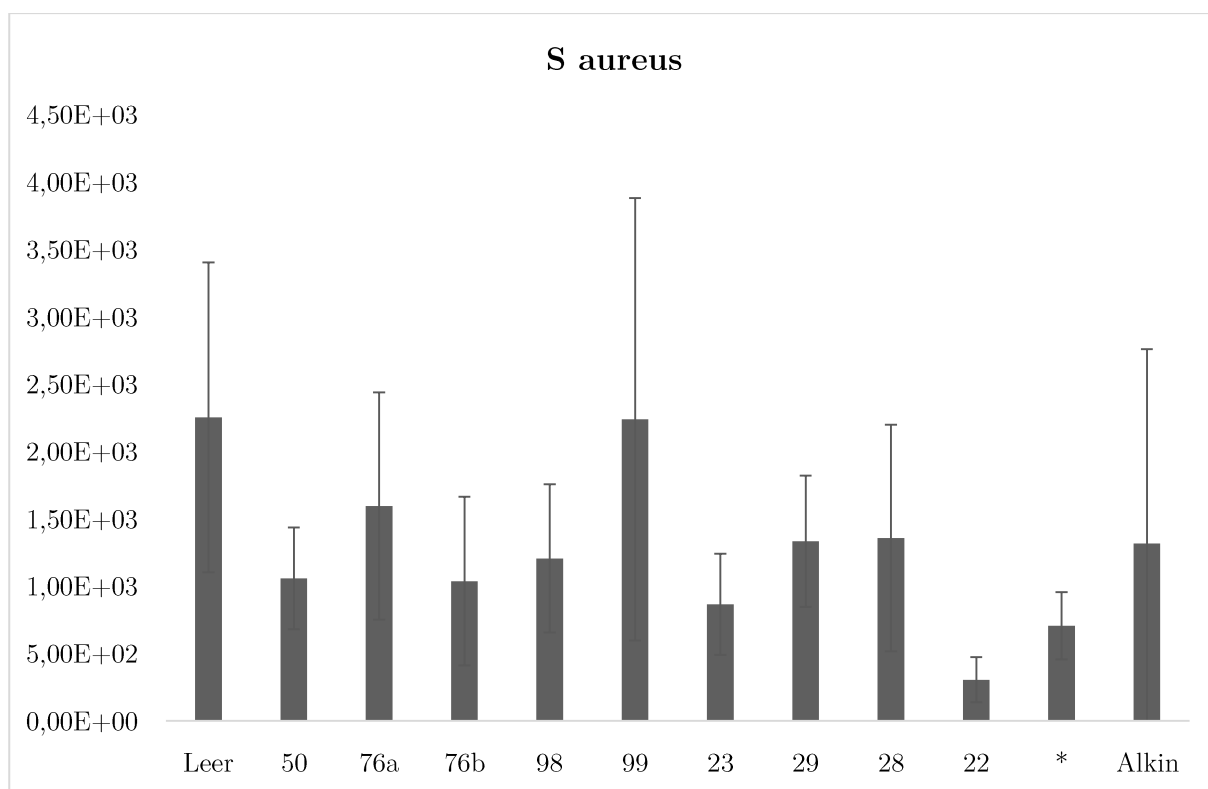


Abbildung 4.50: Vorläufige Ergebnisse zur bakteriziden Oberflächenbeschichtung mittels Konjugation mit azidmodifizierten Sphingolipiden und -analoga auf Nunc Covalink 96 Wellplates gegenüber *S. aureus*. * entspricht einem Well auf dessen Oberfläche nur Pentadecin konjugiert wurde. Die auf der Y-Achse angegebenen Werte sind in koloniebildende Einheiten (*colony forming unit*, CFU) mit Standardabweichungen.^[329] Die Messungen wurden innerhalb des Arbeitskreises Prof. Dr. Erich Gulbins (Uni Duisburg-Essen) durchgeführt.

Auch gegen *S. aureus* zeigen die mit $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** beschichteten Oberflächen die größte Bakterienreduktion. Im Gegensatz zu der Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa*, zeigt auch das langkettige $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** und das Phytosphingosinderivat **50** eine Reduktion von *S. aureus*. Bei den Oberflächen, die mit den *N*-Oleoylserinolanaloga

modifiziert sind, wechselt die Wirksamkeit. Gegen *S. aureus* erweist sich **76a** wirksamer als das Enantiomer **76b**, allerdings liegen die Unterschiede innerhalb der Standardabweichungen. Wie bei den Untersuchungen gegen *P. aeruginosa* zeigen sich für die Oberflächen, die mit dem endständig modifizierten, achiralen Serinolderivat **98** funktionalisiert sind, eine deutliche Bakterienreduktion. Die Wellplates, die mit über die α -Position gebundenen Gegenstück **99** modifiziert sind, weisen keine Bakterizität auf.

Auch bei der antibakteriellen Wirkung der lipidmodifizierten Oberflächen gegen *S. aureus* zeigen die Lipidanaloga, die über das Kettenende der acylierten Fettsäure gebunden sind, die größte Bakterienreduktion. Bei den *N*-Oleoylserinolanaloga spielt die relative Orientierung der Azidfunktion eine wichtige, aber je nach Erreger keine einheitliche Rolle. Analog zu den Ceramidderivaten zeigt sich bei den mit azidfunktionalisierten Carbonsäuren acylierten, nicht chiralen Serinolderivaten **98** und **99**, dass auch hier die Azidfunktion in ω -Position wesentlich wirksamere Oberflächenmodifikationen zur Bakterienreduktion erzeugt.

4.3.3 Lipide für Oberflächen der 2. Generation

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für zukünftige Oberflächenmodifikationen weitere azidmodifizierte Lipidanaloga synthetisiert. Die effektivste Oberflächenmodifikation gegen sowohl *P. aeruginosa* als auch *S. aureus* wurde mit der Konjugation mit ω N₃-C₆-Cer **22** erreicht. Phytosphingosin **3** zeigt bei *in vitro* Untersuchungen ähnliche bakterizide Eigenschaften wie Sphingosin **1**.^[223] Daher wurde ausgehend von Phytosphingosin **3** auch das Azido-Phytoceramid **58** für Oberflächenmodifikationen synthetisiert (vgl. Abb. 4.51).

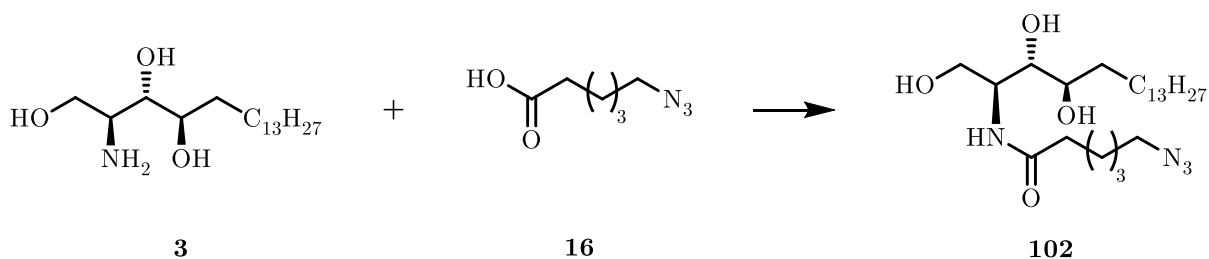


Abbildung 4.51: Synthese des azidmodifizierten Phytoceramidanalogs **102**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT, 24 h, 85 %.

Die Oberflächenmodifikationen mit dem achiralen Serinolamides **98** zeigte ebenfalls gegen beide getesteten VAP relevanten Erreger *P. aeruginosa* als auch *S. aureus* eine Bakterienreduktion. Bei den endständig modifizierten Ceramidanaloga hat die Kettenlänge der acylierten Carbonsäure entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit. Mit dem Serinolderivat **100** wurde erfolgreich ein Sphingolipidanalogs synthetisiert, welches beide Eigenschaften vereint (vgl. Ab 4.52)

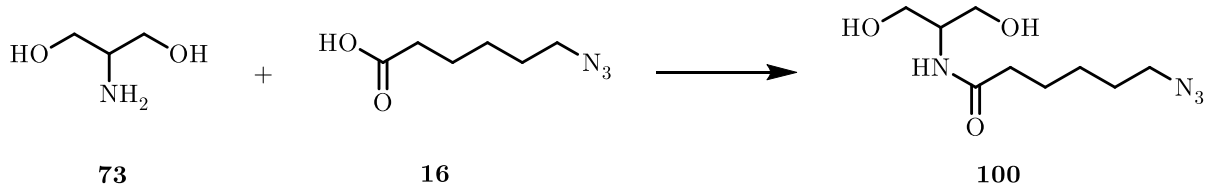


Abbildung 4.52: Synthese von Serinolamid **100**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: DCC, NHS, DIPEA, DMF, RT, 24 h, 46 %.

Die Ergebnisse der Oberflächenmodifikationen mit den azidmodifizierten *N*-Oleoylserinolanaloga **76a** und **76b** weist darauf hin, dass das β -Hydroxyamidmotiv einen wesentlichen Einfluss auf die Bakterizidität hat. Um das Wirkmotiv genauer untersuchen zu können wurde *N*-(2-Hydroxyethyl)hexadecanamid **101** synthetisiert, das die Kopfgruppe auf das reine β -Hydroxyamidmotiv reduziert (vgl. Abb. 4.53)

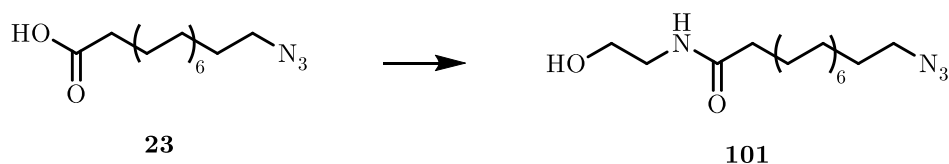


Abbildung 4.53: Synthese von azidmodifizierten *N*-(2-hydroxyethyl)hexanamiden. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) **23**, Monoethanolamin, NEt₃, ClCO₂Et, DCM, RT 16 h, 24 %.

Die Ergebnisse der antibakteriellen Beschichtungen des azidmodifizierten Phytoceramids **102** und der Lipidanaloga **100** und **101** liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Über die Modifikation von Nunc Covalink 96 Wellplates mit Pentadecinsäure konnte eine Grundlage geschaffen werden, die sich zur Herstellung von Lipid beschichteten Oberflächen eignet. Durch die Konjugation der azidhaltigen Sphingolipidanaloga **22** und **98** konnten erfolgreich bakterizide Oberflächen erzeugt werden, welche eine starke antibakterielle Wirkung gegenüber den VAP relevanten Erregern *P. aeruginosa* und *S. aureus* besitzen. Durch Variation der Orientierung und Struktur der kovalent gebundenen Sphingolipidanaloga konnten bereits erste Einblicke auf das Wirkmotiv gewonnen werden.

In Zukunft sind auch Oberflächen von Interesse, bei denen Sphingoidbasen über das Kettenende gebunden sind. Da die Kettenlängen der Lipidstrukturen großen Einfluss auf die antibakteriellen Eigenschaften der Oberflächen gezeigt haben, sollten in weiterführenden Arbeiten auch kurz-kettige Sphingoidbasen untersucht werden. Bisher wurde mit Pentadecin ein lipophiler Linker verwendet; der Einsatz von stärker hydrophilen Linkern, beispielsweise durch die Verwendung von Polyethylenglykoleinheiten, könnte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die antibakterielle Wirkung haben. Zukünftig sollen die lipidmodifizierten Wellplates auch Verwendung in der biochemischen Analyse finden, indem sphingolipidaffine Lipide aus Zellysaten separiert und identifiziert werden.

4.4 Funktionelle Moleküle zur Verfolgung von Zellmechanismen

Neben den einfachen bioorthogonalfunktionalisierten Sphingolipiden sollten in dieser Arbeit auch ein Multivalenter Linker zur Mehrfachkonjugation und ein isotpenmarkiertes 2,3-Methylmethoxy-*p*-quinon zur Untersuchung von Stoffwechselwegen synthetisiert werden.

4.4.1 Multivalenter Linker zur Mehrfachkonjugation

Ziel war es, einen kleinen Synthesebaustein zu generieren, der zwei bioorthogonale konjugierbare Gruppen beinhaltet und über ein Amin an Proteine gebunden oder weiter funktionalisiert werden kann. Die zwei bioorthogonalen Gruppen sollen zukünftig genutzt werden, um zwei Farbstoffe zu konjugieren und damit verbesserte Fluoreszenzeigenschaften, beispielsweise für hochauflösende Spektroskopie, zu erhalten. Die retrosynthetischen Überlegungen zur Herstellung eines multivalenten Linkers zur Mehrfachkonjugation sind in Abb. 4.54 dargestellt.

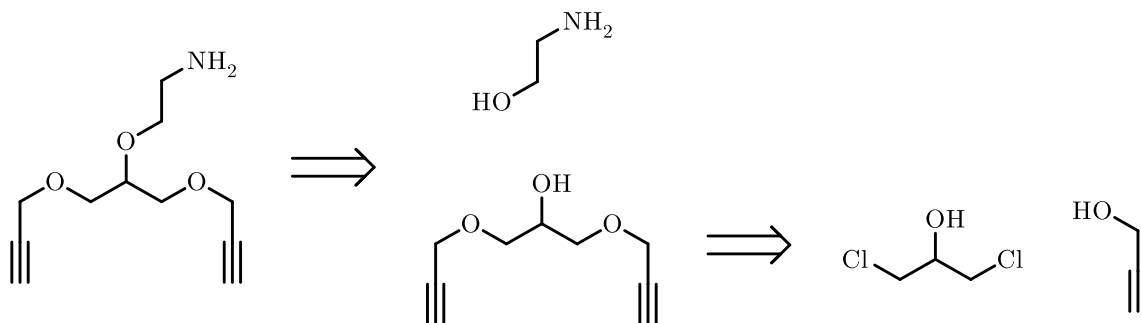


Abbildung 4.54: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung eines multivalenten Linkers zur Mehrfachkonjugation.

Um in biologischen Systemen eventuell störende sterische Einflüsse möglichst gering zu halten, sollte der Linker möglichst klein sein. Die Reaktion zwischen Azid und Alkin ist die am meisten eingesetzte Konjugationsmethode mit dem breitesten Angebot an kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffen. Da mehrere Azide in kleinen Molekülen sich meist als instabil erweisen oder gar explosiv erweisen,^[292, 296] wurden terminale Alkine als konjugierbare Gruppen gewählt. Als Ausgangssubstanz wurde 1,3 Dichlorpropan-2-ol **103** gewählt, da über die Substitution der Chloride zwei clickbare Gruppen eingeführt werden können und über den Alkohol eine Funktionalisierung zum Amin erfolgen kann (vgl. Abb. 5.55).

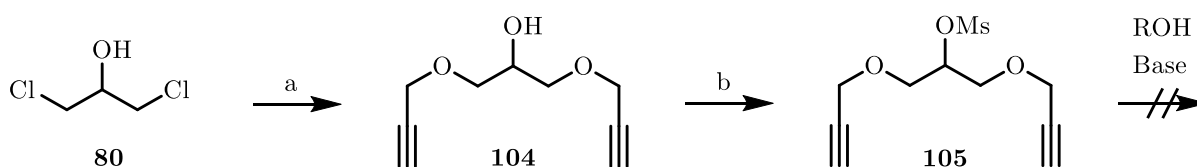


Abbildung 4.55: Synthese des Dialkyns **104** und des Mesylats **105**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Propargylalkohol, NaOH, TBAB, DCM, H₂O, RT, 3 d, 84 %.; b) MsCl, NEt₃, DCM, RT, 3 h.

Die Literatur beschreibt die Umsetzung von 1,3 Dichlorpropan-2-ol **103** mit Propargylalkohol zum Dialkin **104** in kochender Natronlauge mit einer Ausbeute von 34 %.^[330] Um diese Ausbeute zu verbessern wurden, alternative Reaktionsbedingungen gewählt: 1,3 Dichlorpropan-2-ol **103** wurde mit jeweils 6.0 Äquivalenten NaOH und Propargylalkohol in einem Zweiphasengemisch aus Wasser und Dichlormethan umgesetzt. Als Phasentransferkatalysator wurde Tetrabutylammoniumbromid verwendet. Über diese Reaktionsbedingungen konnte eine Ausbeute von 84 % erzielt werden; die gewählten Reaktionsbedingungen waren somit erfolgreich. Anschließend wurde **104** mit Methansulfonylchlorid in das Mesylat **105** überführt. Bei der direkt folgenden Umsetzung von **105** mit Ethylenglycol und NEt₃, erwies sich das Mesylat als

außergewöhnlich reaktionsträge. Es konnte nach Abbruch der Reaktion durch säulenchromatische Aufreinigung zurückgewonnen und charakterisiert werden.

Analog zu der Cyclooctenolmodifizierung (siehe Kapitel 4.1.5) wurde anschließend eine andere Synthesestrategie verfolgt. Um die weitere Modifikation der sekundären Alkoholgruppe zu ermöglichen, sollte der aminhaltige Linker über eine Carbonyleinheit an **104** gebunden werden (vgl. Abb. 4.56).

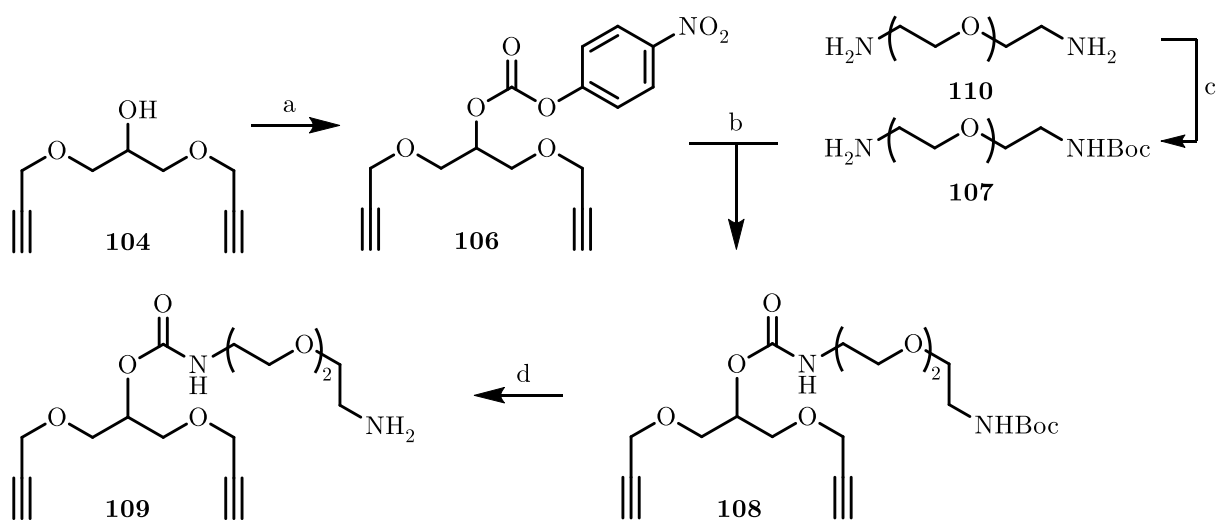


Abbildung 4.56: Synthese des multivalenten Linkers **109**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 4-Nitrophenylchloroformat, Pyridin, DCM, RT, 5 h; b) NEt₃, DMF, RT, 16 h, 91 % über zwei Stufen c) Boc₂O, DIPEA, DCM, 2 h, 84 %; d) TFA, DCM 4 h, 29 %.

Um den sekundären Alkohol des Dialkins **104** um ein primäres Amin zu erweitern, wurde das Dialkin zuerst mit 4-Nitrophenylchloroformat umgesetzt. Anschließend wurde der *p*-Nitrophenolester **106** mit einfach *N*-Boc-geschütztem 1,8-Diaminotriethyleneglycol **107** umgesetzt. Nach Entschützung des so gewonnenen modifizierten Dialkins **108**, wird das primäre Amin **109** erhalten. Dabei wurde als Linker 1,8-Diaminotriethyleneglycol **110** gewählt, um eine gute Wasserlöslichkeit zu erhalten. Durch die erfolgreiche Synthese von **109** steht in ein Mehrfachlinker zur

Verfügung der in Zukunft die Visualisierung in superhochauflösenden Experimenten erleichtert.

4.4.2 Isotopenmarkiertes Benzochinonderivat

Zusätzlich zu den hauptsächlich zur Visualisierung verwendbaren, bioorthogonalfunktionalisierten Lipidanaloga sollte durch Isotopenmarkierung eine weitere Methode im Arbeitskreis etabliert werden, um den Stoffwechsel von Biomolekülen zu verfolgen.

Zur Abwehr gegen Parasiten produzieren einige Doppelfüßer (Diplopoden) benzochinonhaltige Sekrete.^[331] Obwohl diese Abwehrsekrete höchst wirksam gegen die meisten natürlichen Feinde sind, gibt es auch einige Insektenarten, die von den Sekreten sogar angelockt werden; dies konnte bereits für die parasitäre Fliegenart *Myriophora* nachgewiesen wurde.^[332] Aktueller Gegenstand der Forschung sind Raubwanzen, die sich ausschließlich auf Diplopoden als Beutetiere spezialisiert haben (*Ectrichodiinae*). Schmitt *et al.* untersuchen momentan, ob 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111** als Lockmittel auf *Ectrichodiinae* wirkt. Im Gegensatz zu anderen Raubwanzen bilden *Ectrichodiinae* zudem *ortho*-Nitrobenzaldehyd, daher liegt die Vermutung nahe, dass die *Ectrichodiinae* das Chinon **111** zu *ortho*-Nitrobenzaldehyd umsetzen. Um diese Umsetzung durch Fütterungsversuche nachzuweisen, sollte ein isotopenmarkiertes **111** synthetisiert werden. Die retrosynthetischen Überlegungen zur Herstellung von isotopenmarkiertem 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111** sind in Abb. 4.57 gezeigt.

Retrosynthetische Überlegungen

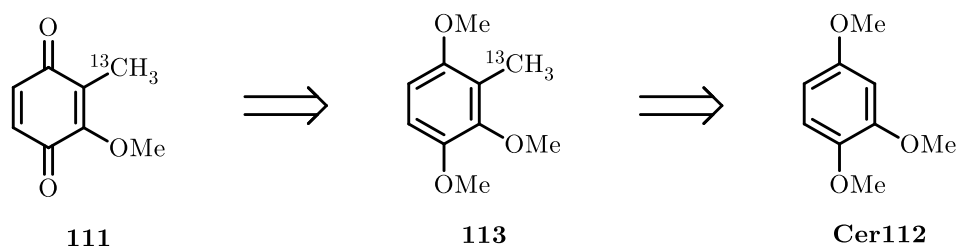


Abbildung 4.57: Retrosynthetische Überlegungen zur Herstellung von isotopenmarkiertem 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111**

1,4-Chinone können durch die Oxidation von 1,4-Dimethoxybenzolen synthetisiert werden. Da Chinone sehr reaktiv sind, muss die Isotopenmarkierung vor der Oxidation erfolgen. Da der aromatische Ring nicht erst aufgebaut werden soll, bleibt zur Markierung einzig die am Aromaten gebundene Methylgruppe zum Einbringen eines Isotopes übrig.

Für die Synthese von ^{13}C -markiertem Chinon **111** wurde eine Synthese von Davies *et al.* modifiziert (vgl. Abb. 4.58).^[333]

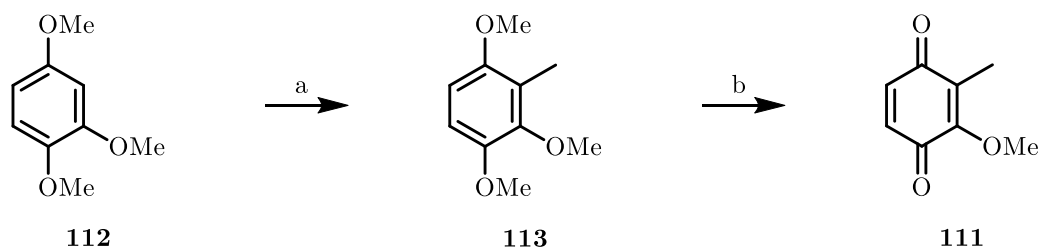


Abbildung 4.58: Synthese von isotopenmarkiertem Benzochinon. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *n*BuLi, MeI, THF, -78 °C \rightarrow RT, 2 h, 85 %; b) PhI(OAc)₂, H₂O, MeOH, RT, 5 h, 25 %.

Als erstes wird 1,2,4-Trimethoxybenzol **112** mit Methyljodid zu **113** umgesetzt. Durch den Einsatz von *n*BuLi erfolgt die Methylierung durch die Vorkoordination des

Lithiums selektiv an Position 3 des Benzolrings. Anschließend erfolgt die Oxidation durch Iodosobenzoldiacetat zum Chinon **111**. Dabei wurde die Synthese erst ohne Isotopenmarkierung durchgeführt und anschließend konnte durch Wiederholung mit $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ die Isotopenmarkierung erreicht werden. Mit der ^{13}C markierten Variante von **111** steht ein Molekül zur Verfügung um dessen Metabolisierungsprodukte identifizieren zu können. Die Ergebnisse der Metabolisierungsstudien liegen derzeit noch nicht vor.

4.4.3 Diskussion der spektroskopischen Daten des Benzochinonderivats

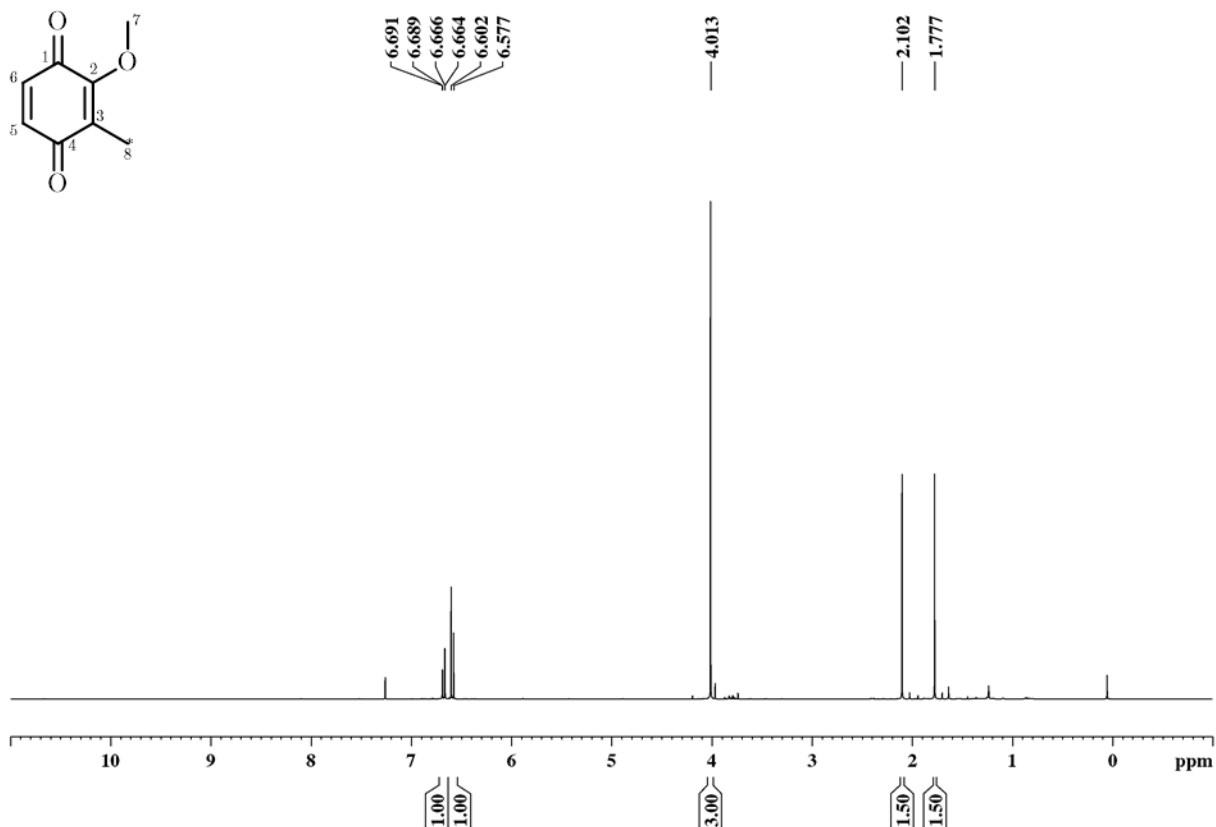


Abbildung 4.59: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) von 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111**.

Das ¹H-NMR-Spektrum von **111** zeigt durch die Aufspaltungsmuster von *H*-5 und *H*-8 den erfolgreichen Einbau der mit ¹³C-angereicherten Methylgruppe an (vgl. Abb. 4.59). Die Signale der Ringprotonen sind am weitesten ins Tieffeld verschoben. Das Signal von *H*-5 erscheint bei 6.68 ppm. als Dublett von Dublett. Das Aufspaltungsmuster erklärt sich zum einen durch die *cis*-Kopplung zu *H*-6 mit einer Kopplungskonstante von 10 Hz und zum anderen durch eine ⁴*J*-Kopplung von 1.2 Hz zum ¹³C der Methylgruppe. Das Signal von *H*-6 erscheint durch die *cis*-Kopplung als Dublett bei 6.59 ppm. Die Signale der Methoxyprotonen erscheinen als Singulett bei 4.01 ppm. Die

Protonen der ^{13}C -angereicherten Methylgruppe erscheinen als Dublett bei 1.94 ppm. mit einer 1J -Kopplungskonstante zum Kohlenstoff von 130.1 Hz.

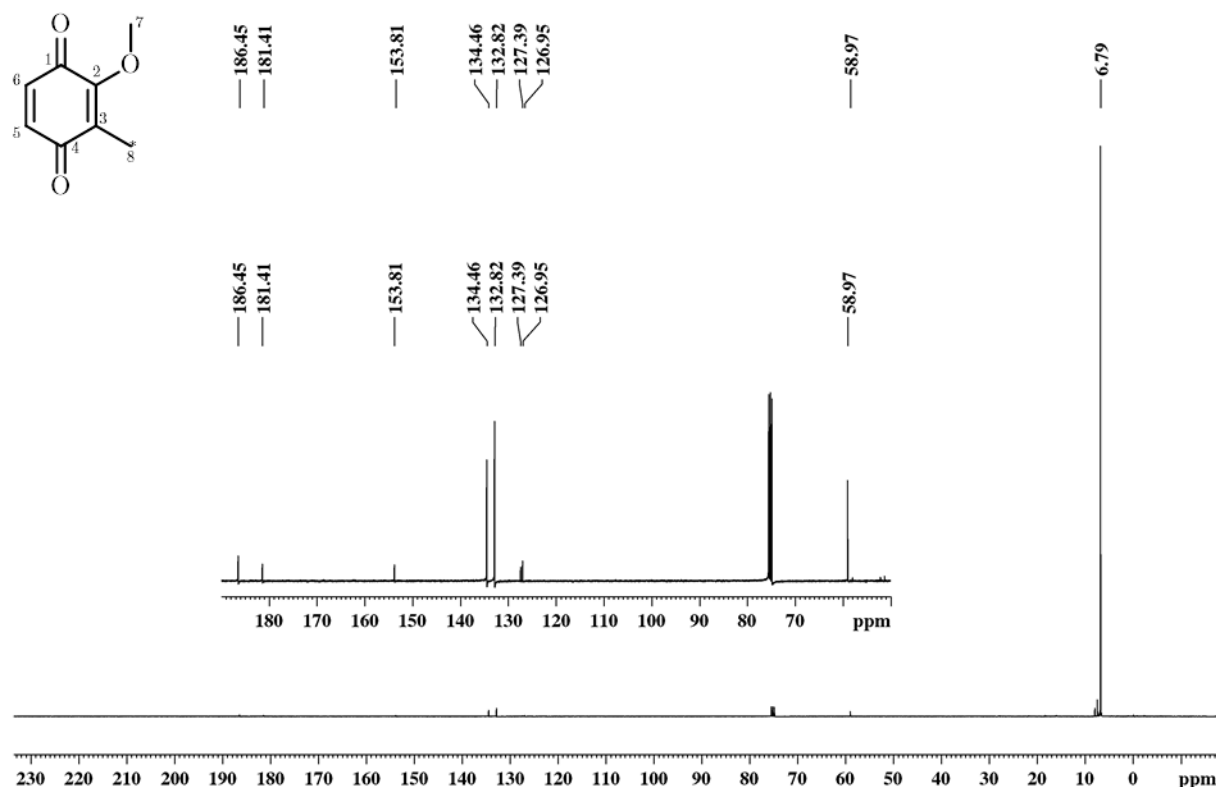


Abbildung 4.60: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon 111. Die Signale der nicht ^{13}C -markierten Kohlenstoffe ist vergrößert dargestellt.

Der erfolgreiche Einbau der ^{13}C angereicherten Methylgruppe zeigt sich auch im ^{13}C -NMR-Spektrum, zum einen durch eine hohe Signalintensität von C-8 bei 6.8 ppm, und zum anderen bewirkt der Kernspin des ^{13}C eine Aufspaltung des Signals von C-3 als Dublett mit einer 1J -Kopplung von 45 Hz bei 127.2 ppm (vgl. Abb. 4.60). Die restlichen Signale weisen keine besondere Intensitäten oder Aufspaltungen auf. Am weitesten im Tieffeld erscheinen die Carbonyl-Kohlenstoffe, bei 186.4 und 181.4 ppm. Bei 153.8 ppm erscheint das Signal des Kohlenstoffes C-2, der den Ring mit der Methoxygruppe verknüpft. Bei 134.5 beziehungsweise 132.8 ppm erscheinen die Signale der Kohlenstoffe C-5 und C-6, das Signal des Kohlenstoffes der Methoxygruppe erscheint bei 59.0 ppm.

5 Zusammenfassung

Sphingolipide nehmen eine zentrale Rolle in vielen grundlegenden Zellprozessen wie Apoptose, Wachstum, Differenzierung, Migration und Adhäsion ein. Aufgrund dieser zentralen Rolle stehen Sphingolipide auch im Fokus der aktuellen medizinischen Forschung im Bezug zu Krebs, Neurodegeneration, Diabetes, Adipositas sowie viraler und mikrobieller Pathogenese.^[10, 12, 334-336]

Daher hat die Entwicklung von Ceramid-/Sphingolipidanaloga als Wirkstoffe im letzten Jahrzehnt an Bedeutung gewonnen. Unter dem Markennamen Gilenya® ist in der Europäischen Union ein Arzneistoff zur Behandlung von Multipler Sklerose (MS) auf dem Markt gekommen, dessen Wirkstoff Fingolimod **72** (FTY-720) ein Sphingolipidanalagon ist. Die Wirkweise von Fingolimod **72** ist allerdings noch nicht vollständig verstanden.^[281] Für das ceramiditierende *N*-Oleoylserinol **71** konnte festgestellt werden, dass es Apoptose in Stammzelltumorzellen, aber nicht in differenzierten oder ruhenden Zellen auslöst.^[204, 337]

Auch in der Kontrolle von viralen oder bakteriellen Infektionen spielen Sphingolipide eine essentielle Rolle^[335-336], weshalb sich inzwischen die Forschung vermehrt an Sphingolipiden und -analoga als Wirkstoffen gegen die verschiedensten Erreger beschäftigt.^[9] Dabei finden in der Synthese und Identifikation potentieller Wirkstoffe auch clickchemiebasierte Ansätze Anwendung.^[224] Allerdings ist die Wirkweise von sphingolipidbasierten Pharmaka auch in viraler und mikrobieller Pathogenese bisher ungeklärt.

Eine wichtige Methode zur Diagnose und Untersuchung von Infektionskrankheiten stellt Fluoreszenzmikroskopie dar.^[338] Um die Wirkweise und Signalwege von Sphingolipiden genauer zu verstehen, wurden seit 1985 verschiedene fluoreszierende

Sphingolipidderivate entwickelt.^[190] Die meisten bisher entwickelten fluoreszierende Sphingolipidanaloga tragen dabei den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden in der acylierten Fettsäure; dadurch unterscheiden sich Struktur und Eigenschaften der Analoga teilweise stark von ihren natürlichen Gegenstücken.

Mit der Entdeckung der CuAAC^[112-113] sowie deren modernen Varianten und Alternativen, die gemeinsam unter dem Begriff Clickchemie zusammengefasst werden, ist es möglich, die strukturellen Änderungen von Biomolekülen klein zu halten und durch spätere Konjugation mit Farbstoffen trotzdem Fluoreszenzspektroskopie zu ermöglichen.^[339-340] Während in den letzten Jahren die Clickchemie breite Anwendung zur Modifikation von Proteinen^[130], Kohlenhydraten^[341] und DNA^[340] gefunden hat, blieben Lipide lange unbeachtet^[342], was vor allem auch für Sphingolipide gilt.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide und -analoga zu synthetisieren, um die Vielseitigkeit der Clickchemie auf das Feld der Sphingolipide zu übertragen. Die clickfähigen Lipidanaloga sollten detaillierte Einblicke in die dynamische Organisation von Sphingolipiden bei Infektionsprozessen ermöglichen und ihr Einsatz als therapeutische Wirkstoffe oder zur Generierung von antibakteriellen Oberflächenbeschichtungen sollte untersucht werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst. Die meisten der Kooperationsprojekte fanden im Rahmen der DFG-geförderten Forschergruppe 2123 statt, welche die Sphingolipiddynamiken während der Infektionsbekämpfung untersucht.

Es gelang die Herstellung von bioorthogonal funktionalisierten Ceramiden (5), Sphingoidbasen (3) und Lipidanaloga (7) die in Abbildung 5.1 bzw. Abbildung 5.2 abgebildet sind.

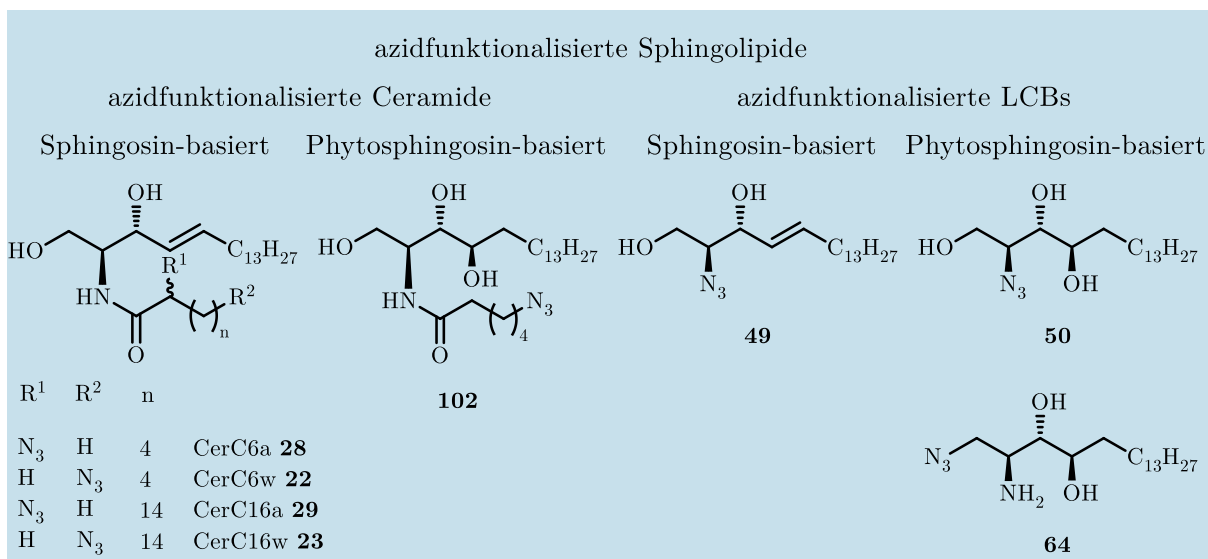


Abbildung 5.1: Übersicht der in dieser Arbeit dargestellten, azidmodifizierten Sphingolipide.

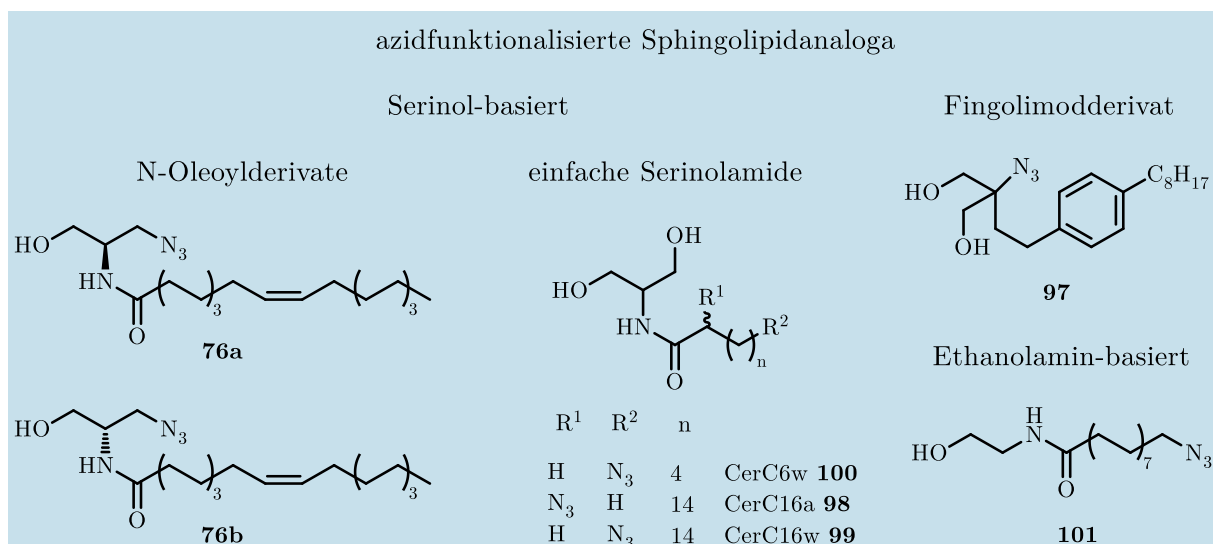


Abbildung 5.2: Übersicht der in dieser Arbeit dargestellten, azidmodifizierten Sphingolipidanaloga.

Die dargestellten azidmodifizierten Sphingolipide und -analoga konnten in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern, bezüglich ihrer Verwendung in Visualisierungsexperimenten und antibakteriellen Eigenschaften untersucht werden.

Die Ceramidderivate $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22**, $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28**, $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** und $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** konnten genutzt werden, um den Einfluss von Kettenlänge und Position des Azides der acylierten Säure auf die *in vivo*-Konjugation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DBCO-Sulfo-Cy5 in Jurkatzellen genauer zu untersuchen.^[211]

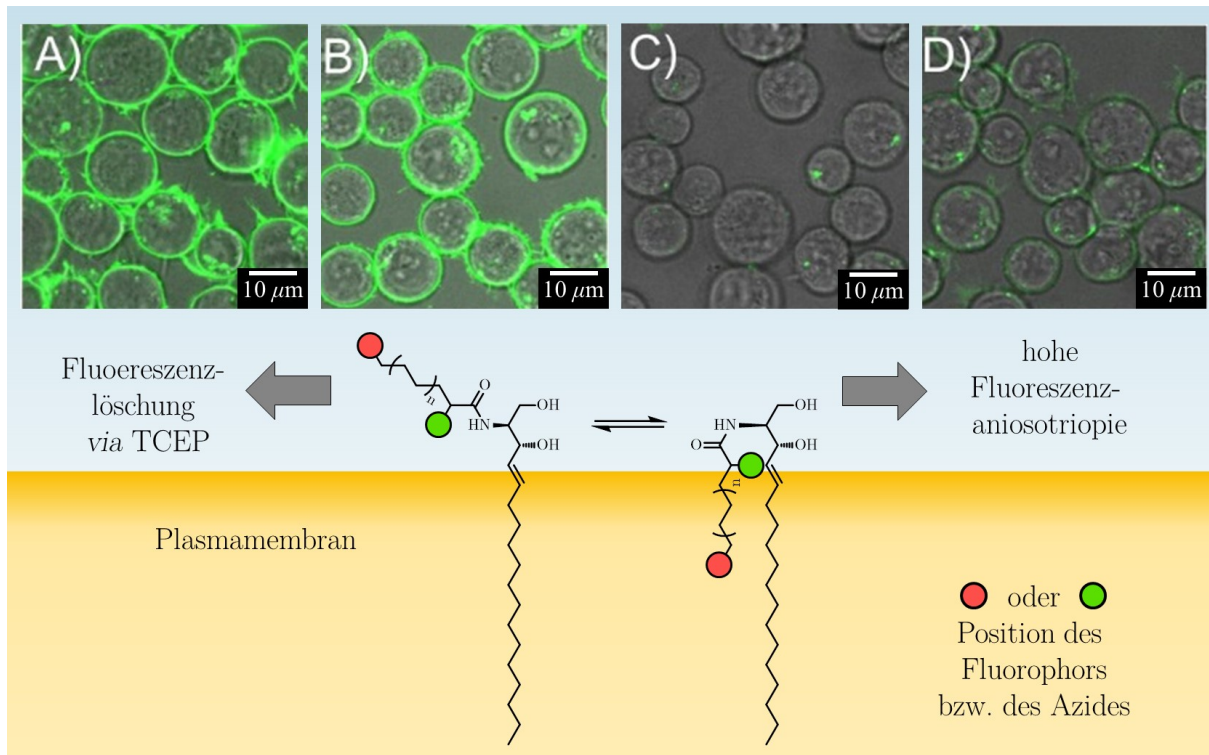


Abbildung 5.3: Oben: Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten nach *in vivo*-Konjugation der azidmodifizierten Ceramidanaloga **28** (A), **22** (B), **29** (C) und **23** (D) mit DBCO-Sulfo-Cy5. Unten: Die Ausrichtung der acylierten Fettsäure beeinflusst die Zugänglichkeit des Azides und konnte nach Konjugation mit Farbstoff mittels einer Kombination aus Fluoreszenz-anisotropie und -löschung analysiert werden.^[211]

In Kooperation mit Dr. Lena Collenburg (Arbeitskreis Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies) konnten azidfunktionalisierte Ceramide auf ihre Eignung zur Visualisierung von Ceramiddynamiken während T-Stimulation untersucht werden.^[205] In diesem

Zusammenhang sind visualisierbare Ceramide von besonderer Bedeutung, da die T-Zellstimulation die ASM-Aktivierung zur Folge hat, die wiederum Ceramide freisetzt.

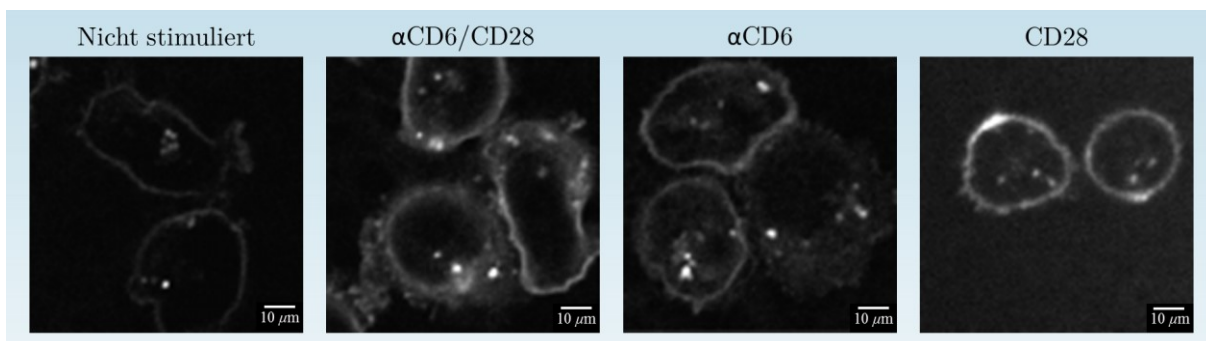


Abbildung 5.4: T-Jurkatzellen nach Inkubation mit **22** und Konjugation mit DBCO-Sulfo-Cy5. **22** kann dabei auch nach Stimulation konjugiert und zur Verfolgung der Ceramidverteilung genutzt werden.

ω N₃-C₆-Cer **22** zeigt bemerkenswerte Eigenschaften für den Einsatz in T-Zellen. Im Gegensatz zu NBD-C₆-Ceramid **82** weist **22** keine toxischen Eigenschaften auf und beeinträchtigt die Stimulation der T-Zellen durch das Antigen CD6 und das Membranprotein CD28 nicht. Sogar nach der T-Zellstimulation lässt sich **22** effizient in der Membran mit Farbstoffen konjugieren. Somit stellt **22** ein wertvolles Werkzeug dar um die subzelluläre Verteilung von Ceramiden während der T-Zell Aktivierung zu verfolgen.

In Kooperation mit Prof. Dr. Frank Waller gelang es erstmals ein azidmodifiziertes Sphingolipid nach Inkubation von *Arabidopsis thaliana* Setzlingen mittels CuAAC mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu konjugieren.^[258]

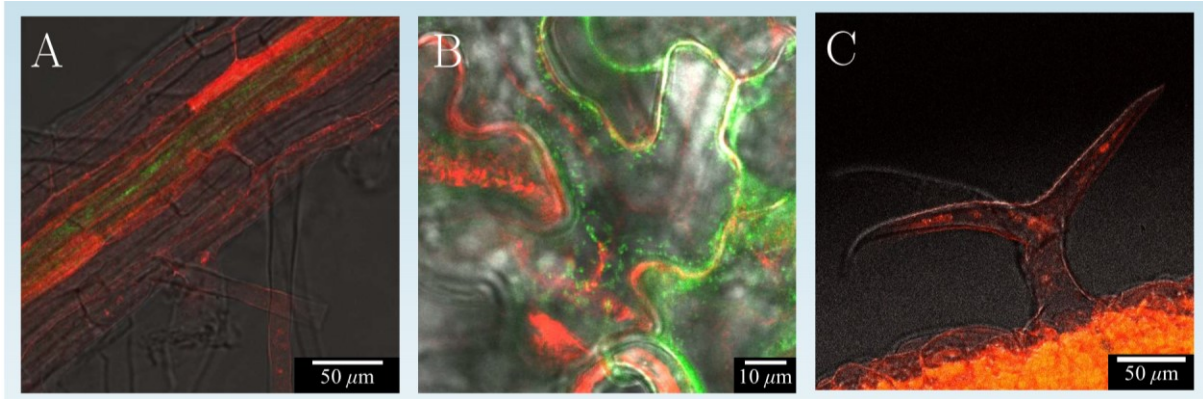


Abbildung 5.5: Fluoreszenzmarkierung von **50** in *Arabidopsis thaliana*. A) Wurzelzellen, B) Blattepithelzellen C) Trichom.

Das azidmodifizierte Phytosphingosinderivat **50** konnte dabei sowohl in Wurzel- als auch in Epithelzellen der Blätter von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden. In den Epithelzellen Zellen reichert es sich dabei in der Kutikula an.

Des Weiteren konnten die azidfunktionalisierten *N*-Oleoylserinole **76a** und **76b** in verschiedenen Zelltypen erfolgreich eingebaut und selektiv mit Fluoreszenzfarbstoff visualisiert werden. Kofärbungen mit GFP-PKC ζ und Antikörpermarkierungen von Ceramid sowie PKC ζ zeigten, dass es sich bei den Enantiomeren **76a** und **76b** um ceramiditierende Lipidanaloga handelt. Somit stellen **76a** und **76b** als Analoga von *N*-Oleoylserinol **71** vielversprechende Verbindungen dar, um die Interaktion von Ceramiden mit der Proteinkinase C ζ zu untersuchen.

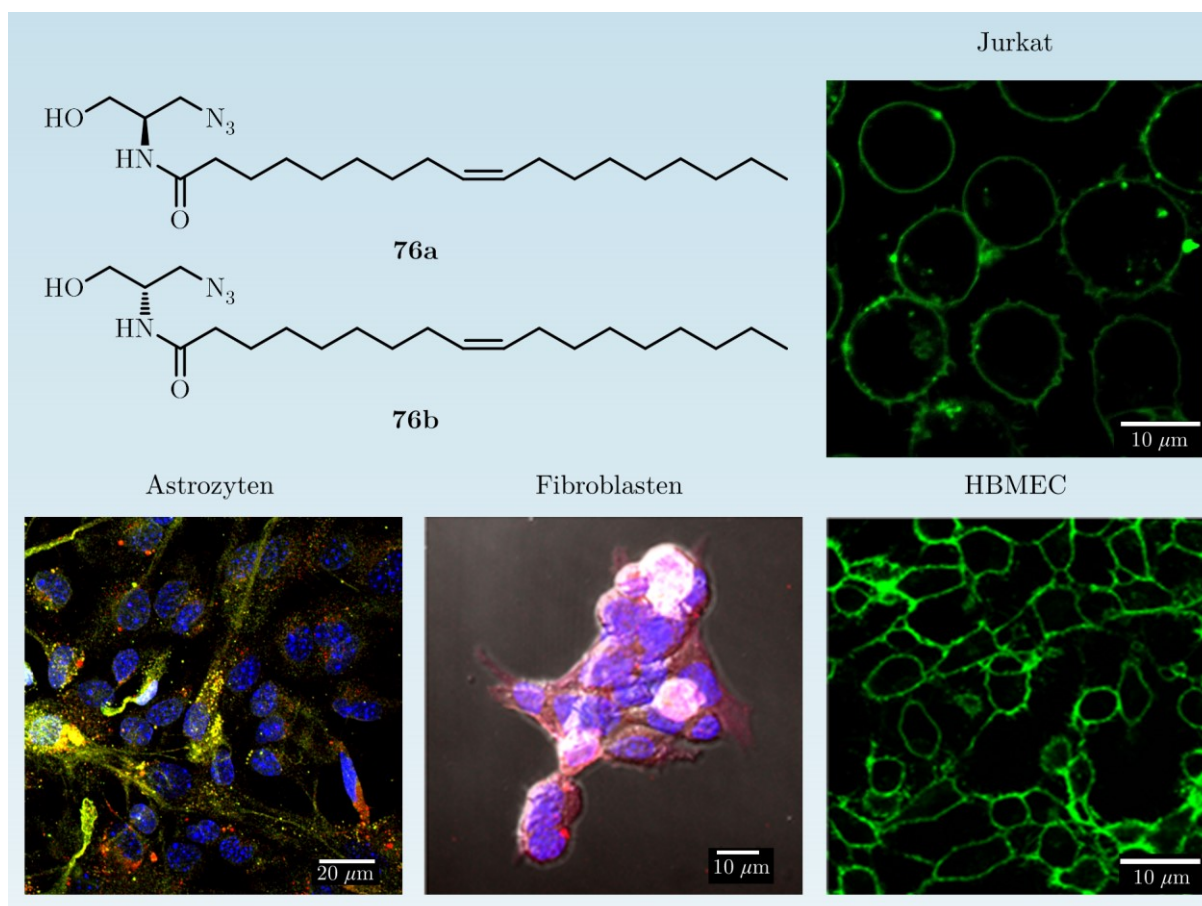


Abbildung 5.6: Die azidfunktionalisierten *N*-Oleoylserinolide **76a** und **76b** eignen sich als ceramiditierende Analoga zur bioorthogonalen Markierung in unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem auch HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*).

Da viele natürliche Sphingolipide antibakterielle Eigenschaften aufweisen, konnte in Kooperation mit Jérôme Becam (Arbeitskreis Prof. Dr. Alexandra Schubert Unkmeir) der Einsatz azidmodifizierter Ceramide als Wirkstoff gegen *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* sowie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* untersucht werden. ω N₃-C₆-Cer **22** zeigt gute bakterizide Eigenschaften gegen *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*, ohne dabei toxisch gegenüber den Wirtszellen zu sein. Die Ceramidanaloga α N₃-C₆-Cer **28**, α N₃-C₁₆-Cer **29** und ω N₃-C₁₆-Cer **23** weisen keine antibakteriellen Eigenschaften auf, aber sie wurden wie **22** effizient in die Membran der *Neisseriae* eingebaut und konnten ebenfalls erfolgreich bioorthogonal markiert werden. Des Weiteren zeigten hochauflösende dSTORM-Aufnahmen der

Bakterien, im Gegensatz zu Humanzellen, eine homologe Verteilung der konjugierten Ceramide. Da Ceramide eine wichtige Rolle in der Infektionsbekämpfung spielen, sind die in dieser Arbeit synthetisierten azidmodifizierten Ceramide wertvolle Werkzeuge, um die Interaktion von Bakterien mit Humanzellen zu untersuchen.

Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich eine innovative Methode entwickelt werden, um alkinpräsentierende Linker auf die Oberfläche von Nunc Covalink 96 Microtiterplatten kovalent zu binden und die Alkine konnten anschließend mittels CuAAC mit den in dieser Arbeit synthetisierten azidfunktionalisierten Lipiden zu konjugiert werden. Ziel der Methode war es potentielle Moleküle für bakterizide Oberflächenmodifikationen zu identifizieren. Mittels solcher Oberflächenmodifikationen soll die Biofilmbildung in Endotrachealtuben verhindert, und damit die Entstehung von beatmungsassoziierten Pneumonien unterbunden werden. Die lipidmodifizierten Microtiterplatten sollen zukünftig auch genutzt werden, um sphingolipidaffine Proteine aus Zelllysaten zu identifizieren.

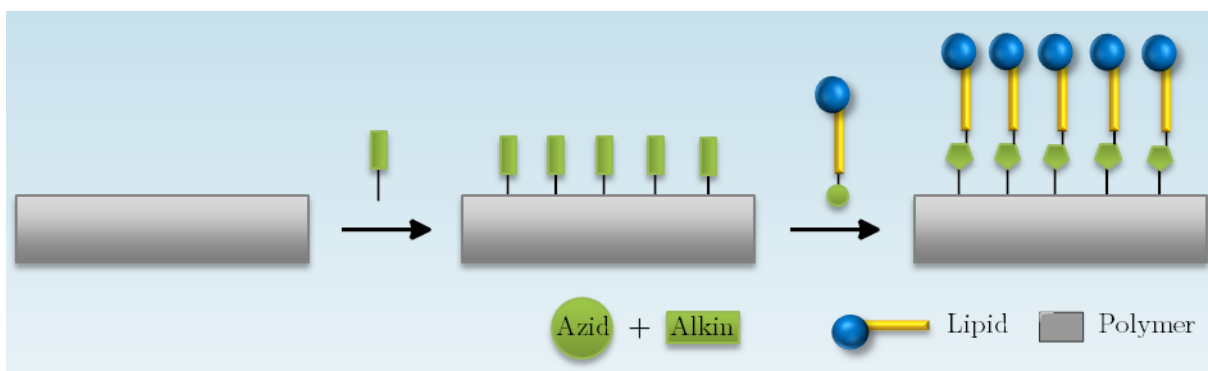


Abbildung 5.7: Konzept der Oberflächenmodifikation mit azidfunktionalisierten Lipidanaloga.

Die bakteriziden Eigenschaften eines Teils der in dieser Arbeit synthetisierten azidmodifizierten Lipide auf Oberflächen konnte in Kooperation mit Prof. Dr. Erich

Gulbins (Universität Duisburg-Essen) bereits bestätigt werden. Nach Konjugation auf die Oberflächen zeigt von den bisher getesteten Lipidanaloga zeigt ω N₃-C₆-Cer **22** die beste Wirkung sowohl gegen *P. aeruginosa* als auch gegen *N. meningitides*. Diese Erreger sind von besonderem Interesse, da sie durch Biofilmbildung in Endotrachealtuben beatmungsassoziierte Pneumonien auslösen können. Somit ist **22** ebenfalls eine vielversprechende Verbindung, um biofilmhemmende Oberflächenmodifikationen in Endotrachealtuben herzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ¹³C-markiertes 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111** erfolgreich synthetisiert und charakterisiert werden. In Kooperation mit Prof. Dr. Thomas Schmitt (Universität Würzburg) sollten die Metabolisierungsprodukte von **111** in *Ectrichodiinae* mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Da **111** ein Lockmittel für *Ectrichodiinae* ist und *ortho*-Nitrobenzaldehyd **114** innerhalb der Familie der Raubwanzen exklusiv in *Ectrichodiinae* vorkommt, liegt eine Metabolisierung von **111** zu **114** nahe (siehe Abbildung 5.8). Die Ergebnisse der Untersuchungen liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

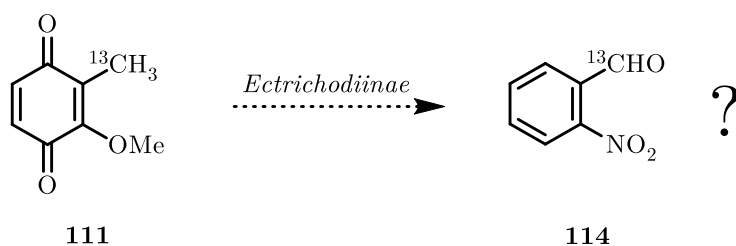


Abbildung 5.8: ¹³C markiertes 2,3-Methylmethoxy-*p*-chinon **111** zur Identifikation von Metabolisierungsprodukten in *Ectrichodiinae*.

Fazit und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit vorgestellten bioorthogonal funktionalisierten Sphingolipide und -analoga überaus wertvolle Werkzeuge mit einem breiten Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten darstellen. Durch *in vivo*-Konjugation der funktionalisierten Sphingolipide mit Fluoreszenzfarbstoffen konnten Sphingolipiddynamiken in verschiedenen Arten von sowohl menschlichen als auch von pflanzlichen sowie bakteriellen Zellen verfolgt werden. Die dadurch beobachteten Sphingolipiddynamiken erlauben somit ein verbessertes Verständnis der Abläufe von viralen und mikrobiellen Infektionen. Der modulare Ansatz der Click Chemie ermöglicht dabei die Konjugation mit verschiedenen chemischen Reportern, beispielsweise Farbstoffen mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen. Wie gezeigt werden konnte ermöglicht dies, ausgehend von derselben Verbindung, den Einsatz in hochauflösender dSTORM Spektroskopie und in Cofärbungsexperimenten mit Antikörpern oder GFP transfusionierten Proteinen.

Da alle in dieser Arbeit vorgestellten Lipidanaloga keine Toxizität gegenüber menschlichen Zellen aufweisen und teilweise gleichzeitig bakterizide Eigenschaften besitzen, sind diese Lipidanaloga auch für die Wirkstoffforschung von Interesse. Durch den modularen Ansatz der Click Chemie können so zukünftig weitere Derivate synthetisiert werden, um die bakterizide Wirkung zu optimieren und so potentielle Antibiotika zu identifizieren.

Durch Konjugation konnten die bakteriziden Eigenschaften der in dieser Arbeit synthetisierten Lipidanaloga auf Oberflächen übertragen werden. Somit kann zukünftig die Biofilmbildung auf der inneren Oberfläche von Beatmungsschläuchen verhindert werden. Ferner könnten die lipidmodifizierten Microtiterplatten zukünftig dazu dienen, sphingolipidaffine Proteine aus Zelllysaten zu identifizieren.

6 Summary

Sphingolipids play a central role in many basic cell processes like apoptosis, growth, differentiation, migration and adhesion. Due to this central role sphingolipids are in the focus of the current health research in relation to cancer, neurodegeneration, diabetes, adiposis as well as viral and microbial pathogenesis.^[10, 12, 334-336]

Thus, the development of ceramide and sphingolipid analogues as active ingredients has gained importance. Under the brand Gilenya[®], a drug is marketed within the European Union for the treatment of multiple sclerosis (MS), it's ingredient Fingolimod **72** (FTY-720) is a sphingolipid analogue. The mode of action of Fingolimod **72** is not completely understood yet.^[281] *N*-oleoyl serinol **71**, an ceramide mimicking molecule, induces apoptosis in stem cell tumor cells but not in differentiated or resting cells.^[204, 337]

In addition sphingolipids play an essential role in the control of viral and bacterial infections^[335-336], therefore sphingolipids and analogues shift into the focus of pharmaceutical research as active ingredients against various pathogens.^[9] Also click chemistry is used for synthesis and screening of potential drugs.^[224] The mode of action of sphingolipid based pharmaceuticals in viral and microbial pathogenesis is not yet fully understood.

A powerful tool for the diagnosis and examination of infections diseases is fluorescence microscopy.^[338] In order to study the mode of action and signalling pathways of sphingolipids, several fluorescent sphingolipid derivatives were developed since 1985.^[190] The majority of the sphingolipids derive their fluorescent capabilities from the acylated chain; as a result structure and properties of the analogues may be quite different to their natural counterparts.

By using CuAAC^[112-113] and their modern variants and alternatives – summarized in the term click chemistry – it is possible to minimise the structural alterations of biomolecules and still use them in fluorescence spectroscopy after labeling.^[339-340] While modification of proteins^[130], carbohydrates^[341] and DNA^[340] *via* click chemistry has been widely used in recent years, lipids have remained unaffected for a long time, especially sphingolipids.^[342]

Therefore the aim of this thesis was to synthesize biorthogonal functionalised sphingolipids and analogues in order to transfer the versatility of the click chemistry to the field of sphingolipids. Furthermore, the clickable lipid analogues should allow a detailed view into the dynamic organisation of sphingolipids in infection processes and in addition their use as therapeutic agents or for the generation of antibacterial surface coatings should be investigated.

The results of this thesis are summarised hereafter. The majority of the cooperation projects were carried out within the DFG sponsored research group 2123, which is discovering the sphingolipid dynamics during infection control.

The synthesized biorthogonal functionalised ceramides (5), sphingoid bases (3) and lipid analogues (7) are shown in figure 5.1 and figure 5.2 respectively.

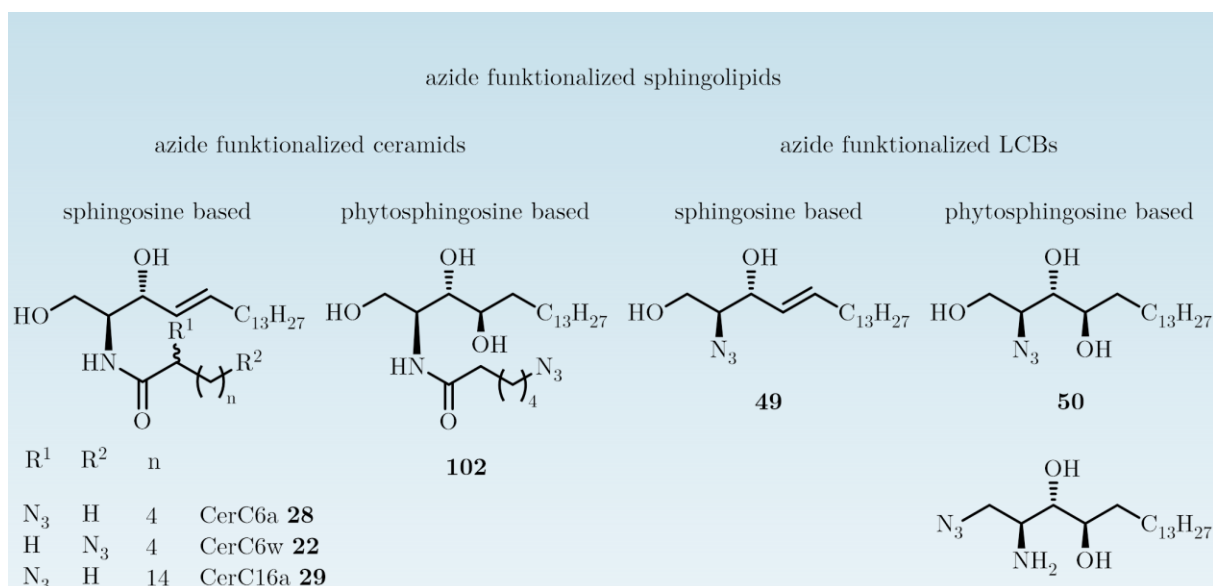


Figure 6.1: Overview of azide modified sphingolipids synthesized in this work.

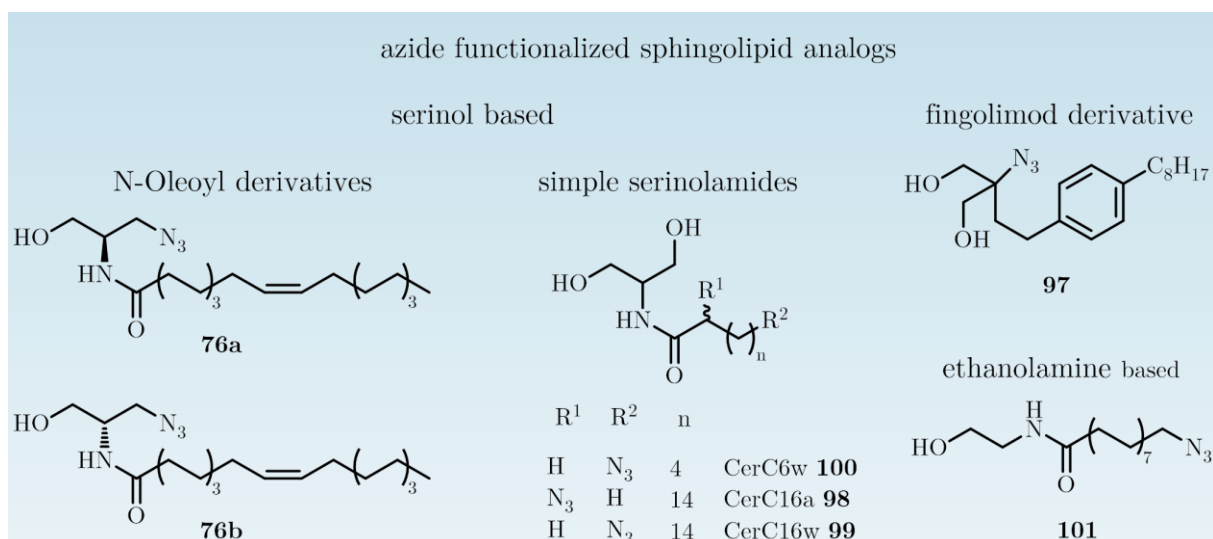


Figure 6.2: Overview of azide modified sphingolipid analogues synthesized in this work.

The synthesized azide modified sphingolipids and analogues were evaluated for the use in visualisation experiments and their antibacterial properties were evaluated within several cooperation projects.

The ceramide derivatives α N₃-C₆-Cer **28**, ω N₃-C₆-Cer **22**, α N₃-C₁₆-Cer **29** and ω N₃-C₁₆-Cer **23** were used to evaluate the influence of acylated chain length and azide

position in regard to *in vivo* labeling with the fluorescence dye DBCO-Sulfo-Cy5 in jurkat cells.^[211]

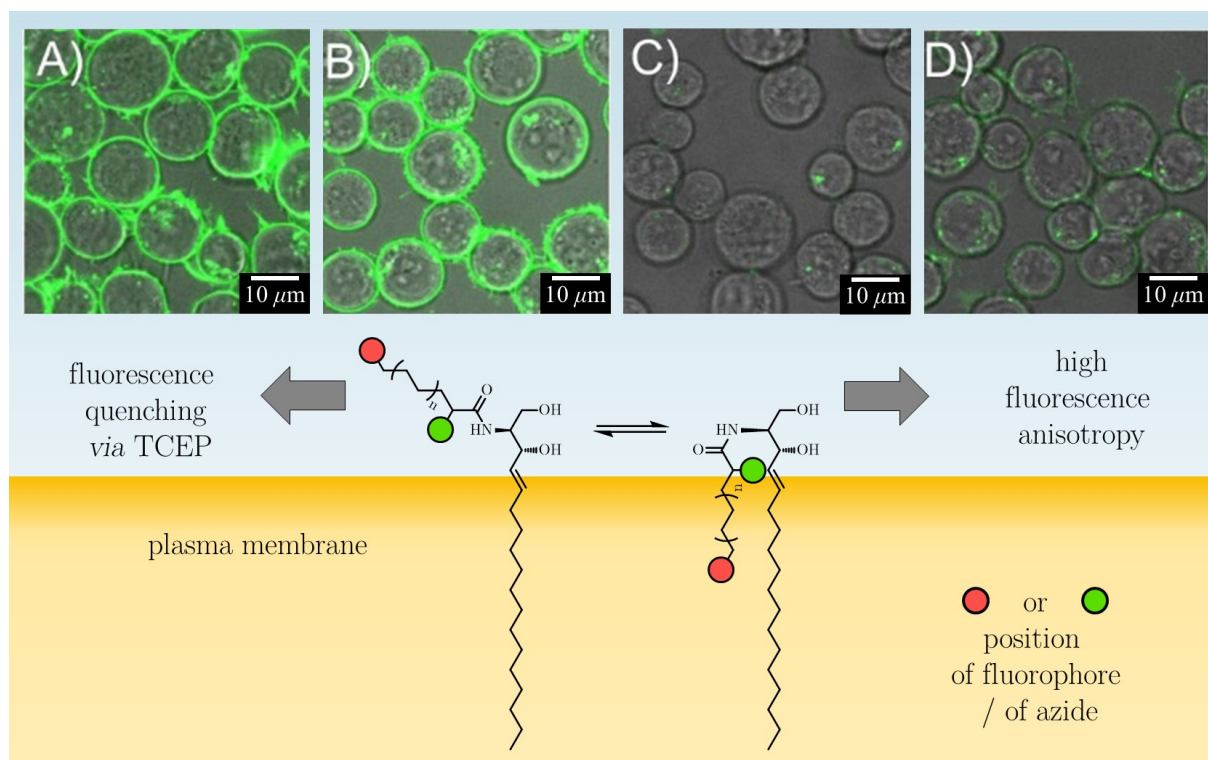


Figure 6.3: Top: Different fluorescence signal intensities after *in vivo* labeling of the azide modified ceramide analogues **28** (B), **22** (A), **29** (D) and **23** (C) with DBCO-Sulfo-Cy5. Bottom: The orientation of the acylated fatty acid influences the accessibility of the azide; the orientation of the fatty acid was evaluated after labeling by a combination of fluorescence anisotropy and quenching.^[211]

In cooperation with Dr. Lena Collenburg (Group of Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies) ceramide dynamics during T-cell stimulation were investigated by labeling azide functionalised ceramides.^[205] In this context visualisable ceramides are of particular interest due T-cell stimulation results in ASM-activation, which again releases ceramides.

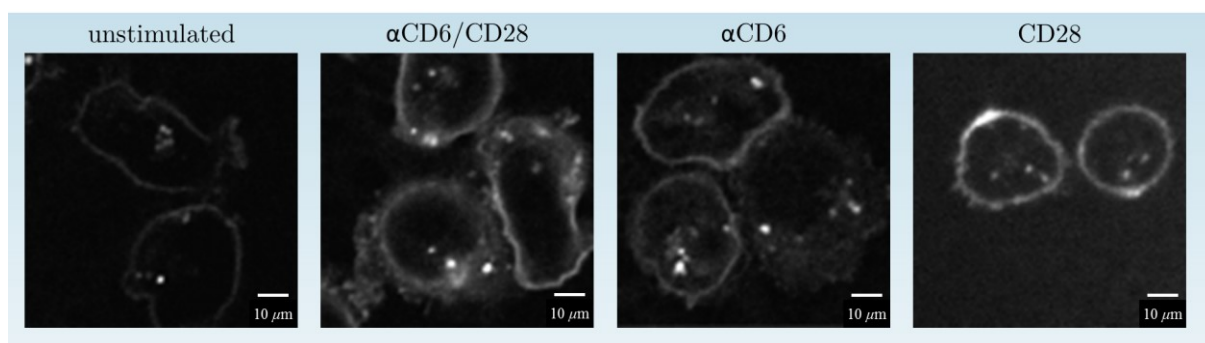


Figure 6.4: T-Jurkat T-cells after incubation with **22** and labeling with DBCO-Sulfo-Cy5. Even after stimulation **22** be labelled and used to follow of the ceramide distribution.

ω N₃-C₆-Cer **22** has remarkable properties for the usage in T-cells. **22** does not affect the stimulation of the T-cells via the antigen CD6 as well as via the membrane protein CD28 and shows no toxic properties in contrast to NBD-C₆-Ceramid **35**. Even after T-cell stimulation **22** can be labelled with dyes inside the membrane. Thus, **22** is a valuable tool to track the subcellular distribution of ceramides during T-cell activation.

In cooperation with Prof. Dr. Frank Waller for the first time an azide modified sphingolipid was labelled *via* CuAAC after incubation of *arabidopsis thailana* seedlings.^[258]

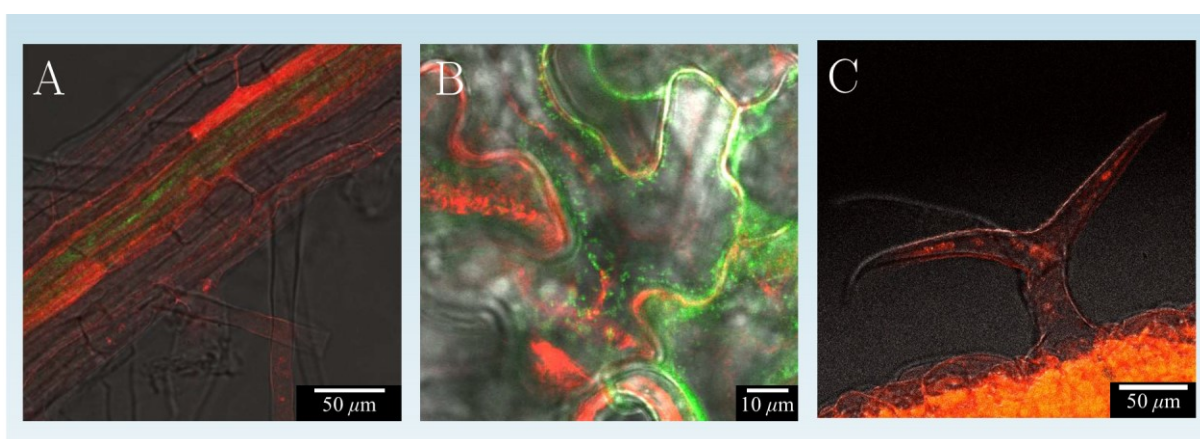


Figure 6.5: Fluorescence labelling of **50** in *arabidopsis thailana*. A) root cells, B) leaf epithial cells C) Trichom.

The azide modified phytosphingosine derivative **50** was found in root cells as well as in leaf epidermal cells of *arabidopsis thaliana*. In the epidermal cells it was enriched in the cuticula.

Furthermore, azide functionalised *N*-Oleoyl serinol **76a** and **76b** were successfully incorporated within different cell types and selectively visualised by labelling. Colocalization studies with GFP-PKC ζ and anti body markings of ceramide as well as PKC ζ showed, that the enantiomers **76a** and **76b** are ceramide imitating lipid analogues. Therefore, **76a** and **76b** as analogues of *N*-Oleoyl serinol **71** are promising compounds to investigate the interaction of ceramides with the protein kinase C ζ .

Furthermore, azide functionalised *N*-Oleoyl serinol **76a** and **76b** were successfully incorporated within different cell types and selectively visualised by labelling. Colocalization studies with GFP-PKC ζ and anti body labeling of ceramide as well as PKC ζ proved **76a** and **76b** to be ceramide mimicking lipid analogues

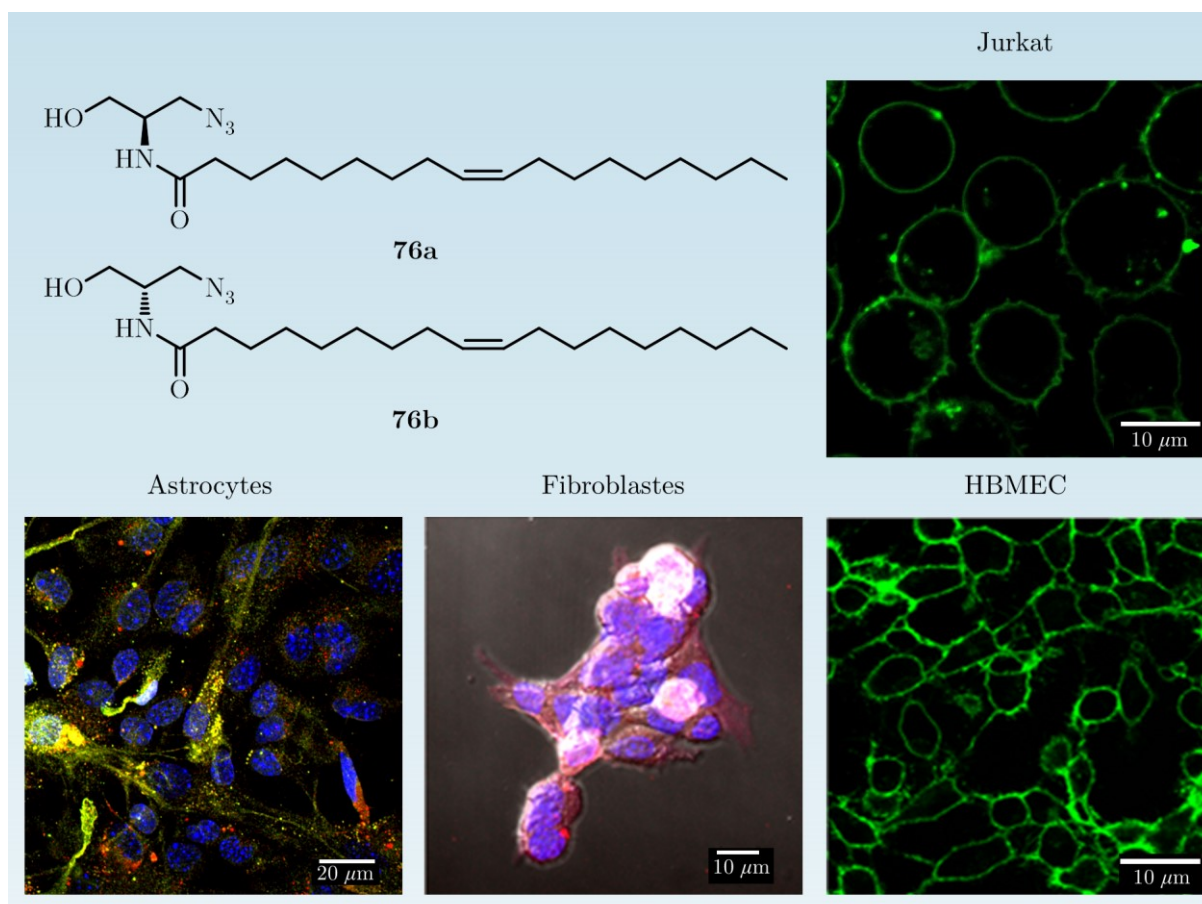


Figure 6.6: The azide functionalised *N*-Oleoyl serinol **76a** and **76b** can be used as ceramide imitating analogues for bioorthogonal labeling in different cell types, *inter alia* in HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*).

Many natural sphingolipids show antibacterial behaviour, therefore the use of azide modified ceramides as active ingredients against *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* sowie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* were investigated in cooperation with Jérôme Becam (Group of Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir). $\omega\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **22** shows good bactericidal properties against *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* without being toxic against host cells. The ceramide analogues $\alpha\text{N}_3\text{-C}_6\text{-Cer}$ **28**, $\alpha\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **29** and $\omega\text{N}_3\text{-C}_{16}\text{-Cer}$ **23** show no antibacterial properties, but like **22** they were also efficiently incorporated into the membrane of *Neisseriae* and can be used biorthogonal labelling. Furthermore, in contrast to human cells high resolution dSTORM-images show an evenly distribution of labelled ceramides in

bacteria cells. Since ceramides play an important role in the fight against infections the ceramides synthesised in this work are valuable tools to investigate the interaction of bacteria with human cells.

Also an innovative method was established within this thesis to modify the surface of Nunc Covalink 96 Wellplates with alkyne presenting linkers followed by the conjugation of the azide modified lipids presented in this work *via* CuAAC. This method is intended to be used for screening of potential molecules for antibacterial surface modifications. In the future this kind of surface modifications are expected to prevent the biofilm formation in endotracheal tubes and prohibit the formation of ventilator-associated pneumonia. In Addition the lipid modified microtiter plates are also intended to be used to identify sphingolipid affine proteins from cell lysate.

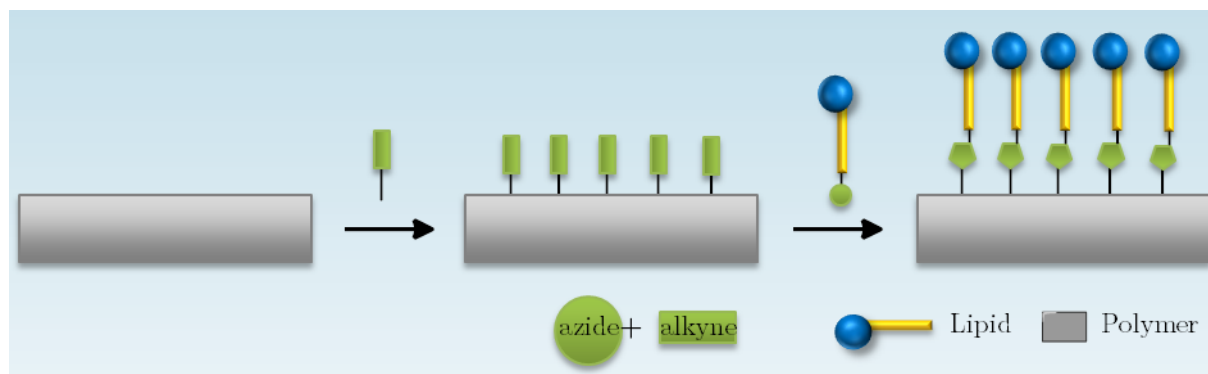


Figure 6.7: Surface modification Concept the with azide functionalised lipid analogs.

The bacterial properties of some of the azide modified lipids on surfaces have been investigated and confirmed in cooperation with Prof. Dr. Erich Gulbins (University Duisburg-Essen). From the already tested lipid analogues **22** exhibit the best effect after conjugation against *P. aeruginosa* and *N. meningitides*. These pathogens are of particular interest as they can induce ventilator-associated pneumonia by biofilm

formation in endotracheal tubes. Thus, **22** is also a promising compound to produce biofilm inhibiting surfaces.

^{13}C -marked 2,3-Methylmethoxy-*p*-quinone **111** was successfully synthesised and characterised within this work. In cooperation with Prof. Dr. Thomas Schmitt (Universität Würzburg) the metabolism products of **111** in *Ectrichodiinae* can be investigated *via* mass spectroscopy. With **111** being an attractant for *Ectrichodiinae* and *ortho*-nitrobenzaldehyde **114** found in *Ectrichodiinae* but not the rest of the family of assassin bugs, a metabolism of **111** to **114** can be reasonably assumed (see figure 5.8). The results of the investigations are still pending.

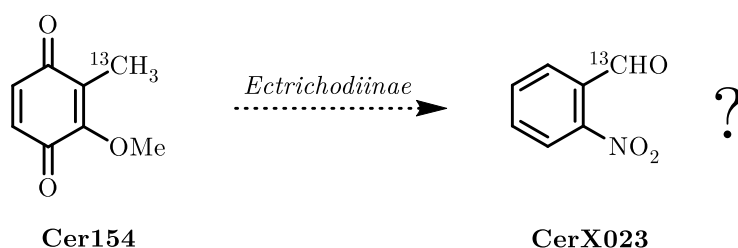


Figure 5.8: ^{13}C -marked 2,3-methylmethoxy-*p*-quinone **111** to identify metabolism products in *Ectrichodiinae*; a metabolism of **111** to **114** is obvious.

Conclusion and Outlook

In summary it has been shown that the bioorthogonal functionalised sphingolipids and analogues synthesised within this thesis are highly valuable tools with a wide spectrum of application possibilities. With the *in vivo* conjugation of bioorthogonal functionalised sphingolipids and analogues to fluorescence dyes sphingolipid dynamics were tracked in

various kinds of human, plant and bacterial cells. Thus, the observed sphingolipid dynamics allow a better understanding of the process of viral and microbial infections. Therefore the modular approach of the click chemistry allows the conjugation with various chemical reporters, like dyes with different emission wave lengths. Originating from the same compound the usage in high resolution dSTORM spectroscopy as well as colocalization experiments with antibodies or GFP transfused proteins are possible.

Since all lipid analogues presented in this thesis exhibit no toxicity against human cells and at the same time partially exhibit bacterial properties, the lipid analogues are also of interest for drug design. *Via* the modular approach of the click chemistry further derivatives can be synthesised to optimize the bactericidal effect in future and to identify potential antibiotics.

By covalently link the modified lipids to surfaces, the bactericidal properties can be transferred to the surfaces. Thus, biofilm formation can be prohibited on the inner surface of endotracheal tubes in the future. Moreover the lipid modified microtiter plates can also be used to identify sphingolipid affine proteins from cell lysate.

7 Experimentalteil

7.1 Allgemeine Arbeits- und Messtechniken

7.1.1 Geräte und Materialien

Kernresonanzspektroskopie

- Bruker Avance III HD 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)
- Bruker Avance III HD 600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

Die NMR-Spektren wurden bei RT gemessen und mit der Software Topspin der Fa. Bruker ausgewertet. Die Verschiebungen der Signale sind ppm angegeben und beziehen sich auf $\delta(\text{TMS}) = 0$ als Standard. Für die ^1H -Spektren wurden die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel zur Kalibrierung verwendet. Für die ^{13}C -Spektren wurden die ^{13}C -Resonanzsignale der Lösungsmittel als interner Standard verwendet: $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26 / 77.16$, $\delta(\text{MeOD-}d_4) = 3.31 / 49.00$ ^{19}F -Spektren zur Reinheitsbestimmung über Mosherester wurden unkorrigiert verwendet. Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben, wenn nicht Anders angegeben handelt es sich um Proton-Proton Kupplungen. Bei den Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Zur genauen Zuordnung der Signale wurden DEPT-135, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren zur Hilfe genommen.

7 Experimenterteil

Massenspektrometrie

Elektronenspray-Ionisation (ESI)

- Bruker Daltonics micOTOF focus

Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

- Bruker Daltonics autoflex II LRF

UV-Reaktor

- Southern New England Ultraviolet Company Rayonet RPR-100 UV Reaktor, bestückt mit UV-Lampen des Typs RPR-2537Å

Der Reaktor war dankenswerter Weise eine Leihgabe des Arbeitskreises Prof. Dr. Würthner, Würzburg

Lösungsmittelpumpe zum Anreichern von *trans* Cyclooctenol

- BESTA HD 2-400

Säule zum Anreichern von *trans* Cyclooctenol

- YMC EUROPE GMBH ECO15/450M0K (15 x 450 mm)

Polarimeter

- Jasco P1020

Vakuumpumpen

- vacuubrand verschiedene Typen von Membran- und Ölpumpen

Vakuumpkonzentrator

- Thermo Savant DNA120 SpeedVac Concentrator

7.1.2 Chemikalien

Vorbehandlung von Chemikalien und Lösungsmitteln

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien wie vom Hersteller erhalten und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch bei reduziertem Druck bei 40 °C destilliert und, wo angegeben, nach Standardmethoden unter Schutzgasatmosphäre getrocknet.

Angaben

Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Lösungen sind, soweit nicht anders angegeben, in wässriger Lösung.

Dünnschichtchromatographie (DC)

- Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄
- Merck TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S

Färbereagenzien für DC

Zur Detektion wurde entweder Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder eine der folgenden Färbereagenzien genutzt.

Unspezifische Färbemethoden:

- Allgemeines Färbereagenz: 15 g Vanillin, 250 ml EtOH, 2,5 ml konzentrierte H₂SO₄
- Allgemeine Färbemethode: wenige Iod Körner in Seesand

7 Experimentalteil

c) allgemeines Färbereagenz: 2.5 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat, 1 g Cerammoniumsulfat-Dehydrat, 10 ml konzentrierte Schwefelsäure, 90 ml Wasser

Nachweis von Nucleophilen:

3.7 ml *para*-Anisaldehyd, 135 ml EtOH, 5 ml konzentrierte H₂SO₄, 1.5 ml Eisessig

Nachweis von Zuckern:

60 mg N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin, 10 ml H₂SO₄ konz., 200 ml MeOH

Nachweis von oxidierbaren Verbindungen:

1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 ml 10%ige NaOH in 200 mL H₂O

Nachweis von sauren Gruppen:

Bromocresol Grün 0.08 g, 200 ml EtOH und Zugabe von 0.1 M NaOH-Lösung bis die Lösung die blaue Farbe beibehält

Nachweis von Aminen und Amiden:

0.60 g Ninhydrin, 200 ml n-Butanol, 6.00 ml Eisessig. Azide konnten mit der gleichen Methode nachgewiesen werden wenn die DC-Probe zuvor mit einer 0.05 M Lösung von PPh₃ in DCM (oder Toluol) behandelt wurde.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) der Fa. Macherey-Nagel, auf Säulen verschiedener Durchmesser und Länge durchgeführt.

7.2 Allgemeine Synthesevorschriften

Allgemeine Synthesevorschrift A (Transformation von Aminen zu Aziden *via* TfN₃)

Tf₂O (1.00 Äq.) in DCM (1.00 ml pro mmol Tf₂O) wurde bei 0 °C zu einer Lösung von NaN₃ (5.00 Äq.) in H₂O (0.30 ml pro mmol NaN₃) getropft und das Gemisch für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase zwei Mal mit DCM extrahiert (jeweils mit 1.00 ml pro mmol Tf₂O). Die organischen Phasen wurden vereint und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen (1.00 ml pro mmol Tf₂O). anschließend wurde die organische Phase abgetrennt und direkt weiter verwendet. **Bitte stets beachten: Die erhaltene Lösung nie zur Trockne destillieren!**

Zu einer Lösung von Kupfersulfatpentahydrat (0.10 Äq. wurden in H₂O (10 ml pro mmol CuSO₄) wurden nacheinander Amin (1.00 Äq.), K₂CO₃ (1.50 Äq.) und Methanol (7.00 ml pro mmol Amin) zugegeben. Anschließend wurde bei 0 °C die nach obiger Anweisung, frisch hergestellte TfN₃ Lösung über 10 min. zugetropft (10.0 Äq.) und das Gemisch für 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch destillativ bei vermindertem Druck destillativ entfernt.

Allgemeine Synthesevorschrift B (Amidkupplung zu Ceramidanaloga)

Sphingoidbase (1.00 Äq.) wurde mit HOBt (1.20 Äq.), EDC (1.20 Äq.) und DIPEA (1.80 Äq.) in trockenem DCM (60 ml pro mmol Sphingoidbase) vorgelegt. Eine Lösung von Carbonsäure (1.00 Äq.) in DCM (60 ml pro mmol Sphingoidbase) wurde über 2 h bei 0 °C zugetropft und anschließend die Lösung unter Stickstoffatmosphäre 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

Allgemeine Synthesevorschrift C (Azidierung von bromierten Carbonsäuren)

Bromierte Carbonsäuren (1.00 Äq.) und NaN_3 (2.00 Äq.) wurden über Nacht zusammen bei 80 °C in DMF gerührt (10 ml pro mmol Säure). Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt, der Rückstand in 0.5 M HCl-Lösung aufgenommen (5 ml pro mmol Säure) und mit EA extrahiert (drei mal mit je 10 ml pro mmol Säure). Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt oder aus Cyclohexan umkristallisiert.

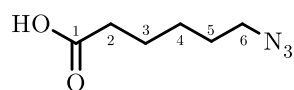
Allgemeine Synthesevorschrift D (Amidkupplung zur Synthese von Serinolamiden)

Hydroxy Amin (1.00 Äq.) und DIPEA (1.00 Äq.) wurden in DMF gelöst (5.00 ml pro mmol Amin) und die Mischung bei RT für 15 min gerührt. Anschließend wurden (1.10 Äq.) Carbonsäure, DCC (1.10 Äq.) sowie NHS (1.10 Äq.) zugegeben und das Gemisch für weitere 14 h gerührt. Nach Filtern und Waschen mit EA (3.5 ml pro mmol Amin) über Kieselgel wurde das Filtrat mit Wasser gewaschen (3.00 ml pro mmol Amin). Die Phasen wurden getrennt, die wässrige mit EA extrahiert (drei mal mit je 1.50 ml pro mmol Amin). Die organischen Phasen wurden vereint und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch destillativ bei vermindertem Druck eingedunstet, der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

7.3 Spezifische Synthesevorschriften

7.3.1 Synthese von Carbonsäurederivaten

6-Azidohexansäure **16**



16

Nach Umsetzung von 6-Bromhexansäure **18** nach der allgemeinen Synthesevorschrift C wurde H₂O zugegeben (2.50 mL pro mmol ω -Aminohexansäure) und das Gemisch mit DCM gewaschen (fünfmal mit je 5.00 mL pro mmol ω -Aminohexansäure). Die wässrige Phase wurde mit 1 m HCl-Lösung auf pH = 2 eingestellt und mit DCM extrahiert (fünfmal mit je 5.00 ml pro mmol ω -Aminohexansäure). Die organischen Phasen der Extraktion wurden vereint und die Lösungsmittel destillativ bei reduziertem Druck entfernt um 16-Azidohexadecansäure **16** zu erhalten.

Ausbeute: 99 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Alternativ

Nach Umsetzung von 6-Aminohexansäure **20** nach der allgemeinen Synthesevorschrift A wurde das Rohprodukt mit Cy/EA (4:1) säulenchromatographisch gereinigt um 16-Azidohexadecansäure **16** zu erhalten.

Ausbeute: 87 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₆H₁₁N₃O₂ (157.17g/mol)

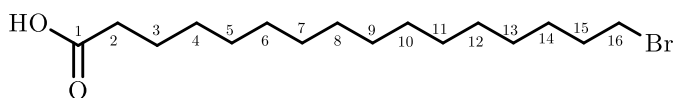
R_f-Wert: 0.45 (EA)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.28$ (t, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, *H*-6), 2.25 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, *H*-2), 1.68 (ddd, $^3J = 15.4, 7.7, 7.7$ Hz, 2H, *H*-3), 1.62 (ddd, $^3J = 15.0, 7.1, 7.1$ Hz, 2H, *H*-5), 1.15-1.25 (m, 2H, *H*-4) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 179.9$ (*C*-1), 51.3 (*C*-6), 33.9 (*C*-2), 28.7 (*C*-5), 26.3 (*C*-4), 24.3 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 180.07544; gefunden: 180.07537.

16-Bromhexadecansäure **19**



ω -Hydroxyoctadecansäure **21** (1.00 Äq.) in einer Mischung aus 48%iger HBr-Lösung (5.00 ml pro mmol ω -Hydroxyoctadecansäure) und Essigsäure (5.00 mL pro mmol ω -Hydroxyoctadecansäure) für 24 h refluxiert. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert und anschließend zwei mal in Cy umkristallisiert um 16-Bromhexadecansäure **19** zu erhalten.

Ausbeute: 94 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

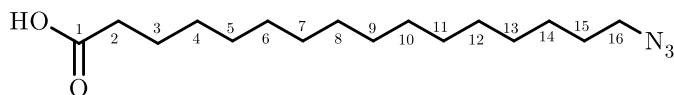
Summenformel: C₁₆H₃₁BrO₂ (335.33 g/mol)

R_f-Wert: 0.53 (Cy/EA, 1:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.41 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, H-16), 2.35 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-2), 1.84 (tt, ³J = 10.8, 7.2 Hz, 2H, H-15), 1.62 (tt, ³J = 11.2, 7.4 Hz, 2H, H-3), 1.46-1.38 (m, 2H, H-4), 1.38-1.20 (m, 20H, H-5 bis H-14) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 179.6 (C-1), 34.3 (C-16), 34.1 (C-2), 33.0 (C-15), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.6 (C-alkyl), 29.6 (C-alkyl), 29.4 (C-alkyl), 28.9 (C-alkyl), 28.6 (C-4), 24.8 (C-3) ppm.

16-Azidohexadecansäure **17**



17

Nach Umsetzung von 16-Bromhexadecansäure **19** nach der allgemeinen Synthesevorschrift C wurde das Rohprodukt mit Cy/EA (4:1) säulenchromatographisch gereinigt um 16-Azidohexadecansäure **17** zu erhalten.

Ausbeute: 99 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₁₆H₃₁N₃O₂ (297.44 g/mol)

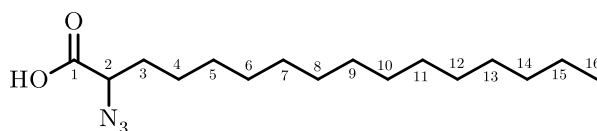
R_f-Wert: 0.27 (Cy/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.25$ (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, *H*-16), 2.35 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, *H*-2), 1.62 (tt, $^3J = 10.6, 7.0$ Hz, 2H, *H*-15), 1.58 (tt, $^3J = 11.1, 6.9$ Hz, 2H, *H*-3), 1.41-1.20 (m, 22H, *H*-4 bis *H*-14) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 179.9$ (*C*-1), 51.6 (*C*-16), 34.1 (*C*-2), 29.8 (*C*-alkyl), 29.7 (*C*-alkyl), 29.7 (*C*-alkyl), 29.6 (*C*-alkyl), 29.6 (*C*-alkyl), 29.4 (*C*-alkyl), 29.3 (*C*-alkyl), 29.2 (*C*-alkyl), 29.0 (*C*-alkyl), 26.9 (*C*-4), 24.8 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + H]⁺: 298.24890; gefunden: 298.24985.

rac 2-Azidohexadecansäure **27**



27

Nach Umsetzung von 2-Bromhexadecansäure nach der allgemeinen Synthesevorschrift C wurde das Rohprodukt mit Cy/EA (4:1) säulenchromatographisch gereinigt um 2-Azidohexadecansäure **27** zu erhalten.

Ausbeute: 95 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₁₆H₃₁N₃O₂ (297.44 g/mol)

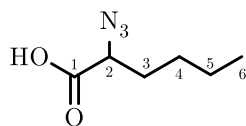
R_f-Wert: 0.32 (Cy/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃/MeOD 4:1): $\delta = 3.89$ (dd, $^3J = 5.2, 8.4$, 1H, *H*-2), 1.94-1.76 (m, 2H, *H*-3), 1.54 – 1.19 (m, 24H), 0.88 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, *H*-16) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, MeOD): $\delta = 176.3$ (C-1), 61.8 (C-2), 32.1 (C-alkyl), 31.4 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.6 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.1 (C-alkyl), 25.8 (C-alkyl), 22.8 (C-alkyl), 14.3 (C-18) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 320.23085; gefunden: 320.23115.

rac 2-Azidohexansäure **26**



26

Nach Umsetzung von 2-Bromhexansäure nach der allgemeinen Synthesevorschrift C wurde das Rohprodukt mit Cy/EA (4:1) säulenchromatographisch gereinigt um 2-Azidohexansäure **26** zu erhalten.

Ausbeute: 85 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

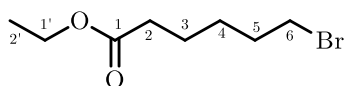
Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ (157.17 g/mol)

R_f-Wert: 0.66 (EA/iPrOH/H₂O 6:3:1/v)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.96$ (s, 1H, COOH), 4.23 (t, $^3J = 7.8, 7.0$ Hz, 1H, H-2), 2.13-1.94 (m, 2H, H-3), 1.53-1.28 (m, 4H, H-4/5), 0.92 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 176.6$ (C-1), 45.5 (C-2), 34.4 (C-3), 29.4 (C-4), 22.1 (C-5), 13.9 (C-6) ppm.

6-Bromhexansäureethylester **41**



41

6-Bromhexansäure **18** (1.00 Äq.) wurde in Ethanol (1 ml pro mmol **18**) gelöst, konzentrierte Schwefelsäure dazugegeben (0.1 ml pro mmol **18**) und das Gemisch für 14 h bei 70 °C gerührt. Das Gemisch wurde mit 1 N NaOH-Lösung neutralisiert und das restliche Ethanol bei vermindertem Druck destillativ entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM (jeweils 5 ml pro mmol **18**) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, anschließend über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt.

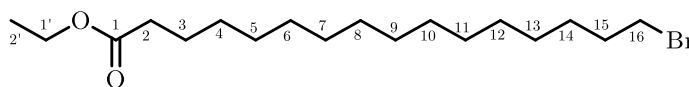
Ausbeute: 91 %. einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{BrO}_2$ (223.11 g/mol)

R_f -Wert: 0.52 (Cy/EA 5:1)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.06$ (q, $^3J = 7.1$ Hz, H-1') 3.34 (t, $^3J = 6.78$ Hz, 2H, H-6), 2.25 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, H-2), 1.85-1.78 (m, 2H, H-5), 1.63-1.55 (m, 2H, H-3), 1.45-1.37 (m, 2H, H-4), 1.19 (t, $^3J = 7.1$ Hz, H-2') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 245.01476; gefunden: 245.01526.

16-Bromhexadecansäureethylester **42****42**

16-Bromhexadecansäure **19** (1.00 Äq.) wurde in Ethanol (1 ml pro mmol **18**) gelöst, konzentrierte Schwefelsäure dazugegeben (0.1 ml pro mmol **18**) und das Gemisch für 14 h bei 70 °C gerührt. Das Gemisch wurde mit 1 N NaOH-Lösung neutralisiert und das restliche Ethanol bei vermindertem Druck destillativ entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM (jeweils 5 ml pro mmol **18**) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: quantitativ einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

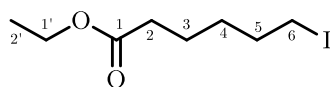
Summenformel: C₁₈H₃₅BrO₂ (363.37 g/mol)

R_f-Wert: 0.64 (Cy/EA 5:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-1') 3.41 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H, H-16), 2.28 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 1.89-1.81 (m, 2H, H-15), 1.65-1.50 (m, 2H, H-3), 1.46-1.38 (m, 2H, H-4); 1.34-1.22 (m, 20H, H-4 bis H-14), 1.28 (t, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 3H, H-2') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.2 (C-1), 60.4 (C-2'), 34.7 (C-2), 34.4 (C-16), 33.1 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.9-28.4 (C-alkyl), 25.2 (C-4), 14.5 (C-3) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 385.17126; gefunden: 385.17067.

6-Jodhexansäureethylester **41****43**

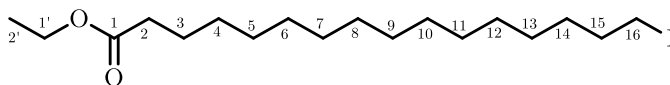
Der Ethylester **41** (1.00 Äq.) wurde in Aceton (3 ml pro mmol **41**) gelöst, Natriumiodid (3.00 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 20 h refluxiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und vom Filtrat das Lösungsmittel destillativ bei reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EA (5 ml pro mmol **41**) aufgenommen, mit H₂O (5 ml pro mmol **41**) gewaschen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit EA (jeweils 3 ml pro mmol **41**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenfiltration über Kieselgel Cy/EA 1:1 gereinigt.

Ausbeute: 77 % einer leicht rötlichen Flüssigkeit.

R_f-Wert: 0.56 (Cy/EA 5:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.11 (q, ³J = 7.1 Hz, H-1') 3.17 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-6), 2.30 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-2), 1.86-1.79 (m, 2H, H-5), 1.67-1.60 (m, 2H, H-3), 1.46-1.38 (m, 2H, H-4), 1.24 (t, ³J = 7.1 Hz, H-2') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.6 (C-1), 60.4 (C-1'), 34.2 (C-2), 33.2 (C-5), 30.1 (C-4), 24.0 (C-3), 14.4 (C-2'), 6.73 (C-6) ppm.

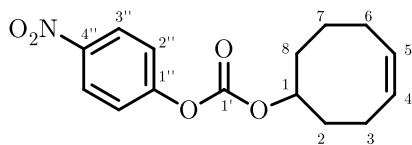
16-Jodhexadecansäureethylester **44****44**

Der Ethylester **42** (1.00 Äq.) wurde in Aceton (3 ml pro mmol **42**) gelöst, Natriumiodid (3.00 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 20 h refluxiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und vom Filtrat das Lösungsmittel destillativ bei reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EA (5 ml pro mmol **42**) aufgenommen, mit H₂O (5 ml pro mmol **42**) gewaschen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit EA (jeweils 3 ml pro mmol **42**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenfiltration über Kieselgel Cy/EA 1:1 gereinigt.

Ausbeute: 87 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

R_f-Wert: 0.63 (Cy/EA 5:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.12 (q, ³J = 7.1 Hz, H-1') 3.19 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-16), 2.28 (t, ³J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 1.82 (quint, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-15), 1.62 (quint, ³J = 7.4 Hz, 2H, H-3), 1.43-1.22 (m, 22H, H-4 bis H-14), 1.25 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-2') ppm.

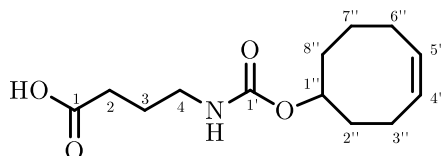
(Z)-Cyclooct-4-en-1-yl (4-nitrophenyl) carbonat 45**45**

Cis-Cyclooct-4-enol **37** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Molsieb (4 Å) in trockenem DCM (15 mL pro mmol **37**) für 20 min gerührt, Pyridin zugegeben (0.1 mL pro mmol **37**) und die Mischung bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung von 4-Nitrophenylchloroformat (1.50 Äq) in trockenem DCM (3 ml pro mmol **37**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 5 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (5 ml pro mmol **37**) wurden die Phase getrennt und die wässrige mit Et₂O extrahiert (dreimal mit je 5 ml pro mmol **37**). Die organischen Phasen wurden vereint und nacheinander mit jeweils gesättigter NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, die Phasen getrennt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt

Ausbeute: quantitativ eines leicht gelben Feststoffes.

Summenformel: C₁₅H₁₇NO₅ (291.30 g/mol)

R_f-Wert: 0.38 (Cy/EA, 5:1)

(Z)-4-(((Cyclooct-4-en-1-yloxy)carbonyl)amino)butansäure 47**47**

4-Aminobutansäure **46** (1.00 Äq) wurde mit DIPEA (0.35 ml pro mmol **46**) in trockenem DMF gelöst und bei 0 °C frisch hergestelltes **45** (1.00 Äq) zugegeben. Die Lösung wurde für 3 d bei RT unter Lichtausschluss gerührt, das Lösungsmittel destillativ bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH, 20:1,).

Ausbeute: 34 % eines leicht gelben Feststoffes

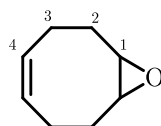
Summenformel: C₁₃H₂₁NO₄ (255.31 g/mol)

R_F-Wert: 0.38 (Cy/EA, 5:1)

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+Na]⁺: 278.1363; gefunden: 278.1361.

7.3.2 Synthese von Cyclooctenolen

(*Z*)-9-Oxabicyclo[6.1.0]non-4-en **38**

**38**

Cycloocta-1,5-dien **36** (1.00 Äq.) wurde vorgelegt, bei 0 °C eine 0.625 M-Lösung von *m*CPBA in DCM (1.50 Äq.) über 2 h zugetropft und anschließend für 4 d bei RT gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und der Rückstand einmal mit DCM extrahiert (1 ml pro mmol **36**). Das Filtrat wurde nacheinander mit 0.1 M HCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (je 1.25 ml pro mmol **36**). Die organische Phase wurde separiert, über Na₂SO₄ getrocknet das Lösungsmittel bei vermindertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cy/EA 10:1).

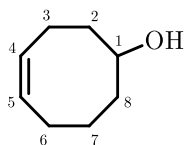
Ausbeute: 76 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₈H₁₂O (124.18 g/mol)

R_f-Wert: 0.54 (Cy/EA 5:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.61-5.53 (m 2H, *H*-4), 3.06-3.01 (m, 2H, *H*-1), 2.47-2.41 (m 2H, *H*-2b), 2.18-2.10 (m, 2H, *H*-3b), 2.07-1.98 (m, 4 H, *H*-2a, *H*-3a) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 129.0 (*C*-4), 56.7 (*C*-1), 28.2 (*C*-3), 23.8 (*C*-2) ppm.

rac (Z)-Cyclooct-4-en-1-ol 37**37**

Das Epoxid **38** (1.00 Äq) wurde innerhalb 1 h als 2.5 M-Lösung in trockenem THF bei 0 °C zu einer Suspension von LiAlH₄ (3.00 Äq.) in trockenem THF (4 ml pro mmol **38**) getropft. Anschließend wurde das Gemisch 2 h refluxiert, wieder auf 0 °C gekühlt, durch aufeinanderfolgende Zugabe von EA sowie H₂O gestoppt und über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde über Kieselgel filtriert, mit EA nachgewaschen und das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 90 % einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₈H₁₂O (124.18 g/mol)

R_f-Wert: 0.27 (Cy/EA 5:1)

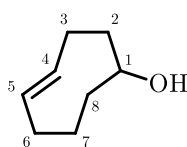
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.73-5.67 (m 1H, *H*-4), 5.63-5.56 (m 1H, *H*-5), 3.85-3.79 (m, 1H, *H*-1), 2.34-2.25 (m, 1H, *H*-3b), 2.18-2.07 (m, 3H, *H*-6a/b, *H*-3a), 1.97-1.82 (m, 2H, *H*-2b, *H*-8b), 1.75-1.59 (m, 2H, *H*-8a, *H*-7b), 1.58-1.47 (m, 2 H, *H*-2a, *H*-7a) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 130.3 (*C*-4), 129.7 (*C*-5), 72.9 (*C*-1), 37.9 (*C*-2), 36.4 (*C*-8), 25.8 (*C*-6), 25.0 (*C*-7), 22.9 (*C*-3) ppm.

trans Cyclooctenole 39a und 39b

Eine Säule wurde Silbernitrat-imprägniertem Kieselgel ($\text{AgNO}_3/\text{SiO}_2$ 1:9 (m/m), 10 g pro mmol **37**) befüllt. Die Säule wurde lichtdicht mit Alufolie umwickelt und mit Laufmittel konditioniert (Et_2O und Pentan 9:1 (v/v)).

1 Äq. *cis* Cyclooctenol **37** zusammen mit 1 Äq. Benzoesäuremethylester in einem Gemisch aus Et_2O und Pentan (v/v 9:1, 10 ml pro mmol **37**) und in einen Quarzkolben überführt und in einen UV-Reaktor gehängt. Der Reaktor war mit 16 UV Lampen (254 nm) bestückt. **Während der Reaktion auf Augen und Hautschutz achten!** Das Gemisch wurde 16 h refluxiert und gleichzeitig kontinuierlich über die Säule im Kreis geführt (Durchflussrate 100 ml / min). Nach Abbruch der Reaktion wurde das Kieselgelgemisch im Stickstoffstrom getrocknet, in einen Kolben überführt und NH_4OH sowie DCM zugegeben (jeweils 10 ml pro mmol **37**). Das Gemisch wurde gerührt bis eine homogene Suspension entstand, das Kieselgel abfiltriert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert (5 ml pro mmol **37**), die organischen Phasen vereint, über Na_2SO_4 getrocknet das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene farblose Öl wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , Cy/EE 4:1).

rac pro-R-(E)-Cyclooct-4-en-1-ol 39a**39 pro R**

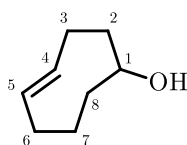
Summenformel: C₈H₁₂O (124.18 g/mol)

R_f-Wert: 0.37 (Cy/EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.61-5.53 (m, 1H, *H*-4/5), 5.42-5.36 (m, 1H, *H*-4/5), 3.48-3.43 (m, 1H, *H*-1), 2.37-2.23 (m, 3H), 1.98-1.89 (m, 4H), 1.71-1.51 (m, 3H), 1.19 (s, 1H, *OH*) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 135.2 (*C*-4/5), 132.9 (*C*-4/5), 77.9 (*C*-1), 44.7, 41.2, 34.5, 32.8, 31.3, ppm.

rac pro-*S*-(*E*)-Cyclooct-4-en-1-ol **39b**



39 pro S

Summenformel: C₈H₁₂O (124.18 g/mol)

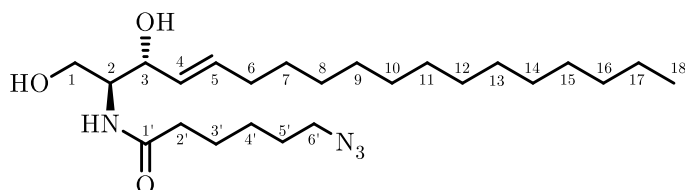
R_f-Wert: 0.28 (Cy/EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.62-5.51 (m, 2H, *H*-4/*H*-5), 4.06-4.02 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.17-2.06 (m, 3H), 1.91-1.71 (m, 3H), 1.70-1.61 (m, 1H, *H*-1), 1.30-1.23 (m, 2H, *H*-4/*H*-5) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 134.4 (*C*-4/5), 133.2 (*C*-4/5), 67.5 (*C*-1), 43.1, 34.2, 34.1, 29.4, 27.8 ppm.

7.3.3 Synthese von Ceramidderivaten

N-(6-Azido)-hexanoylsphingosin (ω N₃-C6-Cer) **22**



22

Nach Umsetzung von 6-Azidohexansäure **16** mit Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (100:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(2-Azido)-hexanoylsphingosin **22** zu erhalten.

Ausbeute: 87 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₄H₄₆N₄O₃ (438.66 g/mol)

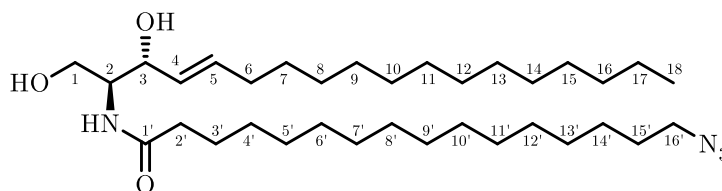
R_f-Wert: 0.72 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.32 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.78 (tdd, ³*J* = 15.2, 6.9, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, *H*-5), 5.52 (tdd, ³*J* = 15.4, 6.4, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, *H*-4), 4.35-4.29 (m, 1H, *H*-3), 3.95 (dd, ²*J* = 11.1, ³*J* = 3.7, 1H, *H*-1a), 3.91 (ddd, ³*J* = 7.4, 7.4, 3.7 Hz, 2H, *H*-2), 3.74-3.66 (m, 1H, *H*-1b), 3.28 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 3H, *H*-6'), 2.87 (s, 2H, OH), 2.25 (t, ³*J* = 7.5 Hz, 2H, *H*-2'), 2.05 (dd, ³*J* = 14.2, 6.9 Hz, 2H, *H*-6), 1.68 (ddd, ³*J* = 15.4, 7.7, 7.7 Hz, 2H, *H*-3'), 1.62 (ddd, ³*J* = 15.0, 7.1, 7.1 Hz, 2H, *H*-5'), 1.15-1.25 (m, 24H, *H*-7 bis *H*-17, *H*-4'), 0.87 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 3H, *H*-18) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.5$ ($C-1'$), 134.4 ($C-5$), 128.8 ($C-6$), 74.8 ($C-3$), 62.5 ($C-1$), 54.5 ($C-2$), 51.4 ($C-6'$), 36.6 ($C-2'$), 32.4 ($C-6$), 32.1 (C -alkyl), 29.8 (C -alkyl), 29.8 (C -alkyl), 29.8 (C -alkyl), 29.6 (C -alkyl), 29.5 (C -alkyl), 29.4 (C -alkyl), 29.3 (C -alkyl), 28.7 ($C-5'$), 26.4 ($C-4'$), 25.3 ($C-3'$), 22.8 (C -alkyl), 14.3 ($C-18$) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 461.34621; gefunden: 461.34614.

N-(16-Azido)-hexadecanoylsphingosin (ωN_3 -C16-Cer) **23**



23

Nach Umsetzung von 16-Azidohexadecansäure **17** mit Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (100:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(16-Azido)-hexadecanoylsphingosin **23** zu erhalten.

Ausbeute: 99 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_3$ (578.93 g/mol)

R_f -Wert: 0.50 (DCM/MeOH , 10:1)

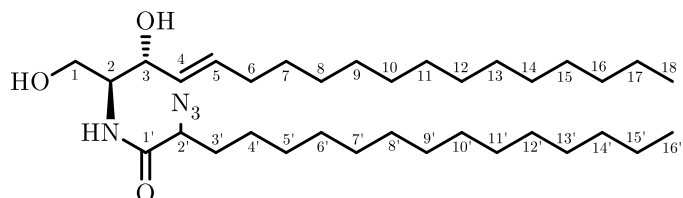
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.25$ (d, $^3J = 7.4$ Hz, 1H, *NH*), 5.78 (dddd, $^3J = 15.2$, 6.8, 6.8, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, *H-5*), 5.52 (dddd, $^3J = 15.4$, 6.4, $^4J = 1.3$, 1.3 Hz, 1H,

H-4), 4.35-4.29 (m, 1H, *H*-3), 3.98-3.95 (m, 2H, *H*-1a, *H*-1b), 3.90 (ddd, $^3J = 7.4, 7.4, 3.7$ Hz, 2H, *H*-2), 3.70 (ddd, $^2J = 10.7, ^3J = 7.0, 3.4$, *H*-1a), 3.25 (t $^3J = 6.98$, 1H, *H*-16'), 2.76-2.70 (m, 2H, OH), 2.24 (dd, $^3J = 7.9, 7.3$ Hz, 2H, *H*-2'), 2.05 (ddd, $^3J = 7.1, 7.1, 7.1$ Hz, 2H, *H*-6), 1.67-1.56 (m, 4H, *H*-3', *H*-15', 4H), 1.15-1.25 (m, 44H, *H*-7 bis *H*-17, *H*-4' bis *H*-14'), 0.88 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, *H*-18), ppm.

^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.0$ (*C*-1'), 134.5 (*C*-5), 128.9 (*C*-6), 74.9 (*C*-3), 62.7 (*C*-1), 54.6 (*C*-2), 51.6 (*C*-16'), 37.0 (*C*-2'), 32.4 (*C*-6), 32.1 (*C*-alkyl), 29.8 (*C*-alkyl), 29.8 (*C*-alkyl), 29.8 (*C*-alkyl), 29.7 (*C*-alkyl), 29.6 (*C*-alkyl), 29.6 (*C*-alkyl), 29.5 (*C*-alkyl), 29.4 (*C*-alkyl), 29.4 (*C*-alkyl), 29.3 (*C*-alkyl), 29.3 (*C*-alkyl), 29.0 (*C*-15'), 26.9 (*C*-alkyl), 25.9 (*C*-3'), 22.8 (*C*-alkyl), 14.3 (*C*-18) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{H}]^+$: 579.52077; gefunden: 579.51988.

N-(2-Azido)-hexadecanoylsphingosin ($\alpha\text{N}_3\text{-C16-Cer}$) **29**



29

Nach Umsetzung von 2-Azidohexadecansäure **27** mit Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (100:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(2-Azido)-hexadecanoylsphingosin **29** als Gemisch der Diastereomeren zu erhalten.

Ausbeute: 94 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₃₄H₆₆N₄O₃ (578.93 g/mol)

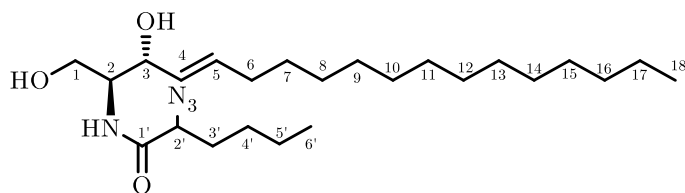
R_f-Wert: 0.44 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.01 (d, ³J = 7.9 Hz, 2H, NH), 5.80 (dddd, ³J = 15.4, 6.8, 6.8 ⁴J = 1.2 Hz, 2H, H-5), 5.53 (dddd, ³J = 15.4, 6.5, ⁴J = 1.4, 1.4 Hz, 1H, H-4) bzw. 5.52 (dddd, ³J = 15.4, 6.5, ⁴J = 1.4, 1.4 Hz, 1H, H-4), 4.37-4.27 (m, 2H, H-3), 4.01-3.97 (m, 4H, H-1a, H-2'), 3.89 (ddd, ³J = 7.9, 7.9, 3.6, Hz, 1H, H-2) bzw. 3.88 (ddd, ³J = 7.8, 7.8, 3.6, Hz, 1H, H-2), 3.76-3.66 (m, 2H, H-1), 2.70-2.54 (m, 2H, C-1-OH), 2.54-2.43 (m, 2H, C-2-OH), 2.10-2.01 (m, 4H, H-6), 1.97-1.88 (m, 2H, H-3'a), 1.83 (dddd, ³J = 14.5, 7.3, 7.3, 7.3 Hz, 2H, H-3'b), 1.47-1.19 (m, 92Hs, H-alkyl), 0.88 (t, 6.9 Hz, 12H, H-16', H-18) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 170,1 (2C, C-1'), 134,9 (2C, C-5), 128,7 (2C, C-4), 74,6 (1C, C-3), 74,5 (1C, C-3), 64,6 (2C, C-2'), 62.4 (1C, C-1), 62.3 (1 C, C-1), 54.6 (2C, C-2), 32.4, 32.4, 32.1, 29.8, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.2, 25.5, 25.5 (46C, C-alkyl), 22.8 (4C, C-17/C-15'), 14.3 (4C, C-18/C-16') ppm.

Keine Zuordnung zu den einzelnen Diastereomeren möglich, da die Kohlenstoffsignale zu stark überlagern.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 601.50271; gefunden: 601.50271.

***N*-(2-Azido)-hexanoylsphingosin (α N₃-C6-Cer) 28****28**

Nach Umsetzung von 2-Azidohexansäure **26** mit Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (100:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(2-Azido)-hexanoylsphingosin **28** als Gemisch der Diastereomeren zu erhalten.

Ausbeute: 83 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₄H₄₆N₄O₃ (438.66 g/mol)

R_f-Wert: 0.35 (DCM/MeOH, 25:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.02 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, NH), 5.79 (dddd, ³*J* = 15.3, 6.9, 6.9 ⁴*J* = 1.1 Hz, 2H, *H*-5) bzw. 5.79 (dddd, ³*J* = 15.4, 6.8, 6.8 ⁴*J* = 1.1 Hz, 2H, *H*-5), 5.51 (dddd, ³*J* = 15.4, 6.4, ⁴*J* = 1.5, 1.5 Hz, 1H, *H*-4) bzw. 5.50 (dddd, ³*J* = 15.4, 6.4, ⁴*J* = 1.5, 1.5 Hz, 1H, *H*-4), 4.32 (dd, ³*J* = 5.3, 5.3 Hz, 1H, *H*-3) bzw. 4.28 (dd, ³*J* = 5.3, 5.3 Hz, 1H, *H*-3), 4.00-3.94 (m, 4H, *H*-1a, *H*-2'), 3.88 (dddd, ³*J* = 9.0, 4.1, 3.9, 3.9 Hz, 1H, *H*-2) bzw. 3.87 (dddd, ³*J* = 8.2, 4.0, 4.0, 4.0 Hz, 1H, *H*-2), 3.71 (dd, ³*J* = 10.7, 3.2 Hz, 1H, *H*-1), bzw. 3.68 (dd, ³*J* = 10.8, 3.2 Hz, 1H, *H*-1), 3.00-2.70 (m, 4H, C-1-OH, C-2-OH), 2.10-2.00 (m, 4H, *H*-6), 1.98-1.88 (m, 2H, *H*-3'a), 1.83 (m, 2H, *H*-3'b),

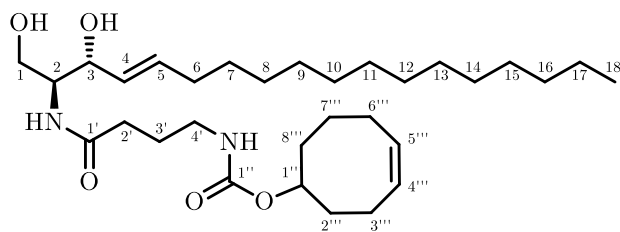
1.47-1.19 (m, 52 Hs, *H*-alkyl), 0.92 (t, 7.2 Hz, 6H, *H*-6'), 0.87 (t, 6.9 Hz, 6H, *H*-18) ppm.

^{13}C -NMR: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.1$ (2C, *C*-1'), 134.9 (2C, *C*-5), 128.7 (1C, *C*-4), 128.6 (1C, *C*-4), 74.4 (1C, *C*-3), 74.3 (1C, *C*-3), 64.5 (2C, *C*-2'), 62.4 (1C, *C*-1), 62.3 (1C, *C*-1), 54.7 (1C, *C*-2), 54.6 (1C, *C*-2), 32.4, 32.1, 32.1, 32.1, 29.8, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.2, 27.5, 27.5 (26C, *C*-alkyl), 22.8 (2C, *C*-17), 22.5 (2C, *C*-5') 14.3 (2C, *C*-18), 14.0 (2C, *C*-6') ppm.

Keine Zuordnung zu den einzelnen Diastereomeren möglich da die C Signale zu stark überlagern.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[2\text{M}+\text{Na}]^+$: 899.70320; gefunden: 899.70359.

N-(*Z*)-4-(((Cyclooct-4-en-1-yloxy)carbonyl)amino)butanoylsphingosin **48**



48

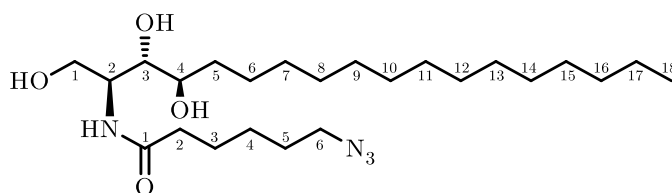
Nach Umsetzung von **47** mit Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (20:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(*Z*)-4-(((Cyclooct-4-en-1-yloxy)carbonyl)amino)butanoylsphingosin **48** zu erhalten.

Ausbeute: 65 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

R_f: 0.45 (DCM/MeOH, 10:1)

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[M+H]^+$: 537.4262; gefunden: 537.4268.

***N*-(6-Azido)-hexanoylpytosphingosin 102**



102

Nach Umsetzung der Azidosäure **16** mit Phytosphingosin **3** nach der allgemeinen Synthesevorschrift B wurde das Rohprodukt mit DCM/MeOH (20:1) säulenchromatographisch gereinigt um *N*-(6-Azido)-hexanoylpytosphingosin **102** zu erhalten.

Ausbeute: 85 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₄H₄₈N₄O₄ (456.67 g/mol)

R_f-Wert: 0.58 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.48 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.15 (dddd, ³*J* = 7.5, 5.5, 2.7, 2.5 Hz 1H, *H*-2), 3.92 (dd, ²*J* = 11.6 ³*J* = 2.6 Hz, 1H, *H*-1a), 3.74 (dd, ²*J* = 11.6 ³*J* = 5.6 Hz, 1H, *H*-1b), 3.62 (ddd, ³*J* = 8.3, 7.0, 3.0 Hz, 1H, *H*-4), 3.57 (dd, ³*J* = 7.0, 2.8 Hz, 1H, *H*-3), 3.29 (dd, ³*J* = 6.8, 6.8 Hz, 2H; *H*-6'), 2.26 (dd, ³*J* = 7.4, 7.4 Hz, 2H, *H*-2'), 1.82-1.53 (m, 3H, OH), 1.67 (ddd, ³*J* = 12.6, ³*J* = 7.3, 7.3 Hz, 2H, *H*-3'),

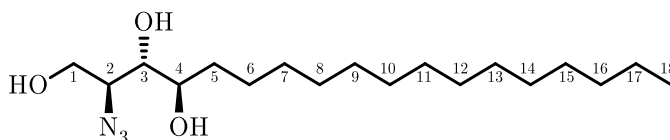
1.63 (ddd, $^3J = 12.4, 6.8, 6.8$ Hz, 2H, $H-5'$), 1.54 - 1.39 (m, 4H, $H-5/H-4'$), 1.15-1.25 (m, 24H, $H-6$ bis $H-17$), 1.37 - 1.18 (m, 24H, $H-6$ bis $H-18$), 0.88 (t, $^3J = 3H$, $H-18$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, MeOD): $\delta = 174.2$ ($C-1'$), 77.0 ($C-3$), 72.8 ($C-4$); 62.0 ($C-1$), 53.6 ($C-2$), 51.4 ($C-6'$), 36.4 ($C-2'$), 33.6 ($C-5$), 32.1 ($C-16$), 29.8-29.5 (9Cs, $C-7$ bis $C-15$), 28.7 ($C-5'$), 26.4 ($C-4'$), 25.7 ($C-6$), 25.2 ($C-3'$), 22.8 ($C-17$), 14.3 ($C-18$) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[M+Na]^+$: 278.1363; gefunden: 278.1361.

7.3.4 Synthese von Sphingoidbaserivaten

2-Azido-2-Desaminophytosphingosin 50



50

Nach Umsetzen von Phytosphingosin **3** nach der allgemeinen Synthesevorschrift A wurde der erhaltene farblose Feststoff abgefiltert, mit Wasser gespült und mit Cy/EA (1:1) über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 65 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₁₈H₃₇N₃O₃ (343.51 g/mol)

R_f-Wert: 0.20 (Cy/EA 1:1)

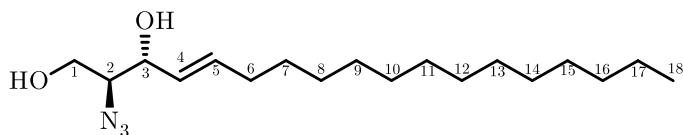
¹H-NMR: (600 MHz, MeOD/CDCl₃): δ = 3.92 (dd, 2J = 11.6 3J = 3.3 Hz, 1H, *H*-1a); 3.75 (dd, 2J = 11.6 3J = 8.0 Hz, 1H, *H*-1b); 3.59 (ddd, 3J = 8.0, 4.6, 3.4 Hz, 1H, *H*-2); 3.45 - 3.50 (m, 2H, *H*-3/*H*-4); 1.70 - 1.64 (m, 1H, *H*-5a); 1.57 - 1.54 (m, 1H, *H*-5b); 1.42 - 1.29 (m, 24H, *H*-6 - *H*-18); 0.90 (t, 3J = 3H, *H*-18) ppm.

¹³C-NMR: (150 MHz, MeOD/CDCl₃): δ = 76.0, 72.9 (2C, *C*-3/*C*-4); 66.7 (1C, *C*-2); 62.5 (1C, *C*-1); 33.9-23.7 (13C, *C*-17 - *C*-5); 14.4 (*C*-18) ppm.

ESI-MS: m/z = 344 [M + H]⁺, 366 [M + Na]⁺, 709 [2M + Na]⁺

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 366.2727; gefunden: 366.2726.

2-Azido-2-desaminosphingosin 49



49

Nach Umsetzen von Sphingosin **1** nach der allgemeinen Synthesevorschrift A wurde der erhaltene farblose Feststoff abfiltriert, mit Wasser gespült und mit Cy/EA (1:1) über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

R_f: 0.62 (Cy/EA 1:1)

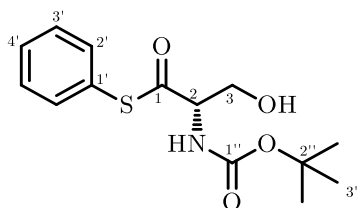
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): δ = 5.82 (dddd, 3J = 15.4, 6.8, 6.8, 4J = 0.9 Hz, 1H, *H*-5), 5.52 (dddd, 3J = 15.4, 7.3, 4J = 1.5, 1.5 Hz, 1H, *H*-4), 4.25 (br, dd, 3J = 5.3 Hz, 1H,

$H-3$), 3.82-3.75 (m, 2H, $H-1$), 3.52 (ddd, $^3J = 5.6, 5.6, 4.7$ Hz, 1H, $H-3$), 2.10-1.98 (m, 4H, $H-6, OH$), 1.39 (dddd, 2H, $^3J = 7.0, 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, $H-7$), 1.32-1.24 (m, 20H; $H-7$ bis $H-17$), 0.88 (dd, $^3J = 6.9, 6.9$ Hz, 3H, $H-18$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, MeOD): $\delta = 136.3$ ($C-5$), 128.1 ($C-4$), 74.0 ($C-3$), 66.9 ($C-2$), 62.8 ($C-1$), 32.5 ($C-6$), 32.1, 29.8-29.3 (9C, $C-8$ bis $C-16$), 21.0 ($C-7$), 22.8 ($C-17$), 14.3 ($C-18$) ppm.

HRMS (ESI): (über 1-*O*-Tr-Derivat) m/z berechnet für $[M + \text{Na}]^+$: 590.37170; gefunden: 590.37181

(S) *N*-Boc Serinthiophenylester 51



51

N-Boc-*L*-Serin **52** (1.00 Äq.) wurden mit HOBt • H₂O (1.00 Äq.) in EA (15 ml pro mmol **52**) vorgelegt und bei 0 °C Thiophenol (2.00 Äq.) und DCC (1.05 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei RT für 72 h gerührt. Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 87 % eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: C₁₄H₁₉NO₄S₄ (297.37 g/mol)

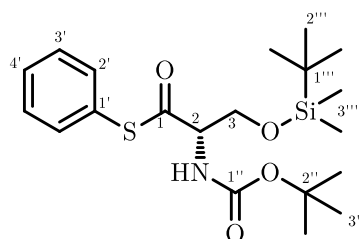
R_f-Wert: 0.46 (Cy/EA 1:1)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.47\text{-}7.36$ (m, 5H, *H*-2' bis 4'), 4.36 (dd, ³*J* = 5.6, 4.3 Hz, 1H, *H*-2), 3.90 (dd, ²*J* = 11.4, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, *H*-3b), 3.82 (dd, ²*J* = 11.4, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-3a), 1.51 (s, 9H, *H*-3'') ppm.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.47\text{-}7.36$ (m, 5H, *H*-2' bis 4'), 5.26 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, *NH*), 4.61-4.50 (m, 1H, *H*-2), 4.19-4.09 (m, 3.90 1H, *H*-3b), 3.84 (ddd, ²*J* = 11.0, ³*J* = 6.0, 4.2 Hz, 1H, *H*-3a), 3.84 (t, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, *OH*), 1.51 (s, 9H, *H*-3'') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 199.4$ (*C*-1), 155.6 (*C*-1'), 134.8 (*C*-4'), 129.7 (2C, *C*-2'), 129.4 (2C, *C*-3'), 127.2 (*C*-1''), 80.9 (*C*-2''), 63.3 (*C*-3), 62.0 (*C*-2), 28.5 (*C*-3'') ppm.

(S) 3-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-2-*N*-Boc Serinthiophenylester **53**



53

Der Alkohol **51** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit TBSCl (4.00 Äq.) und DMAP (0.20 Äq.) in DMF (5.00 ml pro mmol **51**) vorgelegt, das Gemisch auf 0 °C gekühlt und NMM (1.00 Äq.) über 15 min zugetropft und 10 min bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 30 min Rühren bei RT wurde das Gemisch mit EA (15.0 ml pro mmol **51**) aufgenommen und nacheinander mit 0.1 M HCl-, gesättigte NaHCO₃-, und gesättigte NaCl-Lösung gewaschen (jeweils 7.0 ml pro mmol **51**). Die organische Phase wurde

separiert, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 82 % eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: C₂₀H₃₃NO₄SSi (411.63 g/mol)

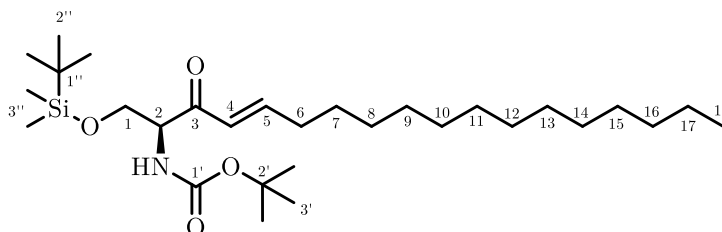
R_F-Wert: 0.53 (Cy/EA, 6:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.41-7.37 (m, 5H, H_{Ph}), 5.50 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, NH), 4.50-4.43 (m, 1H, H-2), 4.17 (dd, ²J = 10.2, ³J = 2.0 Hz, 1H, H-3a), 3.80 (dd, ²J = 10.2, ³J = 3.4 Hz, 1H, H-3b), 1.51 (s, 9H, H-3''), 0.91 (s, 9H, H-2'''), 0.06 (s, 3H, H-3'''a), 0.05 (s, 3H, H-3'''b) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 199.1 (C-1), 155.3 (C-1''), 134.6 (C-4'), 129.3 (2C, C-2'), 129.2 (2C, C-3'), 127.7 (C-1'), 80.5 (C-2''), 63.6 (C-3), 61.9 (C-2), 28.4 (C-3''), 25.8 (C-2'''), 18.3 (C-1'''), -5.5 (C-3'''a), -5.6 (C-3'''b) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 434.17918; gefunden: 434.17904.

(S)-1-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-2-hexadecanylaminooctadec-4-en-3-on
55



55

Der Thioester **53** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Boronsäure **54** (1.70 Äq.), Pd(dba)₃ (0.03 Äq.), CuTC (1.50 Äq.) und P(OEt)₃ (0.20 Äq.) unter Stickstoff vorgelegt, in trockenem THF (30 ml pro mmol **53**) gelöst und das Gemisch für 4 d bei RT unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Der Feststoff wurde abgefrittet, das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde mit EA (60 ml pro mmol **53**) aufgenommen und nacheinander mit 0.1 M NaOH-Lösung (30 ml pro mmol **53**), 0.1 M HCl-Lösung (12.5 ml pro mmol **53**) und gesättigter NaHCO₃-Lösung (12.5 ml pro mmol **53**) gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Pentan/EA 20:1) gereinigt.

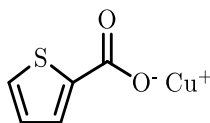
Ausbeute: 83 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₉H₅₇NO₄Si (511.86 g/mol)

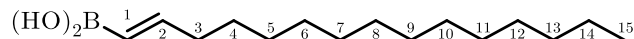
R_f-Wert: 0.20 (Pentan/EA, 20:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.95 (dt, ²J = 14.8, ³J = 7.4, 1H, H-5), 6.26 (d, ²J = 14.8, H-4), 5.51 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.53 (ddd, 1H; ³J = 7.5, 4.6, 3.3 Hz, H-2), 3.96 (dd, ²J = 10.1, ³J = 3.3 Hz, 1H, H-1a), 3.82 (dd, ²J = 10.1, ³J = 4.6 Hz, 1H, H-1b), 2.21 (ddt, ³J = 7.3, 7.1, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H-6), 1.52-1.38 (m, 11H, H-3',H-17), 1.35-1.21 (m, 20H, H-7-16), 0.87 (t, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-18), 0.85-0.81 (m, 9H, H-2''), -0.00 (s, 3H, H-3''a), -0.01 (s, 3H, H-3''b) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 196.6 (C-1'), 155,5 (C-3), 149,3 (C-5), 127,1 (C-4), 79.7 (C-2'), 63.8 (C-1), 59.6 (C-2), 32.8 (C-6), 32.1 (C-16), 29.8-29.3 (9C, C-8 bis C-15), 28.5 (C-3'), 28.2 (C-7), 25.9 (C-2''), 22.8 (C-17a), 18.3 (C-1''), 14.2 (C-18), -5.4 (C-3''a), -5.5 (C-3''b) ppm.

Kupfer(I)-thiophen-2-carboxylat

Cu_2O (1.00 Äq.) wurden zusammen mit Thiophen-2-carbonsäure (4.00 Äq.) unter Stickstoff am Wasserabscheider für 48 h refluxiert. Anschließend wurde der Feststoff unter Stickstoff abgefrittet und nacheinander mit trockenem Methanol und Diethylether gewaschen und ohne weitere Aufarbeitung für die Liebeskind-Srogl-Kupplung eingesetzt (**55**).

***E*-Pentadecenboronsäure 54****54**

Pentadecin (1.00 Äq.) wurde in DCM (5 ml pro mmol Pentadecin) gelöst, bei 0 °C $\text{SMe}_2 \cdot \text{HBBBr}_2$ (1.10 Äq.) zugetropft und das Reaktionsgemisch bei 0 °C für 30 min gerührt. Anschließend wurde das Gemisch für 5 h bei RT gerührt und Et_2O (5 ml pro mmol Pentadecin) zugeben. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (5 ml pro mmol Pentadecin) bei 0 °C vorsichtig gestoppt, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EA (je 0.50 ml pro mmol Pentadecin) extrahiert, die organischen Phasen

wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Pentan/EA 2:1) gereinigt

Ausbeute: 84 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

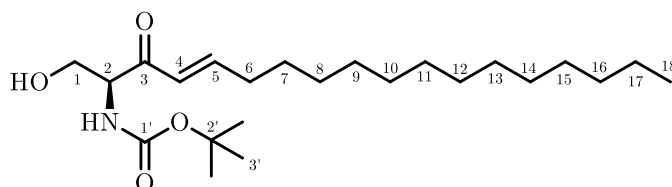
Summenformel: C₁₅H₃₁BO₂ (254.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.24 (Pentan/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.96 (dt, 1H, ³J = 17.6, 6.5 Hz, H-2), 5.53 (dt, 1H, ³J = 17.6, ⁴J = 1.5 Hz, H-1), 2.21 (ddt, 1H, ³J = 7.7, 6.5, ⁴J = 1.5 Hz, H-1), 1.51-1.18 (m, 22H, H-4 bis H-14), 0.87 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-15) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): δ = 180.9 (C-2), 153.8 (C-1), 36.9 (C-3), 33.1, 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 29.8, 23.7 (11C, C-3 bis 14), 14.4 (C-15) ppm.

(S,E)-tert-Butyl-(1-hydroxy-3-oxooctadec-4-en-2-yl)carbamate 57



57

Silylether **55** (1.00 Äq.) wurde in MeOH (5 ml pro mmol **55**) gelöst und bei 0 °C 1 M HCl-Lösung (10 ml pro mmol **55**) zugetropft. Die Mischung wurde anschließend über Nacht bei RT gerührt. Da keine vollständige Umsetzung beobachtet werden konnte wurde TBAF zugegeben (4.00 Äq.). Nachdem die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EA aufgenommen (5 ml pro mmol **55**). Nach Waschen der Lösung mit gesättigter NaHCO₃- und gesättigter NaCl-Lösung (3 ml

pro mmol **55**) wurde die organische Phase wurde separiert, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Pentan/EA 20:1) gereinigt.

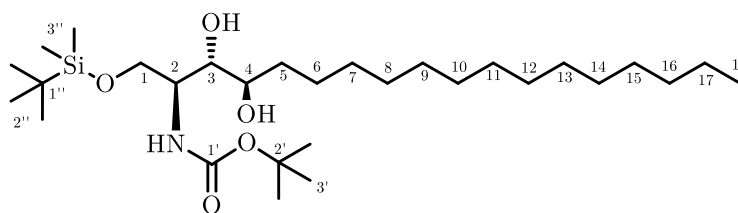
Ausbeute: quantitativ eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₃H₄₃NO₄ (397,60 g/mol)

R_f-Wert: 0.12 (Pentan/EA, 7:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.06 (ddd, ³J = 15.7, 7.0, 7.0 Hz, 1H; *H*-5), 6.27 (dd, ³J = 15.7, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, *H*-4), 5.83-5.63 (m, 1H, *NH*), 4.67-4.56 (m, 1H, *OH*), 3.92 (dd, ²J = 11.5, ³J = 3.6 Hz, 1H, *H*-1a), 3.84 (dd, ²J = 11.5, ³J = 4.5 Hz, 1H, *H*-1b), 2.24 (ddd, ³J = 7.4, 7.4 ⁴J = 1.4 Hz, 2H, *H*-6), 1.50 (s, 9H, *H*-3'), 1.29-1.21 (m, 10H, *H*-7 bis *H*-17), 0.87 (t, ³J = 6.8 Hz, 3H, *H*-18) ppm.

tert-Butyl-((2*S*, 3*S*, 4*R*)-1-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-3,4-dihydroxyoctadecan-2-yl)-carbamat **59**



59

N-Boc-Phytosphingosin **58** (1.00 Äq) wurde in DMF (5 ml pro mmol **58**) gelöst, auf 0 °C gekühlt und nacheinander NEt₃ (1.00 Äq.), TBS-Cl (1.00 Äq) sowie DMAP (0.01 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 2.5 h bei 0 °C

gerührt, halbgesättigte NH₄Cl-Lösung (5 ml pro mmol **58**) zugegeben und das Gemisch dreimal mit EA (jeweils 10 ml pro mmol **58**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 80 % eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: C₂₉H₆₁NO₅Si (531.88 g/mol)

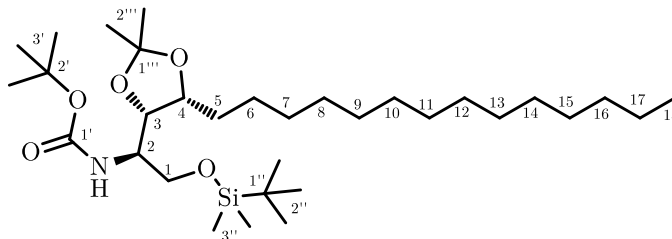
R_f-Wert: 0.74 (EE)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH), 3.91 (m, 1H, H-1a), 2.82 (br s, 1H, H-2), 3.75 (m, 1H, H-1b), 3.59 (m, 2H, H-3/4), 3.12 (br s, 1H, OH), 2.73 (br s, 1H, OH), 1.70 – 1.48 (m, 2H, H-5), 1.44 (s, 9H, H-3'), 1.25 (m, 24H, H-6 bis H-17), 0.90 (s, 9H, H-2''), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H-18), 0.10 ppm. (s, 6H, H-3'') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 155.8 (C-1'), 79.8 (C-2'), 76.1 (C-3), 73.5 (C-4), 63.0 (C-1), 51.8 (C-2), 33.5 (CG), 32.1 (CH), 29.8 – 29.5 (CI), 28.5 (C-3'), 26.1 (CK), 26.0 (C-2''), 22.8 (CM), 18.3 (C-1''), 14.3 (C-18), -5.4 (C-3'') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + Na]⁺: 554.42112; gefunden: 554.42150.

tert-butyl-((*S*)-2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-((4 *R*, 5 *R*)-2,2-dimethyl-5-tetradecyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl)carbamat **60**

**60**

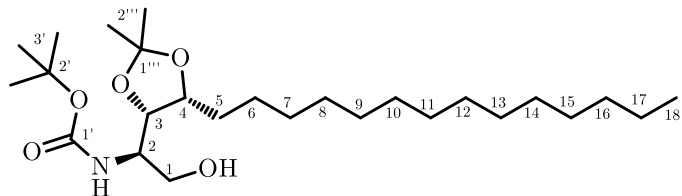
Der Silylether **59** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit 2,2-Dimethoxypropan (DMP, 8.00 Äq.) sowie Pyridinium-4-toluolsulfonat (0.20 Äq) in trockenem DCM (10 ml pro mmol **59**) gelöst und 14 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (7 ml pro mmol **58**) gewaschen, die Phasen getrennt und die wässrige dreimal mit DCM (jeweils 10 ml pro mmol **58**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 59 % eines farblosen Feststoffes.

R_f-Wert: 0.59 (Cy/EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.13 - 3.98 (m, 2H), 3.83 (dd, ³*J* = 9.9, 2.7, 1H), 3.78 - 3.69 (m, 1H), 3.65 (dd, *J* = 9.6, 2.2, 1H), 1.61 - 1.48 (m, 4H), 1.44 (d, ³*J* = 3.8, 6H, H-2'''), 1.43 (s, 2H), 1.41 (s, 3H, H-3'), 1.31 (s, 6H, H-3'), 1.35-1.09 (m, 20H), 0.92 - 0.85 (m, 12H, H-18, H-2''), 0.06 (s, 6H H-3'') ppm.

tert-butyl-((*S*)-1-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-tetradecyl-1,3-dioxolan-4-yl)-2-hydroxyethyl) carbamat **61**

**61**

Das Acetal **60** wurde in THF (jeweils 14 ml pro mmol **60**) gelöst und bei 0 °C TBAF (1.25 Äq) zugegeben. Das Gemisch wurde 14 h bei RT gerührt, gesättigte AlCl₃-Lösung (5 ml pro mmol **58**) zugegeben und das Gemisch dreimal mit DCM (jeweils 10 ml pro mmol **58**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 76 % eines farblosen Feststoffes.

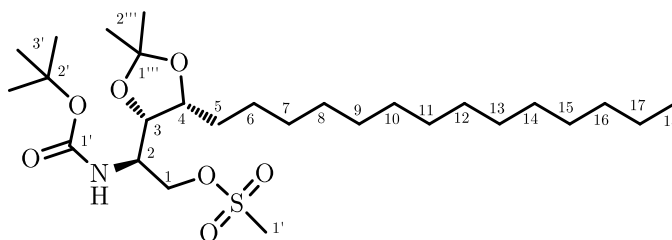
R_f-Wert: 0.22 (Cy/EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 4.12 (m, 2H, *H*-3/4), 3.85 (m, 1H, *H*-1a), 3.77 (m, 1H, *H*-2), 3.69 (m, 1H, *H*-1b), 1.56 (m, 2H, *H*-5), 1.44 (s, 3H, *H*-2'''), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.33 (s, 3H, *H*-2'''), 1.30 - 1.22 (m, 24H, *H*-6 bis *H*-17), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, *H*-18) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 155.6 (*C*-1'), 108.2 (*C*-1'''), 79.9 (*C*-2'), 78.4 (*C*-3), 78.0 (*C*-4), 64.0 (*C*-1), 51.2 (*C*-2), 32.1 (*C*-5), 29.8- 29.4, 26.9, 22.8, (*C*-6 bis *C*-17), 28.5 (*C*-3'), 27.8 (*C*-2'''), 25.43 (*C*-2'''), 14.26 (*C*-18) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[M + H]^+$: 458.39400; gefunden: 458.38423.

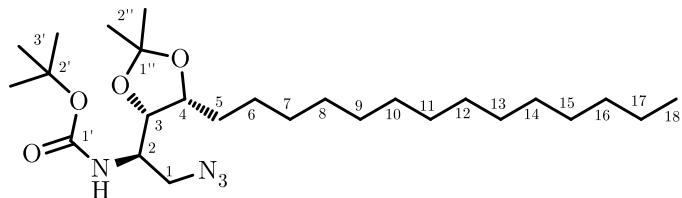
(*S*)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-2-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-tetradecyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethanesulfonat **62**



62

Der Alkohol **61** (1.00 Äq.) wurde in DCM (10 ml pro mmol **61**) gelöst, auf 0 °C gekühlt, NEt_3 (2.00 Äq.) und MsCl (1.15 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde 2,5 h bei 0 °C gerührt, anschließend mit 0.1 N HCl-Lösung (45 ml pro mmol **61**) gewaschen, die Phasen separiert, die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert (jeweils 20 ml pro mmol **61**). Die organischen Phasen wurden vereint das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung weiter eingesetzt.

R_f-Wert: 0.55 (Cy/EA 2:1)

tert*-Butyl-((*S*)-2-azido-1-((4 *R*, 5 *R*)-2,2-dimethyl-5-tetradecyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl)-carbamate **63***63**

Das Mesylat **62** (1.00 Äq.) wurde in DMF (10 ml pro mmol **62**) gelöst, NaN₃ (5.00 Äq) zugegeben und das Gemisch für 14 h bei 60 °C gerührt. Wasser (45 ml pro mmol **62**) wurde zugegeben und das Gemisch dreimal mit Et₂O extrahiert (jeweils 45 ml pro mmol **62**). Die organischen Phasen wurden vereint das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 78 % eines farblosen Feststoffes.

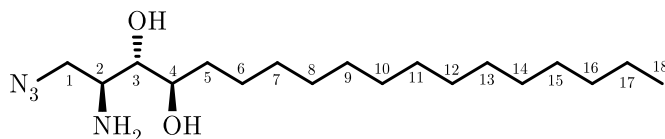
R_f-Wert: 0.50 (Cy/EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.61 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 4.01 - 3.93 (m, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.64 (dd, *J* = 12.2, 3.6 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 12.3, 3.0 Hz, 1H), 1.61 - 1.48 (m, 4H), 1.44 (s, 9H, H-3'), 1.42 (s, 3H, H-2''a), 1.34 (s, 3H, H-2''b), 1.32 - 1.20 (m, 22H, *H*-Alkyl), 0.88 (t, *J* = 6.9, 3H, *H*-18) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 154.65, 108.21, 80.06, 53.36, 49.58, 31.92, 29.68, 29.65, 29.61, 29.56, 29.51, 29.36, 28.91, 28.31, 27.99, 26.56, 25.60, 22.69, 14.11, 1.01 ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[M + Na]^+$: 505,37243; gefunden: 505. 37275.

1-Azido-1-desoxyphytosphingosin **64**



64

Das Azid **63** (1.00 Äq.) wurde DCM (10 ml pro mmol **63**) gelöst, H₂O (3.5 ml pro mmol **63**) und TFA (1.00 Äq.) zugegeben und das Gemisch 14 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EE) gereinigt.

Ausbeute: 91 % eines farblosen Feststoffes.

R_f-Wert: 0.27 (EE)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.78 (dd, ²J = 12.9, ³J = 3.6 Hz, 1H, H-1a), 3.70 - 3.55 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 3.45 - 3.37 (m, 1H, H-1b), 1.59 (m, 1H, H-5), 1.43 (m, 1H, H-5), 1.44-1.84 (m, 24H, H-Alkyl), 0.81 (t, 3J=6.9 Hz, 3H, H-18) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 73.3 (C-3), 72.3 (C-4), 53.4 (C-1), 50.4 (C-1) 33.5 (C-5), 31.9 - 25.6 (C-alkyl), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18) ppm.

MS (ESI): m/z berechnet für $[M + H]^+$: 343.3 gefunden: m/z = 343.3.

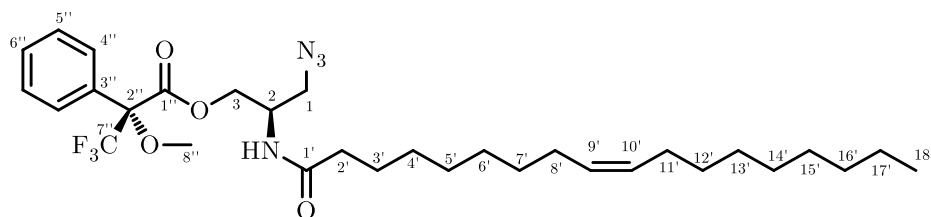
3-azido-2-oleamidopropyl-(*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat

Synthese der Mosherester **87** und **88**.

R- α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetatsäure (2.50 Äq.) wurde in DCM gelöst (15 ml per mmol **76**) und zu einer Lösung von Azido-*N*-Oleoylserinol **76** (1.00 Äq.), DCC (2.50 Äq.) und DMAP (2.50 Äq.) in DCM (15 ml per mmol **76**). Das Reaktionsgemisch wurde 14 h bei RT gerührt, über Kieselgel gefiltert und mit EA herunter gewaschen (100 mL pro mmol **76**). Nach destillativen Entfernen der Lösungsmittel bei reduziertem Druck, wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 10:1) gereinigt.

(*R*)-3-azido-2-oleamidopropyl (*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **87**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **76a** das (*R*)-3-azido-2-oleamidopropyl (*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **87**.



54

Ausbeute: 56 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₃₁H₄₇F₃N₄O₄ (596.74 g/mol)

R_f-Wert: 0.62 (Cy/EA, 2:1)

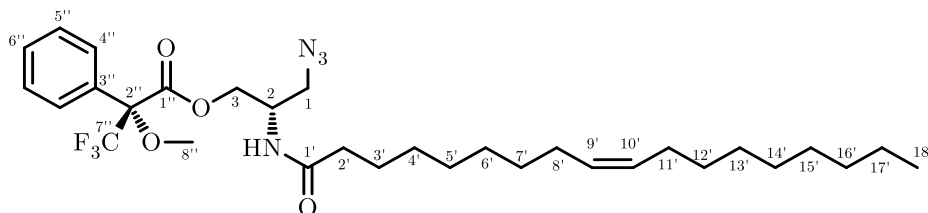
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.46 (m, 2H, Ar), 7.46-7.38 (m, 2H, Ar), 5.50 (m, 1 H, NH), 5.38-5.30 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.43-4.31 (m, 3H, H-2, H-3a/b), 3.54-3.53 (m, 3H, H-8'), 3.43 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1 H, H-1a), 3.38 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1 H, H-1b), 2.11 (dd, ³J = 8.2, 7.1 Hz, 2 H, H-2'), 2.03-1.98 (m, 4 H, H-8'/H-11'), 1.61-1.51 (m, 2H, H-3'), 1.37-1.20 (m, 20H, H-4' bis H-7', H-12' bis H-17'), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.0 (C-1'), 166.4 (C-1''), 132.0 (C-3''), 130.2 (C-9'/10'), 130.0 (C-6''), 129.8 (C-9'/10'), 128.8 (C-4''), 127.3 (C-5''), 122.0 (C-7''), 85.0 (C-2''), 64.5 (C-3), 55.6 (C-8''), 51.1 (C-1), 47.3 (C-2), 36.7 (C-2'), 32.0 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.2 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.5 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18') ppm.

¹⁹F-NMR (375 MHz, CDCl₃): δ = -71.3 (3F) ppm.

(S)-3-azido-2-oleamidopropyl (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **88**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **76b** das (S)-3-azido-2-oleamidopropyl (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **88**.



55

Ausbeute: 93 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₃₁H₄₇F₃N₄O₄ (596.74 g/mol)

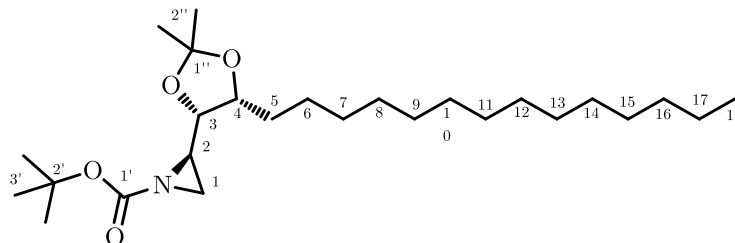
R_f-Wert: 0.62 (Cy/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.51-7.46 (m, 2H, Ar), 7.46-7.39 (m, 2H, Ar), 5.56 (d, ³J = 8.4 Hz, 1 H, NH), 5.38-5.30 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.48 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H-3b), 4.43-4.35 (m, 1H, H-2), 4.27 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-3a), 3.53-3.50 (m, 3H, H-8'), 3.45 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1 H, H-1b), 3.38 (dd, ²J = 12.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1 H, H-1a), 2.13 (dd, ³J = 8.1, 7.1 Hz, 2 H, H-2'), 2.03-1.98 (m, 4 H, H-8'/H-11'), 1.61-1.51 (m, 2H, H-3'), 1.37-1.20 (m, 20H, H-4' bis H-7', H-12' bis H-17'), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.0 (C-1'), 166.4 (C-1''), 131.9 (C-3''), 130.2 (C-9'/10'), 130.1 (C-6''), 129.8 (C-9'/10'), 128.8 (C-4''), 127.5 (C-5''), 124.8 (C-7''), 84.7 (C-2''), 64.5 (C-3'), 55.6 (C-8''), 51.2 (C-1), 47.3 (C-2), 36.7 (C-2'), 32.0 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.2 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.5 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3(C-18') ppm.

¹⁹F-NMR (375 MHz, CDCl₃): δ = -71.4 (3F) ppm.

tert-Butyl-(S)-2-((4R,5R)-2,2-dimethyl-5-tetradecyl-1,3-dioxolan-4-yl)aziridine-1-carboxylat **65**

**65**

Der Alkohol **61** (1.00 Äq.) wurde bei 0 °C in Allylalkohol (30 ml pro mmol **61**) und DMF (20 ml pro mmol **61**) gelöst und frisch getrocknetes Cs₂CO₃ (6.50 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde 54 h bei RT gerührt, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cy/EA 4:1) gereinigt.

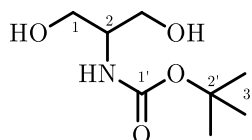
Ausbeute: 51 % eines farblosen Feststoffes.

R_f-Wert: 0.56 (Cy/EA 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.20 (ddd, *J* = 9.3, 5.7, 4.5 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 2.54 (ddd, *J* = 7.9, 6.1, 3.6 Hz, 1H), 2.32 (d, *J* = 6.2, 1H), 2.11 (d, *J* = 3.6, 1H), 1.93 - 1.68 (m, 2H), 1.58 - 1.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H, H-3'), 1.42 - 1.32 (m, 6H, H-2'), 1.26 (m, 22H, H-Alkyl), 0.88 (t, ³*J* = 6.9, 3H, *H*-18) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + Na]⁺: 462.35538; gefunden: 462.35538.

7.3.5 Synthese von Seinolamiden

N-Boc-Serinol 78**023**

Serinol **73** (1.00 Äq.) wurde in MeOH gelöst (4 mL pro mmol **73**), Boc₂O (1.10 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch 14 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 5:1).

Ausbeute: 97 % eines farblosen kristallinen Feststoffes.

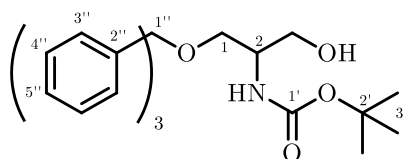
Summenformel: C₈H₁₇NO₄ (191.23 g/mol)

R_f-Wert: 0.89 (DCM/MeOH 1:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.30 (s br, 1H, NH), 3.80 (dd, ²J = 11.1 Hz, ³J = 4.5 Hz, 2H, H-1a), 3.72 (dd, ²J = 11.1, Hz, ³J = 4.6 Hz, 2H, H-1b), 3.66 (s br, 1H, H-2), 2.82 (s br, 2H, OH), 1.43 (s, 9H, H-3') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): δ = 158.7 (C-1'), 80.2 (C-2'), 62.3 (C-2), 55.3 (C-1), 28.7 (C-3') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + H]⁺: 192.12303; gefunden: 192.12314.

N-Boc-1-Trytylserinol 79**025**

N-Boc-Serinol **78** (1.00 Äq.) wurde mit TrCl (1.00 Äq.) und Pyridin (2 ml pro mmol **78**) in DCM (3 ml pro mmol **78**) gelöst und bei RT für 22 h gerührt. Das Gemisch wurde mit H₂O (6 ml pro mmol **78**) gewaschen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit EA extrahiert (jeweils 6 ml pro mmol **78**). Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und die Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Pentan/EA 2:1) gereinigt

Ausbeute: 65 % eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: C₁₅H₂₃NO₄ (281.35 g/mol)

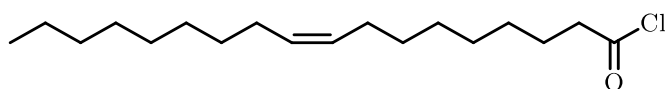
R_f-Wert: 0.48 (Pentan/EA, 1:1)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): δ = 7.47-7.41 (m, 6H, *H*-3'), 7.32-7.25 (m, 6H, *H*-4'), 7.24-7.18 (m, 3H, *H*-5'), 6.31 (d, $3J = 8.7$ Hz, 1H, NH), 3.89-3.76 (m, 1H, *H*-2), 3.66-3.54 (m, 2H, *H*-3), 3.19 (dd, $2J = 9.1$ Hz, $3J = 5.1$ Hz, 1H, *H*-1a), 3.19 (dd, $2J = 9.1$ Hz, $3J = 6.0$ Hz, 1H, *H*-1b), 1.45 (s, 9H, *H*-3') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, MeOD): $\delta = 158.1$ (C-1''), 145.4 (C-2''), 129.9 (C-3''), 128.8 (C-4''), 128.1 (C-5''), 87.8 (C-1'), 80.1 (C-2'), 64.6 (C-1), 62.9 (C-3), 54.1 (C-2), 28.8 (C-3') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{H}]^+$: 456.2145; gefunden: 456.2158.

Ölsäurechlorid **77**



77

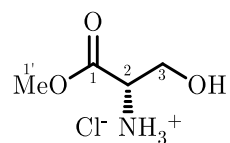
Ölsäure **74** (1.00 Äq.) wurde in DCM gelöst und SOCl_2 (1.50 Äq.) langsam über eine Stunde bei RT zugetropft. Das Gemisch wurde 4.5 h refluxiert und dann bei RT über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei reduziertem Druck wurde das Rohprodukt direkt in der Synthese von N-Oleoylserinol **71** eingesetzt.

Serinmethylester-Hydrochlorid **81**

SOCl_2 (1.10 Äq.) wurde bei 0 °C zu einer Emulsion von L- beziehungsweise D-Serin **9** (1.00 Äq.) in Methanol (2.50 ml ppro mmol **9**) und anschließend die Lösung für 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand dreimal mit Cy (jeweils 1.00 ml per mmol **9**) gewaschen.

L-Serinmethylester-Hydrochlorid **81a**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus L-Serin **9a** das L-Serinmethylester-Hydrochlorid **81a**.

**81a**

Ausbeute: quantitativ, eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: C₄H₁₀ClNO₃ (155.58 g/mol)

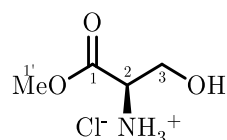
R_f-Wert: 0.62 (MeOH/Ameisensäure, 100:1)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.13$ (dd, $^3J = 4.5, 3.5$ Hz, 1H, *H*-2), 4.01 (dd, $^2J = 11.8, ^3J = 4.5$ Hz, 1H, *H*-3a), 3.92 (dd, $^2J = 11.8, ^3J = 3.5$ Hz, 1H, *H*-3b), 3.85 (br, 3H, *H*-1') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): $\delta = 169.4$ (*C*-1), 60.7 (*C*-3), 56.1 (*C*-1'), 53.7 (*C*-2), ppm.

D-Serinmethylester-Hydrochlorid **81b**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus D-Serin **9b** ergibt das D-Serinmethylester-Hydrochlorid **81b**.

**81b**

Ausbeute: quantitativ, eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ (155.58 g/mol)

R_f-Wert: 62 (MeOH/Ameisensäure, 100:1)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.14$ (dd, $^3J = 4.5, 3.5$ Hz, 1H, *H*-2), 4.01 (dd, $^2J = 11.8, ^3J = 4.5$ Hz, 1H, *H*-3a), 3.93 (dd, $^2J = 11.8, ^3J = 3.5$ Hz, 1H, *H*-3b), 3.85 (br, 3H, *H*-1') ppm.

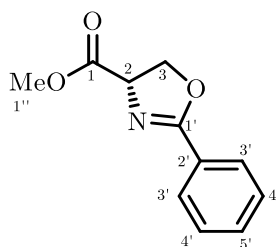
¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): $\delta = 169.4$ (*C*-1), 60.7 (*C*-3), 56.1 (*C*-1'), 53.7 (*C*-2), ppm.

2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuremethylester **82**

Ethylbenzimidat-Hydrochlorid (1.00 Äq.) wurde in DCM (2.00 ml pro mmol **81**) gelöst und nach Zutropfen von Triethylamin (1.15 Äq.) bei RT für 30 min gerührt. Anschließend wurde Serinmethylester-Hydrochlorid **81** (1.25 Äq.) portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei RT gerührt, die Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand anschließend säulenchromatographisch (Cy/EA 1:1) gereinigt.

(S)-2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuremethylester **82a**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **81a** der (S)-2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuremethylester **82a**.

**82a**

Ausbeute: 84 % einer leicht gelben, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₁H₁₁NO₃ (205.21 g/mol)

R_f-Wert: 0.53 (EE)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.99-7.96 (m, 2H, *H*-3'), 7.51-7.46 (m, 1H, *H*-5'), 7.42-7.37 (m, 2H, *H*-4'), 4.95 (dd, ²*J* = 10.6, ³*J* = 7.9 Hz, 1H, *H*-3a), 4.68 (dd, ³*J* = 8.7, 8.0 Hz, 1H, *H*-2), 4.58 (dd, ²*J* = 10.6, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-3b), 3.80 (br, 3H, *H*-1'') ppm.

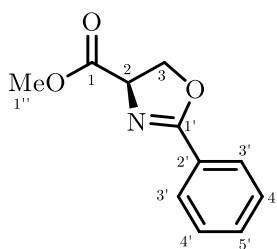
¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.7 (*C*-1), 166.4 (*C*-1'), 132.0 (*C*-5'), 128.7 (*C*-4'), 128.4 (*C*-3'), 127.0 (*C*-2'), 69.6 (*C*-3), 68.7 (*C*-2), 52.8 (*C*-1'') ppm.

MS (MALDI): *m/z* berechnet für [M + H]⁺: 206.081; gefunden: ⁺: 206.113.

[α]_D²²: 130.2 (c = 1, MeOH).

(R)-2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuremethylester **82b**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **81b** der (R)-2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonsäuremethylester **82b**.

**82b**

Ausbeute: 83 % einer leicht gelben, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₁H₁₁NO₃ (205.21 g/mol)

R_f-Wert: 0.53 (EA)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.99-7.96 (m, 2H, *H*-3'), 7.51-7.46 (m, 1H, *H*-5'), 7.43-7.38 (m, 2H, *H*-4'), 4.94 (dd, ²*J* = 10.6, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-3a), 4.69 (dd, ³*J* = 8.7, 8.0 Hz, 1H, *H*-2), 4.58 (dd, ²*J* = 10.6, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-3b), 3.80 (br, 3H, *H*-1'') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.7 (*C*-1), 166.4 (*C*-1'), 132.0 (*C*-5'), 128.7 (*C*-4'), 128.5 (*C*-3'), 127.0 (*C*-2'), 69.6 (*C*-3), 68.7 (*C*-2), 52.8 (*C*-1'') ppm.

MS (MALDI): m/z berechnet für [M + H]⁺: 206.081; gefunden: 206. 107.

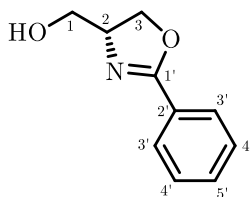
[α]_D²²: -116.6 (c = 1, MeOH).

(2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methanol 84

Der Methylester **82** (1.00 Äq) wurde in THF (2.00 mL per mmol **82**) gelöst und bei 0 °C eine 1.00 M Lösung von Diisopropylaluminiumhydrid (2.00 Äq.) in Cy über 20 min zutropft. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion bei 0 °C mit EA gestoppt und eine halbgesättigte Kaliumnatriumtartrat-Lösung (1 mL per mmol **82**) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EA extrahiert (dreimal mit je 2.00 ml per mmol **82**). Die organischen Phasen wurden vereint und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach destillativen Entfernen der Lösungsmittel bei reduziertem Druck wurde der Rückstand anschließend mit EA über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

(R)-(2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methanol 84a

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **82a** das (R)-(2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methanol **84a**.

**84a**

Ausbeute: 74 % eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: C₁₀H₁₁NO₂ (177.20g/mol)

R_f-Wert: R_f: 0.25 (Cy/EA, 1:2)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): δ = 7.94-7.91 (m, 2H, *H*-3'), 7.55-7.51 (m, 1H, *H*-5'), 7.47-7.42 (m, 2H, *H*-4'), 4.54 (dd, ²*J* = 7.8, ³*J* = 9.4 Hz, 1H, *H*-3a), 4.41 (dd, ²*J* = 7.8, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-3b), 4.40-4.34 (m, 1H, *H*-2), 3.73 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, *H*-1a), 3.68 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-1b) ppm.

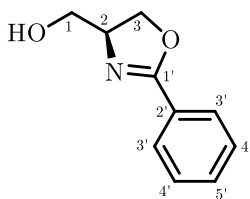
¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): δ = 167.2 (*C*-1'), 132.9 (*C*-5'), 129.5 (*C*-4'), 129.4 (*C*-3'), 128.5 (*C*-2'), 71.2 (*C*-3), 69.0 (*C*-2), 64.5 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + H]⁺: 178.08625; gefunden: 178.08618

[α]_D²²: 44.7 (c = 1, MeOH).

(*S*)-(2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methanol **84b**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **82a** das (*R*)-(2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methanol **84a**.



84b

Ausbeute: 74 % eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Summenformel: C₁₀H₁₁NO₂ (177.20g/mol)

R_f-Wert: 0.25 (Cy/EA, 1:2)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): δ = 7.94-7.91 (m, 2H, *H*-3'), 7.55-7.51 (m, 1H, *H*-5'), 7.46-7.42 (m, 2H, *H*-4'), 4.54 (dd, ²*J* = 7.9, ³*J* = 9.4 Hz, 1H, *H*-3a), 4.41 (dd, ²*J* = 7.8, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, *H*-3b), 4.40-4.34 (m, 1H, *H*-2), 3.73 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, *H*-1a), 3.68 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, *H*-1b) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): δ = 167.2 (*C*-1'), 132.9 (*C*-5'), 129.5 (*C*-4'), 129.4 (*C*-3'), 128.5 (*C*-2'), 71.2 (*C*-3), 69.0 (*C*-2), 64.5 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + H]⁺: 178.08625; gefunden: 178.08618.

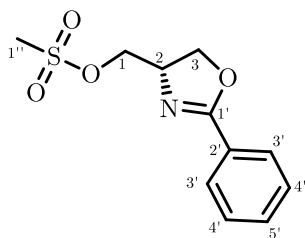
[α]_D²²: - 48.5 (*c* = 1, MeOH).

(2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methylmethansulfonat **85**

Der Alkohol **84** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Trimethylamin (1.20 Äq.) in DCM (7.00 mL per mmol **84**) gelöst und bei 0 °C MsCl (1.10 Äq.) über 10 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt, mit 0.10 M HCl-Lösung (2.00 ml per mmol **84**) gestoppt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (viermal mit je 2.00 ml pro mmol **84**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2.00 ml pro mmol **84**) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach destillativen Entfernen der Lösungsmittel bei reduziertem Druck wurde **85** ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

(*S*) (2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methylmethansulfonat **85a**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **84a** das (*S*) (2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methylmethansulfonat **85a**. Eine kleine Probe wurde zur Analyse separiert.

**85a**

Summenformel: C₁₁H₁₃NO₄S (255.29 g/mol)

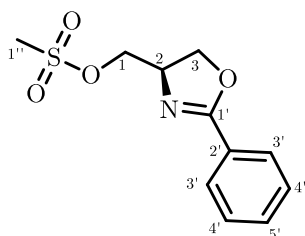
R_f-Wert: 0.10 (Cy/EA, 1:2)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.94\text{-}7.92$ (m, 2H, *H*-3'), 7.57-7.52 (m, 1H, *H*-5'), 7.47-7.43 (m, 2H, *H*-4'), 4.64-4.56 (m, 2H, *H*-3), 4.45-4.35 (m, 3H, *H*-2/*H*-1), 3.08 (s, 1H, *H*-1'')

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): $\delta = 166.7$ (*C*-1'), 131.9 (*C*-5'), 128.3 (*C*-4'), 128.1 (*C*-3'), 126.7 (*C*-2'), 70.2 (*C*-3), 69.2 (*C*-2), 64.9 (*C*-1), 35.9 (*C*-1'')

(*R*)-(2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methylmethansulfonat **85b**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **84b** das (*R*)-(2-Phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-yl)methylmethansulfonat **85b**.

**85a**

Summenformel: C₁₁H₁₃NO₄S (255.29 g/mol)

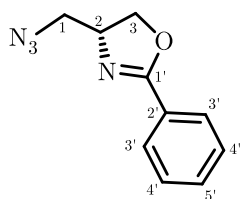
R_f-Wert: 0.10 (Cy/EA, 1:2)

4-(Azidomethyl)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol **86**

Mesylat **85** wurde in DMF gelöst (3.50 ml per mmol **85**), NaN₃ (5.00 Äq.) zugegeben und die Emulsion über Nacht bei 70 °C gerührt. Die Mischung wurde bei reduziertem Druck eingeeengt, mit Wasser aufgenommen (15 ml per mmol **85**) und die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert (vier mal mit je 10 ml pro mmol **85**). Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch (Cy/EA 2:1) gereinigt.

(R)-4-(azidomethyl)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol **86a**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **85a** das (R)-4-(azidomethyl)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol **86a**.



86a

Ausbeute: 80 % (über zwei Stufen) einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₀H₁₀N₄O (202.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.66 (EE)

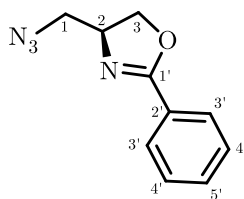
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.94\text{-}7.92$ (m, 2H, *H*-3'), 7.57-7.53 (m, 1H, *H*-5'), 7.47-7.44 (m, 2H, *H*-4'), 4.57-4.47 (m, 2H, *H*-3), 4.33-4.30 (m, 1H, *H*-2), 3.62 (dd, ²*J* = 12.7.3, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, *H*-1a), 3.43 (dd, ²*J* = 12.7, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, *H*-1b) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): $\delta = 167.7$ (*C*-1'), 133.2 (*C*-5'), 129.6 (*C*-4'), 129.4 (*C*-3'), 128.2 (*C*-2'), 71.2 (*C*-3), 67.2 (*C*-2), 55.2 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + H]⁺: 203.09274; gefunden: 203.09276.

(*S*)-4-(azidomethyl)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol **86b** aus **85b**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **85b** das (*S*)-4-(azidomethyl)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol **86b**.



86b

Ausbeute: 86 % (über zwei Stufen) einer farblosen hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₀H₁₀N₄O (202.22 g/mol)

R_f-Wert: 0.66 (EE)

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.95\text{-}7.92$ (m, 2H, *H*-3'), 7.57-7.53 (m, 1H, *H*-5'), 7.48-7.43 (m, 2H, *H*-4'), 4.57-4.47 (m, 2H, *H*-3), 4.33-4.30 (m, 1H, *H*-2), 3.63 (dd, ²*J* = 12.7, ³*J* = 4.2 Hz, 1H, *H*-1a), 3.44 (dd, ²*J* = 12.7, ³*J* = 4.3 Hz, 1H, *H*-1b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, MeOD): $\delta = 167.8$ (C-1'), 133.2 (C-5'), 129.6 (C-4'), 129.5 (C-3'), 128.2 (C-2'), 71.4 (C-3), 67.2 (C-2), 55.2 (C-1) ppm.

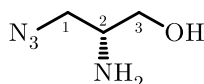
HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{H}]^+$: 203.09274; gefunden: 203.09270.

1-Azido-1-desoxyserinol **75**

Dihydrooxazol **86** (1.00 Äq.) wurde bei 60 °C für 5 h in 4 N HCl-Lösung (5.00 ml per mmol **86**) gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase bei RT mit DCM gewaschen (dreimal mit je 5.00 ml pro mmol **86**). Die Phasen wurden separiert und die wässrige bei reduziertem Druck eingengt. Das bräunliche Öl wurde direkt ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

(R)-1-Azido-1-desoxyserinol **75a**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **86a** das (R)-1-Azido-1-desoxyserinol **75a**.



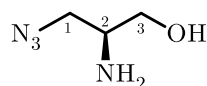
75a

Summenformel: $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$ (116.12 g/mol)

R_f-Wert: 0.31 (Wasser/Isopropanol/ Ethylacetat 1:3:6)

(S)-1-Azido-1-desoxyserinol 75b

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **86b** das (S)-1-Azido-1-desoxyserinol **75b**.

**75a**

Summenformel: C₃H₈N₄O (116.12 g/mol)

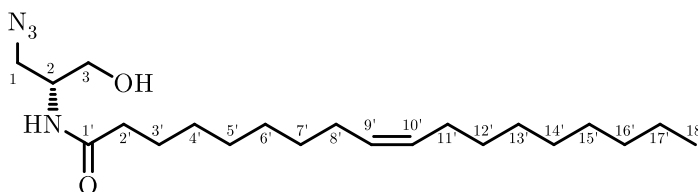
R_f-Wert: 0.31 (Wasser/Isopropanol/ Ethylacetat 1:3:6)

N-Oleoyl-1-azido-1-desoxyserinol 76

Die Umsetzung von Serinolderivat **75** mit Ölsäure **74** nach allgemeiner Syntheseanweisung D gibt nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 10:1) **76**.

(R)-N-Oleoyl-1-azido-1-desoxyserinol 76a

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **75a** das (R)-N-Oleoyl-1-azido-1-desoxyserinol **76a**.

**76a**

Ausbeute: 47 % eines farblosen amorphen Feststoffes über zwei Stufen.

Summenformel: C₂₁H₄₀N₄O₂ (380.58 g/mol)

R_f-Wert: 0.40 (Cy/EA, 1:2)

¹H-NMR: (600 MHz, MeOD): δ = 5.89 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.37-5.31 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.09-4.05 (m, 1H, H-2), 3.80 (ddd, ²*J* = 11.1 Hz, ³*J* = 4.5, 4.5 Hz, 1H, H-3b), 3.69 (ddd, ²*J* = 11.1 Hz, ³*J* = 6.2, 4.8 Hz, 1H, H-3a), 3.58 (dd, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 5.2 Hz, 1H, H-1a), 3.55 (dd, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 5.6 Hz, 2H, H-1b), 2.32 (dd, ³*J* = 6.0, 4.9 Hz, 1H, OH), 2.21 (dd, ³*J* = 7.7, 7.7 Hz, 2H, H-2'), 2.02-1.99 (m, 4H, H-8'/H-11'), 1.64 (dddd, ³*J* = 7.7, 7.5, 7.5, 6.9 Hz, 2H, H-3'), 1.36-1.23 (m, 20H, H-4'-7', H-12'-17'), 0.88 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, H-18') ppm.

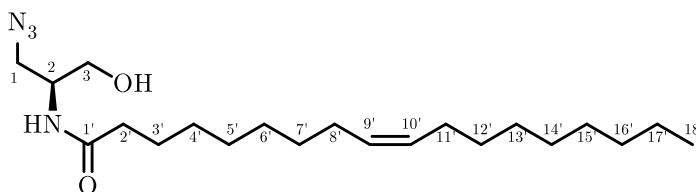
¹³C-NMR: (150 MHz, MeOD): δ = 173.7 (C-1'), 130.2 (C-9'), 129.9 (C-10'), 62.9 (C-3), 51.8 (C-1), 50.3 (C-2), 36.9 (C-2'), 32.1 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.4 (C-alkyl), 29.4 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.8 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18') ppm.

[α]_D²²: -9.9 (c = 1, MeOH).

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+H]⁺: 381.32240; gefunden: 381.32262.

(S)-N-Oleoyl-1-azido-1-desoxyserinol 76a aus 75a

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **75a** das (*R*)-N-Oleoyl-1-azido-1-desoxyserinol **76a**.

**76b**

Ausbeute: 73 % eines farblosen amorphen Feststoffes über zwei Stufen.

Summenformel: C₂₁H₄₀N₄O₂ (380.58 g/mol)

R_f-Wert: 0.40 (Cy/EA, 1:2)

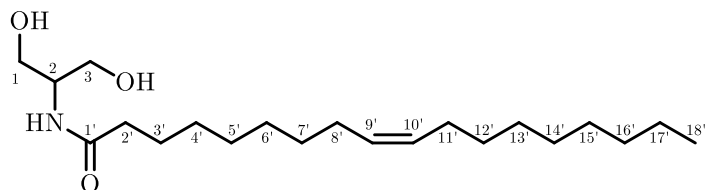
¹H-NMR: (600 MHz, MeOD): δ = 5.89 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, NH), 5.37-5.31 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.09-4.05 (m, 1H, H-2), 3.80 (ddd, ²J = 11.1 Hz, ³J = 4.0, 4.0 Hz, 1H, H-3b), 3.69 (ddd, ²J = 10.8 Hz, ³J = 5.3, 5.3 Hz, 1H, H-3a), 3.58 (dd, ²J = 12.5 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H-1a), 3.55 (dd, ²J = 12.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 2H, H-1b), 2.33 (dd, ³J = 5.5, 4.9 Hz, 1H, OH), 2.21 (dd, ³J = 7.8, 7.5 Hz, 2H, H-2'), 2.02-1.99 (m, 4H, H-8'/H-11'), 1.64 (dddd, ³J = 7.4, 7.4, 7.4, 7.4 Hz, 2H, H-3'), 1.35-1.23 (m, 20H, H-4'-7', H-12'-17'), 0.88 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (150 MHz, MeOD): δ = 173.7 (C-1'), 130.2 (C-9'), 129.9 (C-10'), 62.9 (C-3), 51.8 (C-1), 50.3 (C-2), 36.9 (C-2'), 32.1 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.4 (C-alkyl), 29.4 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.8 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M + H]⁺: 381.32240; gefunden: 381.32284.

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: 12.0 (c = 1, MeOH).

N-Oleoylserinol **71**



9

Die Umsetzung von Serinol **73** mit Ölsäure **74** nach allgemeiner Syntheseanweisung D gab nach säulenchromatographischer Reinigung mit DCM/MeOH (10:1) *N*-Oleoylserinol **71**.

Ausbeute: 70 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

Alternativ:

Serinol **73** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit NEt_3 (1.05 Äq) in MeOH gelöst (10 ml per mmol **73**) und bei 0 °C eine frisch hergestellte 1.00 M Lösung von Ölsäurechlorid **77** in trockenem THF (1.00 Äq.) über 20 min zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch bei RT für 4 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EA/MeOH (9:1) gereinigt.

Ausbeute: 48 % eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₁H₄₁NO₃ (355.56 g/mol)

R_f-Wert: 0.35 (DCM/MeOH, 10:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃/MeOD 4:1): δ = 5.30-5.20 (m, 2H, *H*-9'/*H*-10'), 3.96-3.89 (m, 1H, *H*-2), 3.74 (tt, ³*J* = 7.4, 5.0 Hz, 1H, *H*-2), 3.60 (dd, ²*J* = 11.3 Hz, ³*J* = 4.6 Hz, 2H, *H*-1a/*H*-3b), 3.50 (dd, ²*J* = 11.3 Hz, ³*J* = 5.3 Hz, 2H, *H*-1b/*H*-3a), 2.12 (t, ³*J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-2'), 1.94-1.88 (m, 4H, *H*-8'/*H*-11'), 1.54-1.50 (m, 2H, *H*-3'), 1.27-1.12 (m, 20H, *H*-4' bis *H*-7', *H*-12' bis *H*-17'), 0.78 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 1H, *H*-18') ppm.

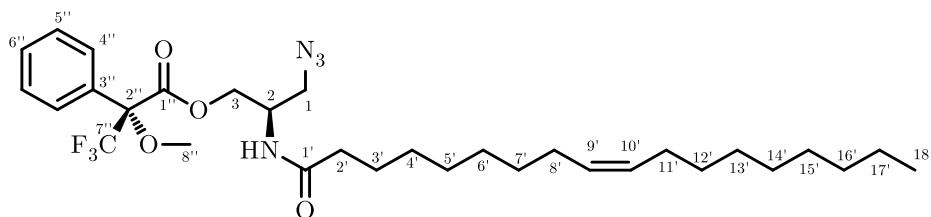
¹³C-NMR: (100 MHz, MeOD): δ = 173.7 (*C*-1'), 130.2 (*C*-9'), 129.9 (*C*-10'), 62.9 (*C*-3), 51.8 (*C*-1), 50.3 (*C*-2), 36.9 (*C*-2'), 32.1 (*C*-alkyl), 29.9 (*C*-alkyl), 29.9 (*C*-alkyl), 29.7 (*C*-alkyl), 29.5 (*C*-alkyl), 29.5 (*C*-alkyl), 29.4 (*C*-alkyl), 29.4 (*C*-alkyl), 29.3 (*C*-alkyl), 27.4 (*C*-8'), 27.3 (*C*-11'), 25.8 (*C*-3'), 22.8 (*C*-17'), 14.3 (*C*-18') ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M+H]⁺: 342.33665; gefunden: 342.33665.

MALDI: 338.365 (-OH-), 356.335 (+H⁺), 378.329 (+Na⁺), 394.320 (+K⁺)

(*R*)-3-azido-2-oleamidopropyl (*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **87**

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **76a** das (*R*)-3-azido-2-oleamidopropyl (*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **87**.



Ausbeute: 56 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₃₁H₄₇F₃N₄O₄ (596.74 g/mol)

R_f-Wert: 0.62 (Cy/EA, 2:1)

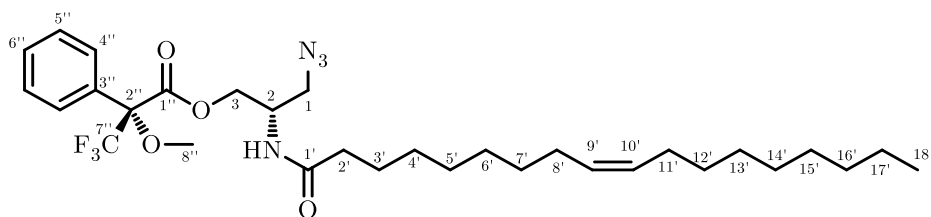
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.52-7.46 (m, 2H, Ar), 7.46-7.38 (m, 2H, Ar), 5.50 (m, 1 H, NH), 5.38-5.30 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.43-4.31 (m, 3H, H-2, H-3a/b), 3.54-3.53 (m, 3H, H-8'), 3.43 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1 H, H-1a), 3.38 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 5.5 Hz, 1 H, H-1b), 2.11 (dd, ³J = 8.2, 7.1 Hz, 2 H, H-2'), 2.03-1.98 (m, 4 H, H-8'/H-11'), 1.61-1.51 (m, 2H, H-3'), 1.37-1.20 (m, 20H, H-4' bis H-7', H-12' bis H-17'), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.0 (C-1'), 166.4 (C-1''), 132.0 (C-3''), 130.2 (C-9'/10'), 130.0 (C-6''), 129.8 (C-9'/10'), 128.8 (C-4''), 127.3 (C-5''), 122.0 (C-7''), 85.0 (C-2''), 64.5 (C-3), 55.6 (C-8''), 51.1 (C-1), 47.3 (C-2), 36.7 (C-2'), 32.0 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.2 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.5 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18') ppm.

¹⁹F-NMR (375 MHz, CDCl₃): δ = -71.3 (3F) ppm.

(S)-3-azido-2-oleamidopropyl (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat 88

Nach obiger Anleitung ergibt sich aus **76b** das (S)-3-azido-2-oleamidopropyl (R)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat **88**.



88

Ausbeute: 93 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

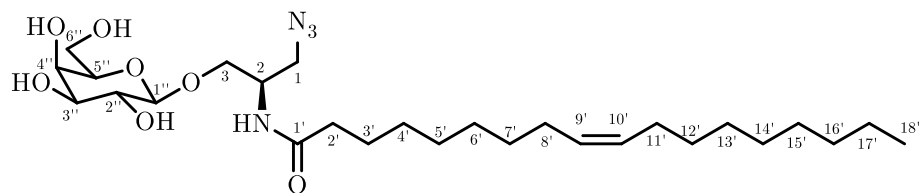
Summenformel: C₃₁H₄₇F₃N₄O₄ (596.74 g/mol)

R_f-Wert: 0.62 (Cy/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.51-7.46 (m, 2H, Ar), 7.46-7.39 (m, 2H, Ar), 5.56 (d, ³J = 8.4 Hz, 1 H, NH), 5.38-5.30 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.48 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H-3b), 4.43-4.35 (m, 1H, H-2), 4.27 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, H-3a), 3.53-3.50 (m, 3H, H-8'), 3.45 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1 H, H-1b), 3.38 (dd, ²J = 12.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1 H, H-1a), 2.13 (dd, ³J = 8.1, 7.1 Hz, 2 H, H-2'), 2.03-1.98 (m, 4 H, H-8'/H-11'), 1.61-1.51 (m, 2H, H-3'), 1.37-1.20 (m, 20H, H-4' bis H-7', H-12' bis H-17'), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.0 (C-1'), 166.4 (C-1''), 131.9 (C-3''), 130.2 (C-9'/10'), 130.1 (C-6''), 129.8 (C-9'/10'), 128.8 (C-4''), 127.5 (C-5''), 124.8 (C-7''), 84.7 (C-2''), 64.5 (C-3'), 55.6 (C-8''), 51.2 (C-1), 47.3 (C-2), 36.7 (C-2'), 32.0 (C-alkyl), 29.9 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 29.2 (C-alkyl), 27.4 (C-8'), 27.3 (C-11'), 25.5 (C-3'), 22.8 (C-17'), 14.3 (C-18') ppm.

¹⁹F-NMR (375 MHz, CDCl₃): δ = -71.4 (3F) ppm.

N-Oleoyl-1-1- β -galactosyl-3-azido-3-desoxyserinol 89a/b**89a/b**

76 (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Penta-O-acetyl- β -D-Galactose (1.20 Äq.) in trockenem DCM (150 ml pro mmol **76**) und unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (6.00 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde erst für 15 min bei 0 °C und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit NaCl-Lösung (75 ml pro mmol **76**) gewaschen und die wässrige Phase anschließend zweimal mit DCM (50 ml pro mmol **76**) extrahiert. Das Rohprodukt wurde zur Aufreinigung über Kieselgel filtriert (Cy/EA, 2:1).

Das Rohprodukt (1.00 Äq.) wurde anschließend in einer Mischung aus MeOH, NEt_3 , und H_2O für (2:1:1, 30 ml pro mmol **76**) 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde danach bei vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt ($\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}/\text{EA}$, 1:3:6).

Ausbeute: 6 % (über 2 Stufen) eines farblosen amorphen Feststoffes.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_7$ (542.72g/mol)

R_f-Wert: 0.38 (Cy/EA, 1:1)

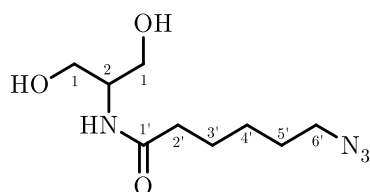
¹H-NMR: (600 MHz, MeOD): δ = 5.89 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.37-5.31 (m, 2H, H-9'/H-10'), 4.09-4.05 (m, 1H, H-2), 3.80 (ddd, 2J = 11.1 Hz, 3J = 4.5, 4.5 Hz, 1H, H-3b),

3.69 (ddd, $^2J = 11.1$ Hz, $^3J = 6.2, 4.8$ Hz, 1H, *H*-3a), 3.58 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, *H*-1a), 3.55 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 2H, *H*-1b), 2.32 (dd, $^3J = 6.0, 4.9$ Hz, 1H, *OH*), 2.21 (dd, $^3J = 7.7, 7.7$ Hz, 2H, *H*-2'), 2.02-1.99 (m, 4H, *H*-8'/*H*-11'), 1.64 (dddd, $^3J = 7.7, 7.5, 7.5, 6.9$ Hz, 2H, *H*3'), 1.36-1.23 (m, 20H, *H*-4' bis *H*-7', *H*-12' bis *H*-17'), 0.88 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, *H*-18') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 176.41$ (*C*1-a), 176.34 (*C*1-b), 130.87 (*C*-9 a/b), 130.80 (*C*-10a/b), 105.42 (*C*-1''-b), 105.20 (*C*-1''-a), 76.80 (*C*-5''a/b), 74.89 (*C*-3''a/b), 72.57 (*C*-2''b), 72.48 (*C*-2''a), 70.27 (*C*-4''b), 70.26 (*C*-4''a), 70.09 (*C*-6''b), 69.92 (*C*-6''a), 62.53 (*C*-1'a), 62.49 (*C*-1'b), 52.55 (*C*-3'b), 52.36 (*C*-3' α), 50.49 (*C*-2a), 50.45 (*C*-2'b), 37.12 (*C*-2b), 37.08 (*C*-2a), 33.05 (*C*-alkyl a/b), 30.83 (*C*-alkyl), 30.76 (*C*-alkyl), 30.72 (*C*-alkyl), 30.60 (*C*-alkyl a/b), 30.43 (*C*-alkyl a/b) (*C*-alkyl a/b), 30.36 (*C*-alkyl a/b), 30.33 (*C*-alkyl a/b), 30.31 (*C*-alkyl a/b), 30.23 (*C*-alkyl a/b), 30.15 (*C*-alkyl a/b) (*C*-alkyl a/b), 28.14 (*C*-8a/b), 28.12 (*C*-11a/b), 26.93 (*C*-3a/b), 23.73 (*C*-17a/b), 14.44 (*C*-18a/b),) ppm.;

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 565.35717; gefunden: 565.35694.

N-(6-Azido)-hexanoylserinol 100



100

Azidosäure **16** (1Äq.) wurde in DCM (1 mL pro mmol **16**) vorgelegt, bei 0°C nacheinander NEt₃ (2Äq.) und ClCO₂Et (2 Äq.) zugetropft und das Gemisch für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Serinol **73** (2 Äq.) zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter HCl- und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, die Phasen getrennt und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenfiltration über Kieselgel DCM/MeOH 50:1 gereinigt.

Ausbeute: 46 % einer farblosen Flüssigkeit.

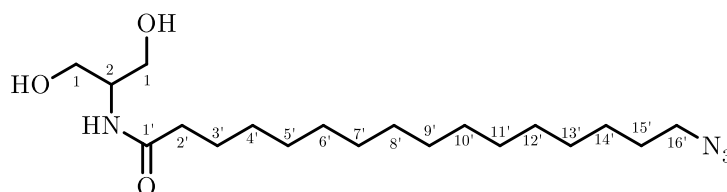
Summenformel: C₉H₁₈N₄O₃ (230.2 g/mol)

R_f-Wert: 0.08 (DCM/MeOH, 15:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.64 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 3.95-3.88 (m, 1H, H-2), 3.76 (dd, ²J = 11.2, ³J = 4.5 Hz, H-1a), 3.66 (dd, ²J = 11.2, ³J = 5.1 Hz, H-1b), 3.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 2H, H-6'), 2.14 (t, ³J = 7.5, 2H, H-2'), 1.69-1.56 (m, 4H, H-2'/H-5'), 1.44-1.34 (m, 2H, H-3') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.2 (C-1'), 62.4 (C-1), 52.6 (C-2), 51.3 (C-6'), 36.5 (C-2'), 28.7 (C-4'), 26.4 (C-5'), 25.2 (C-3') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+Na]⁺: 253.1271; gefunden: 253.1275.

N-(16-Azido)-hexadecanoylserinol 98**98**

Die Umsetzung von Serinol **73** mit der Azidosäure **27** nach der allgemeinen Synthesevorschrift D gab nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EA 5:1) *N*-(16-Azido)-hexadecanoylserinol **98**.

Ausbeute: 72 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

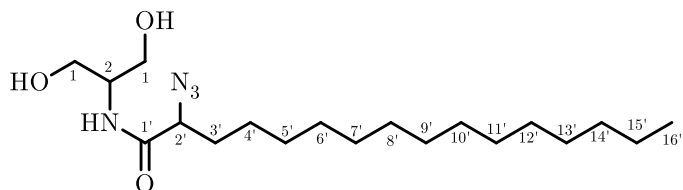
Summenformel: C₁₉H₃₈N₄O₃ (370.54 g/mol)

R_f-Wert: 0.86 (Cy/EA, 3:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.71 (d, ³*J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 3.80-3.76 (m, 1H, *H*-2), 3.65 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 4.5 Hz, *H*-1a), 3.53 (dd, ²*J* = 11.3, ³*J* = 5.3 Hz, *H*-1b), 3.22 (s, 2H, OH), 3.19 (t, ³*J* = 7.0 Hz, 2H, *H*-16'), 2.14 (dd, ³*J* = 8.1, 7.3 Hz, 2H, *H*-2'), 1.59-1.50 (m, 4H, *H*-2'/*H*-15'), 1.34-1.15 (m, 22H, *H*-3' bis *H*-14') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.8 (*C*-1'), 61.4 (*C*-1), 52.4 (*C*-2), 51.5 (*C*-16'), 36.6 (*C*-2'), 29.6 – 29.2 (10C, *C*-3'-*C*13'), 28.8 (*C*-14'), 26.7 (*C*-15'), 25.8 (*C*-3') ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M+Na]⁺: 393.2836; gefunden: 393.2847.

N-(2-Azido)-hexadecanoylserinol 99**81**

Die Umsetzung von Serinol **73** mit der Azidosäure **27** nach der allgemeinen Synthesevorschrift D gab nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cy/EA 1:1) *N*-(16-Azido)-hexadecanoylserinol **100**.

Ausbeute: 86 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

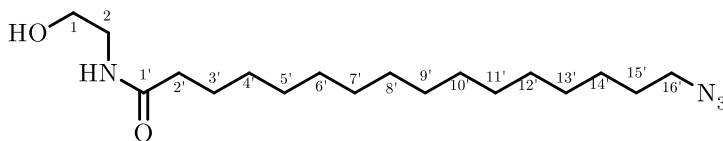
Summenformel: C₁₉H₃₈N₄O₃ (370.54 g/mol)

R_f-Wert: 0.59 (EA)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.07 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, NH), 3.99 (dd, ³J = 7.6, 4.6 Hz, 2H, H-2'), 3.99-3.92 (m, 1H, H-2), 3.85 (dt, ³J = 11.2, 4.2 Hz, H-1a/b), 3.76 (dt, ³J = 11.6, 4.8 Hz, H-1a/b), 2.73 (s, 2H, OH), 1.96-1.76 (m, 2H, H-3'), 1.45-1.25 (m, 22H, alkyl), 0.87 (t, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-18') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.8 (C-1'), 64.4.0 (C-2'), 62.9 (C-1), 52.5 (C-2), 34.4 (C-3'), 32.6 (C-14'), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.8 (C-alkyl), 29.7 (C-alkyl), 29.5 (C-alkyl), 29.3 (C-alkyl), 25.5 (C-alkyl), 25.5 (C-alkyl), 22.8 (C-alkyl), 14.3 (C-16') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+Na]⁺: 393.2836; gefunden: 393.2830.

16-Azido-N-(2-hydroxyethyl)hexadecansäureamid 101**101**

Die azidomodifizierte Carbonsäure **17** (1.00 Äq.) wurde in DCM vorgelegt, die Mischung auf 0 °C gekühlt, NEt₃ (2.00 Äq.) zugegeben und ClCO₂Et zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei RT für 2 h gerührt, auf 0 °C gekühlt und 2-Aminoethanol (2.00 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde destillativ bei vermindertem Druck eingengt, der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch (DCM/MeOH 100:1 -> 50:1) gereinigt.

Ausbeute: 24 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₁₈H₃₆N₄O₂ (340.51 g/mol)

R_f-Wert: 0.41 (DCM/MeOH 15:1)

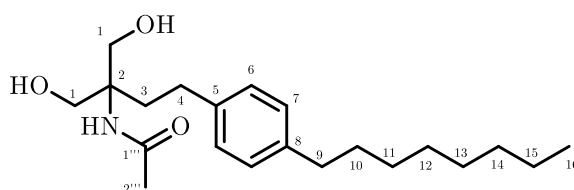
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.04 (t, ³J = 5.6 Hz, 1H, NH), 3.73-3.70 (m, 2H, H-1), 3.44-3.39 (m, 2H, H-2), 3.25 (t, ³J = 7.0 Hz, H-16'), 2.71 (s, 2H, OH), 2.20 (t, ³J = 7.8, 2H, H-2'), 1.67-1.45 (m, 4H, H-2'/H-15'), 1.40-1.19 (m, 22H, H-3' bis H-14') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.7 (C-1'), 62.7 (C-1), 51.6 (C-16'), 42.6 (C-2), 36.8 (C-2'), 29.8 – 29.3 (10C, C-3' bis C-13'), 29.0 (C-14'), 26.8 (C-15'), 25.9 (C-3') ppm.

HRMS-ESI (+): m/z : 363.2734 $[M+Na^+]$ berechnet für $C_{18}H_{36}N_4NaO_2^+$: 363.2730.

7.3.6 Synthese von Fingolimodderivaten

N-Acetyl Fingolimod **90**



90

Fingolimod-Hydrochlorid **72** (1.00 Äq.) wurde in $CHCl_3$ (35 ml pro mmol **72**) gelöst und gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung zugegeben (17 ml pro mmol **72**). Unter Rühren bei RT wurden 6.50 Äq. Ac_2O portionsweise zugegeben, der pH-Wert des Gemisches mit KOH auf 9 eingestellt und für 3.5 d gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die organische dreimal mit gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen (10 ml pro mmol **72**) und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde der Rückstand in Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 64 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: $C_{21}H_{35}NO_3$ (349.52 g/mol)

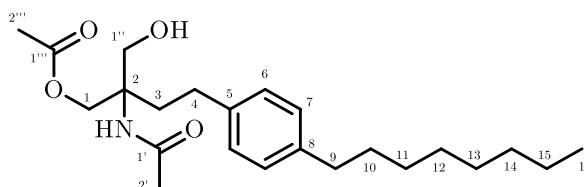
R_f-Wert: 0.67 (Wasser/Isopropanol/ Ethylacetat 1:3:6)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.13-7.09 (m, 4H, *H*-6/7), 5.88-5.83 (m, 1H, *NH*), 3.87 (d, ²*J* = 11.6 Hz, 2H, *H*-1a), 3.85 (s, 2H, *OH*), 3.62 (d, ²*J* = 11.8 Hz, 2H, *H*-1b), 2.65-2.59 (m, 2H, *H*-4), 2.58-2.53 (m, 2H, *H*-9), 1.98-1.93 (m, 2H, *H*-3), 1.93 (s, 3H, *H*-2'), 1.61-1.53 (m, 2H, *H*-10), 1.32-1.23 (m, 10H, *H*-11 bis *H*-15), 0.87 (t, ³*J* = 6.90 Hz, 3H, *H*-16) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.8 (*C*-1'), 141.1 (*C*-8), 138.6 (*C*-5), 128.9 (2C, *C*-7), 128.4 (2C, *C*-6), 66.1 (2C, *C*-1), 61.6 (*C*-2), 35.7 (*C*-9), 35.0 (*C*-3), 32.0 (*C*-14), 31.8 (*C*-10), 29.6 (*C*-11), 29.5, 29.4 (2C, *C*-12/13), 29.3 (*C*-4), 24.22 (*C*-2'), 22.9 (*C*-15), 14.3 (*C*-16) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M+H]⁺: 350.2690; gefunden: 350.2701.

rac N, O-Diacetyl Fingolimod **91**



91

Das Diol **90** wurde in THF gelöst (7 ml pro mmol **90**), Vinylacetat (5.25 ml pro mmol **90**) sowie Lipase (*c. Antarctica*, 175 mg pro mmol **90**) zugegeben und das Gemisch für 18 h bei RT unter Lichtausschluss geschüttelt (50 rpm). Nach Abfiltrieren des Enzyms wurden die Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt und das Produkt in Pentan umkristallisiert.

Ausbeute: 64 % eines farblosen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₂₃H₃₇NO₄ (391.55 g/mol)

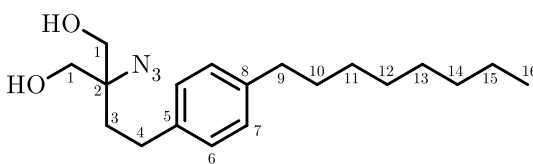
R_f-Wert: 0.54 (MeOH/DCM 1:15)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.11-7.09 (m, 4H, H-6/7), 5.72 (s, 1H, NH), 4.54 (s, 1H, OH), 4.39, 4.17 (d, 2H, ²J = 11.8 Hz, H-1), 3.77, 3.71 (d, ²J = 12.2 Hz, H-1''), 2.70-2.61, 2.59-2.50 (m, 2H, H-4), 2.58-2.53 (m, 2H, H-9), 2.16-2.08, 1.97-1.88 (m, 2H, H-3), 2.11 (s, 3H, H-2'), 1.94 (s, 3H, H-2'''), 1.63-1.52 (m, 2H, H-10), 1.34-1.22 (m, 10H, H-11 bis H-15), 0.87 (t, 3H, ³J = 6.9 Hz, H-16) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.5 (C-1'); 171.4 (C-1'''); 141.0 (C-8); 138.5 (C-5); 128.8 (2C, C-7); 128.4 (2C, C-6); 65.6 (2C, C-1/C1''); 61.0 (C-2); 35.7 (C-9); 34.7 (C-3); 32.1 (C-14); 31.8 (C-10); 29.6 (C-11); 29.5, 29.4 (2C, C-12/13); 29.3 (C-4); 24.2 (C-2'''); 22.8 (C-15); 21.0 (C-2'); 14.3 (C-16) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+Na]⁺: 414.2615; gefunden: 414.2630.

2-Azido-2-Desaminofingolimod 97



97

Nach Umsetzung von Fingolimod **72** nach der allgemeinen Synthesevorschrift A wurde der Rückstand in DCM aufgenommen wurde das Gemisch zweimal mit gesättigter

NaHCO₃-Lösung gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: quantitativ eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: C₁₉H₃₁N₃O₂ (333.48 g/mol)

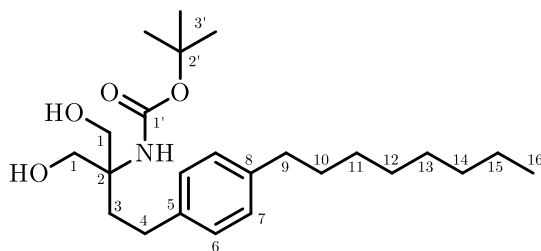
R_f-Wert: 0.45 (MeOH/DCM 1:15)

¹H-NMR: (600 MHz, MeOD): δ = 7.14-7.09 (m, 4H, *H*-6/7), 3.78 (dd, 4H, $^3J = 4.0$ Hz, $^2J = 11.7$ Hz, *H*-1), 2.71-2.64 (m, 2H, *H*-4), 2.60-2.54 (m, 2H, *H*-9), 2.03 (d, 2H, $^3J = 4.2$ Hz, OH), 1.92-1.88 (m, 2H, *H*-3), 1.63-1.53 (m, 2H, *H*-10), 1.35-1.21 (m, 10H, *H*-11 bis *H*-15), 0.88 (t, 3H, $^3J = 6.6$ Hz, *H*-16) ppm.

¹³C-NMR: (150 MHz, MeOD): δ = 141.1 (*C*-8), 138.5 (*C*-5), 128.8 (2C, *C*-7), 128.3 (2C, *C*-6), 67.0 (*C*-2), 66.0 (2C, *C*-1), 35.7 (*C*-9), 34.2 (*C*-3), 32.0, 29.6, 29.4, 22.8 (4C, *C*-12 bis *C*-15), 31.7 (*C*-10), 29.5 (*C*-11), 29.4 (*C*-4), 14.2 (*C*-16) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + Na]⁺: 356.2308; gefunden: 356.2315.

N-Boc-Fingolimod 93



93

Fingolimod-Hydrochlorid **72** (1.00 Äq.) wurde in MeOH gelöst (10 ml pro mmol **72**) und NEt_3 (2.00 Äq.) zugegeben und das Gemisch bei RT für 30 min gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C Boc_2O zugegeben und das Gemisch für 42 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand per Säulenfiltration über Kieselgel (MeOH/DCM 1:15) gereinigt.

Ausbeute: 80 % eines farblosen Feststoffes.

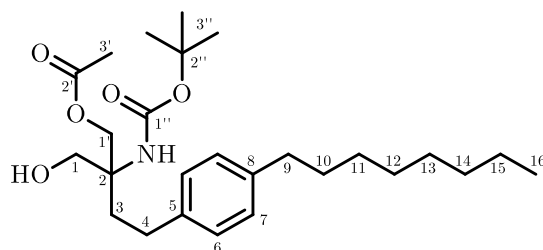
Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_4$ (407.60 g/mol)

R_f-Wert: 0.57 (MeOH/DCM 1:15)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.11\text{-}7.07$ (m, 4H, *H*-7/6), 4.99 (s, 1H, *NH*), 3.89 (d, 2H, 2 *J* = 11.49 Hz, *H*-1a), 3.64 (d, 2H, 2 *J* = 11.49 Hz, *H*-1b), 3.34 (s, 2H, *OH*), 2.62-2.57 (m, 2H, *H*-4), 2.57-2.53 (m, 2H, *H*-9), 1.90-1.84 (m, 2H, *H*-3), 1.62-1.53 (m, 2H, *H*-10), 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.33-1.22 (m, 5H, *H*-11 bis *H*-15), 0.87 (t, 3H, ³*J* = 6.76 Hz, *H*-16) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.8$ (*C*-1'), 141.9 (*C*-8), 138.9 (*C*-5), 128.7 (2C, *C*-6), 128.3 (2C, *C*-7), 80.6 (*C*-2'), 66.8 (2C, *C*-1), 59.5 (*C*-2), 35.7 (*C*-9), 35.6 (*C*-3), 32.1 (*C*-14), 31.7 (*C*-10), 29.6 (*C*-11), 29.5 (*C*-12), 29.4 (*C*-13), 29.2 (*C*-4), 28.5 (3C, *C*-1'), 22.8 (*C*-15), 14.3 (*C*-16) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 430.2928; gefunden: 430.2926.

rac N-Boc-O-Acetylfingolimod **94****94**

Das Diol **93** (1.00 Äq.) wurde in trockenem THF (7 ml pro mmol **93**) gelöst, 1.00 Äq. NEt₃ zugegeben und Ac₂O (1.00 Äq.) als 0.5 molare Lösung in THF innerhalb von 5 h zugetropft. Das Gemisch wurde weitere 15 h bei RT gerührt, H₂O sowie DCM (jeweils 25 ml pro mmol **93**) zugegeben und das Gemisch für 10 min gerührt. Die Phasen wurden separiert, die wässrige zweimal mit DCM (jeweils 12 ml pro mmol **93**) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (MeOH/DCM 1:50) gereinigt.

Ausbeute: 70 % eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₆H₄₃NO₅ (449.63 g/mol)

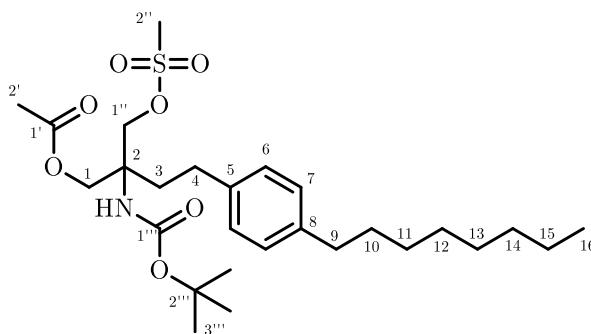
R_f-Wert: 0.67 (MeOH/DCM 1:50)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.11-7.09 (m, 4H, *H*-6/7), 4.85 (s, 1H, NH), 4.34 (d, 1H, ²*J* = 11.4 Hz, *H*-1'a), 4.16 (d, 1H, ²*J* = 11.4 Hz, 1'b), 3.88 (s, 1H, OH), 3.74 (dd, 1H, ³*J* = 6.8 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, *H*-1a), 3.68 (dd, 1H, ³*J* = 6.8 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, *H*-1b), 2.68-2.48 (m, 2H, *H*-4), 2.58-2.53 (m, 2H, *H*-9), 2.11 (s, 3H, *H*-3'), 2.11-2.02 (m, 1H, *H*-

3a), 1.92-1.83 (ddd, 1H, $^3J = 12.1$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, $H-3b$), 1.63-1.53 (m, 2H, $H-10$), 1.45 (s, 9H, $H-3''$), 1.33-1.23 (m, 10H, $H-11-15$), 0.87 (t, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, $H-16$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.4$ ($C-2'$), 155.9 ($C-1''$), 140.8 ($C-8$), 138.8 ($C-5$), 128.7 (2C, $C-7$), 128.3 (2C, $C-6$), 65.4 (3C, $C-1/1'/2''$), 58.8 ($C-2$), 35.7 ($C-9$), 35.0 ($C-3$), 32.0 ($C-14$), 31.7 ($C-10$), 29.6, 29.5, 29.4 ($C-11-13$), 29.3 ($C-4$), 28.5 (3C, $C-3''$), 22.8 ($C-15$), 21.5 ($C-3'$), 14.3 ($C-16$) ppm.

***rac* N-Boc-O-acetyl-O-mesitylfingolimod 95'**



95

Der Alkohol **94** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit NEt_3 (2.00 Äq.) in DCM (7.00 mL per mmol **84**) gelöst und bei 0 °C MsCl (1.20 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h im Eisbad gerührt, über Kieselgel filtriert, mit Cy/EA 1:1 nachgewaschen und das Lösungsmittelgemisch des Filtrates destillativ bei reduziertem Druck entfernt. Nach Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

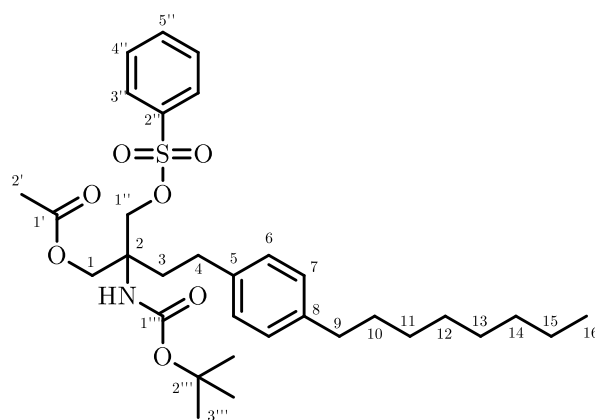
Ausbeute: quantitativ eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₇H₄₅NO₇S (527.72 g/mol)

R_f-Wert: 0.42 (Cy/EA, 2:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.13-7.05 (m, 4H, H-6/7), 4.78 (s, 1H, NH), 4.47 (d, ²J = 9.7 Hz, H-1a), 4.43 (d, ²J = 9.7 Hz, H-1b), 4.29 (d, ²J = 11.5 Hz, H-1''a), 4.24 (d, ²J = 11.5 Hz, H-1''b), 3.67 (s, 3H, H-2''), 2.69-2.51 (m, 4H, H-3/4), 2.23-2.09 (m, 2H, H-9), 2.1 (s, 3H, H-2'), 1.63-1.51 (m, 2H, H-10), 1.45 (s, 9H, H-3'''), 1.37-1.17 (m, 10H, H-11 bis H-15), 0-87 (t, ²J = 6.9 Hz, 3H, H16) ppm.

N-Boc-O-acetyl-O-tosylfingolimod 95''



95Tos

Der Alkohol **94** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit NEt₃ (2.00 Äq.) in DCM (7.00 mL per mmol **84**) gelöst und bei 0 °C TosCl (1.50 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min im Eisbad und über Nacht bei Raumtempertur gerührt, über Kieselgel filtriert, mit Cy/EA 1:1 nachgewaschen und das Lösungsmittelgemisch des

Filtrates destillativ bei reduziertem Druck entfernt. Nach Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: quantitativ eines farblosen Öls.

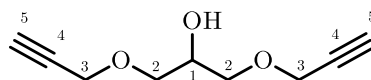
Summenformel: $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{NO}_7\text{S}$ (589.79g/mol)

R_f-Wert: 0.50 (Cy/EA, 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.96\text{-}7.88$ (m, 2H, $H\text{-}4''$), $7.45\text{-}7.36$ (m, 2H, $H\text{-}3''$), $7.14\text{-}7.03$ (m, 4H, $H\text{-}6/7$), 4.88 (s, 1H, NH), 4.34 (d, $^2J = 11.3$ Hz, $H\text{-}1a$), 4.17 (d, $^2J = 11.3$ Hz, $H\text{-}1b$), $3.77\text{-}3.66$ (m, 2H, $H\text{-}1''$), $2.67\text{-}2.50$ (m, 4H, $H\text{-}3/4$), 2.49 (s, 3H, $H\text{-}6''$), 2.1 (s, 3H, $H\text{-}2'$), $1.63\text{-}1.52$ (m, 2H, $H\text{-}10$), 1.45 (s, 9H, $H\text{-}3'''$), $2.01\text{-}1.63$ (m, 2H, $H\text{-}9$), $1.37\text{-}1.19$ (m, 10H, $H\text{-}11$ bis $H\text{-}15$), 0.87 (t, $^2J = 6.9$ Hz, 3H, $H\text{-}16$) ppm.

7.3.7 Synthese des multivalenten Linkers

1,3-bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-ol **104**



104

1,3-Dichlorpropan-2-ol **103** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Propargylalkohol (6.00 Äq.) sowie TBAB (1.00 Äq.) in DCM gelöst und bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zusammen mit einer Lösung von NaOH (6.00 Äq.) in H_2O (0.7 ml pro mmol **103**) für 2 h heftig gerührt. Anschließend wurde das Gemisch für 42 h bei RT gerührt, H_2O zugegeben (1.5 ml pro

mmol **103**) und dreimal mit DCM extrahiert (jeweils 0.5 ml pro mmol **103**). Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cy/EA 2:1).

Ausbeute: 84 % einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₉H₁₂O₃ (191.19 g/mol)

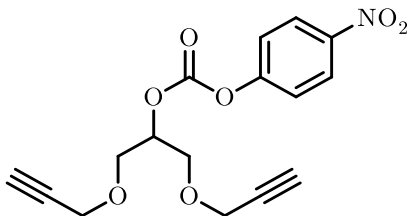
R_f-Wert: 0.38 (Cy/EA, 1:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.20 (d, ⁴J = 2.4, Hz, 4H, *H*-3), 4.00 (dtt, ³J = 4.3, 6.3, 4.3 Hz, 1H, *H*-1), 3.64 (dd, ²J = 9.7, ³J = 4.3 Hz, 2H, *H*-2b), 3.56 (dd, ²J = 9.7, ³J = 6.3 Hz, 2H, *H*-2a), 2.48 (d, ³J = 4.4 Hz, 1H, OH), 2.45 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 2H, *H*-5) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 79.5 (*C*-4), 75.0 (*C*-5), 71.1 (*C*-2), 69.5 (*C*-1), 58.8 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [M + H]⁺: 191.06787; gefunden: 191.06745

1,3-Bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-yl (4-nitrophenyl) carbonat **106**



106

Das Dialkin **104** (1.00 Äq.) wurde zusammen mit Molsieb (4 Å) in trockenem DCM (15 mL pro mmol **104**) für 20 min gerührt, anschließend Pyridin zugegeben (0.1 mL pro mmol **104**) und die Mischung bei 0 °C portionsweise zu einer Lösung von 4-Nitrophenylchloroformat (1.50 Äq.) in trockenem DCM (3 ml pro mmol **104**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 5 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser (5 ml pro mmol **104**) wurden die Phasen getrennt und die wässrige mit Et₂O extrahiert (dreimal mit je 5 ml pro mmol **104**). Die organischen Phasen wurden vereint und nacheinander mit jeweils gesättigter NH₄Cl-, NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, die Phasen getrennt und über NaSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt

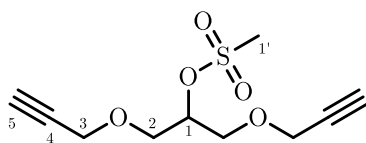
Ausbeute: 23 % einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₆H₁₅NO₇ (333.30 g/mol)

R_f-Wert: 0.19 (Cy/EA, 6:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.31.-8.25 (m, 2H, *H*-4'), 7.44-7.38 (m, 2H, *H*-3'), 5.15 (tt, ³*J* = 5.8, 4.2 Hz, 1H, *H*-1), 4.23 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 4H, *H*-3), 3.84 (dd, ²*J* = 10.8, ²*J* = 4.2 Hz, 2H, *H*-2a), 3.80 (dd, ²*J* = 10.8, ³*J* = 5.9 Hz, 2H, *H*-2b), 2.48 (t, ⁴*J* = 2.38 Hz, 1H, *H*-1) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 155.6 (*C*-5'), 152.2 (*C*-1'), 145.5 (*C*-2'), 125.4 (*C*-4'), 21.9 (*C*-3'), 79.1 (*C*-4), 76.9 (*C*-1), 75.4 (*C*-5), 68.1 (*C*-2), 58.8 (*C*-3) ppm.

1,3-Bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-yl methanesulfonat 105**105**

Das Dialkin **104** (1.00 Äq.) wurde in DCM (0.5 ml pro mmol **104**) gelöst, NEt_3 (1.25 Äq.) zugegeben und bei 0 °C MsCl (1.50 Äq.) zugetropft. Das Gemisch wurde für 3 h bei RT gerührt und anschließend nacheinander mit 1.5 M HCl -Lösung sowie mit gesättigter NaCl -Lösung (jeweils 7 mL pro mmol **104**) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: quantitativ einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$ (269.28 g/mol)

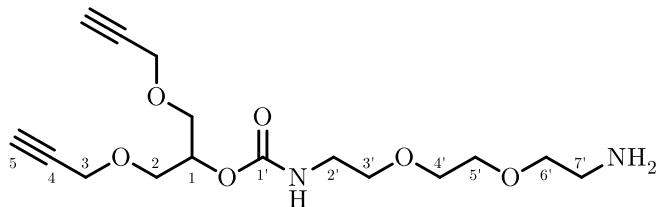
R_f -Wert: 0.38 (Cy/EA, 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.90$ (tt, $^3J = 5.21, 4.99$, 1H, $H-1$), 4.20 (dd, $^3J = 2.3, ^4J = 2.4$, 4H, $H-3$), 3.78 (dd, $^3J = 5.28, ^3J = 4.92$ Hz, 2H, $H-2$), 3.10 (s, 3H, $H-1'$), 2.45 (t, $^4J = 2.4$ Hz, 2H, $H-5$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 79.2$ ($C-4$), 75.0 ($C-5$), 70.8 ($C-1$), 68.2 ($C-2$), 58.8 ($C-3$), 57.3 ($C-1'$) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 269.0460; gefunden: 269.0460.

1,3-Bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-yl-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbammat 109



109

Das *N*-Boc-geschützte Dialkin **108** wurde in DCM gelöst (5 mL pro mmol **108**), und bei 0 °C eine 50%ige Lösung von TFA in DCM (2.5 ml pro mmol **108**) zugetropft. Die Mischung wurde bei RT 4 h gerührt und anschließend dreimal mit 1 M KOH-Lösung gewaschen (jeweils 5 ml pro mmol **108**). Die Phasen wurden getrennt und das Lösungsmittel der organischen Phase destillativ bei reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 20:1 mit 1 % NEt₃).

Ausbeute: 29 % eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: C₁₆H₂₇N₂O₆ (342.39 g/mol)

R_F-Wert: 0.25 (DCM/MeOH, 10:1)

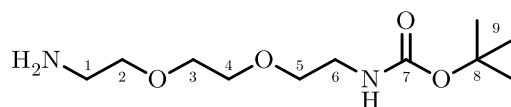
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.50 (t, ³J = 5.0, 1H, CONH), 5.05 (tt, ³J = 5.2, 4.6, 1H, *H*-1), 4.19 (dd, ⁴J = 2.4, ⁴J = 0.4 Hz, 4H, *H*-3), 3.73 (dd, ²J = 10.4, ³J = 4.6 Hz, 2H, *H*-2a), 3.72 (dd, ²J = 10.4, ³J = 5.2 Hz, 2H, *H*-2b), 3.63-3.60 (m, 4H, *H*-4'/5'), 3.56 (dd, ³J = 5.2, 4.7 Hz, 2H, *H*-6'), 3.52 (dd, ³J = 5.2, 4.7 Hz, 2H, *H*-7'), 3.40 (ddd,

$^3J = 5.5, 5.0, 5.0$ Hz, 2H, $H-2'$), 2.88 (dd, $^3J = 5.5, 5.0$ Hz, 2H, $H-3'$), 2.44 (t, $^4J = 2.4$ Hz, 2H, $H-5$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.0$ ($C-1'$), 79.5 ($C-4$), 74.9 ($C-5$), 73.7 ($C-7'$), 71.6 ($C-1$), 70.5, 70.3 ($C-4'/5'$), 70.1 ($C-6'$), 68.7 ($C-2$), 58.7 ($C-3$), 41.9 ($C-3'$), 41.0 ($C-2'$) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 343.1864; gefunden: 343.1864.

tert-Butyl-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate **107**



107

1,8-Diamino-3,6-dioxooctan **110** (3.00 Äq.) wurde zusammen mit DIPEA (1.00 Äq.) in DCM gelöst (1.5 ml pro mmol **110**) und anschließend bei RT eine Lösung von Boc_2O (1.00 Äq.) in DCM (1.5 mL pro mmol **110**) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtempertur gerührt und das Lösungsmittel anschließend destillativ entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 10:1 mit 1 % NEt_3).

Ausbeute: 84 % eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ (248.32 g/mol)

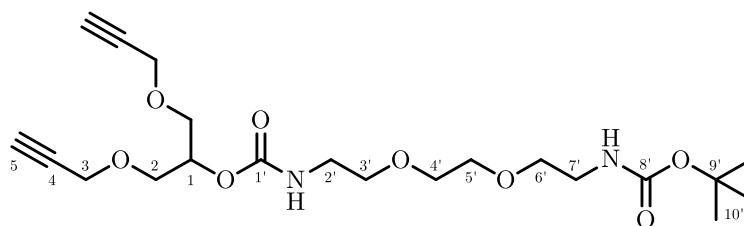
R_f -Wert: 0.64 (DCM/MeOH 10:1 mit 1 % NEt_3)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.14 (t, ³J = 4.2 Hz, 1H, CONH), 3.64-3.60 (m, 4H, H-3,4), 3.57-3.50 (m, 4H, H-5/6), 3.32 (dd, ³J = 10.3 Hz, ³J = 5.6 Hz, 2H, H-2), 2.88 (dt, ²J = 10.6 Hz, ³J = 5.6 Hz, 2H, H-1), 1.44 (s, 9H, H-7) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 156 (C-7), 79.2 (C-8), 73.5 (C-3,4), 70.2 (C-5,6), 41.8 (C-1), 40.3 (C-2), 28.4 (C-9) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+H]⁺: 249.1809; gefunden: 249.1810.

1,3-Bis(prop-2-yn-1-yloxy)propan-2-yl (2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-yl)carbammat 108



108

Das einfach geschützte Amin **107** (1.00 Äq.) wurde mit NEt₃ (1.10 Äq.) in DMF (4 ml pro mmol **107**) gelöst und der Nitrophenolester **106** (1.00 Äq.) zugegeben. Die Mischung wurde für 16 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck destillativ entfernt, der Rückstand mit H₂O (2 ml pro mmol **107**) aufgenommen und viermal mit DCM extrahiert (jeweils 1 ml pro mmol **107**). Die organischen Phasen wurden vereint, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck destillativ entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cy/EA 2:1).

Ausbeute: 91 % einer farblosen, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₂₁H₃₄N₂O₈ (465.51 g/mol)

R_f-Wert: 0.64 (DCM/MeOH, 10:1)

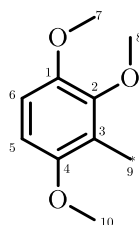
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.4 (t, 1H, N-H), 5.06 (tt, ³J = 5.2, ³J = 4.9, 1H, H-1), 5.06 (m, 1H, N-H (Boc)), 4.19 (dd, ⁴J = 2.4, ⁴J = 0.4 Hz, 4H, H-3), 3.71 (dd, ²J = 10.4, ³J = 4.9 Hz, 4H, H-2), 3.60 (m, 4H, H-4'/5'), 3.55 (m, 2H, H-6'/7'), 3.39 (ddd, 3J = 5.6, 5.5, 5.2 Hz, 2H, H-2'), 3.33 (dd, 3J = 5.3, 5.0 Hz, 2H, H-3'), 2.44 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 2H, H-5), 1.45 (s, 9H, H-8') ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 156.0 (C-1'), 79.5 (C-4), 74.9 (C-5), 73.7 (C-7'), 71.6 (C-1), 70.5, 70.3 (C-4'/5'), 70.1 (C-6'), 68.7 (C-3), 58.7 (C-3), 41.9 (C-3'), 41.0 (C-2') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für [M+Na]⁺: 465.2207; gefunden: 465.2219.

7.3.8 Synthese des Isotopenmarkierten Benchinonderivates

1,2,4-Trimethoxy-3-methylbenzol 113



113

1,2,4-Trimethoxybenzol **112** (1.00 Äq.) wurde in trockenem THF (1.5 0ml pro mmol **112**) vorgelegt und unter Rühren bei -78 °C langsam eine 2.5 M Lösung von *n*-Buli in THF zugetropft (1.25 Äq.). Die Mischung wurde für 1 h bei RT gerührt, wieder auf -78 °C gekühlt und ¹³C-makiertes Methyljodid (1.20 Äq) langsam zugetropft. Das Gemisch wurde 2 h bei -78 °C gerührt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach Stoppen der Reaktion mit gesättigter NH₄Cl-Lösung (1.00 ml pro mmol **112**) wurde das Gemisch mit Et₂O extrahiert (dreimal mit je 1.25 ml pro mmol **112**), die organischen Phasen vereint, mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (je 1.00 ml pro mmol **112**) und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei reduziertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cy/EA 8:1).

Ausbeute: 85 % einer leicht gelben, hoch viskosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₉¹³CH₁₄O₃ (183,21 g/mol)

R_f-Wert: 0.58 (Cy/ EA 4:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.70 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, *H*-6), 6.54 (dd, ³J = 8.9, ⁴J_{CH} = 1.2 Hz, 1H, *H*-5), 3.82 (s, 3H, *H*-7), 3.79 (s, 3H, *H*-8), 3.78 (s, 3H, *H*-10), 2.15 (d, ¹J_{CH} = 128.4 Hz, 3H, *H*-9) ppm.

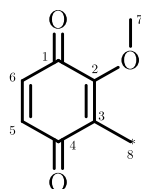
¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 152.6 (1C, *C*-4), 148.2 (1C, *C*-2), 147.3, (d, ³J_{C-C} = 2.5 Hz, 1C, *C*-1), 121.3 (d, ¹J_{C-C} = 44.5 Hz, 1C, *C*-3), 109.3 (s, 1C, *C*-6), 105.3 (d, ³J_{C-C} = 2.5 Hz, 1C, *C*-5), 60.5 (1C, *C*-8), 56.3 (1C, *C*-7), 56.0 (1C, *C*-10), 8.1 (d/s, ¹J_{C-C} = 44.5 Hz, 1C, *C*-9) ppm.

HRMS-ESI (+): 184.1049 [M+H⁺] berechnet für C₉H₁₅O₃¹³C⁺: 184.1049.

Nicht isotopenmarkiert:

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.70$ (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-6), 6.54 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-5), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.16 (s, 3H, H₉) ppm.

2-Methoxy-3-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dion **111**



111

1,2,4-Trimethoxy-3-methylbenzol **113** (1.00 Äq.) wurde in einer Mischung aus H₂O (4 ml pro mmol **113**) und MeOH (1.25 ml pro mmol **113**) vorgelegt und unter Rühren PhI(OAc)₂ (1.50 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 5 h gerührt und anschließend mit Et₂O extrahiert (dreimal mit je 3 ml pro mmol **113**). Die organischen Phasen wurden vereint und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (jeweils mit je 1 ml pro mmol 1,2,4-Trimethoxy-3-methylbenzol). Nach Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wurde das Lösungsmittelgemisch bei reduziertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand über Kieselgel gereinigt (Pentan/Et₂O, 10:1).

Ausbeute: 25 % eines orangefarbenen, amorphen Feststoffes.

Summenformel: C₇¹³CH₈O₃ (153.14 g/mol)

R_f-Wert: 0.30 (Cy/EA, 8:1,)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.68 (dd, ³*J* = 10.0, ⁴*J*_{CH} = 1.1 Hz, 1H, *H*-5), 6.59 (d, ³*J* = 10.0 Hz, 1H, *H*-5), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 1.94 (d, ¹*J*_{CH} = 130.1 Hz, 3H, *H*-8) ppm.

HRMS-ESI (+): *m/z*: 195.0842 [M+CH₃CN+H⁺] berechnet für C₉H₁₂NO₃¹³C⁺: 195.0845

Nicht isotopenmarkiert

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.62 (dd, ³*J* = 10.0, ⁴*J*_{CH} = 1.1 Hz, 1H, *H*-5), 6.53 (d, ³*J* = 10.0 Hz, 1H, *H*-5), 4.96 (s, 3H, OCH₃), 1.89 (s, 3H, *H*-8) ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ = 186.4 (1C, C=O), 181.4 (1C, C=O), 153.8 (1C, C-2), 134.5 (1C, C-H), 132.8 (1C, C-H), 127.2 (d, ¹*J*_{CC} = 45.1 Hz, 1C, C-3), 59.0 (1C, C-7), 6.8 (1C, C-8) ppm.

8 Abkürzungen und Akronyme

Ac	Acetyl
Äq	Äquivalent
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
bzw.	beziehungsweise
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cy	Cyclohexan
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	Destilliert
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid
ESI	Elektronenspray-Ionisation

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und weitere)
Et	Ethyl
ges.	gesättigt
h	Stunde
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
M	mol/l
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
Me	Methyl
MeOD	[d ₄]-Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
Ms	Methansulfonylchlorid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Pufferlösung)
PCC	Pyridiniumchlorochromat
Ph	Phenyl
ppm.	<i>parts per million</i>

quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
S-MTPA	α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, Moshersäure
SPAAC	<i>strain promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
SPT	Serinpalmitoyltransferase
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	tert-Butyldimethylsilyl
TCEP	Tris-(2-chlorethyl)-phosphat
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tos	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Tr	Triphenylmethyl
wässr.	wässrig
WIE	Wasser/Isopropanol/Ethylacetat
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen in NMR-Spektren

δ	chemische Verschiebung
s	Singulett
d	Dublett
t	Triplett
m	Multiplett
J	Kopplungskonstante

9 Literaturverzeichnis

- [1] A. Fleming, *British Journal of Experimental Pathology* **1929** *10*, 226-236.
- [2] J. O'Neill, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, *Review on Antimicrobial Resistance*, **2016**.
- [3] M. de Kraker, A. Stewardson, S. Harbarth, *PLoS medicine* **2016**, *13*, e1002184.
- [4] World Health Organization, *Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*, Genf, **2017** (WHO/EMP/IAU/2017.11).
- [5] World Health Organization, *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.*, Genf, **2017** WHO/EMP/IAU/2017.12).
- [6] Gesundheitsminister der G20-Staaten, *Berliner Erklärung der G20 Gesundheitsministerinnen und -minister: Gemeinsam Gesundheit global gestalten*, Berlin, **2017**
- [7] R. Diel, S. Rutz, S. Castell, T. Schaberg, *European Respiratory Journal* **2012**, *40*, 143-151.
- [8] World Bank, *Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future*, Washington, DC, **2017**
- [9] K. Miazek, S. Lebecque, M. Hamaidia, A. Paul, S. Danthine, L. Willems, M. Frederich, E. De Pauw, M. Deleu, A. Richel, *BASE* **2016**.
- [10] Y. Zeidan, Y. Hannun, *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 327-336.
- [11] K. Sambanthamoorthy, X. Feng, R. Patel, S. Patel, C. Parnavitana, *BMC microbiology* **2014**, *14*, 197.
- [12] Y. Hannun, L. Obeid, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 139-150.
- [13] S. Pruet, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C. Haynes, M. C. Sullards, D. Liotta, A. Merrill, *Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 1621-1639.
- [14] O. Renkonen, E. Hirvisalo, *Journal of Lipid Research* **1969**, *10*, 687-693.
- [15] M. Stewart, D. Downing, *Journal of investigative dermatology* **1995**, *105*, 613-618.
- [16] M. Stewart, D. Downing, *Journal of Lipid Research* **1999**, *40*, 1434-1439.
- [17] A. Merrill, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6387-6422.

- [18] O. Quehenberger, A. Armando, A. Brown, S. Milne, D. Myers, A. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. Jones, S. Kelly, R. Shaner, *Journal of Lipid Research* **2010**, *51*, 3299-3305.
- [19] K. Feingold, *Journal of Lipid Research* **2007**, *48*, 2531-2546.
- [20] P. Wertz, M. Miethke, S. Long, J. Strauss, D. Downing, *Journal of investigative dermatology* **1985**, *84*, 410-412.
- [21] J. van Smeden, W. Boiten, T. Hankemeier, R. Rissmann, J. Bouwstra, R. Vreeken, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841*, 70-79.
- [22] B. Breiden, K. Sandhoff, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841*, 441-452.
- [23] M. Rabionet, A. Bayerle, C. Marsching, R. Jennemann, H.-J. Gröne, Y. Yildiz, D. Wachten, W. Shaw, J. Shayman, R. Sandhoff, *Journal of Lipid Research* **2013**, *54*, 3312-3321.
- [24] K. Robson, M. Stewart, S. Michelsen, N. Lazo, D. Downing, *Journal of Lipid Research* **1994**, *35*, 2060-2068.
- [25] G. Martin, R. Boudreau, C. Couch, K. A. Becker, M. Edwards, C. Caldwell, E. Gulbins, A. Seitz, *Biochimie* **2017**.
- [26] S. Lee, S. Jeong, S. Ahn, *Yonsei medical journal* **2006**, *47*, 293-306.
- [27] Y. Hannun, R. Bell, *Science* **1989**, *243*, 500-507.
- [28] S. Morad, M. Cabot, *Nature Reviews Cancer* **2013**, *13*, 51-65.
- [29] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, *Nature* **2003**, *426*, 803.
- [30] T. Wennekes, R. van den Berg, R. Boot, G. van der Marel, H. Overkleeft, J. Aerts, *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, *48*, 8848-8869.
- [31] T. Yamaji, K. Hanada, *Traffic* **2015**, *16*, 101-122.
- [32] D. Lynch, T. Dunn, *New Phytologist* **2004**, *161*, 677-702.
- [33] L. Obeid, C. Linardic, L. Karolak, Y. Hannun, *Science* **1993**, *259*, 1769-1771.
- [34] M. Venable, J. Lee, M. Smyth, A. Bielawska, L. Obeid, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 30701-30708.
- [35] E. Smith, A. Merrill Jr, L. Obeid, Y. Hannun, *Methods in Enzymology* **2000**, *312*, 361-373.
- [36] C. Chalfant, S. Spiegel, *Journal of cell science* **2005**, *118*, 4605-4612.

-
- [37] S. Mitsutake, T.-J. Kim, Y. Inagaki, M. Kato, T. Yamashita, Y. Igarashi, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 17570-17577.
- [38] V. Hinkovska-Galcheva, L. Boxer, A. Kindzelskii, M. Hiraoka, A. Abe, S. Goparju, S. Spiegel, H. Petty, J. Shayman, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 26612-26621.
- [39] T. Hla, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2004**, *15*, 513-520.
- [40] H. Chen, A. Chan, D. Stone, N. Mandal, *Survey of ophthalmology* **2014**, *59*, 64-76.
- [41] R. Goggel, S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. Slutsky, S. Schutze, *Nature medicine* **2004**, *10*, 155-161.
- [42] F. Goñi, L.-R. Montes, A. Alonso, *Progress in Lipid Research* **2012**, *51*, 238-266.
- [43] E. Hertervig, Å. Nilsson, J. Björk, R. Hultkrantz, R.-D. Duan, *British journal of cancer* **1999**, *81*, 232.
- [44] E. Hertervig, Å. Nilsson, L. Nyberg, R. D. Duan, *Cancer* **1997**, *79*, 448-453.
- [45] M. Zumbansen, W. Stoffel, *Molecular and cellular biology* **2002**, *22*, 3633-3638.
- [46] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 3638-3643.
- [47] C. Arenz, A. Giannis, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 1440-1442.
- [48] Å. Nilsson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1969**, *176*, 339-347.
- [49] D. Newrzella, W. Stoffel, *Biological chemistry Hoppe-Seyler* **1992**, *373*, 1233-1238.
- [50] M. Kölzer, C. Arenz, K. Ferlinz, N. Werth, H. Schulze, R. Klingenstein, K. Sandhoff, *Biological chemistry* **2003**, *384*, 1293-1298.
- [51] A. G. Roth, S. Redmer, C. Arenz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2367-2374.
- [52] S. Schissel, E. Schuchman, K. Williams, I. Tabas, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 18431-18436.
- [53] A. Roth, D. Drescher, Y. Yang, S. Redmer, S. Uhlig, C. Arenz, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7560-7563.
- [54] H. Van Overloop, G. Van der Hoeven, P. Van Veldhoven, *Journal of Lipid Research* **2005**, *46*, 812-816.
- [55] T. Taketomi, N. Kawamura, *The Journal of Biochemistry* **1972**, *72*, 189-193.
- [56] P. Garner, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 5855-5858.
- [57] X. Liang, J. Andersch, M. Bols, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **2001**, 2136-2157.
-

- [58] P. Garner, J. Park, E. Malecki, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 4395-4398.
- [59] R. Benkeser, G. Schroll, D. Sauve, *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 3378-3379.
- [60] S. Torszell, P. Somfai, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 1643-1646.
- [61] A. Rai, A. Basu, *Organic Letters* **2004**, *6*, 2861-2863.
- [62] H. Yang, L. Liebeskind, *Organic Letters* **2007**, *9*, 2993-2995.
- [63] T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Organic Letters* **2006**, *8*, 5569-5572.
- [64] L. Liebeskind, J. Srogl, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 11260-11261.
- [65] J. Schneider, H. Andrea, J. Blom, S. Jaenicke, C. Rückert, C. Schorsch, R. Szczepanowski, M. Farwick, A. Goesmann, A. Pühler, *Eukaryotic cell* **2012**, *11*, 1582-1583.
- [66] R. van den Berg, H. van den Elst, C. Korevaar, J. Aerts, G. van der Marel, H. Overkleeft, *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *2011*, 6685-6689.
- [67] R. van den Berg, C. Korevaar, G. van der Marel, H. Overkleeft, J. van Boom, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 8409-8412.
- [68] R. van den Berg, C. Korevaar, H. Overkleeft, G. van der Marel, J. van Boom, *The Journal of organic chemistry* **2004**, *69*, 5699-5704.
- [69] S. Kim, S. Lee, T. Lee, H. Ko, D. Kim, *The Journal of organic chemistry* **2006**, *71*, 8661-8664.
- [70] Y. Lee, S. Lee, H. Jeon, D. Baek, J. Seo, D. Kim, S. Kim, *Synthesis* **2011**, *2011*, 867-872.
- [71] M. Obayashi, M. Schlosser, *Chemistry Letters* **1985**, 1715-1718.
- [72] R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 481-484.
- [73] P. Zimmermann, R. Schmidt, *European Journal of Organic Chemistry* **1988**, *1988*, 663-667.
- [74] Y. Li, Y. Wu, *European Journal of Organic Chemistry* **1996**, *1996*, 2079-2082.
- [75] N. Lipsky, R. Pagano, *Science* **1985**, *228*, 745-748.
- [76] N. Lipsky, R. Pagano, *The Journal of cell biology* **1985**, *100*, 27-34.
- [77] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569.

-
- [78] R. Pagano, O. Martin, H. Kang, R. Haugland, *The Journal of cell biology* **1991**, *113*, 1267-1279.
- [79] T.-Y. Wang, J. Silvius, *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 1478-1489.
- [80] L. Sklar, B. Hudson, R. Simoni, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1975**, *72*, 1649-1653.
- [81] D. Rintoul, R. Simoni, *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 7916-7918.
- [82] L. Kuerschner, C. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. Anderson, C. Thiele, *Nature Methods* **2005**, *2*, 39-45.
- [83] T. Hakogi, T. Shigenari, S. Katsumura, T. Sano, T. Kohno, Y. Igarashi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 661-664.
- [84] P. Ettmayer, A. Billich, T. Baumruker, D. Mechtcheriakova, H. Schmid, P. Nussbaumer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 1555-1558.
- [85] C. Peters, A. Billich, M. Ghobrial, K. Hoegenauer, T. Ullrich, P. Nussbaumer, *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 1842-1845.
- [86] S. Combemale, C. Santos, F. Rodriguez, V. Garcia, C. Galaup, C. Frongia, V. Lobjois, T. Levade, C. Baudoin-Dehoux, S. Ballereau, Y. Genisson, *RSC Advances* **2013**, *3*, 18970-18984.
- [87] K. Bhabak, D. Proksch, S. Redmer, C. Arenz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 6154-6161.
- [88] A. Borrmann, J. van Hest, *Chemical Science* **2014**, *5*, 2123-2134.
- [89] B. Gergely, H. András, K. Péter, *Methods and Applications in Fluorescence* **2015**, *3*, 042001.
- [90] H. Staudinger, J. Meyer, *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [91] E. Saxon, C. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [92] E. Saxon, S. Luchansky, H. Hang, C. Yu, S. Lee, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14893-14902.
- [93] H. Kolb, M. Finn, K. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [94] K. Lang, J. Chin, *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 16-20.
- [95] F. Lin, H. Hoyt, H. van Halbeek, R. Bergman, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [96] X. Ariza, F. Urpí, C. Viladomat, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 9101-9102.
- [97] X. Ariza, F. Urpí, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 7515-7517.
-

- [98] M. Sundhoro, S. Jeon, J. Park, O. Ramström, M. Yan, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**.
- [99] K. Kiick, E. Saxon, D. Tirrell, C. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 19-24.
- [100] J. Prescher, D. Dube, C. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873.
- [101] C. Wang, T. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 697-701.
- [102] H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Chemical communications* **2009**, 3032-3034.
- [103] E. Saxon, J. Armstrong, C. Bertozzi, *Organic Letters* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [104] B. Nilsson, L. Kiessling, R. Raines, *Organic Letters* **2000**, *2*, 1939-1941.
- [105] B. Nilsson, L. Kiessling, R. Raines, *Organic Letters* **2001**, *3*, 9-12.
- [106] M. Soellner, B. Nilsson, R. Raines, *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67*, 4993-4996.
- [107] J. Prescher, C. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 13-21.
- [108] R. Merckx, D. Rijkers, J. Kemmink, R. Liskamp, *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 4515-4518.
- [109] B. Nilsson, M. Soellner, R. Raines, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 91-118.
- [110] R. Lim, Q. Lin, *Chemical communications* **2010**, *46*, 1589-1600.
- [111] R. Huisgen, *Proceedings of the Chemical Society* **1961**.
- [112] V. Rostovtsev, L. Green, V. Fokin, K. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [113] C. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [114] D. Zeng, B. Zeglis, J. Lewis, C. Anderson, *Journal of Nuclear Medicine* **2013**, *54*, 829-832.
- [115] L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, *21*, 1393/1391-1393/1322.
- [116] V. Rodionov, V. Fokin, M. Finn, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 2250-2255.
- [117] B. Worrell, J. Malik, V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [118] Y. Özkılıç, N. Tüzün, *Organometallics* **2016**, *35*, 2589-2599.
- [119] A. Speers, B. Cravatt, *Chemistry & biology* **2004**, *11*, 535-546.
- [120] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. Marlow, P. Wu, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16893-16899.

-
- [121] P. Gramlich, C. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [122] A. Salic, T. Mitchison, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [123] D. Dieterich, J. Lee, A. Link, J. Graumann, D. Tirrell, E. Schuman, *Nature protocols* **2007**, *2*, 532.
- [124] C. Salisbury, B. Cravatt, *Molecular Informatics* **2007**, *26*, 1229-1238.
- [125] M. Nessen, G. Kramer, J. Back, J. Baskin, L. Smeenk, L. de Koning, J. van Maarseveen, L. de Jong, C. Bertozzi, H. Hiemstra, *Journal of proteome research* **2009**, *8*, 3702-3711.
- [126] K. Kalesh, H. Shi, J. Ge, S. Yao, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 1749-1762.
- [127] A. Krebs, J. Wilke, *Wittig Chemistry* **1983**, 189-233.
- [128] N. Agard, J. Prescher, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [129] G. Wittig, A. Krebs, *European Journal of Inorganic Chemistry* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [130] I. Nikić, J. Kang, G. Girona, I. Aramburu, E. Lemke, *Nature protocols* **2015**, *10*, 780-791.
- [131] M. Gutmann, E. Memmel, A. Braun, J. Seibel, L. Meinel, T. Lühmann, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 866-875.
- [132] J. Warner, A. Muthusamy, E. Petersson, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2508-2514.
- [133] A. Neef, N. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789-793.
- [134] J. Dommerholt, F. Rutjes, F. van Delft, *Topics in Current Chemistry* **2016**, *374*, 16.
- [135] J. Baskin, J. Prescher, S. Laughlin, N. Agard, P. Chang, I. Miller, A. Lo, J. Codelli, C. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [136] X. Ning, J. Guo, M. Wolfert, G. J. Boons, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [137] J. Jewett, E. Sletten, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [138] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. Wolfert, V. Popik, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 2076-2085.
- [139] M. Debets, S. van Berkel, S. Schoffelen, F. Rutjes, J. van Hest, F. van Delft, *Chemical communications* **2010**, *46*, 97-99.
-

- [140] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. Hendriks, F. Rutjes, J. van Hest, D. Lefeber, P. Friedl, F. Van Delft, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 9422-9425.
- [141] H. Stöckmann, A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. Brindle, F. Leeper, *Chemical Science* **2011**, *2*, 932-936.
- [142] F. Friscourt, P. Ledin, N. E. Mbua, H. Flanagan-Steet, M. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 5381-5389.
- [143] B. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele, *Chemistry-A European Journal* **2012**, *18*, 822-828.
- [144] C. Gröst, T. Berg, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13*, 3866-3870.
- [145] N. Agard, J. Baskin, J. Prescher, A. Lo, C. Bertozzi, *ACS chemical biology* **2006**, *1*, 644-648.
- [146] J. Codelli, J. Baskin, N. Agard, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [147] E. Sletten, G. de Almeida, C. Bertozzi, *Organic Letters* **2014**, *16*, 1634-1637.
- [148] F. Schoenebeck, D. Ess, G. Jones, K. Houk, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 8121-8133.
- [149] E. Sletten, H. Nakamura, J. Jewett, C. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 11799-11805.
- [150] C. McNitt, V. Popik, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 8200-8202.
- [151] D. Davis, E. Price, S. Aderibigbe, M. Larkin, E. Barlow, R. Chen, L. Ford, Z. Gray, S. Gren, Y. Jin, *The Journal of organic chemistry* **2016**, *81*, 6816-6819.
- [152] J. Tummatorn, P. Batsomboon, R. Clark, I. Alabugin, G. Dudley, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 2093-2097.
- [153] R. Ni, N. Mitsuda, T. Kashiwagi, K. Igawa, K. Tomooka, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 1190-1194.
- [154] K. Kaneda, R. Naruse, S. Yamamoto, *Organic Letters* **2017**, *19*, 1096-1099.
- [155] R. Carboni, R. Lindsey Jr, *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [156] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chemical communications* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [157] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. Lemke, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 4166-4170.

-
- [158] J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1382-1386.
- [159] R. Foster, M. Willis, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 63-76.
- [160] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *European Journal of Organic Chemistry* **1998**, *1998*, 2885-2896.
- [161] M. Blackman, M. Royzen, J. Fox, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [162] R. Selvaraj, J. Fox, *Current opinion in chemical biology* **2013**, *17*, 753-760.
- [163] D. Patterson, L. Nazarova, J. Prescher, **2014**, *9*, 592-605.
- [164] M. Zheng, L. Zheng, P. Zhang, J. Li, Y. Zhang, *Molecules* **2015**, *20*, 3190-3205/3191-3190-3205/3196, 3196 pp.
- [165] W. Chiuman, Y. Li, *Nucleic acids research* **2006**, *35*, 401-405.
- [166] L. Lavis, *Annual Review of Biochemistry* **2017**.
- [167] J. Jewett, C. Bertozzi, *Organic Letters* **2011**, *13*, 5937-5939.
- [168] M. Minoshima, K. Kikuchi, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2017**, 1-14.
- [169] L. Lin, X. Tian, S. Hong, P. Dai, Q. You, R. Wang, L. Feng, C. Xie, Z. Q. Tian, X. Chen, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 7266-7271.
- [170] A. MacKinnon, J. Taunton, *Current protocols in chemical biology* **2009**, 55-73.
- [171] R. Carpenter, S. Hausner, J. Sutcliffe, *ACS medicinal chemistry letters* **2011**, *2*, 885-889.
- [172] J. Knight, B. Cornelissen, *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2014**, *4*, 96-113, 118.
- [173] A. Neves, Y. Wainman, A. Wright, M. Kettunen, T. Rodrigues, S. McGuire, D.-E. Hu, F. Bulat, S. Geninatti Crich, H. Stoeckmann, F. Leeper, K. Brindle, *Angewandte Chemie, International Edition* **2016**, *55*, 1286-1290.
- [174] T. Tirodkar, C. Voelkel-Johnson, *Exp Oncol* **2012**, *34*, 231-242.
- [175] S. Spiegel, A. Merrill, *The FASEB Journal* **1996**, *10*, 1388-1397.
- [176] E. Bieberich, *Journal of Lipids* **2011**, 610306, 610311 pp.
- [177] L. Heung, C. Luberto, M. Del Poeta, *Infection and Immunity* **2006**, *74*, 28-39.
- [178] J. Schneider-Schaulies, S. Schneider-Schaulies, in *Sphingolipids in Disease*, Springer, **2013**, pp. 321-340.
- [179] M. Adada, C. Luberto, D. Canals, *Chemistry and Physics of Lipids* **2016**, *197*, 45-59.
-

- [180] C. Bollinger, V. Teichgräber, E. Gulbins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2005**, 1746, 284-294.
- [181] H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick, E. Gulbins, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 20589-20596.
- [182] E. Gulbins, *Pharmacological research* **2003**, 47, 393-399.
- [183] E. Gulbins, R. Kolesnick, *Oncogene* **2003**, 22, 7070-7077.
- [184] A. Draeger, E. Babiychuk, in *Sphingolipids in disease*, Springer, **2013**, pp. 341-353.
- [185] F. Bianco, C. Perrotta, L. Novellino, M. Francolini, L. Riganti, E. Menna, L. Saglietti, E. Schuchman, R. Furlan, E. Clementi, *The EMBO journal* **2009**, 28, 1043-1054.
- [186] V. Tchikov, U. Bertsch, J. Fritsch, B. Edelmann, S. Schütze, *European journal of cell biology* **2011**, 90, 467-475.
- [187] G. Vielhaber, L. Brade, B. Lindner, S. Pfeiffer, R. Wepf, U. Hintze, K.-P. Wittern, H. Brade, *Glycobiology* **2001**, 11, 451-457.
- [188] K. Krishnamurthy, S. Dasgupta, E. Bieberich, *Journal of Lipid Research* **2007**, 48, 968-975.
- [189] N. Lipsky, R. Pagano, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1983**, 80, 2608-2612.
- [190] N. Lipsky, R. Pagano, *Science* **1985**, 228, 745-747.
- [191] N. Lipsky, R. Pagano, *The Journal of cell biology* **1985**, 100, 27-34.
- [192] P. Haberkant, O. Schmitt, F. Contreras, C. Thiele, K. Hanada, H. Sprong, C. Reinhard, F. Wieland, B. Brügger, *Journal of Lipid Research* **2008**, 49, 251-262.
- [193] L. Kuerschner, C. Thiele, *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, 1841, 1031-1037.
- [194] Thermo Fisher Scientific Inc., Alexa Fluor® Dyes, **2018**,
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor.html>, zuletzt aufgerufen am 26.03.2018
- [195] BroadPharm, Dye Labeling Reagents, **2018**,
<http://www.broadpharm.com/web/products.php?category1=Dye+Labeling>, zuletzt aufgerufen am 30.04.2018
- [196] Lumiprobe Corporation, Farbstoff-Azide **2018**,

- https://de.lumiprobe.com/catalog/dye-azides?gclid=EAIaIQobChMI2ID5_NLz2AIV1xbTCh1mMAaaEAAYASAAEgIPh_D_BwE, zuletzt aufgerufen am 26.03.2018
- [197] Jena Bioscience GmbH, Azide-containing Fluorescent Dyes, **2018**,
<https://www.jenabioscience.com/click-chemistry/click-reagents-by-chemistry/azide-reagents/fluorescent-dyes>, zuletzt aufgerufen am 26.03.2018
- [198] A.-T. GmbH, Fluorescent Labels, **2018**,
http://www.attotec.com/attotecshop/index.php?language=en&cat=c1_Fluoreszenzlabel.html&language=en, zuletzt aufgerufen am 26.03.2018
- [199] C. Whitman, F. Yang, J. Kohler, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5006-5010.
- [200] A. Neef, C. Schultz, *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, *48*, 1498-1500, S1498/1491-S1498/1425.
- [201] S. Milne, K. Tallman, R. Serwa, C. Rouzer, M. Armstrong, L. Marnett, C. Lukehart, N. Porter, H. Brown, *Nature chemical biology* **2010**, *6*, 205-207.
- [202] M. Sandbhor, J. Key, I. Strelkov, C. Cairo, *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 8669-8674.
- [203] R. Erdmann, H. Takakura, A. Thompson, F. Rivera-Molina, E. Allgeyer, J. Bewersdorf, D. Toomre, A. Schepartz, *Angewandte Chemie, International Edition* **2014**, *53*, 10242-10246.
- [204] E. Bieberich, T. Kawaguchi, R. Yu, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 177-181.
- [205] L. Collenburg, T. Walter, A. Burgert, N. Muller, J. Seibel, L. Japtok, B. Kleuser, M. Sauer, S. Schneider-Schaulies, *Journal of immunology* **2016**, *196*, 3951-3962.
- [206] C. Detre, E. Kiss, Z. Varga, K. Ludányi, K. Pászty, Á. Enyedi, D. Kövesdi, G. Panyi, É. Rajnavölgyi, J. Matkó, *Cellular signalling* **2006**, *18*, 294-306.
- [207] A. Hearps, J. Burrows, C. Connor, G. Woods, R. Lowenthal, S. Ragg, *Apoptosis* **2002**, *7*, 387-394.
- [208] D. Phillips, K. Allen, H. Griffiths, *Archives of biochemistry and biophysics* **2002**, *407*, 15-24.

- [209] L. Church, G. Hessler, J. Goodall, D. Rider, C. Workman, D. Vignali, P. Bacon, E. Gulbins, S. Young, *Journal of leukocyte biology* **2005**, *78*, 266-278.
- [210] A. Lepple-Wienhues, C. Belka, T. Laun, A. Jekle, B. Walter, U. Wieland, M. Welz, L. Heil, J. Kun, G. Busch, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 13795-13800.
- [211] T. Walter, J. Schlegel, A. Burgert, A. Kurz, J. Seibel, M. Sauer, *Chemical communications* **2017**, *53*, 6836-6839.
- [212] T. Walter, L. Collenburg, L. Japtok, B. Kleuser, S. Schneider-Schaulies, N. Muller, J. Becam, A. Schubert-Unkmeir, J. Kong, E. Bieberich, J. Seibel, *Chemical communications* **2016**, *52*, 8612-8614.
- [213] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3. Ed., *Springer Science Business Media*, New York, **2006**.
- [214] J. Vaughan, G. Dempsey, E. Sun, X. Zhuang, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 1197-1200.
- [215] D. Newman, G. Cragg, K. Snader, *Journal of natural products* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [216] D. Bibel, R. Aly, H. Shinefield, *Journal of Investigative Dermatology* **1992**, *98*, 269-273.
- [217] J. Tang, X. Meng, H. Liu, J. Zhao, L. Zhou, M. Qiu, X. Zhang, Z. Yu, F. Yang, *Molecules* **2010**, *15*, 9288-9297.
- [218] M. Dongfack, M.-C. Lallemand, V. Kuete, C. Mbazona, J.-D. Wansi, H. Trinh-van-Dufat, S. Michel, J. Wandji, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *60*, 1072-1075.
- [219] C. Fischer, D. Drake, D. Dawson, D. Blanchette, K. Brogden, P. Wertz, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2011**, AAC. 05151-05111.
- [220] B. El-Amraoui, J.-F. Biard, A. Fassouane, *Springerplus* **2013**, *2*, 252.
- [221] S. Possemiers, J. Van Camp, S. Bolca, W. Verstraete, *International journal of food microbiology* **2005**, *105*, 59-70.
- [222] D. Drake, K. Brogden, D. Dawson, P. Wertz, *Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 4-11.
- [223] Y. Pewzner-Jung, T. Joseph, A. Futerman, T. S. Tavakoli, H. Grassme, K. A. Becker, L. Japtok, B. Kleuser, J. Steinmann, S. Lang, B. Tuemmler, E. Schuchman, A. Lentsch, M. Edwards, E. Gulbins, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1205-1214.

-
- [224] T. Reddy, A. Jyotsna, P. Devi, R. Prasad, Y. Poornachandra, G. Kumar, *European journal of medicinal chemistry* **2016**, *118*, 98-106.
- [225] E. del Olmo, G. Molina-Salinas, R. Escarcena, M. Alves, J. López-Pérez, R. Hernandez-Pando, S. Said-Fernández, A. San Feliciano, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 5764-5768.
- [226] C. Fischer, K. Walters, D. Drake, D. Blanchette, D. Dawson, K. Brogden, P. Wertz, *Skin pharmacology and physiology* **2013**, *26*, 36-44.
- [227] J. Becam, T. Walter, A. Burgert, J. Schlegel, M. Sauer, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 17627.
- [228] N. Roupheal, D. Stephens, *Methods Mol Biol* **2012**, *799*, 1-20.
- [229] D. Caugant, M. Maiden, *Vaccine* **2009**, *27*, B64-B70.
- [230] M. Unemo, W. Shafer, *Clinical microbiology reviews* **2014**, *27*, 587-613.
- [231] M. Sauer, M. Heilemann, *Chemical reviews* **2017**.
- [232] A. Burgert, J. Schlegel, J. Bécam, S. Doose, E. Bieberich, A. Schubert-Unkmeir, M. Sauer, *Angewandte Chemie* **2017**, *129*, 6227-6231.
- [233] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [234] E. Sletten, C. Bertozzi, *Angewandte Chemie, International Edition* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [235] A. Niederwieser, A.-K. Spaete, L. D. Nguyen, C. Juengst, W. Reutter, V. Wittmann, *Angewandte Chemie, International Edition* **2013**, *52*, 4265-4268.
- [236] G. Keller, *Bachelorarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2015**.
- [237] M. Royzen, G. Yap, J. Fox, *Chemtracts* **2008**, *21*, 46-48.
- [238] S. Momchilova, B. Nikolova-Damyanova, *Journal of separation science* **2003**, *26*, 261-270.
- [239] A. Cope, B. Pawson, *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 3649-3651.
- [240] Y. Kurra, K. Odoi, Y.-J. Lee, Y. Yang, T. Lu, S. Wheeler, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. Liu, *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 1730-1738.
- [241] E. H. Ahn, J. Schroeder, *Anticancer research* **2010**, *30*, 2881-2884.
- [242] V. Blaho, T. Hla, *Chemical reviews* **2011**, *111*, 6299-6320.
- [243] J. Chun, E. Goetzl, T. Hla, Y. Igarashi, K. Lynch, W. Moolenaar, S. Pyne, G. Tigyi, *Pharmacological reviews* **2002**, *54*, 265-269.
- [244] A. P. Seitz, H. Grassme, M. J. Edwards, Y. Pewzner-Jung, E. Gulbins, *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 611-620.
-

- [245] Y. Pewzner-Jung, S. Tabazavareh, H. Grassmé, K. Becker, L. Japtok, J. Steinmann, T. Joseph, S. Lang, B. Tuemmler, E. Schuchman, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1205-1214.
- [246] T. Blom, Z. Li, R. Bittman, P. Somerharju, E. Ikonen, *Traffic* **2012**, *13*, 1234-1243.
- [247] C. Cairo, J. Key, C. Sadek, *Current opinion in chemical biology* **2010**, *14*, 57-63.
- [248] A. Billich, P. Ettmayer, *Analytical biochemistry* **2004**, *326*, 114-119.
- [249] M.-H. Hsieh, J.-T. Hung, Y.-W. Liw, Y.-J. Lu, C.-H. Wong, A. L. Yu, P.-H. Liang, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1689-1697, S1689/1681-S1689/1625.
- [250] A. Pandiakumar, S. Sarma, A. Samuelson, *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 2917-2920.
- [251] C. Cavender, V. Shiner Jr, *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3567-3569.
- [252] T. Sminia, H. Zuilhof, T. Wennekes, *Carbohydrate Research* **2016**, *435*, 121-141.
- [253] C. Anderson, I. Wallace, C. Somerville, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 1329-1334, S1329/1321-S1329/1327.
- [254] C. Anderson, I. Wallace, *Plant Signaling & Behavior* **2012**, *7*, 661-663.
- [255] J. Hoogenboom, N. Berghuis, D. Cramer, R. Geurts, H. Zuilhof, T. Wennekes, *BMC plant biology* **2016**, *16*, 220.
- [256] D. Van deáWouwer, *Chemical communications* **2014**, *50*, 12262-12265.
- [257] J. O. Blachutzik, F. Demir, I. Kreuzer, R. Hedrich, G. S. Harms, *Plant Methods* **2012**, *8*, 28.
- [258] F. Waller, Unveröffentlichte Ergebnisse, **2015**
- [259] S. Raffaele, A. Leger, D. Roby, *Plant Signaling & Behavior* **2009**, *4*, 94-99.
- [260] T. Bär, B. Kratzer, R. Wild, K. Sandhoff, R. Schmidt, *European Journal of Organic Chemistry* **1993**, *1993*, 419-426.
- [261] G. van Echten-Deckert, A. Zschoche, T. Bär, R. Schmidt, A. Raths, T. Heinemann, K. Sandhoff, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 15825-15833.
- [262] G. van Echten-Deckert, A. Schick, T. Heinemann, B. Schnieders, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 23585-23589.
- [263] K. Takabe, S. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Pharmacological reviews* **2008**, *60*, 181-195.
- [264] A. Olivera, S. Spiegel, *Nature* **1993**, *365*, 557-560.
- [265] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. Vanek, *Nature* **1996**, *381*, 800.
- [266] S. Milstien, S. Spiegel, *Cancer cell* **2006**, *9*, 148-150.
- [267] L. Edsall, J. Van Brocklyn, O. Cuvillier, B. Kleuser, S. Spiegel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12892-12898.

-
- [268] L. Wong, S. Tan, Y. Lam, A. Melendez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 3618-3626.
- [269] M. Fabisikova, M. Martinkova, S. Hirkova, J. Gonda, M. B. Pilatova, G. Gonciova, *Carbohydr Res* **2016**, *435*, 26-36.
- [270] H. Symolon, A. Bushnev, Q. Peng, H. Ramaraju, S. Mays, J. Allegood, S. Pruett, M. C. Sullards, D. Dillehay, D. Liotta, *Molecular cancer therapeutics* **2011**, *10*, 648-657.
- [271] Y. Yoshimitsu, J. Miyagaki, S. Oishi, N. Fujii, H. Ohno, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4211-4220.
- [272] G. Schwartz, A. Haimovitz-Friedman, S. Dhupar, D. Ehleiter, P. Maslak, L. Lai, F. Loganzo Jr, D. Kelsen, Z. Fuks, A. Albino, *Journal of the National Cancer Institute* **1995**, *87*, 1394-1399.
- [273] G. Schwartz, D. Ward, L. Saltz, E. Casper, T. Spiess, E. Mullen, J. Woodworth, R. Venuti, P. Zervos, A. Storniolo, *Clinical Cancer Research* **1997**, *3*, 537-543.
- [274] B. Maurer, L. Melton, C. Billups, M. Cabot, P. Reynolds, *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, *92*, 1897-1909.
- [275] H. Wang, B. Maurer, P. Reynolds, M. Cabot, *Cancer research* **2001**, *61*, 5102-5105.
- [276] G. Wang, J. Silva, K. Krishnamurthy, E. Tran, B. Condie, E. Bieberich, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 26415-26424.
- [277] E. Bieberich, J. Silva, G. Wang, K. Krishnamurthy, B. Condie, *Journal of Cell Biology* **2004**, *167*, 723-734.
- [278] T. Fujita, R. Hirose, M. Yoneta, S. Sasaki, K. Inoue, M. Kiuchi, S. Hirase, K. Chiba, H. Sakamoto, M. Arita, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 4451-4459.
- [279] A. Huwiler, J. Pfeilschifter, *Biochem Pharmacol* **2008**, *75*, 1893-1900.
- [280] J. Liao, J. Tao, G. Lin, D. Liu, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4715-4733.
- [281] A. Huwiler, J. Pfeilschifter, *Biochemical pharmacology* **2008**, *75*, 1893-1900.
- [282] D. Pchejetski, T. Bohler, L. Brizuela, L. Sauer, N. Doumerc, M. Golzio, V. Salunkhe, J. Teissié, B. Malavaud, J. Waxman, *Cancer research* **2010**, *70*, 8651-8661.
- [283] M. Matloubian, C. Lo, G. Cinamon, M. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. Allende, R. Proia, J. Cyster, *Nature* **2004**, *427*, 355-360.
- [284] K. Chiba, H. Matsuyuki, Y. Maeda, K. Sugahara, *Cell Mol Immunol* **2006**, *3*, 11-19.
- [285] V. Brinkmann, J. Cyster, T. Hla, *American Journal of Transplantation* **2004**, *4*, 1019-1025.
- [286] C. Strader, C. Pearce, N. Oberlies, *Journal of natural products* **2011**, *74*, 900-907.
-

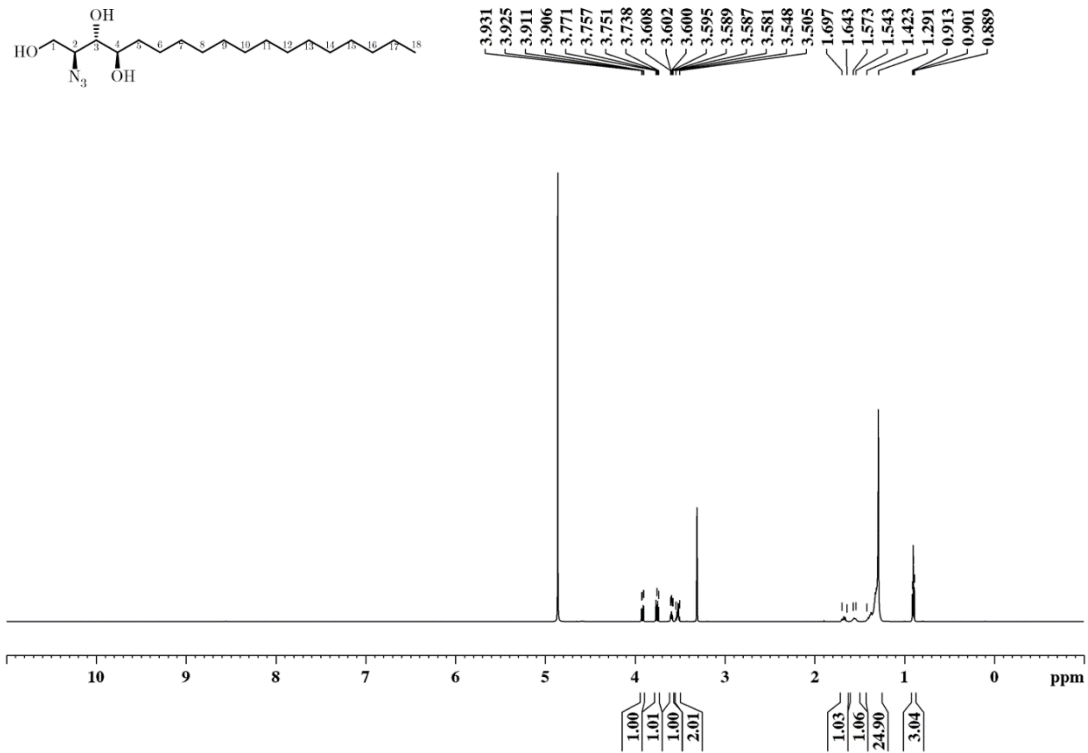
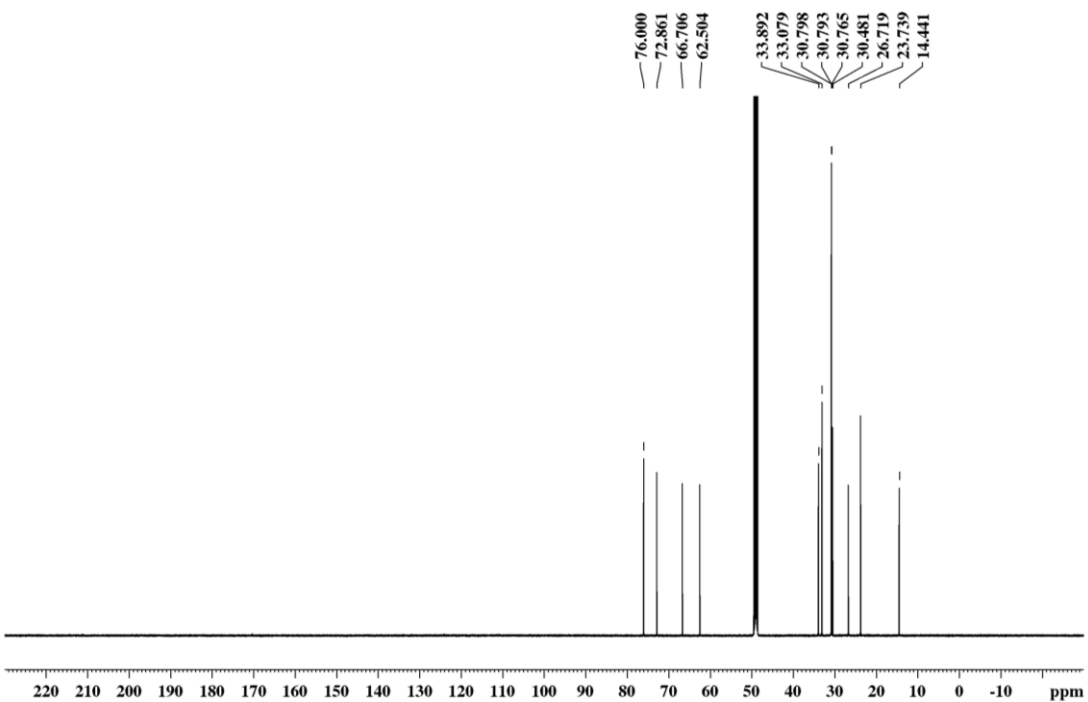
- [287] P. Bandhuvula, Y. Y. Tam, B. Oskouian, J. Saba, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 33697-33700.
- [288] K. Napoli, *Therapeutic drug monitoring* **2000**, *22*, 47-51.
- [289] P. Hiestand, M. Rausch, D. Meier, C. Foster, in *Natural Compounds as Drugs*, Springer, **2008**, pp. 361-381.
- [290] E. Bieberich, B. Hu, J. Silva, S. MacKinnon, R. Yu, H. Fillmore, W. Broaddus, R. Ottenbrite, *Cancer Lett.* **2002**, *181*, 55-64.
- [291] Y. Osornio, P. Uebelhart, S. Bosshard, F. Konrad, J. Siegel, E. Landau, *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 10583-10595.
- [292] H. Kolb, M. Finn, K. Sharpless, *Angewandte Chemie, International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [293] P. Ahern, H. Fong, K. Vaughan, *Canadian Journal of Chemistry* **1977**, *55*, 1701-1709.
- [294] S. Punna, M. Finn, *Synlett* **2004**, *2004*, 99-100.
- [295] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 5188-5240.
- [296] M. Peer, in *CHEMSPEC EUROPE, Vol. 18*, Amsterdam, **1998**, pp. 33-42.
- [297] L. Hawkins, S. Ishizaka, **2004**, *US Pat.* 20040006242.
- [298] G. Wang, M. Dinkins, Q. He, G. Zhu, C. Poirier, A. Campbell, M. Mayer-Proschel, E. Bieberich, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 21384-21395.
- [299] B. Obermeier, R. Daneman, R. Ransohoff, *Nature medicine* **2013**, *19*, 1584-1596.
- [300] A. Simonis, S. Hebling, E. Gulbins, S. Schneider-Schaulies, A. Schubert-Unkmeir, *PLoS pathogens* **2014**, *10*, e1004160.
- [301] A. Unkmeir, K. Latsch, G. Dietrich, E. Wintermeyer, B. Schinke, S. Schwender, K. Kim, M. Eigenthaler, M. Frosch, *Molecular microbiology* **2002**, *46*, 933-946.
- [302] Y. Hirano, S. Yoshinaga, R. Takeya, N. N. Suzuki, M. Horiuchi, M. Kohjima, H. Sumimoto, F. Inagaki, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 9653-9661.
- [303] M. Coureuil, G. Mikaty, F. Miller, H. Lécuyer, C. Bernard, S. Bourdoulous, G. Duménil, R.-M. Mège, B. Weksler, I. Romero, *Science* **2009**, *325*, 83-87.
- [304] D. Brown, E. London, *Biochemical and biophysical research communications* **1997**, *240*, 1-7.
- [305] E. Ikonen, *Current opinion in lipidology* **1997**, *8*, 60-64.
- [306] Z. Korade, A. Kenworthy, *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 1265-1273.
- [307] K. Kasahara, Y. Sanai, *Glycoconjugate journal* **2000**, *17*, 153-162.

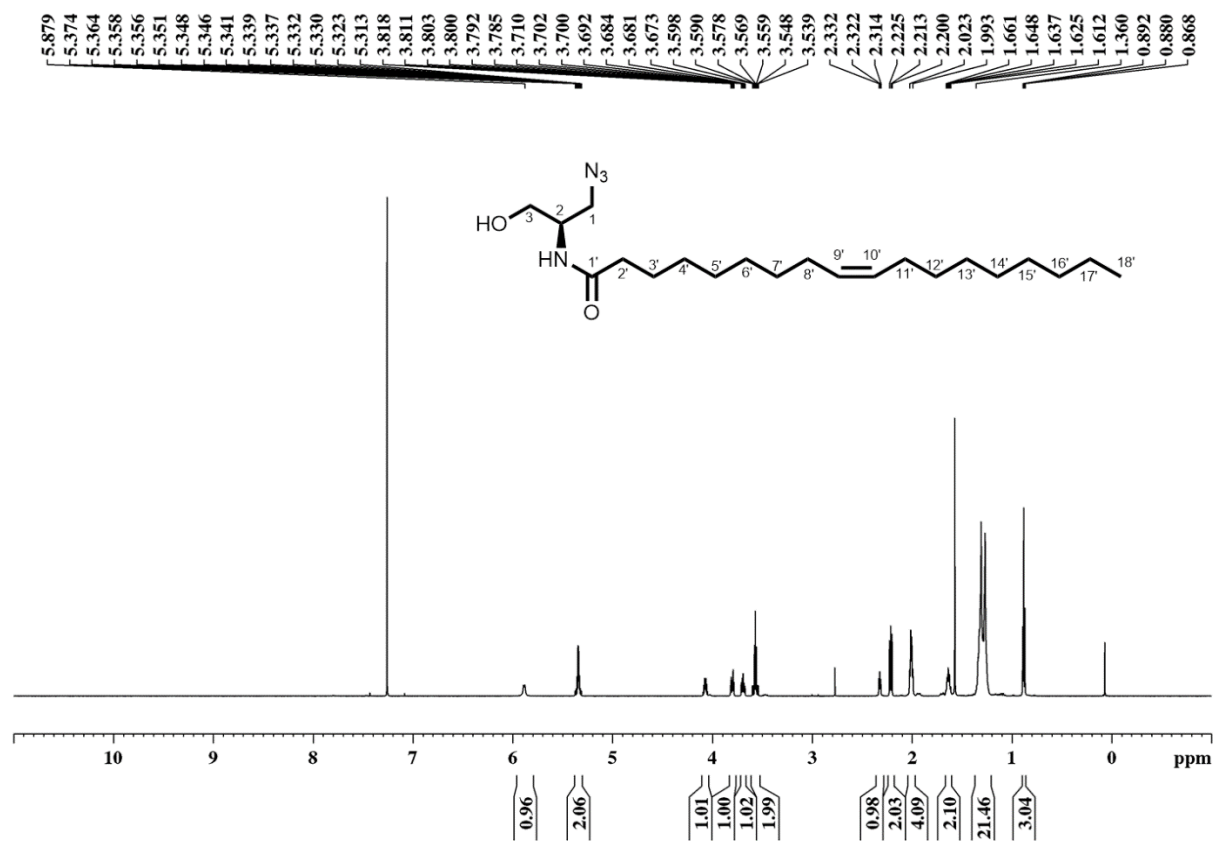
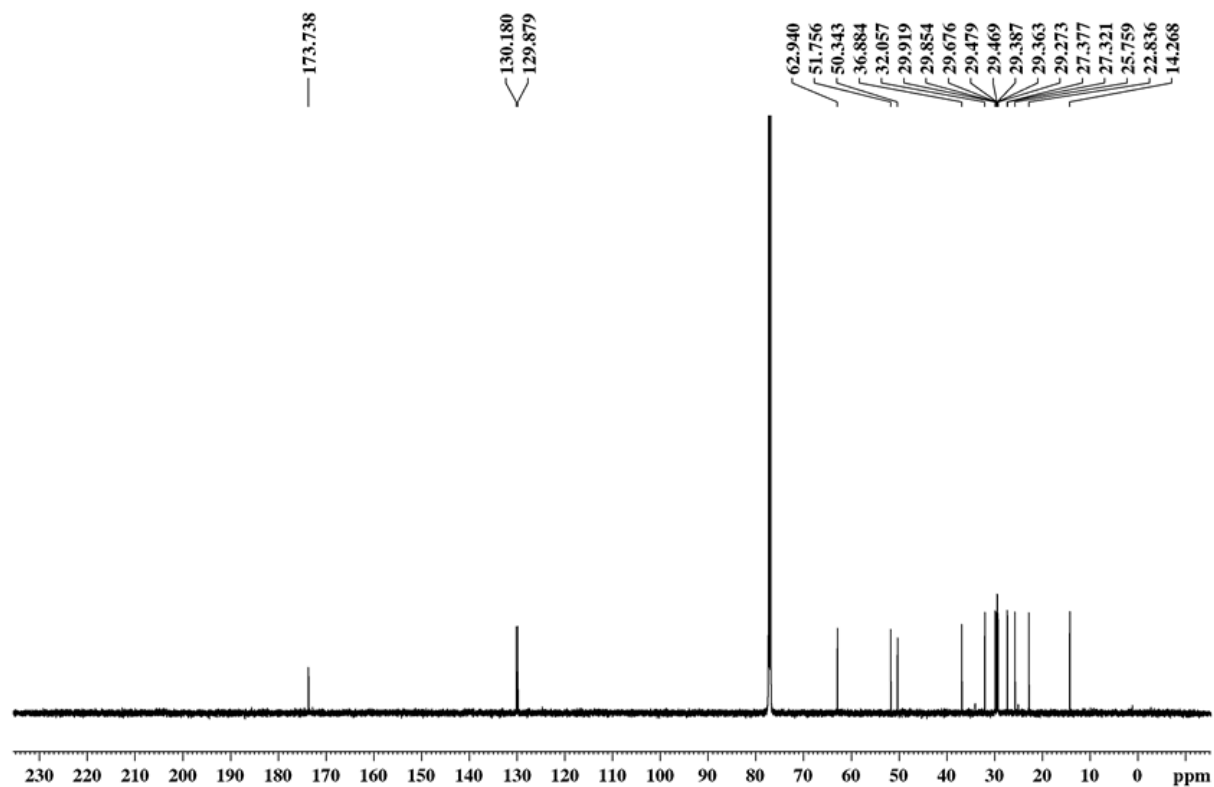
-
- [308] G. D'angelo, S. Capasso, L. Sticco, D. Russo, *The FEBS journal* **2013**, *280*, 6338-6353.
- [309] C. Lingwood, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, *3*, a004788.
- [310] T. Ariga, *Journal of neuroscience research* **2014**, *92*, 1227-1242.
- [311] N. Fabelo, V. Martín, G. Santpere, R. Marín, L. Torrent, I. Ferrer, M. Diaz, *Molecular medicine* **2011**, *17*, 1107.
- [312] M. Kiuchi, K. Adachi, A. Tomatsu, M. Chino, S. Takeda, Y. Tanaka, Y. Maeda, N. Sato, N. Mitsutomi, K. Sugahara, K. Chiba, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *13*, 425-432.
- [313] C. Kellner, *Bachelorarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2017**.
- [314] Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, *Prävention der nosokomialen beatmungsassoziierten Pneumonie* **2013**
- [315] J. Rello, E. Diaz, *Critical care medicine* **2003**, *31*, 2544-2551.
- [316] D. Cook, S. Walter, R. Cook, L. Griffith, G. Guyatt, D. Leasa, R. Jaeschke, C. Brun-Buisson, *Annals of internal medicine* **1998**, *129*, 433-440.
- [317] J. Beyersmann, P. Gastmeier, H. Grundmann, S. Bärwolff, C. Geffers, M. Behnke, H. Rüden, M. Schumacher, *Infection Control & Hospital Epidemiology* **2006**, *27*, 493-499.
- [318] M. Eber, R. Laxminarayan, E. Perencevich, A. Malani, *Archives of internal medicine* **2010**, *170*, 347-353.
- [319] B. Tan, X. Xian-Yang, X. Zhang, X. Peng-Zhou, P. Wang, J. Xue, Y. Ling-Huang, Y. Li-Li, J. Fu-Qiu, *American journal of infection control* **2014**, *42*, 902-910.
- [320] C. Geffers, D. Sohr, P. Gastmeier, *Infection Control & Hospital Epidemiology* **2008**, *29*, 1167-1170.
- [321] J. Muscedere, A. Day, D. Heyland, *Clinical infectious diseases* **2010**, *51*, S120-S125.
- [322] C. Adair, S. Gorman, B. Feron, L. Byers, D. Jones, C. Goldsmith, J. Moore, J. Kerr, M. Curran, G. Hogg, *Intensive care medicine* **1999**, *25*, 1072-1076.
- [323] T. Inglis, M. Millar, J. Jones, D. Robinson, *Journal of Clinical Microbiology* **1989**, *27*, 2014-2018.
- [324] I. Pneumatikos, C. Dragoumanis, D. Bouros, *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **2009**, *110*, 673-680.
-

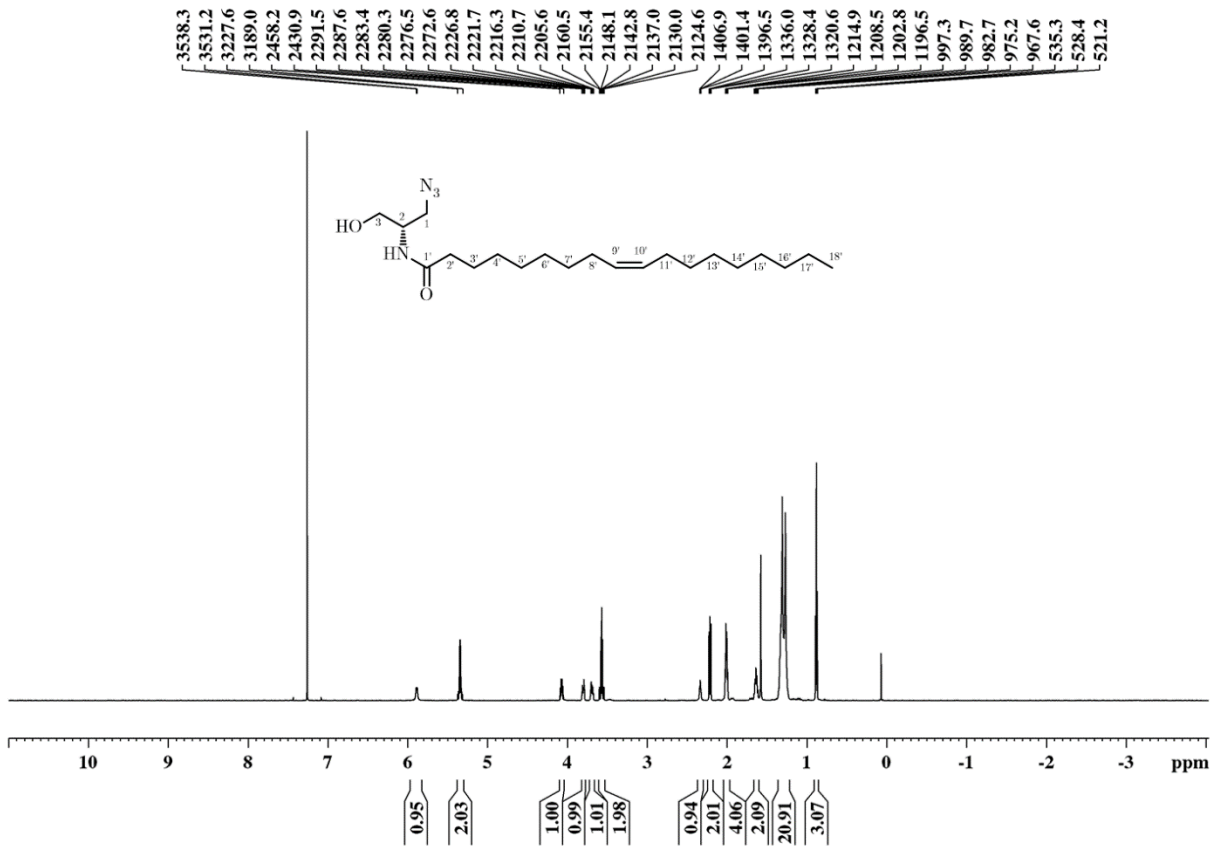
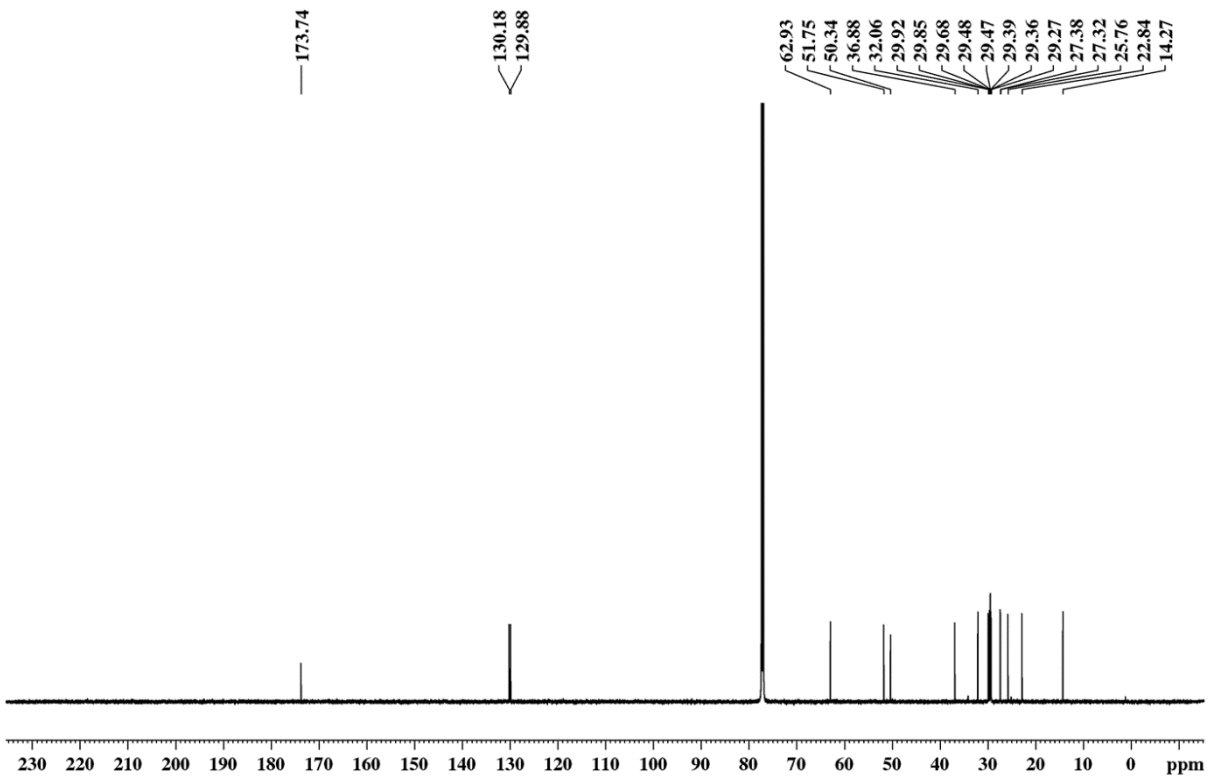
- [325] S. Gil-Perotin, P. Ramirez, V. Marti, J. Sahuquillo, E. Gonzalez, I. Calleja, R. Menendez, J. Bonastre, *Critical care* **2012**, *16*, R93.
- [326] J. Garland, *Clinics in perinatology* **2010**, *37*, 629-643.
- [327] J. Seibel, E. Gulbins, in *SphingoFor 2123*, 2. Antrag, Würzburg, **2016**.
- [328] Thermo Fisher Scientific Inc., Platten und Module mit Oberflächen für kovalente Bindungen, **2017**,
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/436006>, zuletzt aufgerufen am 26.03.2018
- [329] E. Gulbins, Unveröffentlichte Ergebnisse, **2017**
- [330] V. Legros, C. Vanhaverbeke, F. Souard, C. Len, J. Désiré, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 2583-2590.
- [331] L. Vujisić, D. Antić, I. Vučković, T. Sekulić, V. Tomić, B. Mandić, V. Tešević, B. Ćurčić, V. Vajs, S. Makarov, *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11*, 483-490.
- [332] J. M. Hash, J. Millar, J. Heraty, J. Harwood, B. Brown, *Journal of Chemical Ecology* **2017**, *43*, 198-206.
- [333] H. Davies, X. Dai, M. Long, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2485-2490.
- [334] D. Wu, Z. Ren, M. Pae, W. Guo, X. Cui, A. Merrill, S. Meydani, *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4829-4839.
- [335] H. Grassme, J. Riethmuller, E. Gulbins, *Prog Lipid Res* **2007**, *46*, 161-170.
- [336] E. Gulbins, S. Dreschers, B. Wilker, H. Grassme, *J. Mol. Med. (Heidelberg, Ger.)* **2004**, *82*, 357-363.
- [337] E. Bieberich, J. Silva, G. Wang, K. Krishnamurthy, B. Condie, *Journal of Cell Biology* **2004**, *167*, 723-734.
- [338] W. Sanborn, C. Heuck, R. El Aouad, W. Storch, *World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo, Egypt* **2005**.
- [339] K. Nwe, M. Brechbiel, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* **2009**, *24*, 289-302.
- [340] F. Amblard, J. Cho, R. Schinazi, *Chemical reviews* **2009**, *109*, 4207-4220.
- [341] V. Tiwari, B. Mishra, K. Mishra, N. Mishra, A. Singh, X. Chen, *Chemical reviews* **2016**, *116*, 3086-3240.
- [342] A. Doerr, *Nature Methods* **2009**, *6*, 696-696.

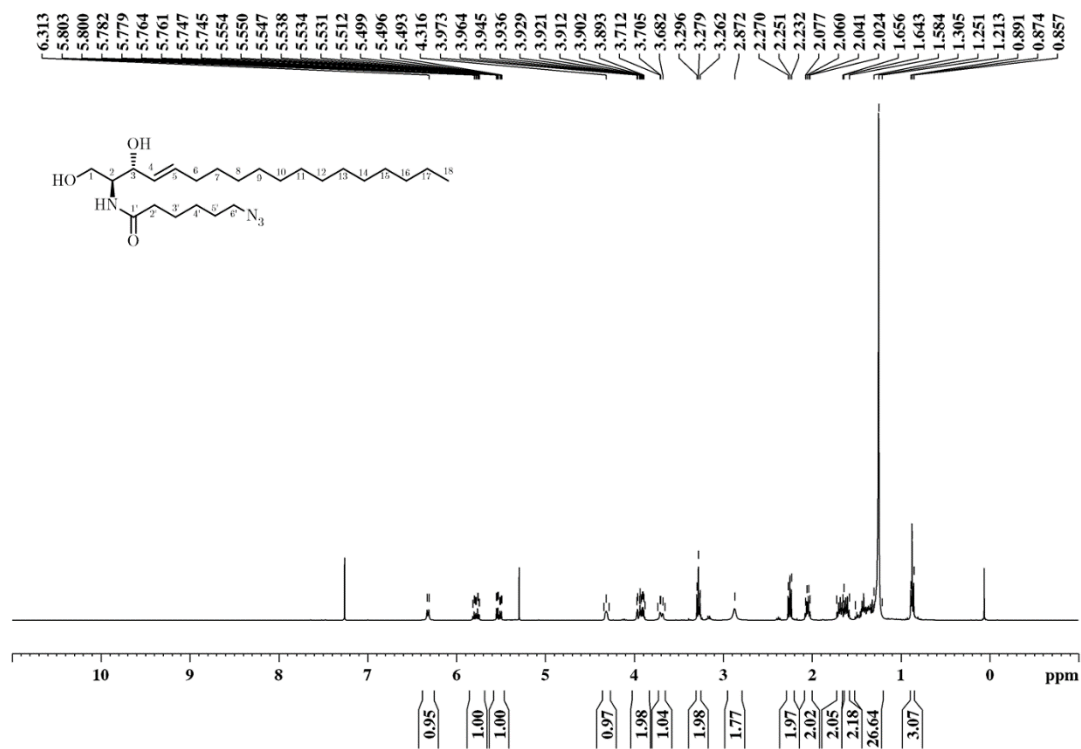
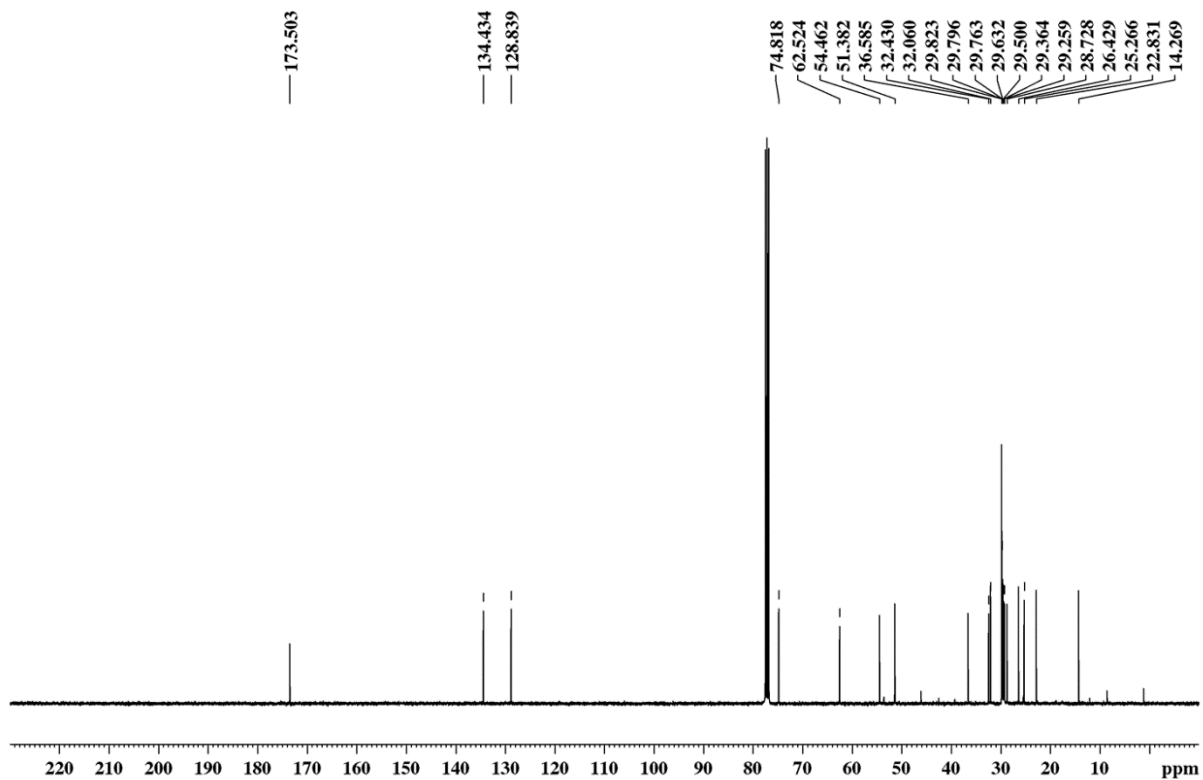
10 Anhang

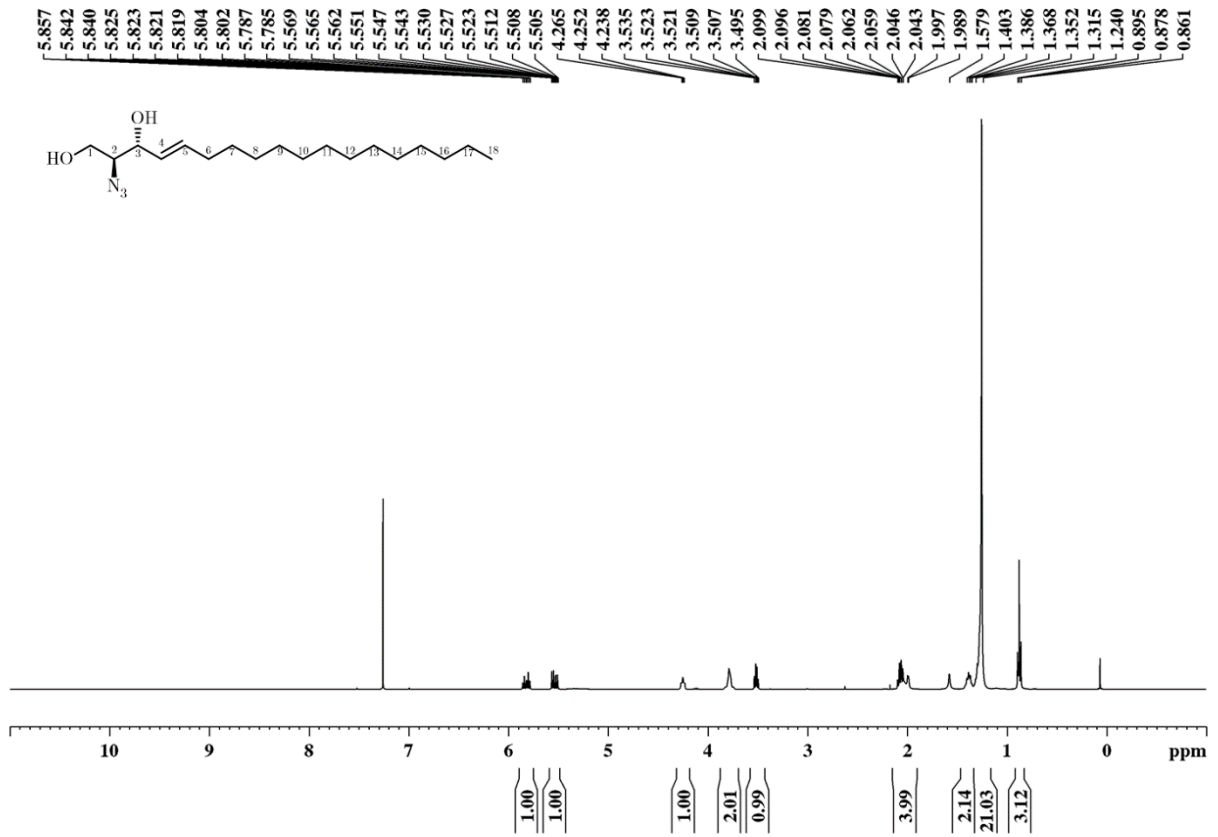
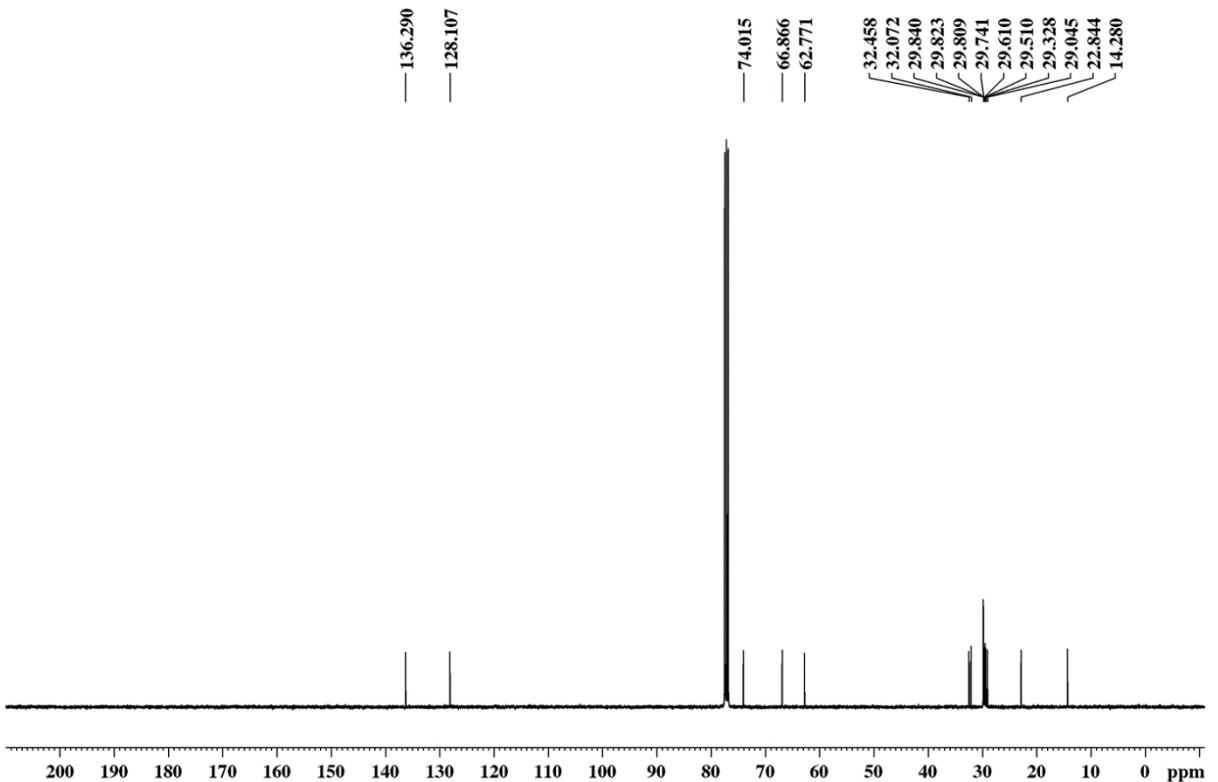
NMR-Spektren

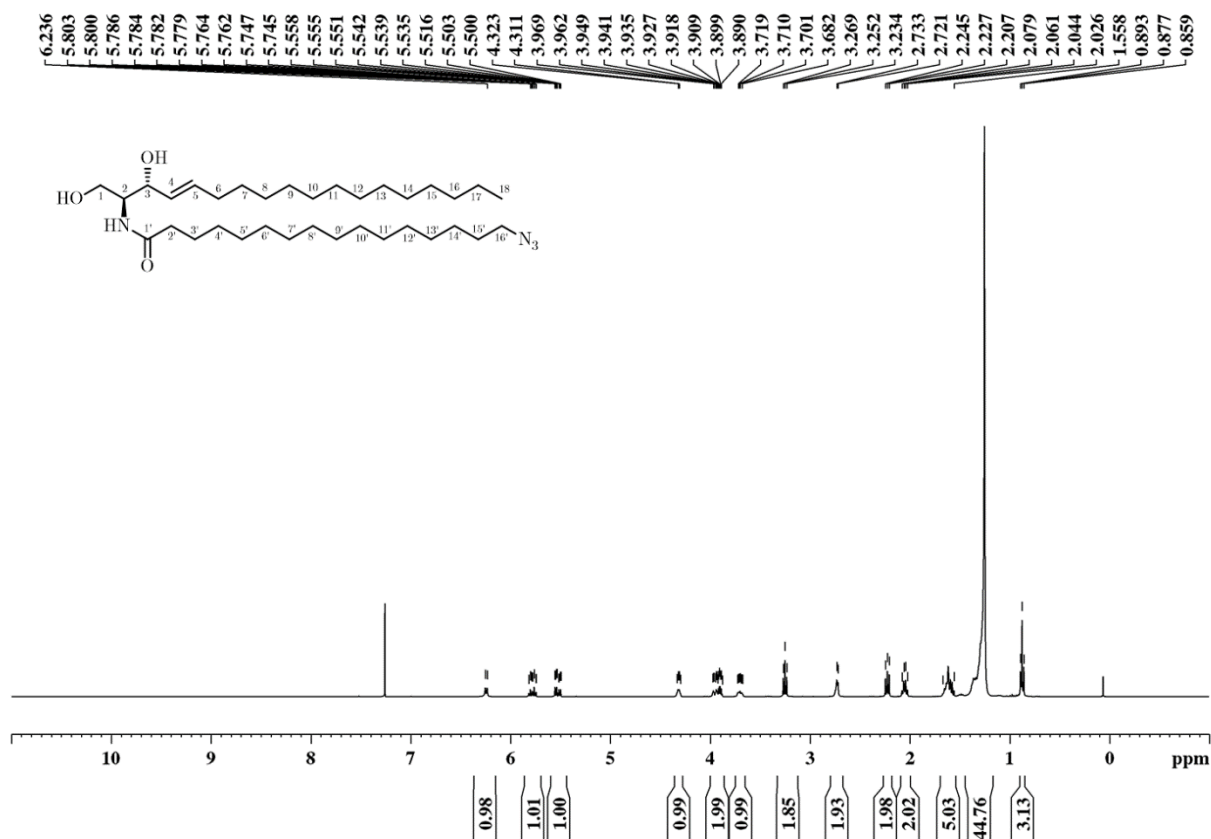
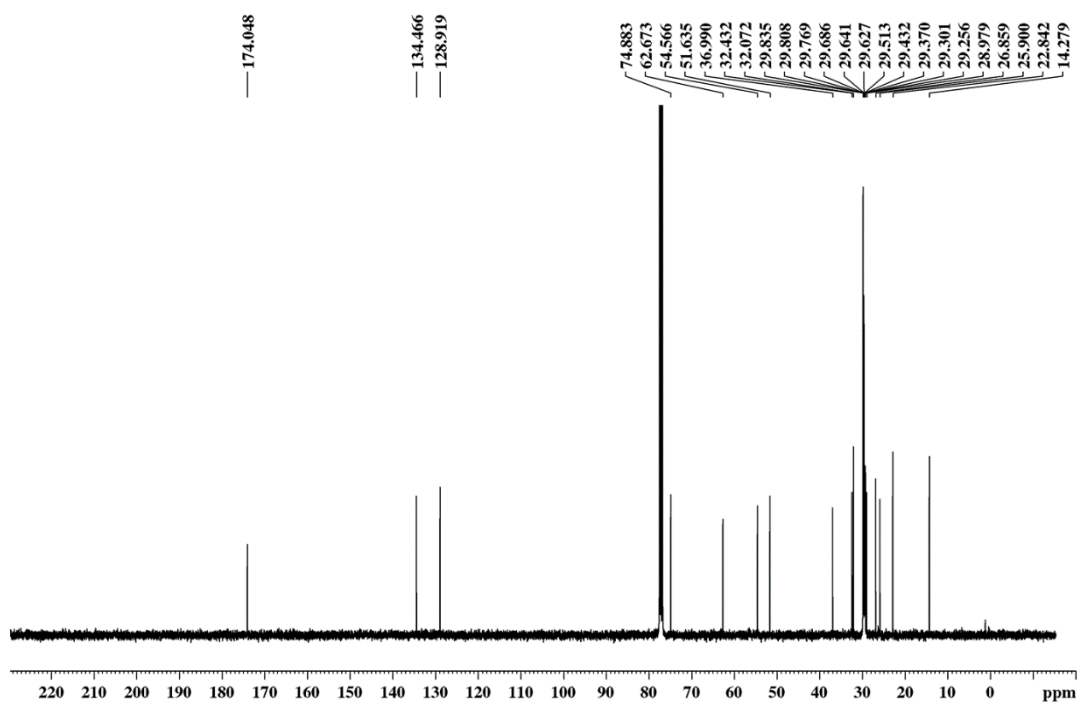
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD/ CDCl_3) **50** $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD/ CDCl_3) **50**

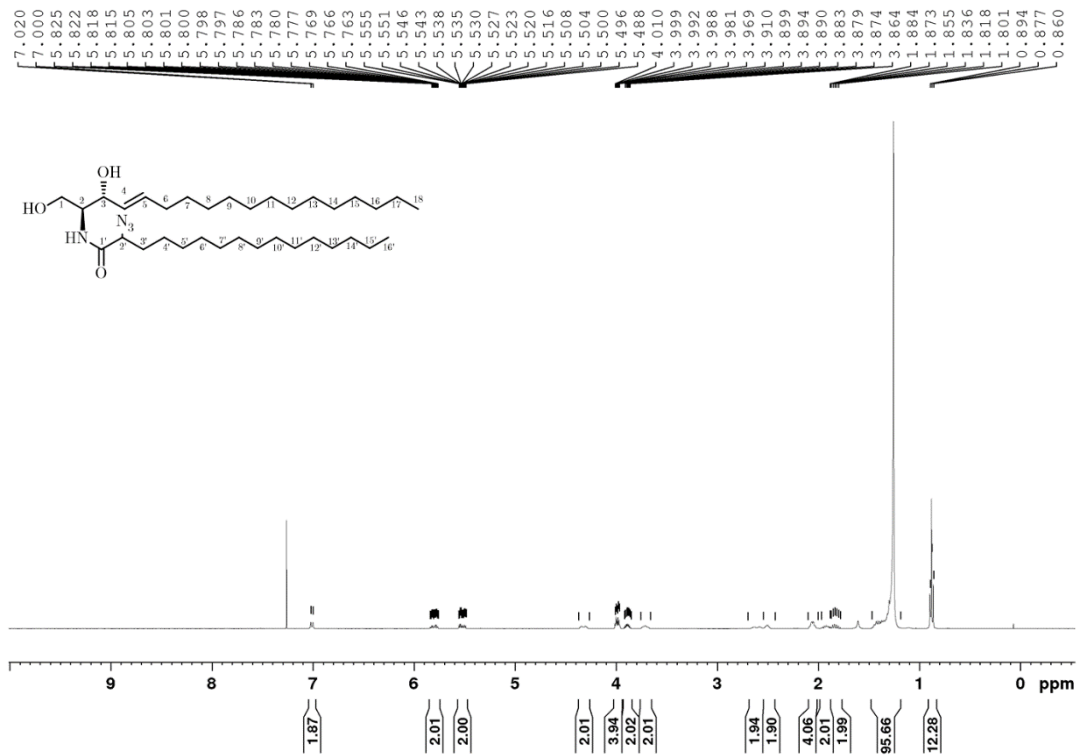
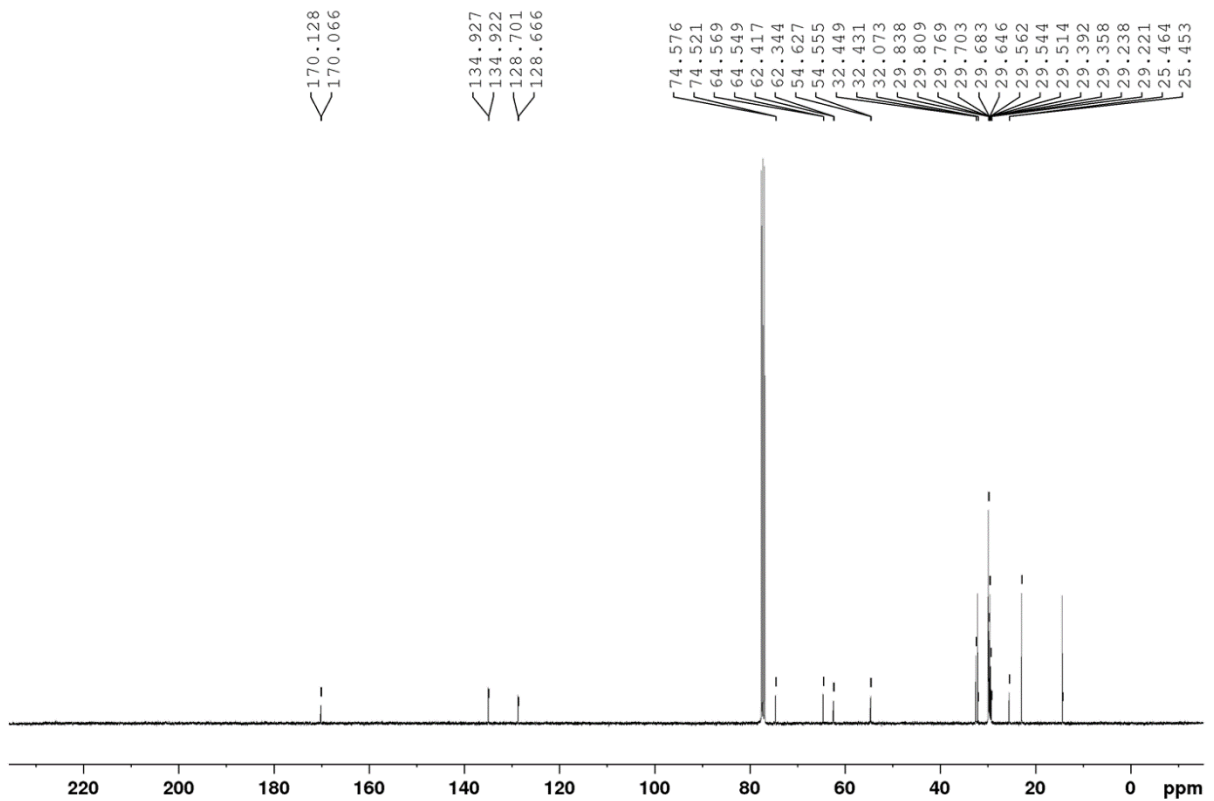
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **76a** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **76a**

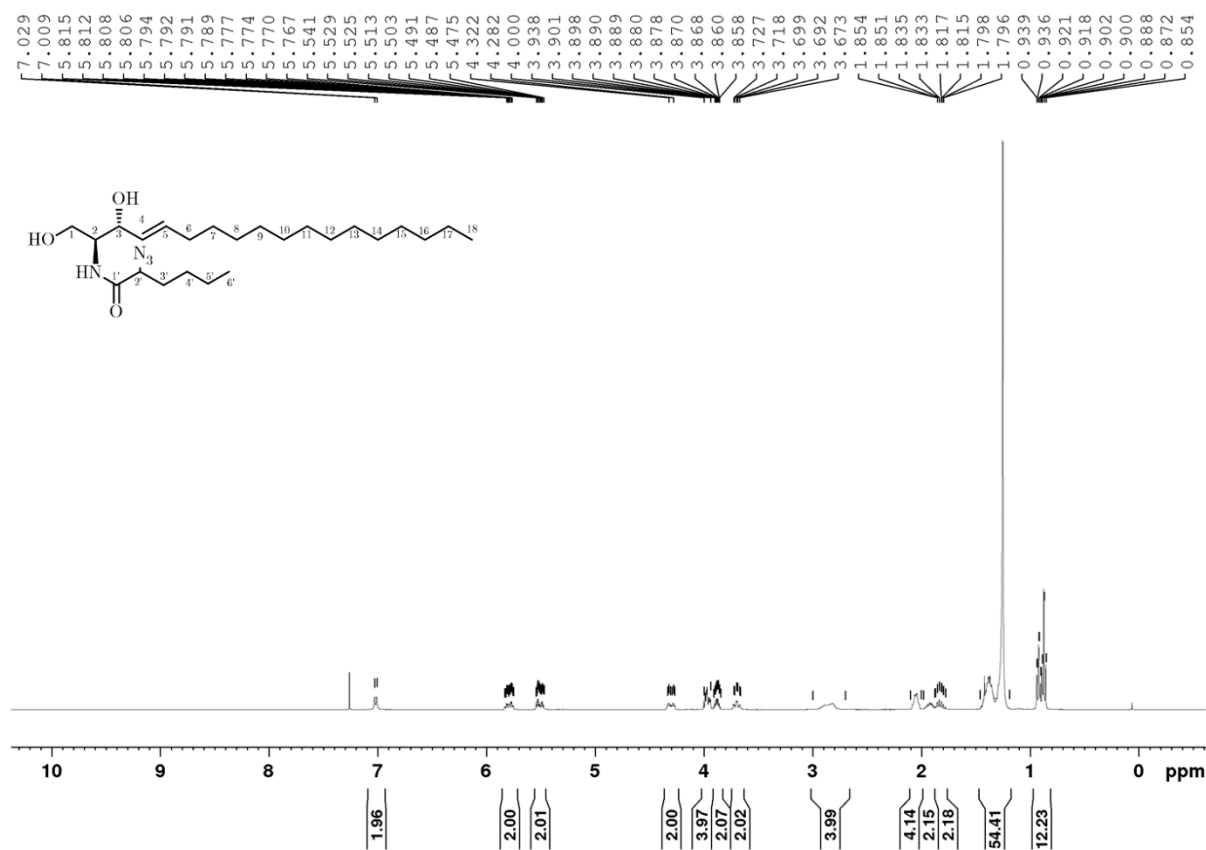
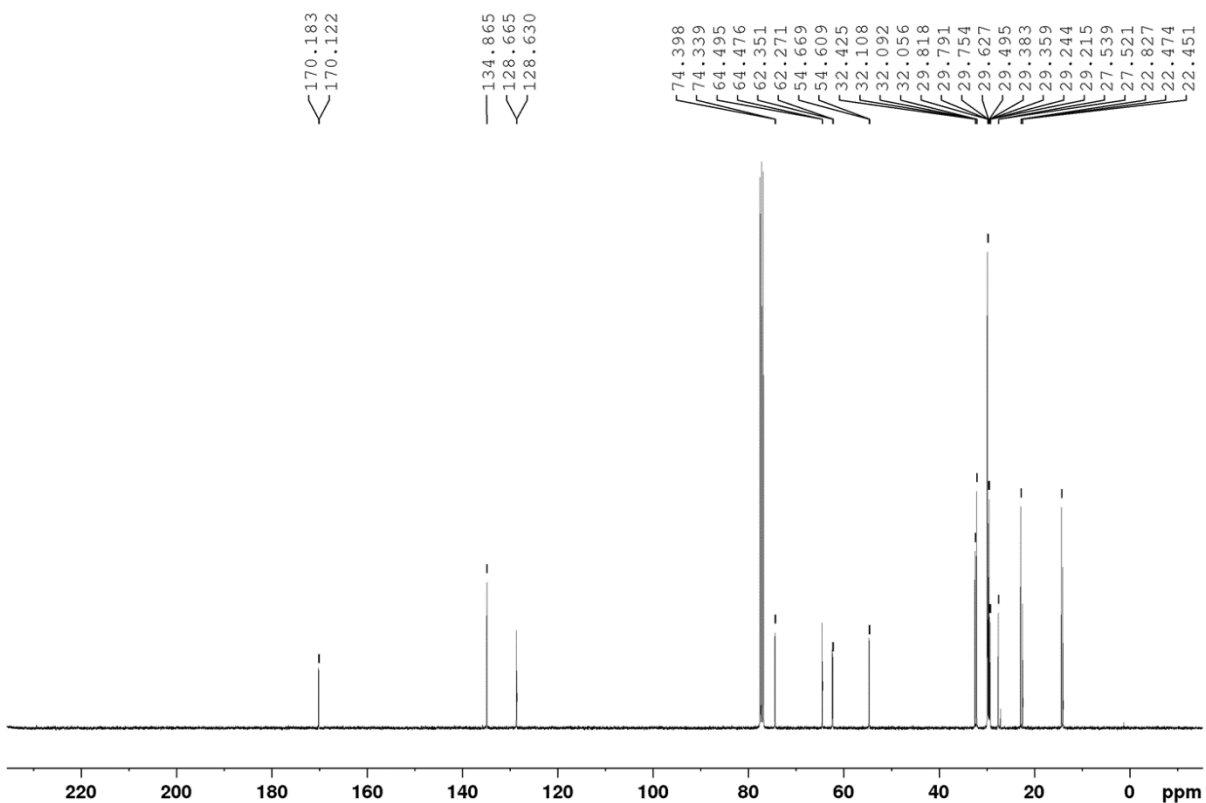
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **76b** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **76b**

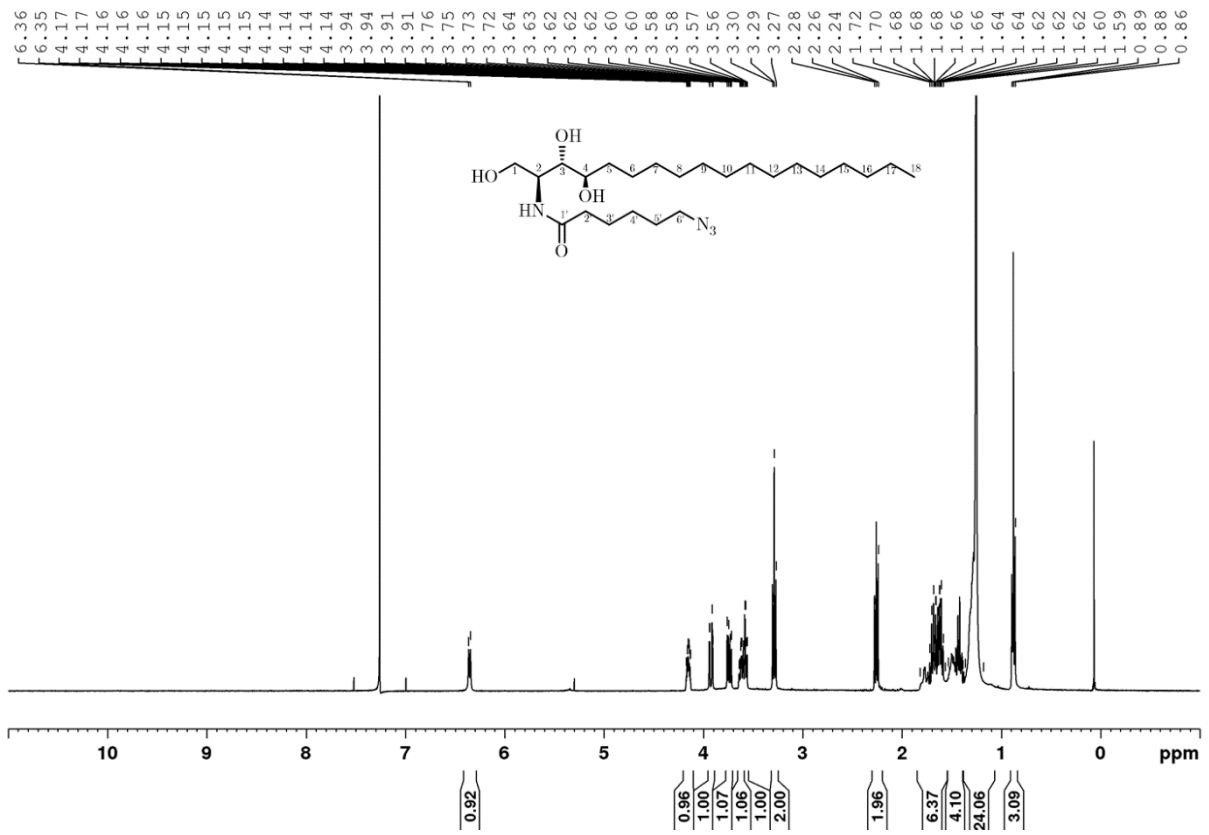
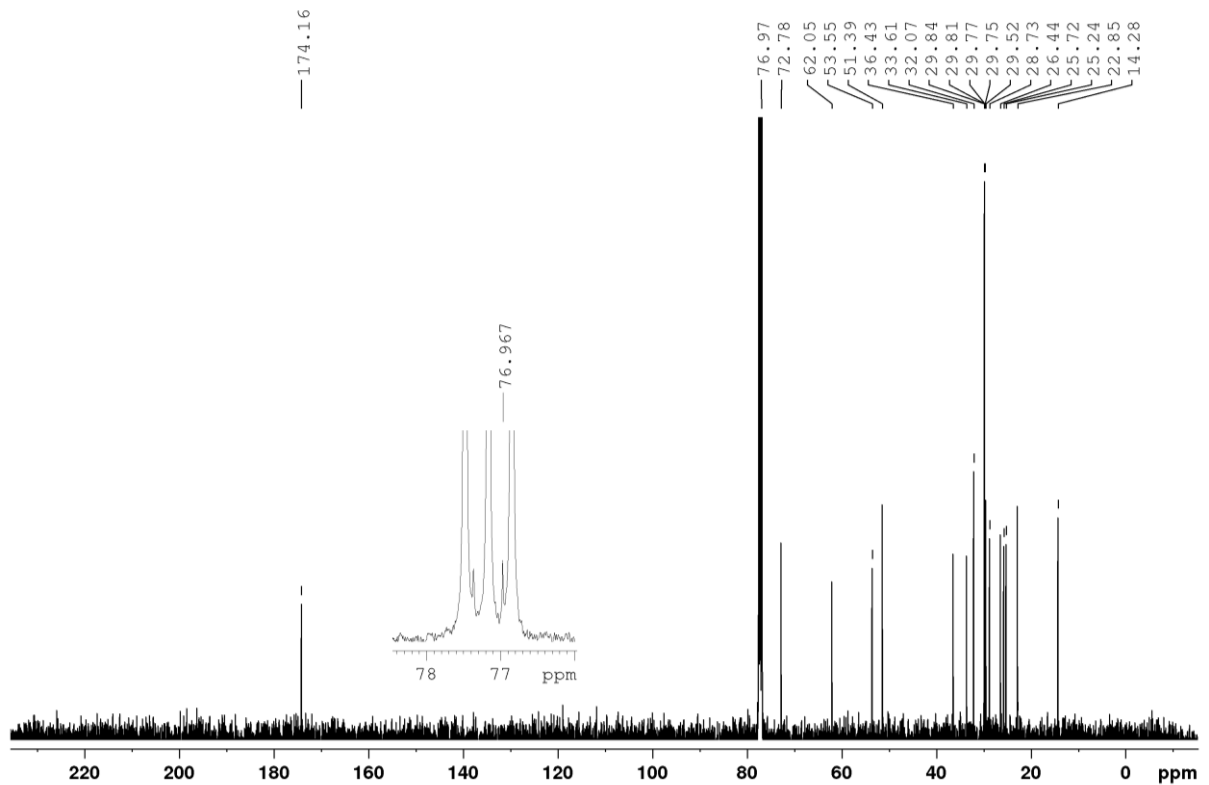
$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **22** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **22**

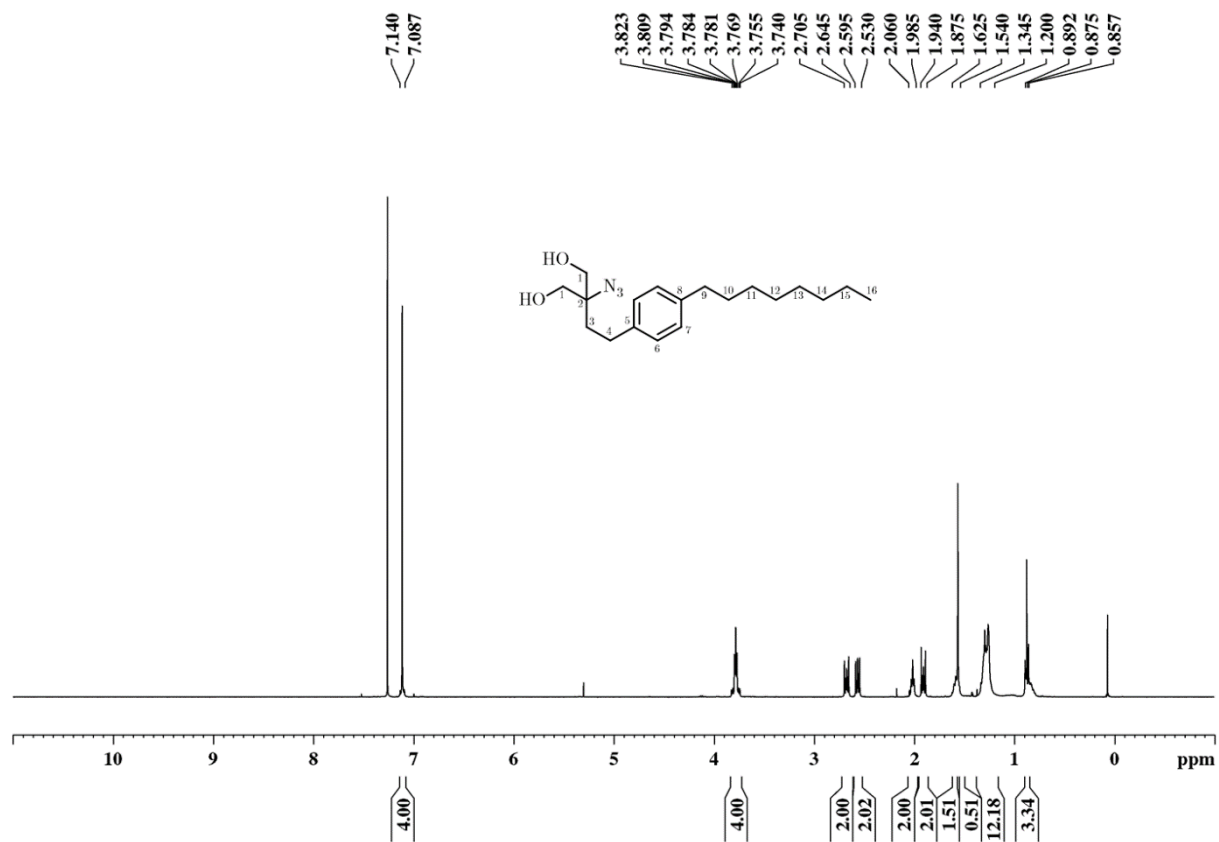
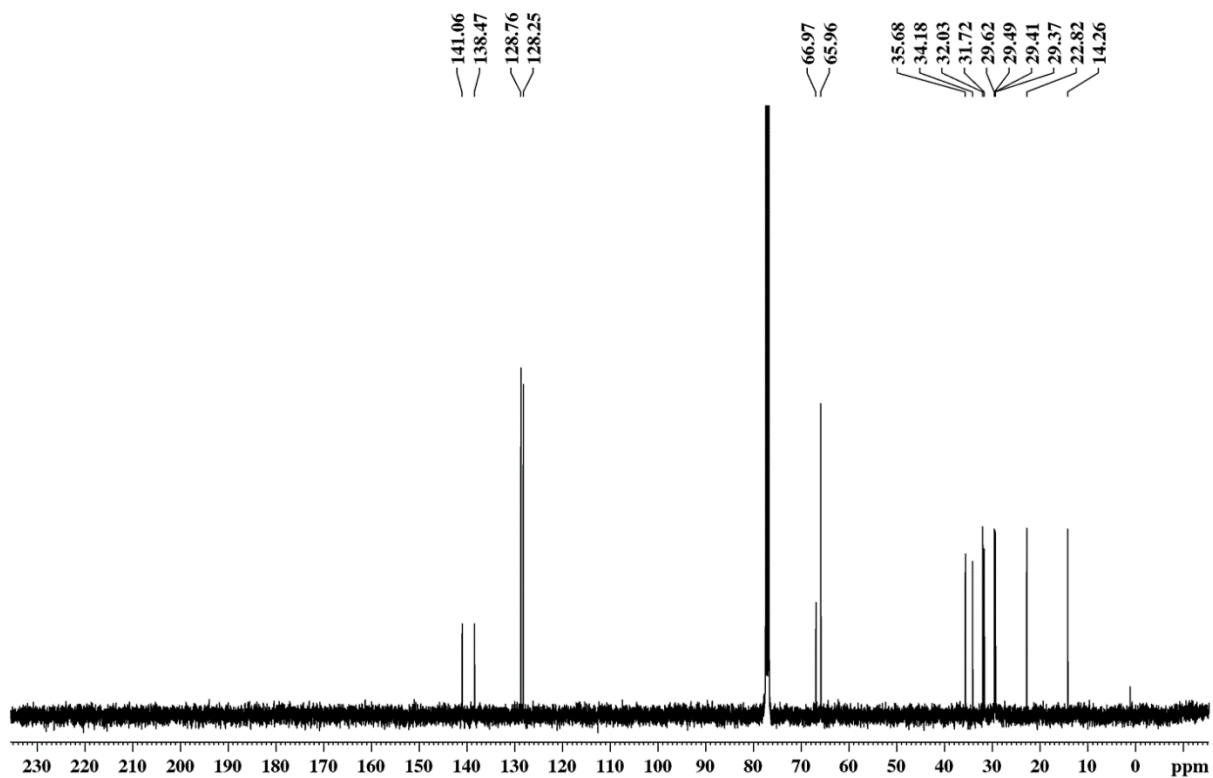
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 49 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 49

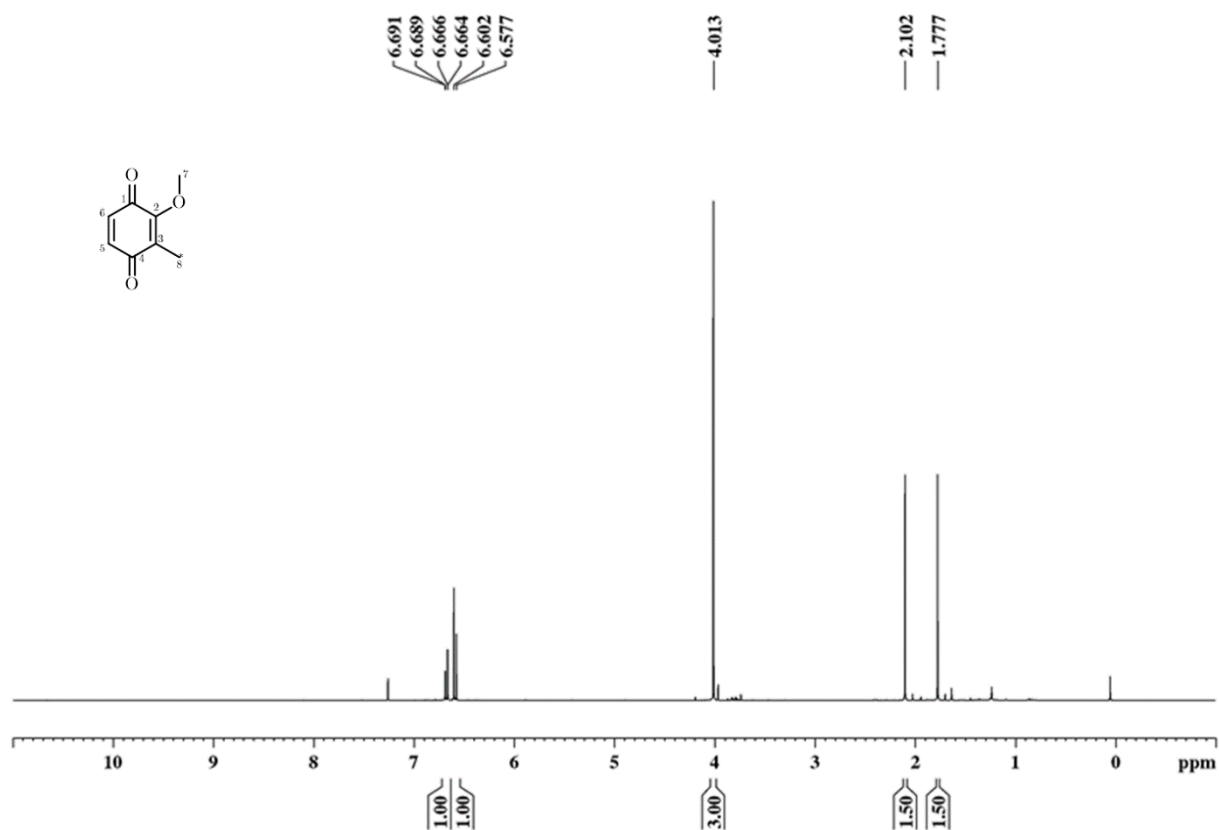
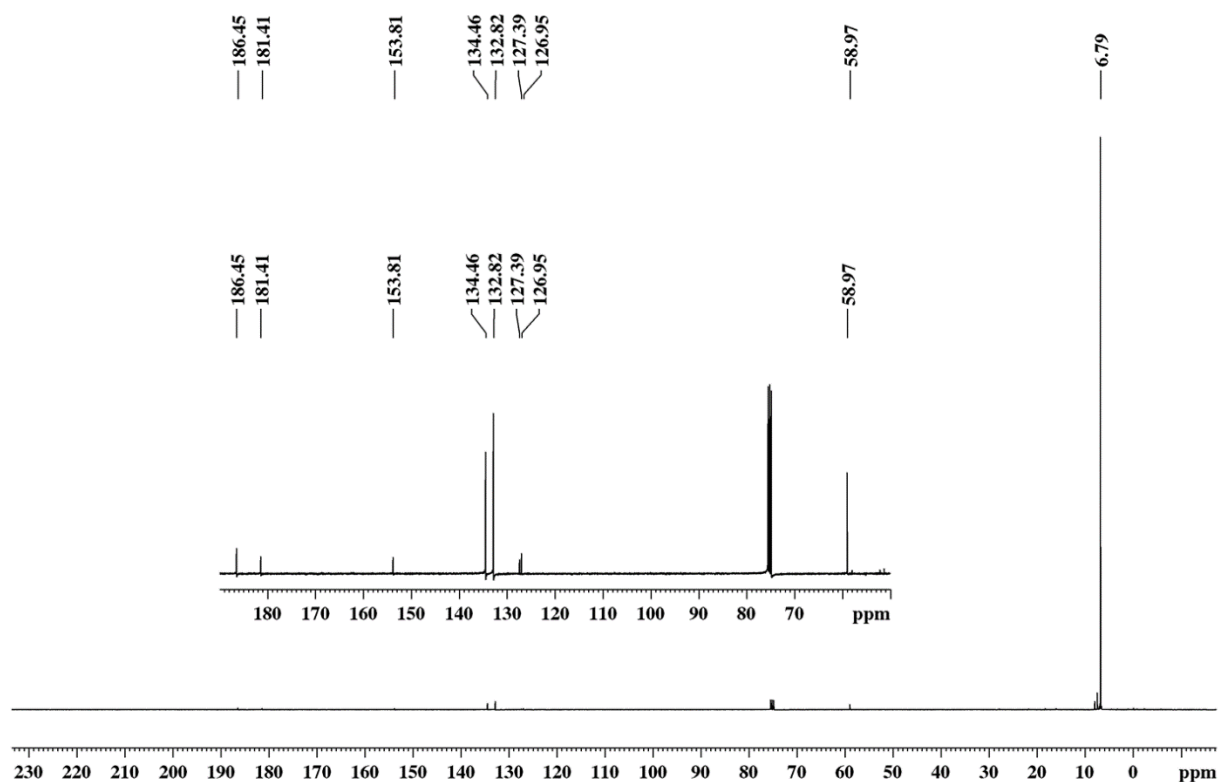
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **23** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **23**

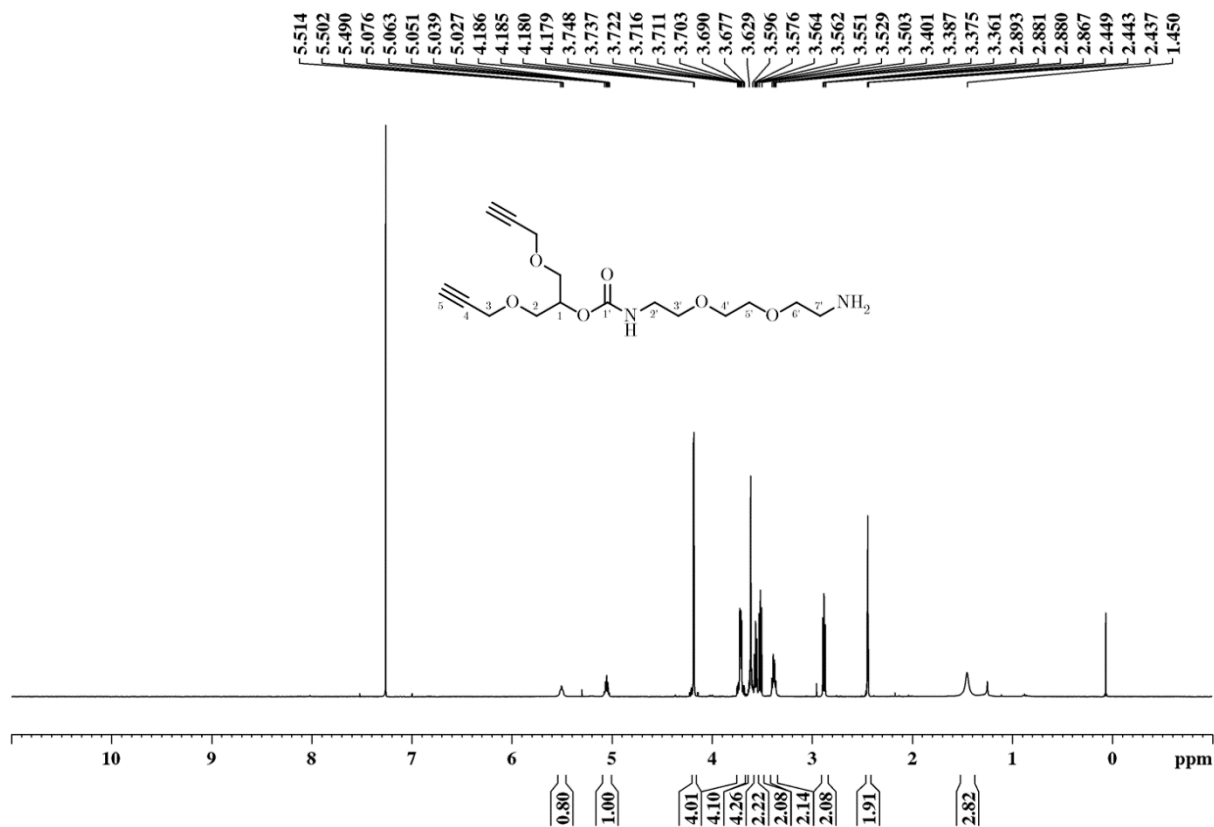
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **29** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **29**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **28** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **28**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **102** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **102**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **97** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **97**

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 111 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 111

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) **109** $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) **109**